

**Bedeutung des P2X7 Purinorezeptors und von Ekto-
ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) für die Reifung und
Funktion von antigenpräsentierenden Zellen der Maus
(*Mus musculus*; Linnaeus, 1758).**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Anette Braß

beim Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Universität Hamburg

Hamburg, Juni 2008

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. F. Haag
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Professor Dr. Iris Bruchhaus
Tag der Disputation: 29. August 2008

Hamburg, den 26. Juli 2008



Jörg Ganzhorn
Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Das adaptive Immunsystem	1
1.1.2	Die Reifung dendritischer Zellen	2
1.1.3	Die Aktivierung von T-Zellen	3
1.2	Purinrezeptoren	5
1.2.1	Die Familie der P2X-Rezeptoren	5
1.2.2	Der P2X7-Rezeptor	6
1.3	ADP-Ribosyltransferasen	9
1.3.1	Mono-ADP-Ribosyltransferasen bei Mensch und Maus	10
1.3.2	Die murine ART2	10
1.4	ATP und NAD	11
1.4.1	Signaltransduktion von ATP und NAD	11
1.4.2	ATP und NAD im Immunsystem	13
1.5	Zielsetzung der Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Materialien	15
2.1.1	Chemikalien	15
2.1.2	Antikörper	15
2.1.3	Zelllinien	15
2.1.4	Mausstämme	16
2.1.5	Materialien für zellbiologische Arbeiten	16
2.1.6	Materialien für molekularbiologische Arbeiten	17
2.1.7	Materialien für proteinchemische Arbeiten	17
2.1.8	Materialien für immunologische Arbeiten	18

2.1.9	Materialien für Aktivitätsuntersuchungen	18
2.2	Puffer und Medien	18
2.2.1	Puffer	18
2.2.2	Medien	19
2.3	Zellbiologische Methoden	20
2.3.1	Kultur von adhärenenten und Suspensionszellen	20
2.3.2	Herstellung GM-CSF-haltiger Überstände	21
2.3.3	Präparation muriner Lymphozyten aus Lymphknoten	21
2.3.4	Präparation muriner Milzzellen	22
2.3.5	Depletion einzelner Zellpopulationen	22
2.3.6	Präparation muriner Knochenmarkszellen	22
2.3.7	Differenzierung von Knochenmarkszellen zu dendritischen Zellen (BMDCs)	22
2.3.8	Differenzierung von Knochenmarkszellen zu Makrophagen (BMMs)	23
2.3.9	Präparation von Peritonealmakrophagen	23
2.3.10	Vorstimulation antigenpräsentierender Zellen	23
2.3.11	Gewinnung von Zellen aus dem Biogel-Modell	23
2.3.12	Vorstimulation primärer T-Zellen	24
2.4	Molekularbiologische Methoden	24
2.4.1	RNA-Präparation aus murinen Zellen	24
2.4.2	Herstellung von cDNA durch reverse Transkription	24
2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.4.4	Agarose-Gelelektrophorese	25
2.5	Proteinchemische Methoden	26
2.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
2.5.2	Coomassie-Färbung	26
2.5.3	Western-Blotting und Antikörpernachweis	26
2.5.4	Silberfärbung	27

2.5.5	Acetonfällung von Proteinen	27
2.6	Immunologische Methoden	27
2.6.1	ELISA	27
2.6.2	Antikörperanfärbung von Zellen und Analyse am Durchflusszytometer	28
2.6.3	Immunpräzipitation	28
2.6.4	Sekretion von IL-1 β	29
2.6.5	Interaktion zwischen APZ und T-Zelle	30
2.7	Aktivitätsuntersuchungen des P2X7-Rezeptors und der ARTs	31
2.7.1	PS-Externalisierung – Anfärbung mit AnnexinV	31
2.7.2	Porenbildung – Anfärbung mit YO-PRO-1 oder Ethidiumbromid	31
2.7.3	Calcium-Flux	31
2.7.4	Messung der ART-Aktivität – 1G4-Assay	32
2.7.5	Autoradiographie	32
3	Ergebnisse	34
3.1	Die Rolle des P2X7-Rezeptors auf antigenpräsentierenden Zellen	34
3.1.1	Charakterisierung der antigenpräsentierenden Zellen	34
3.1.2	Expression und Funktion des P2X7-Rezeptors auf antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen	36
3.1.3	Die Abhängigkeit der IL-1 β Sekretion von ATP	41
3.1.4	Modellsystem für die Interaktion zwischen antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen	42
3.1.5	Antigenabhängige Sekretion von Interleukinen	45
3.1.6	Einfluss von P2X7-Inhibitoren auf die Interleukin-Sekretion	49
3.1.7	Einfluss des P2X7-Rezeptors auf die Interleukin-Sekretion	50
3.1.8	Zusammenfassung der Untersuchungen zum P2X7-Rezeptor	52
3.2	Charakterisierung der ART-Aktivität auf unterschiedlichen Populationen antigenpräsentierender Zellen	53
3.2.1	Expression und Aktivität von ART2.1 auf Knochenmarksmakrophagen	53

3.2.2	Expression und Aktivität von ART2.1 auf weiteren antigenpräsentierenden Zellen	56
3.2.3	Vergleich der ART2.1-Expression und Aktivität zwischen verschiedenen Mausstämmen	58
3.2.4	Konzentrationsabhängigkeit der ART2.1-Aktivität	61
3.2.5	Zielproteine der ART2.1	62
3.2.6	Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ART2.1	63
3.2.7	Zusammenfassung der Untersuchungen der ART2.1	64
4	Diskussion	65
4.1	Die Rolle des P2X7-Rezeptors auf antigenpräsentierenden Zellen	65
4.1.1	Vergleich der Expression und Funktionalität des P2X7-Rezeptors auf antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen	65
4.1.2	Einfluss des P2X7-Rezeptors auf die Interaktion zwischen antigenpräsentierender Zelle und T-Zelle	66
4.2	Expression und Funktion der murinen ART2.1 auf antigenpräsentierenden Zellen	73
4.2.1	Expression der ART2.1 auf unterschiedlichen Populationen antigenpräsentierender Zellen	73
4.2.2	Zielproteine und mögliche Funktion der ART2.1 auf antigenpräsentierenden Zellen	77
4.3	Ausblick	78
5	Zusammenfassung	80
6	Abstract	82
7	Literaturverzeichnis	84

Abkürzungen und Anglizismen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ADPR	Adenosin-5'-diphosphoribose
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APZ	antigenpräsentierende Zelle
ART	ADP-Ribosyltransferase
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BMDC	aus dem Knochenmark ausdifferenzierte dendritische Zelle (<i>bone marrow derived dendritic cell</i>)
BMM	aus dem Knochenmark ausdifferenzierter Makrophage (<i>bone marrow derived macrophage</i>)
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BzATP	2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat
cADPR	zyklische ADP-Ribose
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF2 α	eukaryotischer Initiationsfaktor 2 α
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
E-NPP	Ekto-Nukleotidpyrophosphatasen/phosphodiesterasen
E-NTPD	Ekto-Nukleosidtriphosphatdiphosphohydrolasen
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinthiocyanat

FSC	Vorwärtsstreuung (<i>forward scatter</i>): gibt bei durchflusszytometrischen Analysen Aufschluss über die Größe der Zellen
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinsulfonat
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül (<i>intercellular adhesion molecule</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRF	Interferon-regulierender Faktor
JAK	Januskinase
KN62	(S)-5-Isoquinolinsulfonsäure 4-[2-[(5-isoquinolinylsulfonyl)methylamino]-3-oxo-3-(4-phenyl-1-piperazinyl)propyl]phenylester 1-[N,O-bis(5-Isoquinolinsulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazin
KO	gezielte Deaktivierung eines oder mehrerer Gene (<i>knockout</i>)
LFA	funktionelles Leukozytenantigen (<i>leukocyte functional antigen</i>)
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
M-CSF	Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MVB	multivesikuläre Strukturen (<i>multivesicular bodies</i>)
MyD88	<i>myeloid differentiation primary-response protein 88</i>
NAADP	Nikotinsäureadenindinukleotid-2'-phosphat
NAD	β-Nikotinamidadenindinukleotid
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NALP	<i>NACHT-, LRR- and pyrin-domain-containing protein</i>
NC	Nitrozellulose
NICD	NAD-induzierter Zelltod (<i>NAD-induced cell death</i>)
oATP	oxidiertes ATP: Adenosin-5'-triphosphat-2',3'-dialdehyd
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	entwicklungsgeschichtlich konserviertes Merkmal von Pathogenen (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PARP	Poly-ADP-Ribosylpolymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEM	Peritonealmakrophage (<i>peritoneal excudate macrophage</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration an H_3O^+ -Ionen
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	Rezeptor des adaptiven Immunsystems, der konservierte Strukturen von Pathogenen erkennt (<i>pattern recognition receptor</i>)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptions-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SSC	Seitwärtsstreuung (<i>side scatter</i>): gibt bei durchflusszytometrischen Analysen Aufschluss über die Granularität der Zellen
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TACE	Metalloprotease, die TNF- α von der Zelloberfläche abspaltet (<i>TNF-α converting enzyme</i>)
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumornekrosisfaktor
U0126	1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadien
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

Einbuchstaben-Bezeichnungen der Aminosäuren

Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Asparaginsäure	D
Cystein	C
Glutamin	Q
Glutaminsäure	E
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Friedrich Haag für die Überlassung des interessanten Arbeitsthemas und die hervorragende Betreuung auch in schwierigen Phasen der Arbeit.

Frau Prof. Iris Bruchhaus danke ich sehr für ihre Bereitschaft, diese Dissertation als Gutachterin zu lesen und zu bewerten.

Herrn Prof. Michel Seman und Herrn Dr. Sahil Adriouch möchte ich für die nette Aufnahme und die konstruktive Zusammenarbeit während meines Aufenthaltes in der Arbeitsgruppe „Physiopathologie et biothérapies des maladies inflammatoires et autoimmunes“ an der Université de Rouen danken.

Allen Mitarbeitern am Institut für Immunologie möchte ich für das hervorragende Arbeitsklima, hilfreiche Diskussionen, zahlreiche Tipps und viele nette Kaffeepausen danken.

Meinen Eltern und meinem Mann Thorsten Braß danke ich für die Unterstützung und die Ermutigung, die sie mir während des Studiums und der Promotionszeit zukommen ließen.

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Zum Schutz vor Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten besitzen Organismen ein Abwehrsystem, das als Immunsystem bezeichnet wird. In Vertebraten wird dieses komplexe System in angeborenes und adaptives Immunsystem unterteilt. Das angeborene Immunsystem umfasst neben zellulären Bestandteilen, wie Makrophagen (1) und neutrophilen Granulozyten (2) als phagozytierende Zellen und Natürlichen Killer Zellen (3) als zytotoxische Zellen, auch lösliche Faktoren, wie das Komplementsystem (4), Akut-Phase-Proteine (5), Zytokine und aggressive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen. Die angeborene Immunität richtet sich vor allem gegen entwicklungs geschichtlich konservierte Merkmale von Pathogenen.

Zu dem Immunsystem gehören auch die lymphatischen Organe, die eine große Anzahl Lymphozyten in einem Gerüst aus nicht-lymphatischen Zellen enthalten und in primäre und sekundäre lymphatische Organe unterteilt werden. Die Bildung und Reifung der Zellen des Immunsystems aus hämatopoetischen Stammzellen findet in den primären lymphatischen Organen statt, zu denen das Knochenmark und der Thymus zählen. Die sekundären lymphatischen Organe, welche die Milz, die Lymphknoten und die lymphatischen Gewebe der Schleimhäute umfassen, dienen in erster Linie der Initiation von Immunantworten und der Übermittlung von Überlebenssignalen (6).

1.1.1 Das adaptive Immunsystem

Die adaptive Immunität wird durch antigenspezifische T- und B-Zellen vermittelt, die jede einen Rezeptor einzigartiger Spezifität exprimieren. Die Erkennung definierter Strukturen, sogenannter Antigene, durch den Rezeptor führt zur klonalen Expansion spezifischer T- und B-Zellen, wodurch eine effektive Immunantwort ermöglicht wird (7). Im Rahmen dieser Immunantwort entstehen Gedächtniszellen, die bei einer erneuten Infektion mit demselben Erreger eine schnellere und effektivere Immunantwort auslösen (8).

Das adaptive Immunsystem lässt sich in die zelluläre und die humorale Immunität unterteilen. Unter der humoralen Immunantwort versteht man die Effektorfunktionen, die von den durch B-Zellen produzierten antigenspezifischen Antikörpern vermittelt werden. Die Antikörper dienen der Markierung (Opsonierung) von Pathogenen und Fremdkörpern für phagozytierende Zellen, der Neutralisierung oder der Aktivierung des

Komplementsystems. Die zelluläre Immunität umfasst die von T-Zellen vermittelten Regulator- und Effektorfunktionen.

Die T-Zellen werden anhand des exprimierten Korezeptors in CD8-positive zytotoxische T-Zellen und CD4-positive Helfer-T-Zellen unterteilt. T-Zellen erkennen ihr spezifisches Antigen nur in Zusammenhang mit Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen (MHC, *major histocompatibility complex*), von denen es zwei Klassen, MHC-I und MHC-II, gibt. Zytotoxische T-Zellen erkennen Peptide, die von MHC-I Molekülen präsentiert werden, während Helfer-T-Zellen Peptide erkennen, die von MHC-II Molekülen präsentiert werden. MHC-I Moleküle werden von jeder kernhaltigen Zelle exprimiert, MHC-II Moleküle hingegen nur von sogenannten professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APZs). Auf MHC-II Molekülen werden Peptide präsentiert, die von durch Phagozytose oder Pinozytose aufgenommenen Proteinen stammen. Zu den professionellen APZs zählen B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen, wobei reife dendritische Zellen die effizientesten Aktivatoren von T-Zellen sind (6).

1.1.2 Die Reifung dendritischer Zellen

Unreife dendritische Zellen exprimieren eine Vielzahl an Rezeptoren (PRRs, *pattern-recognition receptors*), mit deren Hilfe sie entwicklungs geschichtlich konservierte Merkmale von Pathogenen (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*) erkennen können. Die prominentesten Vertreter dieser PRRs sind die sogenannten *Toll-like* Rezeptoren (TLRs). Die Aktivierung der unreifen dendritischen Zelle erfolgt, wenn sie in der Peripherie durch Phagozytose oder Pinozytose aufgenommene Antigene mit Hilfe der PRRs als solche erkennt. Eine Aktivierung unreifer dendritischer Zellen kann auch durch Zytokine erfolgen, die im Verlauf einer Entzündungsreaktion von aktivierten Makrophagen sezerniert werden. Die dadurch ausgelösten Signaltransduktionsprozesse innerhalb der Zelle führen zu ihrer Reifung und damit einhergehend zu einer veränderten Expression von Oberflächenmolekülen und der Sekretion von Zytokinen und Chemokinen (9). So wird die Expression von MHC-II Molekülen, die der Präsentation von Peptiden dienen, und von kostimulatorischen Molekülen der B7-Familie CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) verstärkt. Gleichzeitig wird die Expression von Rezeptoren, die der Phagozytose dienen, minimiert. Die reife dendritische Zelle wandert in den nächstgelegenen Lymphknoten ein, um dort das aufgenommene Antigen zu präsentieren und antigenspezifische T-Zellen zu aktivieren (10).

Am Ende ihrer Lebensdauer wandern nicht aktivierte, unreife dendritische Zellen ebenfalls in die lymphatischen Organe ein, wo sie T-Zellen Selbst-Peptid/MHC-Komplexe

präsentieren. Erkennt eine naive T-Zelle dieses Selbst-Peptid, kommt es aufgrund fehlender kostimulatorischer Signale nur zu einer partiellen Aktivierung der T-Zelle, die letztendlich zur Apoptose oder Anergie der T-Zelle führt. Anerge T-Zellen können auch bei optimaler Stimulation nicht mehr durch ihr spezifisches Antigen aktiviert werden (11). Dies trägt zur peripheren Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen bei.

1.1.3 Die Aktivierung von T-Zellen

T-Zellen verlassen den Thymus nach ihrer Reifung als naive, einfach CD4- oder CD8-positive T-Zellen und zirkulieren über die Blut- und Lymphgefäße durch die sekundären Lymphorgane (12). Der Eintritt in die peripheren Lymphknoten wird durch von den T-Zellen exprimierte Oberflächenmoleküle, wie dem L-Selektin CD62L und dem Chemokinrezeptor CCR7, vermittelt (13-15). In den T-Zell-Zonen der lymphatischen Gewebe kommt es zur Interaktion zwischen naiven T-Zellen und APZs. Der Kontakt zwischen APZ und T-Zelle wird zunächst über Adhäsionsmoleküle (LFA-1, CD2, ICAM-1, LFA-3) hergestellt, bevor es zu einer Interaktion zwischen Peptid/MHC-Komplex und T-Zell-Rezeptor kommt (16). Durch niederaffine Interaktionen des T-Zell-Rezeptors mit Selbst-Peptid/MHC-Komplexen auf APZs werden den naiven T-Zellen Überlebenssignale vermittelt (17, 18).

Erkennt eine naive T-Zelle während ihrer Wanderung durch die lymphatischen Gewebe ihr spezifisches Antigen auf einer aktivierten dendritischen Zelle, so bildet sich zunächst ein stabiler Kontakt zwischen dem T-Zell-Rezeptor und dem Korezeptor CD4 bzw. CD8 der T-Zelle und dem Peptid/MHC-Komplex der APZ. Zur vollständigen Aktivierung der T-Zelle wird ein weiteres Signal benötigt, das über die von der APZ exprimierten, kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 vermittelt wird (19, 20). Stimulatorische Signale werden über die Interaktion von CD80 und CD86 mit dem CD28-Molekül auf naiven T-Zellen ins Zellinnere weitergeleitet. Die Aktivierung der T-Zelle führt zur Expression weiterer Moleküle die das kostimulatorische Signal modifizieren können. So wird von aktivierten T-Zellen CD152, ein mit CD28 verwandter Rezeptor für CD80 und CD86 exprimiert, der inhibitorische Signale weiterleitet und so die Proliferation der aktivierten T-Zelle begrenzt (Abb. 1.1).

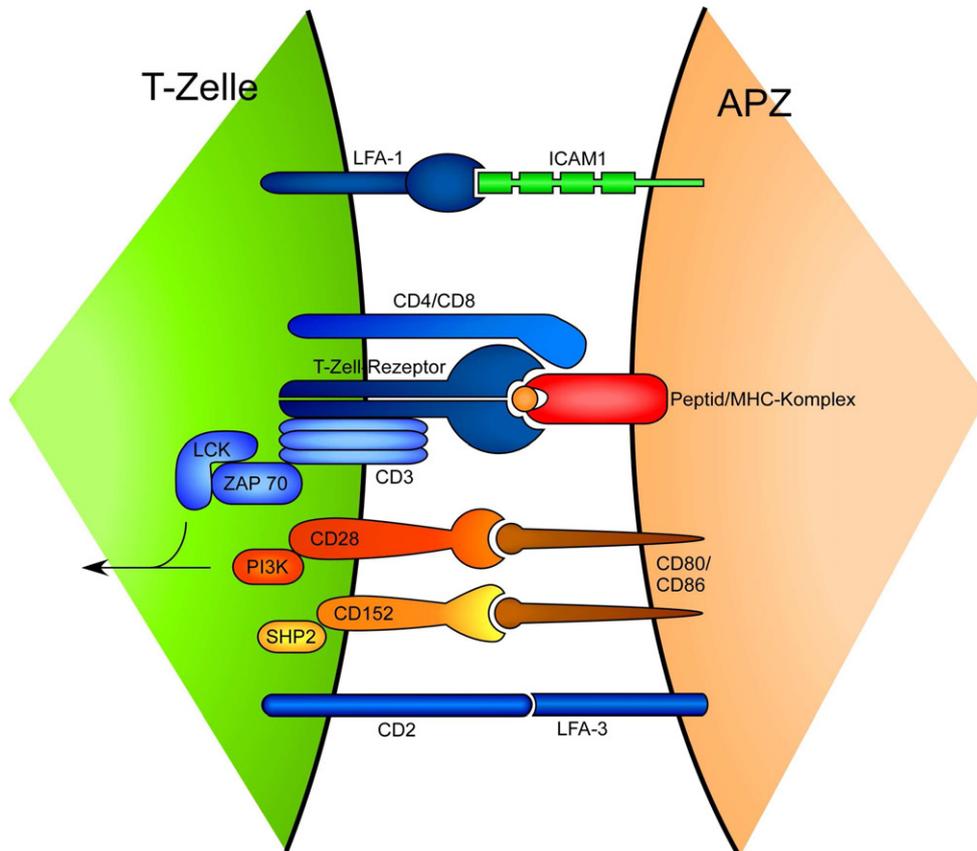


Abb. 1.1: *Schematische Darstellung einer immunologischen Synapse (modifiziert nach Huppa et al (21)). Im Zentrum steht der Kontakt des Peptid/MHC-Komplexes der APZ mit dem T-Zell-Rezeptor und dem Korezeptor der T-Zelle. Die Interaktion von CD80 bzw. CD86 mit CD28 oder CD152 vermittelt zusätzliche stimulatorische oder inhibitorische Signale. Adhäsionsmoleküle wie LFA-1, ICAM1, LFA-3 und CD2 dienen der Ausbildung und Stabilisierung des Zell-Zell-Kontaktes. LFA (leukocyte functional antigen), ICAM (intercellular cell adhesion molecule), LCK (Tyrosinkinase der Src-Familie), ZAP 70 (ζ -chain-associated protein 70), PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase), SHP2 (Src homology 2-domain containing protein tyrosine phosphatase 2).*

Die vollständige Aktivierung der T-Zelle führt zur Expression des sowohl autokrin als auch parakrin wirkenden Zytokins und Wachstumsfaktors IL-2 und des funktionellen IL-2 Rezeptors, wodurch die Proliferation der T-Zelle ausgelöst wird (22). Bedingt durch Veränderungen in der Expression ihrer Oberflächenmoleküle verlassen aktivierte T-Zellen nach der klonalen Expansion die lymphatischen Gewebe und wandern zum Inflammationsort. Nach dem Abklingen der Entzündungsreaktion wird der größte Teil der aktivierten T-Zellen mittels Apoptose eliminiert; nur ein kleiner Teil bleibt als Gedächtnis T-Zellen erhalten.

1.2 Purinrezeptoren

Die Existenz von Rezeptoren für extrazelluläre Purin-Nukleotide wurde erstmals 1976 postuliert. Hierbei wurde zunächst zwischen Rezeptoren für Adenosin und Adenosin-5'-triphosphat (ATP) unterschieden, die heute als P1-Rezeptoren (Adenosin) und P2-Rezeptoren (ATP) bekannt sind (23). Aufgrund molekularbiologischer und pharmakologischer Untersuchungen wurden die P2-Rezeptoren weiter in P2X- und P2Y-Rezeptoren unterteilt. Die P2X-Rezeptoren sind Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, während es sich bei den P2Y-Rezeptoren um G-Protein-gekoppelte 7-Transmembran-Rezeptoren handelt (24, 25). Bis heute sind bei Säugetieren sieben Mitglieder der P2X-Familie und acht Mitglieder der P2Y-Familie identifiziert, die Purin- und teilweise auch Pyrimidin-Nukleotide erkennen (26, 27).

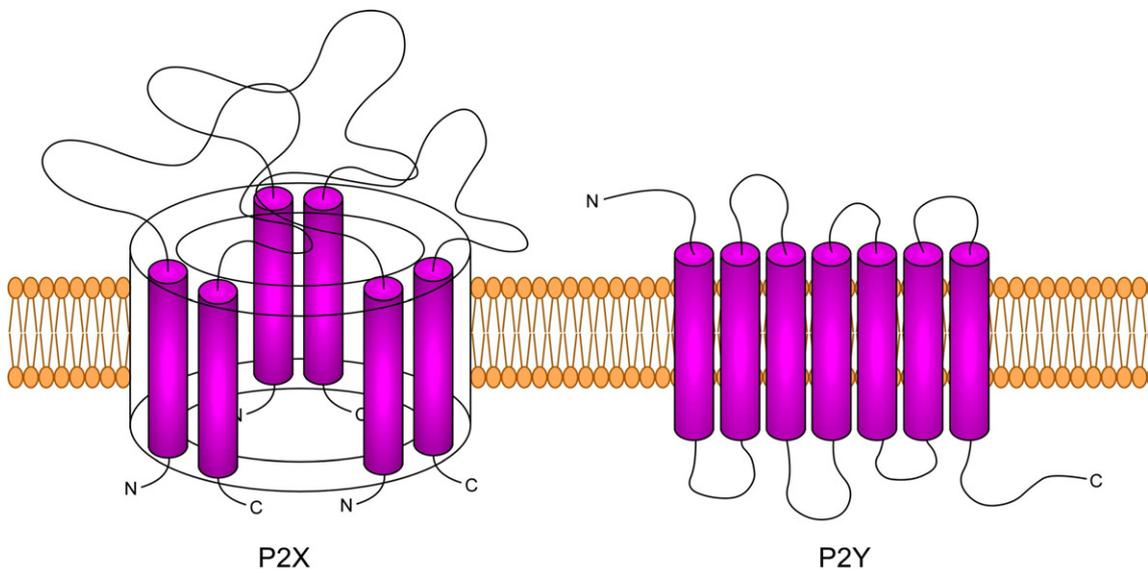


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der P2X- und P2Y-Rezeptoren. Der Ionenkanal der P2X-Rezeptoren wird aus drei Untereinheiten gebildet, P2Y-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte 7-Trans-membranrezeptoren.

1.2.1 Die Familie der P2X-Rezeptoren

Die Familie der P2X-Rezeptoren umfasst sieben Mitglieder, P2X1 bis P2X7, die als Untereinheiten ATP-gesteuerte Ionenkanäle bilden. Der Ionenkanal ist für mono- und divalente Kationen (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) permeabel und besteht aus drei Untereinheiten (Abb. 1.2), wobei die Bildung homo- und heterotrimerer Rezeptoren nachgewiesen werden konnte (27). P2X-Rezeptoren werden in nahezu allen Geweben exprimiert, unter anderem auch auf hämatopoetischen Zellen (26, 28).

Die Untereinheiten haben eine Größe von 384 (P2X4) bis 595 Aminosäuren (P2X7) und besitzen auf Proteinebene eine 30 bis 50%ige Sequenzidentität. Neben eines kurzen intrazellulären N- und C-Terminus und zweier Transmembrandomänen besteht der Hauptteil einer jeden Untereinheit aus einer großen extrazellulären Schleife, die die ATP-Bindungsstelle beinhaltet. Im extrazellulären Teil sind neben zehn konservierten Cysteinresten, die durch die Ausbildung von Disulfidbrücken die Tertiärstruktur stabilisieren, zwei bis sechs Konsensussequenzen für die N-Glykosylierung lokalisiert (26, 29).

Die Bindung von ATP an den Rezeptor führt zur Öffnung des Ionenkanals durch Konformationsänderungen. Hierbei gibt es deutliche Unterschiede in der Sensitivität der einzelnen Rezeptoren gegenüber ihrem Liganden. So liegt die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) für den Ratten-P2X3 bei $1 \mu\text{M}$ und für den Ratten-P2X7 bei $100 \mu\text{M}$ ATP. Die Öffnung des Ionenkanals hat einen schnellen Einstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen, sowie einen Ausstrom von K^+ -Ionen zur Folge, wodurch es zu einer Depolarisierung der Zellmembran und einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kommt. Dies führt zur Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionsprozesse, die noch nicht vollständig aufgeklärt sind (30).

1.2.2 Der P2X7-Rezeptor

P2X7 unterscheidet sich von den anderen Mitgliedern der P2X-Familie in mehrfacher Hinsicht. So besitzt P2X7 einen mit 244 Aminosäuren deutlich längeren intrazellulären C-Terminus und galt lange Zeit als die einzige Untereinheit, die ausschließlich homotrimere Rezeptoren bildet. Neueste Untersuchungen deuten jedoch auf die Existenz funktioneller P2X4/P2X7 Heteromere hin (31). Der homotrimere P2X7-Rezeptor benötigt zur Aktivierung hohe ATP-Konzentrationen von über $100 \mu\text{M}$. Die Aktivierung des Rezeptors führt, wie bei den anderen P2X-Rezeptoren auch, zur Öffnung eines Ionenkanals, der für Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Ionen permeabel ist. Da der P2X7-Rezeptor nicht desensitiviert wird, bleibt der Ionenkanal geöffnet, solange ATP als Ligand gebunden ist (27). Der Öffnung des Ionenkanals innerhalb von Millisekunden folgt die Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran sowie der Verlust von CD23 und CD62L auf der Zelloberfläche durch die Aktivität von Metalloproteasen (32). Eine länger andauernde Aktivierung des Rezeptors hat die Bildung einer Pore zur Folge, die für Moleküle bis zu einer Größe von 900 Da durchlässig ist. Diese Pore kann durch die Diffusion fluoreszierender Farbstoffe in die Zelle nachgewiesen werden. Einige Mausstämme besitzen eine Punktmutation an der Aminosäureposition 451 des intrazellulären C-Terminus (P451L), die zu einer stark reduzierten Sensitivität gegenüber der ATP-vermittelten Porenbildung führt (33). Die

Frage, ob die Pore von P2X7 selbst oder von einem weiteren Protein gebildet wird, das durch den P2X7-Rezeptor aktiviert wird, wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Neuere Untersuchungen zeigten, dass Pannexin-1, ein Membranprotein, das strukturelle Ähnlichkeiten mit den Connexinen aufweist, für die Bildung der Pore verantwortlich ist. Der genaue Mechanismus, der zur Bildung der Pore führt, ist jedoch noch ungeklärt (34).

Die dauerhafte Aktivierung des P2X7-Rezeptors hat letztendlich den Tod der Zelle durch Apoptose zur Folge (35). Auf murinen T-Zellen kann der Zelltod nicht nur durch ATP, sondern auch durch β -Nikotinamidadenindinukleotid (NAD) ausgelöst werden; ein Mechanismus der als NAD-induzierter Zelltod (NICD, *NAD induced cell death*) bezeichnet wird (36). Beim NICD wird der P2X7-Rezeptor durch die ebenfalls auf murinen T-Zellen exprimierte ADP-Ribosyltransferase ART2.2 modifiziert. Dabei wird die ADP-Ribosegruppe des NAD auf den P2X7-Rezeptor übertragen und fungiert als kovalent gebundener Ligand, der den Rezeptor dauerhaft aktiviert und somit zum Zelltod führt (37).

Der P2X7-Rezeptor ist insbesondere auf Makrophagen intensiv untersucht worden, wo seine Aktivierung die Prozessierung und Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β zur Folge hat (Abb. 1.3). Das IL-1 β gehört wie IL-1 α , IL-1Ra und IL-18 zur IL-1 Familie und wird als inaktive Vorstufe ohne Leaderpeptid synthetisiert und im Zytosol gespeichert. Die Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ATP führt über noch nicht genau geklärte Mechanismen zur Aktivierung der Caspase-1, die die inaktive 33 kDa Vorform des IL-1 β zur biologisch aktiven 17 kDa Form spaltet (38). Pannexin-1, das die durch Aktivierung des P2X7-Rezeptors vermittelte Pore bildet, ist auch an der Signaltransduktion beteiligt, die vom P2X7-Rezeptor zur Aktivierung des Inflammasoms und damit der Caspase-1 führt (34). Das Inflammasom ist ein Multiproteinkomplex, der aus Mitgliedern der intrazellulären NLR- (*NOD-like receptors*)-Familie (NALP1, NALP3, IPAF, NAIP), dem Adaptorprotein ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), sowie inflammatorischen Caspasen gebildet wird (39, 40). Für die Freisetzung des prozessierten IL-1 β werden mehrere Mechanismen vorgeschlagen. Erste Hypothesen forderten die Freisetzung von IL-1 β durch apoptotische Zellyse (41) und den direkten Export über Membrantransporter (42). Weitere Modelle enthalten die Prozessierung und Freisetzung des IL-1 β in Mikrosomikeln und sekretorischen Lysosomen, in denen der Verringerung der intrazellulären K⁺-Konzentration durch die Aktivierung des P2X7-Rezeptors eine zentrale Rolle zukommt (43, 44).

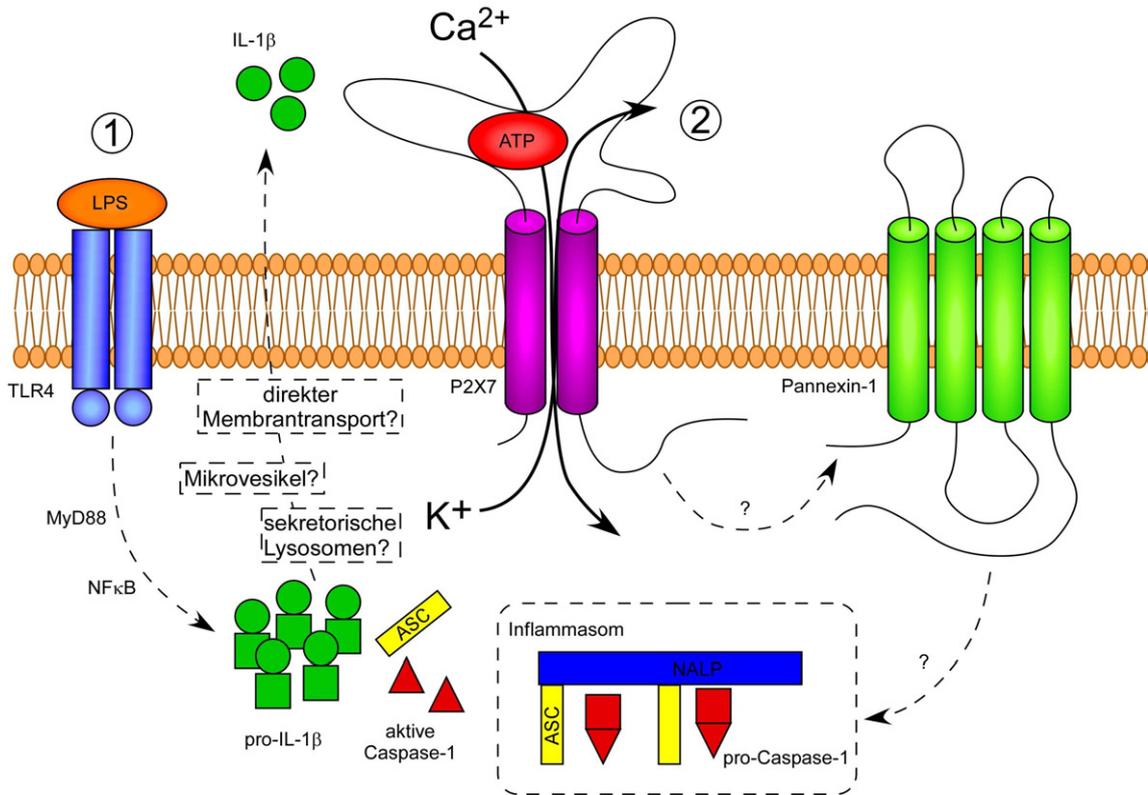


Abb. 1.3: Schematische Darstellung zur Synthese, Prozessierung und Freisetzung von IL-1 β . Das erste Signal, die Stimulation der Zelle über Lipopolysaccharid (LPS) und Toll-like receptor 4 (TLR4), führt zur Synthese des pro-IL-1 β , das im Zytosol akkumuliert (1). Das zweite Signal, die Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ATP-Bindung, führt über Pannexin-1 zur Aktivierung des Inflammasoms (2). Das Inflammasom löst die Aktivierung der Caspase-1 aus, die pro-IL-1 β zu aktivem IL-1 β spaltet. Für die Freisetzung des IL-1 β werden mehrere Wege vorgeschlagen. NALP (NACHT-, LRR- and pyrin-domain-containing protein), ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88), NF κ B (nuclear factor κ B).

Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Prozessierung des pro-IL-1 β im Zytosol erfolgt (45). Die Frage nach dem Mechanismus der Sekretion ist noch immer ungeklärt. Ein weiterer Sekretionsweg der in diesem Zusammenhang diskutiert wird, ist die Freisetzung des IL-1 β über multivesikuläre Strukturen, sogenannte MVBs (*multivesicular bodies*). Dabei kommt es zur Akkumulation des Inflammasoms und unprozessierten IL-1 β in der Nähe von rezirkulierenden Endosomen (*recycling endosomes*) aus denen sich MVBs bilden. Diese enthalten Exosomen, in denen neben IL-1 β auch Bestandteile des Inflammasoms und Membranproteine lokalisiert sind und die durch Fusion der MVBs mit der Plasmamembran in den extrazellulären Raum freigesetzt werden (46). Exosomen sind kleine Membranvesikel mit einem Durchmesser von 50 bis 100 nm und werden unter anderem von dendritischen Zellen abgegeben. Exosomen dendritischer Zellen enthalten in ihrer Membran auch MHC-II Moleküle und können so eine Rolle in der Aktivierung naiver T-Zellen übernehmen (47, 48).

1.3 ADP-Ribosyltransferasen

Als ADP-Ribosyltransferasen bezeichnet man Enzyme, die die ADP-Ribosegruppe von β -Nikotinamidadenindinukleotid (NAD) unter Abspaltung von Nikotinamid auf eine spezifische Zielaminosäure übertragen (Abb. 1.4). Hierbei handelt es sich um eine reversible posttranslationale Modifikation, ähnlich der Phosphorylierung. Man unterscheidet Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs), die eine ADP-Ribosegruppe übertragen und Poly-ADP-Ribosylpolymerasen (PARPs), die bis zu 400 untereinander verzweigte ADP-Ribosegruppen auf das Zielprotein übertragen (49). Als Zielaminosäuren können Arginin, Cystein, Asparagin, Diphthamid (ein modifiziertes Histidin) und Glutamat fungieren. Die Spezifität ist von der ADP-Ribosyltransferase abhängig, die meisten ARTs der Vertebraten sind Arginin-spezifisch (50). Einige ARTs, wie die Ratten-ART2, können die ADP-Ribosegruppe zusätzlich auf Wasser übertragen und besitzen somit eine NAD-Glykohydrolaseaktivität (51).

