

# **Untersuchungen zur Rolle der Ionenkanal-Genexpression während der Aktivierung humaner T-Zellen**

## **Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades  
– Dr. rer. nat. –  
des Departments Biologie der Fakultät für  
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Christoph Ogradowczyk**

Hamburg 2009

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaftler  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. O. PONGS  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. M. BÖTTGER  
Tag der Disputation: 19. Dezember 2008

Hamburg, den 05. Dezember 2008



*J. Ganzhorn*

Professor Dr. J. Ganzhorn  
Leiter des Departments Biologie

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Das Immunsystem .....	1
1.1.1. T-Lymphozyten .....	2
1.1.2. T-Lymphozyten und die Generation einer adaptiven Immunantwort .....	3
1.1.3. Die Rolle von Calcium in Zellen des Immunsystems .....	3
1.1.3.1. Die Calcium-Homöostase in Lymphozyten .....	4
1.1.3.2. Die Rolle weiterer Ionenkanäle .....	4
1.1.4. Die immunologische Synapse .....	5
1.1.4.1. Funktionen des Cytoskeletts bei der Ausbildung der immunologischen Synapse .....	6
1.1.4.2. Bindungen zwischen Molekülen innerhalb der immunologischen Synapse .....	7
1.2. Zielsetzung .....	8
<b>2. Material .....</b>	<b>9</b>
2.1. Lösungen und Puffer .....	9
2.2. Bakterienstämme und Zelllinien .....	11
2.3. Verwendete Klone .....	12
2.4. Nährmedien .....	12
2.5. Zellkulturmedien und -lösungen .....	13
2.6. Molekulargewichtsstandards .....	13
2.7. Antikörper .....	14
<b>3. Methoden .....</b>	<b>16</b>
3.1. Zellbiologische Methoden .....	16
3.1.1. PBMC-Aufarbeitung .....	16
3.1.2. Separation von CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten .....	16
3.1.3. Zellaktivierungsprotokolle .....	17
3.1.3.1. Microarrays .....	17
3.1.3.2. Quantitative PCR .....	17
3.1.3.3. Expressionskinetik .....	18

---

3.1.3.4.	Western Blot.....	18
3.1.3.5.	Biotinylierung.....	18
3.1.3.6.	Immuncytochemie P2RX5 bzw. Co-Lokalisation .....	19
3.1.3.7.	Zellaktivierungsprotokoll mit siRNA-Behandlung für qPCR, Western Blot und Immuncytochemie.....	19
3.1.4.	Zellkultur.....	20
3.1.4.1.	Kultivierung von HEK293-Zellen.....	20
3.1.4.2.	Transfektion von HEK293-Zellen.....	20
3.1.4.3.	Ernte und Lyse von transfizierten HEK293-Zellen.....	20
3.2.	Molekularbiologische Methoden.....	21
3.2.1.	Transformation kompetenter Zellen.....	21
3.2.2.	Plasmid-Präparation aus 2 ml bzw. 50 ml Bakterienkulturen.....	21
3.2.3.	Restriktionsverdau von DNA .....	21
3.2.4.	DNA-Agarosegelelektrophorese .....	22
3.2.5.	PCR .....	22
3.2.6.	Klonierung der PCR-Amplifikate .....	23
3.2.7.	RNA-Isolation .....	23
3.2.8.	Bioanalyzer Messung .....	24
3.2.9.	<i>In vitro</i> RNA-Synthese.....	24
3.2.10.	Eigene Microarrays auf Glas.....	24
3.2.10.1.	Herstellung der Arrays .....	24
3.2.10.1.1.	Vorbereitung der Glas-Objektträger.....	24
3.2.10.1.2.	Spotting .....	24
3.2.10.1.3.	Blockieren der Glasträger mit Bernsteinsäureanhydrid .....	25
3.2.10.1.4.	SYBR Green II-Färbung .....	25
3.2.10.2.	Sondenpräparation.....	26
3.2.10.2.1.	Markierung, Aufreinigung und Präzipitation von cDNA.....	26
3.2.10.2.2.	Vorbereitung der Farbstoffe .....	26
3.2.10.2.3.	Kopplung der Farbstoffe .....	26
3.2.10.2.4.	Bestimmung der Konzentration der inkorporierten Farbstoffe .....	27
3.2.10.3.	Hybridisierung.....	27
3.2.10.3.1.	Herstellung der Hybridisierungslösung.....	28
3.2.10.3.2.	Prehybridisierung .....	28
3.2.10.3.3.	Hybridisierung.....	28

---

3.2.10.3.4.	Waschen des hybridisierten Arrays.....	29
3.2.10.4.	Auswertung der Microarray-Hybridisierungen.....	29
3.2.10.4.1.	Scannen .....	29
3.2.10.4.2.	Auswertung der Arraybilder.....	29
3.2.11.	Affymetrix-Analyse .....	30
3.2.12.	Quantitative PCR.....	30
3.2.12.1.	Reverse Transkription .....	30
3.2.12.2.	Taqman-PCR.....	31
3.2.12.3.	Design <i>ae I</i> -Assay .....	31
3.3.	Proteinbiochemische Methoden .....	32
3.3.1.	Proteinisolation.....	32
3.3.2.	BCA-Test .....	32
3.3.3.	SDS-PAGE.....	33
3.3.4.	Western Blot.....	33
3.3.5.	Immunologischer Nachweis an Nitrozellulose gebundener Proteine .....	33
3.3.6.	Antikörpernachweis durch Chemilumineszenz.....	34
3.3.7.	Biotinylierung.....	34
3.3.8.	Immuncytochemie .....	35
3.3.8.1.	Immuncytochemische Färbungen an (nicht-) aktivierten Zellen .....	35
3.3.8.2.	Co-Färbung mit anti-Talin und anti-P2RX5-Antikörper .....	35
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
4.1.	Array-Analysen .....	37
4.1.1.	cDNA-Gewinnung .....	37
4.1.2.	Herstellung der Arrays auf Glas.....	39
4.1.3.	Analyse der Array-Daten .....	41
4.2.	Affymetrix-Arrays.....	44
4.3.	Quantitative PCR.....	50
4.4.	Expressionskinetik .....	57
4.5.	Protein-Expression .....	59
4.6.	Lokalisation von P2RX5 .....	61
4.6.1.	Generelle Lokalisation von P2RX5 in der Zelle .....	61
4.6.2.	Verteilung von P2RX5 in (nicht-) aktivierten T-Lymphozyten.....	62
4.6.3.	P2RX5 ist in der immunologischen Synapse lokalisiert .....	64

4.7. Untersuchung der Funktion von P2RX5 in aktivierten T-Zellen mit Hilfe von siRNA.....	66
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>74</b>
5.1. P2RX5 in T-Lymphozyten .....	74
5.2. Ionenkanäle und ihre Funktion in der Aktivierung von humanen T-Lymphozyten .	80
5.3. Ausblick .....	84
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>85</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>86</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>92</b>
8.1. Abkürzungsverzeichnis .....	92
8.2. Oligonukleotide.....	98
8.2.1. Micro-Arrays.....	98
8.2.2. PCR .....	107
8.3. Klonkarten.....	108
8.4. Kongressbeiträge.....	110

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem eines Menschen bezeichnet ein komplexes, fein aufeinander abgestimmtes Netzwerk bestehend aus verschiedenen Organen, Zelltypen sowie Molekülen. Seine Hauptfunktion besteht in der Abwehr körperfremder Lebewesen, Zellen oder auch Moleküle. Aber auch gegen körpereigene, entartete oder gealterte Zellen kann es aktiv werden. Dieses Vorgehen des Immunsystems gegen Eindringlinge wird allgemein als Immunabwehr bezeichnet, welche sehr unterschiedlich ausfallen kann. So kann zwischen zwei Grundarten von Abwehr unterschieden werden: die angeborene und die adaptive Abwehr.

Die angeborene Abwehr funktioniert sehr effektiv. Sie wird auch unspezifische Abwehr genannt, was bedeutet, dass sie generell gegen jeden körperfremden Eindringling vorgeht. Dies beginnt schon mit dem Eindringen eines fremden Organismus, zumeist Bakterien, Viren oder auch Pilze. Die erste Stufe der sogenannten angeborenen Abwehr befindet sich in den Epithelzellen, der äußeren Schicht der Haut. Der hier vorherrschende niedrige pH-Wert macht ein weiteres Eindringen fast unmöglich. Ist diese Schicht verletzt, sind Mikroorganismen in der Lage, in das Körperinnere vorzudringen. Hier können bestimmte Merkmale an ihrer Oberfläche von „toll-ähnlichen Rezeptoren“ (TLR) erkannt werden und veranlassen spezifische Zellen der angeborenen Immunantwort wie natürliche Killerzellen oder Makrophagen, zur Eliminierung der fremden Organismen. Auf diese Art und Weise können bis zu 90% aller Eindringlinge bekämpft werden.

Konnte ein Mikroorganismus mit Hilfe der angeborenen Abwehr nicht bekämpft werden, so wird die zweite Form der Defensive aktiv: die adaptive Abwehr.

Sie ist nur bei höheren Lebensformen ausgebildet und in der Lage, extrem spezifisch einen Krankheitserreger zu bekämpfen. Die wichtigsten Zelltypen dieser Art der Abwehr beinhalten T- sowie B-Lymphozyten, aber auch dendritische Zellen und Makrophagen.

### 1.1.1. T-Lymphozyten

Die Gruppe der T-Lymphozyten stellt einen wichtigen Vertreter für Immunzellen dar. Nach ihrer Bildung im Knochenmark wandern sie zur weiteren Reifung in den Thymus, dem primären lymphatischen Organ. Jede T-Lymphozyte trägt ein ganz spezifisches Repertoire an Oberflächenmarkern, welches die Erkennung bestimmter Antigene ermöglicht. Durch ein sehr genaues Kontrollsystem werden im Thymus Zellen daraufhin überprüft, ob sie in der Lage sind, MHC (*Major Histocompatibility Complex*)-Komplexe mit Antigenen zu binden (Positiv-Selektion). „Erfolgreiche“ Zellen werden im nächsten Vorgang, der negativen Selektion, die einen entscheidenden Mechanismus zur immunologischen Toleranz darstellt, auf ihre Autoreaktivität überprüft. Zellen, die eines der Selektionssysteme nicht bestehen, werden durch Apoptose abgebaut. Übersteht eine Zelle beide Arten der Selektion, so wird sie als naive T-Zelle aus dem Thymus entlassen. Die Phasen einer T-Zelle können über die Oberflächenmarker CD4 und CD8 detektiert werden. Zunächst zeigen T-Zellen keinen der beiden Marker (doppelt negative Zellen), nach Eintritt in den Thymus werden beide Marker an der Oberfläche exprimiert (doppelt positive Zellen). Während der Positiv-Selektion entscheidet sich letztendlich die Subpopulations-Zugehörigkeit. Zellen, die MHC-Klasse II-Komplexe binden, werden zu CD4<sup>+</sup>-Zellen, während Zellen, die MHC-Klasse I-Komplexe binden, zu CD8<sup>+</sup>-Zellen werden. CD8<sup>+</sup>-Zellen werden auch cytotoxische T-Zellen genannt, da sie erkannte virenbefallene oder Tumor-Zellen direkt zerstören. CD4<sup>+</sup>-Zellen stellen die große Gruppe der T-Helferzellen dar, die in vielen Aspekten der adaptiven Immunantwort involviert ist. Werden sie aktiviert, so gehen sie schnell in einen proliferativen Zustand über, produzieren und sekretieren Cytokine, welche Regulationsproteine für die Immunantwort darstellen. Abhängig vom jeweiligen Cytokin differenzieren T-Helfer-Zellen weiter in verschiedene T-Helferzellgruppen, wie Th1, Th2, Th3, Th17, ThF, und sorgen für die Produktion weiterer spezifischer Cytokine. Neben diesen eher aktiveren Zellen, können sowohl CD4<sup>+</sup>-, als auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellsubpopulationen Memory-Zellen ausbilden. Diese zeichnen sich durch eine spezifische Antigen-Erkennung aus und stellen eine schnelle effektive Immunantwort für bereits bekannte Antigene sicher. Eine weitere Gruppe der CD4<sup>+</sup>-Zellen stellen die regulatorischen T-Zellen dar, welche für die immunologische Toleranz sehr wichtig sind. Sie übernehmen wichtige Rollen der Überwachung. So können sie z. B. Zellen supprimieren, welche die Negativ-Selektion im Thymus irrtümlich bestanden haben (Murphy *et al.*, 2008).



### **1.1.2. T-Lymphozyten und die Generation einer adaptiven Immunantwort**

Die adaptive Immunantwort beruht auf zwei generellen Schritten: (i) Nach Erkennung eines fremden Moleküls bzw. Organismus beginnt zunächst die Antigen-Prozessierung. Diese schließt mit der Bindung eines Peptids – dem Antigen – an ein MHC-Molekül ab. MHC sind Oberflächen-Glycoproteine mit einer Peptid-Bindetasche und werden in zwei Klassen (I und II) unterteilt. (ii) Anschließend kommt es zum zweiten Schritt, der Antigen-Präsentation. Hierbei wird der Antigen-MHC-Komplex an die Oberfläche von Antigen-Präsentierenden-Zellen (APZ) gebracht, so dass sie von T-Zellen erkannt werden können. Damit das Immunsystem spezifisch gegen das Pathogen vorgehen kann, werden die Peptide je nach Herkunft an ein MHC-Klasse I- oder Klasse II-Molekül gebunden. Antigen-MHC-Klasse I-Komplexe werden, wie beschrieben (s. 1.1.1.), nur von  $CD8^+$ -T-Zellen erkannt und aktivieren durch sie eine cytotoxische Immunantwort, bei der die befallene Zelle lysiert wird. Antigen-MHC-Klasse II-Komplexe binden hingegen an  $CD4^+$ -T-Zellen, die dann weitere Zellen des Immunsystems aktivieren können, wie z. B. B-Lymphozyten, welche die spezifische Antikörper Produktion starten (Murphy *et al.*, 2008).

Die Bindung dieser beiden Moleküle initiiert den Start zur T-Zell-Aktivierung. Für eine effektive Aktivierung sind aber weitere Schritte von Bedeutung. Außerdem muss diese Bindung über mehrere Stunden bestehen bleiben, um zu einer Immunantwort zu führen (Iezzi *et al.*, 1998). Für eine komplette Aktivierung der T-Zelle reicht diese Bindung aber nicht aus. Der benötigte Co-Stimulus, z. B. die Bindung von CD28 (T-Zelle) und B7.1 (APZ) ist für die weitere Aktivierung essentiell (Ward, 1996).

### **1.1.3. Die Rolle von Calcium in Zellen des Immunsystems**

In allen Zelltypen spielt Calcium als sekundärer Botenstoff eine entscheidende Rolle (Lewis, 2001). So ist Calcium auch in Zellen des Immunsystems sehr wichtig für verschiedene zelluläre Funktionen, wie Differenzierung, Effektor-Funktionen und Gen-Transkription. Hierbei werden kurzzeitige Funktionen, wie z. B. die Lymphozyten-Beweglichkeit, von langfristigen Funktionen unterschieden. Für die Aktivierung von T-Zellen ist ein langfristig hoher Calcium-Spiegel nötig. Nur so können Transkriptionsfaktoren aktiviert, Effektor-Funktionen, wie die Bildung von Cyto- und Chemokinen, ausgebildet und die Differenzierung von naiven Lymphozyten in verschiedene Effektor- und Gedächtniszellen vorangetrieben werden (Hogan *et al.*, 2003).

### 1.1.3.1. Die Calcium-Homöostase in Lymphozyten

Nach Kontakt zwischen APZ und T-Zelle wird unter anderem die Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) aktiviert, die in der Plasmamembran lokalisiertes Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PIP $_2$ ) in Diacylglycerol (DAG) und den sekundären Botenstoff Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$ ) spaltet. Das freigesetzte IP $_3$  bindet an IP $_3$ -Rezeptoren in der Membran des endoplasmatischen Reticulums (ER) und aktiviert diese zur Öffnung. So wird Calcium aus den intrazellulären Speichern ins Cytoplasma entlassen. Die Senkung der Calcium-Konzentration im ER führt zur Aktivierung von STIM1 (*stromal interaction molecule 1*), einem Calcium-Sensor in der ER Membran (Roos *et al.*, 2005; Liou *et al.*, 2005). Dieser aktiviert CRAC-Kanäle (*calcium-release-activated calcium channel*) in der Plasmamembran. Die molekulare Beschaffenheit dieser Kanäle war lange Zeit nicht geklärt. Mittlerweile wurde aber gezeigt, dass das Protein Orail durch Tetramerisierung den funktionellen Kanal bildet (Feske *et al.*, 2006; Vig *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Penna *et al.*, 2008). Durch die Aktivierung der CRAC-Kanäle kommt es zu langfristigen Calcium-Einströmen und zu deutlichen Erhöhungen der intrazellulären Calcium-Konzentration (Peinelt *et al.*, 2006). Dies aktiviert wiederum verschiedene Calcium-abhängige Signalproteine, sowie deren Zieltranskriptionsfaktoren, wie z. B. Calcineurin und dessen Ziel nukleärer Faktor von aktivierten T-Zellen (NFAT) oder die Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase (CaMK) und CREB-Protein (*cyclic-AMP-responsive-element-binding protein*) (Macian, 2005). Die aktivierten Transkriptionsfaktoren wiederum wandern in den Nukleus und starten die Expression verschiedener für die T-Zell-Aktivierung wichtiger Gene, wie z. B. Interleukine.

### 1.1.3.2. Die Rolle weiterer Ionenkanäle

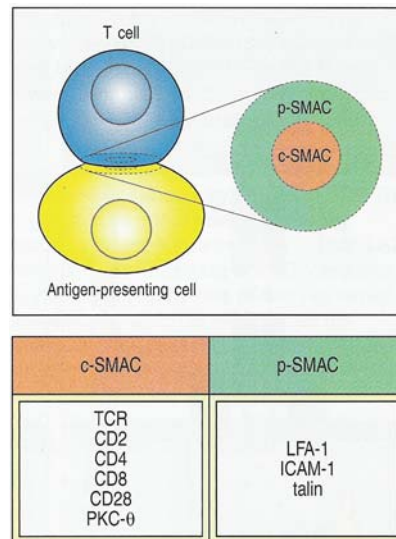
Das Ruhemembranpotential von Lymphozyten liegt bei ca. 55 – 60 mV und wird generell durch die Aktivität von Kaliumkanälen reguliert (Lewis *et al.*, 1995). Das Membranpotential hat entscheidenden Einfluss auf den stattfindenden Ca $^{2+}$ -Einstrom, von dem die Lymphozyten-Aktivierung abhängt. Hierbei kommt es letztendlich durch Leerung der intrazellulären Ca $^{2+}$ -Speicher zu einer signifikanten Erhöhung der intrazellulären Ca $^{2+}$ -Konzentration (von ca. 100 nM auf 1  $\mu$ M). Diese aktiviert wiederum Ca $^{2+}$ -abhängige Kaliumkanäle, welche das Membranpotential auf bis zu -80 mV hyperpolarisieren können. In Jurkat-Zellen ist dies SkCa1 (oder KCNN2) und in Lymphozyten IkCa1 (oder KCNN4) (Grissmer *et al.*, 1993). Neben einigen ATP-abhängigen Pumpen, welche intrazelluläres Ca $^{2+}$

nach außen (PMCA; Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) oder ins ER (SERCA; Sarco/Endoplasmatisches Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) zurückpumpen, sind auch Chlorid-Kanäle, die das Anschwellen der T-Zelle bei der Aktivierung kontrollieren, von Bedeutung (Cahalan *et al.*, 2001).

#### **1.1.4. Die immunologische Synapse**

Um alle für den Aktivierungsvorgang benötigten Moleküle an die Interaktionsstelle von APZ und T-Zelle zu bringen, ist eine Reorganisation vieler Zellmoleküle unerlässlich. Diese Reorganisation führt zur Ausbildung der sogenannten immunologischen Synapse (Tooley *et al.*, 2004). Diese formt sich an der Stelle des Kontakts zwischen APZ und T-Zelle. Hierbei sind drei Einzelprozesse zu unterscheiden: Bildung, Aufrechterhaltung und Abbau. Während die Ausbildung der immunologischen Synapse gut untersucht ist, ist bisher wenig über Aufrechterhaltung und Abbau der immunologischen Synapse bekannt.

Bei der Bildung der immunologischen Synapse kommt es zu einer Konzentration von Membranproteinen, wie T-Zell-Rezeptor-Untereinheiten, Co-Rezeptoren und cytoskelettorganisierenden Proteinen, wie Talin, oder Integrinen wie LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen-1*; oder CD11a). Man unterscheidet bei der Synapse eine innere Zone, die den zentralen supramolekularen Aktivierungskomplex (c-SMAC) darstellt, und eine äußere Zone, dem peripheren supramolekularen Aktivierungskomplex (p-SMAC; Lin *et al.*, 2005). Während im c-SMAC T-Zell-Rezeptoren, assoziierte Co-Rezeptoren sowie Signal-Proteine zu finden sind, ist die p-SMAC durch Cytoskelett-Proteine, wie Talin, Integrine (LFA-1) oder andere Zell-Adhäsionsproteine, wie ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*), gekennzeichnet (Abb. 1-1).



(aus Murphy *et al.*, 2008)

### Abb. 1-1: Struktur der immunologischen Synapse

Im Zentrum des Kontaktbereiches zwischen APZ und T-Zelle finden sich T-Zell-Rezeptor, die Co-Rezeptoren CD4 und CD8, der Co-Stimulations-Rezeptor CD28, das Adhäsions-Molekül CD2, sowie die Signal Protein-Kinase PKC- $\theta$ . Diese Zone wird zentraler supramolekularer Aktivierungs-Komplex (c-SMAC) genannt. Außerhalb dieses Bereichs gibt es eine weitere Zone, in welcher sich das Integrin LFA-1, das Zell-Adhäsionsmolekül ICAM-1 und das Cytoskelett-Protein Talin findet; sie wird peripherer supramolekularer Aktivierungs-Komplex genannt (p-SMAC).

#### 1.1.4.1. Funktionen des Cytoskeletts bei der Ausbildung der immunologischen Synapse

Jede der einzelnen Aktionen nach Erkennung und Interaktion von APZ und T-Zelle, wie integrinvermittelte Adhäsion, Formation der immunologischen Synapse, Ausbildung von Zell-Polarität für gerichtete Cytokin-Sekretion, aber auch Signalverarbeitung, hängt zum großen Teil vom Cytoskelett der Zelle ab (Meiri, 2005). Bereits ca. 30 Sekunden nach der Erkennung des Antigens, setzt in der Zelle eine komplexe Reorganisation von Molekülen ein. Für Adhäsion sorgen Integrine, welche für den Zell-Zell-Kontakt Bindungen zu Cytoskelett-Proteinen oder auch anderen Zell-Adhäsions-Molekülen, wie ICAM-1, bilden können. Diese werden über das Cytoskelett-Protein Talin an das Cytoskelett gekoppelt und damit innerhalb der Zelle umverteilt (Nolz *et al.*, 2007). Weiterhin werden für die Aktivierung wichtige Proteine zur Interaktionsstelle geleitet. Zu diesen Proteinen gehören neben den Rezeptoren selbst auch weitere signalverarbeitende Proteine wie  $\zeta$ -Kette-assoziierte Protein Kinase (ZAP70), Linker für Aktivierung von T-Zellen (LAT) oder Wachstum-Faktor-gebundenes Protein-2 (GRB2). Die Ansammlung dieser Moleküle beginnt bereits 30 Sekunden nach Rezeptor-Bindung (Bunnell *et al.*, 2002). Da die Geschwindigkeit der T-Zell-Rezeptor

Umverteilung deutlich schneller als eine freie Diffusion abläuft (Moss *et al.*, 2002), wurde das Cytoskelett als treibende Kraft für die schnelle und gerichtete Relokalisation entdeckt. Ebenso zeigte völlige Zerstörung von F-Actin oder das Ausschalten von Regulatoren des Cytoskeletts deutliche Beeinträchtigungen in Formation der immunologischen Synapse und Aktivierung von T-Zellen (Campi *et al.*, 2005). Aus den Untersuchungen zeigt sich, dass die Polarisierung des Cytoskeletts einen entscheidenden Faktor für die Bildung der immunologischen Synapse und der folgenden T-Zell-Aktivierung darstellt.

### 1.1.4.2. Bindungen zwischen Molekülen innerhalb der immunologischen Synapse

Soweit bisher bekannt ist, finden für die Aktivierung wichtige Bindungen im c-SMAC-Bereich der immunologischen Synapse statt. Hier kommt es zur Bindung zwischen Antigen-MHC-Komplex und T-Zell-Rezeptor. Zusätzlich tritt eine Co-Bindung zwischen diesem Komplex und dem Subtyp-Marker CD4 ein (Andres *et al.*, 2004). Aufgrund der niedrigen Affinität des T-Zell-Rezeptors zum Antigen-MHC-Komplex, sowie der geringen Anzahl von Rezeptoren und Liganden, bringt die Bindung von LFA-1 und ICAM-1 zusätzliche Stabilität im Zusammenhalt der beiden Zellen an der Kontaktstelle (Grakoui *et al.*, 1999).

Aufbau und Formation der immunologischen Synapse werden sehr intensiv untersucht. Hingegen finden sich in der Literatur wenige Berichte, die sich mit langfristigen Prozessen nach der Ausbildung der immunologischen Synapse auseinander gesetzt haben. Im Jahr 1998 veröffentlichten Iezzi *et al.* ihre Untersuchungen zur nötigen Dauer der Stimuli und der damit verbundenen Aufrechterhaltung der immunologischen Synapse. Sie konnten zeigen, dass der Stimulus mindestens 20 Stunden anhalten muss, um die Zellen in die Produktion und Sekretion von Cytokinen, sowie in die Proliferation zu führen.

Ebenso wenig ist über die zur Stabilität der immunologischen Synapse benötigten Moleküle bekannt. Erst 2008 zeigten Yeh *et al.*, dass Crtam, ein Transmembran-Protein aus der Immunoglobulin-Superfamilie, eine entscheidende Rolle in der Koordination eines Signalkomplexes spielt. Dieser zeigte sich für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität und damit der IS ab sechs Stunden nach Aktivierung für eine erhöhte Cytokin-Produktion verantwortlich. Innerhalb dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die Proteinkinase C $\zeta$  (PKC $\zeta$ ) erst nach acht Stunden in der immunologischen Synapse nachzuweisen ist und somit unter Umständen ein neuer Signalweg aktiv wird. Diese Befunde deuten darauf hin, dass in der T-Zell-Aktivierung neben der Initiation auch Phasen zu späteren Zeitpunkten eine wichtige Rolle spielen.

## 1.2. Zielsetzung

Bei der Aktivierung von Lymphozyten spielt die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine erhebliche Rolle. Sie muss nicht nur kurzzeitig fast das zehnfache betragen, sondern über mehrere Stunden gehalten werden, damit alle weiteren Signalwege, wie Formation der immunologischen Synapse, Cyto- und Chemokin-Produktion/Sekretion, Proliferation und Aktivierung weiterer Immunzellen, gestartet werden können.

Die langandauernde kontrollierte Erhöhung des intrazellulären Calciums kann nur über ein fein abgestimmtes Zusammenspiel verschiedener Ionenkanäle erfolgen, die das für die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration notwendige stabile Membranpotential einstellen. Diese Arbeit setzt an der Fragestellung an, ob nur die bereits beschriebenen Ionenkanalgene bei der Lymphozyten-Aktivierung eine Expressionsänderung zeigen oder ob weitere Ionenkanalgene in diesen Vorgang eingreifen.

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines Array-Systems, mit dessen Hilfe es möglich ist, einen umfassenden Einblick in die Expression von Ionenkanalgenen und deren Veränderung im Laufe der Lymphozyten-Aktivierung zu gewinnen. Die Daten sollten dann validiert und einzelne Zielgene mit Hilfe weiterer Analysetechniken charakterisiert und ihre Aufgabe innerhalb der Lymphozyten-Aktivierung detaillierter betrachtet werden.

## 2. Material

Falls nicht anders angegeben wurden sämtliche Chemikalien von den Firmen Baker, Difco, Fluka, Gibco, Macherey-Nagel, Merck, Riedel-de-Haën, Roth, Serva und Sigma in p.A. oder Reinstqualität bezogen.

Enzyme, Molekulargewichtsstandards, Kits, Oligonukleotide (s. 8.2.) und dNTP wurden von den Firmen Ambion, Amaxa, Dharmacon, AGS, Roche, Clontech, Invitrogen, Miltenyi, MWG Biotech, Operon, New England Biolabs, MBI Fermentas, Pharmacia Biotech, Promega, Qiagen und Stratagene erworben.

Röntgenfilme wurden von Kodak und Amersham verwendet.

### 2.1. Lösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit doppelt destilliertem Wasser (H<sub>2</sub>O bidest.) angesetzt und ggf. autoklaviert bzw. sterilfiltriert (0,22 µm Porenweite).

Betain-Spotting-Puffer	3x	(v/v)	SSC
	1,5	M	Betain
Blockier-Lösung I	5%	(w/v)	Milchpulver in 1x PBS
Blockier-Lösung II	2%	(w/v)	Milchpulver in 1x PBS
Blockier-Lösung III	10%	(v/v)	Ziegenserum
	0,2%	(w/v)	BSA
Carrier-Lösung	3%	(w/v)	BSA in 1x PBS
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,01%	(v/v)	Diethylpyrocarbonat ü. N. gerührt, autoklaviert

ECL-Lösung I	2,5 mM	Luminol
	0,4 mM	p-Kumarsäure
	0,1 M	Tris-HCl, pH 8,5
ECL-Lösung II	0,02% (v/v)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	0,1 M	Tris-HCl, pH 8,5
HEPES-Lyse-Puffer	50 mM	HEPES
	150 mM	NaCl
	0,5% (v/v)	Triton-X 100
	pH 7,4	
Heringssperma-DNA	10 mg/ml	Heringssperma-DNA in TE
Hybridisierungslösung	50 % (v/v)	Formamid
	5x (v/v)	SSC (20x)
	0,1 % (w/v)	SDS
	0,05 % (w/v)	BSA
	sterilfiltriert	
MACS-Puffer	0,5% (w/v)	BSA
	2 mM	EDTA
	in 1x PBS; entgast	
PBS (20x)	3 M	NaCl
	161 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	39 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS-T	0,05% (v/v)	Tween20 in 1x PBS
PBS-Triton	0,2% (v/v)	Triton X 100 in 1x PBS
PolyA	10 mg/ml	PolyA in TE



---

Prehybridisierungspuffer	25 %	(v/v)	Formamid
	5x	(v/v)	SSC (20x)
	0,1 %	(w/v)	SDS
	sterilfiltriert		
SSC (20x)	3	M	NaCl
	300	mM	Natriumcitrat
	autoklaviert, pH 7,0		
TAE (50x)	2	M	Tris-HCl, pH 7,5
	0,5	M	Eisessig
	50	mM	EDTA
TBE (1x)	89	mM	Tris
	89	mM	Borsäure
	2	mM	EDTA
TE (10x)	0,1	M	Tris-HCl, pH 7,5
	10	mM	EDTA
tRNA	10	mg/ml	tRNA in TE

## 2.2. Bakterienstämme und Zelllinien

<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	superkompetente Zellen (Invitrogen)
HEK293-Zellen	<i>Human embryonic Kidney293</i> -Zellen DSMZ ACC305

### 2.3. Verwendete Klone

Die entsprechenden Klonkarten finden sich im Anhang (s. 8.3.).

ae I-Plasmid	Gen-Frg. aus <i>Zea mays</i> in pGEM T-easy erhalten von S. Scholten, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg
DD1B-Plasmid	Gen-Frg. aus <i>Zea mays</i> in pGEM T-easy erhalten von S. Scholten, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg
CE11-Plasmid	Gen-Frg. aus <i>Zea mays</i> in pGEM T-easy erhalten von S. Scholten, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg
P2RX5-Plasmid	<i>P2RX5</i> -Gen (verkürzte Variante, human) RZPD IRATp970E0258D
eGFP-Plasmid	eGFP im pcDNA3-Plasmid

### 2.4. Nährmedien

LB-Medium	10	g/l	Bacto-Trypton, pH 7,4
	10	g/l	NaCl
	5	g/l	Hefeextrakt
LB-Platten	15	g/l	Agar in LB-Medium
LB-Amp-Platten	15	g/l	Agar in LB-Medium
	100	µg/ml	Ampicillin

---

LB-Medium	10	g/l	Bacto-Trypton, pH 7,4
(low salt)	5	g/l	NaCl
	5	g/l	Hefeextrakt
LB-Platten	15	g/l	Agar in LB (low salt)-Medium
(low salt)			
LB-Zeocin-Platten	15	g/l	Agar in LB (low salt)-Medium
(low salt)	25	µg/ml	Zeozin

## 2.5. Zellkulturmedien und -lösungen

X-Vivo 10	serumfreies Medium für Suspensionszellen
RPMI 1640	Medium mit Glutamax supplementiert mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung
Opti-MEM I	serumreduziertes Medium für HEK293- Transfektionen
DMEM F12 / Nut Mix (1:1)	HEK293-Medium supplementiert mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung

## 2.6. Molekulargewichtsstandards

Hyperladder I	DNA-Marker mit 14 spezifischen DNA-Frg.
Novex Sharp Standard	vorgefärbter Proteinmarker
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	vorgefärbter Proteinmarker

## 2.7. Antikörper

anti-P2RX5 (Western Blot)	monoklonaler Antikörper aus Maus, gerichtet gegen P2RX5-Protein (Abnova)
anti-P2RX5 (Immuncytochemie)	polyklonaler Antikörper aus Maus, gerichtet gegen P2RX5-Protein (Abnova)
anti-Talin	monoklonaler Antikörper aus Maus, gerichtet gegen Talin (Sigma)
anti-CD3 $\epsilon$	polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gerichtet gegen CD3 $\epsilon$ (Dako)
anti-CD3 (OKT3-Klon)	Antikörper gegen CD3-Molekül, verwendet zur Aktivierung von T-Zellen (Inims, ZMNH)
anti-LFA-1	monoklonaler Antikörper aus Kaninchen gerichtet gegen LFA-1, (Abcam)
Alexa Fluor 488 (Ziege-anti-Kaninchen IgGs)	monoklonaler Antikörper aus Ziege, absorbiert bei 488 nm, gerichtet gegen Kaninchen IgGs (Invitrogen)

Alexa Fluor 488  
(Ziege-anti-Maus IgGs)

monoklonaler Antikörper aus Ziege,  
absorbiert bei 488 nm, gerichtet gegen  
Maus IgGs  
(Invitrogen)

Alexa Fluor 546  
(Ziege-anti-Kaninchen IgGs)

monoklonaler Antikörper aus Ziege,  
absorbiert bei 546 nm, gerichtet gegen  
Kaninchen IgGs  
(Invitrogen)

Alexa Fluor 546  
(Ziege-anti-Maus IgGs)

monoklonaler Antikörper aus Ziege,  
absorbiert bei 546 nm, gerichtet gegen  
Maus IgGs  
(Invitrogen)

anti-Maus-HRP

Peroxidase gekoppelter polyklonaler Antikörper  
aus Schaf, gerichtet gegen Maus IgGs  
(Jackson ImmunoResearch)

anti-Kaninchen-HRP

Peroxidase gekoppelter polyklonaler Antikörper  
aus Ziege, gerichtet gegen Kaninchen IgGs  
(Jackson ImmunoResearch)

## 3. Methoden

### 3.1. Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1. PBMC-Aufarbeitung

Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC) konnten aus einem Zwischenprodukt bei der Blutkonservenherstellung gewonnen werden. Die Blutbeutel wurden von der Blutbank des Universitäts-Klinikum Eppendorf, Hamburg (UKE) zur Verfügung gestellt. Das leukozytenreiche Blut wurde unter einer Sterilbank 1:1 mit 1x PBS gemischt. Anschließend wurden 25-30 ml vorsichtig auf 20 ml Biocoll-Lösung (Biochrom; 1,077 g/ml) in 50 ml-Röhrchen geschichtet. In einem Zentrifugationsschritt (40 min, 400 x g, RT) ohne Bremse wurden die Zellen nach ihrer Dichte aufgetrennt. Zwischen Biocoll-Lösung und Blutserum entstand eine intermediäre Phase, die die PBMC (Lymphozyten und Monozyten) enthielt. Mittels Pipette wurde diese Schicht abgezogen und in ein neues Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde in reichlich (ca. 30 ml) 1x PBS gewaschen und abzentrifugiert (10 min, 300 x g, RT). Je nach Anschluss-Protokoll wurden die Zellen in 10 ml 1x PBS oder zur weiteren Zellseparation in 10 ml 1x MACS-Puffer resuspendiert.