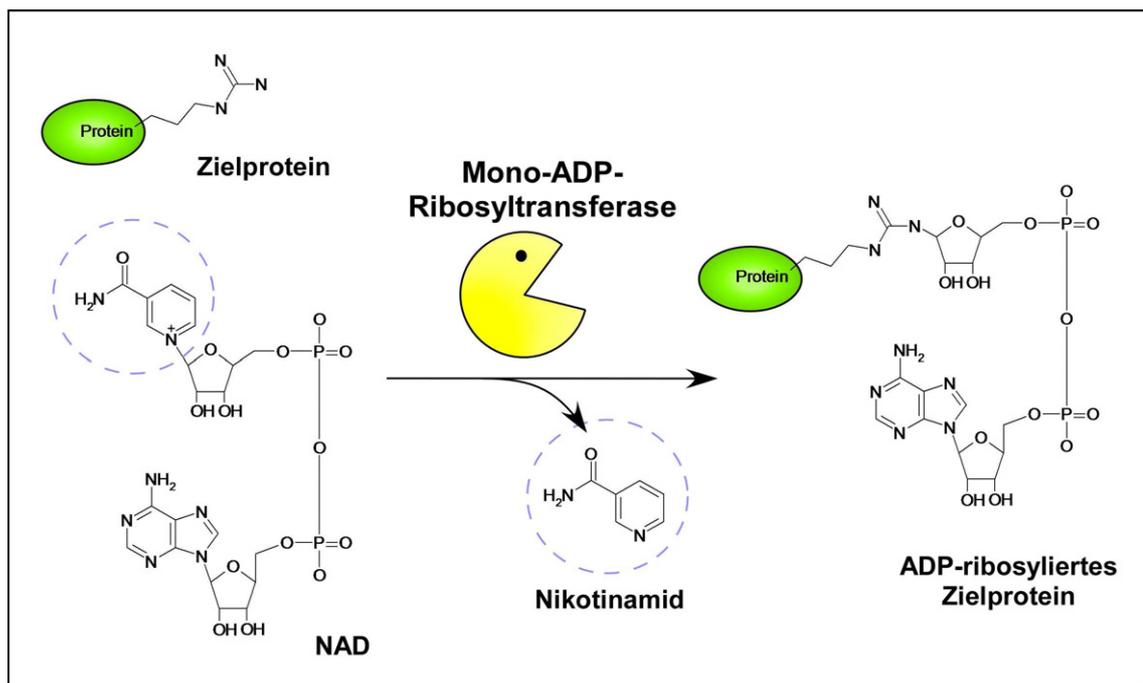


Abb. 1.4: Arginin-spezifische ADP-Ribosylierung durch eine Mono-ADP-Ribosyltransferase (ART). Die ADP-Ribosegruppe des Nikotinamidadenindinukleotids (NAD) wird unter Abspaltung von Nikotinamid auf ein Arginin des Zielproteins übertragen. In Anlehnung an die 3D-Struktur der Ratten-ART2 wird die ART durch einen „Pacman“ symbolisiert.

Die prominentesten Vertreter der ARTs sind bakterielle Toxine, die in Säugetierzellen durch Mono-ADP-Ribosylierung heterotrimerer G-Proteine (Choleratoxin aus *Vibrio cholera*, Pertussistoxin aus *Bordatella pertussis*), GTP-bindender Proteine wie Ras und Rho (Exotoxin S aus *Pseudomonas aeruginosa*, C3 Exotoxin aus *Clostridium botuli-*

num) oder ATP-bindender Proteine wie Aktin (SpvB aus *Salmonella enterica*, C2 Toxin aus *Clostridium botulinum*) die Signaltransduktion inhibieren oder die Zytoskelett-Organisation beeinflussen (52, 53).

1.3.1 Mono-ADP-Ribosyltransferasen bei Mensch und Maus

Die erste in Vertebraten nachgewiesene Mono-ADP-Ribosyltransferase war die ART1 aus dem Skelettmuskel des Kaninchens (54). Seitdem wurde eine ganze Familie verwandter, Arginin-spezifischer ARTs kloniert, die beim Menschen vier (ART1, ART3, ART4, ART5) und bei der Maus sechs (ART1, ART2.1, ART2.2, ART3, ART4, ART5) Mitglieder umfasst (55). Mit Ausnahme der ART5, die sezerniert wird, handelt es sich bei den ARTs um membranständige Ektoenzyme, die über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-(GPI)-Anker in der Zellmembran verankert sind. Die enzymatische Aktivität der ARTs ist somit auf Oberflächenproteine im extrazellulären Raum fokussiert. So wurde die ADP-Ribosylierung des $\alpha_L\beta_2$ -Integrins LFA-1 und weiterer Oberflächenproteine durch die Maus-ART2.2 nachgewiesen (56-58).

1.3.2 Die murine ART2

Die ADP-Ribosyltransferase ART2 wurde erstmals unter dem Namen RT6 als Oberflächenprotein auf T-Zellen der Ratte beschrieben (59). Im Mausgenom sind durch Gen-duplikation zwei ART2 Gene entstanden, *Art2a* und *Art2b*. Diese Paraloge weisen auf DNA-Ebene eine 80%ige Sequenzidentität auf. Beim Menschen enthält das ART2 Gen drei vorzeitige Stopcodons, wodurch es zu einem sogenannten Pseudogen wird (60).

Die ART2.1 und ART2.2 der Maus werden auf naiven T-Zellen exprimiert, wobei es deutliche Unterschiede in der Expression der beiden Isoformen in verschiedenen Mausstämmen gibt. C57BL/6 Mäuse tragen eine Punktmutation im ART2.1 Gen, die zu einem verfrühten Stopcodon in der mRNA und somit zur Abwesenheit des funktionellen Proteins führt (61). Im Gegensatz dazu ist das ART2.2 Gen in NZW Mäusen inaktiv, so dass nur die ART2.1 funktionell exprimiert wird (62, 63). In BALB/c Mäusen werden sowohl ART2.1, als auch ART2.2 funktionell auf naiven T-Zellen exprimiert (64). Bei der Untersuchung der ART2 muss daher dem genetischen Hintergrund der Mäuse besondere Beachtung geschenkt werden. Des Weiteren unterscheiden sich ART2.1 und ART2.2 in ihrer enzymatischen Aktivität. Die ART2.1 besitzt im Vergleich zur ART2.2 eine zusätzliche Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 80 und 201, wodurch sie nur unter reduzierenden Bedingungen die ADP-Ribosylierung katalysiert (65, 66). Die ART2 wird auf naiven T-Zellen exprimiert. Kommt es durch Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen in Gegenwart der entsprechenden, durch APZs vermittelten, kostimulatorischen Signale zur Aktivierung der

T-Zelle, wird ART2 durch die Metalloprotease TACE (*TNF- α converting enzyme*) oder eine verwandte Metalloprotease von der Oberfläche abgespalten (67).

Bei extrazellulären NAD-Konzentrationen im mikromolaren Bereich kommt es, vermittelt durch ART2, zur ADP-Ribosylierung einer Vielzahl von Oberflächenmolekülen der T-Zelle, wie z. B. CD8, CD43, CD44 und CD45. Hierdurch werden das Adhäsionsvermögen und die Signaltransduktion der T-Zelle beeinflusst (58). Auch T-Zellen exprimieren den P2X7-Rezeptor, der, wie bereits unter 1.2.2 beschrieben, ein Zielprotein der ART2.2 ist. Durch die ADP-Ribosylierung des P2X7-Rezeptors wird der Tod der T-Zelle (NICD) eingeleitet (36).

Die Expression von ART2 galt lange Zeit als auf T-Zellen beschränkt (64). Erste Hinweise auf die Expression der ART2.1 auf unterschiedlichen Populationen von APZs, kamen vor kurzem aus der Arbeitsgruppe von George Dubyak in Cleveland (68).

1.4 ATP und NAD

Die Nukleotide ATP und NAD sind seit langem als intrazelluläre Moleküle mit zentraler Rolle im Energiestoffwechsel der Zelle bekannt. Die bei der ATP-Hydrolyse frei werdende Energie wird unter anderem für den Ionentransport, Muskelarbeit und endergonische Biosynthesen genutzt. Zahlreiche Kinasen können die terminale Phosphatgruppe des ATP auf Zielproteine übertragen, eine als Phosphorylierung bezeichnete posttranslationale Modifikation. Diese dient der Regulation von Enzymaktivitäten und ist ein zentraler Mechanismus der Signaltransduktion (69).

NAD wurde bereits 1935 als Koenzym für Redoxreaktionen beschrieben (70). Man unterscheidet zwischen der oxidierten Form NAD (Abb. 1.4) und der reduzierten Form NADH. Das Redoxpaar NAD/NADH fungiert als Oxidationsmittel in katabolen Stoffwechselwegen (69).

1.4.1 Signaltransduktion von ATP und NAD

Neben seiner Rolle im Elektronentransfer dient intrazelluläres NAD auch als Substrat für die Synthese von Botenstoffen, sogenannter *second messenger*. Enzyme mit NAD-Glykohydrolaseaktivität führen zur Bildung von Nikotinamid und ADP-Ribose (ADPR). Einige NAD-Glykohydrolasen können darüber hinaus die Bildung von zyklischer ADP-Ribose (cADPR) katalysieren. Zusätzlich gibt es NAD-Glykohydrolasen, die in Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP) den Austausch von Nikotinamid durch Nikotinsäure katalysieren, wodurch Nikotinsäureadenindinukleotid-2'-phosphat (NAADP) gebildet wird. Die so gebildeten Botenstoffe bewirken auf unter-

schiedliche Weise die Auslösung oder Verstärkung intrazellulärer Calciumsignale (71). Zusätzlich wird intrazelluläres NAD von PARPs und Sirtuinen als Substrat genutzt, die wichtige Rollen bei der DNA-Reparatur und der Regulation der Transkription spielen (72).

Der Großteil des ATP und NAD ist intrazellulär lokalisiert mit Konzentrationen von etwa 5 bis 10 mM für ATP (30) und 400 bis 500 μ M für NAD (72). Im extrazellulären Raum werden ATP und NAD schnell durch zahlreiche, ubiquitär exprimierte Ektoenzyme abgebaut (Abb. 1.5). Die Degradation des NAD erfolgt hauptsächlich durch die NAD-Glykohydrolasen CD38 und CD157, die NAD in ADPR oder cADPR und Nikotinamid umwandeln (73). ATP wird in erster Linie durch Ekto-Nukleosidtriphosphatdiphosphohydrolasen (E-NTPDs), wie CD39 (E-NTPD 1), zu Adenosin-5'-diphosphat (ADP) und weiter zu Adenosin-5'-monophosphat (AMP) hydrolysiert. Das AMP wird von Ekto-5'-Nukleotidasen, wie CD73, zu Adenosin abgebaut (74). Sowohl NAD als auch ATP können darüber hinaus auch durch Ekto-Nukleotidpyrophosphatasen/phosphodiesterasen (E-NPPs 1-3), wie CD203 (E-NPP 3), zu ADP bzw. AMP hydrolysiert werden (75).

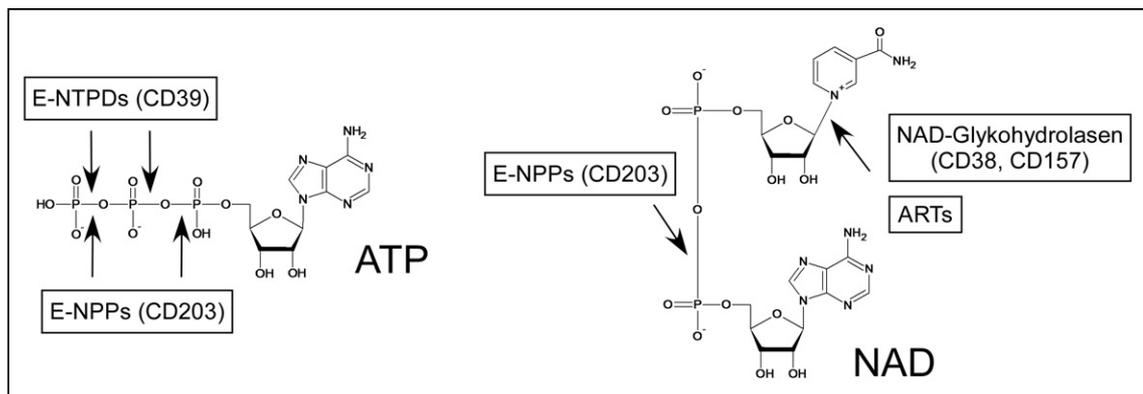


Abb. 1.5: Strukturformeln von ATP und NAD mit Angabe möglicher Spaltstellen durch Ektoenzyme (modifiziert nach Haag et al (76)). Mögliche Spaltstellen von ATP und NAD durch NAD-Glykohydrolasen, ADP-Ribosyltransferasen (ARTs), Ekto-Nukleosidtriphosphatdiphosphohydrolasen (E-NTPDs) und Ekto-Nukleotidpyrophosphatasen/phosphodiesterasen (E-NPPs).

Für die Signaltransduktion durch ATP und NAD ergibt sich somit ein komplexes Bild (Abb. 1.6). NAD dient den ARTs als Substrat für die Modifikation extrazellulärer Proteine und wird gleichzeitig von NAD-Glykohydrolasen zu ADPR und cADPR abgebaut. Die cADPR kann Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern mobilisieren, wobei die Frage, wie und ob cADPR aus dem extrazellulären Raum ins Zellinnere gelangen kann, noch ungeklärt ist (76). ATP wird von P2X- und P2Y-Rezeptoren als Ligand gebunden. Zusätzlich können die bei der Hydrolyse von ATP und NAD gebildeten Abbauprodukte selbst Signalfunktionen übernehmen. Einige Rezeptoren der

P2Y-Familie erkennen neben ATP auch ADP und AMP (P2Y1, P2Y12), während Adenosin als Ligand für die Rezeptoren der P1-Familie fungiert (26).

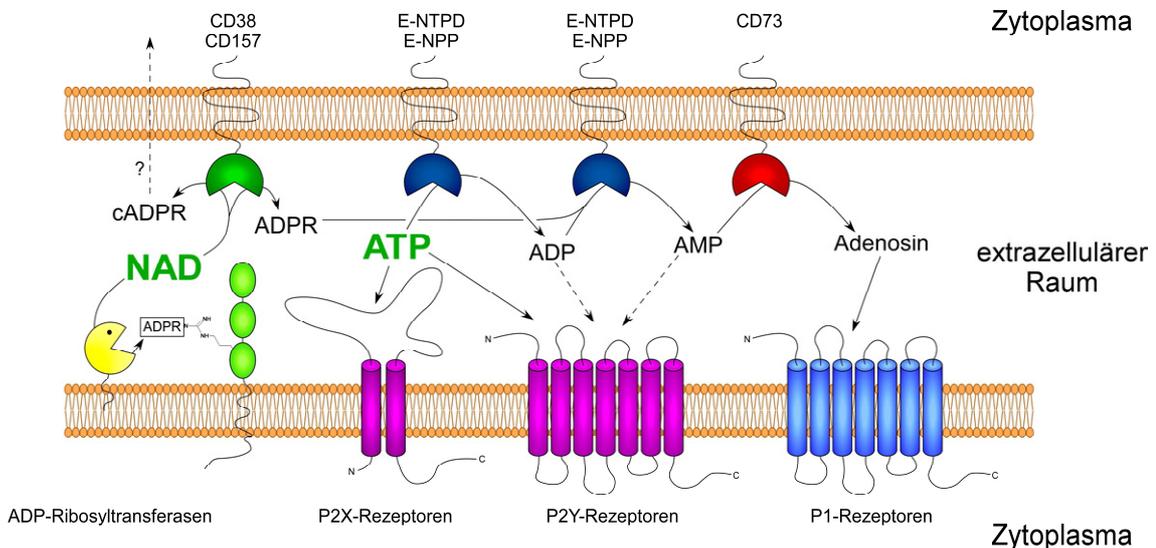


Abb. 1.6: Schematische Übersicht der extrazellulären Enzyme und Rezeptoren die ATP, NAD und deren Abbauprodukte als Substrat oder Ligand binden. NAD dient als Substrat der ADP-Ribosyltransferasen und wird von CD38 und CD157 zu zyklischer ADP-Ribose (cADPR) und ADP-Ribose (ADPR) hydrolysiert. ADPR kann von Ekto-Nukleosidtriphosphatdiphosphohydrolasen (E-NTPDs) und Ekto-Nukleotidpyrophosphatasen/phosphodiesterasen (E-NPPs) zu Adenosin-5'-monophosphat (AMP) abgebaut werden. ATP ist ein Ligand der P2X- und P2Y-Rezeptoren. ATP wird von E-NTPDs und E-NPPs zu Adenosin-5'-diphosphat (ADP) und weiter zu AMP hydrolysiert. ADP und AMP können von P2Y-Rezeptoren als Ligand gebunden werden. AMP wird durch CD73 weiter zu Adenosin abgebaut, das als Ligand der P1-Rezeptoren fungiert.

1.4.2 ATP und NAD im Immunsystem

Die Rolle von ATP und NAD im Stoffwechsel der Zellen bedingt ihre vorwiegend intrazelluläre Lokalisation. Ein Teil des in der Zelle vorhandenen ATPs und NADs kann allerdings auf unterschiedlichen Wegen in den extrazellulären Raum gelangen, sei es durch aktive Exozytose, Diffusion über Transmembrantransporter oder passives Entweichen über die beschädigte Plasmamembran sterbender Zellen (77, 78). Die Freisetzung von ATP und NAD durch beschädigte oder sterbende Zellen kann als Gefahrensignal für das Immunsystem dienen (79).

Eine Reihe von Rezeptoren und Ekto-Enzymen, die Purin-Nukleotide erkennen, werden auf den Zellen des Immunsystems exprimiert. Dendritische Zellen exprimieren neben dem P2X7- auch den P2Y11-Rezeptor für ATP, sowie Rezeptoren der P1-Familie (A1, A2A, A2B, A3) für Adenosin. Über den P2X7-Rezeptor wird die Prozessierung und Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 ausgelöst, während über den empfindlicheren P2Y11-Rezeptor die Synthese von IL-12 inhibiert und IL-10

gesteigert wird (44, 80). Die Adenosinrezeptoren A2A und A2B werden von reifen dendritischen Zellen exprimiert und inhibieren die Synthese von IL-12 und somit die Differenzierung naiver CD4-positiver T-Zellen zu T_H1-Zellen, wodurch ein anti-inflammatorischer Effekt ausgeübt wird.

Auch T-Zellen exprimieren den P2X7-Rezeptor, dessen dauerhafte Aktivierung durch ATP oder vermittelt über die ART2.2 durch NAD letztendlich zum Tod der Zelle führt (NICD). Da der P2X7-Rezeptor relativ hohe Konzentration von mehr als 100 µM ATP zu seiner Aktivierung benötigt, ist unter physiologischen Bedingungen insbesondere seine Aktivierung durch NAD-Konzentrationen im mikromolaren Bereich interessant. Diese Aktivierung und der damit einhergehende Zelltod betrifft nur naive T-Zellen, da die ART2.2 nach der Aktivierung der T-Zelle durch Metalloproteasen von der Zelloberfläche abgespalten wird (67). Zur Rolle des NICD im Kontext einer Immunantwort gibt es mehrere Hypothesen. Eine Hypothese beinhaltet, dass durch die am Entzündungsherd vorliegenden hohen NAD-Konzentrationen naive, antigenunspezifische T-Zellen durch Apoptose eliminiert werden. Dies dient zum Schutz vor der Aktivierung potentiell autoreaktiver T-Zellen (76). Eine weitere Hypothese besagt, dass die Eliminierung antigenunspezifischer, naiver T-Zellen Raum für proliferierende aktivierte T-Zellen schafft, und so zur Aufrechterhaltung der T-Zell Homöostase beiträgt (81).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle des P2X7-Rezeptors während der Interaktion zwischen APZs und T-Zellen näher untersucht werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass für die Sekretion von IL-1 β durch Makrophagen ein Signal über den P2X7-Rezeptor benötigt wird (38). In diesem Zusammenhang sollte der Frage nachgegangen werden, ob der P2X7-Rezeptor auf den APZs durch die auf naiven murinen T-Zellen exprimierte ART2.2 trans-ADP-ribosyliert und somit aktiviert werden kann. Weiterführend sollte untersucht werden inwiefern die Aktivierung oder Inhibition des P2X7-Rezeptors auf den APZs oder den T-Zellen die antigenabhängige Zytokinsekretion beim Zellkontakt und damit den Ausgang der Immunantwort moduliert. Zu diesem Zweck wurden T-Zellen mit einem transgenen T-Zell-Rezeptor eingesetzt, der spezifisch für ein Peptid des Ovalbumins ist.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Expression und Funktion der ART2.1 auf APZs näher untersucht werden. Hier war insbesondere die Frage nach den Zielproteinen der ART2.1 von Interesse. Im Hinblick auf die Aktivierung des P2X7-Rezeptors auf T-Zellen durch die ART2.2, sollte einer möglichen Aktivierung des P2X7-Rezeptors auf den APZs durch die ART2.1 nachgegangen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Fluka (Neu Ulm) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.2 Antikörper

Antikörper wurden von den Firmen BD Pharmingen und eBioscience bezogen. Insbesondere für den Nachweis des P2X7-Rezeptors und der ADP-Ribosyltransferasen wurden die unten aufgeführten durch DNA-Immunisierung in der Arbeitsgruppe hergestellten Antikörper eingesetzt (64, 82).

Spezifität	Klon	Herkunft
Ratte anti-MausP2X7-Alexa488	RH23A44	AG Nolte, UKE Hamburg
Kaninchen anti-MausP2X7	K1G, polyklonales Serum	AG Nolte, UKE Hamburg
Ratte anti-MausART2.1-Alexa488	R18B54	AG Nolte, UKE Hamburg
Ratte anti-MausART2.2-FITC	R8A106	AG Nolte, UKE Hamburg
Maus anti-eNAD-Alexa488	1G4	AG Nolte, UKE Hamburg

2.1.3 Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
A20	BALB/c B-Lymphomzelllinie (83)	AG Nolte, UKE Hamburg
DO11.10 Hyb	BALB/c T-Hybridomzelllinie, die einen transgenen T-Zell-Rezeptor trägt, der einen Komplex aus I-A ^d und dem aus Hühner-Ovalbumin stammenden Peptid OVA ₃₂₃₋₃₃₉ erkennt (84)	AG Nolte, UKE Hamburg
GM-CSF Zellen	Ag8653 Myelomzelllinie transfiziert mit cDNA für murines GM-CSF (85)	AG Ritter, BNI Hamburg

2.1.4 Mausstämme

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

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
BALB/c	H-2 ^d	UKE Hamburg
C57BL/6	H-2 ^b	UKE Hamburg
DO11.10	H-2 ^d ; T-Zell-Rezeptor-transgene Maus, deren T-Zell-Rezeptor einen Komplex aus I-A ^d und dem aus Hühner-Ovalbumin stammenden Peptid OVA ₃₃₂₋₃₃₉ erkennt (86)	BNI Hamburg
OT-II	H-2 ^b ; T-Zell-Rezeptor-transgene Maus, deren T-Zell-Rezeptor einen Komplex aus I-A ^b und dem aus Hühner-Ovalbumin stammenden Peptid OVA ₃₂₃₋₃₃₉ erkennt (87)	BNI Hamburg
C57BL/6 P2X7KO	H-2 ^b ; <i>knockout</i> Maus in der ein Teil des für den carboxyterminalen Teil des P2X7-Rezeptors kodierenden Exons mittels homologer Rekombination durch die Neomycin-Resistenzkassette ersetzt wurde (88)	Christopher Gabel Pfizer Inc. Groton, Connecticut
BALB/c ART2.1KO	H-2 ^d ; <i>knockout</i> Maus in der das hauptsächlich kodierende Exon der ART2.1 mittels homologer Rekombination durch die Neomycin-Resistenzkassette ersetzt wurde (89)	UKE Hamburg
BALB/c ART2.2KO	H-2 ^d ; <i>knockout</i> Maus in der das hauptsächlich kodierende Exon der ART2.2 mittels homologer Rekombination durch die Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt wurde (89)	UKE Hamburg
BALB/c ART2KO	H-2 ^d ; zweifache <i>knockout</i> Maus in der die für ART2.1 und ART2.2 kodierenden Exons durch die Neomycin- bzw. Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt wurden (89)	UKE Hamburg
NZW	H-2 ^z	UKE Hamburg

2.1.5 Materialien für zellbiologische Arbeiten

Medien und Zusätze für die Zellkultur stammen von der Firma Gibco (Karlsruhe).

Biogel P100	BioRad (München)
Cell Strainer (70 µm)	BD Biosciences (Heidelberg)
Dynabeads, sheep anti-mouseIgG	Dynal (Hamburg)
FCS	Biochrom AG (Berlin)
LPS	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
murines IFN-γ	PeproTech GmbH (Hamburg)

murines IL-2	PeptoTech GmbH (Hamburg)
murines M-CSF	PeptoTech GmbH (Hamburg)
murines TNF- α	PeptoTech GmbH (Hamburg)
Nitex-Membran (80 μ m)	Cadisch Precision Meshes (London, UK)
<u>OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid:</u> (NH ₂ -) ISQAVHAAHAEINEAGR (-COOH)	Innovagen (Lund, Schweden)
U0126	Calbiochem (Darmstadt)

2.1.6 Materialien für molekularbiologische Arbeiten

RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen (Hilden)
100 mM dNTP Set PCR Grade	Invitrogen (Karlsruhe)
5x First Strand Buffer	Invitrogen (Karlsruhe)
50x TAE Buffer	Invitrogen (Karlsruhe)
6x Loading Dye Solution	Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneRuler [™] 1kb DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)

Enzyme:

AmpliTaq Gold [™]	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen (Karlsruhe)

Oligonukleotid-Primer:

RH6 (randomisierte Hexamerprimer)	Invitrogen (Karlsruhe)
P2X7 sense:	5' TAC ATT GGA TCC ACC CTG TCC
P2X7 antisense:	5' CCT CAG ATT GTC CAG GAG TCG
eIF2 α sense:	5' CAA GAG ACC TGG ATA TGG TGC C
eIF2 α antisense:	5' TTC AAG CTT ATC TTC AGC TTT GGC TTC CAT TTC

Die zur Amplifikation des P2X7 und des eIF2 α verwendeten Primer wurden von der Firma MWG (Ebersberg) synthetisiert.

2.1.7 Materialien für proteinchemische Arbeiten

ECL Western blotting detection reagents	Amersham Biosciences (Freiburg)
Gel-Dry [™] Drying Solution	Invitrogen (Karlsruhe)
MultiMark [®] Multi-Colored Standard	Invitrogen (Karlsruhe)
NC-Membran Hybond-C, 0.45 μ m	Pharmacia Biotech (Freiburg)
NOVEX [®] Colloidal Blue stain kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Novex [®] Sharp Pre-Stained Protein Standards	Invitrogen (Karlsruhe)

NuPAGE [®] Antioxidans	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE [®] LDS Probenpuffer 4x	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE [®] MES Laufpuffer 20x	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE [®] precast Gele, 10% Bis-Tris	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE [®] Transferpuffer 20x	Invitrogen (Karlsruhe)
PVDF-Membran ImmobilonP	Boehringer Ingelheim (Ingelheim)
Re-Blot Plus	Chemicon (Billerica, MA, USA)
Destaining Bags	Amresco (Solon, Ohio, USA)

2.1.8 Materialien für immunologische Arbeiten

BSA	PAA (Pasching, Österreich)
Celltracker [™] Green CMFDA	Molecular Probes (Karlsruhe)
DuoSet [®] ELISA Development Kits für IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ und TNF- α	R&D Systems (Wiesbaden)
ELISA-Reader	Tecan (Crailsheim)
Protein G Sepharose [™] 4 Fast Flow	GE Healthcare (München)
SNARF [®] -1	Molecular Probes (Karlsruhe)
TMB-Substratlösung	Sweden Diagnostics (Freiburg)

2.1.9 Materialien für Aktivitätsuntersuchungen

³² P-NAD	PerkinElmer (Rodgau-Jügesheim)
Ethidiumbromid	Sigma (Deisenhofen)
Fluo-4, AM	Molecular Probes (Karlsruhe)
Pluronic [®] F-127	Molecular Probes (Karlsruhe)
YO-PRO [®] -1	Molecular Probes (Karlsruhe)

2.2 Puffer und Medien

2.2.1 Puffer

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

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

Gey's Puffer zur Erythrozytenlyse:

Der Puffer setzt sich aus 20% Lösung A, je 5% Lösung B und C und 70% Lösung D zusammen.

DMEM Komplettmedium:	DMEM 10% (v/v) FCS 2 mM Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 100 mM HEPES MEM
BMDC-Medium:	RPMI 1640 10% (v/v) FCS 10 bis 20% (v/v) GM-CSF Überstand 2 mM Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 50 µM β-Mercaptoethanol Gentamycin
BMM-Medium:	DMEM 10% (v/v) FCS 5% (v/v) Pferdeserum 2 mM Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 100 mM HEPES 10 ng/ml M-CSF Gentamycin

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultur von adhärenenten und Suspensionszellen

Adhärente eukaryotische Zellen wurden in DMEM Komplettmedium in Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5% CO₂ in einem Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden alle 3 bis 4 Tage umgesetzt. Dazu wurde das alte Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und durch Zugabe von TrypLETM Express und kurze Inkubation bei Raumtemperatur (RT) abgelöst. Das TrypLETM Express wurde durch Medienzugabe inaktiviert, die Zellen bei 300 x g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und 1:10 in neuen Flaschen ausgesät.

Eukaryotische Suspensionszellen wurden in RPMI Komplettmedium in 10-cm-Petrischalen bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Alle 3 bis 4 Tage wurden die Zellen umgesetzt. Dazu wurden die Zellen resuspendiert und 1/10 der Zellen auf eine neue Petrischale mit neuem Medium überführt.

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Waschschrte bei 300 x g und 4 °C für 5 min durchgeführt.

2.3.2 Herstellung GM-CSF-haltiger Überstände

Zur Produktion GM-CSF-haltiger Überstände für die Differenzierung dendritischer Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen wurde die mit murinem GM-CSF transfizierte Myelom-Zelllinie Ag8653 (85) verwendet. Die Zellen wurden in 20-cm-Petrischalen in RPMI Komplettmedium herangezüchtet und 6 bis 9 Tage bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert, der Überstand steril filtriert, aliquotiert und bei 4 °C gelagert. Der optimale Anteil Überstand im BMDC-Medium wurde experimentell bestimmt.

2.3.3 Präparation muriner Lymphozyten aus Lymphknoten

8 bis 12 Wochen alte Mäuse wurden mit einem Gasmisch (30% O₂, 70% CO₂) betäubt und anschließend durch 100% CO₂ getötet. Die oberflächlichen zervikalen, axiliären, brachialen und inguinalen Lymphknoten (Abb. 2.1) wurden präpariert und in 35-mm-Petrischalen mit eiskaltem RPMI gegeben. Die Lymphknoten wurden mit Hilfe einer Pinzette zwischen zwei Nitex-Membranen (80 µm Maschengröße) zerdrückt, um die Lymphozyten in das Medium freizusetzen. Die Zellen wurden zweimal mit RPMI 1640 gewaschen und nach Bestimmung der Zellzahl für Versuche eingesetzt.

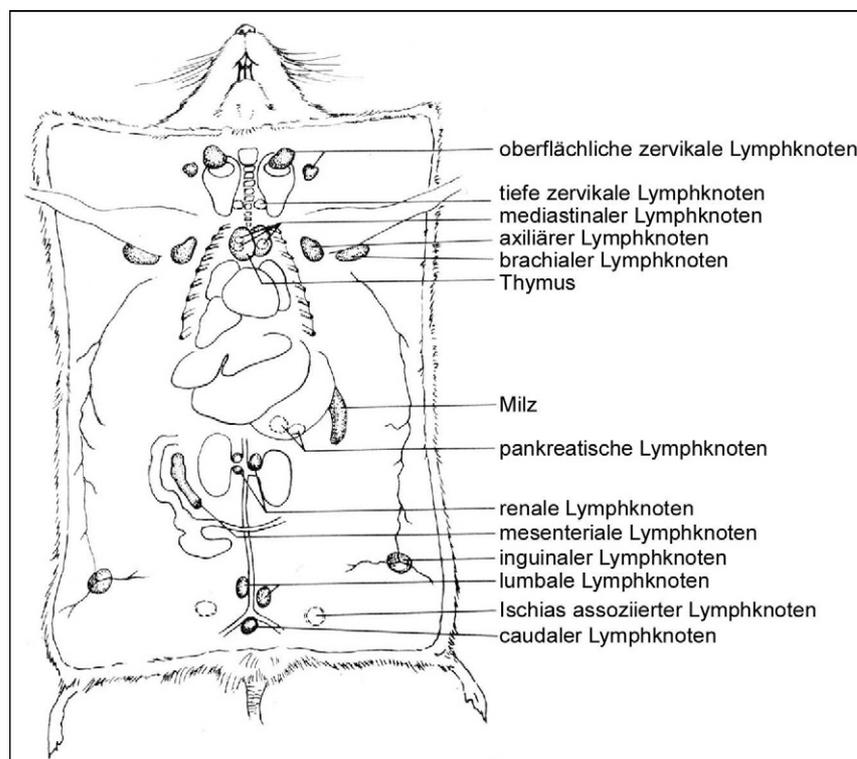


Abb. 2.1: *Lymphatische Organe der Maus.* Schematische Darstellung der Lage der lymphatischen Organe der Maus (modifiziert nach: http://eulep.pdn.cam.ac.uk/Necropsy_of_the_Mouse/index.php?file=Chapter_3.html).

2.3.4 Präparation muriner Milzzellen

8 bis 12 Wochen alten, getöteten Mäusen wurde die Milz entnommen und in eine 35-mm-Petrischale mit eiskaltem RPMI 1640 gegeben. Anschließend wurde die Milz mit einer Pinzette zwischen zwei Nitex-Membranen zerdrückt, wodurch die Zellen freigesetzt wurden. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem RPMI 1640 wurden die Zellen in Gey's Puffer (25 ml pro Milz) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Die Zellen wurden erneut zweimal mit RPMI 1640 gewaschen und nach Bestimmung der Zellzahl für Versuche eingesetzt.

2.3.5 Depletion einzelner Zellpopulationen

Zur Depletion einzelner Zellpopulationen aus z. B. Milzzellen, wurden Dynabeads eingesetzt. Dabei handelt es sich um Magnetkügelchen, die mit Antikörpern beschichtet sind. Zur Depletion von B-Zellen wurden mit anti-mouseIgG beschichtete Dynabeads eingesetzt. Die Beads wurden zweimal durch 10minütiges Rollern bei RT mit RPMI Kompletmedium gewaschen. Der Überstand wurde entfernt, nachdem sich die Beads im Magneten abgesetzt hatten.

Die gewaschenen Beads wurden mit der Zellsuspension für ebenfalls 10 min bei RT gerollert, das Röhrchen in einen Magneten gestellt und der Überstand nach 2 min abgenommen. Dieser Vorgang wurde einmal mit neuen, gewaschenen Beads wiederholt, um eine quantitative Depletion zu gewährleisten.

2.3.6 Präparation muriner Knochenmarkszellen

Die Ober- und Unterschenkelknochen von 8 bis 12 Wochen alten, getöteten Mäusen wurden präpariert und das Muskelgewebe entfernt. Die Knochen wurden kurz in 70%igem Ethanol sterilisiert, die Knochenenden abgeschnitten und das Knochenmark mit RPMI 1640 herausgespült. Die Zellen wurden einmal mit RPMI 1640 gewaschen und über eine Membran gegeben, um vorhandene Haare oder Knochensplitter zu entfernen. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen zu dendritischen Zellen oder Makrophagen ausdifferenziert.

2.3.7 Differenzierung von Knochenmarkszellen zu dendritischen Zellen (BMDCs)

Die Präparation der Zellen (Tag 0) erfolgte wie unter 2.3.6 beschrieben. Die Zellen wurden in BMDC-Medium resuspendiert und 2×10^6 Zellen in einem Gesamtvolumen von 10 ml auf einer 10-cm-Petrischale ausplattiert. An Tag 3 erfolgte die Zugabe von weiteren 10 ml BMDC-Medium, an Tag 6 wurden 10 ml des Mediums durch 10 ml frisches Medium ersetzt. Je nach Versuchsaufbau erfolgte an Tag 7 eine Stimulation der

Zellen, bevor diese an Tag 8 für Versuche eingesetzt wurden. Für Versuche wurden die löslichen Zellen verwendet, die zu 65 bis 80% CD11c-positiv waren.

2.3.8 Differenzierung von Knochenmarkszellen zu Makrophagen (BMMs)

Die Präparation der Zellen (Tag 0) erfolgte wie unter 2.3.6 beschrieben. Die Zellen wurden in BMM-Medium resuspendiert und 5×10^6 Zellen in einem Gesamtvolumen von 10 ml auf einer 10 cm Petrischale ausplattiert. An Tag 3 erfolgte die Zugabe von 5 ml BMM-Medium. An Tag 6 wurde das Medium komplett ausgetauscht; je nach Versuchsaufbau durch BMM-Medium mit oder ohne M-CSF. Je nach Versuchsaufbau erfolgte an Tag 7 eine Stimulation der Zellen, bevor die Zellen an Tag 8 für Versuche verwendet wurden. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch kaltes PBS mit 0,5 mM EDTA mittels eines Zellschabers.

2.3.9 Präparation von Peritonealmakrophagen

Das Peritoneum getöteter Mäuse wurde mit 5 ml RPMI 1640 ausgespült. Die Zellen wurden zweimal mit RPMI 1640 gewaschen, die Zellzahl bestimmt und die Zellen für Versuche eingesetzt.

2.3.10 Vorstimulation antigenpräsentierender Zellen

Je nach Versuchsanordnung wurden BMDCs, BMMs und PEMs 24 Stunden vor Beginn des Versuches mit unterschiedlichen Substanzen vorstimuliert. Zum Einsatz kamen folgende Substanzen:

- LPS in einer Konzentration von 1 µg/ml oder 100 ng/ml
- TNF- α in einer Konzentration von 50 ng/ml
- IFN- γ in einer Konzentration von 100 U/ml
- IFN- β in einer Konzentration von 100 U/ml
- LPS in einer Konzentration von 100 ng/ml zusammen mit 10 µM U0126

Vor der Verwendung der Zellen in den jeweiligen Versuchen wurden die Zellen dreimal mit RPMI 1640 gewaschen.

2.3.11 Gewinnung von Zellen aus dem Biogel-Modell

Beim sogenannten Biogel-Modell handelt es sich um die Auslösung einer sterilen Entzündungsreaktion durch das subkutane, dorsale Spritzen von Polyacrylamidkügelchen (Biogel P100). Die Mäuse wurden am Rücken rasiert und mit Ethanol abgewaschen. Es wurden 800 µl einer sterilen 67%igen Biogelsuspension in PBS (53 mg Trockengewicht pro ml) subkutan, beginnend an der Schwanzspitze injiziert. Nach zwei bis drei Tagen

wurden die Mäuse getötet, die Haut am Rücken aufgeschnitten und die Biogelmatrix mit einem Spatel entfernt und in zuvor gewogene Röhren mit PBS überführt. Die Röhren wurden erneut gewogen und bei 300 x g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Biogelmatrix in 2 ml PBS resuspendiert und das Röhren für ca. 5 min auf Eis stehen gelassen, bis sich das Biogel abgesetzt hatte. Der Überstand mit den Zellen wurde in ein neues Röhren überführt, die Zellen gezählt und für Versuche eingesetzt. Aus der Zellzahl und der Biogelmasse, konnte die Zellzahl pro Milligramm Biogel berechnet werden.

2.3.12 Vorstimulation primärer T-Zellen

Die Lymphozyten wurden wie unter 2.3.4 beschrieben aus der Milz isoliert und auf eine Zellzahl von 2×10^6 /ml in RPMI Kompletmedium resuspendiert. Von der Zellsuspension wurde 1 ml in jeden Napf einer 24-well-Platte gegeben und 1 ml einer OVA₃₂₃₋₃₃₉-Lösung zugefügt (Endkonzentration OVA₃₂₃₋₃₃₉: 1 μ M). Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. An den Tagen 2, 5 und 6 wurden die Zellen bei 300 x g für 5 min abzentrifugiert, das Medium möglichst vollständig entfernt und 2 ml neues RPMI Kompletmedium mit 100 U/ml IL-2 zugefügt. An Tag 7 wurden die Zellen abgenommen, einmal mit RPMI Kompletmedium gewaschen, gezählt und für Versuche eingesetzt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Präparation aus murinen Zellen

Die Präparation der Gesamt-RNA aus murinen Zellen und Zelllinien erfolgte mit dem RNeasy[®] Mini Kit von Qiagen nach den Angaben des Herstellers. Zur Präparation der RNA wurden 4×10^6 Zellen eingesetzt, die in 200 μ l Lysispuffer resuspendiert wurden. Für die Homogenisierung wurde eine RNase-freie Spritze mit Kanüle (\varnothing 0,9 mm) verwendet. Die Elution erfolgte mit 50 μ l RNase-freiem Wasser. Die Konzentration der präparierten RNA wurde photometrisch bestimmt und die RNA bei -80 °C gelagert.

2.4.2 Herstellung von cDNA durch reverse Transkription

Zur Herstellung komplementärer DNA (cDNA, *complementary DNA*) aus Gesamt-RNA wurden an 1,5 μ g der RNA randomisierte Hexamerprimer angelagert. Dazu wurde die RNA für 10 min bei 70 °C mit 3 μ l der Hexamerprimer (200 ng/ μ l) in einem Gesamtvolumen von 16,8 μ l inkubiert. Mit dieser ‚Hexamer-RNA‘ wurde die reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR) wie unten aufgeführt durchgeführt. Ein Aliquot der

„Hexamer-RNA“ wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert, um die Qualität der isolierten RNA zu beurteilen.

Ansatz für die RT-PCR:

11,5 µl	„Hexamer-RNA“
1,0 µl	dNTPs (10 mM)
2,5 µl	DTT (0,1 M)
4,0 µl	5x First Strand Buffer
1,0 µl	M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)

PCR-Programm:

Schritt:	Dauer:	Temperatur:
1	10 min	24 °C
2	20 min	42 °C
3	2 min	95 °C
4	∞	4 °C

Die hergestellte cDNA wurde bei -20 °C gelagert und als Matrize für die Amplifikation der gesuchten Gene mittels PCR eingesetzt.

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine etablierte Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten (90). Die PCR wurde zur Amplifikation eines für den P2X7-Rezeptor kodierenden DNA-Fragmentes und eines für den eIF2 α kodierenden DNA-Fragmentes aus käuflich erworbener oder aus murinen Zellen, wie unter 2.4.1 und 2.4.2 beschrieben, hergestellter cDNA eingesetzt. Die zur Amplifikation verwendeten Primer sind unter 2.1.6 angegeben.

Ansatz für die PCR:

1,0 µl	cDNA
2,5 µl	10x Puffer
1,0 µl	Primer 1 (10 µM)
1,0 µl	Primer 2 (10 µM)
0,6 µl	dNTPs (10 mM)
0,2 µl	AmpliTaq Gold (5 U/µl)
ad 25,0 µl	H ₂ O

PCR-Programm:

Schritt:	Dauer:	Temperatur:
1	5 min	94 °C
2	30 s	94 °C
3	30 s	60 °C
4	45 s	72 °C
5	10 min	72 °C
6	∞	4 °C

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA und RNA wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Es wurden Gele mit 1% (w/v) Agarose und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in 1x TAE-Puffer verwendet. Die DNA- bzw. RNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 bis 100 V. Nukleinsäurebanden wurden nach der Elektrophorese durch UV-Strahlung sichtbar gemacht und mit Hilfe einer digitalen Kamera dokumentiert. Zur Größenbestimmung wurde die GeneRuler™ 1kb DNA Ladder mit auf das Gel aufgetragen.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-PAGE. Die Gele, bestehend aus einem Trenn- und einem Sammelgel, wurden käuflich erworben. Zum Einsatz kamen 10%ige Bis-Tris Gele von Invitrogen. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit einem entsprechenden Volumen an 4x LDS-Puffer und 10x DTT versetzt und für 10 min bei 80 °C denaturiert. Zur Größenbestimmung wurden 5 µl eines Protein-Markers (Multi-Mark[®] oder NOVEX[®] Sharp) eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 180 V für ca. 20 min.

2.5.2 Coomassie-Färbung

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

2.5.3 Western-Blotting und Antikörpernachweis

Proteine aus Polyacrylamidgelen wurden durch Elektroblooming bei 30 V und 300 mA für 1,5 h auf PVDF-Membranen übertragen. Zusätzlich wurde durch Auflegen einer Nitrozellulosemembran (NC-Membran) auf der dem Pluspol zugewandten Seite ein Abdruck erzeugt. Die gleichmäßige Beladung der Gele konnte anschließend durch eine Silberfärbung der NC-Membran (siehe 2.5.4) überprüft werden.

Die PVDF-Membran wurde kurz in TBS-T gewaschen und für ca. 20 min bei RT blockiert (Blocklösung: 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS). Es folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Verdünnung zwischen 1:1000 und 1:5000 in Blocklösung) für 1 h bei RT. Die Membran wurde dreimal 3 min mit TBS-T bei RT gewaschen und anschließend mit dem sekundären, HRP-konjugierten Antikörper (Verdünnung zwischen 1:1000 und 1:5000 in Blocklösung) für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 3 min mit TBS-T erfolgte der Nachweis mit dem ECL-System von Amersham.

2.5.4 Silberfärbung

Die NC-Membran wurde kurz mit Wasser gewaschen, bevor die Färbelösung auf die Membran gegeben wurde. Die Färbelösung wurde jedes Mal frisch angesetzt: 80 mg Eisen-II-Sulfat wurden in 400 μ l H₂O gelöst (gesättigte Lösung) und in 9 ml H₂O gegeben, unter starkem Rühren wurden langsam 500 μ l 40%ige (w/v) Natriumcitratlösung und 100 μ l 20%ige (w/v) Silbernitratlösung hinzupipettiert, um die Bildung von Aggregaten zu vermeiden. Die fertige Färbelösung wurde auf die NC-Membran gegeben und diese so lange geschwenkt, bis Banden sichtbar wurden. Die Membran wurde gründlich mit H₂O gewaschen, getrocknet, eingeschweißt und zur Dokumentation eingescannt.

2.5.5 Acetonfällung von Proteinen

Zur Präzipitation von Proteinen aus einem größeren Volumen wurde das Probenvolumen mit der vierfachen Menge Aceton versetzt und mindestens eine Stunde bei -20 °C inkubiert. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 16000 x g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und die Pellets bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Pellets in 1x LDS-Puffer resuspendiert und für die SDS-PAGE vorbereitet.

2.6 Immunologische Methoden

2.6.1 ELISA

Für den Nachweis der verschiedenen Zytokine mittels ELISA wurden die DuoSet Kits der Firma R&D verwendet. Die Antikörper wurden nach den Angaben des Herstellers gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Beschichtung von 96-well-Platten erfolgte mit 50 μ l Antikörperlösung pro Napf bei 4 °C über Nacht. Anschließend wurden die Platten dreimal mit PBS + 0,1% (v/v) Tween 20 (Waschpuffer) gewaschen und mit 150 μ l PBS + 1% (w/v) BSA (Blocklösung) pro Napf für 4 bis 6 h bei 4 °C blockiert. Die Platten wurden mit der Blocklösung bei -20 °C eingefroren und bis zu 6 Monate gelagert.

Für den Zytokinnachweis wurden die entsprechend beschichteten Platten aufgetaut und die Blocklösung herausgeschlagen. Anschließend wurden 50 μ l Zellkulturüberstand in die jeweiligen Näpfe gegeben und eine doppelte Standardreihe zur späteren Quantifizierung pipettiert. Die Platte wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und danach dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Der biotinylierte Nachweisantikörper wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verdünnt und 50 μ l Antikörperlösung in die jeweiligen Näpfe pipettiert. Nach 2 h Inkubation bei RT wurden die Platten erneut dreimal mit

Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Zugabe von 50 µl verdünnter Streptavidin-Peroxidase-Lösung und 30 min Inkubation bei RT. Die Platten wurden fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Für die Nachweisreaktion wurden pro Napf 100 µl TMB-Enzymbsubstratlösung pipettiert und die Farbreaktion nach ca. 5-10 Minuten mit jeweils 50 µl 0.5 M Schwefelsäure gestoppt. Zur Auswertung wurde die Extinktion bei 450 nm gemessen und die Daten mit Excel und Graphpad Prism4 bearbeitet.

2.6.2 Antikörperanfärbung von Zellen und Analyse am Durchflusszytometer

Um die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf unterschiedlichen Zellpopulationen zu untersuchen, wurden diese mit Fluochrom-konjugierten Antikörpern markiert und anschließend am Durchflusszytometer gemessen. Der Nachweis erfolgte entweder mit direkt an ein Fluochrom gekoppelten Antikörpern oder ungekoppelten Antikörpern, die durch einen sekundären, Fluochrom-konjugierten Antikörper nachgewiesen wurden.

Die Zellen wurden auf 10^7 Zellen pro ml in PBS resuspendiert und pro Anfärbung 100 µl Zellsuspension (10^6 Zellen) eingesetzt. Die Zellen wurden mit je 100 µl Antikörperlösung (Verdünnung zwischen 1:100 und 1:500 in PBS) versetzt und ca. 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und je nach eingesetztem Antikörper direkt am Durchflusszytometer gemessen oder für 30 min bei 4 °C mit einem Fluochrom-konjugierten sekundären Antikörper inkubiert. Die Analyse der angefärbten Zellen erfolgte an einem FACSCalibur mit Hilfe der Software Cellquest Pro.

2.6.3 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden Zelllysate verschiedener Zellpopulationen eingesetzt. Die Zellen (10^7 Zellen pro Ansatz) wurden zweimal mit PBS gewaschen und das Zellpellet in 100 µl Lysispuffer resuspendiert. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellkerne für 5 min bei 800 x g in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand erneut 10 min bei 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand (Zelllysat) wurde abgenommen und entweder direkt für die Immunpräzipitation eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

Zur Präzipitation der gewünschten Proteine wurden die entsprechenden Antikörper an ProteinG Sepharose gekoppelt. Die Sepharose wurde zunächst dreimal mit PBS gewaschen, bevor 20 µl Sepharose pro Ansatz mit 1 µg Antikörper in einem Gesamtvolumen von 200 µl für 1 h bei 4 °C gerollert wurden. Nach der Kopplung des Antikörpers wurde die Sepharose dreimal mit je 1 ml Lysispuffer gewaschen. Zwischen den

Waschungen wurde die Sepharose durch 5minütige Zentrifugation mit 600 x g in einer Tischzentrifuge präzipitiert. Vor der Inkubation mit der gekoppelten Sepharose wurde das Zelllysate für 1 h bei 4 °C mit gewaschener, ungekoppelter Sepharose (20 µl pro Ansatz) inkubiert, um unspezifisch an die Sepharose bindende Proteine zu entfernen. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation pelletiert, der Überstand (vorgeklärtes Zelllysate) zu der gekoppelten Sepharose gegeben und 1 h bei 4 °C gerollert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die Sepharose (Immunpräzipitat) dreimal mit Lysispuffer gewaschen. Ein Aliquot des Zelllysats, die Sepharose aus der Vorklärung und das Immunpräzipitat wurden anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

2.6.4 Sekretion von IL-1 β

Versuche mit BMDCs

Es wurden 5×10^5 Zellen pro Napf auf einer 24-well-Platte in RPMI Kompletmedium ausplattiert und ein Teil der Zellen über Nacht mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Die Zellen wurden 5 min bei 300 x g abzentrifugiert und nach Abnahme des Mediums einmal mit RPMI 1640 und einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 30 min bei 37 °C in PBS mit ATP inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die darin enthaltenen Proteine mittels Acetonfällung präzipitiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, das Zellpellet in Lysispuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 16000 x g und 4 °C wurde der Überstand (Zelllysate) abgenommen. Die Pellets der Acetonfällung und die Zelllysate wurden mit LDS-Puffer versetzt und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von IL-1 β erfolgte im Westernblot.

Versuche mit PEMs

Für Untersuchungen zur IL-1 β Sekretion wurden die Zellen auf *culture slides* ausplattiert (2×10^5 Zellen pro Napf) und bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Lymphozyten mit RPMI 1640 weggespült und die abgesetzten PEMs mit neuem RPMI Kompletmedium versetzt. Es folgte eine Stimulation der Zellen mit 1 µg/ml LPS über Nacht. Anschließend wurden die PEMs erneut mit RPMI 1640 gewaschen und in PBS für 30 min bei 37 °C mit ATP inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteine mittels Acetonfällung präzipitiert. Die Zellen wurden mit kaltem PBS mit 0,5 mM EDTA von den *culture slides* abgelöst und das Zellpellet nach dreiminütiger Zentrifugation bei 300 x g in Lysispuffer resuspendiert. Die Lyse erfolgte für 30 min auf Eis. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 16000 x g und 4 °C wurde der Überstand (Zelllysate) abgenommen. Die Pellets der Acetonfällung

und die Zelllysate wurden mit LDS-Puffer versetzt und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von IL-1 β erfolgte im Westernblot.

2.6.5 Interaktion zwischen APZ und T-Zelle

Im Durchflusszytometer

Um die Interaktion von APZs und T-Zellen im Durchflusszytometer sichtbar zu machen wurden die APZs und die T-Zellen vor der Koinkubation getrennt mit SNARF-1 und Celltracker green beladen. Die APZs wurden einmal mit RPMI 1640 gewaschen und auf 5×10^6 Zellen/ml in RPMI 1640 resuspendiert. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit einer $10 \mu\text{M}$ SNARF-1 Lösung in RPMI 1640 versetzt (Endkonzentration SNARF-1: $5 \mu\text{M}$) und 45 min bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit RPMI 1640 gewaschen und in RPMI Kompletmedium auf 5×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Die T-Zellen wurden einmal mit RPMI Kompletmedium gewaschen und auf eine Zellzahl von 5×10^6 /ml resuspendiert. Die T-Zellen wurden im Verhältnis 3:1 mit einer $4 \mu\text{M}$ Celltracker green Lösung in RPMI Kompletmedium versetzt (Endkonzentration Celltracker green: $1 \mu\text{M}$) und 3 min bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit RPMI Kompletmedium gewaschen, auf eine Zellzahl von 5×10^6 /ml resuspendiert und 45 min bei 37°C und 5% CO_2 weiterinkubiert. Die erfolgreiche Beladung der Zellen mit den jeweiligen Farbstoffen wurde im Mikroskop kontrolliert.

Jeweils 5×10^5 APZs und T-Zellen wurden anschließend in Gegenwart oder Abwesenheit von $10 \mu\text{M}$ OVA₃₂₃₋₃₃₉ für 3 h bei 37°C und 5% CO_2 in RPMI Kompletmedium koinkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und in $500 \mu\text{l}$ 2%igem (w/v) PFA in PBS resuspendiert (Fixierung der Zellen). Die Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

Im ELISA

Für die Koinkubation von APZs und T-Zellen zur anschließenden Zytokinbestimmung im Überstand wurden 10^4 APZs und 5×10^4 T-Zellen pro Napf in einer 96-well-Platte ausgesät. Je nach Versuchsaufbau wurden die APZs 24 h vor der Koinkubation mit 50 ng/ml TNF- α oder 100 ng/ml bzw. $1 \mu\text{g/ml}$ LPS vorstimuliert oder unstimuliert eingesetzt. Die Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von $200 \mu\text{l}$ RPMI Kompletmedium für 24 h bei 37°C und 5% CO_2 in Gegenwart unterschiedlicher OVA₃₂₃₋₃₃₉-Konzentrationen koinkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen für 5 min bei $300 \times g$ anzentrifugiert und $100 \mu\text{l}$ des Überstandes für die Bestimmung der sezernierten Zytokine im ELISA (siehe 2.6.1) abgenommen. Für jede Versuchsbedingung wurden drei Parallelansätze durchgeführt.

2.7 Aktivitätsuntersuchungen des P2X7-Rezeptors und der ARTs

2.7.1 PS-Externalisierung – Anfärbung mit AnnexinV

Phosphatidylserin, das durch Aktivierung des P2X7-Rezeptors von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite transloziert wird, bindet in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen AnnexinV und kann so nachgewiesen werden. Die Zellen wurden auf 10^7 Zellen pro ml in PBS resuspendiert und pro Ansatz 100 μl (10^6 Zellen) eingesetzt. Zu den Ansätzen wurden 100 μl ATP-Lösung gegeben und die Zellen für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml Annexinpuffer gewaschen und in 100 μl Annexinpuffer resuspendiert. Pro Ansatz wurden 2,5 μl AnnexinV-FITC hinzugegeben und die Zellen erneut 30 min bei 4 °C inkubiert. Das Gesamtvolumen pro Ansatz wurde mit Annexinpuffer auf 500 μl erhöht und die Zellen am Durchflusszytometer gemessen.

2.7.2 Porenbildung – Anfärbung mit YO-PRO-1 oder Ethidiumbromid

Die Aktivierung des P2X7-Rezeptors führt zur Bildung einer Pore, durch die Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 900 Da ins Zellinnere gelangen können. Die Bildung dieser Pore kann durch die Aufnahme von YO-PRO-1 (629 Da) oder Ethidiumbromid (394 Da) nachgewiesen werden. Die Zellen wurden auf $10^7/\text{ml}$ in NaCl-Puffer resuspendiert und 100 μl (10^6 Zellen) pro Ansatz eingesetzt. Nach der Zugabe von 100 μl ATP-Lösung und 1 μM YOPRO-1 bzw. Ethidiumbromid wurden die Zellen 30 min bei 37 °C inkubiert, zweimal mit 1 ml NaCl-Puffer gewaschen und am Durchflusszytometer gemessen.

2.7.3 Calcium-Flux

Um den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in Zellen zu messen, wurden diese zuvor mit dem Calcium-sensitiven Farbstoff Fluo4 AM beladen. Die Zellen wurden auf $4 \times 10^6/\text{ml}$ in RPMI 1640 resuspendiert und mit einem 1:1 Gemisch aus Fluo4 AM und Pluronic F-127 versetzt, so dass eine Konzentration von 1 μM Fluo4 AM vorlag. Nach 30minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen zweimal mit RPMI Kompletmedium gewaschen und auf eine Zellzahl von $4 \times 10^7/\text{ml}$ in RPMI 1640 resuspendiert. In FACS-Röhrchen wurden 500 μl NaCl-Medium mit 1 mM CaCl_2 vorgelegt und auf 37 °C erwärmt. Pro Röhrchen wurden 20 μl Zellsuspension zugegeben und am Durchflusszytometer für etwa 20 s der Nullwert gemessen. Das Röhrchen wurde kurz entfernt, 50 μl ATP- oder BzATP-Lösung hinzugegeben, gevortext und das Röhrchen bis zu einer Gesamtdauer von 2 min weitergemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Programme WinMDI 2.9 und Excel.

2.7.4 Messung der ART-Aktivität – 1G4-Assay

Die Messung der ART-Aktivität erfolgte mit Hilfe des NAD-Analogons etheno-NAD (eNAD), das von der ART ebenso wie NAD als Substrat genutzt werden kann. Die etheno-ADP-Ribosylierung von Proteinen kann daraufhin mit dem monoklonalen Antikörper 1G4 nachgewiesen werden, der gegen die etheno-Adenosin-Gruppe gerichtet ist (Abb. 2.2). Die Zellen wurden auf 10^7 Zellen pro ml in PBS resuspendiert und $100 \mu\text{l}$ (10^6 Zellen) pro Ansatz eingesetzt. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen eNAD-Konzentrationen bei 4°C oder 37°C für den angegebenen Zeitraum in Gegenwart oder Abwesenheit von 2 mM DTT inkubiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die Anfärbung mit dem 1G4-Antikörper erfolgte wie unter 2.6.2 beschrieben.

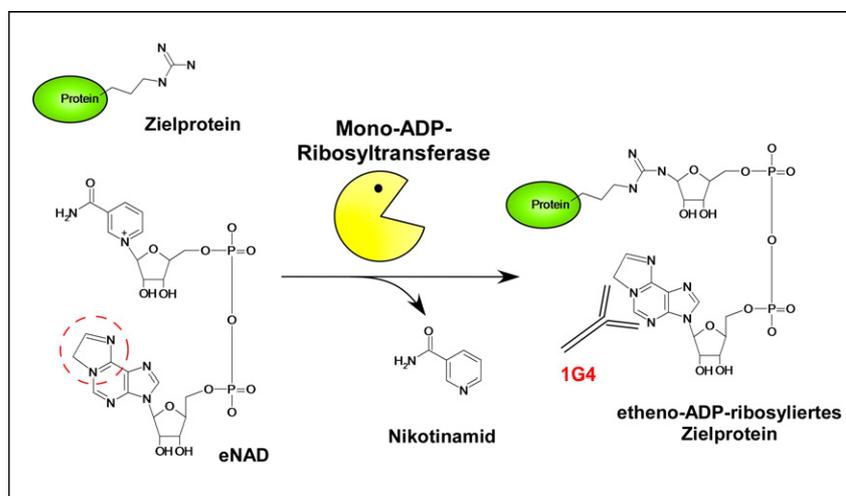


Abb. 2.2: Nachweis der etheno-ADP-Ribosylierung durch den 1G4-Assay. Als Substrat dient etheno-NAD (eNAD), das eine zusätzliche etheno-Gruppe am Adenosin trägt (roter Kreis). Der Nachweis erfolgt mit Hilfe des 1G4-Antikörpers, der gegen etheno-Adenosin gerichtet ist.

2.7.5 Autoradiographie

Die unstimulierten und vorstimulierten BMMs (siehe 2.3.8) wurden auf eine Zellzahl von $5 \times 10^7/\text{ml}$ in PBS resuspendiert und pro Ansatz $200 \mu\text{l}$ Zellsuspension (10^7 Zellen) eingesetzt. Die Zellen wurden mit einer NAD-Lösung, bestehend aus NAD, ADPR, DTT und ^{32}P -NAD versetzt, so dass Endkonzentrationen von $2 \mu\text{M}$ NAD, 1 mM ADPR und 2 mM DTT erreicht wurden. Von dem radioaktiven ^{32}P -NAD wurden $2 \mu\text{Ci}$ pro Ansatz eingesetzt. Die Zellen wurden mit der NAD-Lösung 15 min auf Eis inkubiert und anschließend fünfmal mit PBS mit 1 mM ADPR gewaschen. Das Zellpellet wurde in $200 \mu\text{l}$ Lysispuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei $800 \times g$ (Präzipitation der Zellkerne) wurde der Überstand abgenommen und erneut für 15 min bei $16000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand (das Zelllysat) wurde abgenommen und bei -20°C gelagert. Am nächsten Tag wurde das Zelllysat auf-

getaut und eine Immunpräzipitation mit anschließender SDS-PAGE durchgeführt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, getrocknet und auf einen Röntgenfilm aufgelegt, der bis zu 14 Tage bei -80 °C belichtet wurde. Sämtliche Arbeiten wurden im Isotopenlabor unter den entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen durchgeführt.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in zwei Bereiche unterteilt. Unter 3.1 wird die Rolle des P2X7-Rezeptors während der Interaktion zwischen antigenpräsentierender Zelle (APZ) und T-Zelle beschrieben. Zunächst wird dabei auf die Expression und Funktionalität des Rezeptors auf APZs und T-Zellen eingegangen. Es folgen Experimente zur Zytokinsekretion während der Interaktion zwischen APZs und T-Zellen und Untersuchungen zum Einfluss von Inhibitoren des P2X7-Rezeptors auf diese Zytokinsekretion. Ein besonderer Schwerpunkt wird dabei auf die Sekretion von IL-1 β gelegt, da eine Rolle für den P2X7-Rezeptor bei der Prozessierung und Sekretion von IL-1 β bereits beschrieben ist (38).

Der Abschnitt 3.2 behandelt die ADP-Ribosyltransferase ART2.1. Es werden Untersuchungen zur Expression und Aktivität der ART2.1 auf unterschiedlichen Populationen APZs gezeigt. Im weiteren Verlauf werden Experimente zur Identifikation ihrer Zielproteine gezeigt. Dabei wird der Frage nach einer Modifikation des P2X7-Rezeptors und der daraus folgenden Auswirkungen auf dessen Funktion nachgegangen.

3.1 Die Rolle des P2X7-Rezeptors auf antigenpräsentierenden Zellen

3.1.1 Charakterisierung der antigenpräsentierenden Zellen

Als APZs wurden aus dem Knochenmark verschiedener Mauslinien ausdifferenzierte dendritische Zellen (BMDCs, *bone marrow derived dendritic cells*, siehe 2.3.7) und Makrophagen (BMMs, *bone marrow derived macrophages*, siehe 2.3.8) verwendet. Bevor die Zellen für Versuche eingesetzt wurden, wurden sie durch Anfärbung verschiedener Oberflächenmoleküle im Durchflusszytometer näher charakterisiert. In Abb. 3.1 ist diese Charakterisierung für BMDCs, in Abb. 3.2 für BMMs aus BALB/c Mäusen zu sehen.

Die BMDCs wurden in der Regel an Tag 8 nach der Präparation der Knochenmarkszellen für Versuche eingesetzt. Zu diesem Zeitpunkt exprimierten 65 bis 80% der Zellen CD11c auf ihrer Oberfläche, die α -Kette des $\alpha_X\beta_2$ -Integrins CR4, die charakteristisch für dendritische Zellen ist. Des Weiteren wurden die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 exprimiert, sowie für die Antigenpräsentation wichtige MHC-II Moleküle.

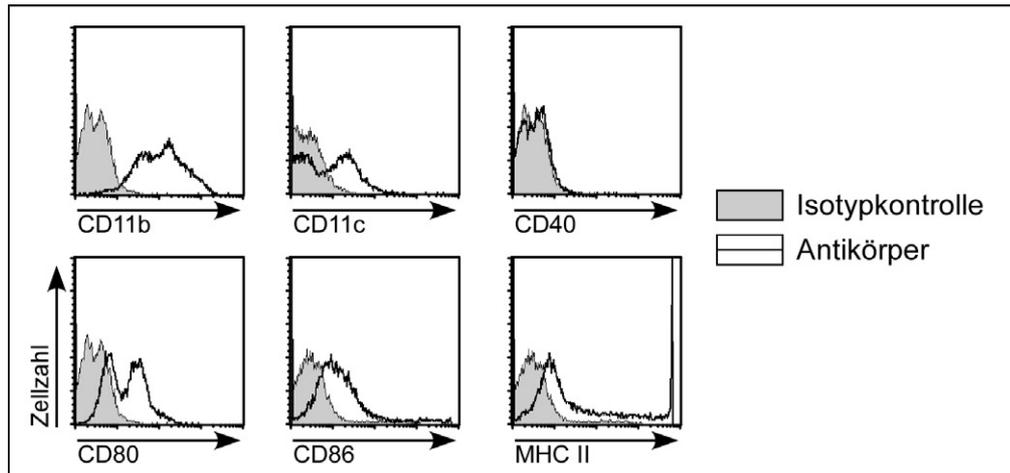


Abb. 3.1: *Expression charakteristischer Oberflächenmoleküle dendritischer Zellen.* Die Anfärbung der unstimulierten BMDCs erfolgte an Tag 8 nach der Präparation der Knochenmarkszellen aus BALB/c Mäusen. Jeweils 10^6 Zellen wurden mit einem spezifischen Antikörper (schwarze Linie) oder einer Isotypkontrolle (graue Fläche) gefärbt.

Die BMMs wurden ebenfalls an Tag 8 nach der Präparation der Knochenmarkszellen für Versuche eingesetzt. Die Zellen exprimierten zu diesem Zeitpunkt die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 sowie MHC-II Moleküle. Die Makrophagen exprimierten zusätzlich CD14, einen für Makrophagen charakteristischen Rezeptor, der zur Erkennung von Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien, dient. Im unstimulierten Zustand exprimierten weder dendritische Zellen noch Makrophagen CD40, einen Rezeptor für kostimulatorische Signale.

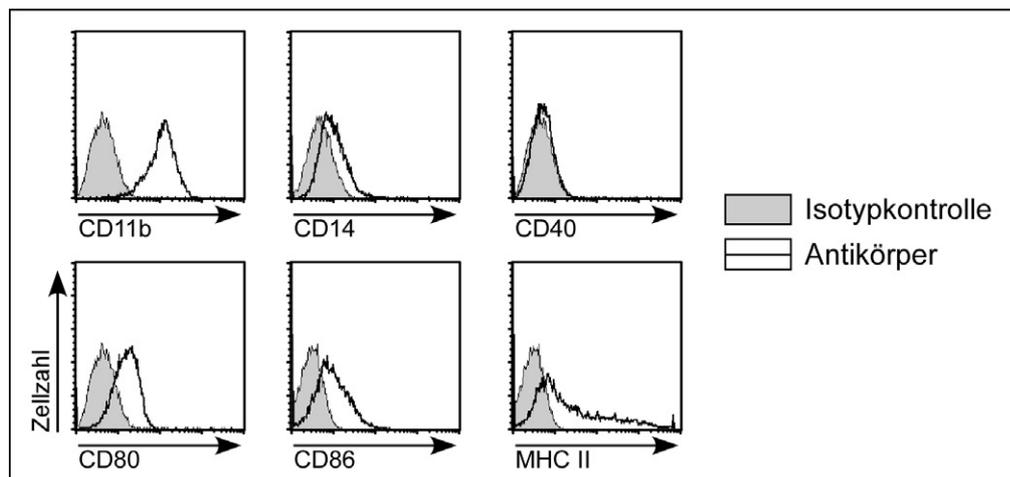


Abb. 3.2: *Expression charakteristischer Oberflächenmoleküle von Makrophagen.* Die Anfärbung der unstimulierten BMMs erfolgte an Tag 8 nach der Präparation der Knochenmarkszellen aus BALB/c Mäusen. Jeweils 10^6 Zellen wurden mit einem spezifischen Antikörper (schwarze Linie) oder einer Isotypkontrolle (graue Fläche) gefärbt.

3.1.2 Expression und Funktion des P2X7-Rezeptors auf antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen

Die Oberflächenexpression des P2X7-Rezeptors konnte mit Hilfe von im Institut durch DNA-Immunsierung hergestellten monoklonalen Antikörpern (RH23A44, RH24A43) und polyklonalen Antisera (K1G) nachgewiesen werden (82). In Abb. 3.3 ist die Expression des P2X7-Rezeptors auf APZs und primären T-Zellen zu sehen.

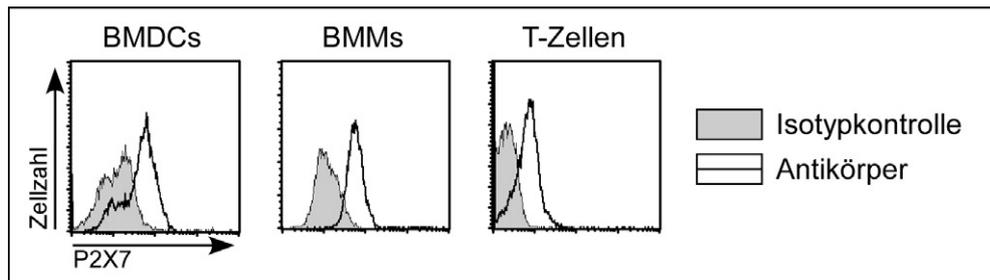


Abb. 3.3: *Oberflächenexpression des P2X7-Rezeptors.* Anfärbung von unstimulierten BMDCs und BMMs an Tag 8 nach der Präparation der Knochenmarkszellen und T-Zellen aus der Milz von BALB/c Mäusen. Jeweils 10^6 Zellen wurden mit dem Alexa488-konjugierten RH23A44 Antikörper (schwarze Linie) oder einer Isotypkontrolle (graue Fläche) gefärbt.

Sowohl APZs als auch T-Zellen exprimierten den P2X7-Rezeptor in vergleichbarer Stärke auf ihrer Oberfläche. Die Anfärbung von BMDCs, die mit Tumornekrosisfaktor- α (TNF- α) oder LPS vorstimuliert wurden, zeigte auf den stimulierten, CD86-positiven BMDCs eine im Vergleich zu den unstimulierten BMDCs reduzierte P2X7-Expression (Abb. 3.4).

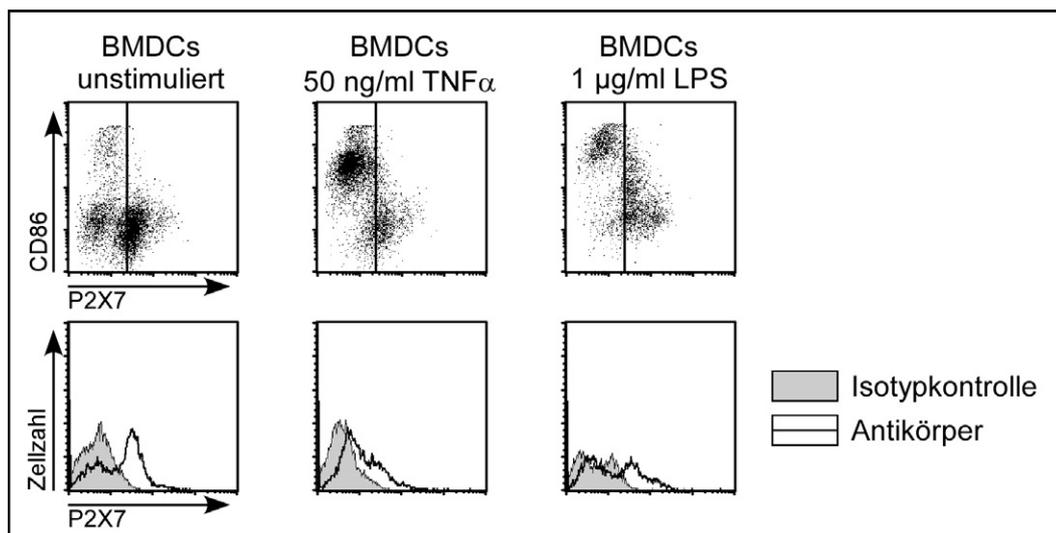


Abb. 3.4: *Oberflächenexpression des P2X7-Rezeptors auf BMDCs.* Anfärbung von unstimulierten, mit 50 ng/ml TNF- α oder mit 1 μ g/ml LPS vorstimulierten BMDCs an Tag 8 nach der Präparation der Knochenmarkszellen aus BALB/c Mäusen. Jeweils 10^6 Zellen wurden mit einem APC-konjugierten Antikörper gegen CD86 und dem Alexa488-konjugierten RH23A44 Antikörper (schwarze Linie) oder einer Isotypkontrolle (graue Fläche) gefärbt.

Die Untersuchung der P2X7-Expression auf RNA-Ebene ergab, dass die verringerte Oberflächenexpression des P2X7-Rezeptors auf den stimulierten BMDCs zumindest teilweise mit einem reduzierten Vorkommen der P2X7-mRNA einherging. In Abb. 3.5 ist die Amplifikation der P2X7-DNA aus der mittels RT-PCR transkribierten cDNA von der Gesamt-RNA unstimulierter, mit LPS oder TNF- α vorstimulierter BMDCs, sowie von der Gesamt-RNA der untransfizierten bzw. der mit P2X7-transfizierten B-Zelllinie A20 zu sehen. Um das Vorhandensein der P2X7-mRNA unabhängig von einer unterschiedlich starken Translationsaktivität in den einzelnen Zellen zu untersuchen, wurde zusätzlich die DNA des ubiquitär exprimierten eukaryotischen Initiationsfaktors 2 α (eIF2 α) als sogenanntes „Housekeeping Gene“ amplifiziert.