#### 3.1.2. Separation von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten

Für Untersuchungen an T-Zellsubtypen wurden die Lymphozyten in CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-Zellen mit Hilfe des „CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II“ (Miltenyi) separiert. Dazu wurden die isolierten PBMC nach dem Waschschrift in 5-10 ml MACS-Puffer resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden  $5 \times 10^7$  Zellen in 15 ml- Röhrchen überführt, mit dem fünffachen Volumen MACS-Puffer gewaschen und bei 300 x g 10 min bei 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde in 200 µl MACS-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Nach Zugabe des Antikörper-Cocktails (50 µl) erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei 4°C in Dunkelheit. Anschließend wurde die Suspension mit 150 µl MACS-Puffer verdünnt und mit 100 µl Biotin-Zweitantikörper versetzt. Es folgte eine Inkubation für 15 min bei 4°C in Dunkelheit. Anschließend wurden die Zellen in reichlich (10-faches Volumen) MACS-Puffer gewaschen und sedimentiert. Überschüssiger Antikörper

---

im Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 500 µl MACS-Puffer gelöst und auf vorher mit MACS-Puffer äquilibrierte Magnet-Säulen pipettiert. Der Durchfluss wurde aufgefangen. Anschließende FACS-Analysen bestätigten Reinheiten von 94-97% für CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-Zellen.

### 3.1.3. Zellaktivierungsprotokolle

#### 3.1.3.1. Microarrays

Für die Microarray-Analysen wurde zunächst die Zellkonzentration bestimmt und im Anschluss die Zellsuspension auf zwei neue Röhrchen verteilt. Nach einer Zentrifugation (300 x g, 10 min, RT) wurde eines der Pellets je nach Zellzahl in 20-40 ml RPMI 1640-Medium gelöst, zur Adhäsion von Monozyten an Plastik in Petrischalen überführt und für 2 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Das zweite Zellpellet wurde in einer Endkonzentration von 2 x 10<sup>6</sup> Zellen pro ml Medium aufgenommen und in Aliquots von je 5 ml in Wells einer 6-Well-Platte überführt. Nach Ruhezeit von 1 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde jedes Well zur Aktivierung der Zellen mit Phytohemagglutinin (PHA-L) versetzt (Endkonzentration 31,3 nM) und für 72 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### 3.1.3.2. Quantitative PCR

Für die qPCR-Analysen wurde die Zellkonzentration bestimmt und im Anschluss die Zellsuspension auf zwei neue Röhrchen verteilt. Nach einer Zentrifugation (300 x g, 10 min, RT) wurden aus einem der Pellets sofort CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-Zellen separiert (vgl. 3.1.2.) und die Zellen im Anschluss daran in 1x PBS gewaschen. Für die Weiterbehandlung s. „RNA-Isolation“ (3.2.7.). Das zweite Pellet wurde in einer Endkonzentration von 2 x 10<sup>6</sup> Zellen pro ml RPMI 1640 bzw. X-Vivo 10 Medium aufgenommen und in Aliquots von je 5 ml in die Wells einer 6-Well-Platten überführt. Nach Ruhezeit von 1 h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) wurde jedes Well zur Aktivierung der Zellen mit Phytohemagglutinin (PHA-L; Endkonzentration 31,3 nM) oder anti-CD3-Antikörper (OKT3-Klon; Endkonzentration 10 µg/ml) versetzt und für 72 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden auch aus diesen Zellen CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-Zellen separiert und die Zellen nach „RNA-Isolation“ (3.2.7.) weiterbehandelt.

#### 3.1.3.3. Expressionskinetik

Für die Expressionskinetik-Analysen wurden separierte CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-Zellen verwendet. Die Zellsuspensionen aus Punkt 3.1.2. wurden sedimentiert (300 x g, 10 min, 4°C) und das Pellet in X-Vivo 10-Medium gelöst (1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml). Anschließend wurden die Zellen in Wells von 96-Well-Platten verteilt (je 200 µl) und mit anti-CD3/CD28-Antikörper beschichteten Kügelchen (eins pro vier Zellen (50000/Well); Invitrogen) für 3, 6, 12, 24, 48 oder 72 h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) aktiviert.

Für den Translationsblock wurde das Zellpellet in X-Vivo 10-Medium mit 50 µg/ml Cycloheximid-Lösung (Sigma) resuspendiert und nach dem oben genannten Protokoll weiterbehandelt.

#### 3.1.3.4. Western Blot

Für die Western Blot-Analysen wurde die Zellkonzentration bestimmt und im Anschluss die Zellsuspension auf neue Röhrchen verteilt. Für die nicht aktivierten Fraktionen wurden sofort CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-Zellen separiert (3.1.2.) und die Zellen anschließend in 1x PBS gewaschen. Für die Weiterbehandlung s. „Protein-Isolation“ (3.3.1.). Der andere Teil der Zellen wurde in einer Endkonzentration von 2 x 10<sup>6</sup> Zellen pro ml X-Vivo 10-Medium aufgenommen und in Aliquots von je 5 ml in Wells einer 6-Well-Platte überführt. Nach kurzer Ruhezeit von 1 h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) wurde jedes Well zur Aktivierung der Zellen mit anti-CD3-Antikörper (OKT3-Klon; Endkonzentration 10 µg/ml) versetzt und für 72 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden auch aus diesen Zellen CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-Zellen separiert und die Zellen nach „Protein-Isolation“ (3.3.1.) weiterbehandelt.

#### 3.1.3.5. Biotinylierung

Für die Biotinylierung wurden PBMC benutzt. Zunächst wurde die Zellkonzentration bestimmt, im Anschluss die Zellkonzentration auf 2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml X-Vivo 10-Medium eingestellt und in Aliquots von je 5 ml in Wells einer 6-Well-Platte überführt. Nach Ruhezeit von 1 h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) wurde jedes Well zur Aktivierung der Zellen mit anti-CD3-Antikörper (OKT3-Klon; Endkonzentration 10 µg/ml) versetzt und für 72 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach „Biotinylierung“ (3.3.7.) weiterbehandelt.



### 3.1.3.6. Immuncytochemie P2RX5 bzw. Co-Lokalisation

Für die Immuncytochemie wurden PBMC benutzt. Zunächst wurde die Zellkonzentration bestimmt, danach die Zellkonzentration auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml X-Vivo 10-Medium eingestellt und in Aliquots von je 200  $\mu$ l in Wells einer 96-Well-Platte (mit V-Boden) überführt. Nach 1 h Inkubation ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) wurde die Hälfte der Wells zur Aktivierung der Zellen mit anti-CD3-Antikörper (OKT3-Klon; Endkonzentration 10  $\mu\text{g/ml}$ ) versetzt, die andere Hälfte blieb nicht aktiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Weiterbehandlung erfolgte nach „Immuncytochemie“ (3.3.8.).

### 3.1.3.7. Zellaktivierungsprotokoll mit siRNA-Behandlung für qPCR, Western Blot und Immuncytochemie

PBMC wurden aus Vollblut gewonnen,  $\text{CD4}^+$ -Zellen separiert und anschließend mit siRNA (Dharmacon) bzw. eGFP-Plasmid mit Hilfe des „*Human T Cell Nucleofector*“-Kit (Amaxa) nach Herstellerangaben transfiziert. Dazu wurden vier Aliquots mit  $5\text{-}10 \times 10^6$   $\text{CD4}^+$ -Zellen in Reaktionsgefäße überführt, bei  $300 \times g$  für 7 min bei RT sedimentiert, der Überstand verworfen und drei der Pellets in 100  $\mu$ l siRNA-Transfektionspuffer resuspendiert. Das vierte Pellet wurde als nicht-transfizierter Kontrollansatz in 2000  $\mu$ l X-Vivo 10-Medium aufgenommen und in ein Well einer 6-Well-Platte überführt. Nacheinander wurden die drei Zellsuspensionen mit eGFP-Plasmid (5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), Kontroll-siRNA (2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) oder P2RX5-siRNA (2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) versetzt, sofort in eine Elektroporationsküvette überführt und im AMAXA-Nucleofector mit Hilfe des Programms U-014 transfiziert. Anschließend wurde der transfizierten Zellsuspension direkt 500  $\mu$ l vorgewärmtes ( $37^\circ\text{C}$ ) X-Vivo 10-Medium zugegeben und das Gemisch vorsichtig in ein mit 1,5 ml vorgewärmtem X-Vivo 10-Medium befülltes Well einer 6-Well-Platte überführt. Nach einer 12-stündigen Ruhephase ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) wurde die Effizienz der Transfektion unter einem Mikroskop mit Hilfe der eGFP-exprimierenden Zellen bestimmt (Effizienz (%) =  $\frac{\text{eGFP transfizierte Zellen}}{\text{Gesamtzellanzahl pro Ausschnitt}}$ ). Anschließend wurden die Zellen der drei verbliebenen Fraktionen in Reaktionsgefäße überführt und durch Zentrifugation ( $300 \times g$ , 7 min, RT) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in vorgewärmtem X-Vivo 10-Medium (Endkonzentration  $1 \times 10^6$  Zellen/ml) resuspendiert. Danach wurden die Zellen in 200  $\mu$ l-Aliquots in die Wells einer 96-Well-Platte (V-Boden) verteilt. Der Hälfte der Wells einer jeden Fraktion wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörper beschichteten Kügelchen (50000 Stück pro Well) stimuliert. Die Aktivierung erfolgte für eine im Ergebnisteil

angegebene Zeit (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Danach wurden die Zellen nach „RNA-Isolation“ (3.2.7.), „Protein-Isolation“ (3.3.1.) oder „Immuncytochemie“ (3.3.8.) weiterbehandelt.

### **3.1.4. Zellkultur**

#### 3.1.4.1. Kultivierung von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden in Nährmedium (DMEM F12 / Nut Mix-Medium; Gibco) in Gegenwart von 10%igem fetalem Kälberserum (Biochrom) und 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung (Gibco) unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in Zellkulturflaschen (25 ml; Sarstedt) kultiviert. Bei Konfluenz (alle 3-4 Tage) wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit Trypsin (Gibco) inkubiert (3 ml, 3 min, 37°C). Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von frischem DMEM-Medium gestoppt, die Zellen durch Trituration von der Gefäßoberfläche gelöst, in ein 15 ml-Röhrchen transferiert und zentrifugiert (1200 x g, 5 min, RT). Das Sediment wurde in frischem DMEM-Medium resuspendiert, die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml Medium ausgesät.

#### 3.1.4.2. Transfektion von HEK293-Zellen

In eine 6-Well-Platte wurden je 2 ml DMEM-Medium vorgewärmt und pro Transfektionsansatz  $4 \times 10^5$  Zellen ausgesät. Nach 16-24 h wurden 97 µl serumfreies Medium mit 3 µl Fugene 6 (Roche) gemischt, 5 min bei RT inkubiert, danach 2 µg Plasmid-DNA des gewünschten Konstrukts zugegeben und das Gemisch für 20 Min. bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium der ausgesäten Zellen abgesaugt und durch frisches ersetzt. Anschließend wurde der Transfektionsansatz durch Eintröpfeln zugegeben. Durch die Kontroll-Transfektion mit einem eGFP-Plasmid konnte nach ca. 12-24 h die Effizienz bestimmt werden.

#### 3.1.4.3. Ernte und Lyse von transfizierten HEK293-Zellen

Die transfizierten Zellen wurden in 1x PBS gewaschen und nach Zugabe von HEPES-Lyse-Puffer (250 µl pro Well) mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt. Das Lysat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für ca. 2 h auf einem Rollrad bei 4°C zur kompletten Lyse inkubiert. Anschließend erfolgte zur Konzentrationsbestimmung ein „BCA-Test“ (s. 3.3.2.).

## **3.2. Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1. Transformation kompetenter Zellen**

Für die Transformation des *E. coli* XL1-Blue Stammes wurden 100 µl der kompetenten Zellen mit 50-100 ng Plasmid-DNA 30 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock (45 sec, 42°C) und anschließender Abkühlung auf Eis (10 min) wurden die transformierten Zellen auf Nährplatten mit einem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und ü. N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert (Sambrook und Russel, 2001).

### **3.2.2. Plasmid-Präparation aus 2 ml bzw. 50 ml Bakterienkulturen**

Für die Mini-Präparation wurden 2 ml Nährmedium unter Zusatz eines entsprechenden Antibiotikums mit einer Einzelkolonie des plasmidtragenden *E.coli*-Stammes angeimpft und ü. N. im Wärmeschüttler wachsen gelassen (37°C, 225 rpm). 1,5 ml dieser Kultur wurden zentrifugiert (max. rpm, 1 min, RT) und das Pellet mit Hilfe des „GFX Micro Plasmid Prep“-Kit (Amersham) aufgearbeitet. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Für die Mini-Präparation aus 50 ml Kultur wurden ebenso unter Zusatz eines entsprechenden Antibiotikums mit einer Einzelkolonie des plasmidtragenden *E.coli*-Stammes angeimpft und ü. N. im Wärmeschüttler wachsen gelassen (37°C, 225 rpm). Die Bakterien wurden mit Hilfe des „Nucleobond AX-System“ (Macherey und Nagel) nach Herstellerprotokoll aufgearbeitet. Die Ausbeute an Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt und auf 1 µg/µl eingestellt.

### **3.2.3. Restriktionsverdau von DNA**

Zur Kontrolle isolierter Plasmide erfolgten Restriktionsverdau mit entsprechenden Enzymen, die ein spezifisches Bandenmuster erzeugten. Dazu wurde eine gewünschte Menge an Plasmid-DNA mit einem gewünschten Enzym und seinem spezifischen Puffer gemischt und 1-2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Probenpuffer (Bioline) gestoppt und das Gemisch konnte zur gelelektrophoretischen Auftrennung verwendet werden (Sambrook und Russel, 2001).

### 3.2.4. DNA-Agarosegelelektrophorese

DNA-Gelelektrophoresen wurden mit Hilfe selbstgegossener Horizontalgele durchgeführt. 1-2% (w/v) Agarose wurden in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst, zur DNA-Detektion 0,5 µg/ml (w/v) Ethidiumbromid zugegeben und in eine Form gegossen und abkühlen lassen. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Danach konnte das DNA-Bandenmuster unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht und dokumentiert werden (Sambrook und Russel, 2001).

### 3.2.5. PCR

Zur Analyse der P2RX5-Transkriptvariante in T-Lymphozyten wurde eine nested-PCR durchgeführt. Als Template dienten jeweils cDNAs aus den qPCR-Analysen. Es wurden cDNAs nicht-aktivierter sowie aktivierter CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen von je vier unterschiedlichen Spendern benutzt. In der PCR wurde zunächst ein größeres Produkt mit den Oligonukleotiden 2254 und 2255 in zehn Zyklen amplifiziert. Dieses diente als Template für die zweite PCR mit den Oligonukleotiden 2256 und 2257, welches das Zielamplifikat in 35 Zyklen herstellen sollte (Oligonukleotid-Sequenzen s. 8.2.2.).

Eingesetzt wurden generell:

Oligonukleotid 2254 bzw. 2256:	50 pmol
Oligonukleotid 2255 bzw. 2257:	50 pmol
dNTP-Mix:	0,4 mM
MgCl <sub>2</sub> :	1 mM
PCR-Puffer (10x):	1x
Taq-DNA-Polymerase:	2 U

Zyklen:

1. Denaturierung:	94°C	180 sec	1 x
2. Hauptzyklus:	94°C	45 sec	10 x bzw. 35 x
	60°C	60 sec	
	72°C	60 sec	

### 3.2.6. Klonierung der PCR-Amplifikate

Mittels „Zero-Blunt-Topo-PCR-Cloning-Kit“ (Invitrogen) wurden die Amplifikate in den pCRII-Blunt-Topo Vektor nach Herstellerangaben kloniert. Anschließend wurden die Plasmide in kompetente Zellen (TOP10; Teil des Kits) transformiert und anschließend per Plasmid-Mini-Präparation (Amersham) isoliert. Die Plasmide wurden mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* verdaut und die Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese in einem 1,5% Agarose-Gel (w/v) in 1x TAE-Puffer der Größe nach getrennt. Anschließend wurden sowohl Sense- als auch Antisensestrang der isolierten Plasmide mit Hilfe der Sequenzierprimer T7 und SP6 sequenziert.

### 3.2.7. RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurden gleichbehandelte Zellen zunächst vereint, zentrifugiert (300 x g, 10 min, 4°C), der Überstand verworfen und die Zellen in Trizol (Endkonzentration  $1 \times 10^7$  Zellen/ml; mindestens aber 200 µl; Invitrogen) lysiert und homogenisiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen zur kompletten Lyse in flüssigem Stickstoff für 2 min eingefroren. Danach wurden sie entweder bei -80°C gelagert oder zur direkten RNA-Isolation wieder aufgetaut (20 min, RT, gelegentliches Mixen).

Anschließend erfolgte die RNA-Aufreinigung durch Zugabe von Chloroform (200 µl/ml Startvolumen), Mixen des Ansatzes, 3 min Inkubation bei RT und anschließender Zentrifugation (12000 x g, 15 min, 4°C). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mittels Isopropanol (500 µl bei 1 ml Startvolumen) gefällt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die gefällte RNA durch Zentrifugation (12000 x g, 10 min, 4°C) gesammelt, der Überstand verworfen und das Pellet in Ethanol (75%; 1 ml bei 1 ml Startvolumen) gewaschen und erneut zentrifugiert (7500 x g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet kurz (ca. 8 min bei RT) getrocknet. Anschließend wurde das RNA-Pellet in DEPC-H<sub>2</sub>O (je nach Pelletgröße zwischen 10 und 30 µl) zunächst durch auf- und abpipettieren, anschließend durch Inkubation im Wärmeblock (57°C, 10 min) gelöst. Pro RNA-Probe wurden 1 µl in ein neues Reaktionsgefäß zur Qualitäts- und Konzentrationsbestimmung entnommen. Die RNA wurde auf Eis oder bei -80°C für einen längeren Zeitraum gelagert.

### 3.2.8. Bioanalyser Messung

Zur gleichzeitigen Qualitäts- und Konzentrationsbestimmung von Gesamt-RNA wurde der Agilent Bioanalyser benutzt (für detaillierte Anwendung s. Herstellerprotokoll). Die RNA-Proben wurden in zwei unterschiedliche Konzentrationen verdünnt und bei 70°C für 2 min denaturiert. Der Chip wurde nach Protokoll des Herstellers beladen und die Proben mit dem Programm „*Total RNA Nano*“ analysiert.

### 3.2.9. *In vitro* RNA-Synthese

Zur RNA-Synthese wurden zunächst 2 µg des jeweiligen Plasmids in einem Volumen von 100 µl mit geeigneten Restriktionsendonukleasen linearisiert. Nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die DNA durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 3 Volumen Ethanol (absolut) 60 min bei -70°C gefällt. Die präzipitiert DNA wurde durch Zentrifugation sedimentiert und in 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA in 6,5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Für die folgende RNA-Synthese wurde das „*Message Machine in vitro Transcription Kit*“ (Ambion) benutzt. Nach Synthese wurde die RNA durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt, gefällt und in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Nach einer Bioanalyser-Messung (s. 3.2.8.) wurde die RNA für nachfolgende Reaktionen verdünnt, aliquotiert und bei -70°C gelagert.

### 3.2.10. Eigene Microarrays auf Glas

#### 3.2.10.1. Herstellung der Arrays

##### 3.2.10.1.1. Vorbereitung der Glas-Objektträger

Glas-Objektträger wurden zunächst in NaOH (2,5 M in 60%-igem Ethanol) und 70%-igem Ethanol gewaschen. Anschließend in ausreichend H<sub>2</sub>O bidest. gespült und anschließend mit Poly-L-Lysin (10% (v/v) in 1x PBS) für eine Stunde bei RT beschichtet. Nach Spülung mit ausreichend H<sub>2</sub>O bidest. wurden die Glassträger durch kurze Zentrifugation getrocknet.

##### 3.2.10.1.2. Spotting

Für jedes Gen wurde ein spezifisches 68-70 bp Oligonukleotid als Template für die Hybridisierung ausgesucht. Die einzelsträngigen Oligonukleotide wurden kommerziell

bezogen (Operon; s. Material). Die Sequenzen waren mit Hilfe eines Sequenz-Analyse-Programms auf der Internet-Seite von Operon so gewählt, dass die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Oligonukleotid-cDNA Fragmente in einem Bereich von  $78,5^\circ\text{C} \pm 2,5^\circ\text{C}$  lag. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in Betain-Spottingpuffer aufgenommen und in 96-Well-Platten überführt. Mit Hilfe eines Spottingrobotors (Tecan) wurden punktuell die Oligos auf die beschichteten Glas-Objektträger aufgebracht. Dabei wurde jeder Spot viermal aufgebracht, so dass am Ende jedes Gen viermal vertreten war um den Ausfall eines Spots zu kompensieren. Im Anschluss an den Spot-Vorgang wurden die mit Lysin beschichteten Glas-Objektträger im Vakuum bei  $60^\circ\text{C}$  für ca. 2 Stunden getrocknet, um die DNA an das Lysin zu binden. Danach erfolgte ein „Crosslink“ im UV-Stratalinker 2400 (Stratagene) mit einer totalen Energie von 60 mJ. In Dunkelheit konnten die bedruckten Glaträger für 3-4 Wochen bei RT gelagert werden.

#### 3.2.10.1.3. Blockieren der Glaträger mit Bernsteinsäureanhydrid

Um den Hintergrund bei den Hybridisierungen zu reduzieren, wurden die Aminogruppen mit Bernsteinsäureanhydrid nach dem Protokoll von Diehl abgesättigt (Diehl *et al.*, 2001). Das Bernsteinsäureanhydrid (1 g in 200 ml 1,2-Dichlorethan) wurde im Ultraschallbad in etwa 5 min vollständig gelöst (Endkonzentration: 50 mM). Anschließend wurde 1-Methylimidazol hinzugefügt (Endkonzentration 150 mM).

Die Objektträger wurden in einem Färbetrog mit der Blockier-Lösung 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurden sie kurz zweimal in 200 ml 1,2-Dichlorethan gewaschen. Um die gespottete cDNA auf den Glaträgern zu denaturieren, wurden sie in kochendem Wasser geschwenkt und anschließend 2 min darin inkubiert. Danach wurden sie mit Ethanol (absolut) gewaschen und bei RT getrocknet.

#### 3.2.10.1.4. SYBR Green II-Färbung

Um die Qualität der Spots und die Konzentration der gespotteten DNA zu überprüfen, wurden die Objektträger mit SYBR Green II nach dem Protokoll „*Analysis of DNA Microarrays by Non-Destructive Fluorescent Staining Using SYBR Green II*“ von Battaglia gefärbt (Battaglia *et al.*, 2000).

Die SYBR Green II-Färbung erfolgte in 50 ml-Röhrchen durch Inkubation der Objektträger für 2 min in der Färbelösung (SYBR Green II im Verhältnis von 1:10000 in TBE-Puffer

(pH 8.0)). Nach der Färbung wurden die Objektträger mit 1x TBE und H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen, luftgetrocknet und gescannt.

#### 3.2.10.2. Sondenpräparation

Zur Sondenherstellung wurde das „*SuperScript Indirect cDNA Labeling System for Microarrays*“-Kit (Invitrogen) benutzt, welches auf dem Prinzip des Einbaus von Aminoallyl-Nukleotiden bei der reversen Transkription von Gesamt-RNA in cDNA beruht. Anschließend kann durch Kopplung von N-Hydroxysuccinimid (NHS) funktionalisierten Farbstoffen die cDNA markiert werden.

##### 3.2.10.2.1. Markierung, Aufreinigung und Präzipitation von cDNA

Zur Synthese von cDNA wurden je 15 µg Gesamt-RNA, isoliert aus den zu untersuchenden, eingesetzt. Die Erststrang-Synthese erfolgte nach Herstellerangaben mit einer 3-stündigen Inkubation bei 46°C. Nach Hydrolyse der RNA, erfolgte die Aufreinigung der synthetisierten cDNA mit Hilfe von S.N.A.P Säulen (s. Hersteller-Protokoll) und anschließender Ethanol-Präzipitation.

##### 3.2.10.2.2. Vorbereitung der Farbstoffe

Die NHS-reaktiven Farbstoffe Cy3 und Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech) wurden in 45 µl DMSO resuspendiert und zu je 5 µl aliquotiert. Nach einer anschließenden „*Speed Vac*“-Evaporation wurden sie bei -80°C gelagert.

##### 3.2.10.2.3. Kopplung der Farbstoffe

Die Kopplung der Farbstoffe Cy3 und Cy5 an die aminoallyl-dUTPs in der synthetisierten cDNA erfolgte nach Herstellerangaben. Anschließend wurden durch erneute Aufreinigung mit Hilfe der S.N.A.P Säulen ungebundene Farbstoffe entfernt und die markierte cDNA zur Hybridisierung aufgereinigt.



## 3.2.10.2.4. Bestimmung der Konzentration der inkorporierten Farbstoffe

Die Absorption der 100 µl-Cy3-markierten Sonden-cDNA wurde in einer sterilen UVette (Eppendorf) bei 260 nm, 320 nm, 550 nm und 650 nm im Photometer Utrospec 3000 (Pharmacia Biotech) gemessen. Für die Cy5-markierte Sonden-cDNA wurden die Absorptionen bei 260 nm, 320 nm, 650 nm und 750 nm bestimmt. Mit Hilfe der folgenden Gleichungen konnten cDNA-Quantität, Menge des inkorporierten Farbstoffs, sowie Frequenz der Inkorporation berechnet werden:

Menge der Sonden-cDNA (ng):

$$(A_{260} - A_{320}) \times 37 \text{ ng}/\mu\text{l} \times \text{Gesamtvolumen } \mu\text{l} = \text{ng der Sonde}$$

Menge von inkorporierten Farbstoff (pmol):

$$\text{Cy3 inkorporiert: } (A_{550} - A_{650}) \times \text{Gesamtvolumen in } \mu\text{l} / 0,15 = \text{pmol des Cy3-Farbstoffes}$$

$$\text{Cy5 inkorporiert: } (A_{650} - A_{750}) \times \text{Gesamtvolumen in } \mu\text{l} / 0,25 = \text{pmol des Cy5-Farbstoffes}$$

Frequenz der Inkorporation (Anzahl markierter Nukleotide je 1000 Nukleotide):

$$\text{f.o.i.} = \text{pmol der inkorporierten Farbstoffe} \times 324,5 / \text{Menge an cDNA-Sonde in ng}$$

Optimale Frequenzen der Inkorporation liegen zwischen 15-20. Aus den vorangehenden Berechnungen konnte das notwendige Volumen der Sonde berechnet werden, um 40 pmol des inkorporierten Farbstoffs je Richtung einzusetzen:

$$\text{Gesamte pmol des inkorporierten Farbstoffes} / \mu\text{l Probe} = \text{pmol}/\mu\text{l}$$

$$40 / \text{pmol}/\mu\text{l} = \mu\text{l Sonde pro Microarray}$$

Je 40 pmol der mit den Farbstoffen Cy3- und Cy5-markierten cDNAs wurden miteinander kombiniert und in der Speed Vac auf ein Volumen unter 5 µl reduziert.

## 3.2.10.3. Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde basierend auf dem technischen Protokoll nach Volker durchgeführt und optimiert (Volker, 2001).

Bei der Durchführung der Hybridisierung wurde darauf geachtet, dass nichts auf den Objektträgern trocknet, um Hintergrundfärbungen durch das permanente Binden von Salz,

Detergenz und Sonde an der Oberfläche zu verhindern. Aus diesem Grund wurde auf zügiges Arbeiten geachtet, wenn die Objektträger bei den Waschschritten und beim Trocknen transferiert wurden. Die lichtempfindlichen Farbstoffe wurden während Inkubationszeiten mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt.

#### 3.2.10.3.1. Herstellung der Hybridisierungslösung

Zu 50 µl filtrierter Prehybridisierungslösung wurden 0,5 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml, Sigma), 1 µl tRNA (10 mg/ml, Sigma) und 2 µl PolyA (10 mg/ml, Sigma) gegeben und mit der unter 5 µl reduzierten Sonden-DNA gemischt. Die Hybridisierungslösung wurde vor Licht geschützt bei RT gehalten, bis sie eingesetzt wurde.

#### 3.2.10.3.2. Prehybridisierung

Die Prehybridisierungslösung wurde in 50 ml-Röhrchen im Wasserbad auf 42°C vorgeheizt. Maximal zwei Objektträger je Röhrchen wurden 45 min bei 42°C prehybridisiert. Danach wurden die Objektträger nacheinander durch Eintauchen in H<sub>2</sub>O bidest. 5-10 sec gewaschen. Anschließend wurden sie mit einem Strahl gasförmigen Stickstoffs getrocknet.