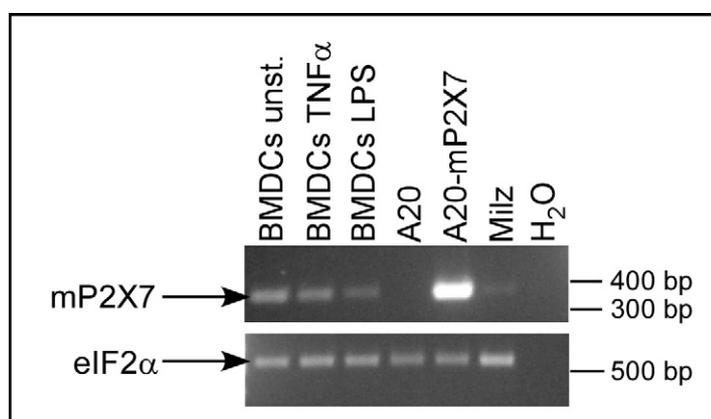


Abb. 3.5: *Amplifikation der P2X7-DNA aus der Gesamt-RNA unterschiedlicher Zellen.* Untersucht wurde mittels RT-PCR transkribierte cDNA aus der Gesamt-RNA von unstimulierten, mit 50 ng/ml TNF- α bzw. mit 1 μ g/ml LPS vorstimulierten BMDCs, der B-Zelllinie A20, mit dem P2X7-Rezeptor transfizierten A20-Zellen, sowie käuflich erworbene cDNA aus murinen Milzzellen. Amplifikation der murinen P2X7-DNA mit exonübergreifenden Primern und des eukaryotischen Initiationsfaktors 2 α (eIF2 α) als „Housekeeping Gene“.

Um die Funktionalität des P2X7-Rezeptors auf den verschiedenen Zellpopulationen zu untersuchen, wurden die im folgenden beschriebenen Aktivitätstests durchgeführt. Die Aktivierung des P2X7-Rezeptors hat eine Reihe messbarer Veränderungen zur Folge. Die Bindung von ATP an den Rezeptor führt einerseits zur Öffnung des Ionenkanals, der von drei P2X7-Molekülen gebildet wird. Dadurch kommt es zum Einstrom von Na⁺- und Ca²⁺-Ionen, sowie zum Ausstrom von K⁺-Ionen (30). Der Einstrom von Ca²⁺-Ionen kann durch vorherige Beladung der Zellen mit einem Calcium-sensitiven Farbstoff, wie z. B. Fluo4 AM, und der Messung von Änderungen in dessen Fluoreszenz am Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Die Bildung und Öffnung des Ionenkanals erfolgt innerhalb von Millisekunden nach Aktivierung des P2X7-Rezeptors (27). Aus diesem Grund wurde der Einstrom von Ca²⁺-Ionen wie unter 2.7.3 beschrieben mittels Echtzeitmessung analysiert.

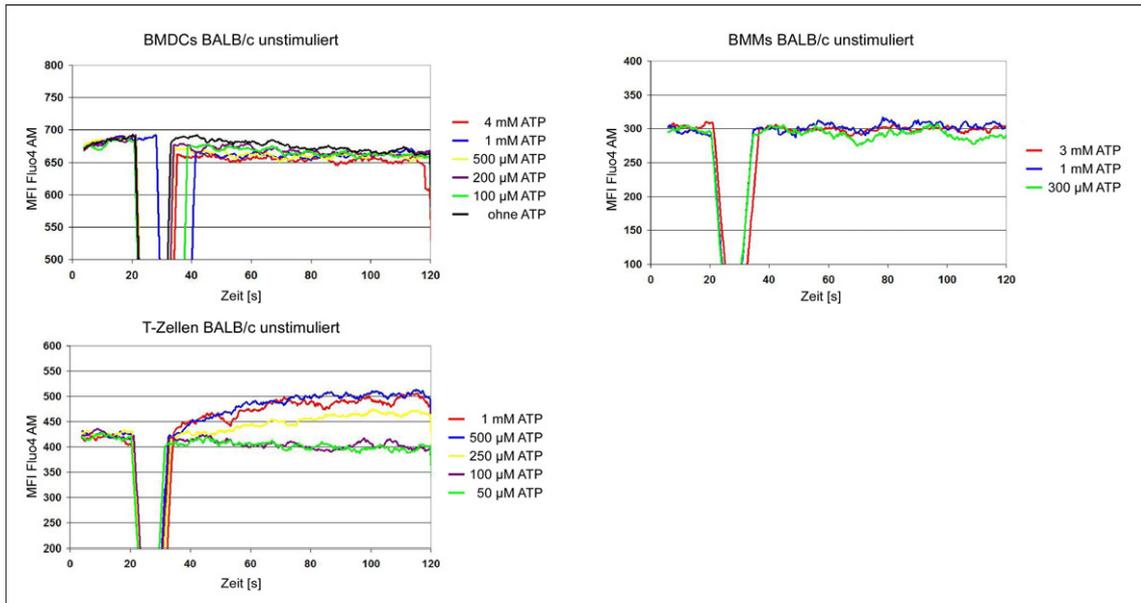


Abb. 3.6: *Einstrom von Ca^{2+} -Ionen nach Zugabe von ATP.* Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des Calcium-sensitiven Farbstoffes Fluo4 AM über die Zeit. Der Einbruch der Kurven markiert die ATP-Zugabe zum Erreichen der angegebenen ATP-Konzentrationen. Untersucht wurden unstimulierte BMDCs und BMMs an Tag 8 nach der Präparation der Knochenmarkszellen aus BALB/c Mäusen und primäre T-Zellen aus der Milz von BALB/c Mäusen.

Der P2X7-Rezeptor benötigt zu seiner Aktivierung relativ hohe ATP-Konzentrationen von über 100 μ M (91). Makrophagen und dendritische Zellen zeigten keinen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen nach Zugabe selbst hoher Mengen ATP (Abb. 3.6). Im Gegensatz zu dendritischen Zellen und Makrophagen war in T-Zellen ab einer ATP-Konzentration von 250 μ M ein deutlicher Einstrom von Ca^{2+} -Ionen messbar. APZs und T-Zellen reagierten somit unterschiedlich auf ATP, obwohl ein ähnliches Expressionsniveau des P2X7-Rezeptors auf der Oberfläche vorlag.

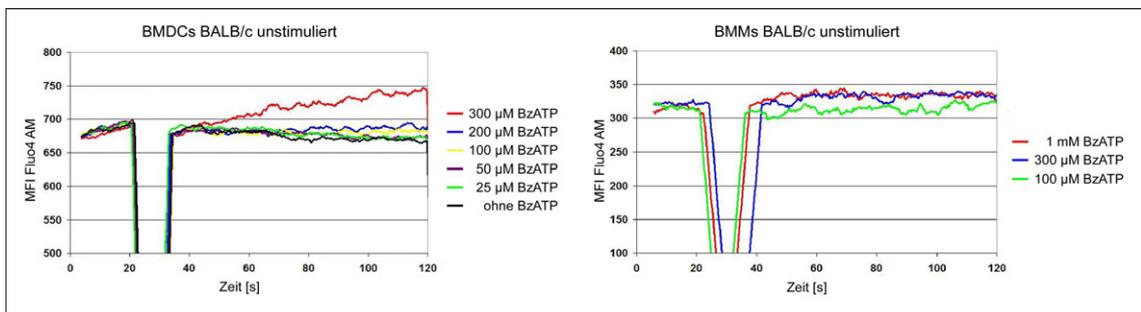


Abb. 3.7: *Einstrom von Ca^{2+} -Ionen nach der Zugabe von BzATP.* Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des Calcium-sensitiven Farbstoffes Fluo4 AM über die Zeit. Der Einbruch der Kurven markiert die BzATP-Zugabe zum Erreichen der angegebenen BzATP-Konzentrationen. Untersucht wurden unstimulierte BMDCs und BMMs an Tag 8 nach der Präparation der Knochenmarkszellen aus BALB/c Mäusen.

Neben der Reaktion auf ATP wurde auch die Reaktion auf BzATP, einen Agonisten des P2X7-Rezeptors mit etwa zehnfach höherer agonistischer Potenz, getestet (91). Wie in Abb. 3.7 zu sehen ist, reagierten die dendritischen Zellen nach der Zugabe von 300 μM BzATP mit einem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen.

Eine andauernde Aktivierung des P2X7-Rezeptors hat Veränderungen in der Zellmembran zur Folge. Phosphatidylserin, das sich normalerweise nur auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran befindet, wird nach außen gekehrt und kann dort über die Bindung von Fluochrom-konjugiertem AnnexinV im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Die Exposition von Phosphatidylserin dient zugleich als frühes Anzeichen der Apoptose, die bei länger andauernder Aktivierung des P2X7-Rezeptors eintritt (35). Des Weiteren führt die andauernde Aktivierung des P2X7-Rezeptors zur Bildung einer Pore, durch die Moleküle mit einer Größe von bis zu 900 Da ins Zellinnere gelangen können. Diese Pore wird von Pannexin-1 gebildet (34) und kann durch die Aufnahme von Ethidiumbromid (394 Da) oder YO-PRO-1 (629 Da) und die damit einhergehende Anfärbung der Zellen im Durchflusszytometer nachgewiesen werden.

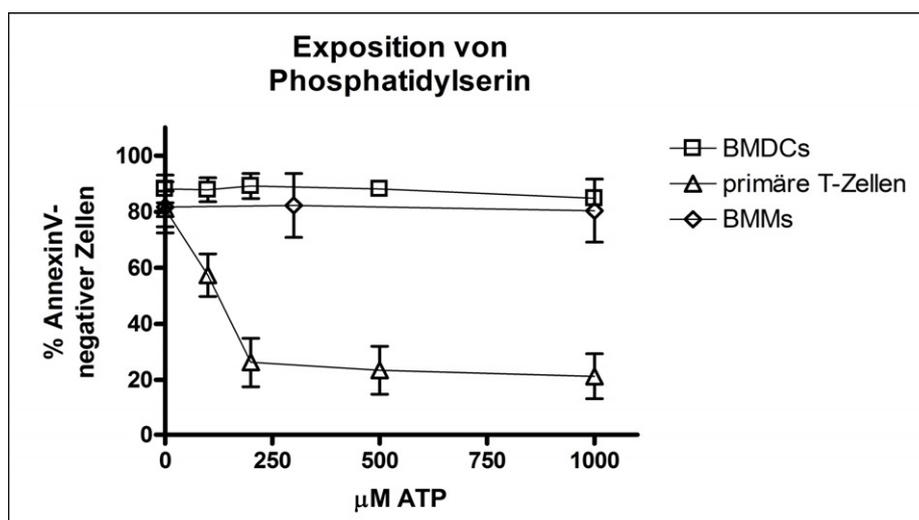


Abb. 3.8: *Exposition von Phosphatidylserin nach Inkubation mit ATP.* Dargestellt ist der prozentuale Anteil AnnexinV-negativer Zellen an der Gesamtpopulation in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration nach 30minütiger ATP-Inkubation bei 4 °C. Untersucht wurden unstimulierte BMDCs und BMMs an Tag 8 nach der Präparation der Knochenmarkszellen aus BALB/c Mäusen und primäre T-Zellen aus der Milz von BALB/c Mäusen.

Für die Exposition von Phosphatidylserin als Reaktion auf Inkubation mit ATP ergab sich ein ähnliches Bild wie bei der Messung des Ca^{2+} -Einstroms. Die T-Zellen zeigten bereits bei einer Konzentration von 100 μM ATP eine deutliche Anfärbung mit AnnexinV und somit eine Exposition von Phosphatidylserin, während die Inkubation von Makrophagen und dendritischen Zellen selbst mit hohen Konzentrationen von 1 mM ATP nicht zu einer AnnexinV-Anfärbung führten (Abb. 3.8).

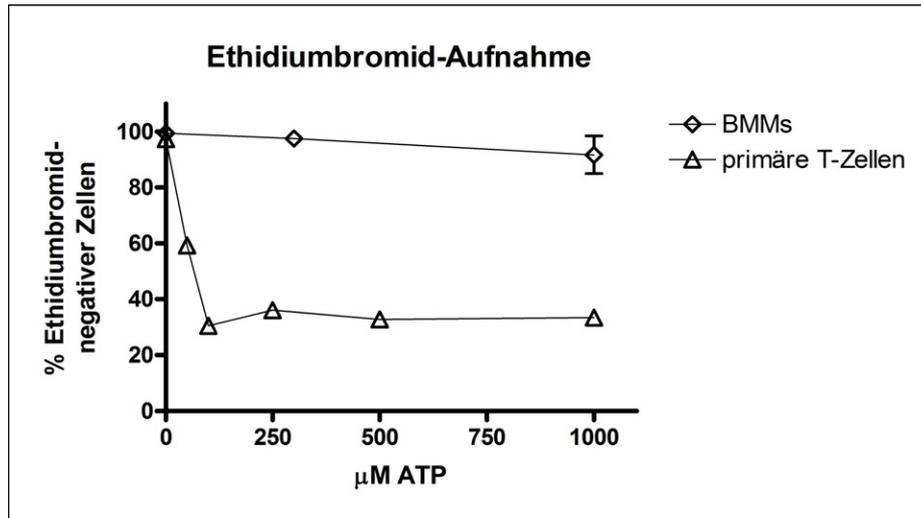


Abb. 3.9: *Ethidiumbromid-Aufnahme nach Inkubation mit ATP.* Dargestellt ist der prozentuale Anteil Ethidiumbromid-negativer Zellen in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration nach 30minütiger Inkubation mit ATP bei 37 °C. Untersucht wurden unstimulierte BMMs an Tag 8 nach der Präparation der Knochenmarkszellen aus BALB/c Mäusen und primäre T-Zellen aus der Milz von BALB/c Mäusen.

Auch in Bezug auf die Bildung der Pore als Folge der Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ATP zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen T-Zellen und APZs (Abb. 3.9). Die T-Zellen reagierten ab einer Konzentration von 50 µM ATP mit der Aufnahme von Ethidiumbromid, während bei den Makrophagen nur bei hohen Konzentrationen von 1 mM ATP eine leichte Ethidiumbromid-Aufnahme zu beobachten war. Ein vergleichbares Bild ergab sich auch, wenn statt Ethidiumbromid der DNA-Farbstoff YO-PRO-1 als Indikator für die Porenbildung verwendet wurde (Abb. 3.10).

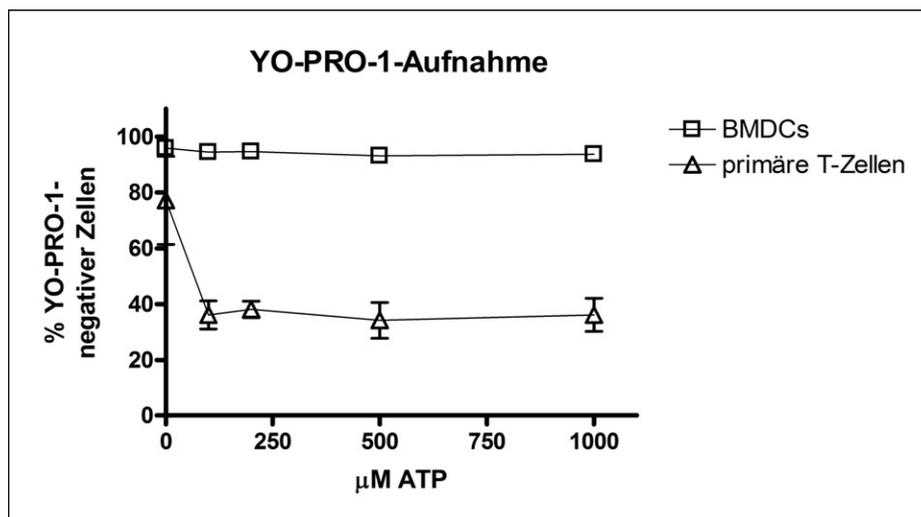


Abb. 3.10: *YO-PRO-1-Aufnahme nach Inkubation mit ATP.* Dargestellt ist der prozentuale Anteil YO-PRO-1-negativer Zellen in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration nach 30minütiger Inkubation mit ATP bei 37 °C. Untersucht wurden unstimulierte BMDCs an Tag 8 nach der Präparation der Knochenmarkszellen aus BALB/c Mäusen und primäre T-Zellen aus der Milz von BALB/c Mäusen.

3.1.3 Die Abhängigkeit der IL-1 β Sekretion von ATP

Wie bereits beschrieben wurde, ist der P2X7-Rezeptor an der Sekretion von IL-1 β durch Makrophagen beteiligt. Die durch die ATP-vermittelte Aktivierung des P2X7-Rezeptors ausgelöste Signalkaskade führt zur Aktivierung der Caspase-1, die wiederum die Vorform des IL-1 β zur biologisch aktiven 17 kDa Form prozessiert (38). Um dies zu bestätigen, wurden zunächst BMDCs bzw. Peritonealmakrophagen (PEMs, *peritoneal exudate macrophages*) mit LPS stimuliert, wodurch die Synthese der unprozessierten IL-1 β -Vorform (33 kDa) induziert wurde. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen ATP-Konzentrationen inkubiert, die Proteine aus den anschließend hergestellten Zelllysaten und dem Kulturüberstand gefällt und nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE das IL-1 β im Westernblot nachgewiesen. Der Mechanismus der IL-1 β Freisetzung ist noch nicht genau geklärt. Nach einer Hypothese erfolgt die Freisetzung des IL-1 β über Mikrovesikel, die von den Zellen in den Überstand abgegeben werden (44). In diesem Versuch wurde zusätzlich getestet, ob sich derartige Mikrovesikel durch Filtration aus dem Überstand entfernen lassen. Ein Teil der Überstände wurde daher vor der Fällung der Proteine durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,22 μ m filtriert.

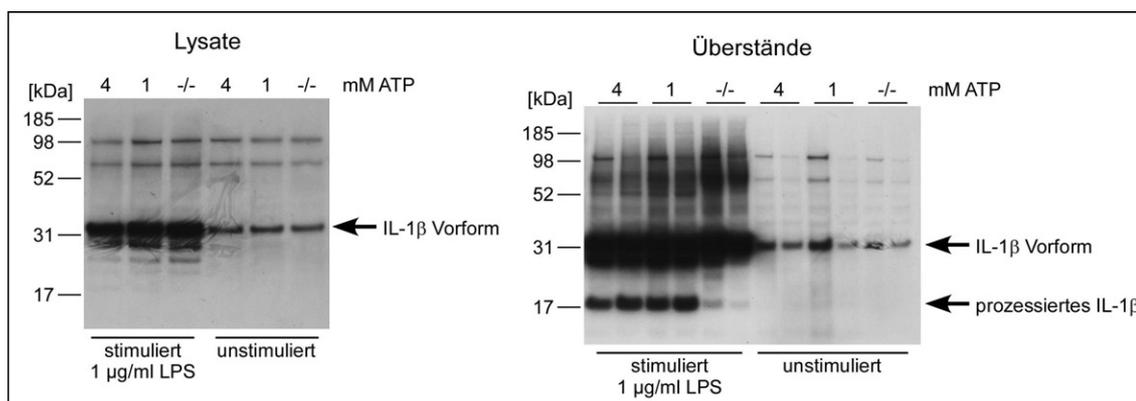


Abb. 3.11: Nachweis von IL-1 β aus BMDCs im Westernblot. Zelllysate und Überstände von 5×10^5 BMDCs nach 30minütiger ATP-Inkubation bei 37 °C. Untersucht wurden unstimulierte bzw. für 24 h mit 1 μ g/ml LPS vorstimulierte BMDCs an Tag 8 nach der Präparation der Knochenmarkszellen aus BALB/c Mäusen. Ein Teil der Überstände wurde nach der Abnahme filtriert, jeweils in der zweiten Spur zu sehen.

In den Überständen der mit ATP behandelten BMDCs konnte die prozessierte Form des IL-1 β (17 kDa) eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 3.11). Des Weiteren ist erkennbar, dass eine starke Synthese der IL-1 β -Vorform (33 kDa) nur in LPS-stimulierten Zellen stattfand. In den Überständen wurde auch die unprozessierte Form des IL-1 β nachgewiesen. Diese stammte vermutlich aus während der ATP-Inkubation gestorbenen Zellen. Eine Filtration der Überstände führte nicht zu einer Verringerung der messbaren

Menge an prozessiertem IL-1 β . Eine mögliche Ursache hierfür ist die Zerstörung der Mikrosvesikel durch die Filtration.

Neben dendritischen Zellen, gaben auch LPS-stimulierte und mit ATP behandelte PEMs IL-1 β in den Überstand ab (Abb. 3.12). Die Aktivierung des P2X7-Rezeptors mit BzATP führte jedoch nicht zur Prozessierung von IL-1 β .

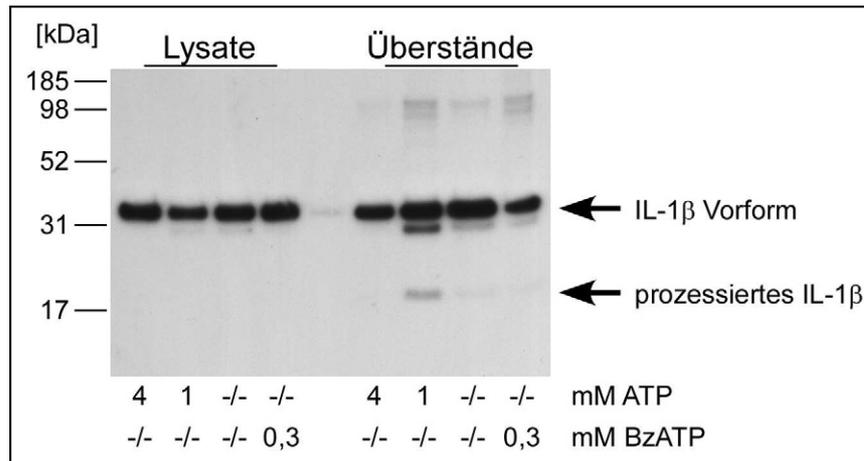


Abb. 3.12: Nachweis von IL-1 β aus PEMs im Westernblot. Untersucht wurden PEMs aus BALB/c Mäusen 48h nach der Präparation und nach Stimulation mit 1 μ g/ml LPS über Nacht. Zellysate und Überstände von 2×10^5 vorstimulierten PEMs nach 30minütiger Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen ATP bzw. BzATP bei 37 °C.

3.1.4 Modellsystem für die Interaktion zwischen antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen

Um die Interaktion zwischen APZs und T-Zellen unter definierten Bedingungen untersuchen zu können, wurde das DO11.10-Modellsystem genutzt. Eingesetzt wurden zum einen Zellen der T-Hybridomzelllinie DO11.10 (DO11.10 Hyb) und zum anderen aus DO11.10 Mäusen isolierte T-Zellen (DO11.10 Pri). Der transgene T-Zell-Rezeptor, den diese Zellen mehrheitlich tragen, ist für ein Peptid des Hühner-Ovalbumins, das aus den Aminosäuren 323 bis 339 (OVA₃₂₃₋₃₃₉) besteht, in Zusammenhang mit MHC-II Molekülen spezifisch (86). Die im Labor vorhandenen DO11.10 Hyb wurden zunächst im Durchflusszytometer auf die Expression charakteristischer Oberflächenmoleküle von T-Zellen näher untersucht. Die Zellen zeigten nur noch eine sehr schwache Expression von CD3, einem Bestandteil des T-Zell-Rezeptors, und des Korezeptors CD4 (DO11.10 Hyb unsortiert). Wie in Abb. 3.13 zu sehen ist konnte durch eine mehrfache Selektion der CD3- und CD4-positiven Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers der Anteil an CD3- aber nicht der an CD4-hochexprimierenden Zellen gesteigert werden (DO11.10 Hyb sortiert).

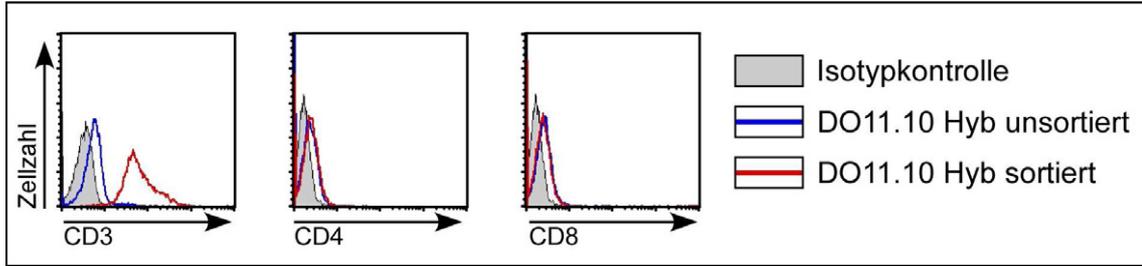


Abb. 3.13: Oberflächenexpression von CD3, CD4 und CD8 auf DO11.10 Hyb Zellen. Anfärbung von jeweils 10^6 Zellen mit einem spezifischen Antikörper (Linie) oder einer Isotypkontrolle (graue Fläche). Vergleich zwischen DO11.10 Hyb Zellen vor (blaue Linie) und nach (rote Linie) der Selektion auf CD3- und CD4-positive Zellen.

In ersten Versuchen die Interaktion zwischen APZs und T-Zellen sichtbar zu machen, wurden die Zellpopulationen getrennt mit Farbstoffen markiert. Die BMDCs wurden mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff SNARF-1, die DO11.10 Hyb mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff Celltracker green beladen und die Zellen anschließend in Gegenwart oder Abwesenheit des Antigens OVA₃₂₃₋₃₃₉ koinkubiert. Nach der Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd folgte die Analyse im Durchflusszytometer.

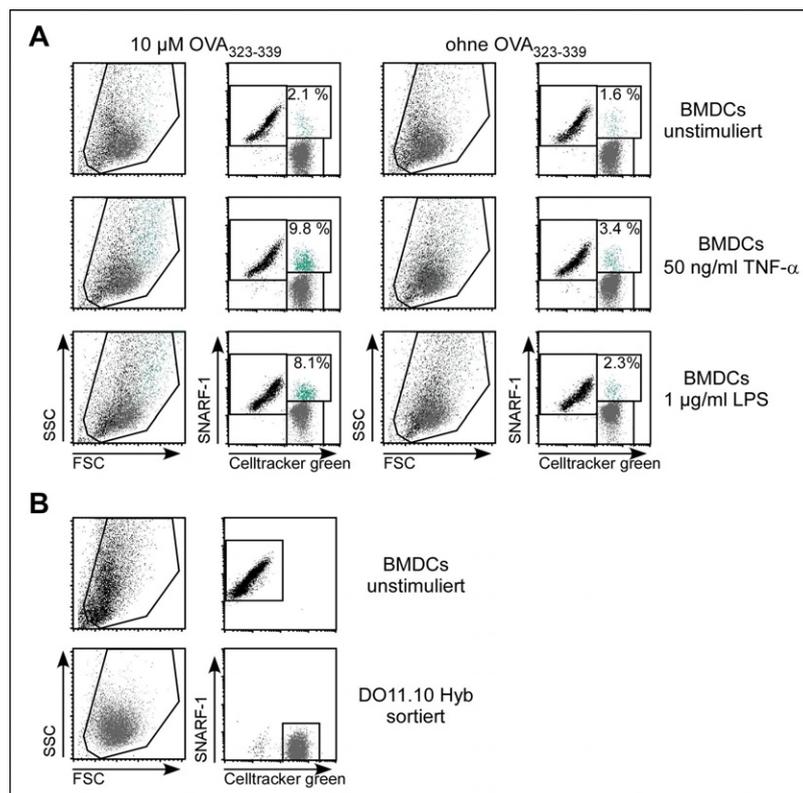


Abb. 3.14: APZ-T-Zell-Interaktion. A: Analyse der Zellaggregate nach Koinkubation von BMDCs und DO11.10 Hyb. Koinkubation unstimulierter, TNF-stimulierter und LPS-stimulierter BMDCs Tag 8 (markiert mit dem Farbstoff SNARF-1) mit DO11.10 Hyb sortiert (markiert mit dem Farbstoff Celltracker green) für 3 h bei 37 °C in Gegenwart oder Abwesenheit von 10 μ M OVA₃₂₃₋₃₃₉. B: Analyse der mit SNARF-1(BMDCs) bzw. Celltracker green (DO11.10 Hyb sortiert) markierten Einzelpopulationen.

In Abb. 3.14 ist deutlich zu erkennen, dass sich bereits nach drei Stunden Koinkubation Aggregate zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen bildeten, erkennbar an dem Erscheinen einer SNARF-1 und Celltracker green doppelt-positiven Population (Abb. 3.14A grün dargestellt). Diese Aggregate traten verstärkt bei der Koinkubation der Zellen in Gegenwart des Antigens auf, insbesondere wenn die BMDCs durch Inkubation mit TNF- α oder LPS voraktiviert wurden.

Um die Interaktion zwischen APZs und T-Zellen genauer zu untersuchen, wurden BMDCs zusammen mit DO11.10 Hyb T-Zellen in Gegenwart unterschiedlicher Antigenkonzentrationen inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die in den Zellkulturüberstand sezernierten Zytokine mittels ELISA bestimmt.

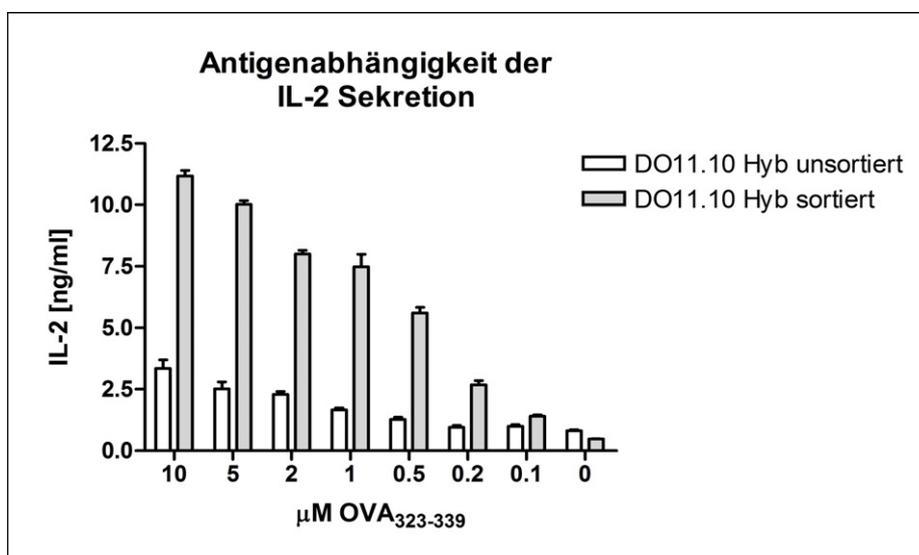


Abb. 3.15: Antigenabhängige IL-2 Sekretion. Bestimmung der IL-2 Menge im Überstand von unstimulierten BMDCs Tag 8 (BALB/c) und DO11.10 Hyb T-Zellen nach 24 h Koinkubation in Gegenwart der angegebenen $\text{OVA}_{323-339}$ -Konzentrationen. Vergleich der Koinkubation unstimulierter BMDCs mit DO11.10 Hyb sortiert (graue Balken) und unsortiert (weiße Balken).

In Abb. 3.15 ist zu sehen, dass die Sekretion von Interleukin-(IL)-2 mit steigender Antigenkonzentration zunahm. Des Weiteren war zu beobachten, dass die Koinkubation mit DO11.10 Hyb sortiert zu einer deutlich höheren IL-2 Sekretion führte. Vermutlich wurde dies durch die stärkere Expression von CD3 und die damit einhergehende bessere intrazelluläre Weiterleitung stimulatorischer Signale über den T-Zell-Rezeptor bedingt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden T-Zellen aus Milz und Lymphknoten von DO11.10 Mäusen isoliert (DO11.10 Pri) und mit den DO11.10 Hyb sortiert hinsichtlich der Oberflächenexpression T-Zell-spezifischer Moleküle und der Fähigkeit zur IL-2 Sekretion verglichen.

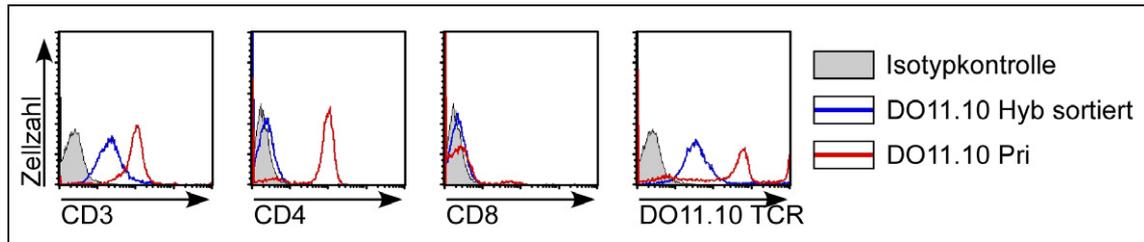


Abb. 3.16: Oberflächenexpression charakteristischer T-Zell-Moleküle auf DO11.10 T-Zellen. Anfärbung von jeweils 10^6 Zellen mit einem spezifischen Antikörper (Linie) oder einer Isotypkontrolle (graue Fläche). Vergleich zwischen DO11.10 Hyb sortiert (blaue Linie) und aus Milz und Lymphknoten von DO11.10 Mäusen isolierten T-Zellen (DO11.10 Pri, rote Linie).

Die DO11.10 Pri zeigten im Vergleich mit den DO11.10 Hyb sortiert eine deutlich höhere CD3- und CD4-Expression. Auch der transgene T-Zell-Rezeptor, der spezifisch für das OVA₃₂₃₋₃₃₉ Peptid ist, wurde stärker exprimiert (Abb. 3.16). Des Weiteren wurden von den DO11.10 Pri im Vergleich zu den DO11.10 Hyb sortiert wesentlich mehr IL-2 sezerniert, insbesondere bei niedrigen Antigenkonzentrationen (Abb. 3.17).

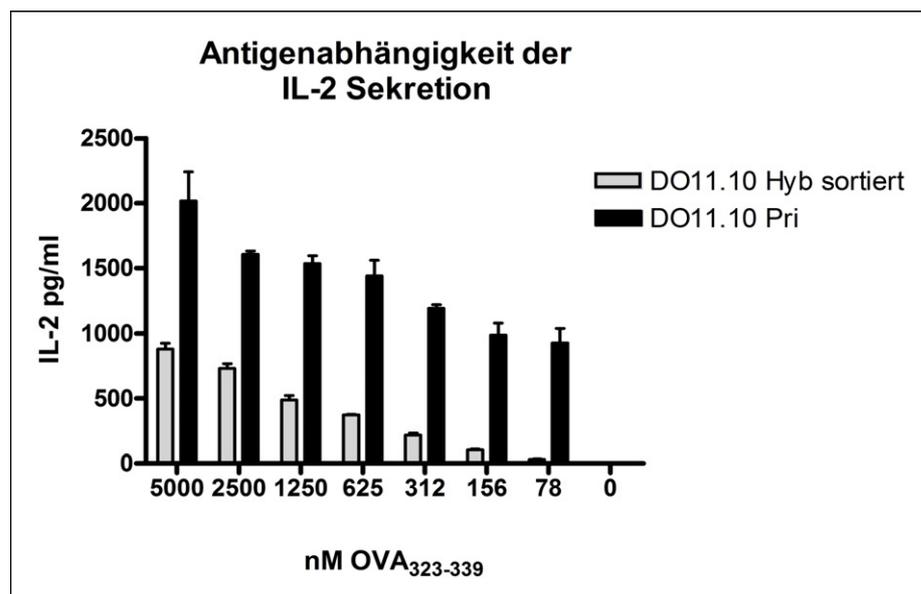


Abb. 3.17: Antigenabhängige IL-2 Sekretion. Bestimmung der IL-2 Menge im Überstand von unstimulierten BMDCs und DO11.10 T-Zellen nach 24 h Koinkubation in Gegenwart unterschiedlicher OVA₃₂₃₋₃₃₉-Konzentrationen. Vergleich der Koinkubation unstimulierter BMDCs mit DO11.10 Hyb sortiert (graue Balken) und DO11.10 Pri (schwarze Balken).

3.1.5 Antigenabhängige Sekretion von Interleukinen

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass während der Koinkubation von dendritischen Zellen und DO11.10 T-Zellen in Gegenwart des Antigens (OVA₃₂₃₋₃₃₉) IL-2 in den Zellkulturüberstand sezerniert wurde. Da bereits im Westernblot gezeigt werden konnte, dass LPS-stimulierte BMDCs und PEMs nach Inkubation mit ATP

IL-1 β in den Überstand abgeben (Abb. 3.11, Abb. 3.12), wurde im ELISA untersucht, ob neben IL-2 weitere Zytokine antigenabhängig sezerniert werden.

Die Koinkubation unstimulierter und mit TNF- α -vorstimulierter BMDCs mit DO11.10 Hyb führte zur antigenabhängigen Sekretion von IL-1 β (Abb. 3.18). Durch eine Vorstimulation der BMDCs mit LPS wurde während der Koinkubation deutlich mehr IL-1 β gebildet, jedoch unabhängig von dem Vorhandensein des Antigens. Eine Unterscheidung zwischen der biologisch inaktiven 33-kDa-Form und der biologisch aktiven 17-kDa-Form des IL-1 β war im ELISA nicht möglich.

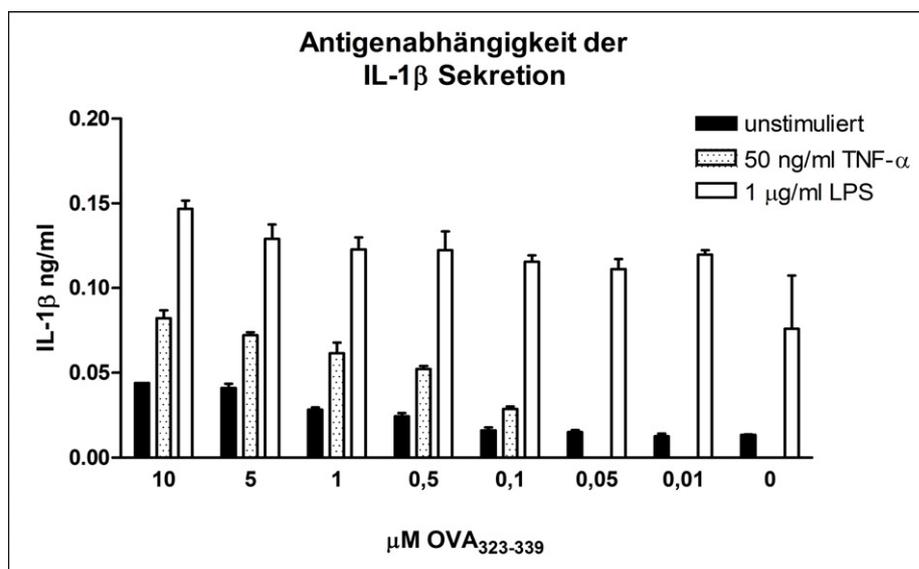


Abb. 3.18: Antigenabhängige IL-1 β Sekretion. Bestimmung der IL-1 β Menge im Überstand von BMDCs und DO11.10 Hyb nach 24 h Koinkubation in Gegenwart unterschiedlicher OVA₃₂₃₋₃₃₉-Konzentrationen. DO11.10 Hyb wurden mit unstimulierten (schwarze Balken), TNF- α -stimulierten (gepunktete Balken) oder LPS-stimulierten (weiße Balken) BMDCs Tag 8 (BALB/c) koinkubiert.

Neben IL-1 β und IL-2 wurde auch die Sekretion der Zytokine IL-4, IL-10, IL-12 und Interferon-(IFN)- γ getestet, wobei erneut die DO11.10 Hyb sortiert und mit den DO11.10 Pri verglichen wurden. Wie in Abb. 3.19 zu sehen ist, gab es deutliche Unterschiede zwischen DO11.10 Hyb sortiert und DO11.10 Pri in Bezug auf die Sekretion verschiedener Zytokine. Nach Koinkubation unstimulierter BMDCs mit DO11.10 Pri konnte keine antigenabhängige Freisetzung von IL-1 β und IL-4 nachgewiesen werden. Eine Sekretion von IFN- γ konnte nur nach Koinkubation der BMDCs mit DO11.10 Pri gezeigt werden. Die ebenfalls getesteten Zytokine IL-10 und IL-12 konnten gar nicht nachgewiesen werden. Somit bestanden deutliche Unterschiede in der Funktionalität von Hybridomzellen und primären T-Zellen.

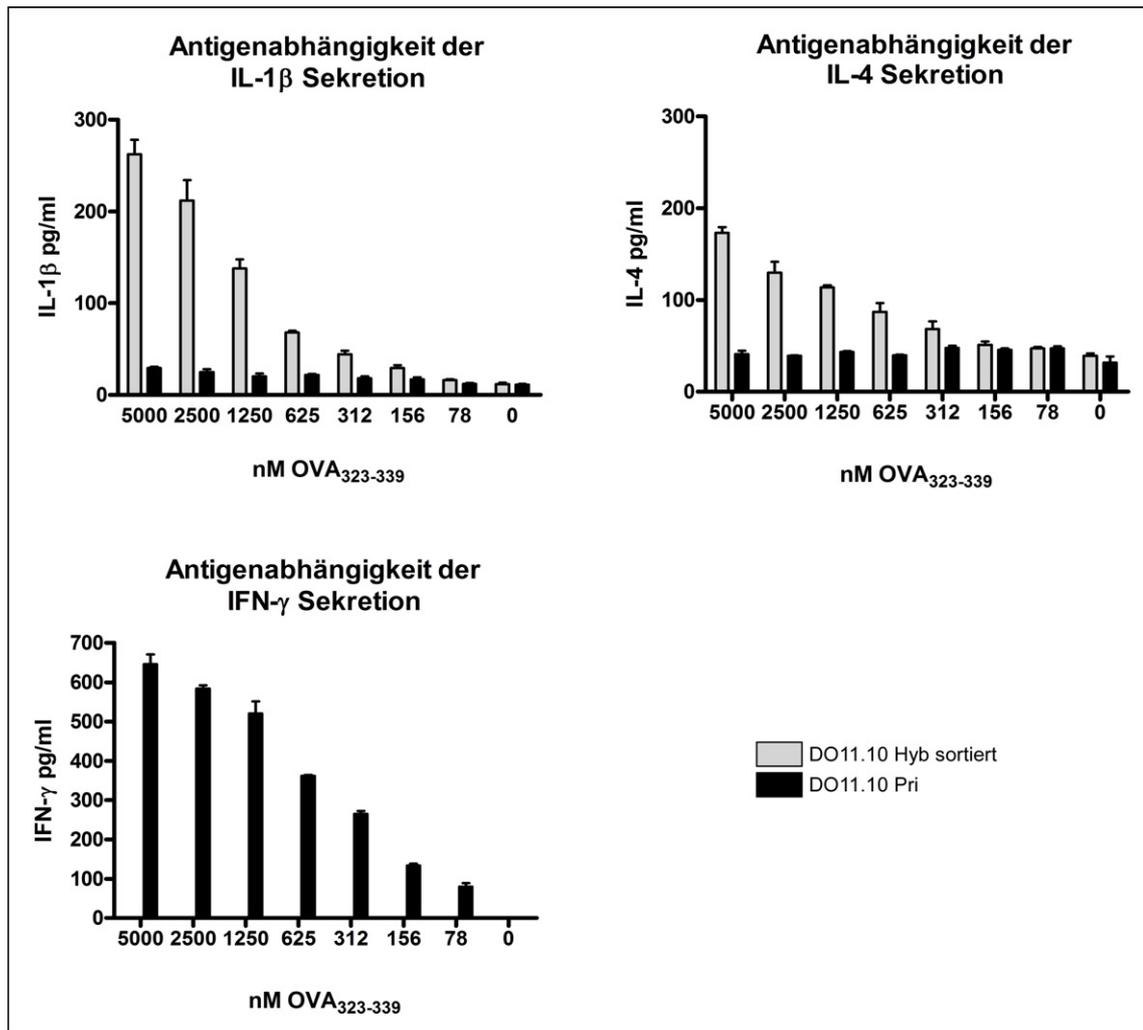


Abb. 3.19: Antigenabhängige Sekretion von IL-1 β , IL-4 und IFN- γ Nachweis von IL-1 β , IL-4 und IFN- γ im Überstand nach Koinkubation unstimulierter BMDCs Tag 8 (BALB/c) mit DO11.10 Hyb sortiert (graue Balken) oder DO11.10 Pri (schwarze Balken) in Gegenwart unterschiedlicher OVA₃₂₃₋₃₃₉-Konzentrationen für 24 h.

Eine Immunantwort wird initiiert, wenn naive, antigenspezifische T-Zellen in den lymphatischen Organen ihr Antigen auf APZs erkennen und von diesen weitere ko-stimulatorische Signale erhalten. Die T-Zellen werden daraufhin aktiviert und sezernieren, in Abhängigkeit von der Art der T-Zelle, die entsprechenden Zytokine. Um diese Situation in den Untersuchungen besser simulieren zu können, wurden die DO11.10 Pri wie unter 2.3.12 beschrieben mit dem OVA₃₂₃₋₃₃₉ Peptid vorstimuliert und die Zytokinsekretion zwischen naiven und vorstimulierten DO11.10 Pri verglichen. In Abb. 3.20 ist zum Nachweis der erfolgten Aktivierung eine Analyse verschiedener Oberflächenmoleküle, deren Expressionsstärke sich mit dem Aktivierungszustand von T-Zellen ändert, auf naiven und vorstimulierten DO11.10 Pri zu sehen.

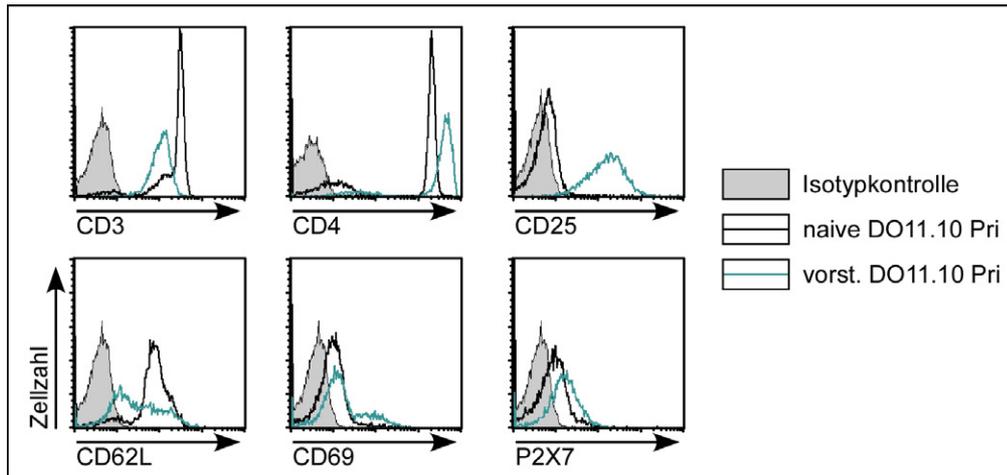


Abb. 3.20: Expression von Oberflächenmolekülen auf primären DO11.10 T-Zellen. Anfärbung von jeweils 10^6 Zellen mit einem spezifischen Antikörper (Linie) oder einer Isotypkontrolle (graue Fläche). Vergleich zwischen naiven (schwarze Linie) und vorstimulierten (grüne Linie) DO11.10 Pri.

Die Vorstimulation der T-Zellen führte zur Oberflächenexpression von CD25 (α -Kette des IL-2 Rezeptors) und CD69, die nach der Aktivierung von T-Zellen verstärkt exprimiert werden (92). Das Expressionsniveau des L-Selektins CD62L, das von naiven Zellen exprimiert wird, nahm hingegen ab.

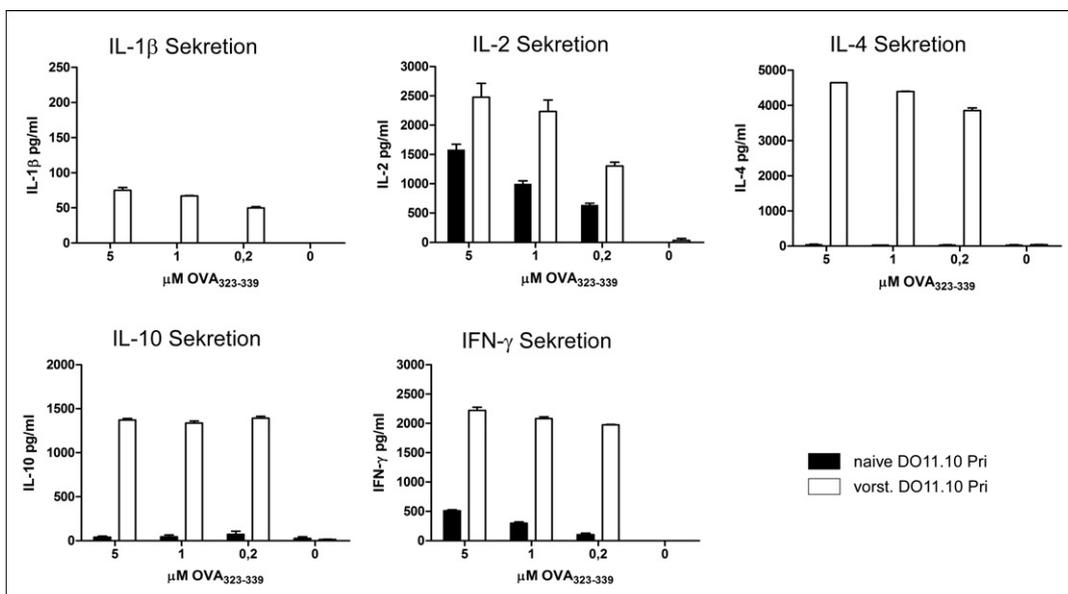


Abb. 3.21: Antigenabhängige Sekretion von IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10 und IFN- γ . Nachweis von IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10 und IFN- γ im Überstand nach Koinkubation von BMDCs Tag 8 (BALB/c) und DO11.10 Pri für 24h in Gegenwart unterschiedlicher OVA₃₂₃₋₃₃₉-Konzentrationen. Vergleich zwischen naiven (schwarze Balken) und vorstimulierten (weiße Balken) DO11.10 Pri.

Auch bezüglich der Zytokinsekretion zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen naiven und vorstimulierten DO11.10 Pri. Wie in Abb. 3.21 zu sehen ist, konnte die antigenabhängige Sekretion von IL-1 β , IL-4 und IL-10 mit vorstimulierten DO11.10 Pri

nachgewiesen werden. Die freigesetzte Menge IL-2 und IFN- γ wurde durch Koinkubation der BMDCs mit vorstimulierten im Vergleich zu naiven DO11.10 Pri ebenfalls erhöht.

3.1.6 Einfluss von P2X7-Inhibitoren auf die Interleukin-Sekretion

Zur Untersuchung der Rolle des P2X7-Rezeptors während der Interaktion zwischen APZs und T-Zellen wurden die Zellen in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitoren des P2X7-Rezeptors koinkubiert und anschließend die Zytokine im Überstand mittels ELISA bestimmt. Zum Einsatz kamen die P2X7-Inhibitoren KN62 und oxidiertes ATP (oATP). Bei KN62 handelt es sich um einen reversiblen Inhibitor des P2X7-Rezeptors (93), während die Wirkung von oATP irreversibel ist (94). Es wurde daher getestet, ob die Vorinkubation der dendritischen Zellen bzw. der T-Zellen mit 100 μ M oATP für drei Stunden einen Einfluss auf die Zytokinsekretion während einer anschließenden Koinkubation hat, und inwiefern die Gegenwart von KN62 während der Koinkubation unbehandelter BMDCs und DO11.10 Hyb die Zytokinsekretion modifiziert.

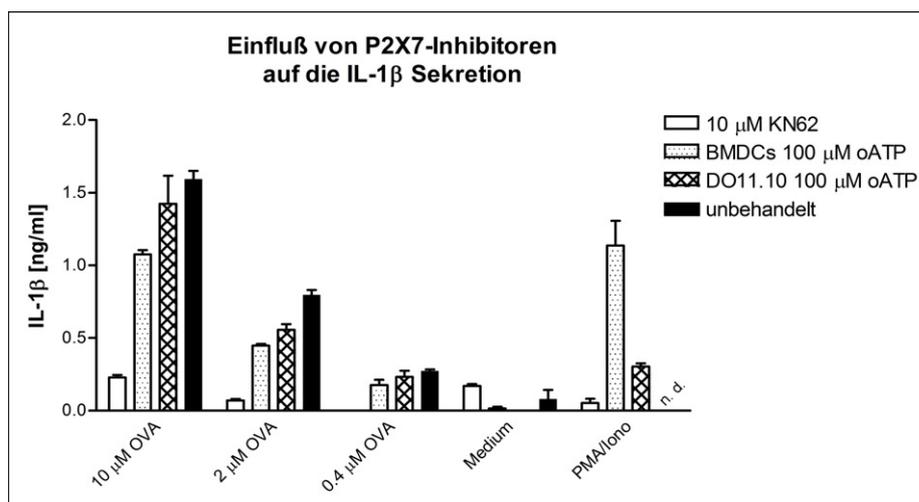


Abb. 3.22: *Modifizierung der IL-1 β Sekretion durch die P2X7-Inhibitoren KN62 und oATP.* Nachweis von IL-1 β im Überstand nach 24stündiger Koinkubation unstimulierter BMDCs Tag 8 (BALB/c) mit DO11.10 Hyb sortiert. Untersucht wurde die Koinkubation unbehandelter BMDCs und T-Zellen in Gegenwart des P2X7-Inhibitors KN62 (weiße Balken), die Koinkubation mit oATP vorbehandelter BMDCs und unbehandelter T-Zellen (gepunktete Balken), die Koinkubation unbehandelter BMDCs und mit oATP vorbehandelter T-Zellen (gekreuzte Balken) und die Koinkubation ohne Gegenwart bzw. Vorbehandlung mit P2X7-Inhibitoren (schwarze Balken). Koinkubation in Gegenwart oder Abwesenheit des Antigens bzw. der antigenunspezifischen Stimuli PMA und Ionomycin (n.d. – nicht durchgeführt).

In Abb. 3.22 ist zu sehen, dass eine Vorinkubation der BMDCs oder der DO11.10 Hyb sortiert mit 100 μ M oATP bei hohen Antigenkonzentrationen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen einen geringen reduzierenden Effekt auf die IL-1 β Sekretion hatte.

Die Koinkubation der Zellen in Gegenwart von KN62 führte hingegen zu einer deutlichen, dosisabhängigen Reduktion des sezernierten IL-1 β (Abb. 3.23).

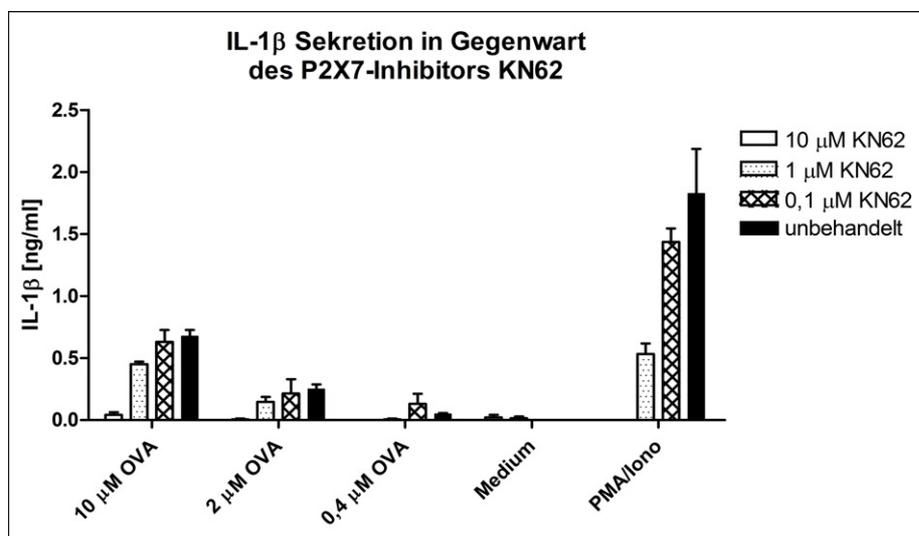


Abb. 3.23: Modifizierung der IL-1 β Sekretion durch KN62. Nachweis von IL-1 β im Überstand nach Koinkubation von unstimulierten BMDCs Tag 8 (BALB/c) und DO11.10 Hyb sortiert in Gegenwart von 10 μ M (weiße Balken), 1 μ M (gepunktete Balken), 0,1 μ M (gekennzeichnete Balken) oder Abwesenheit (schwarze Balken) von KN62. Koinkubation in Gegenwart oder Abwesenheit des Antigens bzw. der antigenunspezifischen Stimuli PMA und Ionomycin.

Auch die durch die Koinkubation in Gegenwart von 50 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin ausgelöste, antigenunabhängige IL-1 β Freisetzung wurde durch KN62 und oATP beeinflusst. Dies wirft Fragen nach der Spezifität der P2X7-Inhibitoren auf (95). Um diesen unbekanntem Faktor auszuschalten, wurden daher Versuche mit P2X7KO Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen durchgeführt.

3.1.7 Einfluss des P2X7-Rezeptors auf die Interleukin-Sekretion

Da die P2X7KO Mäuse zum Zeitpunkt der Experimente nur auf dem C57BL/6 Hintergrund verfügbar waren, wurden die Versuche mit APZs aus P2X7KO und C57BL/6 Mäusen und T-Zellen aus OT-II Mäusen durchgeführt. Die T-Zellen der OT-II Mäuse tragen, wie die T-Zellen der DO11.10 Mäuse, einen transgenen T-Zell-Rezeptor, der dasselbe Peptid aus dem Ovalbumin (OVA₃₂₃₋₃₃₉) in Zusammenhang mit MHC-II Molekülen erkennt. Einziger Unterschied ist der genetische Hintergrund der Mäuse.

Um den Einfluss des P2X7-Rezeptors auf die Interleukin-Sekretion zu untersuchen wurden LPS-stimulierte BMDCs und PEMs aus C57BL/6 und P2X7KO Mäusen mit vorstimulierten OT-II T-Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit von OVA₃₂₃₋₃₃₉ koinkubiert und die in den Überstand sezernierten Zytokine im ELISA bestimmt.

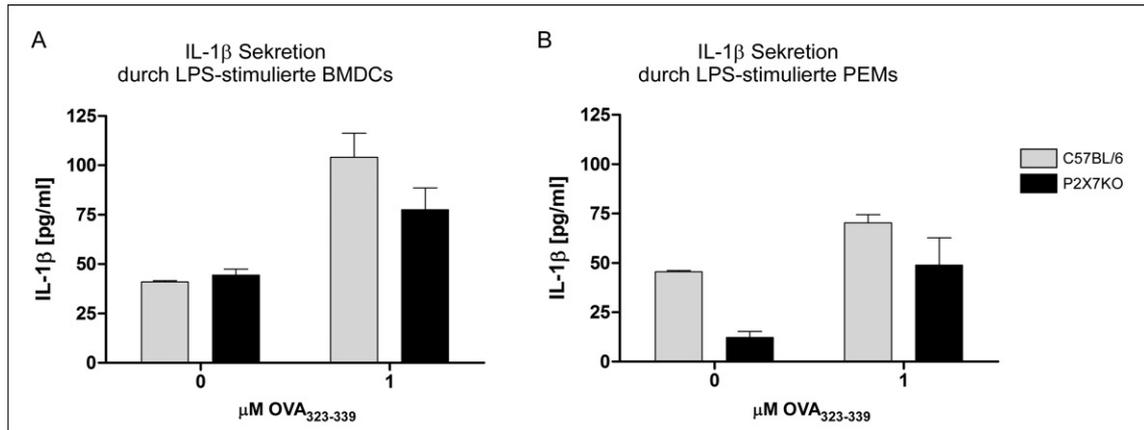


Abb. 3.24: *IL-1 β Sekretion durch BMDCs und PEMs. Vergleich zwischen LPS-stimulierten BMDCs (A) bzw. PEMs (B) aus C57BL/6 (graue Balken) und P2X7KO (schwarze Balken) Mäusen nach 24stündiger Koinkubation mit vorstimulierten primären OT-II T-Zellen ohne Antigen bzw. mit 1 $\mu\text{M OVA}_{323-339}$.*

Versuche mit LPS-stimulierten BMDCs und vorstimulierten OT-II T-Zellen zeigten, dass die BMDCs unabhängig vom P2X7-Rezeptor konstitutiv IL-1 β sezernierten. Die freigesetzte IL-1 β Menge konnte in der Gegenwart des Antigens gesteigert werden (Abb. 3.24A). Mit LPS-stimulierten PEMs als APZs ergab sich ein anderes Bild. Auch hier kam es zu einer konstitutiven IL-1 β Sekretion, die jedoch in den PEMs aus C57BL/6 Mäusen deutlich höher als in den PEMs aus P2X7KO Mäusen und somit abhängig vom P2X7-Rezeptor war (Abb. 3.24B). Die Gegenwart des Antigens während der Koinkubation führte insbesondere in den PEMs aus P2X7KO Mäusen zu einem Anstieg der IL-1 β Sekretion. Durch eine antigenabhängige Interaktion zwischen den LPS-stimulierten PEMs und vorstimulierten OT-II T-Zellen ließ sich die Abhängigkeit der IL-1 β Sekretion von der Expression des P2X7-Rezeptors teilweise aufheben.

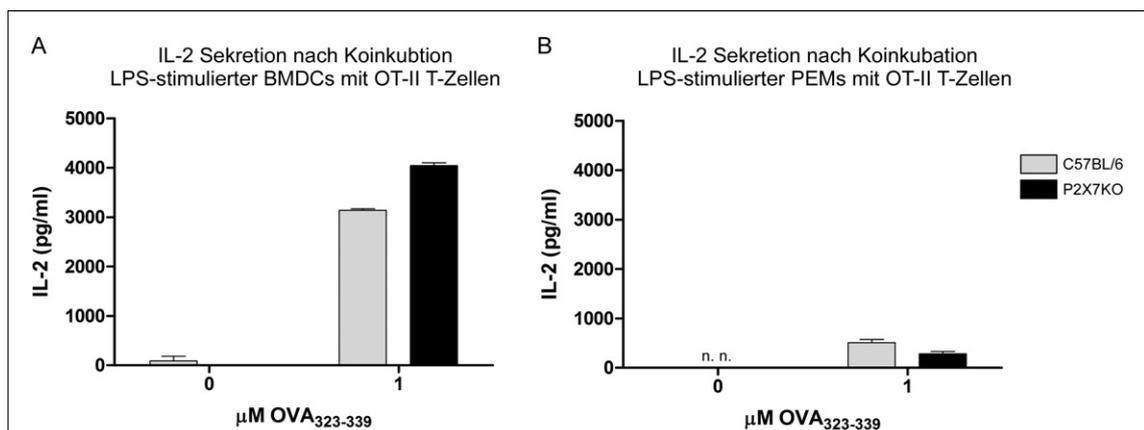


Abb. 3.25: *IL-2 Sekretion nach Koinkubation LPS-stimulierter BMDCs oder PEMs mit vorstimulierten OT-II T-Zellen. Vergleich zwischen LPS-stimulierten BMDCs (A) bzw. PEMs (B) aus C57BL/6 (graue Balken) und P2X7KO (schwarze Balken) Mäusen nach 24stündiger Koinkubation mit vorstimulierten primären OT-II T-Zellen ohne Antigen bzw. mit 1 $\mu\text{M OVA}_{323-339}$ (n. n. – nicht nachweisbar).*

Die Koinkubation vorstimulierter OT-II T-Zellen mit LPS-stimulierten BMDCs oder PEMs führte zu einer P2X7-unabhängigen aber antigenabhängigen IL-2 Sekretion in den Überstand (Abb. 3.25). Die IL-2 Menge unterschied sich dabei deutlich in Abhängigkeit der verwendeten APZs. Während es bei der Koinkubation von BMDCs und T-Zellen zu einer starken IL-2 Sekretion kam (Abb. 3.25A), führte die Koinkubation von PEMs und T-Zellen zu einer wesentlich geringeren IL-2 Sekretion (Abb. 3.25B). Dies deutet auf einen Unterschied in der Fähigkeit zur Aktivierung von T-Zellen zwischen dendritischen Zellen und Makrophagen hin.

3.1.8 Zusammenfassung der Untersuchungen zum P2X7-Rezeptor

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass der P2X7-Rezeptor auf T-Zellen und APZs in vergleichbarer Stärke auf der Zelloberfläche exprimiert wurde. Auf BMDCs nahm die Oberflächenexpression des P2X7-Rezeptors mit der durch TNF- α bzw. LPS induzierten Reifung der Zellen ab. Die T-Zellen reagierten auf eine Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ATP mit einem Einstrom von Ca²⁺-Ionen, der Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran und der Bildung der für den P2X7-Rezeptor charakteristischen Pore. Die als APZs untersuchten BMDCs und BMMs reagierten auf hohe ATP-Konzentrationen sehr schwach bis gar nicht. Der Einsatz hoher Konzentrationen des P2X7-Agonisten BzATP konnte bei den BMDCs den Einstrom von Ca²⁺-Ionen auslösen. Die Abhängigkeit der IL-1 β Sekretion aus LPS-stimulierten BMDCs und PEMs von ATP konnte nachgewiesen werden.

Die Koinkubation von APZs und DO11.10 T-Zellen führte zu einer antigenabhängigen Interaktion und zur Sekretion verschiedener Zytokine. Die Menge und Art der Zytokine erwies sich unter anderem als abhängig vom Aktivierungszustand der eingesetzten T-Zellen. Die Inhibitoren des P2X7-Rezeptors KN62 und oATP waren in der Lage die IL-1 β Sekretion zu reduzieren, wobei Fragen über die Spezifität dieser Inhibitoren offen blieben. Daraufhin durchgeführte Experimente mit Wildtyp und P2X7KO Mäusen zeigten, dass LPS-stimulierte PEMs in Abhängigkeit vom P2X7-Rezeptor konstitutiv IL-1 β sezernierten, während dieser Vorgang in LPS-stimulierten BMDCs unabhängig vom P2X7-Rezeptor war. Durch die Gegenwart von Antigen wurde die IL-1 β Sekretion erhöht und die Abhängigkeit dieser Sekretion vom P2X7-Rezeptor aufgehoben. Die antigenabhängige IL-2 Sekretion erwies sich als unabhängig vom P2X7-Rezeptor, deutete jedoch auf einen Unterschied in der Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung zwischen Makrophagen und dendritischen Zellen hin.

3.2 Charakterisierung der ART-Aktivität auf unterschiedlichen Populationen antigenpräsentierender Zellen

Die murine ART2 kommt in zwei Isoformen vor, ART2.1 und ART2.2, die sich unter anderem durch eine zusätzliche Disulfidbrücke im ART2.1-Molekül unterscheiden. Diese zusätzliche Disulfidbrücke beschränkt die enzymatische Aktivität der ART2.1 auf reduzierende Milieus. Die Expression von ART2.1 und ART2.2 auf murinen T-Zellen ist seit längerem bekannt und gut untersucht und galt bisher als auf T-Zellen beschränkt (64). Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die ART2.1 auch auf APZs exprimiert wird (68). Im zweiten Teil dieser Arbeit wird auf die darauf aufbauenden Experimente zur Expression und Funktion der ART2.1 auf APZs eingegangen. Auch werden erste Versuche zur Identifikation ihrer Zielproteine vorgestellt.

3.2.1 Expression und Aktivität von ART2.1 auf Knochenmarksmakrophagen

Experimente mit BMMs aus BALB/c Mäusen zeigten, dass die ART2.1 nicht nur auf T-Zellen sondern auch auf APZs exprimiert wird. Der Expressionsgrad erwies sich hierbei als abhängig von einer vorherigen Stimulation der Zellen.

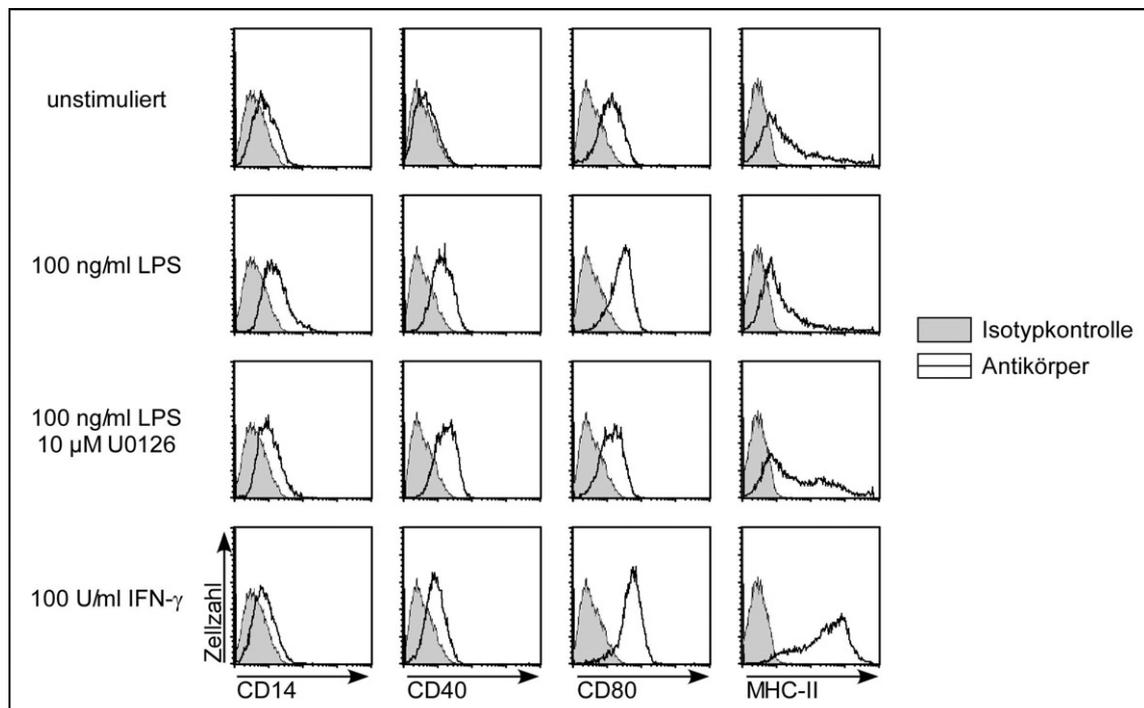


Abb. 3.26: *Expression charakteristischer Oberflächenmoleküle auf BMMs.* Vergleich zwischen unstimulierten, LPS-stimulierten, in Gegenwart von U0126 LPS-stimulierten und IFN- γ -stimulierten BMMs Tag 8 (BALB/c). Anfärbung von 10^6 Zellen mit einem spezifischen Antikörper (schwarze Linie) oder einer Isotypkontrolle (graue Fläche). U0126 (Inhibitor der MAPK-Kinasen MEK 1/2).

In Abb. 3.26 ist zunächst die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle in Abhängigkeit von der vorherigen Stimulation der BMMs dargestellt. CD14 und CD40 wurden insbesondere durch eine vorherige Stimulation mit LPS verstärkt exprimiert, während die Expression von MHC-II Molekülen durch Stimulation mit IFN- γ stark gesteigert wurde.

Der Nachweis von ART2.1 auf der Zelloberfläche erfolgte mit Hilfe monoklonaler Antikörper. Die Aktivität der ART2.1 wurde durch die Inkubation der Zellen mit 50 μ M etheno-NAD (eNAD), einem NAD-Analogon mit einer zusätzlichen etheno-Gruppe am Adenosin, als Substrat getestet. Die etheno-ADP-Ribosylierung von Oberflächenproteinen konnte im Durchflusszytometer mit dem, gegen die etheno-Adenosin-Gruppe gerichteten, monoklonalen Antikörper 1G4 gezeigt werden (siehe 2.7.4).

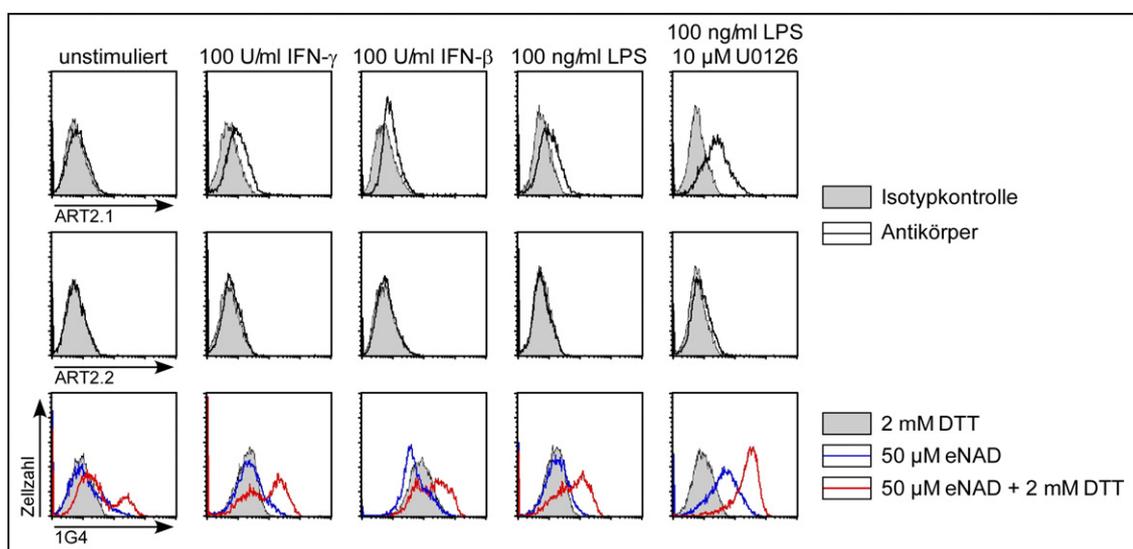


Abb. 3.27: ART-Expression und -Aktivität auf BMMs. Untersucht wurden unstimulierte, IFN- γ -stimulierte, IFN- β -stimulierte, LPS-stimulierte und in Gegenwart von U0126 LPS-stimulierte BMMs Tag 8. Anfärbung von ART2.1 mit dem monoklonalen Antikörper R18B54 und von ART2.2 mit dem monoklonalen Antikörper R8A106. Anfärbung etheno-ADP-ribosylierter Proteine mit dem 1G4 Antikörper nach 15minütiger Inkubation bei 37 °C mit 50 μ M eNAD + 2 mM DTT (rote Linie), 50 μ M eNAD (blaue Linie), 2 mM DTT (graue Fläche). U0126 (Inhibitor der MAPK-Kinasen MEK1/2).

Wie in Abb. 3.27 zu sehen ist, wurde die minimale ART2.1 Oberflächenexpression auf unstimulierten BMMs durch die Vorstimulation der Zellen stark gesteigert. Einen besonders deutlichen Effekt hatte die vorherige Stimulation der Zellen mit LPS in Gegenwart von U0126, einem Inhibitor der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kinasen MEK1 und MEK2. Das Expressionsniveau von ART2.1 auf der Zelloberfläche korrelierte mit der ART-Aktivität. Die etheno-ADP-Ribosylierung war auf den mit 100 ng/ml LPS in Gegenwart von 10 μ M U0126 vorstimulierten Zellen am höchsten. Auf diesen Zellen wurde auch eine etheno-ADP-Ribosylierung in Abwesen-

heit des Reduktionsmittels DTT nachgewiesen, obwohl die ART2.1 nur unter reduzierenden Bedingungen aktiv ist. Hierbei könnte sich um eine, durch die hohe Substratkonzentration bedingte, Restaktivität der ART2.1 handeln (Abb. 3.33) oder auf die Aktivität von ART2.2 hindeuten, obwohl sich eine Oberflächenexpression von ART2.2 auf den BMMs auch nach Stimulation der Zellen nicht nachweisen ließ.

Die Aktivität der ART2.1 ließ sich auch in Zelllysaten mit eNAD inkubierter BMMs im Westernblot nachweisen. Auffällig war hierbei, dass in den Zelllysaten LPS-stimulierter BMMs die etheno-ADP-Ribosylierung im Vergleich zu den Zelllysaten unstimulierter, IFN- γ -stimulierter oder in Gegenwart von U0126 LPS-stimulierter BMMs deutlich schwächer war (Abb. 3.28). Bei den Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie hingegen wurde für die LPS-stimulierten BMMs eine deutlich stärkere etheno-ADP-Ribosylierung als für die unstimulierten BMMs beobachtet. Diese war mit der etheno-ADP-Ribosylierung der IFN- γ -stimulierten BMMs vergleichbar (Abb. 3.27).