#### 3.2.10.3.3. Hybridisierung

Die Hybridisierungslösung mit der Sonden-cDNA wurde zur Denaturierung für 5 min auf 90°C erhitzt. Der Ansatz wurde bei max. rpm für 1 min zentrifugiert, um ihn zu sammeln und auf weniger als 42°C abzukühlen. Die Sonde wurde nicht auf Eis abgekühlt, um das Ausfallen von SDS zu verhindern. 50 µl des endgültigen Hybridisierungsgemisches wurden auf einem Deckgläschen in einer Linie plaziert. Dabei wurde die Produktion von Luftbläschen, die zu Hybridisierungseffekten führen könnten, vermieden. Eine Seite des Arrays wurde an die Linie der Hybridisierungslösung auf dem Deckgläschen gelegt und der Objektträger langsam auf das Deckgläschen gesenkt, wobei die Lösung gleichmäßig verteilt wurde. Die Glaträger wurden in vorgewärmte Hybridisierungseinheiten (Monterey Industries, Kalifornien, USA) gelegt und diese wasserdicht verschlossen. Die Hybridisierung erfolgte ü. N. bei 42°C im Wasserbad.

#### 3.2.10.3.4. Waschen des hybridisierten Arrays

Alle Waschschritte wurden in Glasküvetten, in denen die Objektträger aufrecht stehen, auf einem Schüttler mit 70 rpm durchgeführt. Alle Waschlösungen wurden sterilfiltriert. Durch Auf- und Abbewegung in einer auf 42°C vorgewärmten Glasküvette mit 2x SSC und 0,1% SDS wurde das Deckglas entfernt und dann für 5 min geschüttelt. Der Objektträger wurde anschließend in eine Glasküvette mit 0,1x SSC und 0,1% SDS überführt und bei RT für 10 min gewaschen. Als nächstes folgten drei Waschschritte für 1 min in 0,1x SSC.

Optional wurde zur Verhinderung von Salzen noch ein kurzes Waschen von 45 sec in 0,05x SSC angeschlossen. Anschließend wurde der Glasträger mit Hilfe eines Stickstoffstrahls getrocknet.

#### 3.2.10.4. Auswertung der Microarray-Hybridisierungen

##### 3.2.10.4.1. Scannen

Zum Scannen wurde der Scanner „*arrayWoRx*“ (Applied Precision) verwendet.

Das Scannen erfolgte bei den SYBR Green II gefärbten Objektträgern mit dem FITC-Filter (494 nm/518 nm), bei Cy3- und Cy5-markierten Sonden wurde mit dem Filter für Cy3 (548 nm/595 nm) und Cy5 (633 nm/685nm) gescannt. Mit dem Vorscan-Modus wurde zuerst der Bereich des Arrays auf dem Objektträger festgestellt. Dann wurde das Array automatisch in Teilbildern gescannt und zusammengesetzt. Die Belichtungszeit variierte von 0,5 bis 1,5 sec für Cy3 und 1,5 bis 3,0 sec für Cy5. Das gescannte Bild wurde im tiff-Format gespeichert.

##### 3.2.10.4.2. Auswertung der Arraybilder

Für die Identifizierung der Spots wurde eine Excel-Tabelle mit den Namen der Klone und ihrer Position in der 384-Well-Platte erstellt. Die Auswertung der Arrays erfolgte mit Hilfe des Programms „*ScanAlyze*“ (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>). Die als tiff-Dateien gespeicherten Rohdaten wurden für jeden Kanal einzeln in das Programm geladen. Mit Hilfe SYBR-Green II gefärbter Glasträger konnte ein sogenanntes Grid erstellt werden, welches nun über die Aufnahmen der eigentlichen Hybridisierung gelegt werden konnte. Manuell konnten noch Fehler wie Spotgröße und -lage korrigiert werden. Mit der Analyse-Funktion wurde eine Ergebnis-Tabelle im Excel-Format erstellt, die für einzelne Spots relative Fluoreszenzintensitäten angab. Mit Hilfe der *Spiking*-Kontrollen *ae I*, *DD1B* und *CE11* wurde

eine Korrektur vorgenommen, die eine Drift der Gesamtfluoreszenz ins Grüne oder Rote ausglich. Dabei wurden die Daten der Fraktion, die den aktivierten Zellen entsprach, durch die Daten der unaktivierten Fraktion geteilt. Die erhaltenen Faktoren einer jeden Referenz-Kontrolle wurden gemittelt und als Kontrollfaktor benutzt. Um diesen Faktor wurden die Ergebnisse normalisiert. Anschließend konnte für alle Gene ein Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der aktivierten zu den unaktivierten Fraktionen gebildet werden. Formeln und Kriterien zur Analyse der eigenen Arrays sind im Ergebnisteil unter Punkt 4.1.3. detailliert beschrieben.

### **3.2.11. Affymetrix-Analyse**

Für die Affymetrix-Analyse wurden PBMC eines Spenders benutzt, wobei zu Anfang des Experiments zwischen je drei unaktivierten und drei aktivierten Proben unterschieden wurde. Das Aktivierungsprotokoll war identisch zu dem der eigenen Arrays. Nach Isolation der Gesamt-RNA und Analyse durch den Bioanalyzer wurden die sechs Proben auf Trockeneis zum IFG, Münster verschickt. Dort erfolgte die RNA-Fragmentierung, die Hybridisierung auf insgesamt sechs Chips, sowie die Auslesung der Hybridisierungsergebnisse. Die erhaltenen Daten wurden anschließend mit Hilfe des Programms „*Array Assist*“ (Kommerzielle Software, Stratagene) analysiert. Hierbei wurde in den Einstellungen nach einem ANOVA-Test die Bonferroni-Korrektur als Posthoc-Test verwendet. Die signifikant herauf- bzw. herunterregulierten Gene wurden dann in das Programm „*Pathway Assist*“ (Kommerzielle Software, Stratagene) überführt. Hier wurde in dem Menüpunkt „GO-Term-Sortierung“ eine Analyse der Funktion aller Gene durchgeführt und diese in ihre GO-Terme eingruppiert. Die Gene aus der Gruppe „*Ion channel function*“ wurden für weitere Analysen und genauere Betrachtungen separiert.

### **3.2.12. Quantitative PCR**

#### 3.2.12.1. Reverse Transkription

Für die qPCR wurden die Gesamt-RNA zunächst in cDNA mit Hilfe des „Super Script II Reverse Transcriptase“-Kits (Invitrogen) umgeschrieben. Hierbei wurden pro Probe zwei Ansätze angesetzt, aber nur je einer mit dem Enzym reverse Transkriptase versetzt. Generell wurden 0,5-2 µg Gesamt-RNA eingesetzt und diese mit einem Premix aus zufälligen Hexaoligonukleotiden (250 ng/Ansatz), dNTP-Mix (2 mM) und *ae I*-cRNA (50 pg/Ansatz)

---

vermischt. Anschließend erfolgte ein 5-minütiger Inkubationsschritt bei 65°C in einem PCR-Gerät (PTC DNA Engine, Biozym). Die Proben wurden auf Eis schnell abgekühlt, ein zweiter Premix, bestehend aus 1x First-Strand-Buffer, 10 mM DTT und 40 U RNase OUT (Invitrogen), hinzugegeben. Die Ansätze wurden gemischt und 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde je Probe jeder Ausgangs-RNA das Enzym reverse Transkriptase hinzugegeben und die Reaktionsgefäße in einem PCR-Gerät (10 min 25°C; 3 h 42°C; 15 min 70°C) inkubiert. Danach wurden die synthetisierten cDNAs mit 40 µl DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

#### 3.2.12.2. Taqman-PCR

Für die qPCR wurden vorproduzierte Taqman-Assays (Applied Biosystems) benutzt. Pro cDNA wurden generell je 3 Replikate pipettiert. Ein 20 µl Taqman-Ansatz setzt sich aus „*Taqman – Universal PCR Master Mix*“ (1x), 1 µl Sondenmix (Taqman-Assay) und 1 µl cDNA zusammen. Die PCR-Reaktion erfolgte im „*7900 HT Sequence Detection System*“ (Applied Biosystems) in Standard Einstellungen. Nach Ende des Programms konnte für jede Probe ein Ct-Wert abgelesen werden. Diese Rohdaten wurden zunächst mit Hilfe des externen Gens *ae I*, später dann mit der internen Kontrolle *CD247* normalisiert (Auswertung s. 4.3.). Die n-fachen Expressionsänderungen wurden mit Hilfe eines ANOVA-Tests ([www.physics.csbsju.edu/stats/anova.html](http://www.physics.csbsju.edu/stats/anova.html)) einer Zufallsuntersuchung unterzogen und danach mittels Bonferroni-Posthoc-Tests ([www.graphpad.com/quickcalcs/posttest1.cfm](http://www.graphpad.com/quickcalcs/posttest1.cfm)) kontrolliert.

#### 3.2.12.3. Design *ae I*-Assay

Um die cDNA der zugemischten *ae I*-Kontroll-RNA detektieren zu können, musste ein Taqman-Assay entworfen werden, da ein solcher nicht in der Applied Biosystems Datenbank verfügbar war. Um die Gleichheit aller Parameter dieses Assays zu den anderen Taqman zu gewährleisten wurde das Programm „*Primer Express*“ (Applied Biosystems) genutzt. Bei diesem wird die Sequenz des Gens geladen und das Programm prüft diese auf optimale Primer- bzw. Sondensequenzen. Anschließend wurden nach Vorgaben dieses Programms Vorwärts-, Rückwärts-, sowie Sondenprimer hergestellt. Dieses Gemisch konnte dann gleichwertig zu den predesignten Taqman-Assays benutzt werden.

### 3.3. Proteinbiochemische Methoden

#### 3.3.1. Proteinisolation

Zur Protein-Isolation wurden die Zellen ( $5-10 \times 10^6$ ) aus 3.1.3. zweimal in 1xPBS gewaschen (500  $\mu$ l 1x PBS, Zentrifugation, 300 x g, 10 min, 4°C; Überstand jeweils verworfen). Die Pellets wurden in 500-1000  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bidest. mit PIM (Proteinase Inhibitor Mix; 1:100; Sigma) resuspendiert und durch 3-faches Einfrieren in flüssigem Stickstoff (2 min) und Auftauen bei 37°C lysiert. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von 20x PBS (Endkonzentration 1x) gepuffert. Bei einer Zentrifugation mit 2000 x g für 3 min bei 4°C wurden die Zellkerne sedimentiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit 18000 x g für 20 min bei 4°C. Der Überstand wurde ebenfalls in ein neues Reaktionsgefäß überführt (cytosolische Fraktion; CF) und das Sediment (Membran-Fraktion; MF) in 25% des Startvolumens HEPES-Lyse-Puffer + PIM (1:100) gelöst.

#### 3.3.2. BCA-Test

Für die Protein-Konzentrationsbestimmung wurde ein „BCA-Test“ (Pierce) durchgeführt. Dazu wurden Aliquots der Proteinlösungen generell 1:5 und 1:10 mit H<sub>2</sub>O bidest. verdünnt. Für jede Probe wurden 3 Replikate pro Verdünnung in eine 96-Well-Platte pipettiert (je 10  $\mu$ l). Zusätzlich wurde eine BSA-Eichreihe mit Konzentrationen von 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500  $\mu$ g/ml BSA erstellt. Hier wurde jede Konzentration in Doppelansätzen pipettiert (je 10  $\mu$ l). Anschließend wurden vom frisch angesetzten Reaktionsgemisch (s. Hersteller-Protokoll) je 100  $\mu$ l zu jeder 10  $\mu$ l-Probe pipettiert. Die Platte wurde kurz mit Hilfe eines Vortexers geschüttelt und anschließend für 30 min bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Danach wurde die optische Dichte mit Hilfe eines ELISA-Lesegerätes ( $\mu$ Quant, Bio-Tek) ausgelesen. Für die BSA-Eichreihe ergab sich eine Eichgerade mit Hilfe derer die Konzentrationen der einzelnen Proben abgelesen werden konnten. Nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor, wurden die Ergebnisse der verschiedenen Verdünnungen gemittelt.

### 3.3.3. SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen erfolgte durch SDS-Polyacrylamidelektrophorese in „XCell SureLock Mini-Cell“ (Invitrogen). Zur Auftrennung wurden „NuPAGE Novex Bis-Tris“ Fertig-Gele (Invitrogen) verwendet.

Dazu konnten je nach Konzentration bis zu max. 19,5 µl Proteinlösung pro Probe eingesetzt werden. Diese wurde gemischt mit „4x NuPAGE LDS“ Proben-Puffer (Endkonzentration 1x) und „10x NuPAGE Reducing Agent“ (Endkonzentration: 1x). Das Probengemisch wurde bei 70°C für 10 min denaturiert und anschließend in die Taschen eines 10% „NuPAGE Bis-Tris“-Gels geladen. Als Größenmarker wurde entweder „Novex Sharp Standard“ (Invitrogen) oder „Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder“ (Fermentas) benutzt. Der Lauf erfolgte bei 15 V/cm für ca. 75 min.

### 3.3.4. Western Blot

Western Blot-Analysen wurden modifiziert nach Towbin *et al.* (1979) durchgeführt.

Der Proteintransfer vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Protan Nitrozellulose BA85, Schleicher & Schüll) erfolgte in einer „Mini-Transblot“-Kammer (BioRad). Dazu wurde das Sammelgel abgetrennt und verworfen. Das Trenngel wurde in einen Blotstapel (Schwamm, 2x Whatman Filterpapier, Gel, Membran, 2x Whatman Filterpapier, Schwamm) unter „NuPAGE Transfer“-Puffer luftblasenfrei eingegliedert. Anschließend wurde der Stapel in einer Klemmeinrichtung in die mit „NuPAGE Transfer“-Puffer befüllte Kammer gesetzt. Der elektrophoretische Transfer (Western Blot) erfolgte bei 4°C ü. N. bei 40 mA.

### 3.3.5. Immunologischer Nachweis an Nitrozellulose gebundener Proteine

Nach erfolgtem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese zweimal für 1 min in 1x PBS bei RT geschwenkt. Anschließend erfolgte ein Blockierschritt für 1 h bei RT in Blockierlösung I. Danach erfolgte die Inkubation mit Erstantikörper in Blockierlösung II (4°C, ü. N.). Es schlossen sich Waschschrte in 1x PBS-T (4 x 5 min) bei RT an. Danach wurde die Membran mit peroxidasegekoppelten Zweitantikörper in 1x PBS (1 h, RT) inkubiert. Zum Abschluss wurde die Membran erneut 4 x 5 min in 1x PBS-T (RT) gewaschen.

### 3.3.6. Antikörpernachweis durch Chemilumineszenz

Für den Nachweis der Antikörper wurden ECL-Lösungen I und II frisch angesetzt und im Verhältnis 1:1 zur Membraninkubation gemischt. Die Membran wurde auf der Proteinseite mit der Lösung überschüttet und 1 min unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Whatman-Filterpapier getrocknet und luftblasenfrei in eine Filmkassette eingelegt. Zur Exposition wurden Röntgenfilme (Kodak MR-Film, Amersham Sensitiv) für verschiedene Zeiten (30 sec bis 15 min) aufgelegt.

### 3.3.7. Biotinylierung

Für die Biotinylierungsreaktion wurden  $1 \times 10^7$  aktivierte PBMC aus 3.1.3.5. benutzt. Die Zellen wurden zweimal in 1x PBS gewaschen (Zentrifugation bei 300 x g, 10 min, 4°C) und das Pellet in 1 ml 1x PBS mit 10 mM Biotin (Pierce) resuspendiert. Identisch wurde zu jeder Probe ein Kontrollansatz ohne Biotinzugabe durchgeführt. Die Reaktion erfolgte im Dunkeln bei 4°C für 30 min. Anschließend wurden die Zellen zur Entfernung des ungebundenen Biotins zweimal durch Zentrifugation (300 x g, 10 min, 4°C) sedimentiert, in 1 ml HEPES-Glycin-Puffer resuspendiert und für 20 min bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Danach erfolgte erneut ein zweimaliger Waschschrift in 1x PBS (Zentrifugation bei 300 x g, 10 min, 4°C) und die Aufnahme des Pellets in 500 µl H<sub>2</sub>O bidest. + PIM (1:100). Das weitere Protokoll folgte dem der Protein-Isolation (3.3.1.). Anschließend wurden sämtliche Fraktionen (CF, MF, mit bzw. ohne Biotin) mit 0,2 Volumen gewaschen (viermal in 1x PBS, 2 min Magnet, Überstand verworfen) „*Streptavidin MyOne Microbeads*“ (Invitrogen) versetzt und für 4-6 h bei 4°C auf einem Rollrad inkubiert. Die Kügelchen wurden mit Hilfe des Magneten von der Lösung getrennt und 4-5 x mit 500 µl Waschpuffer I gewaschen (2 min Magnet, 1. Überstand behalten (die weiteren verwerfen), 6 min Rollrad). Nach dem letzten Waschschrift wurden die Kügelchen in 19,5 µl Waschpuffer 1 resuspendiert, und mit Probenpuffern für eine SDS-PAGE vorbereitet (vgl. 3.3.3.). Abweichend vom Protokoll wurden nach der Denaturierung der Proteine die Kügelchen mit Hilfe des Magneten abgetrennt und der Überstand auf das Gel geladen.

Danach erfolgten „Western Blot“ (3.3.4.), „Immunologischer Nachweis an Nitrozellulose gebundener Proteine“ (3.3.5.) und „Antikörpernachweis durch Chemilumineszenz“ (3.3.6.) wie oben angegeben.



### 3.3.8. Immuncytochemie

#### 3.3.8.1. Immuncytochemische Färbungen an (nicht-) aktivierten Zellen

Die unaktivierten bzw. aktivierten Zellen aus 3.1.3. wurden je nach Probe in einem Reaktionsgefäß vereint, dabei wurde von 200000 Zellen pro Well ausgegangen, und durch Zentrifugation (300 x g, 7 min, RT) sedimentiert. Das Pellet wurde in 1x PBS (100 µl/100000 Zellen) resuspendiert und auf Poly-D-Lysin beschichtete Deckgläschen (BD Bioscience) pipettiert. Nach ca. 20 min Inkubation bei RT konnte der PBS-Puffer vorsichtig abgesaugt werden. Das erfolgreiche Anheften der Zellen an die Deckglasoberfläche wurde unter einem Binokular (Wilovet) überprüft. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 150 µl Paraformaldehyd (4% in 1x PBS) für 10 min bei RT fixiert. Nach zwei Waschstritten (2 min Inkubation bei RT, danach absaugen) mit 1x PBS wurden die Zellen in 100 µl 1x PBS-Triton permeabilisiert (5 min, RT). Anschließend erfolgte das Blockieren unspezifischer Proteinbindungen mit 100 µl Blockierlösung III (20 min, RT). Nach 3 x Waschen in 1x PBS wurden die Zellen mit 100 µl Carrier-Lösung, die den ersten Antikörper enthielt, ü. N. bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Es folgten drei Waschstritte in 1x PBS und die Inkubation in 100 µl Carrier-Lösung mit dem zweiten, mit einem Farbstoff gekoppelten Antikörper (1 h, RT, Dunkelheit). Für die letzten drei Waschstritte wurde 1x PBS-Triton benutzt. Auf Objektträgern wurde in Abständen 5 µl-Aliquots der „*Anti-Fade-Mounting-Reagent*“ (Invitrogen) pipettiert und die Deckgläschen mit der zellbehafteten Seite nach unten vorsichtig aufgelegt, so dass der gesamte Zwischenraum luftblasenfrei mit der Reagenzlösung gefüllt war. Das Austrocknen der Reagenzlösung erfolgte bei RT ü. N. in Dunkelheit.

Anschließend wurden die Zellen unter einem konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop (Fluoview Fv1000, Olympus) mit einem 60x Öl-Immersions-Objektiv angeschaut und dokumentiert.

#### 3.3.8.2. Co-Färbung mit anti-Talin und anti-P2RX5-Antikörper

Für die Co-Lokalisationsanalyse von P2RX5 und Talin, musste mit Hilfe von FAB-Fragmenten eine „Spezies-Umpolung“ erfolgen, da beide Erst-Antikörper in Maus generiert waren. Generell wurde das Protokoll „Immuncytochemische Färbungen an (nicht-) aktivierten Zellen“ (3.3.8.1.) verfolgt. Abweichend wurde nach dem ersten 1. Antikörper (anti-Talin, Sigma) eine Inkubation mit Kaninchen-anti-Maus-FAB-Fragmenten (15 µg/ml; Dianova) in Carrier-Lösung (1 h, RT) durchgeführt. Die Zellen wurden gewaschen (dreimal in 1x PBS)

und das Protokoll ab dem Paraformaldehyd-Fixierungs-Schritt erneut durchgeführt. Als zweiter Erst-Antikörper wurde nun anti-P2RX5 (polyklonal, Abnova) eingesetzt und in der späteren Zweit-Antikörper-Inkubation sowohl ein anti-Kaninchen- als auch ein anti-Maus-Antikörper, jeweils gekoppelt an zwei unterschiedliche Farbstoffe (Alexa 488 und Alexa 546) benutzt. Als Kontrolle für die „Umpol-Reaktion“ dienten die zur Aktivierung benutzten Kügelchen. Diese waren mit Maus-Antikörpern beschichtet und fluoreszierten bei erfolgreicher Reaktion nur in dem Kanal, der dem Farbstoff entsprach, der an den anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt war.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Array-Analysen

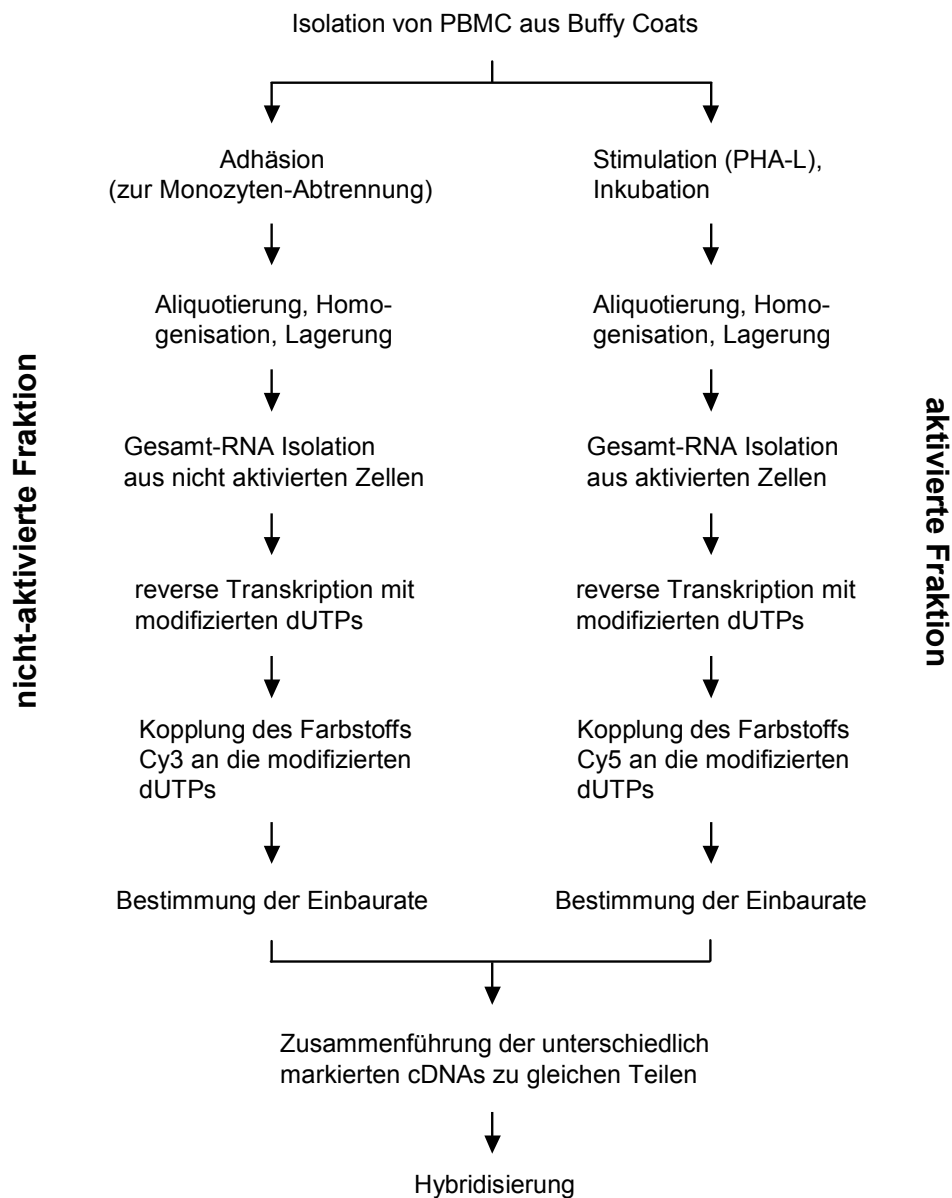
Die Analyse der Expression von Ionenkanalgenen in primären humanen Lymphozyten wurde in zwei Abschnitten durchgeführt. Zunächst wurden selbst hergestellte Arrays auf Glas verwendet, die Proben für 206 verschiedene Kanal- und akzessorische Untereinheiten, sowie für Kontrollen enthielten; anschließend wurde eine Analyse des kompletten Transkriptom der Lymphozyten mit Hilfe einer Affymetrix-Analyse durchgeführt. Ein Teil der Ergebnisse wurde mit quantitativer PCR validiert.

#### 4.1.1. cDNA-Gewinnung

Für die Array-Analysen wurde aus humanen Lymphozyten isolierte Gesamt-RNA benutzt, wobei in den Pilot-Experimenten nicht nach Lymphozyten-Subtypen unterschieden wurde. Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden durch eine Dichtegradientenzentrifugation als „Buffy Coats“ aus einem Zwischenprodukt bei der Blutkonservenherstellung gewonnen. Ein Teil der Zellen wurde, nachdem Monozyten durch einen Plastikadhäsionsschritt weitestgehend entfernt worden waren, in Aliquots von je  $1 \times 10^7$  Zellen pro ml Trizol homogenisiert, eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Dieser Teil diente zur Analyse des Transkriptom nicht aktivierter Lymphozyten. Der andere Teil wurde in Aliquots mit  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml RPMI-Komplettmedium (5 ml Endvolumen) mit 31,3 nM (3,6  $\mu\text{g/ml}$  Medium) Phytohemagglutinin (PHA-L) 72 h lang inkubiert um die Zellen zu aktivieren. Anschließend wurde diese Population ebenfalls in Aliquots von je  $1 \times 10^7$  Zellen pro ml Trizol homogenisiert und eingefroren. Den isolierten Gesamt-RNA-Gemischen aus den nicht-aktivierten bzw. aktivierten Zellen, wurde pro  $\mu\text{g}$  RNA 120 pg Kontroll-RNA zugegeben. Diese RNA stammte aus einer in vitro Transkription dreier verschiedener Maisgene (*ae I*; *DD1B* und *CE11*) und diente als interne Kontrolle einer erfolgreichen reversen Transkription der Lymphozyten-RNA in cDNA und für die Hybridisierung an den Arrays.

Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Hier wurden modifizierte Nukleotide in Form von aminoallyl-dUTP miteingebaut, um anschließend die cDNAs mit Cy3- oder Cy5-Farbstoff zu

koppeln. Generell wurde cDNA aus nicht-aktivierten Zellen mit Cy3 und die aus aktivierten Zellen mit Cy5 markiert. Zur Kontrolle wurden die Farbstoffe aber auch untereinander getauscht. Cy3 und Cy5 markierte cDNAs wurden zu gleichen Teilen (je 40-70 pmol) gemischt und zur Hybridisierung eingesetzt. Der methodische Ablauf ist schematisch in einem Fließschema in Abbildung 4-1 dargestellt.



**Abb. 4-1: Fließschema des methodischen Ablaufs zur Gewinnung markierter cDNAs**  
Gezeigt ist der generelle Ablauf von der Gewinnung der Zellen bis zum Einsatz der Hybridisierungsproben. Zur Kontrolle wurden die Farbstoffe getauscht.

### 4.1.2. Herstellung der Arrays auf Glas

Für die Herstellung der eigenen Arrays wurden die in Tabelle 4-1 aufgeführten Gene ausgewählt.

**Tab. 4-1: Aufstellung der für den eigenen Array ausgewählten Gene**

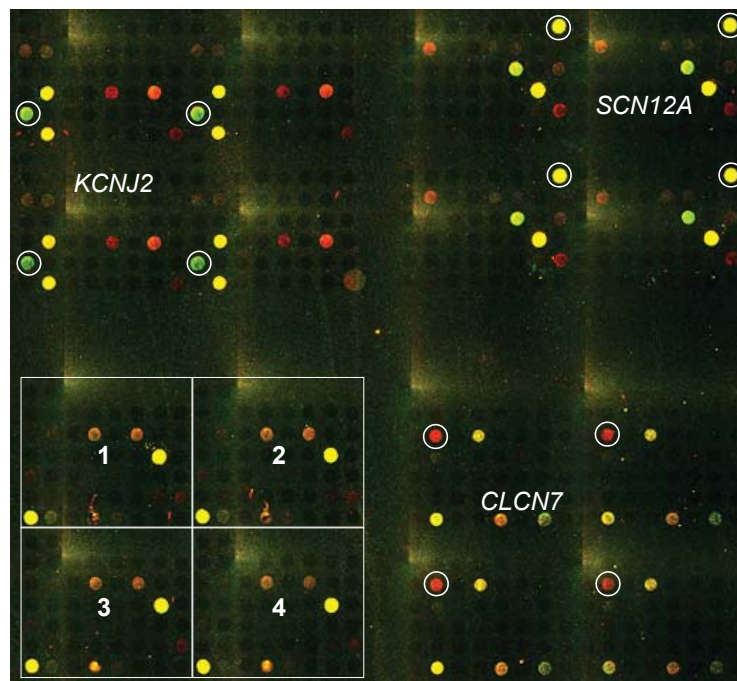
Die Tabelle zeigt alle Gene, für die Oligonukleotide hergestellt worden sind, die anschließend auf den Glas-Arrays als Hybridisierungs-Templates genutzt wurden.