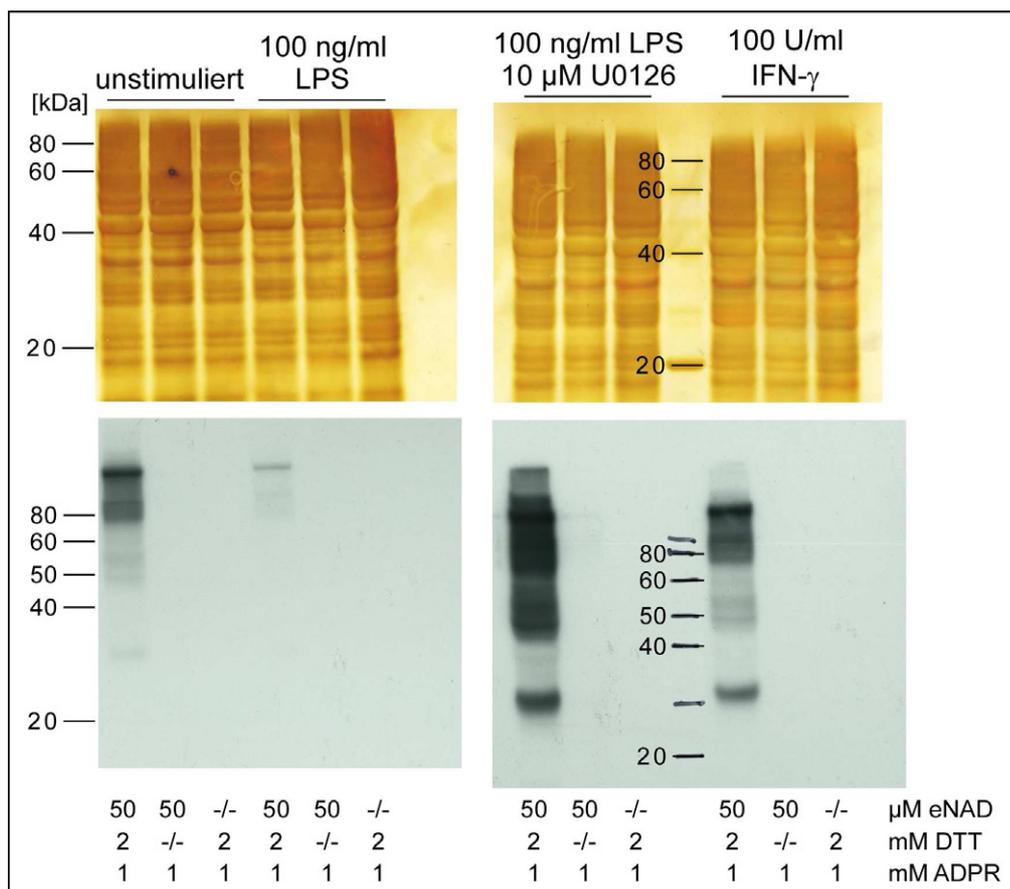


Abb. 3.28: ART-Aktivität im Westernblot. Untersuchung von unstimulierten, LPS-stimulierten, in Gegenwart von U0126 LPS-stimulierten und IFN- γ -stimulierten BMMs Tag 8 (BALB/c). Aufgetragen wurden Zelllysate der BMMs nach 15minütiger Inkubation mit den angegebenen Mengen eNAD, DTT und ADPR bei 37 °C. Nachweis etheno-ADP-ribosylierter Proteine im Westernblot mit dem IG4-Antikörper. Die Silberfärbung zeigt eine gleichmäßige Beladung der Gele. U0126 (Inhibitor der MAPK-Kinasen MEK1/2).

3.2.2 Expression und Aktivität von ART2.1 auf weiteren antigenpräsentierenden Zellen

Neben BMMs wurden weitere APZs auf ART-Aktivität getestet: BMDCs, PEMs, B-Zellen und Makrophagen aus der Milz und sog. Biogel-Zellen (s.u.). BMDCs und PEMs wurden wie unter 2.3.7 und 2.3.9 beschrieben gewonnen. Für die Untersuchung von B-Zellen wurden diese durch Depletion der T-Zellen aus Milzzellen aufgereinigt oder, wie die Makrophagen, durch Anfärbung spezifischer Oberflächenmarker aus der gesamten Milzzellpopulation identifiziert. Die Biogel-Zellen wurden wie unter 2.3.10 beschrieben gewonnen. Es handelt sich um Zellen, die in eine subkutan gespritzte Polyacrylamidmatrix (Biogel) einwanderten, und aus dieser nach 2 bis 3 Tagen isoliert wurden. Durch die Polyacrylamidmatrix wurde eine sterile Entzündung induziert, in die u. a. neutrophile Granulozyten einwanderten. Die ART-Aktivität wurde wie im Abschnitt 3.2.1 nach der Inkubation mit 50 μM eNAD durch Anfärbung mit dem 1G4-Antikörper nachgewiesen.

Die BMDCs zeigten nur eine sehr schwache ART-Aktivität, die sich durch die Vorstimulation der Zellen mit 100 ng/ml LPS in Gegenwart von 10 μM U0126 nur geringfügig steigern ließ (Abb. 3.29A). Die unstimulierten PEMs zeigten eine schwache aber deutliche ART-Aktivität in Abhängigkeit von DTT, ebenso wie aus der Milz isolierte B-Zellen. Die deutlichste etheno-ADP-Ribosylierung von Oberflächenmolekülen wurde bei den Makrophagen aus der Milz beobachtet. Bei den Milz-Makrophagen trat, ebenso wie bei den aus der Milz stammenden B-Zellen, eine schwache ART-Aktivität in Abwesenheit des Reduktionsmittels DTT auf (Abb. 3.29B). Die Analyse von Oberflächenmolekülen der aus der Biogelmatrix isolierten Zellen zeigte, dass es sich bei den Biogel-Zellen hauptsächlich um Granulozyten handelte und nur ein geringer Teil der Zellen Makrophagen waren (Abb. 3.29C). Auf den Biogel-Zellen konnte keine ART-Aktivität nachgewiesen werden. Dies war auch dann nicht der Fall, wenn die Biogelmatrix zusammen mit hitzeinaktiviertem *Mycobacterium Tuberculosis* (MTB) gespritzt wurde, um durch das Einbringen von TLR-Liganden eine Entzündung mit infektiöser Komponente zu simulieren.

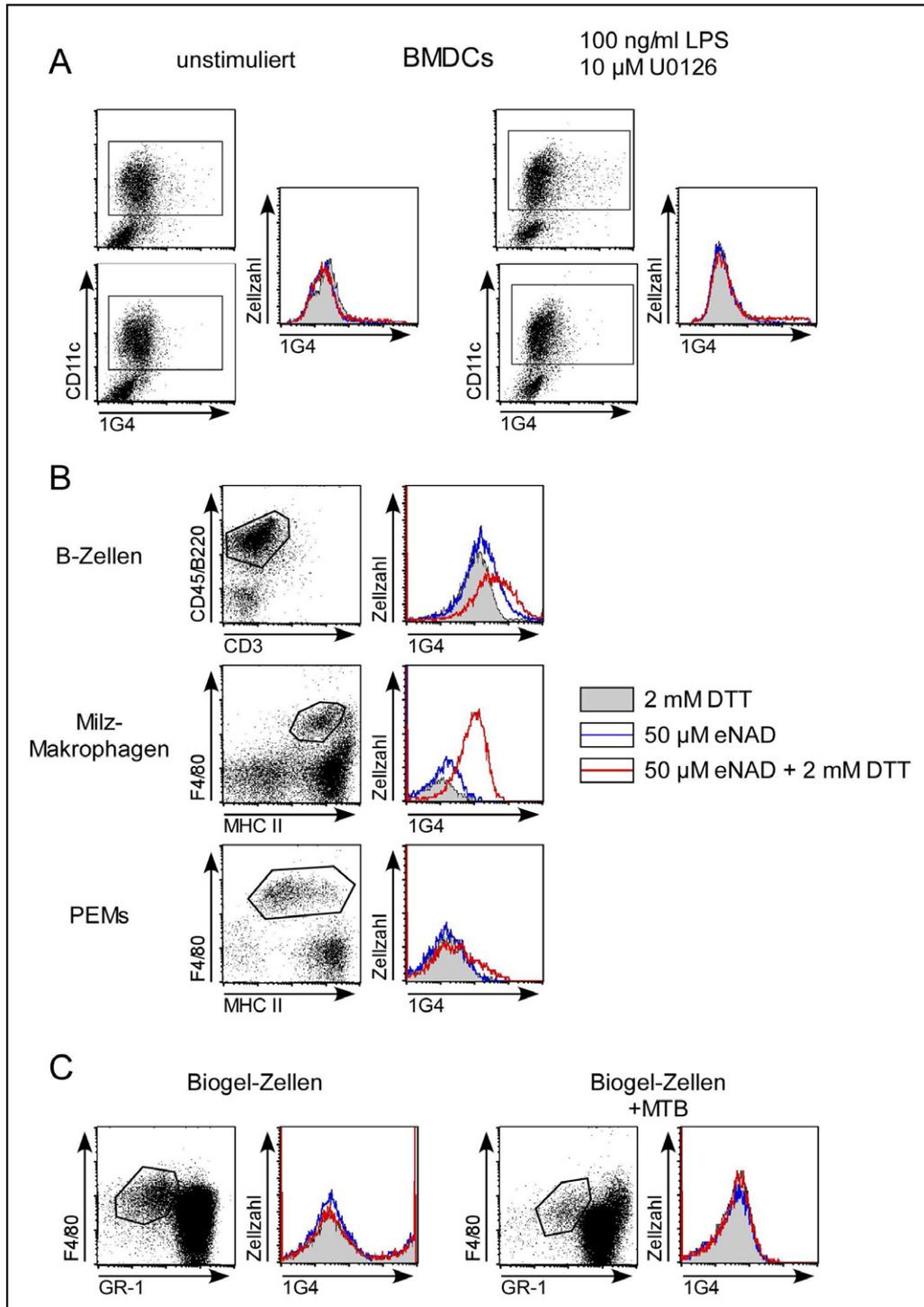


Abb. 3.29: ART-Aktivität auf unterschiedlichen APZs. A: ART-Aktivität auf unstimulierten und in Gegenwart von U0126 mit LPS stimulierten CD11c-positiven BMDCs, B: ART-Aktivität auf Makrophagen und B-Zellen aus der Milz, sowie auf PEMs, C: ART-Aktivität auf Biogel-Zellen. Alle Zellen stammen aus BALB/c Mäusen. Inkubation für 15 min bei 4 °C mit 50 μM eNAD + 2 mM DTT (rote Linie), 50 μM eNAD (blaue Linie), 2 mM DTT (graue Fläche). Anfärbung etheno-ADP-ribosylierter Proteine mit dem 1G4 Antikörper. MTB (Mycobacterium Tuberculosis), U0126 (Inhibitor der MAPK-Kinasen MEK1/2).

3.2.3 Vergleich der ART2.1-Expression und Aktivität zwischen verschiedenen Mausstämmen

Die beiden Isoformen der ART2, ART2.1 und ART2.2, werden in verschiedenen Mausstämmen unterschiedlich stark exprimiert. Die bisherigen Untersuchungen fanden in BALB/c Mäusen statt, die sowohl ART2.2 als auch ART2.1 exprimieren. In C57BL/6 Mäusen hingegen wird nur die ART2.2 exprimiert, während NZW Mäuse wiederum nur die ART2.1 exprimieren. C57BL/6 und NZW Mäuse stellen aufgrund von Punktmutationen bzw. Gendeletionen natürliche *knockouts* für ART2.1 bzw. ART2.2 dar (63). Aus diesem Grund wurde die ART2.1-, die ART2.2-Expression und die ART-Aktivität in diesen drei Wildtyp-Mausstämmen, sowie in auf konventionelle Weise erzeugten ART2.1KO, ART2.2KO und ART2KO Mäusen auf dem BALB/c Hintergrund untersucht.

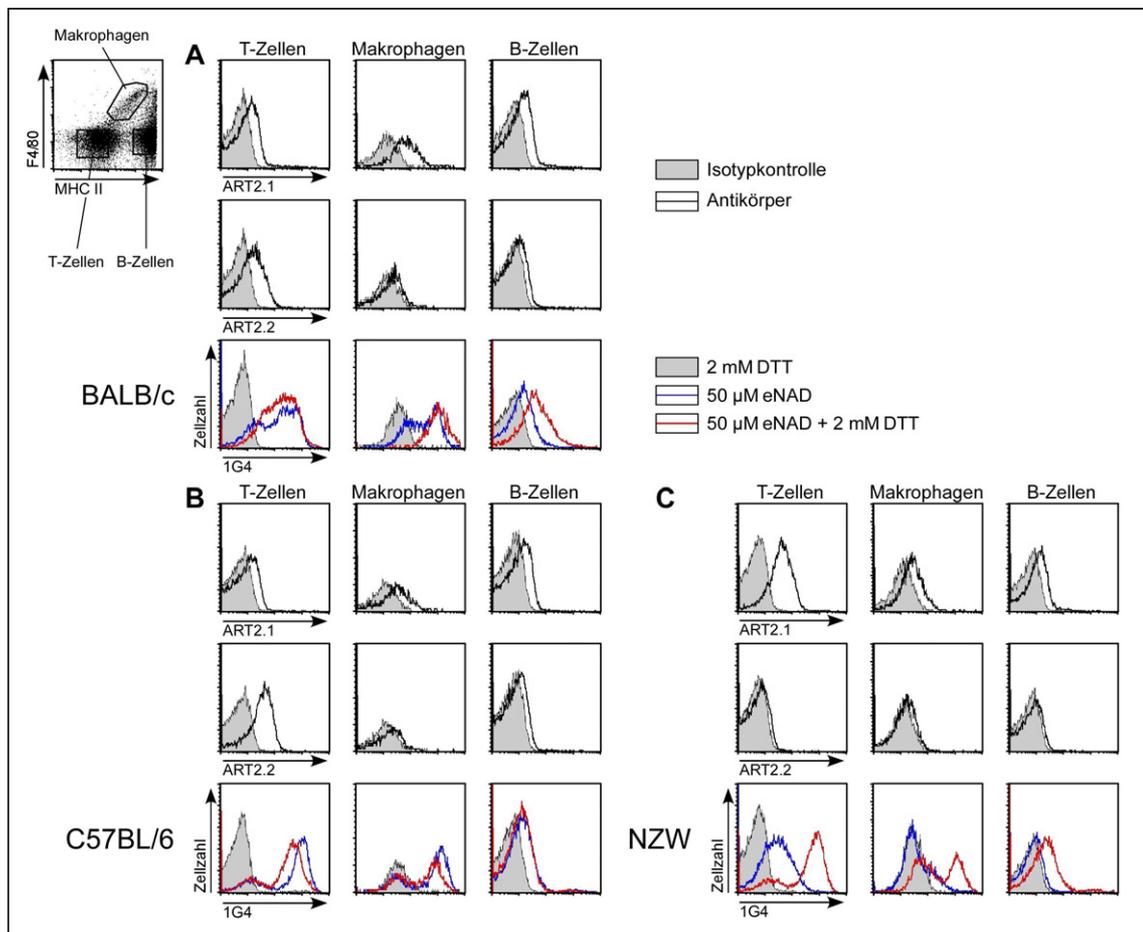


Abb. 3.30: Vergleich der ART-Aktivität in BALB/c, C57BL/6 und NZW Mäusen. A: Milzzellen aus BALB/c Mäusen, B: Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen, C: Milzzellen aus NZW Mäusen. Anfübung von ART2.1 mit R18B54, ART2.2 mit R8A106. Anfübung etheno-ADP-ribosylierter Proteine mit dem 1G4 Antikörper nach 15minütiger Inkubation bei 4 °C mit 50 μ M eNAD + 2 mM DTT (rote Linie), 50 μ M eNAD (blaue Linie), 2 mM DTT (graue Fläche). Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen anhand der Oberflächenexpression von F4/80 (Makrophagen) und MHC-II (Makrophagen, B-Zellen).

In Abb. 3.30 sind die unterschiedlichen Expressionsniveaus für die beiden Isoformen ART2.1 und ART2.2, sowie die ART-Aktivität auf Milzzellen der verschiedenen Mausstämmen zu sehen. Die Unterteilung in T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen erfolgte anhand der Anfärbung der Oberflächenmoleküle F4/80, exprimiert auf Makrophagen, und MHC-II, exprimiert auf Makrophagen und B-Zellen. T-Zellen aus BALB/c Mäusen exprimierten beide ART2-Isoformen, T-Zellen aus C57BL/6 Mäusen nur ART2.2 und T-Zellen aus NZW Mäusen nur ART2.1. Aufgrund der schwachen Oberflächenexpression der ART2.1 auf Makrophagen und B-Zellen konnten die Unterschiede in der ART2.1-Expression auf diesen Zellen in den getesteten Mausstämmen nicht eindeutig gezeigt werden. Eine weitere Schwierigkeit bei der Beurteilung der ART2.1 Oberflächenexpression ist die Tatsache, dass der Antikörper gegen ART2.1, R18B54, eine gewisse Unspezifität aufwies, wie die Anfärbung von Milzzellen aus ART2KO Mäusen, die weder ART2.1 noch ART2.2 exprimieren, zeigte (Abb. 3.31). In BALB/c Mäusen zeigten T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen sowohl eine DTT-abhängige, als auch eine DTT-unabhängige ART-Aktivität (Abb. 3.30A). Auf Makrophagen und B-Zellen, konnte keine ART2.2-Expression nachgewiesen werden, die eine DTT-unabhängige ART-Aktivität erklären würde. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass die ART2.2-Expression zu gering ist, um sie im Durchflusszytometer nachzuweisen. In C57BL/6 Mäusen, die keine ART2.1 exprimieren, konnte auf Makrophagen und B-Zellen eine DTT-unabhängige ART-Aktivität nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine geringe ART2.2 Expression auf Makrophagen und B-Zellen hin, eine These, die durch den Nachweis von ART2.2-mRNA in BMMs aus C57BL/6 Mäusen gestützt wird (68).

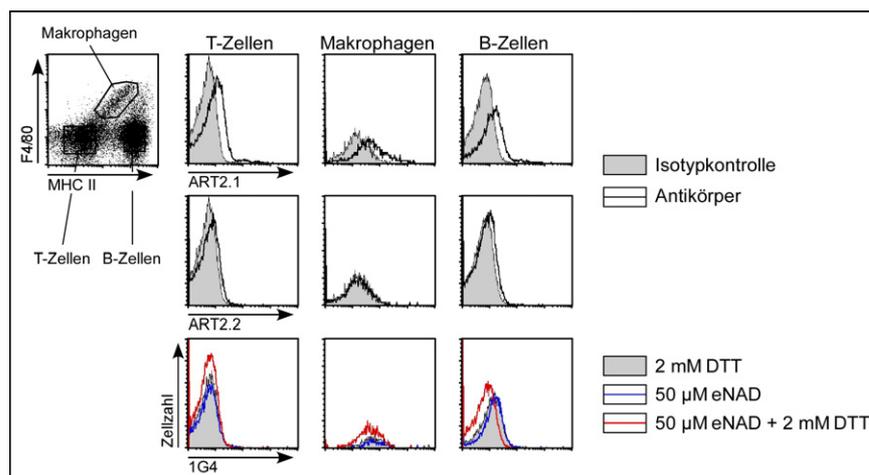


Abb. 3.31: *ART-Expression und -Aktivität auf ART2KO Mäusen.* Anfärbung mit spezifischen Antikörpern (schwarze Linie) gegen ART2.1 (R18B54-gAlexa) und ART2.2 (R8A106-FITC) oder einer Isotypkontrolle (graue Fläche) von Milzzellen aus ART2KO Mäusen. Anfärbung ethno-ADP-ribosylierter Proteine mit dem 1G4 Antikörper nach 15minütiger Inkubation bei 4 °C mit 50 μM eNAD + 2 mM DTT (rote Linie), 50 μM eNAD (blaue Linie), 2 mM DTT (graue Fläche). Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen anhand der Oberflächenexpression von F4/80 (Makrophagen) und MHC-II (Makrophagen, B-Zellen).

In Abb. 3.31 ist ebenfalls zu sehen, dass auf den Milzzellen aus ART2KO Mäusen nach Inkubation mit eNAD weder eine DTT-abhängige noch eine DTT-unabhängige ART-Aktivität nachgewiesen werden konnte.

Abb. 3.32 zeigt die ART-Expression und -Aktivität auf Milzzellen aus ART2.1KO und ART2.2KO Mäusen auf BALB/c Hintergrund. Als Negativkontrolle wurden hier mit dem ART2.1- (R18B54) bzw. ART2.2-Antikörper (R8A106) angefärbte ART2KO-Milzzellen eingesetzt, um die Unspezifität des ART2.1-Antikörpers zu umgehen.

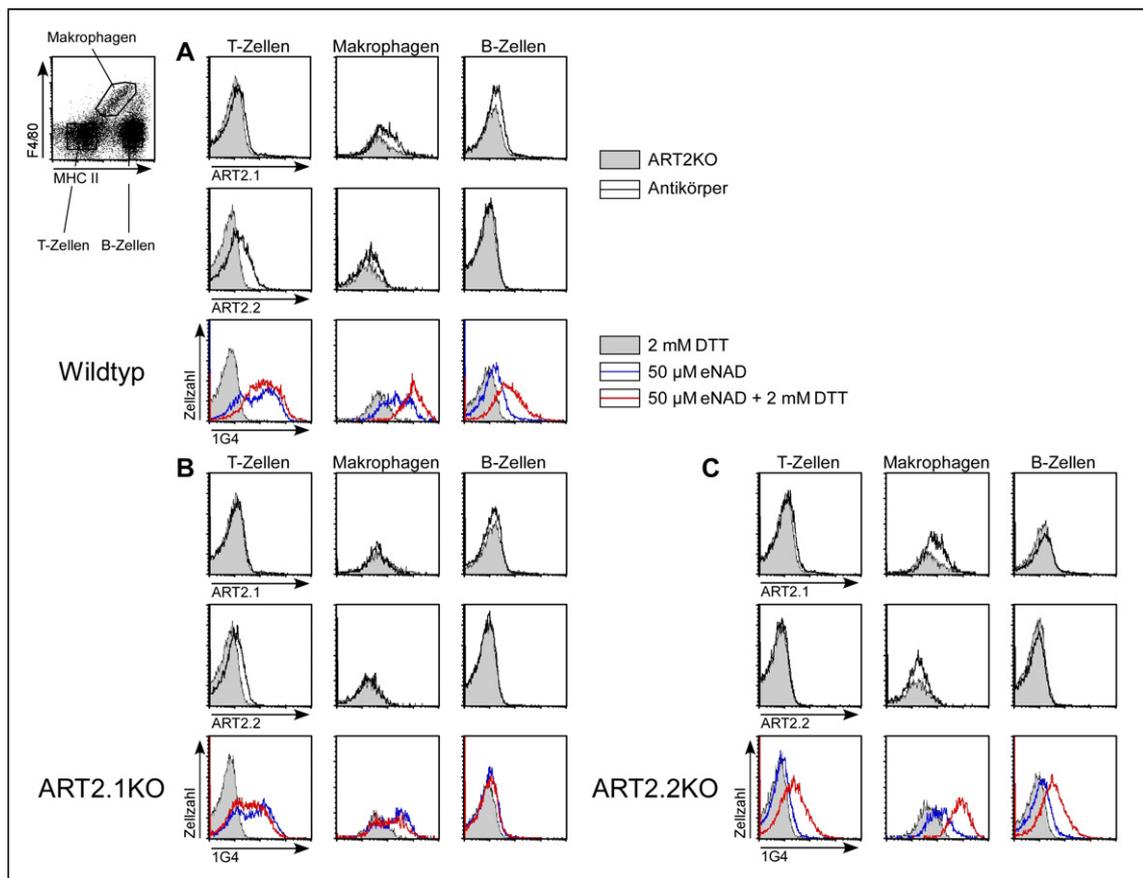


Abb. 3.32: Vergleich der ART-Expression und -Aktivität in Wildtyp, ART2.1KO und ART2.2KO Mäusen. A: Milzzellen aus BALB/c Mäusen, B: Milzzellen aus ART2.1KO Mäusen (BALB/c), C: Milzzellen aus ART2.2KO Mäusen (BALB/c). Anfärbung von ART2.1 mit R18B54 und ART2.2 mit R8A106 auf Milzzellen aus Wildtyp und Einzel-KO Mäusen (schwarze Linie) im Vergleich zu ART2KO Mäusen (graue Fläche). Anfärbung etheno-ADP-ribosylierter Proteine mit dem 1G4 Antikörper nach 15minütiger Inkubation bei 4 °C mit 50 μM eNAD + 2 mM DTT (rote Linie), 50 μM eNAD (blaue Linie), 2 mM DTT (graue Fläche). Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen anhand der Oberflächenexpression von F4/80 (Makrophagen) und MHC-II (Makrophagen, B-Zellen).

Auf Makrophagen aus der Milz von ART2.1KO Mäusen konnte eine deutliche ART-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.32B). Dies ist ein Hinweis darauf, dass ART2.2 nicht nur von T-Zellen sondern auch von Makrophagen exprimiert wurde, obwohl ART2.2 nicht auf der Oberfläche der Makrophagen nachgewiesen werden konnte. Die

B-Zellen aus ART2.1KO Mäusen zeigten keine ART-Aktivität. Die DTT-unabhängige ART-Aktivität auf Makrophagen aus Wildtyp Mäusen beruhte somit zumindest teilweise auf der Expression von ART2.2 (Abb. 3.32A). Die auf Makrophagen, T- und B-Zellen aus ART2.2KO Mäusen zu beobachtende DTT-unabhängige ART-Aktivität (Abb. 3.32C) könnte auf eine Restaktivität der ART2.1 bedingt durch die hohe Substratkonzentration hindeuten (Abb. 3.33).

3.2.4 Konzentrationsabhängigkeit der ART2.1-Aktivität

Neben der Aktivität der ART2.1 auf verschiedenen Zellpopulationen und in unterschiedlichen Mausstämmen wurde auch die Abhängigkeit der ART2.1-Aktivität von der Substratkonzentration untersucht. Wie in Abb. 3.33 zu sehen ist, konnte, unabhängig von einer vorherigen Stimulation der BMMs, eine DTT-abhängige etheno-ADP-Ribosylierung von Oberflächenproteinen bereits bei einer eNAD-Konzentration von 2 μM nachgewiesen werden. Bei Inkubation mit 5 μM eNAD wurde in Gegenwart von DTT bereits ein halbmaximaler bis maximaler Ribosylierungsgrad erreicht. Lagen während der Ribosylierungsreaktion keine reduzierenden Bedingungen vor, kam es bei hohen eNAD-Konzentrationen von 20 und 50 μM zu einer nachweisbaren etheno-ADP-Ribosylierung. Dies deutete auf eine Restaktivität der ART2.1 in Gegenwart hoher Substratkonzentrationen hin.

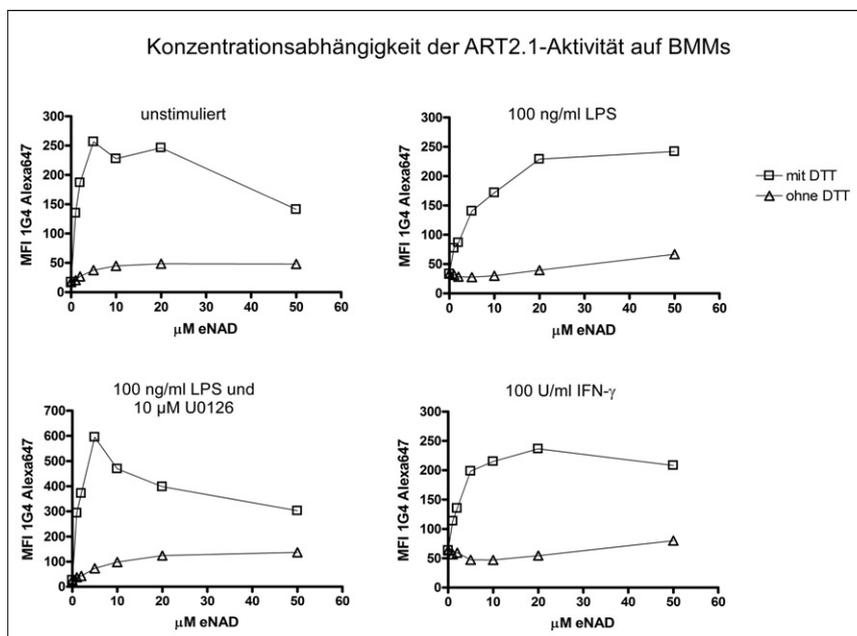


Abb. 3.33: Aktivität der ART2.1 bei unterschiedlichen eNAD-Konzentrationen. Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des 1G4 Antikörpers in Abhängigkeit von der eNAD-Konzentration. Untersucht wurden unstimulierte, LPS-stimulierte, in Gegenwart von U0126 LPS-stimulierte und mit IFN- γ -stimulierte BMMs Tag 8 (BALB/c). Inkubation mit eNAD, 1 mM ADPR und +/- 2 mM DTT für 15 min bei 4 °C. Anfärbung etheno-ADP-ribosylierter Proteine mit 1G4-Alexa647. U0126 (Inhibitor der MAPK-Kinasen MEK1/2).

3.2.5 Zielproteine der ART2.1

Zur Identifizierung möglicher Zielproteine der ART2.1 auf APZs wurden BMMs wie unter 2.7.5 beschrieben mit ^{32}P -NAD inkubiert und anschließend aus den Zelllysaten mögliche Zielproteine immunpräzipitiert. Nach einer SDS-PAGE konnten radioaktiv markierte, immunpräzipitierte Proteine mittels Autoradiographie nachgewiesen werden. Von der murinen ART2.2 auf T-Zellen ist bekannt, dass sie unter anderem den P2X7-Rezeptor ADP-ribosyliert wodurch der Zelltod eingeleitet wird (36). Des weiteren kommt es zu einer auto-ADP-Ribosylierung der ART2.2. Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, ob zu den Zielproteinen der murinen ART2.1 ebenfalls der P2X7-Rezeptor und die ART2.1 selbst zählen. Des weiteren wurde getestet, ob CD11a, die α -Kette des $\alpha_L\beta_2$ -Integrins LFA-1, und CD11b, die α -Kette des $\alpha_M\beta_2$ -Integrins CR3, ebenfalls zu den Zielproteinen gehören.

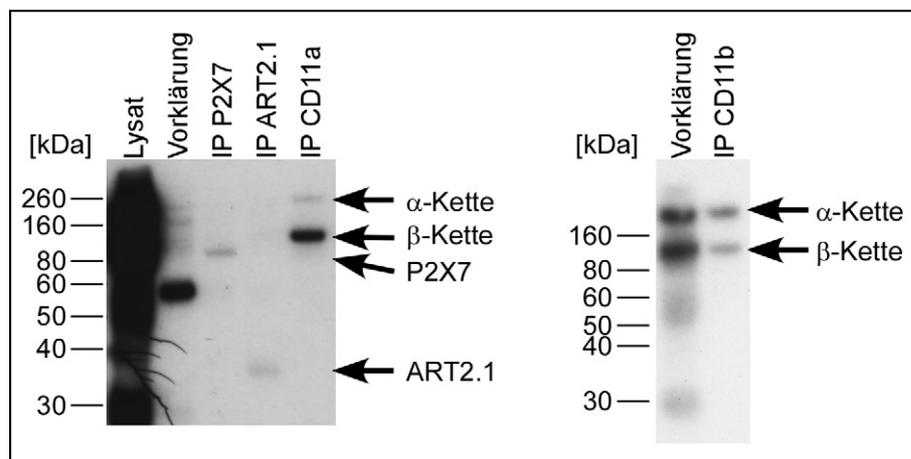


Abb. 3.34: *Autoradiographie von Immunpräzipitaten der potentiellen Zielproteine P2X7, ART2.1, CD11a und CD11b.* Aufgetragen wurde ein Aliquot des Gesamtzelllysats (Lysat), ungekoppelte, mit dem Lysat inkubierte Sepharose (Vorklämung) und die Immunpräzipitate der mit Antikörpern gegen P2X7, ART2.1, CD11a bzw. CD11b gekoppelten Sepharose (IP). Untersucht wurden in Gegenwart von 10 μM U0126 mit 100 ng/ml LPS vorstimulierte BMMs Tag 8 (BALB/c) nach 15minütiger Inkubation mit 2 μM NAD, 2 μCi ^{32}P -NAD, 2 mM DTT, 1 mM ADPR.

In Abb. 3.34 konnten mehrere Zielproteine der ART2.1 erfolgreich nachgewiesen werden. Im Immunpräzipitat des P2X7-Rezeptors ist auf der Höhe von ca. 90 kDa eine schwache aber deutlich erkennbare Bande zu sehen, die mit der vorhergesagten Größe des P2X7-Rezeptors von 83 kDa übereinstimmt. Die murine ART2.1 hat eine Größe von etwa 34 kDa, was gut mit der Bande im Präzipitat korreliert. Sowohl für den P2X7-Rezeptor als auch für die ART2.1 konnte somit eine ADP-Ribosylierung nachgewiesen werden. Im Immunpräzipitat von CD11a sind zwei Banden erkennbar, eine starke Bande bei ca. 120 kDa und eine schwächere Bande bei ca. 200 kDa, die wahrscheinlich der α -Kette (CD11a) und β -Kette (CD18) des Integrins LFA-1 entsprechen. CD18, das

sowohl die β -Kette des Integrins LFA-1, als auch die β -Kette des Integrins CR3 bildet, hat eine Größe von etwa 100 kDa. Im Heterodimer CD11a/CD18 (LFA-1) schien CD18 deutlich stärker ADP-ribosyliert zu werden als CD11a. Auch bei der Immunpräzipitation von CD11b waren zwei Banden zu sehen, die der α -Kette (CD11b) und der β -Kette (CD18) des Integrins CR3 entsprechen. Im Heterodimer CD11b/CD18 scheint CD11b (170 kDa) etwas stärker ADP-ribosyliert worden zu sein als CD18. Anhand des Bandenmusters im Zellysat ist erkennbar, dass es weitere Zielproteine für die mART2.1 gibt. Deren Identifikation sowie Untersuchungen zur Funktion der ADP-Ribosylierung dieser Proteine sind Ziel weiterführender Experimente.

3.2.6 Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ART2.1

Auf T-Zellen führt die ADP-Ribosylierung des P2X7-Rezeptors durch die ART2.2 zur Aktivierung des Rezeptors. Zur Untersuchung, ob die ART2.1 auf APZs durch ADP-Ribosylierung den P2X7-Rezeptor aktivieren kann, wurden PEMs mit NAD und dem P2X7-Agonisten BzATP inkubiert und anhand der Aufnahme von YO-PRO-1 die Porenbildung am Durchflusszytometer analysiert.

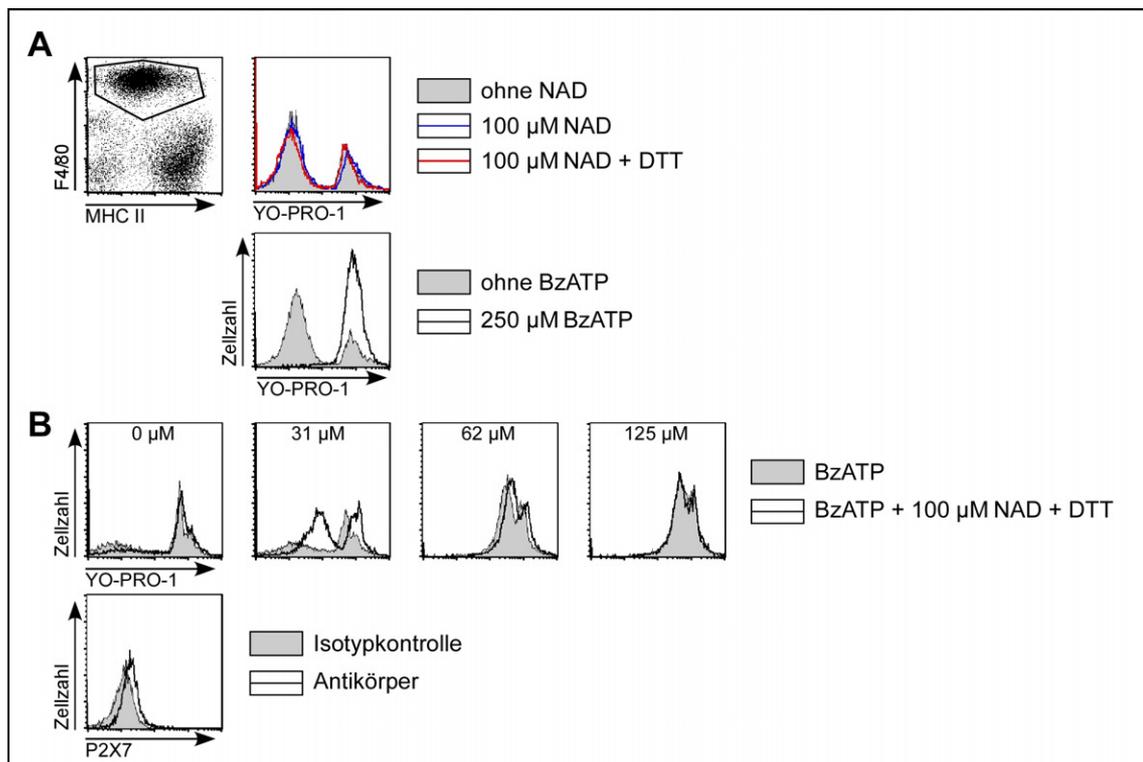


Abb. 3.35: YO-PRO-1-Aufnahme in PEMs. A: Inkubation der PEMs mit 100 μ M NAD + 2 mM DTT (rote Linie), 100 μ M NAD (blaue Linie), ohne NAD (graue Fläche) oder mit 250 μ M BzATP (schwarze Linie), ohne BzATP (graue Fläche). B: Inkubation der PEMs mit den angegebenen Konzentrationen BzATP allein (graue Fläche) oder mit BzATP + 100 μ M NAD und 2 mM DTT schwarze Linie. Anfärbung des P2X7-Rezeptors mit dem polyklonalen K1G Serum (schwarze Linie) oder einer Isotypkontrolle (graue Fläche).