Positiv-Kontrollproben	Negativ-Kontrollproben	„spiking“-Kontrollproben	Haushalts-genproben			andere Kanalgenproben		
<i>CD25</i>	<i>Amp</i>	<i>ae 1</i>	<i>GAPDH</i>	<i>PPIA</i>	<i>STIM1</i>			
<i>CD3</i>	<i>eGFP</i>	<i>DD1B</i>	<i>β-actin</i>	<i>RPLPO</i>	<i>HCN1</i>			
<i>CD69</i>	<i>Shaker</i>	<i>CE11</i>	<i>B-2M</i>	<i>TFRC</i>	<i>HCN2</i>			
<i>TCR</i>			<i>GUSB</i>	<i>TBP</i>	<i>HCN3</i>			
			<i>HPRT1</i>	<i>18S rRNA</i>	<i>HCN4</i>			
			<i>PGK1</i>					
<b>Kalium-Kanalgenproben</b>								
<i>DPPX</i>	<i>KCNAB2</i>	<i>KCNE1</i>	<i>KCNH2</i>	<i>KCNIP4</i>	<i>KCNJ12</i>	<i>KCNK7</i>	<i>KCNMB3</i>	<i>KCNRG</i>
<i>KCMF1</i>	<i>KCNAB3</i>	<i>KCNE1L</i>	<i>KCNH2-</i>	<i>KCNJ1</i>	<i>KCNJ13</i>	<i>KCNK9</i>	<i>KCNMB4</i>	<i>KCNS1</i>
<i>KCNA1</i>	<i>KCNB1</i>	<i>KCNE2</i>	<i>USO</i>	<i>KCNJ2</i>	<i>KCNJ14</i>	<i>KCNK10</i>	<i>KCNN1</i>	<i>KCNS2</i>
<i>KCNA2</i>	<i>KCNB2</i>	<i>KCNE3</i>	<i>KCNH3</i>	<i>KCNJ3</i>	<i>KCNJ15</i>	<i>KCNK12</i>	<i>KCNN2</i>	<i>KCNS3</i>
<i>KCNA3</i>	<i>KCNC1</i>	<i>KCNE4</i>	<i>KCNH4</i>	<i>KCNJ4</i>	<i>KCNJ16</i>	<i>KCNK13</i>	<i>KCNN3</i>	<i>KCNT1</i>
<i>KCNA4</i>	<i>KCNC2</i>	<i>KCNF1</i>	<i>KCNH5</i>	<i>KCNJ5</i>	<i>KCNK1</i>	<i>KCNK15</i>	<i>KCNN4</i>	<i>KCNU1</i>
<i>KCNA5</i>	<i>KCNC3</i>	<i>KCNG1</i>	<i>KCNH6</i>	<i>KCNJ6</i>	<i>KCNK2</i>	<i>KCNK16</i>	<i>KCNQ1</i>	<i>KCNV1</i>
<i>KCNA6</i>	<i>KCNC4</i>	<i>KCNG2</i>	<i>KCNH7</i>	<i>KCNJ8</i>	<i>KCNK3</i>	<i>KCNK17</i>	<i>KCNQ2</i>	<i>KCNV2</i>
<i>KCNA7</i>	<i>KCND1</i>	<i>KCNG3</i>	<i>KCNH8</i>	<i>KCNJ9</i>	<i>KCNK4</i>	<i>KCNMA1</i>	<i>KCNQ3</i>	<i>KCR1</i>
<i>KCNA10</i>	<i>KCND2</i>	<i>KCNG4</i>	<i>KCNIP2</i>	<i>KCNJ10</i>	<i>KCNK5</i>	<i>KCNMB1</i>	<i>KCNQ4</i>	
<i>KCNAB1</i>	<i>KCND3</i>	<i>KCNH1</i>	<i>KCNIP3</i>	<i>KCNJ11</i>	<i>KCNK6</i>	<i>KCNMB2</i>	<i>KCNQ5</i>	
<b>Calcium-Kanalgenproben</b>								
<i>CACNA1A</i>	<i>CACNA1D</i>	<i>CACNA1G</i>	<i>CACNA1S</i>	<i>CACNA2D3</i>	<i>CACNB2</i>	<i>CACNG1</i>	<i>CACNG4</i>	<i>CACNG7</i>
<i>CACNA1B</i>	<i>CACNA1E</i>	<i>CACNA1H</i>	<i>CACNA2D1</i>	<i>CACNA2D4</i>	<i>CACNB3</i>	<i>CACNG2</i>	<i>CACNG5</i>	<i>CACNG8</i>
<i>CACNA1C</i>	<i>CACNA1F</i>	<i>CACNA1I</i>	<i>CACNA2D2</i>	<i>CACNB1</i>	<i>CACNB4</i>	<i>CACNG3</i>	<i>CACNG6</i>	
<b>Chlorid-Kanalgenproben</b>					<b>Natrium-Kanalgenproben</b>			
<i>CLCA1</i>	<i>CLCN1</i>	<i>CLCN5</i>	<i>CLCNKB</i>	<i>SCN1A</i>	<i>SCN3A</i>	<i>SCN5A</i>	<i>SCN10A</i>	<i>SCNN1A</i>
<i>CLCA2</i>	<i>CLCN2</i>	<i>CLCN6</i>	<i>CLNS1A</i>	<i>SCN1B</i>	<i>SCN3B</i>	<i>SCN7A</i>	<i>SCN11A</i>	<i>SCNN1B</i>
<i>CLCA3</i>	<i>CLCN3</i>	<i>CLCN7</i>	<i>CLNS1B</i>	<i>SCN2A2</i>	<i>SCN4A</i>	<i>SCN8A</i>	<i>SCN12A</i>	<i>SCNN1D</i>
<i>CLCA4</i>	<i>CLCN4</i>	<i>CLCNKA</i>		<i>SCN2B</i>	<i>SCN4B</i>	<i>SCN9A</i>	<i>SCNM1</i>	<i>SCNN1G</i>
<b>TRP (transient receptor potential)-Kanalgenproben</b>								
<i>TRPA1</i>	<i>TRPC3</i>	<i>TRPC5</i>	<i>TRPM1</i>	<i>TRPM4</i>	<i>TRPM7</i>	<i>TRPV2</i>	<i>TRPV5</i>	
<i>TRPC1</i>	<i>TRPC4</i>	<i>TRPC6</i>	<i>TRPM2</i>	<i>TRPM5</i>	<i>TRPM8</i>	<i>TRPV3</i>	<i>TRPV6</i>	
<i>TRPC2</i>	<i>TRPC4AP</i>	<i>TRPC7</i>	<i>TRPM3</i>	<i>TRPM6</i>	<i>TRPV1</i>	<i>TRPV4</i>		

Neben den Ionenkanalgenen wurden mehrere Kontrollen benutzt. Diese sind in der Tab. 4-1 als „spiking“-Kontrolle (drei Mais-Gene), als Positiv-Kontrolle (vier Aktivierungskontrollen) und als Negativ-Kontrollen (organismusfremde Gene) bezeichnet.

Für jedes Gen wurde ein spezifisches 68-70 bp Oligonukleotid als Template für die Hybridisierung ausgesucht. Die einzelsträngigen Oligonukleotide wurden kommerziell

bezogen (s. Material und Methoden). Die Sequenzen waren so gewählt, dass die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Oligonukleotid-cDNA Fragmente in einem Bereich von  $78,5^\circ\text{C} \pm 2,5^\circ\text{C}$  lag. Die Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von  $30 \mu\text{M}$  in Betain-Puffer auf die mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasträger maschinell aufgebracht. Es wurden pro Oligonukleotid 4 Replikate gedruckt. Nach Trocknung, Vernetzung und Blockierung der Glasträger in einer staubfreien Umgebung wurden sie für die Hybridisierung mit cDNAs eingesetzt. Nach der Hybridisierung wurden die Fluoreszenzen der Farbstoffe bei  $635 \text{ nm}$  (Cy5) bzw.  $532 \text{ nm}$  (Cy3) gemessen. In Abbildung 4-2 ist das Ergebnis einer Hybridisierung beispielhaft gezeigt.



**Abb. 4-2: „Falschfarben“-Darstellung der Signale nach der Hybridisierung**

Dargestellt sind die Signalintensitäten für die mit den Farbstoffen Cy3 (grün) und Cy5 (rot) markierten cDNAs in Falschfarben. Genproben, die ausschließlich ein Signal in der nicht-aktivierten Fraktion zeigen, erscheinen dunkelgrün (z. B. *KCNJ2*), während die Farbe rot Genproben (z. B. *CLCN7*) anzeigt, die nur in der aktivierten Fraktion ein Hybridisierungssignal ergaben. Identische Signalintensitäten in beiden Fraktionen werden in gelb (z. B. *SCN12A*) wiedergegeben. Jede Template-cDNA wurde viermal aufgetragen, wodurch sich die wiederkehrenden Hybridisierungsmuster, illustriert durch die Quadrate 1-4, ergeben.

Zur besseren Darstellung wurden die in unterschiedlichen Graustufen erhaltenen Hybridisierungsintensitäten in Farbsignale umgewandelt. Hierbei wurde für Cy3-Signale grün, für Cy5-Signale rot gewählt. Daraus resultierte die in Abbildung 4-2 gezeigte „Falschfarben“-Darstellung, welche ein typisches Rohdatenbild zeigt. Jeder Farbpunkt in

Abbildung 4-2 gibt die Hybridisierung an eine entsprechende Genprobe an. Jede Genprobe wurde in vierfacher Kopie aufgebracht, um eventuelle Ausfälle eines einzelnen Spots kompensieren zu können.

Als Beispiele für die unterschiedlichen Regulationen wurden drei Gene herausgestellt. Unbeeinflusste Genexpression (z. B. der Natriumkanal *SCN12A*) ist in gelb dargestellt. Wurde ein Gen in stimulierten Lymphozyten höher exprimiert, überwog der rote Farbstoff (z. B. *CLCN7*); wurde ein Gen weniger exprimiert, erschien der Spot grün (z. B. *KCNJ2*). Der Scan-Vorgang gab die Hybridisierungsergebnisse lediglich als schwarz-weiß Bild wieder, in dem die Signale je nach Stärke in unterschiedlich dunklen Grautönen dargestellt wurden. Anschließend wurde die Stärke der Signale mit Hilfe des Programms „ScanAlyze“ (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>) in relative Fluoreszenzintensitätseinheiten umgewandelt.

#### 4.1.3. Analyse der Array-Daten

Zur Normalisierung der Rohdaten der Cy3- und Cy5-markierten Fraktionen wurden die Signalintensitäten von zugemischten Mais-Proben (*ael*; *DDIB*; *CE11*) genutzt. Ursprünglich war vorgesehen, auch Standardgene zur Normalisierung zu verwenden. Unerwarteterweise zeigten die Ergebnisse, dass die ausgewählten Standardgene mit Aktivierung der Lymphozyten ihre Expression veränderten und deshalb nicht verwendet werden konnten. So wurden zunächst die Signalwerte der drei Maisgenproben im unstimulierten Zustand mit denen des stimulierten Zustands verglichen und jeweils der Quotient „stimuliert/unstimuliert“ für jedes der drei Maisgene gebildet. Die Quotienten wurden gemittelt und der erhaltene Mittelwert als Faktor für die weitere Normalisierung genutzt. Mit Hilfe dieses Normalisierungsfaktors konnten Signalunterschiede der verschieden markierten cDNAs ausgeglichen werden.

Anschließend wurde mit Hilfe von Gleichung (1) die n-fache Expressionsänderung (n) errechnet, indem die Signalwerte der aktivierten Fraktion ( $F_{\text{akt., norm.}}$ ) durch die der nicht-aktivierten ( $F_{\text{n.akt., norm.}}$ ) geteilt wurde:

$$n = \frac{F_{\text{akt., norm.}}}{F_{\text{n.akt., norm.}}} \quad \text{Gleichung (1)}$$

Für die weitere Auswertung wurden Kriterien festgelegt, die ein Hybridisierungsergebnis erfüllen musste, um in die Analyse miteinbezogen zu werden.

1. Die Signalintensität einer Genprobe musste mindestens in einem der Aktivierungszustände der Lymphozyten  $\geq 1,5\%$  der Maximalsignalstärke des Arrays betragen. Nur dann galt das Gen als exprimiert.

2. Das Gen musste in mindestens 75% der durchgeführten Analysen ( $n = 14$ ) als exprimiert gelten.

Zu berücksichtigen blieb, dass aufgrund der gewählten Strategie, die PBMC zunächst nicht weiter aufzutrennen, Expressionsänderungen kleinerer Subpopulationen nicht nachgewiesen werden konnten.

In Tabelle 4-2 sind die Ergebnisse der gefundenen Expressionsänderungen zusammengefasst. Wie die Daten aus den ersten Array-Analysen (s. Tab. 4-2) zeigten, wurde die Mehrzahl (180) der insgesamt untersuchten Gene (206) als nicht exprimiert eingestuft. Von den 18 aktiven Ionenkanalgenen zeigten 13 keine Aktivitätsänderung. Die Werte wichen nicht wesentlich von  $n = 1,0$  ab, was als gleich bleibende Expression (unbeeinflusst) in aktivierten bzw. unaktivierten Lymphozyten definiert wurde. Als erhöht exprimiert wurden Gene definiert, wenn  $n \geq 2,0$  war; gleichermaßen galten Genaktivitäten als herunterreguliert, wenn die  $n$ -fache Expressionsänderung mindestens halbiert und dementsprechend  $n \leq 0,5$  war.



**Tab. 4-2: Expressionsänderungen von Ionenkanalgenen nach Aktivierung humaner Lymphozyten**

Tabelliert sind die gemittelten Expressionsänderungen  $n$  (s. Gleichung (1)) für 26 Gene. Die Gene wurden in mindestens elf der 14 Analysen (\*Stim1: drei von drei Analysen) als exprimiert eingestuft. Neben der mittleren Expressionsänderung  $n$  ist jeweils der mittlere Fehler (S.E.M.) angegeben.

	<b>Gen</b>	<b>n</b>	<b>S.E.M.</b>		<b>Gen</b>	<b>n</b>	<b>S.E.M.</b>
<b>Kontrollen</b>	<i>ae I</i>	1,01	± 0,03	<b>Zielgene</b>	<i>CACNA1C</i>	0,82	± 0,16
	<i>CE11</i>	0,93	± 0,05		<i>CACNA1E</i>	0,96	± 0,15
	<i>DD1B</i>	0,94	± 0,07		<i>CLCN3</i>	1,56	± 0,34
	<i>CD25</i>	26,80	± 8,32		<i>CLCN7</i>	2,09	± 0,32
	<i>CD3</i>	2,81	± 0,41		<i>CLNS1A</i>	2,49	± 0,38
	<i>CD69</i>	0,43	± 0,06		<i>CLNS1B</i>	0,84	± 0,08
	<i>TCR</i>	1,35	± 0,15		<i>HCN2</i>	1,82	± 0,48
	<i>GAPDH</i>	1,65	± 0,32		<i>KCMF1</i>	1,66	± 0,20
					<i>KCNA3</i>	0,81	± 0,16
			<i>KCNAB2</i>		2,19	± 0,39	
			<i>KCNG3</i>		1,16	± 0,23	
			<i>KCNJ2</i>		0,29	± 0,05	
			<i>KCNQ2</i>		1,01	± 0,15	
			<i>SCN12A</i>		0,91	± 0,07	
			<i>STIM1</i>		3,40*	± 0,48	
			<i>TRPC4AP</i>		1,73	± 0,27	
			<i>TRPM7</i>	1,28	± 0,23		
			<i>TRPV1</i>	1,41	± 0,28		
			<i>TRPV2</i>	2,02	± 0,30		

Während die Aktivierungsmarker *CD25* und *CD3* eine ca. 30-fach bzw. ca. dreifach erhöhte Expression nach Aktivierung zeigten, konnte bei vier Ionenkanalgenen eine Verdoppelung der Expression gemessen werden.

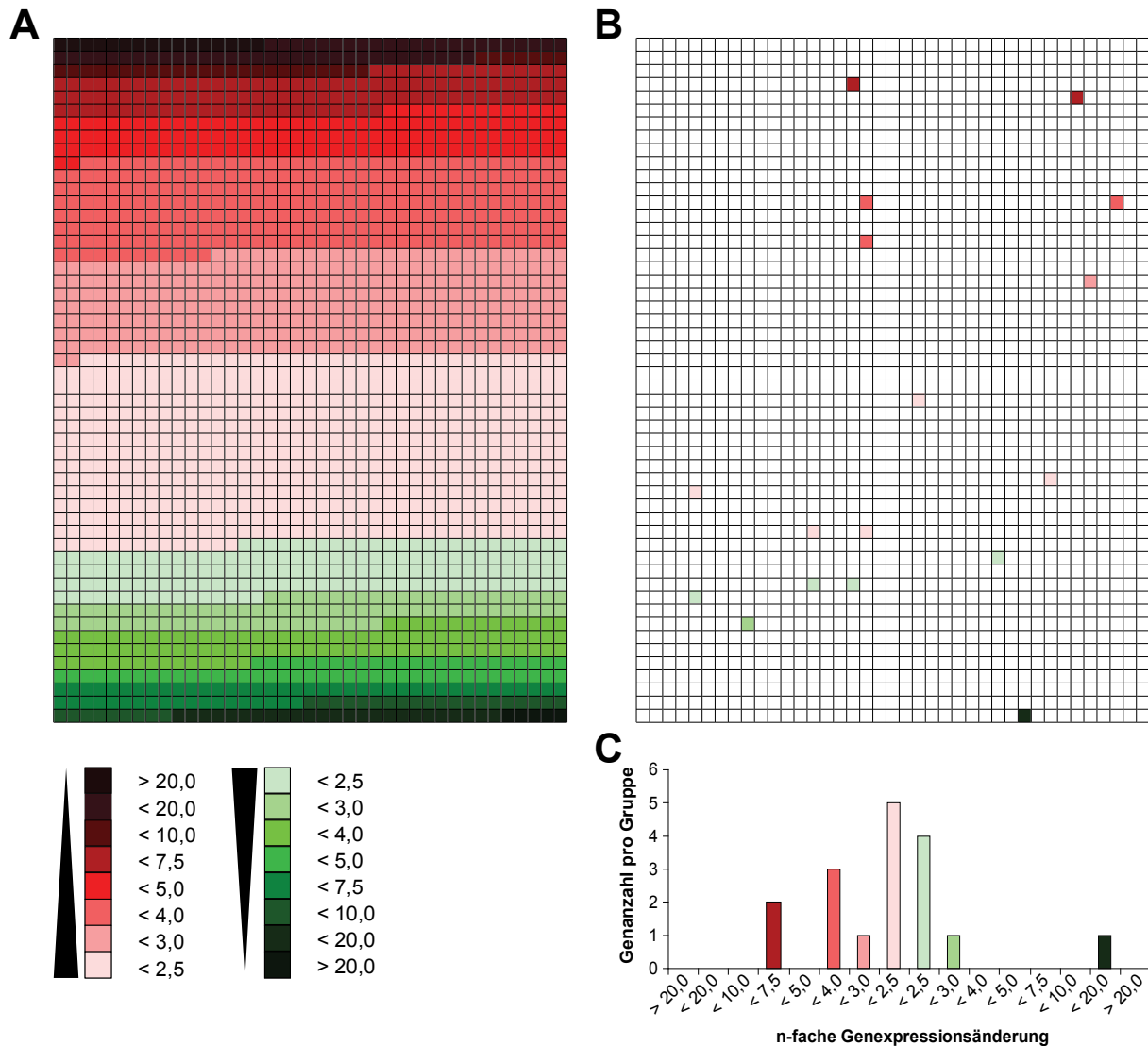
Dies waren die Gene für die Chloridkanäle *CLCN7* und *CLNS1A*, die akzessorische Kaliumkanaluntereinheit *KCNAB2* (*K<sub>v</sub>β2*) sowie den TRP-(*Transient-Rezeptor-Potential*) Kanal *TRPV2*. Als herunterreguliert wurde das Gen für *KCNJ2*, der Untereinheit eines einwärts rektifizierenden Kaliumkanals *KCNJ2* klassifiziert, das eine um den Faktor drei verminderte Expression aufwies. Zusätzlich konnte für das erst später zugefügte *STIM1*, für das eine Rolle in der  $Ca^{2+}$ -Antwort identifiziert wurde (Roos *et al.*, 2005; Liou *et al.*, 2005), eine deutlich erhöhte Expression bei  $n = 3$  Experimenten gefunden werden.

## 4.2. Affymetrix-Arrays

Im Anschluss an die Arrays auf Glas wurden Affymetrix-Chips (human U133A 2.0) benutzt, um die erhaltenen Daten auf einer unabhängigen zweiten Plattform zu verifizieren. Zugleich ergab dieser Validierungsschritt auch die Möglichkeit, die Analyse um eine Vielzahl an Genen zu erweitern. Die Herstellung der Sonden, die Hybridisierung auf den Chips, sowie die Detektion der Signale erfolgte durch das Institut für Integrierte Funktionelle Genomik (IFG) in Münster.

Die Rohdaten wurden mittels des Auswerteprogramms „*Array Assist*“ der Firma Stratagene zunächst normalisiert; im Anschluss erfolgte die Ermittlung der Expressionsänderungen aller auf dem Chip vorhandenen Gene. In die weitere Auswertung gingen nur Gene mit ein, die die Schwellenwerte für  $n$  von 0,5 bzw. 2,0 unter- bzw. überschritten, sowie eine signifikante Expressionsänderung mit  $p \leq 0,005$  zeigten. Die Ergebnisse zeigten, dass 1496 Gene signifikant heraufreguliert und 532 Gene herunterreguliert waren. Alle Gene wurden mit Hilfe des Programms „*Pathway Architect*“ kategorisiert und in „*Gene Ontology*“ (GO) Gruppen eingeordnet. Die Gene, die in die Gruppe „Ionenkanal-Aktivität“ geordnet wurden, waren der Ausgang für weitere Analysen. Eine Übersicht der signifikant unterschiedlich regulierten Gene zeigt Abbildung 4-3.

Die Abbildung zeigt zwei identische Rechtecke, in denen jedes Kleinquadrat für ein Gen steht. Im linken Rechteck wurde jedes Quadrat eingefärbt. Dies erfolgte nach Richtung der Expressionsänderung (heraufreguliert-rot; herunterreguliert-grün) und gleichzeitig nach relativer  $n$ -facher Expressionsänderung in Form von Farbintensitätsunterschieden. So zeigt ein dunkles Grün eine hohe Herunterregulation, während ein helles Rot für eine mäßige bzw. kleine Expressionserhöhung steht. Das rechte Rechteck hingegen zeigt nur Expressionsänderungen der Gene (insgesamt 17), die in den GO-Term „Ionenkanal-Aktivität“ gruppiert wurden. Dies sind insgesamt 17 Gene, von denen eines sehr stark herunter- und sechs heraufreguliert ( $> 3$ -fach) wurden (Abb. 4-3 B, C). In Tabelle 4-3 finden sich diese Gene mit einer zugehörigen Beschreibung, sowie der relativen  $n$ -fachen Expressionsänderung der Affymetrix-Analyse. Zusätzlich wurde auch die Änderung eingetragen, welche in den eigenen Array-Analysen gefunden wurde.



**Abb. 4-3: Übersicht der laut Affymetrix-Analyse signifikant unterschiedlich regulierten Gene**

Jedes Quadrat symbolisiert ein Gen. (A) Je nach Herauf- bzw. Herunterregulation wurde dieses in Rot- bzw. Grüntönen eingefärbt. Die Intensität der jeweiligen Farbe spiegelt dabei die Größe der n-fachen Expressionsänderung wider. (B) Das zweite Diagramm symbolisiert dieselben Gene wie das linke, allerdings wurden hier nur die Quadrate eingefärbt, die Gene zeigen, welche in den GO-Term „Ionenkanal-Aktivität“ gruppiert wurden. (C) zeigt die Verteilung der Gene in den jeweiligen Gruppen.

Wie Tabelle 4-3 zeigt, war die Expression von 17 Genen, die laut „Gene Ontology“-Datenbank in die Gruppe „Ionenkanal-Aktivität“ eingeordnet sind, nach Aktivierung verändert. Vier (*ATP5A1*, *AVEN*, *CYBB* und *NOLAI*) der 17 Gene zeigen allerdings keine Kanal-Aktivität und wurden nicht weiter untersucht. Auffällig war, dass in den Affymetrix-Analysen keiner der TRP-Kanäle als exprimiert zu finden war. Lediglich *TRPC4AP* war schwach exprimiert, allerdings, wie sich auch schon in den Glas-Array Analysen zeigte, nicht unterschiedlich reguliert. Die Untereinheit *Orai1*, welche den CRAC-Kanal bildet, und bei

der Aktivierung von Lymphozyten extrem heraufreguliert wird, war nicht auf dem Array präsent.

**Tab. 4-3: Veränderte Expression von Genen aus der Gruppe „Ionenkanal-Aktivität“**

Die Tabelle zeigt zu jedem Gen eine Beschreibung seiner Funktion sowie die n-fach veränderte Expression für Affymetrix-Analyse ( $n_{\text{Affy}}$ ), sowie – wenn vorhanden – für die eigenen Arrays ( $n_{\text{eigen}}$ ). Markiert (\*) sind Änderungen, welche in weniger als 75% der Analysen ein Signal zeigten.

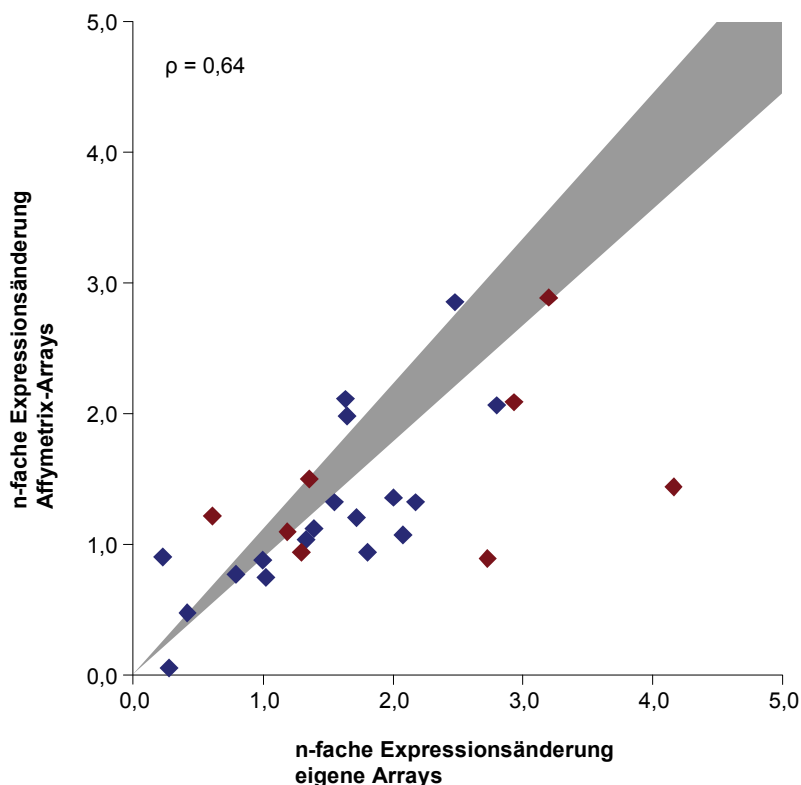
Gen	Beschreibung	$n_{\text{Affy}}$	$n_{\text{eigen}}$
<i>ATP5A1</i>	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1, cardiac muscle	2.34	
<i>AVEN</i>	apoptosis, caspase activation inhibitor	3.46	
<i>CLIC3</i>	chloride intracellular channel 3	0.35	
<i>CLIC4</i>	chloride intracellular channel 4	0.42	
<i>CLIC5</i>	chloride intracellular channel 5	5.40	
<i>CYBB</i>	cytochrome b-245, beta polypeptide (chronic granulomatous disease)	0.36	
<i>ITPR1</i>	inositol 1, 4,5-triphosphate receptor, type 1	6.23	
<i>ITPR2</i>	inositol 1, 4,5-triphosphate receptor, type 2	3.11	
<i>KCNJ2</i>	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2	0.06	0.29
<i>KCNMB1</i>	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1	0.43	0.39*
<i>KCNN4</i>	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4	2.02	2.40*
<i>NOLA1</i>	nucleolar protein family A, member 1 (H/ACA small nucleolar RNPs)	2.13	
<i>P2RX1</i>	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1	0.46	
<i>P2RX5</i>	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 5	3.39	
<i>PKD2</i>	polycystic kidney disease 2 (autosomal dominant)	2.13	
<i>VDAC2</i>	voltage-dependent anion channel 2	2.02	
<i>VDAC3</i>	voltage-dependent anion channel 3	2.81	

In den Affymetrix-Analysen wurde auch *KCNN4* (*IKCa1*) gefunden. Das Gen kodiert für eine Untereinheit eines calciumaktivierten Kaliumkanals. Elektrophysiologische Messungen konnten zeigen, dass bei Lymphozytenstimulation die Anzahl dieses Kanals in der Plasmamembran zunimmt (Cahalan *et al.*, 2001).

Für *KCNA3*, welches für eine Untereinheit eines spannungsabhängigen Kaliumkanals kodiert, wurde eine erhöhte Anzahl der Kanäle in aktivierten Lymphozyten gezeigt

(Cahalan *et al.*, 2001). Allerdings zeigte weder die Glasarray-, noch die Affymetrix-Analyse eine Erhöhung von *KCNA3*-mRNA.

Die Ergebnisse der Glas-Arrays bzw. der Affymetrix-Chips wurden in Abb. 4-4 gegenübergestellt. In die Gegenüberstellung wurden alle Gene miteinbezogen, die in mindestens 75% der Analysen ein Signal zeigten, welches  $\geq 1,5$  % der Maximalsignalstärke des Arrays betragen musste. Außerdem wurden auch neun so genannte „Haushaltsgene“ miteinbezogen.



#### Abb. 4-4: Gegenüberstellung der eigenen und der Affymetrix-Array-Ergebnisse

Aufgetragen sind n-fache Expressionsänderungen der eigenen Arrays gegen die Affymetrix-Arrays. Blaue Rauten geben Zielgene an, rote Rauten zeigen Kontrollen („Haushaltsgene“). Die grau-unterlegte Fläche gibt den Bereich wieder, wenn Affymetrix- und eigene Arrays identische Resultate liefern. Hierbei wurde ein mittlerer Fehler von 10% berücksichtigt.  $\rho$  gibt die Korrelation der Daten an.

Die Daten zeigen eine Pearson-Korrelation von  $p = 0,64$ . Auffällig ist bei diesem Vergleich, dass einige (36%) Gene in der Analyse der eigenen Arrays eine um den Faktor 1,7 größere n-fache Expressionsänderung als in der Affymetrix-Analyse zeigten. Bei vier Genen wurden deutlich unterschiedliche Ergebnisse erhalten. Das Calciumkanalgen *CACNA1C* und das

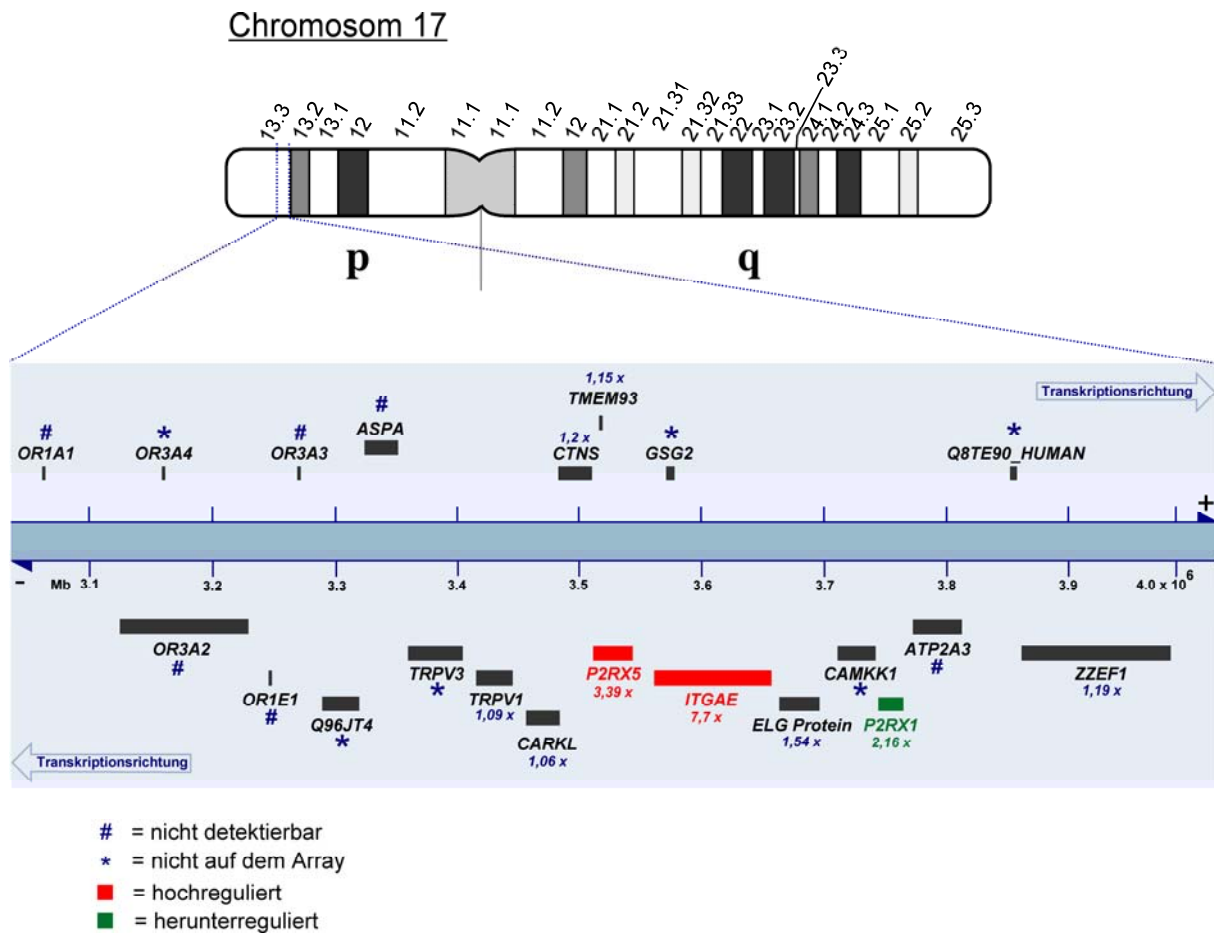
Phosphoglyceratkinase *PGK1*-Gen zeigten einen deutlich höheren Wert für n in der Affymetrix-Analyse, die Gene für Peptidyl-Prolyl-Isomerase *PPIA* bzw. TATA-Box-Bindeprotein *TBP* einen deutlich niedrigeren.

Bemerkenswerterweise gehören *PGK1*, *PPIA* und *TBP* zu den Konotrollgenen, die ursprünglich zur Normalisierung der Rohdaten verwendet werden sollten. Im weiteren Verlauf der Analysen wurden deshalb diese Kontrollgene nicht zur Normalisierung verwendet, sondern exogen definiert zugesetzte Genproben (z. B. *ae I*).

Der Vergleich in Tabelle 4-3 zeigt, dass in der Affymetrix-Analyse die Aktivierung weiterer Ionenkanalgene gefunden wurde. Neben intrazellulären Chloridkanälen der CLIC-Familie fanden sich zwei Gene (*ITPR1* und *ITPR2*) für IP<sub>3</sub>-Rezeptoren, die eine wichtige Rolle in der Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher einnehmen (Khan *et al.*, 1992). Diese sind ebenfalls in ihrer Expression deutlich heraufreguliert.

Zusätzlich fanden sich zwei Mitglieder der P2X-Rezeptor-Familie, von denen eines, das *P2RX1*-Gen, ca. 2,2-fach herunter-, und das zweite, das *P2RX5*-Gen, ca. 3,4-fach heraufreguliert war. Aktiviert werden die Kanäle der P2X-Kanalfamilie durch extrazelluläres ATP (North, 2002). Interessanterweise wird in der Literatur eine Rolle für ATP bei Aktivierung von Lymphozyten diskutiert (Di Virgilio *et al.*, 2001). Deshalb wurde den *P2RX1*- und *P2RX5*-Genen in den weiteren Analysen besondere Aufmerksamkeit zuteil.

Die beiden Gene befinden sich auf Chromosom 17, Abschnitt p13.3, in relativer Nachbarschaft (Abb. 4-5).



**Abb. 4-5: Schematische Darstellung der Genanordnung im Locus Chr. 17 p13.3**

Vergrößerung der Anordnung der Gene des + und – Stranges. Die Ziffern unter den Gennamen geben die Herauf- (rot) bzw. Herunterregulation (grün) der Gene laut Affymetrix-Analyse an.

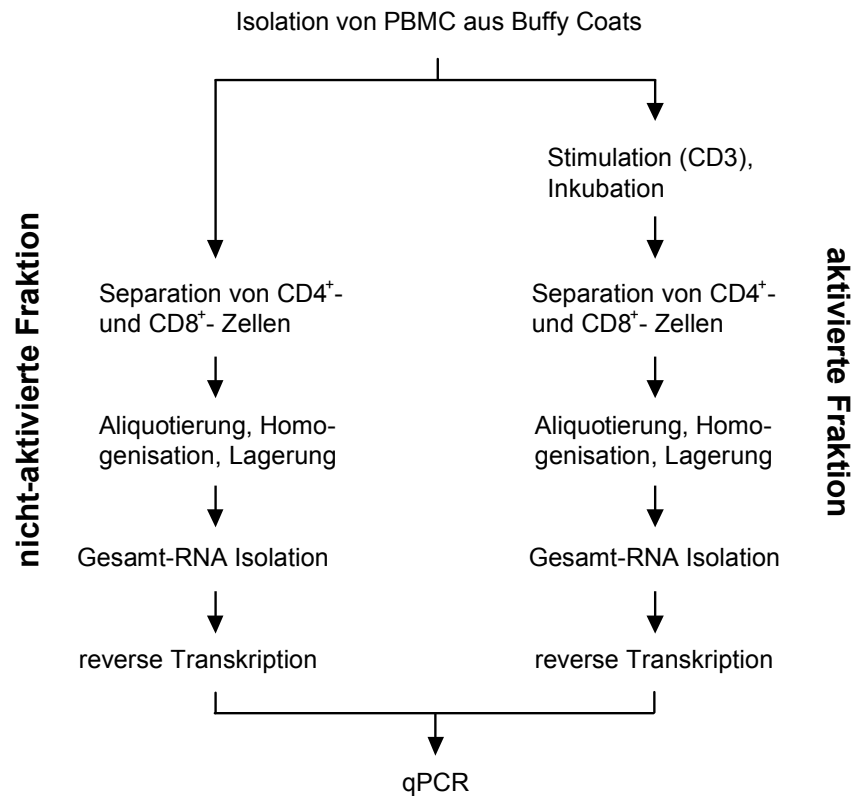
In demselben Chromosomenabschnitt finden sich auch die Gene für *TRPV1*, welches entsprechend der eigenen Arrays bei der Lymphozytenaktivierung exprimiert wird, *TRPV3* und in unmittelbarer Nachbarschaft zum *P2RX5*-Gen das *ITGAE*-Gen, dessen Expression um den Faktor 7,7 heraufreguliert wurde und welches für das Integrin  $\alpha_E$  kodiert. Integrine spielen für den Zell-Zell-Kontakt eine wichtige Rolle und sind somit auch für die Interaktionen zwischen APZ und Lymphozyten selbst unerlässlich (Pribila *et al.*, 2004).

### 4.3. Quantitative PCR

Die Möglichkeit, dass die beiden benachbarten Gene *P2RX5* und *ITGAE* gemeinsam reguliert werden, wurde bei den folgenden qPCR-Analysen untersucht. In diese Untersuchungen wurden die auf Chromosom 17 p13.3 benachbarten Gene *P2RX1*, *TRPV1* und *TRPV3* miteinbezogen. Zusätzlich wurden aufgrund der Array-Ergebnisse *TRPV2* und *KCNJ2* (s. Tab. 4-2 und Tab. 4-3) untersucht. Als Kontrollen dienten *P2RX4*, welches bei der Aktivierung von Lymphozyten keiner Expresssionsänderung unterliegt (North und Surprenant, 2000), sowie die Gene *CD25* und *CD247* (*CD3Z*), die für den Interleukin-2-Rezeptor (alpha-Kette) bzw. für einen Teil des T-Zell-Rezeptorkomplexes kodieren. Um zu untersuchen, ob in  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -Zellen *P2RX5* und *ITGAE* in ähnlicher oder unterschiedlicher Weise reguliert wurden, wurden die Analysen mit beiden T-Zellsubtypen separat durchgeführt.

Nachdem PBMC aus den Buffy Coats isoliert worden waren, wurde ein Teil der Zellen ihren Subtypen nach in  $CD4^+$ - bzw.  $CD8^+$ - Zellen separiert. Für die Separation wurde das MACS-System (Miltenyi) verwendet. Um eine vorzeitige Aktivierung der Zellen zu vermeiden, wurde dem PBMC-Zellgemisch ein Antikörper-Cocktail zugegeben, der gegen jeden Zelltyp, mit Ausnahme des zu isolierenden, einen Antikörper enthielt, der an ein magnetisches Kügelchen gekoppelt war. Die Zellen wurden dann mit einem Magneten abgetrennt und als nicht aktivierte Fraktion definiert. Ein anderer Teil der PBMC wurde mit PHA-L aktiviert. Nach 72 h wurden  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -Zellen voneinander separiert. Anschließend wurde aus jeder der vier Proben ( $CD4^+$  /  $CD8^+$ , akt./nicht-akt.) RNA isoliert. Zur Normalisierung der qPCR wurde den Proben Mais-RNA des *ae I*-Gens (50 pg/Ansatz) als exogene Kontrolle zugegeben. Der methodische Ablauf ist in Abbildung 4-6 schematisch zusammengefasst.





**Abb. 4-6: Fließschema des methodischen Ablaufs bis zur qPCR**

Gezeigt ist der generelle Ablauf von der Gewinnung der Zellen bis zur qPCR.

Bei der Ermittlung des „Cycle threshold“ (Ct) des *ae I*-Referenzgens stellte sich heraus, dass das Gen *CD247*, welches für einen Teil des T-Zell-Rezeptorkomplexes kodiert, einer gleichbleibenden unregulierten Expression unterlag. Aus diesem Grunde wurde es als interne Normalisierungskontrolle genutzt. Die folgenden Analysen wurden dementsprechend mit *CD247* als internem Normalisierungs- und Referenzgen durchgeführt.

Die n-fache Expressionsänderung der untersuchten Gene wurde nach einem Standardprotokoll nach Gleichung (2) berechnet:

$$n = 2^{-\Delta\Delta C} \quad \text{Gleichung (2)}$$

wobei:

$$\Delta\Delta C = \Delta C_{\text{akt}} - \Delta C_{\text{n.akt}} \quad \text{Gleichung (3)}$$

und:

$$\Delta Ct_{akt} = Ct_{X, akt} - Ct_{Ref, akt} \quad \text{Gleichung (4)}$$

$$\Delta Ct_{n.akt} = Ct_{X, n.akt} - Ct_{Ref, n.akt} \quad \text{Gleichung (5)}$$

ist.

$n$  = n-fache Expressionsänderung, bezogen auf das Referenzgen *CD247*

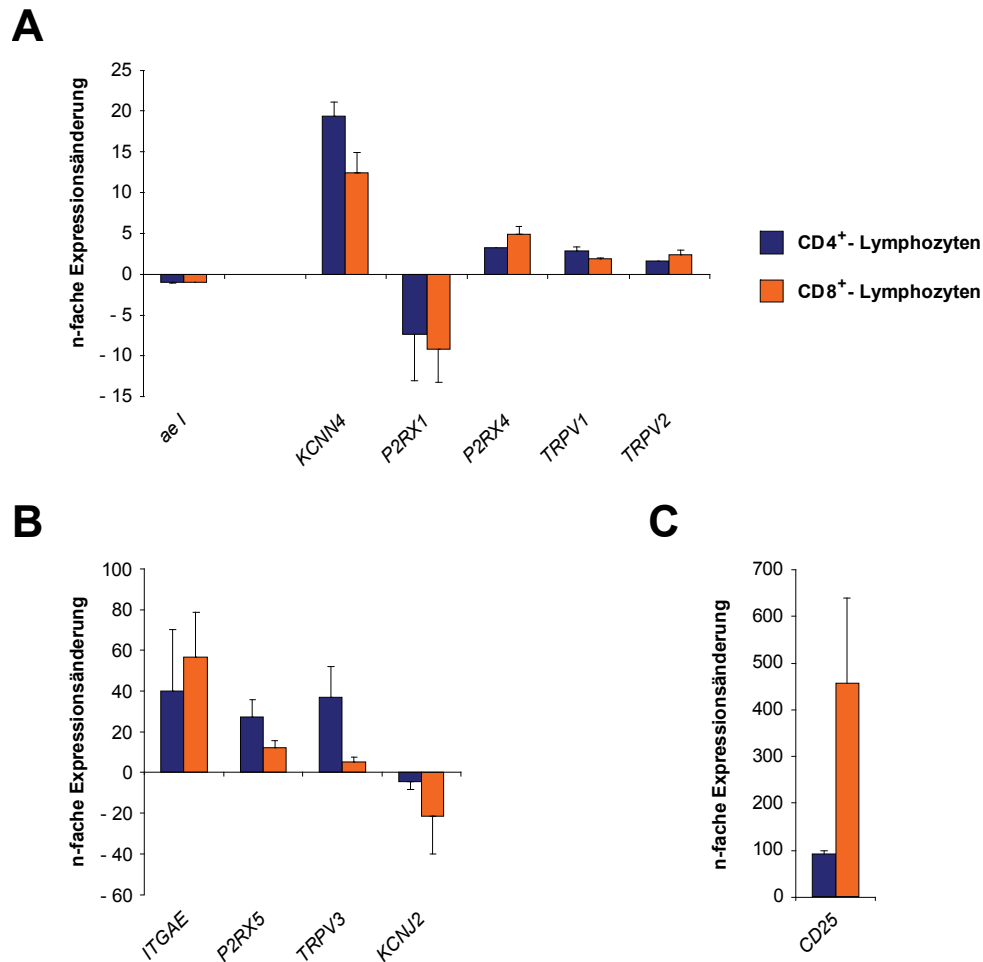
$Ct_{X, akt}$  = Ct des Zielgens im aktivierten Zustand

$Ct_{Ref, akt}$  = Ct des Referenzgens im aktivierten Zustand

$Ct_{X, n.akt}$  = Ct des Zielgens im nicht aktivierten Zustand

$Ct_{Ref, n.akt}$  = Ct des Referenzgens im nicht aktivierten Zustand

Abbildung 4-7 zeigt die Ergebnisse von qPCR-Analysen für  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ - Lymphozyten zweier unterschiedlicher Spender.

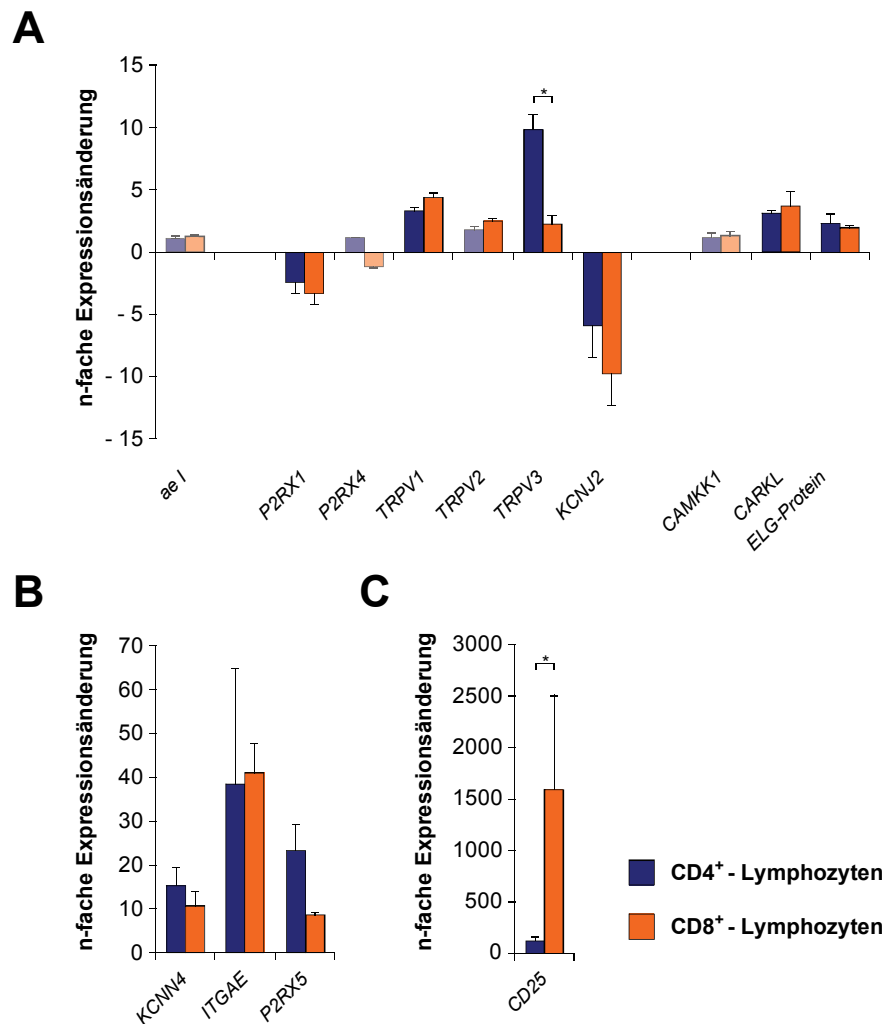


**Abb. 4-7: Expressionsänderungen ausgewählter Transkripte nach Stimulation der Zellen mit PHA-L in serumhaltigem Medium**

Jeder Balken zeigt die relative n-fache Expressionsänderung des untersuchten Gens von aktivierten CD4<sup>+</sup>- (blau) bzw. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (orange) im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Ermittelt wurde n mit Hilfe von Gleichung (2). In diese Analysen gingen Daten von zwei Spendern ein. Die Fehlerbalken geben den mittleren Fehler (S.E.M.) bezogen auf die zwei Werte für die Expressionsänderung der einzelnen Spender an. (A) zeigt Transkripte mit geringerer Expressionsänderung; in (B) sind Transkripte mit größerer (n-fache Expressionsänderung > 20) Expressionsänderung herausgestellt. (C) zeigt die Expressionsänderung für das *CD25*-Transkript.

Die anschließend über die kompletten Daten durchgeführte ANOVA-Analyse ( $p = 0.98$ ) zeigte, dass die Unterschiede in den CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen statistisch nicht signifikant waren. Dies lag vermutlich an der geringen Anzahl der Daten pro Gen ( $n = 2$ ). Zur besseren Analyse wurden in einer weiteren qPCR-Analyse das Medium gewechselt, um Wirkungen des im Medium befindlichen Kälberserums bei der Aktivierung auszuschließen. So wurde ein serumfreies Medium (X-Vivo 10; Lonza) für diese Analysen gewählt. Zusätzlich zu den oben genannten Genen wurden noch weitere chromosomale Nachbargene von *P2RX5* (*CAMKK1*,

*CARKL*, *ELG-Protein*) in die Analysen miteinbezogen. Das generelle Protokoll (s. Abb. 4-6) wurde nicht geändert. Die qPCR-Ergebnisse (n = 3) sind in Abbildung 4-8 dargestellt.



**Abb. 4-8: Expressionsänderungen ausgewählter Transkripte nach Stimulation der Zellen mit PHA-L in serumfreiem Medium**

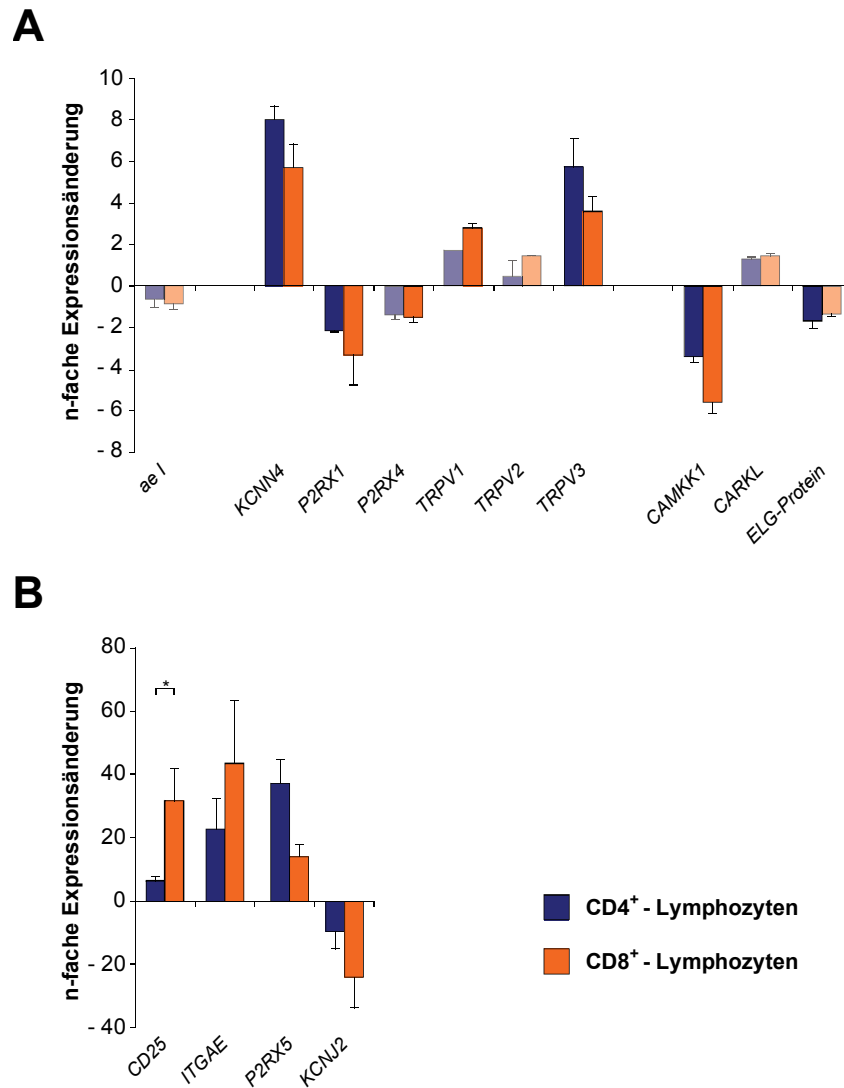
Jeder Balken zeigt die relative n-fache Expressionsänderung des untersuchten Gens von aktivierten CD4<sup>+</sup>- (blau) bzw. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (orange) im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Ermittelt wurde n mit Hilfe von Gleichung (2). In diese Analysen gingen Daten von drei Spendern ein. Die Fehlerbalken geben den mittleren Fehler (S.E.M.) bezogen auf die drei Werte für die Expressionsänderung der einzelnen Spender an. (A) zeigt Transkripte mit geringerer Expressionsänderung; in (B) sind Transkripte mit größerer (n-fache Expressionsänderung > 10) Expressionsänderung herausgestellt. \* zeigt signifikante Unterschiede laut Bonferroni-Posthoc-Test sowie *Student's T-Test* ( $p < 0,05$ ) zwischen CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen. Die blass dargestellten Balken geben Werte für Proben an, die laut Konfidenzintervall-Untersuchungen nicht reguliert sind.

Der durchgeführte ANOVA-Test ( $p < 0,0001$ ) zeigte, dass Unterschiede in den erhaltenen Daten signifikant waren. Der anschließende Bonferroni-Posthoc-Test ergab, dass *CD25* und *TRPV3* einen signifikanten Unterschied im Vergleich der Expressionsänderungen zwischen

CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen zeigten (Abb. 4-8). Durch die Analyse der Konfidenzintervalle konnte für fünf Proben (*P2RX4* (beide Subtypen), *CAMKK1* (beide Subtypen) und *TRPV2* (CD4<sup>+</sup>)) keine Regulation gefunden werden. Außer *KCNN4*, *ITGAE*, *P2RX5* und *CD25* zeigte kein Gen eine größere Expressionsänderung als 10-fach. Die Reduktionen in der Expression von *P2RX1* und *KCNJ2* bestätigten die Daten der Array-Analysen (vgl. Tab. 4-3 und für *KCNJ2* zusätzlich auch Tab. 4-2). Die Nachbargene *CAMKK1*, *CARKL* und *ELG-Protein* zeigten keine bzw. eine sehr geringe Expressionsänderung, was eine Kompletregulation dieses Locus sehr unwahrscheinlich macht.

Im direkten Vergleich zwischen dem Marker-Ionenkanalgen *KCNN4* und *P2RX5* zeigte sich in der Expressionsänderung weder in CD4<sup>+</sup>-, noch in CD8<sup>+</sup>-Zellen ein Unterschied ( $p = 0,34$  bzw.  $p = 0,88$ ).

Für eine dritte qPCR-Analyse wurde der Stimulus geändert. PHA-L stimuliert sehr unspezifisch alle Immunzellen. Aus diesem Grund wurde ein deutlich physiologischer aktivierender anti-CD3-Antikörper (OKT3-Klon) benutzt. Zugleich wurde wieder das serumfreie Medium für die Inkubation benutzt und das Protokoll (s. Abb. 4-6) unverändert verfolgt.



**Abb. 4-9: Expressionsänderungen ausgewählter Transkripte nach Stimulation der Zellen mit anti-CD3-Antikörper in serumfreiem Medium**

Jeder Balken zeigt die relative n-fache Expressionsänderung des untersuchten Gens von aktivierten CD4<sup>+</sup>- (blau) bzw. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (orange) im Vergleich zu nicht-aktivierten Zellen. Ermittelt wurde n mit Hilfe von Gleichung (2). In diese Analysen gingen Daten von drei Spendern ein. Die Fehlerbalken geben den mittleren Fehler (S.E.M.) bezogen auf die drei Werte für die Expressionsänderung der einzelnen Spender an. (A) zeigt Transkripte mit geringerer Expressionsänderung; in (B) sind Transkripte mit größerer ( $n > 20$ ) Expressionsänderung herausgestellt. \* zeigt signifikante Unterschiede laut Bonferroni-Posthoc-Test sowie *Student's T-Test* ( $p < 0,05$ ). Die blass dargestellten Balken geben Werte für Proben an, die laut Konfidenzintervall-Untersuchungen nicht reguliert sind.

Ein durchgeführter ANOVA-Test bestätigte mit  $p < 0.0001$  die Signifikanz der Daten. Mittels des Bonferroni Posthoc- und des *Student's T-Test* ergab sich, dass alle Gene, mit Ausnahme des CD25-Gens, vergleichbar in CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen auf den CD3-Stimulus reagierten. Zur Bestätigung einer realen, von Null unterschiedlichen Expressionsänderung wurden die Konfidenzintervalle der einzelnen Proben überprüft. Die Transkripte von P2RX4, TRPV1,

*TRPV2* und *CARKL* aus  $CD4^+$ -Zellen zeigten laut dieser Analyse keine Regulation. Gleiches galt für *TRPV2*, *CARKL* und *ELG-Protein* aus  $CD8^+$ -Zellen. Der Vergleich der quantitativen PCR-Daten zeigte eine sehr gute Übereinstimmung mit den qualitativen Daten der Array-Analysen. Generell erschienen die Expressionsänderungen im Vergleich zu den Array-Daten verstärkt, was wahrscheinlich auf eine höhere Sensitivität der qPCR-Analyse im Vergleich zu den Array-Techniken zurückgeführt werden kann. Bei zwei Genen war die Übereinstimmung zwischen qPCR- und Array-Daten unbefriedigend. Das Kaliumkanalgen *KCNN4* zeigte eine signifikant erhöhte Expressionsänderung ( $n = 8,0$  ( $CD4^+$ -Zellen) bzw.  $n = 5,7$  ( $CD8^+$ -Zellen)) in der qPCR-Analyse. In den Array-Analysen wird er nicht oder als leicht erhöht ( $n = 2,02$ ; Tab. 4-3) klassifiziert. In der Literatur wurde ebenfalls eine erhöhte *KCNN4*-Expression berichtet (Khanna *et al.*, 1999). Interessanterweise zeigte *P2RX5* unter dem CD3-Stimulus eine signifikant höhere Expressionsänderung im Vergleich zu den *KCNN4*-Transkripten sowohl in  $CD4^+$ -, als auch in  $CD8^+$ -Zellen (beide  $p < 0.01$ ).

Aufgrund der starken Heraufregulation und der unmittelbaren Nähe der beiden Genloci von *ITGAE* und *P2RX5* wurde eine generell hohe Transkription dieses Chromosomenabschnitts in Betracht gezogen. Aufgrund der qPCR-Daten ist dies unwahrscheinlich. In diesem Chromosomen-Abschnitt befinden sich weitere Gene, die entweder unreguliert (*TRPVI*, *CARKL*, *ELG-Protein*) oder gegenläufig reguliert (*CAMKK1*) waren.

#### 4.4. Expressionskinetik

Für *P2RX5* wurde ein Einzel-Nukleotid-Polymorphismus, der zum Austausch eines Thymidins zu einem Guanin führt, gefunden (Le *et al.*, 1997). Der Austausch mutiert eine 3' Spleiß-Erkennungssequenz, wodurch *P2RX5*-mRNA anders prozessiert wird (Bo *et al.*, 2003). Als Folge fehlt dem abgeleiteten *P2RX5*-Protein ein großer Teil der zweiten Transmembrandomäne, die für die Kanalfunktion des Proteins essentiell ist (Duckwitz *et al.*, 2005). Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde zwischen beiden *P2RX5*-Spleißformen nicht unterschieden. Um zu überprüfen, welche *P2RX5*-Variante in T-Lymphozyten vorkommt, wurde eine PCR-Analyse durchgeführt. RNA aus  $CD4^+$ - bzw.  $CD8^+$ -Zellen wurde in cDNA umgeschrieben und als Template eingesetzt. Die Primer-Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie beide *P2RX5*-Varianten erfassten. Das PCR-Produkt wurde subkloniert und sequenziert. In nicht-aktivierten und aktivierten  $CD4^+$ - bzw.  $CD8^+$ -Zellen wurde nur die um

das Exon 10 verkürzte Variante gefunden, was bedeutete, dass *P2RX5* in Lymphozyten keinen funktionellen Ionenkanal ausbildet, sondern eine andere Funktion übernimmt.

Generell konnte es sich bei der gefundenen Stimulierung der *P2RX5*-mRNA Synthese um eine primäre oder sekundäre Antwort der T-Zellen auf den Stimulus handeln. Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Zeitabhängigkeit der *P2RX5*-mRNA Synthese in Ab- bzw. Anwesenheit von Cycloheximid untersucht. Da sekundäre Antworten von einer vorhergehenden Proteinbiosynthese abhängen, konnte durch Block der Proteinbiosynthese mit Cycloheximid zwischen primärer und sekundärer Stimulusantwort unterschieden werden. Zu diesem Zweck wurden separierte CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- Lymphozyten mit anti-CD3/CD28-Antikörper beschichteten Kügelchen für 3, 6, 12, 24, 48 und 72 h aktiviert. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen isoliert, revers transkribiert und als Matrize für qPCR eingesetzt. Zusätzlich wurde je eine Fraktion der 3, 6 und 12 h Gruppen mit Cycloheximid versetzt.

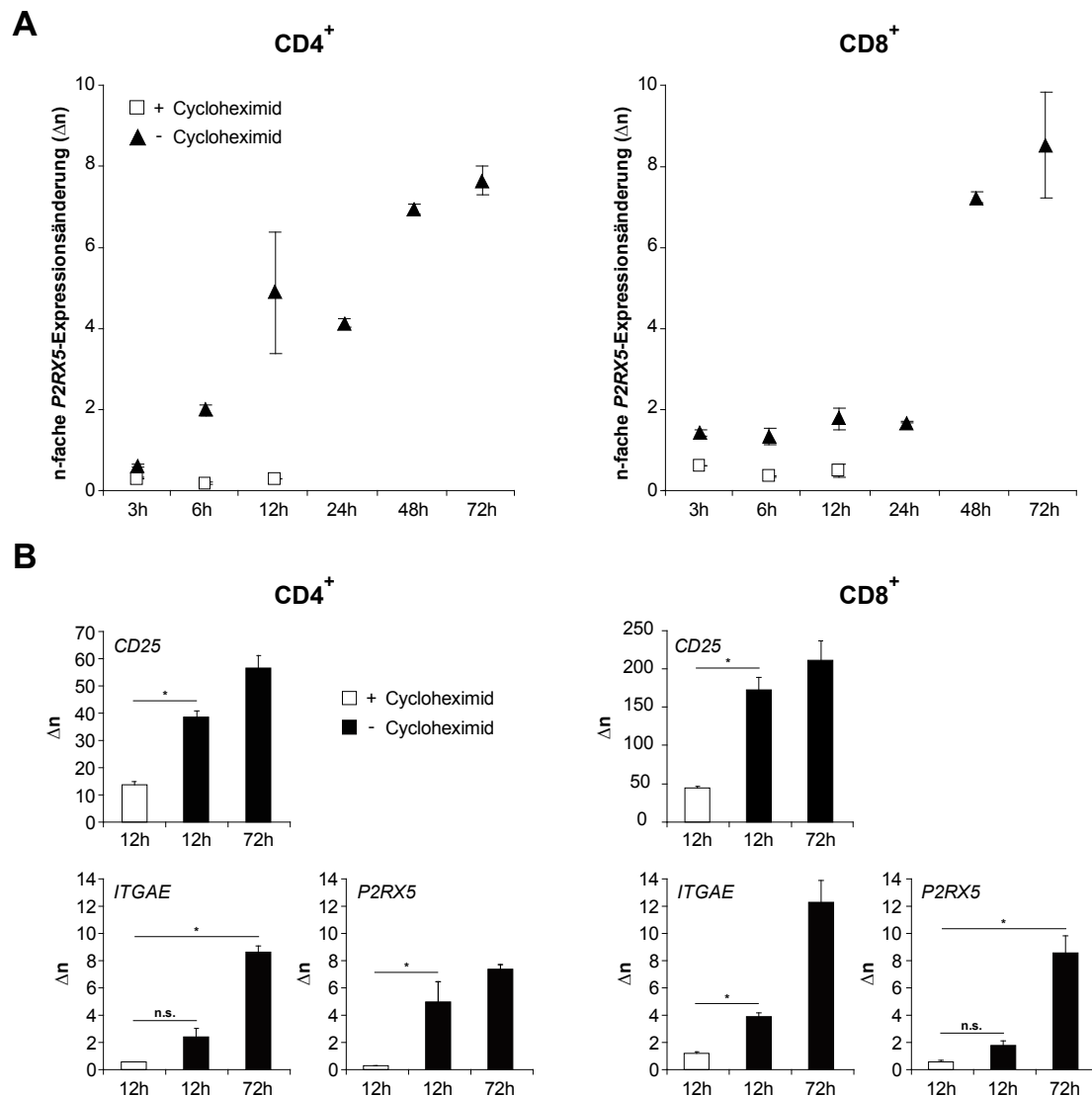
Vermutlich durch die separate Aktivierung von reinen CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-Zellen war die gemessene *P2RX5*-Expressionsänderung im Vergleich zu den Daten der vorangegangenen qPCR schwächer.

Die Expression in CD4<sup>+</sup>-Zellen stieg mehr oder weniger linear an, während sie in CD8<sup>+</sup>-Zellen erst nach 24 h deutlich zunahm (Abb. 4-10A). In Anwesenheit von Cycloheximid fand keine Stimulierung von *P2RX5*-mRNA-Synthese statt. Hingegen wurde *CD25*-mRNA auch in Anwesenheit von Cycloheximid deutlich, wenn auch geringer, stimuliert. Der Vergleich beider Ergebnisse zeigt, dass die *CD25*-Stimulation eine Primärantwort, die Stimulation der *P2RX5*-mRNA-Synthese hingegen eine sekundäre Antwort darstellt (Abb. 4-10B).

Das *ITGAE*-Transkript aus CD4<sup>+</sup>-Zellen zeigte keine Expressionsänderung in den ersten 12 h nach Aktivierung. Aus CD8<sup>+</sup>-Zellen isoliertes *ITGAE*-Transkript war bereits 12 h nach Aktivierung hochreguliert. Interessanterweise standen diese Beobachtungen im genauen Gegensatz zu *P2RX5*. Das Ergebnis zeigte, dass die Transkriptionen der benachbarten Gene *P2RX5* und *ITGAE* nicht gemeinsam reguliert werden.

Die Ergebnisse deuteten drauf hin, dass *P2RX5* wahrscheinlich keine Rolle zu Beginn, sondern erst zu einem späteren Zeitpunkt der Lymphozytenaktivierung spielt.