Wie in Abb. 3.35A zu sehen ist, reagierten die PEMs nicht auf eine alleinige Inkubation mit NAD. Die Inkubation mit BzATP führte hingegen zu einer deutlichen Aufnahme von YO-PRO-1. Ein Teil der PEMs war bereits ohne die Inkubation mit BzATP oder NAD positiv für YO-PRO-1. Die Inkubation der PEMs mit unterschiedlichen Konzentrationen BzATP in Gegenwart oder Abwesenheit von NAD und DTT zeigte, dass NAD nicht ausreichend war, um eine Aufnahme von YO-PRO-1 und damit die Porenbildung zu induzieren, aber den Effekt von BzATP verstärken konnte. So kam es bei einer Konzentration von 31 μM BzATP in Gegenwart von 100 μM NAD und 2 mM DTT zu einer deutlichen YO-PRO-1 Aufnahme, während die PEMs nur mit 31 μM BzATP negativ für YO-PRO-1 blieben (Abb. 3.35B). Eine mit der Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch die ART2.2 auf T-Zellen vergleichbare Reaktion wurde durch die ART2.1-vermittelte ADP-Ribosylierung nicht ausgelöst. Die ADP-Ribosylierung durch die ART2.1 schien einen eher modulierenden Einfluss auf die Aktivierung des P2X7-Rezeptors zu haben.

3.2.7 Zusammenfassung der Untersuchungen der ART2.1

Es konnte gezeigt werden, dass die ART2.1 auf verschiedenen APZ-Populationen funktionell exprimiert wird. Insbesondere auf BMMs konnte die ART2.1-Expression und -Aktivität durch eine vorherige Stimulation der Zellen mit LPS, IFN- γ oder IFN- β gesteigert werden. Experimente mit ART2.1KO und ART2.2KO Mäusen deuteten darauf hin, dass Makrophagen zusätzlich zur ART2.1 auch ART2.2 exprimieren. Als Zielproteine der ART2.1 auf BMMs konnten neben dem P2X7-Rezeptor und der ART2.1 die α - und β -Kette des $\alpha_L\beta_2$ Integrins (LFA-1, CD11a/CD18) und des $\alpha_M\beta_2$ -Integrins (CR3, CD11b/CD18) identifiziert werden. Erste Untersuchungen einer möglichen Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch die ART2.1-vermittelte ADP-Ribosylierung deuteten auf einen modulierenden Einfluss der ADP-Ribosylierung auf die Aktivierung des P2X7-Rezeptors hin.

4 Diskussion

4.1 Die Rolle des P2X7-Rezeptors auf antigenpräsentierenden Zellen

4.1.1 Vergleich der Expression und Funktionalität des P2X7-Rezeptors auf antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe der durch genetische Immunisierung hergestellten Antikörper gegen den murinen P2X7-Rezeptor zum ersten Mal ein direkter Vergleich zwischen der Expression und der Funktionalität des P2X7-Rezeptors auf Mauszellen angestellt werden. Dabei wurde gezeigt, dass der P2X7-Rezeptor auf T-Zellen und APZs in vergleichbarer Stärke auf der Oberfläche exprimiert wird (Abb. 3.3). In verschiedenen Untersuchungen zur Funktionalität des P2X7-Rezeptors ergaben sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen T-Zellen und APZs. Während die T-Zellen ab einer Konzentration von 100 bis 250 μM ATP mit dem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen (Abb. 3.6), der Aufnahme von Ethidiumbromid oder YO-PRO-1 (Abb. 3.9, Abb. 3.10) und der Exposition von Phosphatidylserin (Abb. 3.8) reagierten, zeigten die APZs nur in einigen Fällen bei Konzentrationen von 1 mM ATP eine schwache Reaktion. Dies war unerwartet, da bei humanen Blutmonozyten eine deutliche YO-PRO-1-Aufnahme als Reaktion auf extrazelluläres ATP beschrieben wurde (96). Dieser scheinbare Widerspruch lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass die hier untersuchten APZs vor allem durch *in vitro* Differenzierung aus Knochenmarksstammzellen gewonnen wurden, und daher funktionell nicht den in anderen Untersuchungen verwendeten humanen Blutmonozyten entsprechen. Auch in anderer Hinsicht gab es einen Unterschied zwischen humanen Blutmonozyten und den hier untersuchten BMDCs. So konnte eine erhöhte Expression des P2X7-Rezeptors nach der Stimulation der BMDCs mit LPS, wie dies für humane Monozyten beschrieben wurde (97), nicht nachgewiesen werden. Vielmehr zeigte sich unter diesen Bedingungen eine Abnahme der P2X7-Expression. Dies wurde besonders bei gleichzeitiger Anfärbung des P2X7-Rezeptors und des, nach Aktivierung verstärkt exprimierten, kostimulatorischen Moleküls CD86 auf BMDCs deutlich. Dabei zeigte sich, dass nach einer Vorstimulation mit LPS oder TNF- α insbesondere die stark CD86-positiven BMDCs eine eher geringere P2X7-Oberflächenexpression aufwiesen als unstimulierte BMDCs (Abb. 3.4). Dieser Befund wurde durch die Untersuchung der *p2rx7*-Transkription in stimulierten und unstimulierten BMDCs zusätzlich untermauert. Durch reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR) konnte gezeigt werden, dass die verringerte Oberflächenexpression des P2X7-Rezeptors mit einem

geringeren Vorkommen von P2X7-mRNA einherging (Abb. 3.5). Vermutlich wird, zumindest in den *in vitro* erzeugten BMDCs, im Verlauf der durch LPS oder TNF α induzierten Reifung die Transkription des P2X7-Gens herunterreguliert. Insgesamt zeigen diese Untersuchungen klare Unterschiede in der Rolle des P2X7-Rezeptors zwischen T-Zellen und APZs, aber auch zwischen verschiedenen Populationen von APZs aus Maus und Mensch auf.

Der von T-Zellen exprimierte P2X7-Rezeptor kann durch ATP oder NAD aktiviert werden. Die ART2.2-vermittelte ADP-Ribosylierung des P2X7-Rezeptors führt zur Bereitstellung eines kovalent gebundenen Liganden, der den Rezeptor dauerhaft aktiviert und so den NAD-induzierten Zelltod (NICD) auslöst (36). Da die ART2.2 kurz nach der Aktivierung der T-Zelle von der Zelloberfläche abgespalten wird, sind aktivierte T-Zellen vor dem NICD geschützt. Eine mögliche Funktion dieses Mechanismus ist die Aufrechterhaltung der T-Zell-Homöostase; durch die Eliminierung naiver T-Zellen im Falle einer Entzündung wird Raum für die Proliferation aktivierter T-Zellen geschaffen (81). Im Unterschied dazu sollen APZs, die am Ort einer Entzündungsreaktion hohen ATP- und NAD-Konzentrationen durch die Lyse infizierter oder beschädigter Zellen ausgesetzt sind (79), Antigene aufnehmen, um T-Zellen zu aktivieren oder im Fall der Makrophagen, selbst die Infektion zu bekämpfen. Ein durch die Aktivierung des P2X7-Rezeptors ausgelöster Zelltod wäre in diesem Zusammenhang nur hinderlich. Die Tatsache, dass in Makrophagen die Aktivierung des P2X7-Rezeptors zur Sekretion von biologisch aktivem IL-1 β führt (Abb. 3.12, (38)) und zur Abtötung intrazellulärer Pathogene wie Mykobakterien und Chlamydien beiträgt (98, 99), unterstreicht die unterschiedliche Rolle des P2X7-Rezeptors auf APZs und T-Zellen.

4.1.2 Einfluss des P2X7-Rezeptors auf die Interaktion zwischen antigenpräsentierender Zelle und T-Zelle

Ein wesentlicher Impuls für die dieser Arbeit zugrunde liegende Fragestellung ging von der Beobachtung aus, dass dendritische Zellen in Gegenwart von T-Zellen und spezifischem Antigen IL-1 β sezernierten (100). In diesen Untersuchungen wurden verschiedene immortalisierte dendritische Zelllinien verwendet, die sich in ihrer Fähigkeit, auf die Stimulation durch ATP mit der Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoff YO-PRO-1 zu reagieren, unterschieden. Auf eine Beteiligung des P2X7-Rezeptors an der antigenabhängigen IL-1 β Sekretion wurde indirekt aus der Beobachtung, dass die Zelllinien, die besonders gut YO-PRO-1 aufnahmen auch besonders viel IL-1 β sezernierten, geschlossen. Die Rolle des P2X7-Rezeptors bei diesem Vorgang konnte jedoch nicht direkt definiert werden. Die Beobachtung unserer eigenen Arbeitsgruppe, dass der P2X7-Rezeptor auch über ART2.2-vermittelte ADP-Ribosylierung durch NAD aktiviert

werden kann, führte zu der Hypothese, dass die ART2.2 auf der T-Zelle während einer antigenabhängigen Interaktion mit der APZ deren P2X7-Rezeptor durch ADP-Ribosylierung aktivieren könnte und so die Sekretion von IL-1 β ausgelöst werden könnte.

Bei der antigenspezifischen Interaktion zwischen APZ und T-Zelle bildet sich ein stabiler, strukturierter Kontakt aus, in dem die interagierenden Moleküle lokalisiert sind, die sogenannte immunologische Synapse (16). Über die Lokalisation der ART2.2 oder des P2X7-Rezeptor in diesem Signalkomplex ist noch nichts bekannt. Allerdings ist die ART2.2, ebenso wie viele Signalmoleküle der immunologischen Synapse in cholesterolreichen Membranarealen, sogenannten *lipid rafts*, lokalisiert, vermutlich um sie auf bestimmte Zielproteine zu fokussieren (56). Eine Modifikation von CD8, CD43, CD44 und CD45 durch die murine ART2.2 und eine damit einhergehende Inhibition der Signaltransduktion über den T-Zell-Rezeptor wurde bereits gezeigt (57, 58). Eine Lokalisation der ART2.2 im Bereich der immunologischen Synapse ist somit durchaus denkbar (Abb. 4.1).

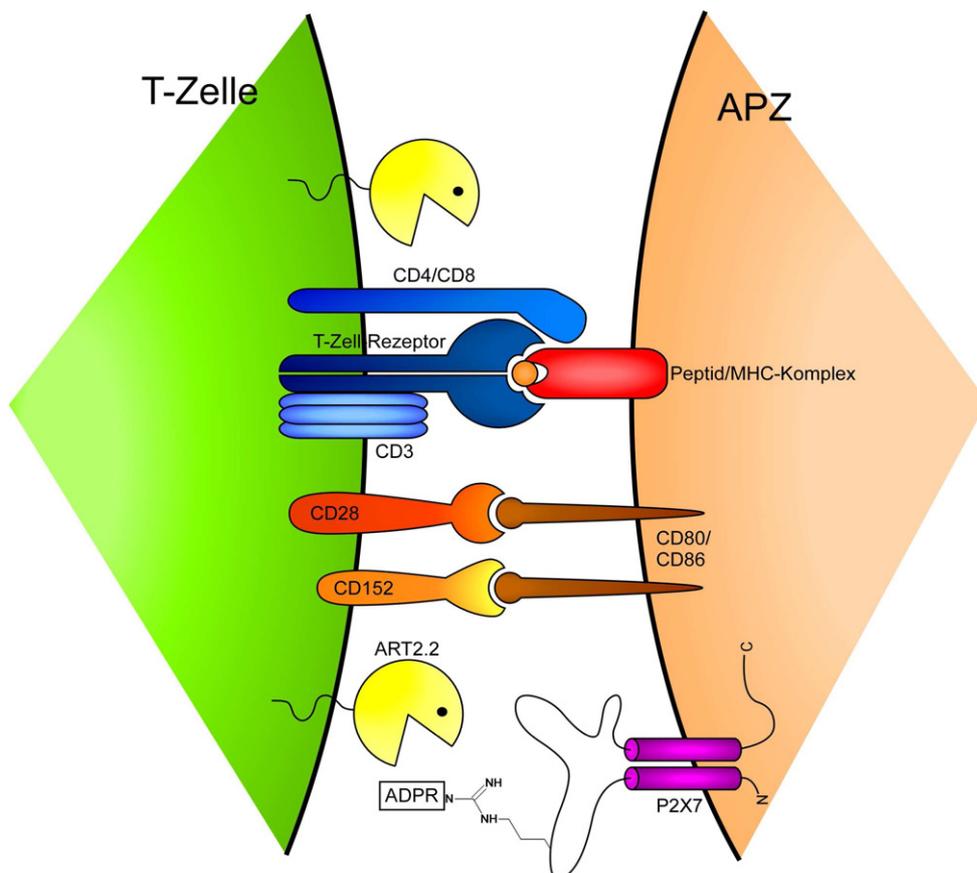


Abb. 4.1: *Mögliche Lokalisation von ART2.2 und P2X7 in der immunologischen Synapse. Eine Lokalisation der ART2.2 und des P2X7-Rezeptors im Bereich der immunologischen Synapse, könnte zur trans-ADP-Ribosylierung und somit zur Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch die ART2.2 führen.*

Um die antigenabhängige Interaktion zwischen APZs und T-Zellen zu untersuchen, wurden T-Zellen aus Mäusen verwendet, die einen transgenen T-Zell-Rezeptor tragen. Es wurden Zellen aus den zwei T-Zell-Rezeptor-transgenen Mauslinien DO11.10 und OT-II verwendet, die sich in ihrem genetischen Hintergrund (BALB/c bzw. C57BL/6) unterscheiden. Die T-Zellen beider Mauslinien erkennen dasselbe Peptid des Hühner-Ovalbumins, OVA₃₂₃₋₃₃₉, im Kontext des jeweils passenden MHC-II Moleküls (H-2^d für DO11.10, H-2^b für OT-II). Die Mehrzahl der Versuche wurde mit APZs aus BALB/c Mäusen und DO11.10 T-Zellen durchgeführt. Bei den DO11.10 T-Zellen handelte es sich entweder um primäre T-Zellen, die aus Lymphknoten und Milz von DO11.10 Mäusen isoliert wurden, oder um Zellen einer aus DO11.10 Mäusen entwickelten T-Hybridomzelllinie. In späteren Versuchen wurde die Verwendung der OT-II Mäuse notwendig, da die P2X7KO Mäuse nur auf dem C57BL/6 Hintergrund vorhanden waren.

Die produktive antigenspezifische Interaktion der T-Zell-Rezeptor-transgenen DO11.10 T-Zellen mit BMDCs aus BALB/c Mäusen wurde dadurch nachgewiesen, dass die Kokubation beider Zellarten in Gegenwart des spezifischen Antigens zur Zelladhäsion (Abb. 3.14), sowie zur Sekretion von IL-2 durch die T-Zellen (Abb. 3.15) und IL-1 β durch die BMDCs führte (Abb. 3.18). Dabei zeigten sich Unterschiede zwischen Hybridomzellen (DO11.10 Hyb) und primären T-Zellen (DO11.10 Pri). Während die DO11.10 Hyb als besonders gute Stimulatoren von IL-1 β und Produzenten von IL-4 fungierten, waren die DO11.10 Pri gute Produzenten von IFN- γ , aber schlechte Induktoren der IL-1 β Sekretion (Abb. 3.19). Die schlechte Induktion der IL-1 β Sekretion durch naive DO11.10 Pri wurde durch eine Vorstimulation, ein sogenanntes *Priming*, der primären Zellen deutlich gesteigert (Abb. 3.21). Die Tatsache, dass die IL-1 β Sekretion in BMDCs vorzugsweise durch T-Zellen induziert werden konnte, die einen aktivierten Phänotyp aufwiesen (Hybridomzellen und vorstimulierte primäre Zellen), deutet darauf hin, dass ein Signalsystem, welches im Rahmen der Differenzierung von naiven T-Zellen zu Effektorzellen induziert wird, eine Rolle bei der Auslösung der IL-1 β Sekretion durch BMDCs spielt.

In den oben beschriebenen Untersuchungen wurde zwar die antigenabhängige Induktion der IL-1 β Sekretion in BMDCs durch T-Zellen belegt, die Rolle des P2X7-Rezeptors in diesem Prozess blieb jedoch unklar. Um den Einfluss des P2X7-Rezeptors auf die Interaktion zwischen APZs und T-Zellen näher zu charakterisieren, wurden zwei Herangehensweisen gewählt: der Einsatz spezifischer Inhibitoren, sowie der Einsatz der erst gegen Ende der Arbeit verfügbaren P2X7KO Mäuse. Beide Herangehensweisen brachten dabei ihre spezifischen Probleme mit sich.

Zunächst wurden zwei Inhibitoren des P2X7-Rezeptors, KN62 und oxidiertes ATP (oATP), eingesetzt. Der Inhibitor oATP besetzt, ohne eine Aktivierung auszulösen, irreversibel die ATP-Bindungsstelle des P2X7-Rezeptors und verhindert dadurch die Aktivierung des Rezeptors durch seinen Liganden ATP (94). Die Selektivität dieses Antagonisten für den P2X7-Rezeptor ist jedoch umstritten, da er vermutlich auf die gleiche Weise die ATP-Bindungsstellen anderer P2-Rezeptoren blockieren kann. Studien mit P2X7KO Mäusen und humanen, P2X7-negativen Zellen zeigten, dass oATP unabhängig von der Expression des P2X7-Rezeptors die Weiterleitung inflammatorischer Signale inhibieren kann (95). Die Vorinkubation sowohl von APZs, als auch von T-Zellen mit oATP vor einer Koinkubation der Zellen führte jeweils zu einer geringen Abnahme der im Überstand gemessenen IL-1 β Menge, wobei die Wirkung auf die BMDCs größer war, als die auf die T-Zellen (Abb. 3.22). Aufgrund des geringen Effektes und der zweifelhaften Spezifität des Inhibitors konnten aus diesem Experiment jedoch keine eindeutigen Schlussfolgerungen gezogen werden.

Die Koinkubation von APZs und T-Zellen in Gegenwart des reversiblen P2X7-Inhibitors KN62 führte zu einer deutlichen Reduktion der im Überstand gemessenen IL-1 β Menge, in Abhängigkeit von der eingesetzten KN62-Konzentration (Abb. 3.23). Unerwarteterweise kam es jedoch auch bei der P2X7-unabhängigen, als Negativkontrolle für die Wirkung von KN-62 gedachten, Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin zu einer dosisabhängigen Hemmung der IL-1 β Sekretion durch KN-62 (Abb. 3.23). Durch diesen unerwarteten Effekt, wurde die Interpretation der beobachteten Hemmung der IL-1 β Sekretion durch KN62, als Folge der Inhibition einer P2X7-abhängigen, antigenspezifischen Interaktion zwischen APZ und T-Zelle, in Frage gestellt. Eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis liegt auch hier in einer ungenügenden Spezifität des verwendeten Inhibitors begründet. Von KN62 ist bekannt, dass es neben dem P2X7-Rezeptor auch die Ca²⁺/Calmodulinabhängige Proteinkinase II inhibiert (101). Es ist daher denkbar, dass KN-62 auf vielfache Weise in die Prozesse der T-Zell-Aktivierung oder der Signaltransduktion in APZs eingreifen kann. In Anbetracht der ungeklärten Spezifität der Inhibitoren oATP und KN-62, konnten aus den Experimenten keine Rückschlüsse auf eine mögliche Rolle des P2X7-Rezeptors bei der Interaktion zwischen APZ und T-Zelle gezogen werden.

Um die Frage zu klären, ob die T-Zell-induzierte Sekretion von IL-1 β abhängig von einer Aktivierung des P2X7-Rezeptors ist, wurden daher in weiteren Untersuchungen APZs aus P2X7KO Mäusen verwendet. Dabei ist zu beachten, dass die P2X7KO Mäuse nur auf dem C57BL/6 Hintergrund verfügbar waren. Wie in früheren Versuchen der Arbeitsgruppe beschrieben wurde, enthält der intrazelluläre C-Terminus des P2X7-

Rezeptors der C57BL/6 Maus eine Mutation an der Aminosäure 451 (P451L), die die Funktionalität des Rezeptors einschränkt (33). Daher sind die durchgeführten Experimente unter der Einschränkung zu betrachten, dass es sich hierbei um einen Vergleich zwischen Zellen ohne P2X7-Rezeptor und Zellen mit einem mutierten P2X7-Rezeptor handelt. Die P2X7KO Mäuse werden zur Zeit auf den BALB/c Hintergrund rückgekreuzt, standen allerdings für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente noch nicht zur Verfügung. Da die Mehrzahl der bisherigen Untersuchungen zur Bedeutung des P2X7-Rezeptors für die IL-1 β Sekretion an Makrophagen durchgeführt wurden (38), wurden in den hier durchgeführten Versuchen Peritonealmakrophagen (PEMs) mit BMDCs in Bezug auf die Sekretion von IL-1 β als Reaktion auf die Interaktion mit T-Zellen verglichen. Dazu wurden sowohl PEMs als auch BMDCs aus P2X7KO Mäusen isoliert, mit LPS stimuliert und in Gegenwart oder Abwesenheit des Antigens mit OVA₃₂₃₋₃₃₉-spezifischen OT-II T-Zellen koinkubiert.

Eine durch LPS induzierte Reifung der PEMs führte bei der Koinkubation der Makrophagen mit OT-II T-Zellen in der Abwesenheit des Antigens zu einer konstitutiven IL-1 β Sekretion, die in P2X7KO Mäusen deutlich geringer als in Wildtyp Mäusen war (Abb. 3.24B). In Gegenwart des Antigens kam es in beiden Mauslinien zu einer Steigerung der IL-1 β Sekretion. Die LPS-induzierte, antigenunabhängige, konstitutive IL-1 β Sekretion erwies sich somit als P2X7-abhängig, die durch den spezifischen Antigenkontakt der Makrophagen mit T-Zellen induzierte Steigerung jedoch als P2X7-unabhängig.

Für die Interaktion zwischen LPS-vorstimulierten BMDCs und OT-II T-Zellen ergab sich ein anderes Bild. Sowohl die konstitutive als auch die antigenabhängige IL-1 β Sekretion waren unabhängig von der Expression des P2X7-Rezeptors (Abb. 3.24A), obwohl im Westernblot nachgewiesen wurde, dass zumindest LPS-stimulierte BALB/c BMDCs grundsätzlich in der Lage sind, auf exogenes ATP mit der Freisetzung von biologisch aktivem IL-1 β zu reagieren (Abb. 3.11).

Zusammenfassend zeigte sich, dass der Mechanismus der, durch die antigenabhängige Interaktion mit T-Zellen induzierten, IL-1 β Sekretion unabhängig vom P2X7-Rezeptor ist. Bei der, durch die Reifung mit LPS induzierten, antigenunabhängigen IL-1 β Sekretion zeigte sich jedoch ein grundlegender Unterschied zwischen PEMs und BMDCs. Diese war bei PEMs auf den P2X7-Rezeptor angewiesen, bei BMDCs jedoch nicht. Die Frage, ob es sich hier um einen grundsätzlichen Unterschied im Mechanismus der IL-1 β Sekretion zwischen Makrophagen und dendritischen Zellen handelt, oder ob dieser Unterschied auch auf dem Vergleich von primären Gewebsmakrophagen mit *in vitro* herangezogenen dendritischen Zellen beruht, lässt sich anhand der hier durch-

geführten Experimente nicht beantworten. Sowohl Makrophagen als auch dendritische Zellen sind APZs, die sich dennoch in ihrer Rolle deutlich unterscheiden. Die Hauptaufgabe der dendritischen Zellen ist die Aufnahme und Präsentation von Antigenen und im Falle einer Infektion, die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen. Im Gegensatz zu dendritischen Zellen übernehmen Makrophagen neben ihrer Rolle als APZs auch Effektorfunktionen. Die Aktivierung durch T-Zellen versetzt Makrophagen in die Lage intrazelluläre Bakterien abzutöten (6). Diese unterschiedlichen Rollen von dendritischen Zellen und Makrophagen werden auch in ihrer Fähigkeit bei der Koinkubation mit T-Zellen eine antigenabhängige IL-2 Sekretion zu induzieren reflektiert. Bei einer Koinkubation mit T-Zellen induzierten BMDCs, gemäß ihrer Rolle als Initiatoren einer spezifischen Immunantwort, eine starke, antigenabhängige IL-2 Sekretion, während PEMs eine deutlich geringere IL-2 Sekretion auslösten (Abb. 3.25). Es ist daher durchaus denkbar, dass sich Makrophagen und dendritische Zellen auch bezüglich des Mechanismus der IL-1 β Sekretion unterscheiden.

Dieser Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. IL-1 β ist ein Zytokin, welches als inaktive Vorstufe (pro-IL-1 β) ohne ein konventionelles Leaderpeptid synthetisiert wird und somit zunächst im Zytosol akkumuliert. Diese inaktive Vorstufe muss erst von der ebenfalls intrazellulär lokalisierten Protease Caspase-1 gespalten werden, damit biologisch aktives IL-1 β sezerniert werden kann (38). Dabei ist der Mechanismus, durch den das prozessierte IL-1 β aus der Zelle gelangt noch nicht geklärt. Es wurde gezeigt, dass die Ausbildung eines sogenannten Inflammasoms die Voraussetzung für die Prozessierung und Freisetzung von IL-1 β ist (39). Das Inflammasom ist ein Multiproteinkomplex, der sich aus Mitgliedern der intrazellulären NLR-(*NOD-like receptors*)-Familie (NALP1, NALP3, IPAF, NAIP), dem Adaptorprotein ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), sowie inflammatorischen Caspasen bildet. Die Zusammenlagerung erfolgt durch homotypische Proteininteraktionen zwischen Pyrimidindomänen (PYD) und Caspase-Rekrutierungsdomänen (CARD) der Proteine (39, 40). Für die Synthese, Prozessierung und Sekretion von IL-1 β ist die Zwei-Signal-Hypothese weitgehend akzeptiert. Hierbei löst das erste Signal die Synthese der IL-1 β Vorform und deren Akkumulation im Zytosol aus. Dieses erste Signal wird durch die Aktivierung von *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), z. B. durch LPS, vermittelt. Das zweite Signal induziert die Ausbildung des Inflammasoms und löst die Prozessierung und Sekretion des IL-1 β aus. Die Stimuli, die dieses zweite Signal darstellen könnten, sind zur Zeit noch unzureichend charakterisiert. Der einzige bisher molekular charakterisierte Mechanismus der Induktion des Inflammasoms stellt die Gegenwart von extrazellulärem ATP und die daraus resultierende Aktivierung des

P2X7-Rezeptors dar (88). Der entscheidende Faktor ist hierbei, die auf die Aktivierung des P2X7-Rezeptors folgende Öffnung des Ionenkanals und der damit verbundene Ausstrom von K^+ -Ionen. Substanzen wie Nigericin, ein Antibiotikum aus *Streptomyces hygroscopicus*, und Maitotoxin, ein Gift aus der Alge *Gambierdiscus toxicus*, die auch zu einem K^+ -Ausstrom führen, können ebenfalls die Aktivierung der Caspase-1 auslösen (102-104). Der Ausstrom von K^+ -Ionen resultiert in der Aktivierung der Ca^{2+} -unabhängigen Phospholipase A2 (iPLA₂), deren Hemmung die Sekretion von IL-1 β blockiert (105).

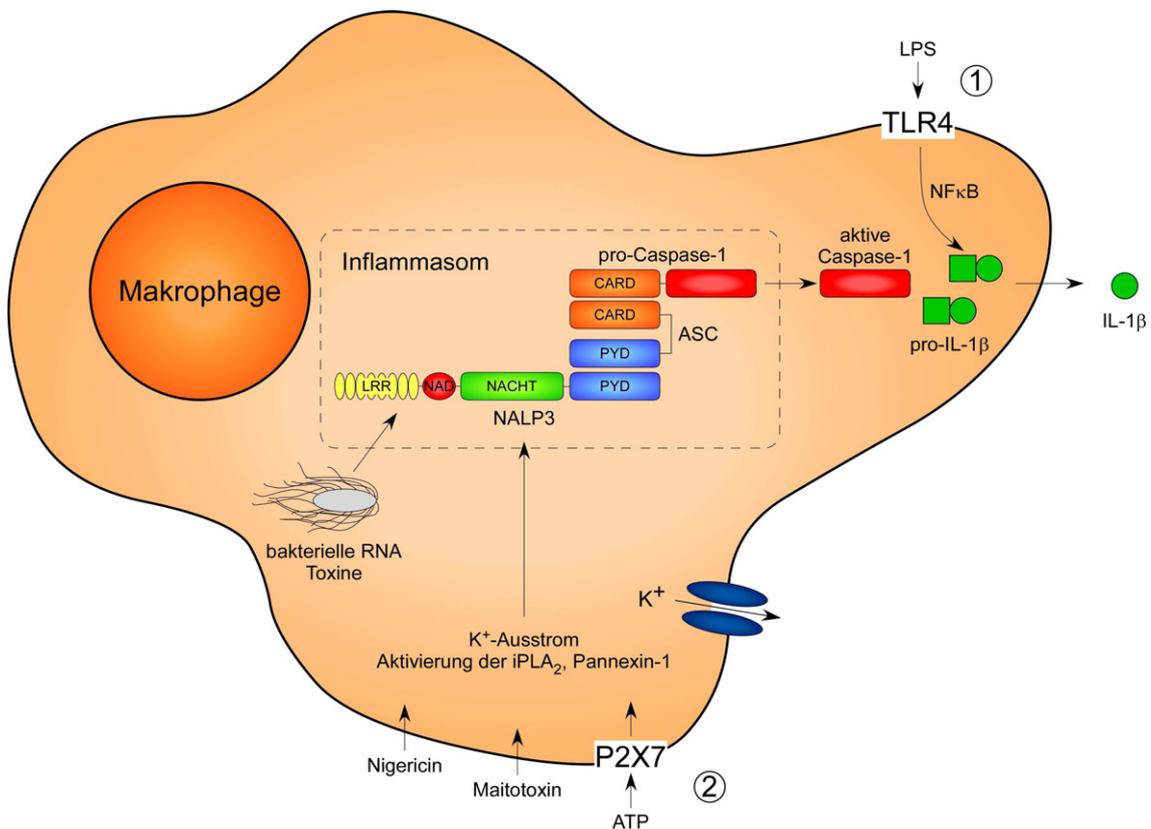


Abb. 4.2: *Ausbildung des Inflammasoms und Aktivierung der Caspase-1* (modifiziert nach Mariathasan 2007 (106)). Das erste Signal, die Aktivierung des TLR4 durch LPS löst die Synthese und Akkumulation von IL-1 β im Zytosol aus (1). Das zweite Signal induziert die Ausbildung des Inflammasoms und führt zur Aktivierung der Caspase-1, sowie der Prozessierung und Sekretion von IL-1 β (2). Die Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ATP und Substanzen wie Nigericin und Maitotoxin können durch Auslösen eines K^+ -Ausstroms die Ausbildung des Inflammasoms induzieren. Intrazelluläre Pathogene können Bestandteile des Inflammasoms direkt aktivieren und so dessen Ausbildung induzieren. NALP3 (NACHT-, LRR- and pyrin-domain-containing protein 3), LRR (leucine-rich repeat), NAD (NACHT-associated domain), PYD (pyrin domain), CARD (caspase-recruitment domain), ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), NF κ B (nuclear factor κ B).

Die in dieser und anderen Arbeiten gemachte Beobachtung, dass APZs aus P2X7KO Mäusen grundsätzlich in der Lage sind IL-1 β zu sezernieren, dass sie jedoch eine Hemmung in der ATP-induzierten IL-1 β Sekretion aufweisen (88), deutet darauf hin,

dass es auch andere, bisher nicht im Detail charakterisierte Auslöser der Inflammasombildung geben muss. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde gezeigt, dass im Rahmen einer antigenabhängigen Interaktion von APZs und T-Zellen das zur IL-1 β Sekretion nötige zweite Signal ein anderes als die Aktivierung des P2X7-Rezeptors ist. Auch in anderen biologischen Kontexten, wie z. B. Infektionen mit verschiedenen bakteriellen Pathogenen, kommt es zu einer Sekretion von IL-1 β , ohne dass ein bisher charakterisiertes zweites Signal vorliegt (102). Die Induktion der IL-1 β Sekretion im Rahmen einer akuten Infektion geschieht vermutlich über charakteristische, Pathogen-assoziierte Muster, die intrazellulär von den Mitgliedern der NLR-Familie erkannt werden (Abb. 4.2, (107)).

Ein entsprechender Mechanismus, über den im Rahmen der antigenspezifischen Interaktion von Makrophagen und T-Zellen ein auslösendes Signal für die Ausbildung des Inflammasoms induziert werden könnte, ist bisher nichts bekannt. Denkbar wäre, dass z. B. die Interaktion von CD40 (auf APZs) mit CD40L (auf T-Zellen), die zur Weiterleitung kostimulatorischer Signale dient, auch die Ausbildung eines Inflammasoms induzieren könnte. Ein in dieser Arbeit durchgeführter Versuch, die antigenabhängige IL-1 β Sekretion durch einen blockierenden Antikörper gegen CD40 zu inhibieren war jedoch erfolglos. Um diesen Mechanismus zu charakterisieren werden weitere Experimente erforderlich sein.

4.2 Expression und Funktion der murinen ART2.1 auf antigenpräsentierenden Zellen

4.2.1 Expression der ART2.1 auf unterschiedlichen Populationen antigenpräsentierender Zellen

Die Expression von ART2.2 und ART2.1 auf T-Zellen ist seit langem bekannt und gut untersucht (55). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ART2.1 nicht nur auf T-Zellen sondern auch auf unterschiedlichen Populationen antigenpräsentierender Zellen funktionell exprimiert wird (Abb. 3.27, Abb. 3.29). Auf BMMs konnte die Oberflächenexpression der ART2.1 durch eine vorherige Stimulation der Zellen insbesondere mit LPS in Gegenwart von U0126 stark gesteigert werden (Abb. 3.27). Bei U0126 handelt es sich um einen Inhibitor der Mitogen-aktivierten Proteinkinase-(MAPK)-Kinasen MEK 1/2 (68). Die Aktivierung von TLR4 durch LPS setzt mehrere intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse in Gang. Vermittelt über die Adaptorproteine TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β*) und TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) kommt es über den MyD88-unabhängigen Signalweg zur Aktivierung des Interferon-regulierenden Faktors 3 (IRF3) und somit zur

Sekretion von IFN- β . Des weiteren kommt es über den MyD88-abhängigen Signalweg zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und der MAPK-Kaskade. IFN- β und von T-Zellen sezerniertes IFN- γ können über den JAK/STAT-Signalweg die Transkription zahlreicher Proteine regulieren (108). Experimente mit Inhibitoren der verschiedenen Signalwege deuten darauf hin, dass die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges die Expression von ART2.1 induziert. Der die ART2.1-Expression steigernde Effekt von LPS wird vermutlich über die durch LPS ausgelöste Synthese von IFN- β vermittelt. Des weiteren scheint die Aktivierung der MAPK ERK1 und ERK2 einen inhibitorischen Effekt auf die ART2.1 Expression zu haben, der durch den Inhibitor der MAPK-Kinasen MEK1 und MEK2, U0126, aufgehoben wird (68). In Abb. 4.3 sind diese Zusammenhänge schematisch dargestellt, wie genau die einzelnen Signalwege zusammenspielen ist noch nicht im Detail bekannt und bedarf weiterführender Untersuchungen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Vorstimulation der Makrophagen mit Typ-I und Typ-II Interferonen, als auch mit LPS zu einer gesteigerten Oberflächenexpression der ART2.1 führt (Abb. 3.27).

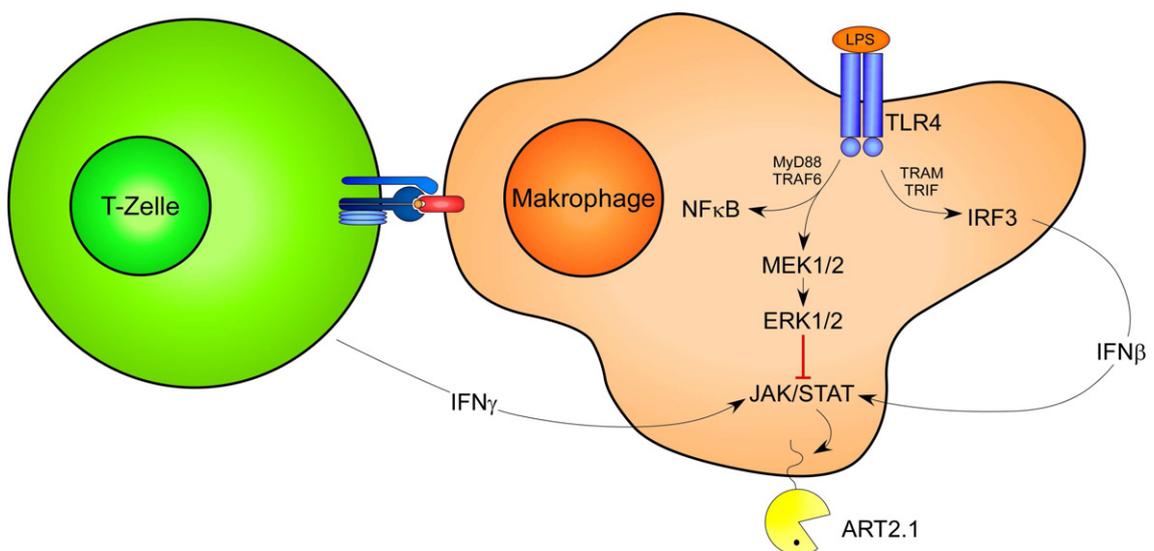


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege, die zur Induktion der ART2.1-Expression führen. Aktivierung von TLR4 über LPS aktiviert über die Adaptorproteine TRIF und TRAM den IRF3, wodurch die Synthese von IFN- β induziert wird. Zusätzlich wird über den MyD88-abhängigen Signalweg der Transkriptionsfaktor NF κ B und die MAPK-Kaskade aktiviert. Über eine antigenspezifische Interaktion aktivierte T-Zellen sezernieren IFN- γ . IFN- β und IFN- γ aktivieren den JAK/STAT-Signalweg, wodurch die Expression von ART2.1 induziert wird. Die MAPK ERK1/2 haben einen inhibitorischen Einfluß auf den JAK/STAT-Signalweg, der durch die Hemmung von MEK1/2 mittels U0126 aufgehoben wird. TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β), TRAM (TRIF-related adaptor molecule), IRF3 (Interferon-regulierender Faktor 3), MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88), TRAF6 (tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor 6) NF κ B (nuclear factor κ B), JAK (Januskinasen), STAT (signal transducers and activators of transcription), MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase).