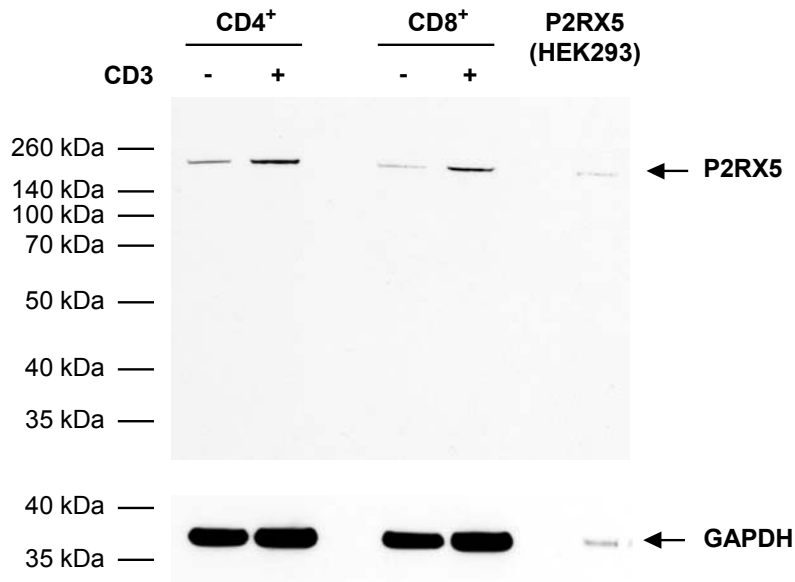
**Abb. 4-10: Zeitreihe von P2RX5-, CD25- und ITGAE-mRNA-Expression in An- bzw. Abwesenheit von Cycloheximid**

(A) N-fache Expressionsänderung von P2RX5-mRNA aus aufgereinigten CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen nach Aktivierung mit anti-CD3/CD28-Antikörpern beschichteten Kügelchen für 3, 6, 12, 24, 48 und 72 h mit (Quadrate) und ohne (Dreiecke) Zugabe von Cycloheximid. (B) N-fache Expressionsänderungen ( $\Delta n$ ) von P2RX5-, ITGAE- und CD25- Transkriptmengen nach 12 h und 72 h nach Stimulation. Die Bestimmung der Transkriptmengen erfolgte durch qPCR-Analysen. Die Fehlerbalken geben den mittleren Fehler (S.E.M.) an. Signifikanztests wurden mit Student's T-Test durchgeführt. \*:  $p < 0,05$ .

#### 4.5. Protein-Expression

Aufgrund der Ergebnisse der Transkriptom-Analyse von aktivierten bzw. nicht-aktivierten Lymphozyten, wurde die Expressionsänderung auf Proteinebene für P2RX5 untersucht. Dazu wurden die Zellen wie für die qPCR-Analysen aktiviert, aufgetrennt und anschließend lysiert.

Die Proteinkonzentration in den Lysaten wurde quantifiziert und mittels SDS-PAGE wurden vergleichbare Proteinmengen aufgetrennt. Nach dem Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Western Blot) wurde P2RX5 immunologisch nachgewiesen (Abb. 4-11).



#### Abb. 4-11: Stimulierung der P2RX5-Proteinexpression

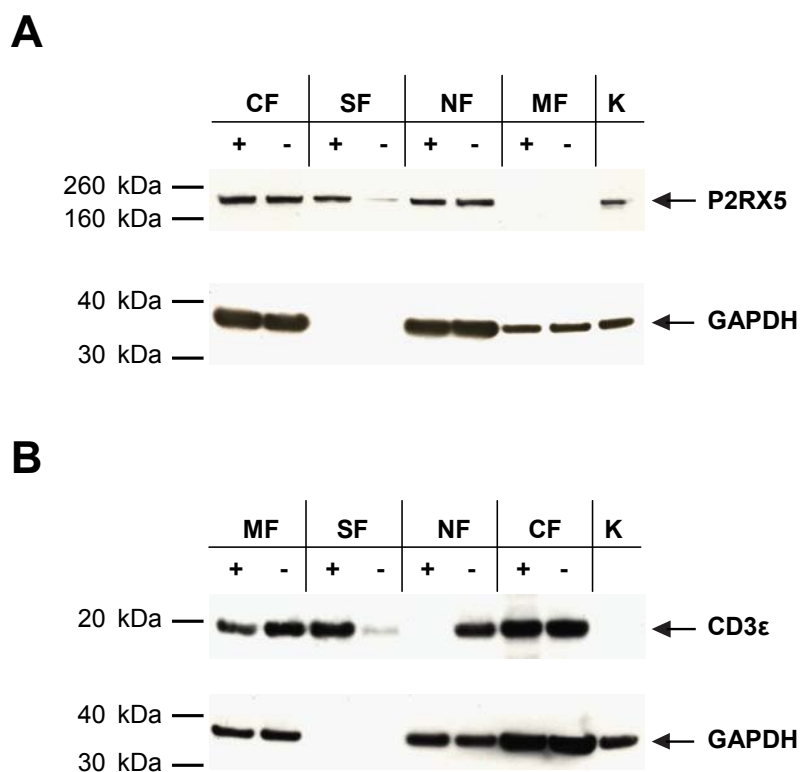
Das P2RX5-Protein konnte mit Hilfe eines entsprechenden Antikörpers sowohl in nicht-aktivierten (-), als auch in für 72 h aktivierten (+) Lymphozyten nachgewiesen werden. Von den Lymphozyten-Protein-Lysaten wurden je 15 µg aufgetragen. Das Protein zeigt eine Bande bei ca. 180 kDa wie das Protein-Lysat (P2RX5 (HEK293)) aus HEK293-Zellen. Als Ladekontrolle diente GAPDH (37 kDa).

Die Färbung mit anti-P2RX5-Mausantikörpern zeigte als Hauptprodukt eine Bande mit ca. 180 kDa Masse. Dies entsprach etwa dem vierfachen des erwarteten Molekulargewichts (52 kDa) für P2RX5-Protein. Diese beträchtliche Diskrepanz zwischen errechnetem und tatsächlichem Molekulargewicht, die auch für exprimiertes P2RX5-Protein aus transient transfizierten HEK293-Zellen galt, kann verschiedene Ursachen haben, z. B. eine extensive posttranslationale Modifikation, Aggregation usw. Wichtig war der Befund, dass im Lysat der aktivierten Lymphozyten eine deutlich stärkere P2RX5-Immunfärbung gefunden wurde, als im Vergleich zu den nicht-aktivierten Zellen. Die Stimulierung der P2RX5-Proteinexpression in aktivierten CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen entsprach qualitativ sehr gut den auf Transkriptionsebene gemachten Befunden, d. h. Stimulierung der T-Zell-Subtypen führt zu einer Stimulierung der Expression von P2RX5-mRNA und -Protein.

## 4.6. Lokalisation von P2RX5

### 4.6.1. Generelle Lokalisation von P2RX5 in der Zelle

P2X-Kanäle werden normalerweise aus drei Untereinheiten gebildet. Die Topologie jeder Untereinheit entspricht zwei Transmembrandomänen, die von cytoplasmatischen N- und C-Termini flankiert sind. Das in T-Zellen exprimierte P2RX5-Protein entspricht nicht dieser Topologie. Dem Protein fehlt die zweite Transmembrandomäne (Duckwitz *et al.*, 2006).



**Abb. 4-12: Biotinylierungsexperiment zur Prüfung auf Plasmamembran-Lokalisation von P2RX5**

Stimulierte PBMC wurden mit freiem Biotin versetzt. Anschließend wurden die Zelllysate in cytoplasmatische (CF) und membranständige Fraktionen (MF) durch unterschiedliche Zentrifugationen separiert. Biotinylierte Proteine wurden mit Streptavidin beschichteten magnetischen Kügelchen aus den Gesamtllysaten herausgezogen. Die einzelnen Proteinfractionen wurden mit einem SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit anti-P2RX5- (A) bzw. anti-CD3-Antikörper (B) inkubiert. Als Lade- bzw. interne Kontrolle diente GAPDH. Molekulare Größenstandards sind jeweils auf der linken Seite zu finden. SF – an Streptavidin-Kügelchen gebundene Proteinfraction; NF – nicht an Kügelchen gebundene Proteinfraction; + – Probe mit Zugabe von Biotin; - – Probe ohne Zugabe von Biotin; K – Kontrolllysat aus HEK293 Zellen.

Aufgrund dessen sollte das P2RX5-Protein nur eine Transmembrandomäne haben und dementsprechend wahrscheinlich einen extrazellulär lokalisierten C-Terminus aufweisen. Möglich ist sogar, dass die veränderte Topologie zu einer veränderten zellulären Lokalisation führt (Duckwitz *et al.*, 2005). Es wurde deshalb untersucht, ob das P2RX5-Protein in der Plasmamembran oder in intrazellulären Kompartimenten zu finden ist. Hierzu wurde an intakten Zellen Plasmamembranprotein mit Biotin markiert. Anschließend wurden die biotinmarkierten Zellen lysiert, und biotinyliertes Protein mit Hilfe von streptavidingekoppelten magnetischen Kügelchen angereichert.

Als Biotinylierungskontrollen wurden je ein cytoplasmatisches (GAPDH) und ein plasmamembrangebundenes Protein (CD3 $\epsilon$ ), ein Teil des T-Zell-Rezeptors, eingesetzt (Abb. 4-12). Erwartungsgemäß wurde biotinyliertes CD3 $\epsilon$  spezifisch an die Streptavidin-Kügelchen gebunden (Abb. 4-12B; SF +), während für GAPDH dies nicht der Fall war. Die Bindung von CD3 $\epsilon$  an die Streptavidin-Kügelchen war nach der Biotinylierungsreaktion quantitativ, da im Überstand kein CD3 $\epsilon$ -Protein mehr nachgewiesen werden konnte. In Kontrollansätzen mit nicht-biotinyliertem Protein zeigte sich das entsprechende, komplementäre Bild: nahezu vollständige Anwesenheit des CD3 $\epsilon$ -Proteins im Überstand der Streptavidin-Kügelchen. Im Falle von P2RX5 war das Ergebnis komplexer. Biotinyliertes P2RX5 wurde an die Streptavidin-Kügelchen gebunden, aber es fand sich auch P2RX5-Protein im Überstand, d. h. nach Biotinylierung wurde nur ein Teil des P2RX5-Proteins an die Streptavidin-Kügelchen gebunden. Dass diese auf eine spezifische Bindung biotinylierten Proteins an die Streptavidin-Kügelchen zurückzuführen ist, belegten die in Abb. 4-12 gezeigten Kontrollen. So konnte ohne Biotinylierung keine P2RX5-Proteinbindung an die Streptavidin-Kügelchen nachgewiesen werden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass P2RX5-Protein sowohl in der Plasmamembran aktivierter T-Zellen lokalisiert ist, aber wohl auch in intrazellulären Kompartimenten zu finden ist.

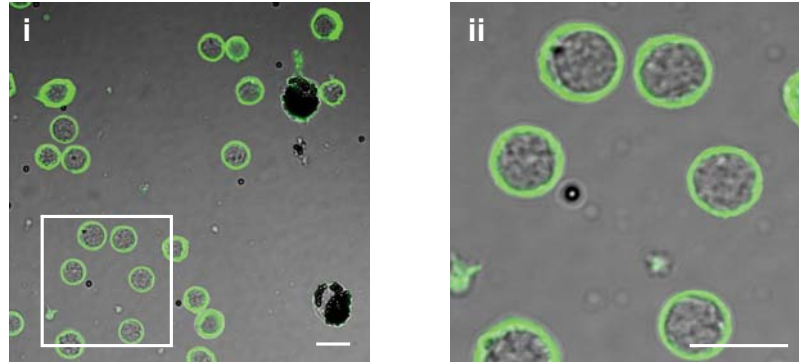
#### **4.6.2. Verteilung von P2RX5 in (nicht-) aktivierten T-Lymphozyten**

Als nächstes wurden immunocytochemische Färbungen angefertigt, um einen Einblick in die Verteilung des P2RX5-Proteins in der T-Zelle im ruhenden bzw. aktivierten Zustand zu erhalten. Dazu wurden PBMC nach 24-stündiger Inkubation durch anti-CD3/CD28-Antikörper oder Streptavidin beschichtete Kügelchen mit einem anti-P2RX5-Antikörper angefärbt. Nach Inkubation mit einem zweiten, mit dem Farbstoff Alexa 488 gekoppelten

Antikörper wurde die Immunfärbung mittels eines konfokalen Laser-Mikroskops untersucht (Abb. 4-13).

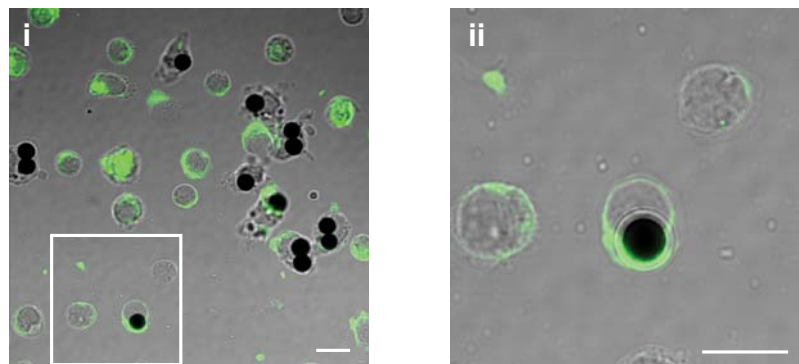
**A**

**Streptavidin beschichtete Kügelchen**



**B**

**anti-CD3/CD28-AK beschichtete Kügelchen**



**Abb. 4-13: Immunocytochemische Analyse der P2RX5-Lokalisation**

PBMC wurden mit Streptavidin (A i) oder anti-CD3/CD28-Antikörpern (B i) beschichteten Kügelchen für 24 h inkubiert und mit anti-P2RX5-Antikörper und farbstoffgekoppeltem Zweitantikörper gefärbt. Zellen in den weißen Quadraten sind rechts (ii) in höherer Vergrößerung dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

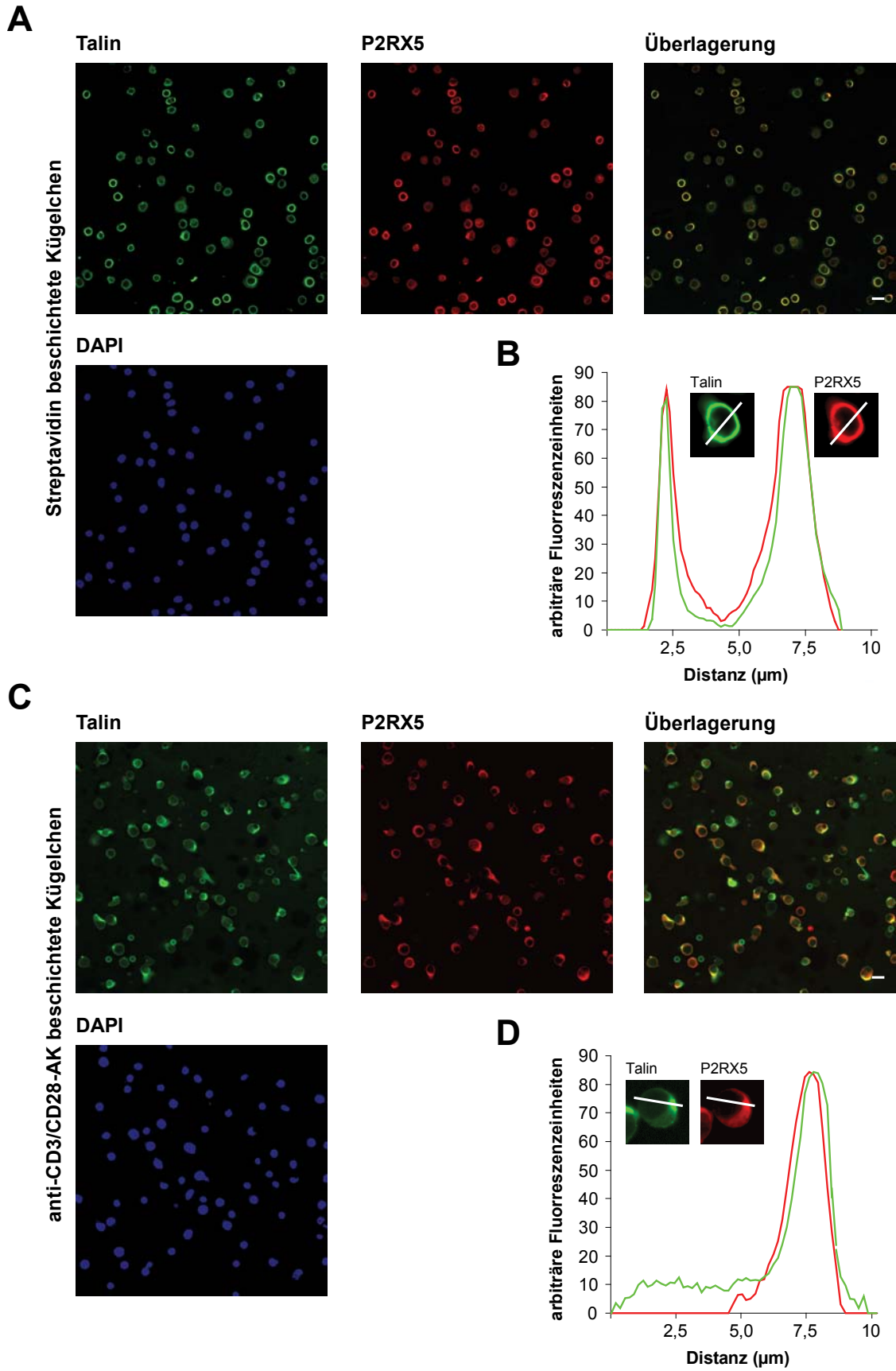
In Zellen, die nur mit Streptavidin beschichteten Kügelchen behandelt waren, war eine homogene Verteilung von P2RX5-Protein an der Plasmamembran zu sehen (Abb. 4-13A). Hingegen wurde in Zellen, die mit anti-CD3/CD28-Antikörpern beschichteten Kügelchen aktiviert worden waren, eine polarisierte Verteilung des P2RX5-Proteins gefunden (Abb. 4-13B).

### 4.6.3. P2RX5 ist in der immunologischen Synapse lokalisiert

Die beobachtete Verteilung von P2RX5-Protein in aktivierten T-Zellen ähnelte der Relokalisation von Proteinen, die an der Ausbildung der immunologischen Synapse und der damit verbundenen Polarisierung der aktivierten T-Zellen beteiligt sind. Hierzu gehören z. B. Proteine des TCR-Komplexes wie CD3, CD4 oder CD28, welche im zentralen Teil (c-SMAC) der immunologischen Synapse zu finden sind, und Talin bzw. LFA-1. Letztere sind im peripheren Teil der Synapse (p-SMAC) angesiedelt (Cemerski *et al.*, 2006).

Um die Lokalisation von P2RX5-Protein in der polarisierten T-Zelle näher zu untersuchen, wurden immunocytochemische Co-Färbungen von Talin und P2RX5 angefertigt. Dazu wurden T-Zellen entweder mit anti-CD3/CD28-Antikörpern oder Streptavidin beschichteten Kügelchen für 24 h inkubiert und anschließend mit anti-P2RX5- und anti-Talin-Antikörpern sowie entsprechenden Zweitantikörpern, gekoppelt an die Farbstoffe Alexa 488 und Alexa 546, gefärbt (Abb. 4-14).

Die Färbungen für P2RX5- und Talin-Protein in nicht-aktivierten Kontroll-Zellen zeigten eine vergleichbare homogene Verteilung an der Plasmamembran (Abb. 4-14A). Die Überlagerung der Immunfärbung deutete auf eine Co-Lokalisierung beider Proteine in der nicht aktivierten T-Zelle hin. In aktivierten T-Zellen waren beide Proteine hingegen vergleichbar umverteilt und im Bereich der immunologischen Synapse konzentriert (Abb. 4-14C). Die ähnliche Lokalisierung beider Proteine wurde besonders deutlich, wenn entlang einer Geraden die Fluoreszenzintensitäten von angefärbtem P2RX5 bzw. Talin bestimmt wurden (Abb. 4-14B und D). Für ruhende Zellen zeigten die P2RX5- und Talin-Färbungen vergleichbare Intensitäten und eine symmetrische Verteilung (Abb. 4-14B). Bei aktivierten Zellen hingegen war die Fluoreszenzintensität asymmetrisch auf einer Seite der Zelle lokalisiert (Abb. 4-14D). Die polarisierte Verteilung des P2RX5-Proteins war nach T-Zellaktivierung vergleichbar zu Talin, einem Marker für den peripheren Teil der immunologischen Synapse (Cemerski *et al.*, 2006).



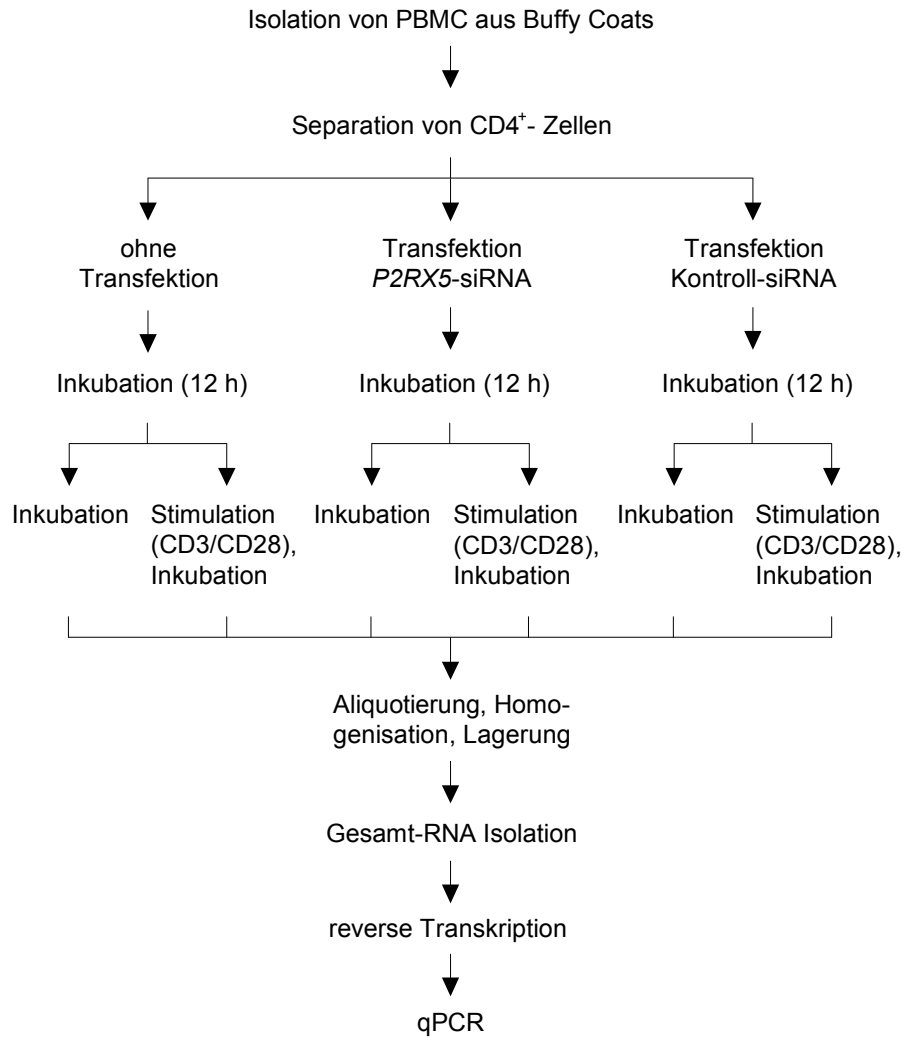
**Abb. 4-14: Immuncytochemische Analyse der Co-Lokalisation von P2RX5 und Talin**

T-Zellen wurden isoliert und für 24 h mit Streptavidin (A) bzw. anti-CD3/CD28-Antikörpern (C) beschichteten Kügelchen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit anti-P2RX5- und anti-Talin-Antikörpern behandelt und mit Hilfe von entsprechenden Zweitantikörpern gefärbt. (B) und (D) zeigen arbiträre Fluoreszenzeinheiten entlang einer über eine ruhende (B) bzw. aktivierte (D) CD4<sup>+</sup>-Zelle gelegten Geraden. P2RX5-Färbungen sind in rot, Talin-Färbungen in grün gezeigt. Die weißen Balken in (B) und (D) entsprechen 10 µm. Die Maßstäbe in (A) und (C) entsprechen 10 µm.

**4.7. Untersuchung der Funktion von P2RX5 in aktivierten T-Zellen mit Hilfe von siRNA**

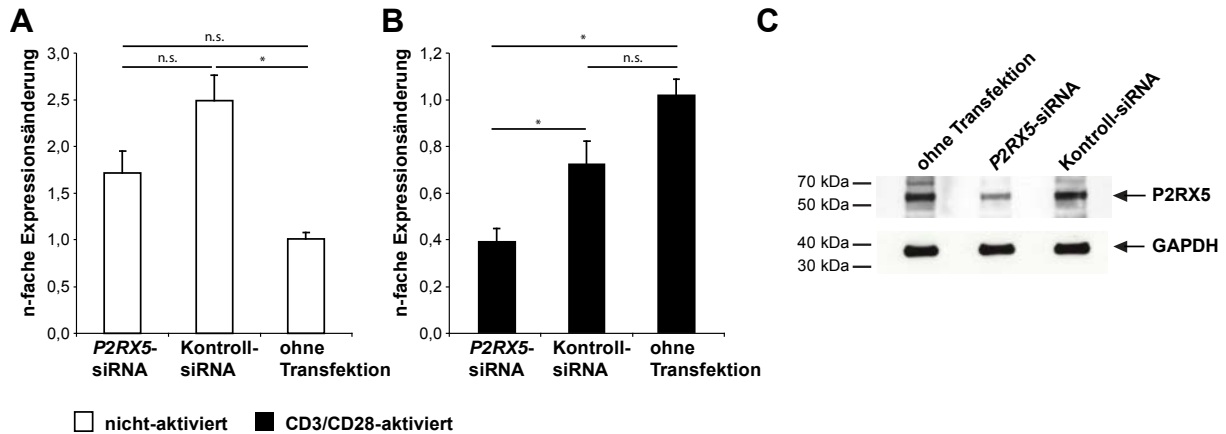
Ein Vergleich unter Berücksichtigung des Zeitverlaufs der *P2RX5*-mRNA- und Protein-Synthese ließ die polarisierte Verteilung vermuten, dass P2RX5-Protein nach T-Zellaktivierung zwar nicht bei der Ausbildung der immunologischen Synapse, aber bei der Aufrechterhaltung oder Stabilisierung der damit verbundenen Zellpolarität von Bedeutung ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Folgen der Unterdrückung der *P2RX5*-mRNA-Synthese mittels siRNA untersucht. In Vorversuchen wurden CD4<sup>+</sup>-Zellen aus PBMC aufgereinigt und mit *P2RX5*-spezifischer bzw. mit einer Kontroll-siRNA oder, als Transfektionskontrolle, mit einem eGFP-Plasmid transfiziert. Die jeweilige Transfektionseffizienz (eGFP-exprimierende Zellen/Gesamtzellzahl) lag durchschnittlich zwischen 50% und 60%. Des Weiteren wurde eine Fraktion gar nicht mit siRNA behandelt. 12 h nach Transfektion wurden die Zellen mit anti-CD3/CD28-Antikörper beschichteten Kügelchen für 24 h aktiviert. Anschließend wurde die Abnahme von *P2RX5*-mRNA mittels qPCR bestimmt (s. Schema in Abb. 4-15).





**Abb. 4-15: Fließschema des methodischen Ablaufs der siRNA-Analyse**  
Gezeigt ist der generelle Ablauf von der Gewinnung der Zellen bis zur qPCR.

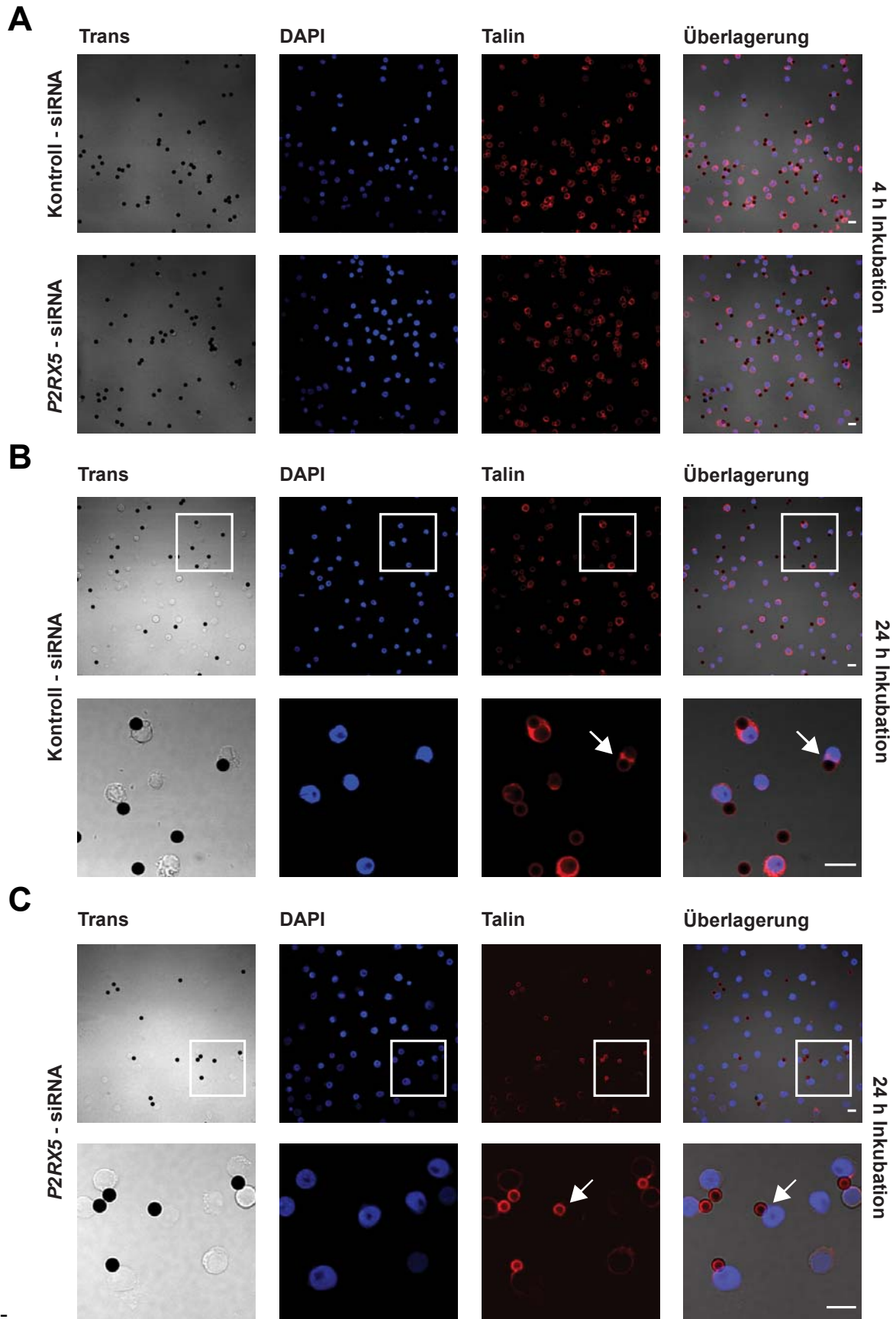
Bei nicht-aktivierten T-Zellen bewirkte die Transfektion mit Kontroll-siRNA eine unspezifische Stimulierung der *P2RX5*-mRNA Expression (Abb. 4-16A). Die Gründe wurden nicht näher untersucht. Im Gegensatz dazu zeigten mit Kontroll-siRNA transfizierte und aktivierte T-Zellen keine signifikante Änderung der *P2RX5*-mRNA-Synthese im Vergleich zu *P2RX5*-mRNA aus untransfizierten, aktivierten T-Zellen (Abb. 4-16B). In aktivierten, mit *P2RX5*-siRNA transfizierten T-Zellen hingegen wurde die *P2RX5*-mRNA Expression signifikant unterdrückt ( $p < 0,05$ ). Dies korrelierte sehr gut mit einer Reduzierung der *P2RX5*-Protein-Expression, die in den entsprechenden Kontrollen nicht zu beobachten war (Abb. 4-16C).



**Abb. 4-16: Nachweis der Funktionalität des siRNA-Experiments auf Transkript- bzw. Proteinebene**

CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden mit *P2RX5*-, Kontroll-siRNA oder nicht transfiziert. Ein Teil der Zellen blieb ohne Stimulus (A, weiße Balken), der andere Teil wurde mit anti-CD3/CD28-Antikörpern beschichteten Kügelchen für 24 h inkubiert (B, schwarze Balken). Nach Gesamt-RNA Isolation wurde die *P2RX5*-mRNA Menge der nicht-aktivierten bzw. aktivierten Zellen relativ zu den unbehandelten Zellen (ohne Transfektion) bestimmt. (C) Gesamtproteinlysate der drei Gruppen wurde isoliert und mittels Western Blots *P2RX5*-Protein nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Signifikanzen (\*:  $p < 0,05$ ) wurden mittels *Student's T-Test* ermittelt.