Im Gegensatz zu BMMs, Makrophagen aus der Milz, B-Zellen aus der Milz und PEMs konnte auf unstimulierten und LPS-stimulierten BMDCs keine ART2.1-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.29A).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen ART2.1 und ART2.2 ist, dass die ART2.1 aufgrund einer zusätzlichen Disulfidbrücke nur unter reduzierenden Bedingungen enzymatisch aktiv ist (65). Aus diesem Grund wurde die ART-Aktivität in Gegenwart von exogen zugeführtem DTT als Reduktionsmittel untersucht. Auf der Oberfläche von BMMs kam es unter reduzierenden Bedingungen bereits bei geringen eNAD-Konzentrationen von 2 μM zu einer halbmaximalen etheno-ADP-Ribosylierung (Abb. 3.33). Bei hohen eNAD-Konzentrationen von 50 μM konnte auch eine DTT-unabhängige ART-Aktivität auf den BMMs nachgewiesen werden, insbesondere wenn diese zuvor mit LPS in Gegenwart von U0126 vorstimuliert waren (Abb. 3.27). Für dieses Phänomen gibt es mehrere möglich Erklärungen. Zum einen ist es möglich, dass durch die Stimulation der Zellen in einem geringen Ausmaß auch die Expression der ART2.2 auf der Oberfläche induziert wurde, so dass ihre Enzymaktivität gemessen werden konnte, obwohl ein direkter Nachweis der ART2.2 durch Antikörperanfärbung nicht gelang. Diese Hypothese wird durch RT-PCR Untersuchungen gestützt, die für die verwendeten Stimulationsbedingungen auch eine geringe Steigerung der ART2.2-Transkription zeigen (68). Des weiteren ist es möglich, dass die BMMs in der Lage sind eigene, endogene Reduktionsäquivalente zu produzieren, die eine enzymatische Aktivität der ART2.1 ermöglichen würden. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass Makrophagen in der Lage sind endogene Reduktionsäquivalente in Form von Cystein oder Glutathion bereitzustellen (109), wodurch deren geringe Konzentration im Plasma (110) deutlich erhöht würde. Zusätzlich könnten vornehmlich intrazellulär lokalisierte Proteine wie Thioredoxin und die Protein Disulfid Isomerase (PDI) als extrazelluläre Sulfhydryl-Oxidoreduktasen fungieren (111) und so eine Aktivierung der ART2.1 im Kontext einer inflammatorischen Reaktion auslösen. Schließlich ist es möglich, dass bei hohen Substratkonzentrationen eine Restaktivität der ART2.1 zur etheno-ADP-Ribosylierung von Oberflächenproteinen unter nicht-reduzierenden Bedingungen ausreicht. Um diese Möglichkeiten genauer zu untersuchen wurden Versuche mit Milzzellen aus Mäusen durchgeführt, die für ART2.1, ART2.2 oder beide Isoformen defizient waren.

Zunächst wurden Milzzellen aus BALB/c Mäusen mit solchen aus C57BL/6 und NZW Mäusen verglichen. Aufgrund von Punktmutationen bzw. Gendelektionen stellen C57BL/6 und NZW Mäuse natürliche *knockouts* für ART2.1 bzw. ART2.2 dar (63). Dabei zeigte sich, dass auf Makrophagen und B-Zellen aus C57BL/6 Mäusen, die genetisch nicht in der Lage sind ART2.1 zu exprimieren, eine DTT-unabhängige ART-

Aktivität beobachtet werden konnte (Abb. 3.30B). Dies deutet auf eine geringe, durch den gegen ART2.2 gerichteten Antikörper R8A106 nicht nachweisbare, Expression von ART2.2 auf diesen Zellen hin. Auf B-Zellen aus NZW Mäusen, die genetisch bedingt keine ART2.2 exprimieren können, konnte eine ART-Aktivität ausschließlich in Gegenwart von DTT nachgewiesen werden. Auf Makrophagen und insbesondere auf T-Zellen aus diesen Mäusen war auch eine DTT-unabhängige ART-Aktivität zu beobachten. Diese war deutlich geringer als die ART-Aktivität in Gegenwart von DTT und die stärkere DTT-unabhängige ART-Aktivität auf den T-Zellen im Vergleich zu den Makrophagen korrelierte mit einer stärkeren Expression der ART2.1 auf den T-Zellen (Abb. 3.30C). Diese Beobachtung ist vermutlich ein Hinweis darauf, dass bei den eingesetzten hohen Substratkonzentrationen von 50 μM eNAD die ART2.1 auch in Abwesenheit von Reduktionsäquivalenten noch eine Restaktivität aufweist.

Die drei untersuchten Mausstämme weisen unterschiedliche genetische Hintergründe auf. Da bekannt ist, dass sich u. a. auch das Expressionsniveau von ART2.1 und ART2.2 von Stamm zu Stamm stark unterscheidet, wurden die gemachten Beobachtungen durch Versuche mit auf konventionelle Weise hergestellten *knockout* Mäusen überprüft. Bei den eingesetzten *knockout* Mäusen handelt es sich um Mäuse auf dem BALB/c Hintergrund, in denen gezielt das Gen für ART2.1 (ART2.1KO), ART2.2 (ART2.2KO) oder die Gene für ART2.1 und ART2.2 (ART2KO) inaktiviert wurden (89). Die Untersuchung der Milzzellen aus *knockout* Mäusen bestätigte im wesentlichen die an den natürlichen Defektvarianten gemachten Beobachtungen (Abb. 3.32). Im Unterschied zu den B-Zellen aus C57BL/6 Mäusen konnte auf B-Zellen aus ART2.1KO Mäusen keine ART-Aktivität nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass im Unterschied zu den C57BL/6 Mäusen auf B-Zellen aus BALB/c Mäusen ausschließlich ART2.1 exprimiert wird. In ähnlicher Weise konnte bei der ART2.2KO Maus im Unterschied zur ART2.2-defizienten NZW Maus auf T-Zellen ART-Aktivität in Abwesenheit von DTT nachgewiesen werden. Auch hier ist diese Diskrepanz vermutlich auf Unterschiede im ART2.1-Expressionsniveau zwischen NZW und BALB/c Mäusen zurückzuführen.

Die Expression der ART2.1 auf BMMs konnte durch eine vorherige Stimulation der Zellen mit LPS oder IFN- γ stark gesteigert werden. Dies deutet auf eine mögliche Rolle der ART2.1 im Verlauf einer Infektion oder Entzündung hin. Da die ART2.1 nur unter reduzierenden Bedingungen enzymatisch aktiv ist, stellt sich die Frage, ob und wann reduzierende Bedingungen *in vivo* vorliegen. Makrophagen sind nach Aktivierung in der Lage selbst reduzierende Substanzen, wie z. B. Glutathion, freizusetzen und so die Voraussetzung für die Aktivität der ART2.1 *in vivo* zu schaffen (109).

Bemerkenswerterweise blieb jedoch der Versuch eine ART-Aktivität *in vivo* unter inflammatorischen Bedingungen im Biogel-Modell nachzuweisen ohne Erfolg (Abb. 3.29C). Beim Hauptteil der nach zwei bis drei Tagen in die Biogelmatrix eingewanderten Zellen handelte es sich jedoch um Granulozyten, die keinerlei ART-Aktivität zeigten. Weiterführende Experimente mit längeren Verweildauern des Biogels könnten besseren Aufschluss über die Reaktion von Makrophagen in diesem Modell bringen. Um die Frage nach der Bedeutung der ART2.1-Expression auf aktivierten Makrophagen zu beantworten, wurde zunächst der Frage nach den Zielproteinen der ART2.1 nachgegangen.

4.2.2 Zielproteine und mögliche Funktion der ART2.1 auf antigenpräsentierenden Zellen

Durch Inkubation mit radioaktiv markiertem NAD und anschließende Immunpräzipitation konnten mittels Autoradiographie der P2X7-Rezeptor, die ART2.1 und die α - und β -Ketten der Integrine $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1, CD11a/CD18) und $\alpha_M\beta_2$ (CR3, CD11b/CD18) als Zielproteine der ART2.1 identifiziert werden (Abb. 3.34). Die Analyse des Gesamtzelllysates zeigte weiterhin, dass es noch mehrere bisher nicht identifizierte Zielproteine der ART2.1 gibt. Ausgehend von der Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ART2.2-vermittelte ADP-Ribosylierung auf T-Zellen wurde untersucht, ob der P2X7-Rezeptor auf Makrophagen durch eine ART2.1-vermittelte ADP-Ribosylierung ebenfalls aktiviert werden kann. Bei in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Experimenten mit HEK293-Zellen, die mit dem P2X7-Rezeptor und der ART2.1 transfiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass ART2.1 grundsätzlich in der Lage ist, den P2X7-Rezeptor in Anwesenheit von extrazellulärem NAD zu aktivieren. Zellen, die mit P2X7 und ART2.1 kotransfiziert wurden, aber nicht solche, die mit P2X7 alleine transfiziert wurden, reagierten auf extrazelluläres NAD mit der Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran und der Aufnahme von YO-PRO-1. In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit primären Makrophagen konnte jedoch keine Aufnahme von YO-PRO-1 nach Inkubation der Zellen mit NAD gezeigt werden (Abb. 3.35A). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass durch die Inkubation der PEMs mit NAD bei gleichzeitiger Inkubation mit dem P2X7-Agonisten BzATP zu einer Verringerung der für die Porenbildung nötigen BzATP-Konzentration führt (Abb. 3.35B). Der Effekt der ART2.1-abhängigen ADP-Ribosylierung des P2X7-Rezeptors auf Makrophagen scheint somit eher in der Modulation der Sensitivität des Rezeptors gegenüber extrazellulärem ATP als in seiner vollen Aktivierung zu liegen. So könnte die ADP-Ribosylierung des P2X7-Rezeptors auf aktivierten Makrophagen dazu führen, dass dieser bei geringen Mengen von ATP, die am Inflammationsort durch die Lyse

beschädigter und infizierter Zellen vorliegen können, aktiviert wird, wodurch u. a. die Sekretion von IL-1 β ausgelöst bzw. gesteigert werden kann.

Auf T-Zellen beeinträchtigt die ADP-Ribosylierung von LFA-1 die homotypische Zelladhäsion und inhibiert die über LFA-1 vermittelte Signaltransduktion (57). Inwiefern die ADP-Ribosylierung der Integrine LFA-1 und CR3 auf Makrophagen das Adhäsions- und Wanderungsverhalten der Zellen beeinflusst oder die intrazelluläre Signaltransduktion modifiziert, bedarf weiterführender Untersuchungen.

Abschließend lässt sich sagen, dass sowohl der P2X7-Rezeptor als auch die ART2 auf T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen unterschiedliche Funktionen ausüben. Die Aktivierung des P2X7-Rezeptors löst in Makrophagen die Sekretion von IL-1 β aus, während die Aktivierung des Rezeptors auf T-Zellen durch ATP oder ADP-Ribosylierung letztendlich zum Zelltod führt. Die Oberflächenexpression von ART2.1 wird auf Makrophagen durch eine vorherige Stimulation der Zellen stark gesteigert, während die ART2.2 nach Aktivierung der T-Zelle von der Oberfläche abgespalten wird. Dies deutet darauf hin, dass die Wirkung der am Ort einer Entzündung freigesetzten Nukleotide NAD und ATP durch die unterschiedliche Expression ihrer Liganden bzw. der sie nutzenden Enzyme spezifisch und genau reguliert werden.

4.3 Ausblick

Durch die mittlerweile erfolgte Rückkreuzung der P2X7^{-/-} Mutation auf den BALB/c Hintergrund werden Möglichkeiten für weitergehende Untersuchungen eröffnet, da erst in dieser Konstellation die P2X7-Defektvariante mit einem voll funktionstüchtigen Wildtyp verglichen werden kann. Um den Einfluss des P2X7-Rezeptors auf die Interaktion zwischen T-Zellen und APZs genauer zu untersuchen, wäre des weiteren eine Kreuzung der DO11.10 Mäuse mit P2X7KO Mäusen auf dem BALB/c Hintergrund hilfreich. Dies würde gezielte Experimente mit APZs und antigenspezifischen T-Zellen ermöglichen, in denen entweder die APZs, die T-Zellen oder beide Zellpopulationen keinen P2X7-Rezeptor aufweisen. In dieser Hinsicht wäre es auch interessant das *Priming* von Wildtyp T-Zellen durch P2X7-positive und -negative APZs zu vergleichen. Erste, in dieser Arbeit nicht gezeigte Versuche mit einer P2X7-transfizierten B-Zelllinie als APZs ergaben Hinweise auf einen möglichen Einfluss von extrazellulärem ATP auf die Polarisation der vorstimulierten T-Zellen. Die Verwendung von APZs aus P2X7KO Mäusen könnte hier neue Erkenntnisse bringen.

Ein weiteres Aufgabengebiet ist die Identifizierung weiterer Zielproteine der ART2.1. Neben der gezielten Immunpräzipitation putativer Zielproteine könnten auch die

Gesamtheit der, nach einer etheno-ADP-Ribosylierung modifizierten Proteine, mit dem 1G4-Antikörper präzipitiert werden und eine weitere Auftrennung bzw. Identifikation mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese oder der Massenspektrometrie versucht werden. Auch die funktionellen Auswirkungen der ADP-Ribosylierung auf die Zielproteine müssen näher untersucht werden. So bedarf die Frage, ob die ADP-Ribosylierung der Integrine LFA-1 und CR3 das Adhäsionsvermögen der Makrophagen oder ihre Interaktion mit anderen Zellen beeinflusst weiterer Experimente zu ihrer Klärung. Das $\alpha_M\beta_2$ -Integrin (CR3) ist sowohl ein Adhäsionsmolekül für Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, als auch ein Rezeptor für die Komplementkomponente C3b, und in dieser Funktion an der Phagozytose Komplement-beschichteter Mikroorganismen beteiligt (112). Ob eine oder beide dieser Funktionen durch die ADP-Ribosylierung beeinflusst wird, ist eine interessante Frage.

5 Zusammenfassung

Die Erkenntnis, dass ATP und NAD neben ihrer intrazellulären Rolle im Energiestoffwechsel auch extrazellulär eine Rolle als Signalmoleküle spielen, ist relativ neu und noch nicht ausgiebig untersucht. Beide Nukleotide aktivieren auf unterschiedliche Art den Purinrezeptor P2X7, der auf vielen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird und an der Regulation von Entzündungsvorgängen beteiligt ist. Der P2X7-Rezeptor wird entweder direkt durch Bindung von ATP aktiviert, oder indirekt durch eine ADP-Ribosyltransferase (ART), die NAD nutzt um den Rezeptor zu modifizieren (ADP-ribosylieren). Die Aktivierung des P2X7-Rezeptors führt u. a. zu Veränderungen der Zellmembran (z. B. Externalisierung von Phosphatidylserin) und zur Prozessierung und Sekretion von Interleukin-(IL-)1 β . In dieser Arbeit wurden die Wirkungen von NAD und ATP auf antigenpräsentierende Zellen (APZs) und T-Zellen untersucht.

Neben der Expression wurde die Funktion des P2X7 auf APZs und T-Zellen anhand einer Reihe messbarer, durch die Aktivierung des Rezeptors ausgelösten Veränderungen analysiert. Dabei zeigten die T-Zellen, abgesehen von der IL-1 β -Sekretion, eine deutlich stärkere Reaktion als die APZs, obwohl die Oberflächenexpression des Rezeptors auf beiden Zellarten vergleichbar war.

Sowohl Makrophagen als auch dendritische Zellen werden durch den Kontakt mit T-Zellen in Gegenwart von Antigen zur Sekretion von IL-1 β angeregt. Diese antigenabhängige IL-1 β Sekretion erwies sich in beiden Zellarten als P2X7-unabhängig. Dagegen zeigten Makrophagen und dendritische Zellen Unterschiede in der antigenunabhängigen, durch LPS induzierten IL-1 β -Sekretion. Diese war in Makrophagen P2X7-abhängig, in dendritischen Zellen jedoch P2X7-unabhängig. Die Unterschiede im Mechanismus der IL-1 β Sekretion weisen auf eine unterschiedliche Rolle von P2X7 in diesen beiden Typen von APZs gemäß ihrer unterschiedlichen Rolle in der Immunantwort hin.

Die Aktivierung von P2X7 durch NAD ist von der Gegenwart einer ART abhängig. Im Kontext des Immunsystems wurden bisher nur die Isoformen ART2.1 und ART2.2 ausschließlich auf T-Zellen nachgewiesen. In dieser Arbeit wurde nun erstmals gezeigt, dass ART2.1 auch auf verschiedenen Populationen von APZs exprimiert wird und enzymatisch aktiv ist. Die Expression von ART2.1 wurde auf Makrophagen durch Stimulation mit LPS oder Interferonen gesteigert.

Die ADP-Ribosylierung des P2X7-Rezeptors durch ART2.1 auf Makrophagen führte nicht zu einer vollständigen Aktivierung des Rezeptors, wie dies bei der ART2.2-vermittelten ADP-Ribosylierung von P2X7 auf T-Zellen der Fall ist, sondern senkte die Schwelle für die Aktivierung von P2X7 durch ATP. Schließlich wurden neben dem P2X7-Rezeptor beide Ketten der Integrine $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1, CD11a/CD18) und $\alpha_M\beta_2$ (CR3, CD11b/CD18) als Zielproteine der ART2.1 auf Makrophagen identifiziert.

6 Abstract

The nucleotides NAD and ATP play a major role in the intracellular energy metabolism of cells. The knowledge of their function as extracellular signalling molecules is relatively new and far from being exhaustively studied. Both nucleotides activate, via different means, the P2X7 purinergic receptor, which is expressed on a wide range of hematopoietic cells and participates in the regulation of inflammatory responses. The P2X7 receptor is activated either directly by binding its ligand ATP or indirectly by an ADP-ribosyltransferase (ART) using NAD as a substrate to modify (ADP-ribosylate) the receptor. Activation of the P2X7 receptor leads amongst others to changes in the plasma membrane (i. e. externalisation of phosphatidylserine) and to the processing and secretion of interleukin-(IL-)1 β . In the course of this study the effects of NAD and ATP on antigen-presenting cells (APCs) and T cells were examined.

Experiments examining the expression and function of the P2X7 receptor on APCs and T cells showed a stronger reaction of T cells than APCs in most assays of P2X7 receptor activation, except for the secretion of IL-1 β , although P2X7 surface expression on the two cell types was comparable.

Both macrophages and dendritic cells (DCs) secreted IL-1 β upon interaction with T cells in the presence of antigen. This antigen-dependent IL-1 β secretion proved to be independent of the P2X7 receptor. In contrast there were differences between macrophages and DCs regarding the antigen-independent IL-1 β secretion induced by incubation with LPS. While the antigen-independent IL-1 β secretion was dependent on P2X7 in macrophages, it was independent of P2X7 in DCs. Differences in the mechanism of IL-1 β secretion point to a different role of the P2X7 receptor on these two types of APCs according to their different roles in the course of an immune response.

Activation of the P2X7 receptor by NAD depends on the presence of an ART. In the context of the immune system, only the ART2 isoforms ART2.1 and ART2.2 have been described so far, and their expression is thought to be restricted to T cells. In this study it was shown for the first time that ART2.1 is also expressed and enzymatically active on different populations of APCs. On macrophages the expression of ART2.1 on macrophages was increased upon stimulation with LPS or interferones.

ADP-ribosylation of the P2X7 receptor on T-cells by ART2.2 leads to full activation of the receptor. In contrast NAD-dependent ADP-ribosylation of the P2X7 receptor on

macrophages by ART2.1 does not activate the receptor by itself, but lowers the threshold for ATP-mediated activation. Finally, in addition to the P2X7 receptor, both chains of the integrins $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1, CD11a/CD18) and the $\alpha_M\beta_2$ (CR3, CD11b/CD18) could be identified as novel target proteins of ART2.1 on macrophages.

7 Literaturverzeichnis

1. Aderem, A., and Underhill, D. M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology* **17**, 593-623
2. Lee, W. L., Harrison, R. E., and Grinstein, S. (2003) Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **5**, 1299-1306
3. Kirwan, S. E., and Burshtyn, D. N. (2007) Regulation of natural killer cell activity. *Current opinion in immunology* **19**, 46-54
4. Fearon, D. T. (1998) The complement system and adaptive immunity. *Seminars in immunology* **10**, 355-361
5. Ramadori, G., and Christ, B. (1999) Cytokines and the hepatic acute-phase response. *Seminars in liver disease* **19**, 141-155
6. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2002) *Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag
7. Cohn, M., Mitchison, N. A., Paul, W. E., Silverstein, A. M., Talmage, D. W., and Weigert, M. (2007) Reflections on the clonal-selection theory. *Nat Rev Immunol* **7**, 823-830
8. Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L. J., and McHeyzer-Williams, M. G. (2007) Local development of effector and memory T helper cells. *Current opinion in immunology* **19**, 259-267
9. Granucci, F., Castagnoli, P. R., Rogge, L., and Sinigaglia, F. (2001) Gene expression profiling in immune cells using microarray. *International archives of allergy and immunology* **126**, 257-266
10. Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252
11. Schwartz, R. H. (1993) T cell anergy. *Scientific American* **269**, 62-63, 66-71
12. Mackay, C. R. (1993) Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Current opinion in immunology* **5**, 423-427
13. Arbones, M. L., Ord, D. C., Ley, K., Ratech, H., Maynard-Curry, C., Otten, G., Capon, D. J., and Tedder, T. F. (1994) Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* **1**, 247-260
14. Campbell, J. J., Bowman, E. P., Murphy, K., Youngman, K. R., Siani, M. A., Thompson, D. A., Wu, L., Zlotnik, A., and Butcher, E. C. (1998) 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7. *The Journal of cell biology* **141**, 1053-1059
15. Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999) CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* **99**, 23-33

16. Friedl, P., den Boer, A. T., and Gunzer, M. (2005) Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **5**, 532-545
17. Ernst, B., Lee, D. S., Chang, J. M., Sprent, J., and Surh, C. D. (1999) The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* **11**, 173-181
18. Link, A., Vogt, T. K., Favre, S., Britschgi, M. R., Acha-Orbea, H., Hinz, B., Cyster, J. G., and Luther, S. A. (2007) Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nature immunology* **8**, 1255-1265
19. Croft, M., and Dubey, C. (1997) Accessory molecule and costimulation requirements for CD4 T cell response. *Critical reviews in immunology* **17**, 89-118
20. Lenschow, D. J., Walunas, T. L., and Bluestone, J. A. (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annual review of immunology* **14**, 233-258
21. Huppa, J. B., and Davis, M. M. (2003) T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **3**, 973-983
22. Schorle, H., Holtschke, T., Hunig, T., Schimpl, A., and Horak, I. (1991) Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* **352**, 621-624
23. Burnstock, G. (1976) Purinergic receptors. *Journal of theoretical biology* **62**, 491-503
24. Abbracchio, M. P., and Burnstock, G. (1994) Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacology & therapeutics* **64**, 445-475
25. Burnstock, G., and Kennedy, C. (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *General pharmacology* **16**, 433-440
26. Burnstock, G. (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* **64**, 1471-1483
27. North, R. A. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews* **82**, 1013-1067
28. Di Virgilio, F., Ferrari, D., Falzoni, S., Chiozzi, P., Munerati, M., Steinberg, T. H., and Baricordi, O. R. (1996) P2 purinoceptors in the immune system. *Ciba Foundation symposium* **198**, 290-302; discussion 302-295
29. Khakh, B. S., and North, R. A. (2006) P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* **442**, 527-532
30. Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D., Falzoni, S., Sanz, J. M., Morelli, A., Torboli, M., Bolognesi, G., and Baricordi, O. R. (2001) Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* **97**, 587-600
31. Guo, C., Masin, M., Qureshi, O. S., and Murrell-Lagnado, R. D. (2007) Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Molecular pharmacology* **72**, 1447-1456
32. 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

33. Adriouch, S., Dox, C., Welge, V., Seman, M., Koch-Nolte, F., and Haag, F. (2002) Cutting edge: a natural P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor. *J Immunol* **169**, 4108-4112
34. Pelegrin, P., and Surprenant, A. (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *The EMBO journal* **25**, 5071-5082
35. Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Falzoni, S., Ferrari, D., Sanz, J. M., Venketaraman, V., and Baricordi, O. R. (1998) Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell death and differentiation* **5**, 191-199
36. Seman, M., Adriouch, S., Scheuplein, F., Krebs, C., Freese, D., Glowacki, G., Deterre, P., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2003) NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* **19**, 571-582
37. Adriouch, S., Bannas, P., Schwarz, N., Fliegert, R., Guse, A. H., Seman, M., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2008) ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. *Faseb J* **22**, 861-869
38. Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R. M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., and Di Virgilio, F. (2006) The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* **176**, 3877-3883
39. Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell* **10**, 417-426
40. Martinon, F., and Tschopp, J. (2007) Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell death and differentiation* **14**, 10-22
41. Hogquist, K. A., Nett, M. A., Unanue, E. R., and Chaplin, D. D. (1991) Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 8485-8489
42. Singer, II, Scott, S., Chin, J., Bayne, E. K., Limjuco, G., Weidner, J., Miller, D. K., Chapman, K., and Kostura, M. J. (1995) The interleukin-1 beta-converting enzyme (ICE) is localized on the external cell surface membranes and in the cytoplasmic ground substance of human monocytes by immuno-electron microscopy. *The Journal of experimental medicine* **182**, 1447-1459
43. Andrei, C., Margiocco, P., Poggi, A., Lotti, L. V., Torrisi, M. R., and Rubartelli, A. (2004) Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9745-9750
44. MacKenzie, A., Wilson, H. L., Kiss-Toth, E., Dower, S. K., North, R. A., and Surprenant, A. (2001) Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* **15**, 825-835
45. Brough, D., and Rothwell, N. J. (2007) Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. *Journal of cell science* **120**, 772-781
46. Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G., and Dubyak, G. R. (2007) Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome

- activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol* **179**, 1913-1925
47. Hwang, I., Shen, X., and Sprent, J. (2003) Direct stimulation of naive T cells by membrane vesicles from antigen-presenting cells: distinct roles for CD54 and B7 molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 6670-6675
 48. They, C., Duban, L., Segura, E., Veron, P., Lantz, O., and Amigorena, S. (2002) Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nature immunology* **3**, 1156-1162
 49. Hassa, P. O., Haenni, S. S., Elser, M., and Hottiger, M. O. (2006) Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 789-829
 50. Koch-Nolte, F., and Haag, F. (1997) Mono(ADP-ribosyl)transferases and related enzymes in animal tissues. Emerging gene families. *Advances in experimental medicine and biology* **419**, 1-13
 51. Haag, F., Koch-Nolte, F., Gerber, A., Schroder, J., and Thiele, H. G. (1997) Rat T cell differentiation alloantigens RT6.1 and RT6.2 are NAD(+)-metabolizing ecto-enzymes that differ in their enzymatic activities. *Transplantation proceedings* **29**, 1699-1700
 52. Aktories, K., and Barbieri, J. T. (2005) Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nature reviews* **3**, 397-410
 53. Corda, D., and Di Girolamo, M. (2003) Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *The EMBO journal* **22**, 1953-1958
 54. Zolkiewska, A., Nightingale, M. S., and Moss, J. (1992) Molecular characterization of NAD:arginine ADP-ribosyltransferase from rabbit skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 11352-11356
 55. 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
 56. 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
 57. Nemoto, E., Yu, Y., and Dennert, G. (1996) Cell surface ADP-ribosyltransferase regulates lymphocyte function-associated molecule-1 (LFA-1) function in T cells. *J Immunol* **157**, 3341-3349
 58. Okamoto, S., Azhipa, O., Yu, Y., Russo, E., and Dennert, G. (1998) Expression of ADP-ribosyltransferase on normal T lymphocytes and effects of nicotinamide adenine dinucleotide on their function. *J Immunol* **160**, 4190-4198
 59. Koch-Nolte, F., Petersen, D., Balasubramanian, S., Haag, F., Kahlke, D., Willer, T., Kastelein, R., Bazan, F., and Thiele, H. G. (1996) Mouse T cell membrane proteins Rt6-1 and Rt6-2 are arginine/protein mono(ADPribosyl)transferases

- and share secondary structure motifs with ADP-ribosylating bacterial toxins. *The Journal of biological chemistry* **271**, 7686-7693
60. 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. *Journal of molecular biology* **243**, 537-546
61. Kanaitsuka, T., Bortell, R., Stevens, L. A., Moss, J., Sardinha, D., Rajan, T. V., Zipris, D., Mordes, J. P., Greiner, D. L., and Rossini, A. A. (1997) Expression in BALB/c and C57BL/6 mice of Rt6-1 and Rt6-2 ADP-ribosyltransferases that differ in enzymatic activity: C57BL/6 Rt6-1 is a natural transferase knockout. *J Immunol* **159**, 2741-2749
62. Koch-Nolte, F., Klein, J., Hollmann, C., Kuhl, M., Haag, F., Gaskins, H. R., Leiter, E., and Thiele, H. G. (1995) Defects in the structure and expression of the genes for the T cell marker Rt6 in NZW and (NZB x NZW)F1 mice. *International immunology* **7**, 883-890
63. Matthes, M., Hollmann, C., Bertuleit, H., Kuhl, M., Thiele, H. G., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (1997) "Natural" RT6-1 and RT6-2 "knock-out" mice. *Advances in experimental medicine and biology* **419**, 271-274
64. 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* **163**, 6014-6022
65. Hara, N., Badruzzaman, M., Sugae, T., Shimoyama, M., and Tsuchiya, M. (1999) Mouse Rt6.1 is a thiol-dependent arginine-specific ADP-ribosyltransferase. *European journal of biochemistry / FEBS* **259**, 289-294
66. Hara, N., Terashima, M., Shimoyama, M., and Tsuchiya, M. (2000) Mouse T-cell antigen rt6.1 has thiol-dependent NAD glycohydrolase activity. *Journal of biochemistry* **128**, 601-607
67. Kahl, S., Nissen, M., Girisch, R., Duffy, T., Leiter, E. H., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2000) Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation. *J Immunol* **165**, 4463-4469
68. Hong, S., Brass, A., Seman, M., Haag, F., Koch-Nolte, F., and Dubyak, G. R. (2007) Lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IFN-beta induce expression of the thiol-sensitive ART2.1 Ecto-ADP-ribosyltransferase in murine macrophages. *J Immunol* **179**, 6215-6227
69. Stryer, L., Tymoczko, J. L., Berg, J. M. (2003) *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag
70. Warburg, O., Christian, W. and Griese, A. (1935) Wasserstoffübertragendes Co-Ferment, seine Zusammensetzung und Wirkungsweise. *Biochemische Zeitung* **282**, 157-165
71. Lee, H. C. (1997) Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiological reviews* **77**, 1133-1164

72. D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., and Poirier, G. G. (1999) Poly(ADP-ribose)ylation reactions in the regulation of nuclear functions. *The Biochemical journal* **342** (Pt 2), 249-268
73. Berthelie, V., Tixier, J. M., Muller-Steffner, H., Schuber, F., and Deterre, P. (1998) Human CD38 is an authentic NAD(P)⁺ glycohydrolase. *The Biochemical journal* **330** (Pt 3), 1383-1390
74. Robson, S. C., Sevigny, J., and Zimmermann, H. (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic signalling* **2**, 409-430
75. Stefan, C., Jansen, S., and Bollen, M. (2005) NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends in biochemical sciences* **30**, 542-550
76. Haag, F., Adriouch, S., Brass, A., Jung, C., Moller, S., Scheuplein, F., Bannas, P., Seman, M., and Koch-Nolte, F. (2007) Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. *Purinergic signalling* **3**, 71-81
77. Bruzzone, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L., and De Flora, A. (2001) Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *Faseb J* **15**, 10-12
78. Schwiebert, E. M., and Zsembery, A. (2003) Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochimica et biophysica acta* **1615**, 7-32
79. la Sala, A., Ferrari, D., Di Virgilio, F., Idzko, M., Norgauer, J., and Girolomoni, G. (2003) Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *Journal of leukocyte biology* **73**, 339-343
80. Wilkin, F., Stordeur, P., Goldman, M., Boeynaems, J. M., and Robaye, B. (2002) Extracellular adenine nucleotides modulate cytokine production by human monocyte-derived dendritic cells: dual effect on IL-12 and stimulation of IL-10. *European journal of immunology* **32**, 2409-2417
81. Adriouch, S., Hubert, S., Pechberty, S., Koch-Nolte, F., Haag, F., and Seman, M. (2007) NAD⁺ released during inflammation participates in T cell homeostasis by inducing ART2-mediated death of naive T cells in vivo. *J Immunol* **179**, 186-194
82. Moller, S., Jung, C., Adriouch, S., Dubberke, G., Seyfried, F., Seman, M., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2007) Monitoring the expression of purinoceptors and nucleotide-metabolizing ecto-enzymes with antibodies directed against proteins in native conformation. *Purinergic signalling* **3**, 359-366
83. Kim, K. J., Kanellopoulos-Langevin, C., Merwin, R. M., Sachs, D. H., and Asofsky, R. (1979) Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties. *J Immunol* **122**, 549-554
84. Haskins, K., Kubo, R., White, J., Pigeon, M., Kappler, J., and Marrack, P. (1983) The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. *The Journal of experimental medicine* **157**, 1149-1169
85. Svensson, M., Stockinger, B., and Wick, M. J. (1997) Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J Immunol* **158**, 4229-4236

86. Murphy, K. M., Heimberger, A. B., and Loh, D. Y. (1990) Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR $\alpha\beta$ thymocytes in vivo. *Science (New York, N.Y)* **250**, 1720-1723
87. Barnden, M. J., Allison, J., Heath, W. R., and Carbone, F. R. (1998) Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunology and cell biology* **76**, 34-40
88. Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D. G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B. H., Griffiths, R. J., and Gabel, C. A. (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *The Journal of biological chemistry* **276**, 125-132
89. Ohlrogge, W., Haag, F., Lohler, J., Seman, M., Littman, D. R., Killeen, N., and Koch-Nolte, F. (2002) Generation and characterization of ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.1/ART2.2-deficient mice. *Molecular and cellular biology* **22**, 7535-7542
90. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y)* **239**, 487-491
91. Volonte, C., Amadio, S., D'Ambrosi, N., Colpi, M., and Burnstock, G. (2006) P2 receptor web: complexity and fine-tuning. *Pharmacology & therapeutics* **112**, 264-280
92. Sagerstrom, C. G., Kerr, E. M., Allison, J. P., and Davis, M. M. (1993) Activation and differentiation requirements of primary T cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 8987-8991
93. Gargett, C. E., and Wiley, J. S. (1997) The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes. *British journal of pharmacology* **120**, 1483-1490
94. Murgia, M., Hanau, S., Pizzo, P., Rippa, M., and Di Virgilio, F. (1993) Oxidized ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor. *The Journal of biological chemistry* **268**, 8199-8203
95. Beigi, R. D., Kertesy, S. B., Aquilina, G., and Dubyak, G. R. (2003) Oxidized ATP (oATP) attenuates proinflammatory signaling via P2 receptor-independent mechanisms. *British journal of pharmacology* **140**, 507-519
96. Denlinger, L. C., Angelini, G., Schell, K., Green, D. N., Guadarrama, A. G., Prabhu, U., Coursin, D. B., Bertics, P. J., and Hogan, K. (2005) Detection of human P2X7 nucleotide receptor polymorphisms by a novel monocyte pore assay predictive of alterations in lipopolysaccharide-induced cytokine production. *J Immunol* **174**, 4424-4431
97. Humphreys, B. D., and Dubyak, G. R. (1996) Induction of the P2z/P2X7 nucleotide receptor and associated phospholipase D activity by lipopolysaccharide and IFN-gamma in the human THP-1 monocytic cell line. *J Immunol* **157**, 5627-5637
98. Coutinho-Silva, R., Stahl, L., Raymond, M. N., Jungas, T., Verbeke, P., Burnstock, G., Darville, T., and Ojcius, D. M. (2003) Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation. *Immunity* **19**, 403-412

99. Lammas, D. A., Stober, C., Harvey, C. J., Kendrick, N., Panchalingam, S., and Kumararatne, D. S. (1997) ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors. *Immunity* **7**, 433-444
100. Mutini, C., Falzoni, S., Ferrari, D., Chiozzi, P., Morelli, A., Baricordi, O. R., Collo, G., Ricciardi-Castagnoli, P., and Di Virgilio, F. (1999) Mouse dendritic cells express the P2X7 purinergic receptor: characterization and possible participation in antigen presentation. *J Immunol* **163**, 1958-1965
101. Communi, D., Dewaste, V., and Erneux, C. (1999) Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C-mediated phosphorylation and activation of D-myo-inositol 1,4, 5-trisphosphate 3-kinase B in astrocytes. *The Journal of biological chemistry* **274**, 14734-14742
102. Mariathasan, S., and Monack, D. M. (2007) Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **7**, 31-40
103. Perregaux, D., and Gabel, C. A. (1994) Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *The Journal of biological chemistry* **269**, 15195-15203
104. Verhoef, P. A., Kertesz, S. B., Estacion, M., Schilling, W. P., and Dubyak, G. R. (2004) Maitotoxin induces biphasic interleukin-1beta secretion and membrane blebbing in murine macrophages. *Molecular pharmacology* **66**, 909-920
105. Waley, I., Klein, J., Husmann, M., Valeva, A., Strauch, S., Wirtz, H., Weichel, O., and Bhakdi, S. (2000) Potassium regulates IL-1 beta processing via calcium-independent phospholipase A2. *J Immunol* **164**, 5120-5124
106. Mariathasan, S. (2007) ASC, Ipaf and Cryopyrin/Nalp3: bona fide intracellular adaptors of the caspase-1 inflammasome. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **9**, 664-671
107. Martinon, F., and Tschopp, J. (2005) NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends in immunology* **26**, 447-454
108. Akira, S., and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 499-511
109. Gmunder, H., Eck, H. P., Benninghoff, B., Roth, S., and Droge, W. (1990) Macrophages regulate intracellular glutathione levels of lymphocytes. Evidence for an immunoregulatory role of cysteine. *Cellular immunology* **129**, 32-46
110. Moriarty-Craige, S. E., and Jones, D. P. (2004) Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annual review of nutrition* **24**, 481-509
111. Hogg, P. J. (2003) Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends in biochemical sciences* **28**, 210-214
112. Griffin, F. M., Jr., and Mullinax, P. J. (1985) In vivo activation of macrophage C3 receptors for phagocytosis. *The Journal of experimental medicine* **162**, 352-357