Im folgenden wurde untersucht, ob die nach siRNA-Transfektion beobachtete Abnahme des *P2RX5*-Proteins in aktivierten T-Zellen eine Auswirkung auf Ausbildung bzw. Stabilität ihrer Polarität hatte. CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden mit *P2RX5*-, Kontroll-siRNA oder gar nicht transfiziert, für 4 h bzw. 24 h aktiviert und anschließend auf Poly-D-Lysin beschichtete Deckgläschen transferiert. Die Zellen wurden mit einem anti-Talin-Antikörper gefärbt und ihre Morphologie unter einem konfokalen Lasermikroskop analysiert.



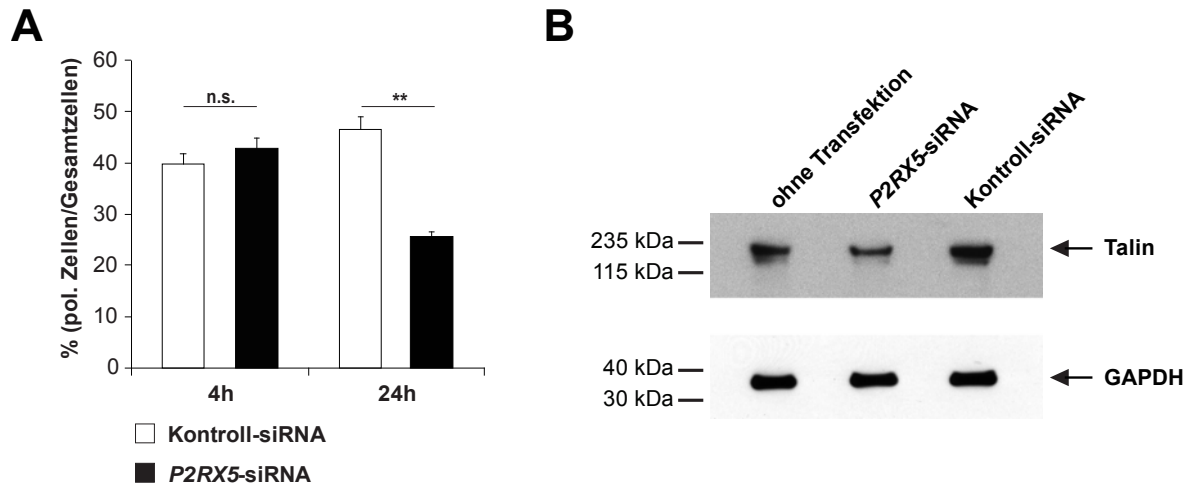
**Abb. 4-17: Charakterisierung der phänotypischen Auswirkungen der Reduktion der *P2RX5*-mRNA auf die zelluläre Verteilung von Talin nach 4 h und 24 h Aktivierung**

CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden mit *P2RX5*- oder Kontroll-siRNA transfiziert, für 4 h (A) bzw. 24 h (B) und (C) aktiviert und mit anti-Talin-Antikörpern gefärbt. (A) Das obere Panel zeigt mit Kontroll-siRNA transfizierte, das untere Panel mit *P2RX5*-siRNA transfizierte Zellen. (B), (C) Das jeweils obere Panel zeigt beispielhaft einige Zellen. Die unteren Panele geben Ausschnitte (weiße Quadrate) in höherer Vergrößerung wieder. Die Maßstäbe entsprechen 10 µm.

Die Talin-Färbung zeigte nach 4-stündiger Inkubation mit anti-CD3/CD28-Antikörpern gekoppelten Kügelchen keinen Unterschied zwischen *P2RX5*- und Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (Abb. 4-17A). Zur Bewertung der zellulären Verteilung des Talins wurde eine statistische Analyse durchgeführt (Abb. 4-18A). Hierbei wurde bei den jeweiligen Mikroskopaufnahmen die Anzahl der Zellen, die eine Polarisation von Talin aufwiesen, in Relation zur Gesamtanzahl der Zellen gesetzt, die durch Dapi-Färbung (Abb. 4-17) ermittelt wurde. Als Polarisation wurde eine deutliche Anreicherung des Moleküls Talin in einem Bereich der Zelle gewertet, der nicht mehr als ein Drittel der Gesamtzellmembran umfasste. Ein signifikanter Unterschied in der polarisierten Verteilung von Talin konnte nicht gefunden werden, wenn die Zellen für 4 h aktiviert worden waren ( $p = 0,44$ ; Abb. 4-18A).

Nach 24-stündiger Inkubation hingegen zeigten sich deutliche Unterschiede. Die mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen waren deutlich angefärbt und ließen eine für die immunologische Synapse typische, polarisierte Verteilung des Talins erkennen (Abb. 4-17B). Die Färbung der Zellen, die mit *P2RX5*-siRNA transfiziert wurden, war im Vergleich deutlich schwächer und weniger strukturiert (Abb. 4-17C). Die statistische Analyse ( $n = 9$ ) zeigte, dass 45% ( $\pm 2,5\%$ , S.E.M.) der mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen nach 24-stündiger Aktivierung eine polarisierte Verteilung des Talins aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten mit *P2RX5*-siRNA transfizierte und für 24 h aktivierte Zellen eine signifikant geringere Anzahl an Zellen mit einer polarisierten Talinverteilung ( $25\% \pm 1,1\%$ , S.E.M.;  $p < 0,001$ ; Abb. 4-18A).

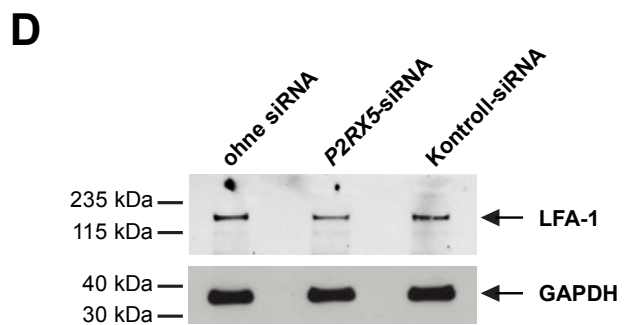
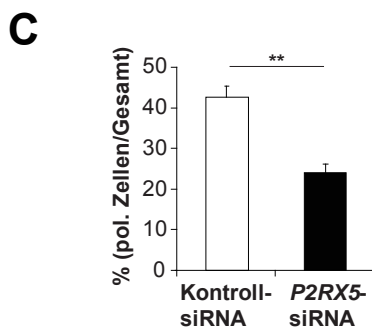
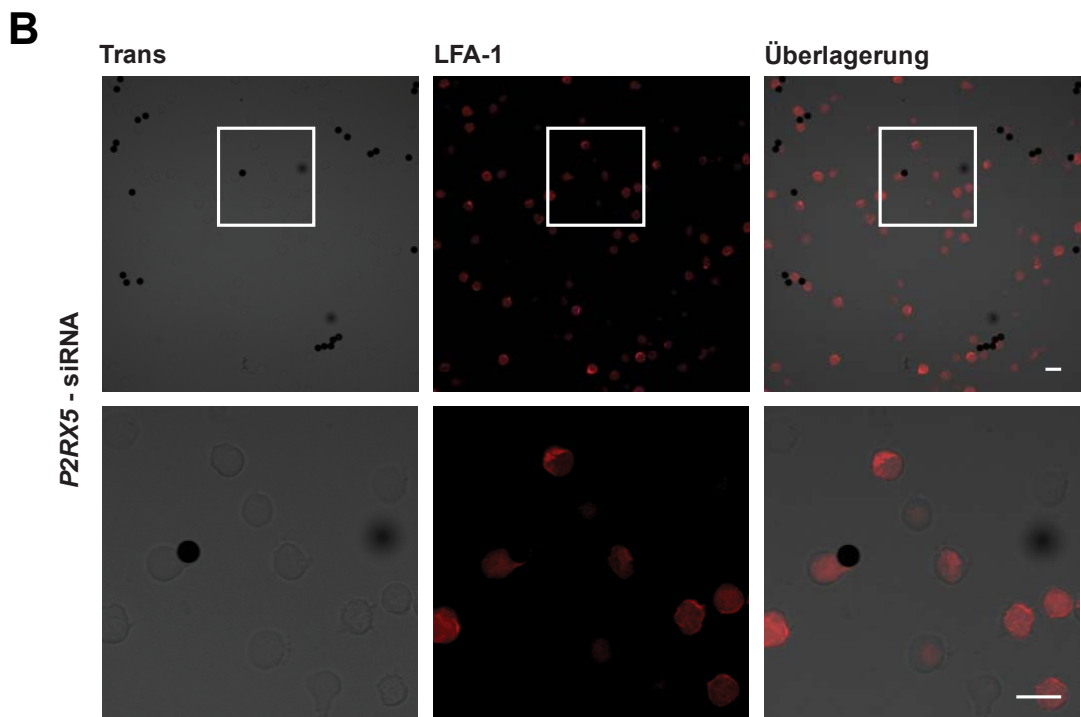
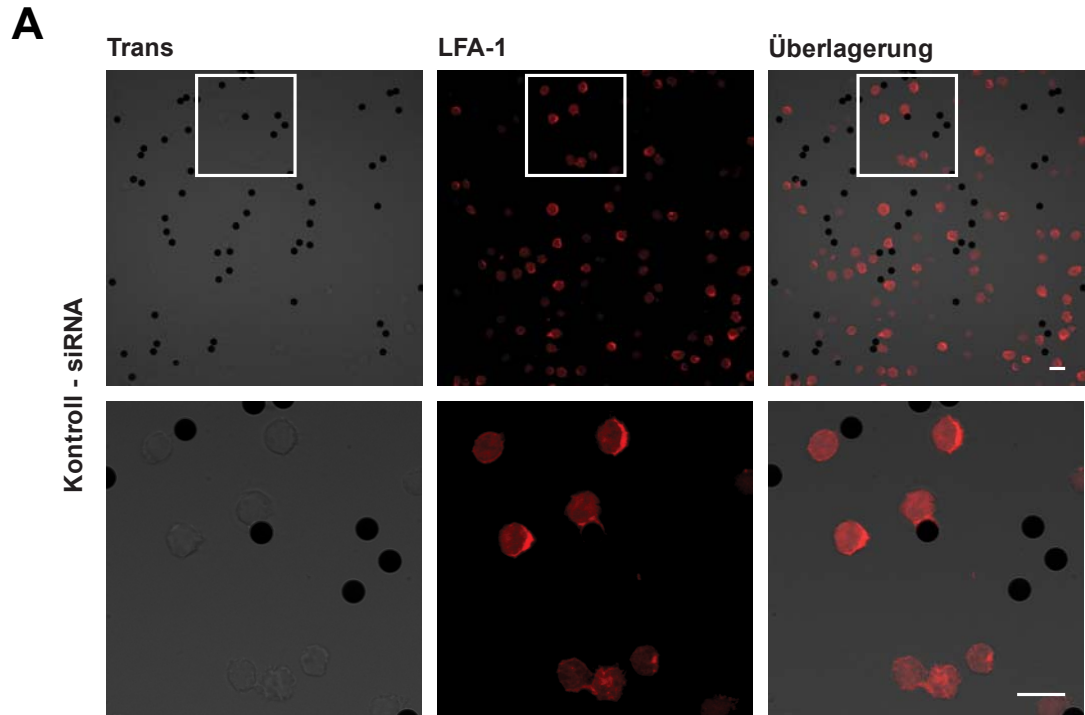
Es fiel auf, dass in diesen Zellen die Intensität der Talinfärbungen deutlich geringer war als in den Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Aufgrund dessen wurde die Proteinmenge von Talin mittels Western Blots analysiert. Hierbei zeigte sich, dass *P2RX5*-siRNA transfizierte Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Ansätzen deutlich weniger Talin enthielten (Abb. 4-18B), was auf einen Abbau des Talins schließen lässt.



**Abb. 4-18: Auswertung und Validierung der immunocytochemischen Analyse von Talin nach *P2RX5*-mRNA Unterdrückung**

(A) Statistische Auswertung der Mikroskop-Aufnahmen. Der prozentuale Anteil an polarisierten (pol.) Zellen wurde für siRNA transfizierte Zellen nach 4 h bzw. 24 h Aktivierung bestimmt. Signifikanztest: *Student's T-Test*, \*\*:  $p < 0,01$ . n.s. – nicht signifikant. (B) Im Western Blot wurde die Talin-Menge in den drei unterschiedlichen Transfektionsfraktionen überprüft. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

Zur Validierung dieses Ergebnisses wurde ein weiterer Marker für den peripheren Teil der immunologischen Synapse, LFA-1, verwendet. So wurden Zellen wie zuvor behandelt und anschließend mit einem anti-LFA-1-Antikörper gefärbt (Abb. 4-19). In mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen war eine typische Polarisierung der Färbung von LFA-1 zu erkennen (Abb. 4-19A). Waren die Zellen mit *P2RX5*-siRNA transfiziert, war die Färbung eher diffus und unpolar (Abb. 4-19B). Für die Analyse wurde, wie oben, die Anzahl der Zellen mit Polarisierung von LFA-1 pro Gesamtzellanzahl für Kontroll-siRNA und *P2RX5*-siRNA transfizierte Zellen bestimmt (Abb. 4-19C). Bei 43% ( $\pm 2,7\%$ , S.E.M.;  $n = 10$ ) der mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen war eine polarisierte Verteilung von LFA-1 nachweisbar. *P2RX5*-siRNA transfizierte Zellen zeigten lediglich in 24% ( $\pm 2,2\%$ , S.E.M.;  $n = 10$ ) der Zellen eine Polarisierung der LFA-1-Färbung ( $p = 0,0052$ ; Abb. 4-19C). Im Western Blot zeigte sich auch, dass die LFA-1-Proteinmenge in *P2RX5*-siRNA transfizierten Zellen im Vergleich zu nicht- bzw. mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen reduziert war (Abb. 4-19D).



**Abb. 4-19: Charakterisierung der phänotypischen Auswirkungen der Reduktion der P2RX5-mRNA auf die zelluläre Verteilung von LFA-1**

CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden mit Kontroll- (A) oder P2RX5-siRNA (B) transfiziert, für 24 h aktiviert und mit anti-LFA-1-Antikörpern gefärbt. Das jeweils obere Panel zeigt beispielhaft einige Zellen. Die unteren Panele geben Ausschnitte (weiße Quadrate) in höherer Vergrößerung wieder. Die Maßstäbe zeigen 10 µm Länge an. (C) Statistische Auswertung der Mikroskop-Aufnahmen. Der prozentuale Anteil an Zellen mit polarisierter Verteilung von LFA-1 wurde für siRNA transfizierte Zellen nach 24 h Aktivierung bestimmt. (D) Gesamtproteinlysate der drei Gruppen wurde isoliert und mittels Western Blots LFA-1-Protein nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Signifikanztest: *Student's T-Test*, \*\*:  $p < 0,01$ .

Aus den Ergebnissen ließen sich drei wichtige Schlussfolgerungen für die Bedeutung von P2RX5 bei der Aktivierung von T-Zellen ziehen:

- i) P2RX5 ist nicht in die Ausbildung der immunologischen Synapse involviert, spielt aber in einer späteren Phase bei Aufrechterhaltung der Polarität der aktivierten T-Zelle eine wichtige Rolle.
- ii) Unterdrückung des P2RX5-Transkripts führt in der späten Phase der T-Zellaktivierung zu einer Abnahme von Talin und LFA-1, die im peripheren Bereich (p-SMAC) der immunologischen Synapse konzentriert sind.
- iii) P2RX5-Protein ist offensichtlich kritisch für die Stabilität von in der immunologischen Synapse konzentrierten Proteinen.

## 5. Diskussion

### 5.1. P2RX5 in T-Lymphozyten

In dieser Arbeit wurde die Expression von Ionenkanalgenen vor und nach Aktivierung von T-Zellen untersucht. Der wichtigste Befund dieser Analysen ist, dass die Expression eines Ionenkanalgens nach Aktivierung sowohl in CD4<sup>+</sup>- als auch in CD8<sup>+</sup>-Zellen signifikant (etwa 10-fach) zunahm. Das Gen kodiert für *P2RX5*, einem Mitglied der ATP-aktivierten Ionenkanalfamilie P2X. Das *P2RX5*-Gen liegt auf Chromosom 17 im Abschnitt p13.3 in unmittelbarer Nachbarschaft zu *ITGAE*, einem Integrin, welches bei der Zell-Adhäsion von T-Zellen eine Rolle spielt, und dessen Expression ebenfalls bei T-Zell-Aktivierung signifikant (10- bis 12-fach) stimuliert wurde. Die weiteren Untersuchungen (qPCR nach unterschiedlicher Stimulation sowie Untersuchungen zur Expressionskinetik) haben ergeben, dass beide Gene wie auch weitere, auf dem Chromosomenabschnitt 17 p13.3 benachbart liegende, in T-Zellen exprimierte Gene (wie *P2RX1*, *CAMKK1*, *ELG*-Protein, *CARXL*, *TRPV1* und *TRPV3*) nicht einer gemeinsamen Transkriptionskontrolle unterliegen.

*P2RX5*, das 1996 als ATP-aktivierter Ionenkanal entdeckt wurde, hat in der Familie der P2X-Rezeptoren eine Sonderrolle (Collo *et al.*, 1996). In transient transfizierten Zellkulturzellen vermittelt der *P2RX5*-Kanal Einwärtsströme, die im Vergleich zu anderen Mitgliedern der P2X-Kanalfamilie atypische Eigenschaften, wie z. B. eine verminderte ATP-Sensitivität sowie eine deutlich geringere Stromamplitude im Vergleich zu anderen Mitgliedern der P2X-Kanalfamilie, aufweisen (North, 2002). Es ist fraglich, ob in humanen T-Zellen exprimiertes *P2RX5*-Protein tatsächlich aktive P2X-ähnliche Ionenkanäle ausbildet, da das Hauptprodukt des humanen *P2RX5*-Gens aufgrund eines Nukleotid-Polymorphismus (vgl. 4.6.) so prozessiert wird, dass ein um Exon 10 verkürztes Transkript entsteht. Die Verkürzung führt zu einer veränderten TM2-Domäne, aufgrund dessen das verkürzte *P2RX5*-Protein *in vitro* nicht zu einem funktionellen Kanal trimerisiert (Duckwitz *et al.*, 2006; Bo *et al.*, 2003). Interessanterweise wird in der Literatur von einem weiteren Mitglied der P2RX-Familie, *P2RX2*, berichtet, das Spleißvarianten bildet, die ebenfalls ihre Ionenkanalfunktion verloren haben (Lynch *et al.*, 1999). Eine dieser Spleißvarianten trägt interessanterweise eine Insertion in der TM2-Domäne, weshalb sie vergleichbar zur *P2RX5*-Variante nicht trimerisieren und



keine funktionellen Kanäle ausbilden kann. Welche physiologischen Bedeutungen diese Spleißvarianten haben, ist unbekannt.

Neben dieser *P2RX5*-Spleißvariante, wird von einem weiteren Polymorphismus berichtet, der durch Untersuchungen an Transplantationspatienten gefunden wurde (de Rijke *et al.*, 2005). Durch ein fehlendes Cytosin in Exon 3 kommt es hier zu einer Änderung des Leserasters und damit zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation. So weist das Protein nur eine Länge von 146 Aminosäuren auf. In den PCR-Analysen konnte eindeutig die längere Spleißvariante von *P2RX5* identifiziert werden. Außerdem weisen die benutzten anti-*P2RX5*-Antikörper Epitope nach, die ebenfalls nur in der längeren *P2RX5*-Spleißvariante zu finden sind.

Die T-Zell-Aktivierung führte nicht zu einer sofortigen Stimulation der *P2RX5*-Genexpression. Diese war erst nach ca. 12 h zu beobachten. Offensichtlich handelte es sich um eine sekundäre Antwort auf den T-Zell-Aktivierungsstimulus. Die Cycloheximid-Sensitivität der *P2RX5*-Expression zeigte, dass erst bestimmte Faktoren (wahrscheinlich spezifische Transkriptionsfaktoren) gebildet werden müssen, um die *P2RX5*-Expression stimulieren zu können. Im Vergleich dazu konnte die Expression von Genen, wie z. B. CD25, deren Expression direkt stimuliert wird (Malek, 2008), durch Cycloheximid zwar vermindert, aber nicht unterdrückt werden.

Die nach 12-24 h erhöhte *P2RX5*-Genexpression in stimulierten CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-Zellen führt zu einer deutlichen Erhöhung der Gleichgewichtskonzentration von *P2RX5*-Protein. Aus diesen Befunden wurde der Schluss gezogen, dass das *P2RX5*-Protein eine Rolle in einer relativ späten Phase der T-Zell-Aktivierung hat.

Für den Nachweis des *P2RX5*-Proteins in Western Blots entsprechender Zelllysate war es schwierig einen geeigneten Antikörper zu finden, da die meisten getesteten Antikörper eine unspezifische Hintergrundfärbung produzierten. In Tests mit Lysaten *P2RX5*-transfizierter HEK293-Zellen lieferte ein Antikörper der Firma Abcam eine spezifische Anfärbung einer Proteinbande mit dem erwarteten Molekulargewicht von 52 kDa. Zusätzlich zeigten die Lysate eine Bande bei ca. 180 kDa. Die relative Signalstärke beider Banden variierte für die gleiche Lysatpreparation von Blot zu Blot. Vermutlich entspricht die etwa 180 kDa Bande *P2RX5*-Proteinaggregaten, die je nach Aufarbeitung und Behandlung der Proben mit SDS-Probenpuffer fallweise stärker bzw. schwächer vertreten waren. Von aggregierten *P2RX5*-Molekülen berichteten auch Duckwitz *et al.* (2006). Dieses Problem der mangelhaften Solubilisierung in Probenpuffern ist bei membranständigen Proteinen weit verbreitet. Dass beide Banden einer spezifischen Anfärbung von *P2RX5*-Protein mit anti-*P2RX5*-Antikörpern entsprachen, wurde durch zwei Kontroll-Experimente belegt.

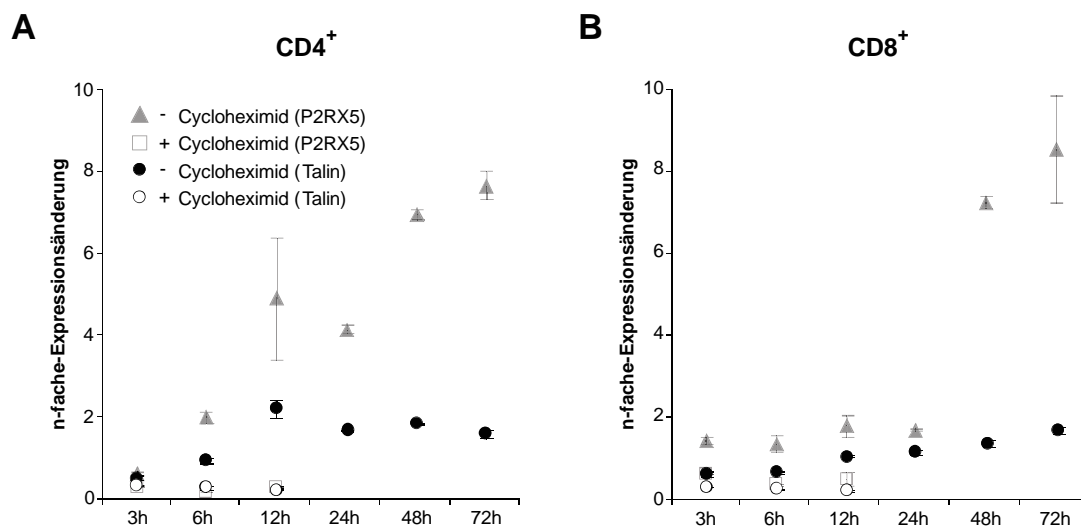
Beide Banden waren abwesend, wenn HEK293-Zellen mit einem Kontroll-Plasmid transfiziert worden waren. Ebenso wurden beide Banden in mit spezifischer siRNA-behandelten T-Zellen unterdrückt. Nicht ausgeschlossen werden kann, dass die P2RX5-180 kDa-Bande einem posttranslational modifiziertem P2RX5-Protein entspricht. Bedingt durch das Fehlen der zweiten Transmembrandomäne liegt der C-Terminus von P2RX5 nicht im Cytosol, sondern im extrazellulären Raum und bietet damit viele Möglichkeiten an posttranslationalen Modifikationen extrazellulärer wie auch intrazellulärer Domänen. Hier kann es eine Vielzahl von Möglichkeiten, wie Glykosylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung etc. geben. Bei einer ELM-Datenbank-Analyse fand sich interessanterweise eine atypische Glykosylierungsstelle bei Aminosäure 116, die bei dem auf vielen Immunzellen exprimierten Signal-Rezeptor Protein CD69 ebenfalls gefunden und glykosyliert wurde (Vance *et al.*, 1997). Ob eine posttranslationale Modifikation des P2RX5-Proteins stattfindet, bedarf weiterer Untersuchungen.

Bei der Aktivierung von T-Zellen kommt es im zeitlichen Rahmen von Minuten zur Ausbildung der immunologischen Synapse (Billadeau *et al.*, 2007). Diese dient zur Festigung der Interaktion zwischen APZ und T-Zelle (Dustin, 2008) und ist unter dem Mikroskop als eine deutliche Verdickung an der Plasmamembran aufgrund der polarisierten Verteilung von Proteinen an der Aktivierungsstelle zu sehen. Während die Bildung der immunologischen Synapse recht gut untersucht ist, finden sich nur wenige Daten in der Literatur zur Aufrechterhaltung der immunologischen Synapse. Zu vermuten ist, dass dies ein dynamischer Prozess ist und dass nach der schnellen Ausbildung der Synapse Signalkaskaden und zelluläre Signalwege aktiviert werden, die aktiv an der Aufrechterhaltung der Synapse beteiligt sind. Kürzlich wurde berichtet, dass Crtam, ein Transmembran-Protein aus der Immunoglobulin-Superfamilie, erst 6 h nach Aktivierung in der Zelle nachweisbar, für die Stabilität der Polarität der aktivierten T-Zelle wichtig und bei der Produktion bestimmter Cytokine involviert ist (Yeh *et al.*, 2008). Das zeitliche Profil der P2RX5-Expression und die polarisierte Lokalisation von P2RX5 lässt vermuten, dass P2RX5 eine vergleichbare Rolle bei der Aufrechterhaltung der T-Zellpolarität zukommt.

In ruhenden Zellen wurde eine homogene Verteilung von P2RX5 beobachtet (Abb. 4-13). Nach T-Zell-Aktivierung fand sich eine polarisierte Verteilung des P2RX5, vergleichbar zu Talin, einem Markerprotein für den peripheren Teil der immunologischen Synapse.

Talin ist ein Cytoskelett-Protein und in der Zelle direkt unter der Plasmamembran lokalisiert, wo es mit in der Plasmamembran integrierten Molekülen interagiert (Kinashi, 2005). Es ist

250 kDa groß und bildet eine Verbindung zwischen Integrinen und Actin-Cytoskelett (Horwitz *et al.*, 1986). So kann Talin nach Integrin-Adhäsion das Cytoskelett reorganisieren, um es für den Zellaktivierungsprozess zu strukturieren. Die Co-Lokalisierung von P2RX5 und Talin deutet darauf hin, dass P2RX5 eine Aufgabe in der Aufrechterhaltung der T-Zellpolarität bzw. in der immunologischen Synapse zukommt. Worin diese besteht, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Der Befund, dass P2RX5 erst nach 12 h hochreguliert wird, deutet auf eine späte Funktion des P2RX5 bei der Zellpolarisierung hin. Dies steht im Gegensatz zu Talin, das bereits an der Ausbildung der Synapse beteiligt ist. Vergleicht man den Zeitverlauf der mRNA-Expressionen von *Talin* und *P2RX5* (Abb. 5-1), zeigt sich, dass das *Talin*-Gen auch schon in nicht-aktivierten Zellen eine sehr hohe Aktivität aufweist und der Zeitverlauf – wie erwartet – nicht vergleichbar zur *P2RX5*-mRNA-Expression ist. Diese Befunde verdeutlichen, dass Talin und P2RX5 unterschiedliche Aufgaben in aktivierten T-Zellen übernehmen.



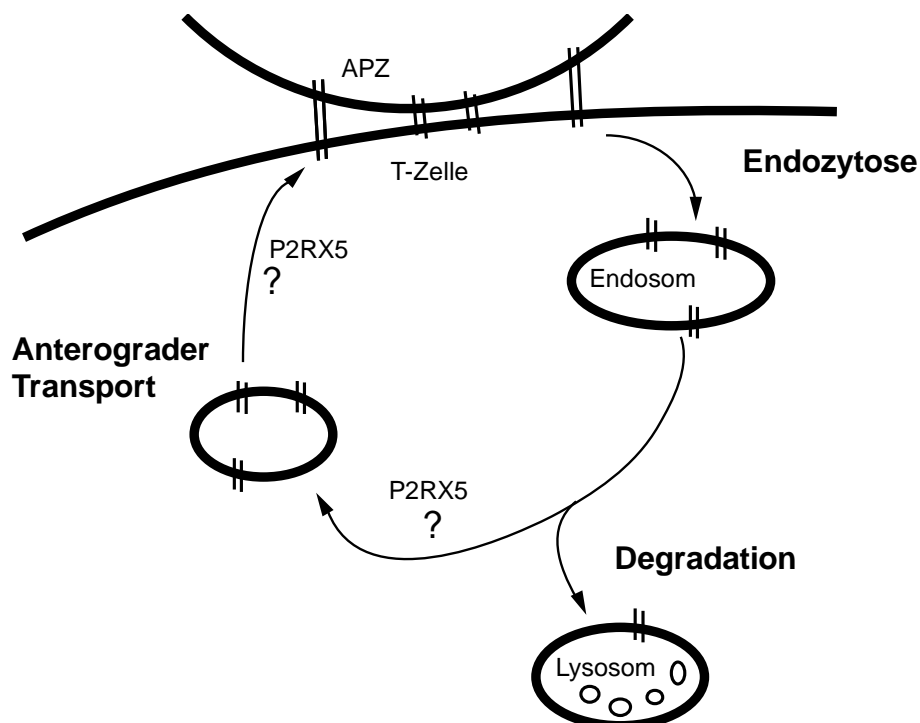
**Abb. 5-1: Zeitreihe von *Talin*-, und *P2RX5*-mRNA-Expression in An- bzw. Abwesenheit von Cycloheximid**

Dargestellt ist die n-fache Expressionsänderung von *Talin*-mRNA aus aufgereinigten CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- Zellen (A bzw. B) nach Aktivierung mit anti-CD3/CD28-Antikörpern beschichteten Kügelchen für 3, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden mit (weiße Kreise) und ohne (schwarze Kreise) Zugabe von Cycloheximid. Zum Vergleich sind die äquivalenten n-fachen Expressionsänderungen der *P2RX5*-mRNA mit (Quadrate) und ohne (Dreiecke) Zugabe von Cycloheximid weniger intensiv im Hintergrund gezeigt.

Ob die Anwesenheit von P2RX5 in der späten Phase der T-Zell-Aktivierung für die Stabilität der T-Zellpolarität wichtig war oder nicht, wurde in Experimenten untersucht, bei denen mit Hilfe von siRNA *P2RX5*-mRNA in CD4<sup>+</sup>-Zellen gezielt und spezifisch zerstört wurde. Es

konnten allerdings keine Bedingungen gefunden werden, die zu einer vollständigen Unterdrückung von *P2RX5*-mRNA führten. Dennoch waren die erhaltenen Ergebnisse eindeutig. Mit der spezifischen Absenkung der *P2RX5*-mRNA-Konzentration ging eine entsprechende Abnahme des P2RX5-Proteins einher. Dies hatte offensichtlich zur Folge, dass die Zahl der nach T-Zell-Aktivierung gebildeten immunologischen Synapsen deutlich vermindert war. Dieser Befund bedeutete, dass P2RX5 eine wichtige Komponente für die Stabilität der Zellpolarität aktivierter T-Zellen ist. Unterstützt wird dieser Befund durch die Tatsache, dass in den siRNA-Experimenten die transfizierten T-Zellen sich nach vierstündiger Aktivierung nicht von Kontrollen unterschieden, sondern ein deutlicher morphologischer Effekt erst nach 24-stündiger Aktivierung zu beobachten war.

Interessanterweise zeigten die Western Blot-Analysen, dass parallel zur Abnahme des P2RX5-Proteins auch eine Abnahme von Talin und LFA-1 festzustellen war. Dieser Befund bedeutete, dass durch Unterdrückung der P2RX5-Proteinsynthese die Konzentration von Proteinen, die in der immunologischen Synapse angesiedelt sind, vermindert wird. Die durchgeführten Versuche können nicht entscheiden, ob der Effekt auf Talin- und LFA-1-Proteinkonzentration direkt oder indirekt ist.



**Abb. 5-2: Schematische Darstellung einer hypothetischen Funktion von P2RX5 in aktivierten T-Zellen**

Graphische Darstellung der aufgestellten Hypothese für eine Funktion von P2RX5 beim anterograden Transport internalisierter Proteine.

Denkbar ist aber auch das folgende Szenario (Abb. 5-2): Die längerfristige Aufrechterhaltung der Synapse ist ein dynamischer Prozess, indem ständig Proteine der immunologischen Synapse internalisiert und wieder neu eingebaut werden. Dies bedingt wahrscheinlich ein Rezyklisieren synaptischer Proteine über einen endozytotischen/endosomalenen Rezyklisierungsweg, wie er vielfach für Membranproteine in der Literatur beschrieben ist (Jugloff *et al.*, 1999; McEwen *et al.*, 2007). Nimmt man an, dass P2RX5 hierbei eine Rolle spielt, dann könnten die bisherigen Befunde bedeuten, dass ein Fehlen von P2RX5 den Rezyklisierungsweg unterbricht und als Folge die Proteine einem proteasomalen Abbau zugeführt werden. Dieses relativ einfache Reaktionsschema könnte erklären, warum nach Abnahme von P2RX5 die immunologische Synapse verschwindet und die Konzentration synaptischer Proteine abnimmt. Für eine Rolle von P2RX5 bei einer Rezyklisierung spricht auch, dass in den Biotinylierungsversuchen dieses sowohl in der Plasmamembran, als auch im Zellinneren gefunden wurde.

Im Vergleich mit Crtam, ist P2RX5 auch in nicht-aktivierten T-Zellen zu finden, wird aber um ein Vielfaches heraufreguliert, sobald die Zelle aktiviert ist. Die Anwesenheit des P2RX5 in nicht-aktivierten Zellen könnte für eine allgemeinere Rolle des P2RX5 bei der Rezyklisierung von Membranproteinen in der T-Zelle sprechen. Für nicht-aktivierte primäre Zellen gilt aber auch zu berücksichtigen, dass durch die vorangegangene Blutentnahme und die daran angeschlossenen Zentrifugationsschritte zur Serenabtrennung und weiteren Zellseparation es sehr wahrscheinlich ist, dass ein Teil der Zellen in einen aktivierten Zustand getrieben wurde. Dies kann erst in weiteren Untersuchungen zur Funktion des P2RX5 geklärt werden.

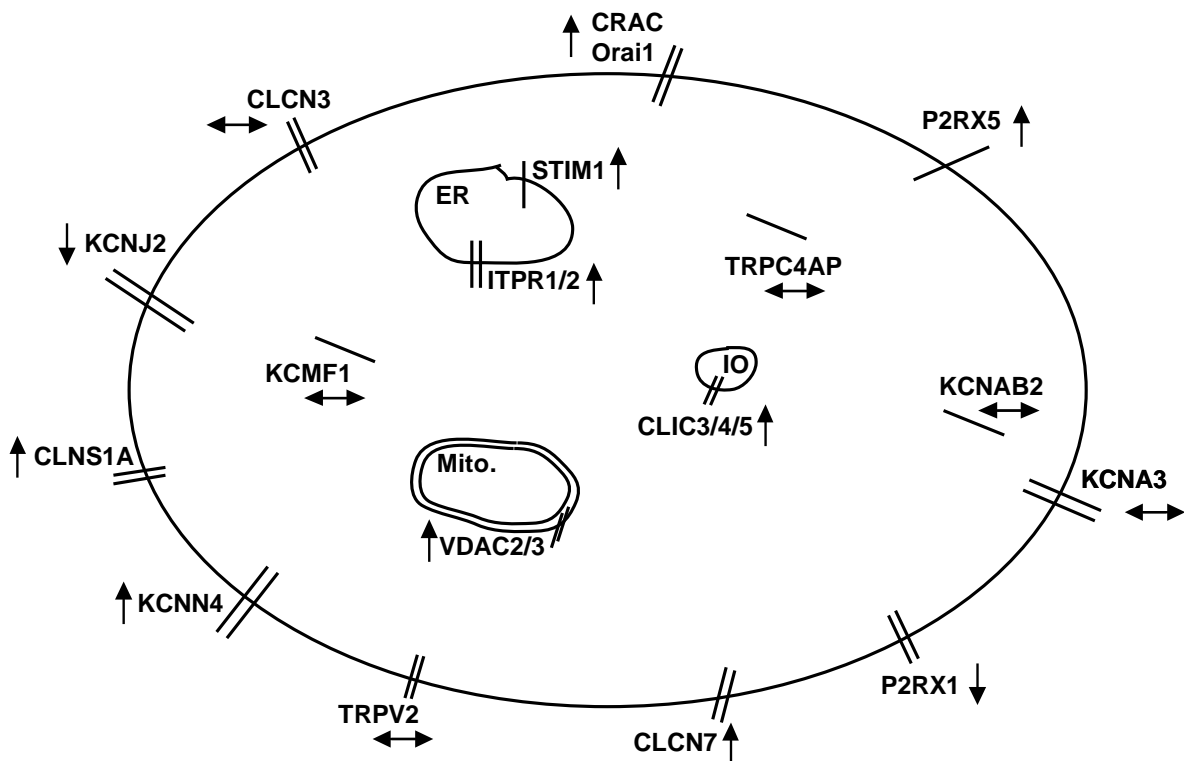
## 5.2. Ionenkanäle und ihre Funktion in der Aktivierung von humanen T-Lymphozyten

Die durchgeführten eigenen Array-Analysen lieferten eine übersichtliche Zahl an exprimierten Ionenkanalgenen, von denen fünf reguliert erschienen. Die anschließende Analyse mit Hilfe von Affymetrix-Chips bestätigte die Daten (vgl. Korrelation Abb. 4-4) und erhöhte, aufgrund der größeren Anzahl an Gen-Sonden, die Anzahl von regulierten Ionenkanalgenen auf 13. Die Affymetrix-Chips enthielten einen großen Teil an menschlichen Genen, während für die eigenen Arrays nur klassische Ionenkanalgene untersucht worden waren. Die Korrelation der beiden Array-Ergebnisse zeigte eine gute Übereinstimmung der beiden Plattformen, wobei die Expressionen von Genen auf eigenen Arrays im Durchschnitt eine 1,7-fach höhere Expression zeigten als die der Affymetrix-Analyse. Worauf dieser Unterschied beruht, wurde nicht näher untersucht. Ein Grund könnte darin liegen, dass bei Affymetrix-Analysen die verwendeten Oligonukleotide beliebigen Bereichen des jeweiligen Gens entsprechen. Bei den eigenen Arrays wurde darauf geachtet, dass sich die benutzten Sequenzen möglichst nah am 3'-Ende des Gens befanden, um Artefakte durch Strangabbruch bei der reversen Transkription mit Hilfe von Oligo-dT Primern zu minimieren. Ein weiterer Grund für Unterschiede zwischen den eigenen und den Affymetrix-Array-Analysen liegt möglicherweise auch in den Transkripten selbst. So besitzen z. B. Calcium-Kanäle, die zwar in den eigenen Array-Analysen gefunden, aber in den Affymetrix-Daten abwesend waren, sehr viele verschiedene Transkriptvarianten. Es ist nicht ausgeschlossen, dass in den Analysen nach unterschiedlichen Varianten gesucht wurde.

Ionenkanäle in T-Lymphozyten spielen Schlüsselrollen bei der Kontrolle des Membranpotentials und regulieren dabei den Calcium-Einstrom, welcher wichtige Signalwege aktiviert. Das besondere in aktivierten T-Zellen ist, dass über längere Zeit eine hohe Calcium-Konzentration aufrechterhalten wird (Oh-hora und Rao, 2008). Dies erfordert die Aktivität mehrerer verschiedener Ionenkanäle, die entweder Calcium leiten, wie CRAC-, TRP-, oder spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle oder aber durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert werden und zu einer Repolarisierung der Plasmamembran führen, wie z. B.  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte  $\text{I}_k$ -Kanäle (wie KCNN4). Darüber hinaus spielen spannungsabhängig gesteuerte de- (P2X-Rezeptoren) und repolarisierende (KCNA3) Kanäle ebenfalls eine wichtige Rolle (Feske, 2007; Scharenberg *et al.*, 2007). Neben diesen Kanälen übernehmen weitere Kanäle z. B. Chlorid-Kanäle, die das

Anschwellen von Lymphozyten bei der Aktivierung regulieren, wichtige Aufgaben (Jiang *et al.*, 2002). Weiterhin erfüllen auch Rezeptoren, wie z. B. der IP<sub>3</sub>-Rezeptor, welcher für die Leerung der intrazellulären Calcium-Speicher des endoplasmatischen Reticulums sorgt, wichtige Funktionen.

In der Abbildung 5-3 sind Ionenkanäle und Rezeptoren, die in den Array-Analysen dieser Arbeit gefunden wurden, sowie ihre Lokalisation innerhalb der Zelle schematisch dargestellt.



### Abb. 5-3: Ionenkanäle und Rezeptoren mit Funktionen in der T-Zell-Aktivierung

Überblick der in die T-Zellaktivierung involvierten Kanäle und Rezeptoren. Neben den in der Literatur beschriebenen wurden auch durch diese Arbeit identifizierte Moleküle hinzugefügt. Die Pfeile deuten Herauf- (↑), Herunter- (↓) oder keine Regulation (↔) an. ER – endoplasmatisches Reticulum; IO – Intrazelluläres Organell; Mito. – Mitochondrium (Komplette Gennamen finden sich im Anhang (8.1))

Ergänzt wurde das Schema um ein Schlüsselmolekül für den Calcium-Einstrom, den „Ca<sup>2+</sup>-release-activated calcium channel“ (CRAC-Kanal). Seine Existenz und physiologische Funktion wurde bereits früh in Mastzellen nachgewiesen (Hoth und Penner, 1992) und darauffolgend als genereller Calcium-Signalweg in vielen Zellarten anerkannt. Trotz der frühen Entdeckung dieses Kanals war seine molekulare Zusammensetzung lange Zeit nicht bekannt. Es wurden verschiedene TRP-Familienmitglieder als Untereinheiten gehandelt, bis Prakriya *et al.* (2006) das Genprodukt von *Orai1* als essentielle Poreneinheit des CRAC-

Kanals identifizierten. Innerhalb dieser Arbeit konnte *Orai1* nicht nachgewiesen werden, da es aufgrund seiner relativ späten Entdeckung nicht in die Analysen der eigenen Arrays einbezogen wurde und auch nicht auf dem kommerziellen Chip von Affymetrix zu finden war.

Die Aktivierung des CRAC-Kanals erfolgt über STIM1 (Penna *et al.*, 2008), das als Bindeglied zwischen Leerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher und der Aktivierung von CRAC-Kanälen fungiert (Liou *et al.*, 2005). Es agiert über eine N-terminale EF-Hand, welche sich im ER Lumen befindet, als Calcium-Sensor und transloziert vom ER zur Plasmamembran, um dort über seinen C-Terminus mit in der Plasmamembran lokalisierten Orai1-Dimeren zu interagieren. Diese Interaktion führt zur Dimerisierung von zwei Orai1-Dimeren zu Tetrameren, welche dann die  $\text{Ca}^{2+}$ -selektive Pore des CRAC-Kanals bilden. *STIM1* wurde erst nachträglich in die Glas-Array-Analysen integriert, so dass es nur in drei der insgesamt 14 Analysen anwesend war und deshalb in die Ergebnistabelle hinzugefügt wurde. In diesen drei Analysen allerdings zeigte es eine durchschnittliche Expressionsänderung um das 3,4-fache ( $\pm 0,48$  S.E.M.). Im Gegensatz dazu konnte eine Expression von *STIM1* in den Affymetrix-Analysen nicht nachgewiesen werden.

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Kaliumkanal KCNN4 ist ein wichtiger Gegenpol zum CRAC-Kanal und damit für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase essentiell. Ähnlich wie bei CRAC-Kanälen war die Existenz des Kanals früher bekannt als seine molekulare Zusammensetzung (Grissmer *et al.*, 1993). Im Jahr 1997 klonierten Logsdon *et al.* das Gen *KCNN4* (*hKCa4*), welches für eine Untereinheit des kanalbildenden Proteins kodiert. In den Array-Analysen konnte *KCNN4* nicht eindeutig als heraufreguliert eingestuft werden. Da für diese Analysen keine reinen Lymphozyten, sondern PBMC benutzt wurden, ist es möglich, dass das *KCNN4*-Transkript zu gering konzentriert war, um es nachzuweisen. So konnte bei Expressionsanalysen gezeigt werden, dass *KCNN4*-mRNA in PBMC in deutlich geringerer Konzentration zu finden ist, als z. B. in Milz oder Thymus, beides Gewebe mit großer Anreicherung an Lymphozyten (Logsdon *et al.*, 1993; Ghanshani *et al.*, 2000). In separierten  $\text{CD4}^+$ - und  $\text{CD8}^+$ -Zellen konnte eine deutliche Expressionsänderung nachgewiesen werden. Ghanshani *et al.* (2000) berichteten keinen Unterschied in der *KCNN4*-mRNA-Konzentration nach PHA-L- oder anti-CD3-Stimulation. In dieser Arbeit war eine geringere *KCNN4*-mRNA-Stimulierung nach anti-CD3-Aktivierung im Vergleich zur Stimulation mit PHA-L zu beobachten. Der Rückgang betrug zwischen 35 und 50%. Im Unterschied zu den hier durchgeführten Analysen wurde bei Ghanshani *et al.* (2000) auf die Expressionsänderung aus elektrophysiologischen Messungen geschlossen; zusätzlich wurden die Zellen für 48 h (und nicht für 72 h) aktiviert.



Der spannungsabhängige Kaliumkanal KCNA3 (Kv1.3) gilt als Schlüsselmolekül für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials der T-Zelle (Lewis *et al.*, 1995). Dies konnte unter anderem durch seine im Vergleich zu anderen Ionenkanälen hohe Kanal-Dichte selbst in ruhenden T-Zellen gezeigt werden. In der Literatur konnten keine eindeutigen Daten für *KCNA3*-Transkriptionsänderungen gefunden werden. Viele der veröffentlichten Daten basieren auf elektrophysiologischen Analysen (Deutsch *et al.*, 1986; Grissmer *et al.*, 1993). In zwei der in dieser Arbeit durchgeführten qPCR-Analysen wurde das *KCNA3*-Transkript nachgewiesen, es konnte aber kein Unterschied zwischen ruhenden und aktivierten T-Zellen gefunden werden. Deshalb wurde das Transkript in den weiteren Analysen nicht weiter untersucht. Dasselbe galt auch für die mit *KCNA3*-Kanälen assoziierte  $\beta$ -Untereinheit *KCNAB2*.

Bei beiden Arten der Array-Analyse war die Expression des *KCNJ2*-Gens, welches für eine Untereinheit eines einwärts rektifizierenden Kaliumkanals kodiert, stark herunterreguliert (s. Tab. 4-2 bzw. Tab. 4-3). Diese Herunterregulation bei Aktivierung von Immunzellen wurde bisher nur für Makrophagen nachgewiesen (Vicente *et al.*, 2003). Da bei den Array-Analysen PBMC benutzt wurden, war es möglich, dass die Herunterregulation durch Makrophagen-Verunreinigungen hervorgerufen wurde. Die *KCNJ2*-Expression wurde aber auch in qPCR-Analysen basierend auf reinen  $CD4^+$ - bzw.  $CD8^+$ -Zellpopulationen herunterreguliert (s. Abb. 4-7, Abb. 4-8 und Abb. 4-9), so dass *KCNJ2* höchstwahrscheinlich auch in T-Lymphozyten für die Immunantwort eine Rolle spielt. Möglicherweise erleichtert die Herunterregulation von *KCNJ2* bei Lymphozyten-Aktivierung eine für den  $Ca^{2+}$ -Einstrom nötige Membrandepolarisation. Diese Hypothese konnte nicht näher untersucht werden, da es nicht möglich war, in elektrophysiologischen Messungen einen *KCNJ2*-vermittelten Strom in ruhenden T-Zellen zu identifizieren, weshalb auf eine weitere Analyse der Funktion von *KCNJ2* in aktivierten Lymphozyten verzichtet wurde.

### 5.3. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein neues Molekül in der Signalkaskade von aktivierten T-Zellen identifiziert werden: P2RX5.

Durch die späte Heraufregulation seiner mRNA spielt es erst in einer späteren Phase der T-Zellaktivierung eine Rolle. P2RX5 ist ein Membranprotein, das in aktivierten T-Zellen sowohl in der Plasmamembran wie auch intrazellulär nachgewiesen wurde. Nach Aktivierung der T-Zellen reichert sich P2RX5 in Bereichen der immunologischen Synapse in polarisierter Form an. Wird die P2RX5-Proteinsynthese unterdrückt, kommt es zu einer verminderten T-Zellpolarität und zu einem Verlust an ausgebildeten Synapsen. Durch seinen Einfluss auf die längerfristige Stabilisierung der Polarität aktivierter T-Zellen konnte auf eine essentielle Rolle von P2RX5 in der T-Zell-Antwort geschlossen werden. Hier sollte ein möglicher Einfluss von P2RX5 auf die Produktion oder Sekretion verschiedener Cytokine, welche für T-Zell-vermittelte Immunantworten von essentieller Bedeutung sind, untersucht werden. Es wird vorgeschlagen, dass die Aufrechterhaltung der immunologischen Synapse ein dynamischer Prozess ist, bei dem ständig Proteine ab- und eingebaut werden, und dass P2RX5 hierbei eine Rolle spielt.

## 6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe zweier unabhängiger Array-Plattformen die unterschiedliche Expression von Ionkanalgenen in ruhenden bzw. aktivierten humanen Lymphozyten untersucht. Neben bereits bekannten Genen, wie z.B. *KCNN4*, konnten wenige regulierte Gene gefunden werden. *P2RX5* wurde aufgrund seiner 3,5-fachen Heraufregulation in aktivierten Lymphozyten eingehender untersucht. Anschließende qPCR-Analysen nach verschiedenen Aktivierungs-Stimuli bestätigten die Daten der Array-Analyse und ergaben, dass *P2RX5*-mRNA erst nach 12-stündiger Aktivierung heraufreguliert wird.

*P2RX5* ist im humanen Organismus vornehmlich als verkürzte Transkriptionsvariante zu finden, welche aufgrund des Verlusts der zweiten Transmembran-Domäne nicht mehr zu einem funktionellen Kanal trimerisieren kann. Auf der Suche nach einer anderen Funktion konnte gezeigt werden, dass *P2RX5*-Protein sowohl in der Plasmamembran, aber auch im Zellinneren lokalisiert ist.

Durch immunocytochemische Analysen konnte eine Co-Lokalisation von *P2RX5* mit einem Marker für den peripheren Teil der immunologischen Synapse, Talin, gefunden werden. Nach Unterdrückung der *P2RX5*-mRNA in  $CD4^+$ -T-Zellen mit Hilfe spezifischer siRNA wurde eine reduzierte Anzahl Zellen gefunden, die eine immunologische Synapse ausbildeten. Gleichzeitig wurde auch eine Reduktion in der Proteinkonzentration von zwei Synapsen-Markern, Talin und LFA-1, gefunden.

Aus den Beobachtungen wurde geschlossen, dass *P2RX5* eine Rolle in einer späten und bisher wenig untersuchten Phase der T-Zellaktivierung zukommt. Es scheint für die Stabilität der T-Zell-Polarität bzw. der immunologischen Synapse und darin enthaltener Proteine essentiell zu sein.

## 7. Literaturverzeichnis

**Alizadeh, A. A. and Staudt, L. M.** (2000) "Genomic-scale gene expression profiling of normal and malignant immune cells." *Curr Opin Immunol* **12**(2): 219-25.

**Andres, P. G., Howland, K. C., Dresnek, D., Edmondson, S., Abbas, A. K. and Krummel, M. F.** (2004) "CD28 signals in the immature immunological synapse." *J Immunol* **172**(10): 5880-6.

**Battaglia, C., Salani, G., Consolandi, C., Bernardi, L. R. and De Bellis, G.** (2000) "Analysis of DNA microarrays by non-destructive fluorescent staining using SYBR green II." *Biotechniques* **29**(1): 78-81.

**Billadeau, D. D., Nolz, J. C. and Gomez, T. S.** (2007) "Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton." *Nat Rev Immunol* **7**(2): 131-43.

**Bo, X., Jiang, L. H., Wilson, H. L., Kim, M., Burnstock, G., Surprenant, A. and North, R. A.** (2003) "Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor." *Mol Pharmacol* **63**(6): 1407-16.

**Bunnell, S. C., Hong, D. I., Kardon, J. R., Yamazaki, T., McGlade, C. J., Barr, V. A. and Samelson, L. E.** (2002) "T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies." *J Cell Biol* **158**(7): 1263-75.

**Cahalan, M. D., Wulff, H. and Chandy, K. G.** (2001) "Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system." *J Clin Immunol* **21**(4): 235-52.

**Campi, G., Varma, R. and Dustin, M. L.** (2005) "Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling." *J Exp Med* **202**(8): 1031-6.

**Cemerski, S. and Shaw, A.** (2006) "Immune synapses in T-cell activation." *Curr Opin Immunol* **18**(3): 298-304.

**Collo, G., North, R. A., Kawashima, E., Merlo-Pich, E., Neidhart, S., Surprenant, A. and Buell, G.** (1996) "Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels." *J Neurosci* **16**(8): 2495-507.

**de Rijke, B., van Horsen-Zoetbrood, A., Beekman, J. M., Otterud, B., Maas, F., Woestenenk, R., Kester, M., Leppert, M., Schattenberg, A. V., de Witte, T., van de Wiel-van Kemenade, E. and Dolstra, H.** (2005) "A frameshift polymorphism in P2X5 elicits an allogeneic cytotoxic T lymphocyte response associated with remission of chronic myeloid leukemia." *J Clin Invest* **115**(12): 3506-16.

**Delon, J., Bercovici, N., Liblau, R. and Trautmann, A.** (1998) "Imaging antigen recognition by naive CD4<sup>+</sup> T cells: compulsory cytoskeletal alterations for the triggering of an intracellular calcium response." *Eur J Immunol* **28**(2): 716-29.

**Deutsch, C., Krause, D. and Lee, S. C.** (1986) "Voltage-gated potassium conductance in human T lymphocytes stimulated with phorbol ester." *J Physiol* **372**: 405-23.

**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**(3): 587-600.

**Diehl, F., Beckmann, B., Kellner, N., Hauser, N. C., Diehl, S. and Hoheisel, J. D.** (2002) "Manufacturing DNA microarrays from unpurified PCR products." *Nucleic Acids Res* **30**(16): e79.

**Duckwitz, W., Hausmann, R., Aschrafi, A. and Schmalzing, G.** (2006) "P2X5 subunit assembly requires scaffolding by the second transmembrane domain and a conserved aspartate." *J Biol Chem* **281**(51): 39561-72.

**Dustin, M. L.** (2008) "T-cell activation through immunological synapses and kinapses." *Immunol Rev* **221**: 77-89.

**Feske, S.** (2007) "Calcium signalling in lymphocyte activation and disease." *Nat Rev Immunol* **7**(9): 690-702.

**Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M. and Rao, A.** (2006) "A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function." *Nature* **441**(7090): 179-85.

**Ghanshani, S., Wulff, H., Miller, M. J., Rohm, H., Neben, A., Gutman, G. A., Cahalan, M. D. and Chandy, K. G.** (2000) "Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences." *J Biol Chem* **275**(47): 37137-49.

**Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M. and Dustin, M. L.** (1999) "The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation." *Science* **285**(5425): 221-7.

**Grissmer, S., Nguyen, A. N. and Cahalan, M. D.** (1993) "Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology." *J Gen Physiol* **102**(4): 601-30.

**Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J. and Rao, A.** (2003) "Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT." *Genes Dev* **17**(18): 2205-32.

- Horwitz, A., Duggan, K., Buck, C., Beckerle, M. C. and Burridge, K.** (1986) "Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage." *Nature* **320**(6062): 531-3.
- Hoth, M. and Penner, R.** (1992) "Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells." *Nature* **355**(6358): 353-6.
- Iezzi, G., Karjalainen, K. and Lanzavecchia, A.** (1998) "The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells." *Immunity* **8**(1): 89-95.
- Jiang, B., Hattori, N., Liu, B., Kitagawa, K. and Inagaki, C.** (2002) "Expression of swelling- and/or pH-regulated chloride channels (ClC-2, 3, 4 and 5) in human leukemic and normal immune cells." *Life Sci* **70**(12): 1383-94.
- Jugloff, D. G., Khanna, R., Schlichter, L. C. and Jones, O. T.** (2000) "Internalization of the Kv1.4 potassium channel is suppressed by clustering interactions with PSD-95." *J Biol Chem* **275**(2): 1357-64.
- Khan, A. A., Steiner, J. P., Klein, M. G., Schneider, M. F. and Snyder, S. H.** (1992) "IP<sub>3</sub> receptor: localization to plasma membrane of T cells and cocapping with the T cell receptor." *Science* **257**(5071): 815-8.
- Khanna, R., Chang, M. C., Joiner, W. J., Kaczmarek, L. K. and Schlichter, L. C.** (1999) "hSK4/hIK1, a calmodulin-binding K<sub>Ca</sub> channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation." *J Biol Chem* **274**(21): 14838-49.
- Kinashi, T.** (2005) "Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes." *Nat Rev Immunol* **5**(7): 546-59.
- Le, K. T., Paquet, M., Nouel, D., Babinski, K. and Seguela, P.** (1997) "Primary structure and expression of a naturally truncated human P2X ATP receptor subunit from brain and immune system." *FEBS Lett* **418**(1-2): 195-9.
- Lewis, R. S.** (2001) "Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes." *Annu Rev Immunol* **19**: 497-521.
- Lewis, R. S. and Cahalan, M. D.** (1995) "Potassium and calcium channels in lymphocytes." *Annu Rev Immunol* **13**: 623-53.
- Lin, J., Miller, M. J. and Shaw, A. S.** (2005) "The c-SMAC: sorting it all out (or in)." *J Cell Biol* **170**(2): 177-82.
- Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr. and Meyer, T.** (2005) "STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx." *Curr Biol* **15**(13): 1235-41.

**Logsdon, N. J., Kang, J., Togo, J. A., Christian, E. P. and Aiyar, J.** (1997) "A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes." *J Biol Chem* **272**(52): 32723-6.

**Lynch, K. J., Touma, E., Niforatos, W., Kage, K. L., Burgard, E. C., van Biesen, T., Kowaluk, E. A. and Jarvis, M. F.** (1999) "Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors." *Mol Pharmacol* **56**(6): 1171-81.

**Macian, F.** (2005) "NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function." *Nat Rev Immunol* **5**(6): 472-84.

**Malek, T. R.** (2008) "The biology of interleukin-2." *Annu Rev Immunol* **26**: 453-79.

**McEwen, D. P., Schumacher, S. M., Li, Q., Benson, M. D., Iniguez-Lluhi, J. A., Van Genderen, K. M. and Martens, J. R.** (2007) "Rab-GTPase-dependent endocytic recycling of Kv1.5 in atrial myocytes." *J Biol Chem* **282**(40): 29612-20.

**Meiri, K. F.** (2005) "Lipid rafts and regulation of the cytoskeleton during T cell activation." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**(1461): 1663-72.

**Moss, W. C., Irvine, D. J., Davis, M. M. and Krummel, M. F.** (2002) "Quantifying signaling-induced reorientation of T cell receptors during immunological synapse formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(23): 15024-9.

**Murphy, K., Travers, P., Walport, M.** (2008) Janeway's Immunology, 7. Edition, *Garland Science, Taylor & Francis Group*, New York

**Nolz, J. C., Medeiros, R. B., Mitchell, J. S., Zhu, P., Freedman, B. D., Shimizu, Y. and Billadeau, D. D.** (2007) "WAVE2 regulates high-affinity integrin binding by recruiting vinculin and talin to the immunological synapse." *Mol Cell Biol* **27**(17): 5986-6000.

**North, R. A.** (2002) "Molecular physiology of P2X receptors." *Physiol Rev* **82**(4): 1013-67.

**North, R. A. and Surprenant, A.** (2000) "Pharmacology of cloned P2X receptors." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**: 563-80.

**Oh-hora, M. and Rao, A.** (2008) "Calcium signaling in lymphocytes." *Curr Opin Immunol* **20**(3): 250-8.

**Peinelt, C., Vig, M., Koomoa, D. L., Beck, A., Nadler, M. J., Koblan-Huberson, M., Lis, A., Fleig, A., Penner, R. and Kinet, J. P.** (2006) "Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1)." *Nat Cell Biol* **8**(7): 771-3.

**Penna, A., Demuro, A., Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Safrina, O., Parker, I. and Cahalan, M. D.** (2008) "The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers." *Nature* **456**(7218): 116-20.

**Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A. and Hogan, P. G.** (2006) "Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel." *Nature* **443**(7108): 230-3.

**Pribila, J. T., Quale, A. C., Mueller, K. L. and Shimizu, Y.** (2004) "Integrins and T cell-mediated immunity." *Annu Rev Immunol* **22**: 157-80.

**Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D., Velicelebi, G. and Stauderman, K. A.** (2005) "STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function." *J Cell Biol* **169**(3): 435-45.

**Sambrook, J., Russel, D.W.** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3. Auflage, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York

**Scharenberg, A. M., Humphries, L. A. and Rawlings, D. J.** (2007) "Calcium signalling and cell-fate choice in B cells." *Nat Rev Immunol* **7**(10): 778-89.

**Tooley, A. J., Jacobelli, J., Moldovan, M. C., Douglas, A. and Krummel, M. F.** (2005) "T cell synapse assembly: proteins, motors and the underlying cell biology." *Semin Immunol* **17**(1): 65-75.

**Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979) "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350-4.

**Vance, B. A., Wu, W., Ribaldo, R. K., Segal, D. M. and Kears, K. P.** (1997) "Multiple dimeric forms of human CD69 result from differential addition of N-glycans to typical (Asn-X-Ser/Thr) and atypical (Asn-X-cys) glycosylation motifs." *J Biol Chem* **272**(37): 23117-22.

**Vicente, R., Escalada, A., Coma, M., Fuster, G., Sanchez-Tillo, E., Lopez-Iglesias, C., Soler, C., Solsona, C., Celada, A. and Felipe, A.** (2003) "Differential voltage-dependent K<sup>+</sup> channel responses during proliferation and activation in macrophages." *J Biol Chem* **278**(47): 46307-20.

**Vig, M., Beck, A., Billingsley, J. M., Lis, A., Parvez, S., Peinelt, C., Koomoa, D. L., Soboloff, J., Gill, D. L., Fleig, A., Kinet, J. P. and Penner, R.** (2006) "CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel." *Curr Biol* **16**(20): 2073-9.

**Volker** (2001) "Technical Protocols-Microarray Series: Hybridization-Coverslip."



**Ward, S. G.** (1996) "CD28: a signalling perspective." *Biochem J* **318** ( Pt 2): 361-77.

**Yeh, J. H., Sidhu, S. S. and Chan, A. C.** (2008) "Regulation of a late phase of T cell polarity and effector functions by Crtam." *Cell* **132**(5): 846-59.

**Zhang, S. L., Yeromin, A. V., Zhang, X. H., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K. A. and Cahalan, M. D.** (2006) "Genome-wide RNAi screen of Ca<sup>2+</sup> influx identifies genes that regulate Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(24): 9357-62.

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
18S rRNA	<i>18S (Svedberg Unit) ribosomal RNA</i>
A	Adenin; Adsorption
Abb.	Abbildung
ACC	<i>American clone collection</i>
Acc.-Nr.	<i>Accession Nummer (NCBI)</i>
<i>ae I</i>	Gen aus <i>Zea mays</i>
akt.	aktiviert
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosin-Monophosphat
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APZ	Antigen präsentierende Zelle(n)
ATP	Adenosin-Triphosphat
B-2M	Beta 2-Microglobulin
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CACN	<i>Calcium channel</i>
CAMKK1	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1</i>
CARKL	<i>Carbohydrate kinase like</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD4 <sup>+</sup>	T-Lymphozyte mit CD4-Expression
CD8 <sup>+</sup>	T-Lymphozyte mit CD8-Expression
cDNA	<i>complementary Desoxyribonucleic Acid</i>
CE11	Gen aus <i>Zea mays</i>
CF	Cytosol-Fraktion

---

CLC	<i>Chloride channel</i>
CLN	<i>Chloride channel, nucleotide-sensitive</i>
CRAC	<i>Calcium released-activated channel</i>
CREB	<i>Cyclic-AMP-responsive-element-binding Protein</i>
cRNA	<i>complementary Ribonucleic Acid</i>
c-SMAC	zentraler supramolekularer Aktivierungskomplex
Ct	<i>Cycle threshold</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAG	Diacylglycerol
<i>DD1B</i>	Gen aus <i>Zea mays</i>
DEPC-H <sub>2</sub> O	Diethylpyrocarbonat-behandeltes Wasser
d. h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's modified earle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
DPPX	<i>Dipeptidyl-peptidase 6</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dUTP	desoxy-Uracil-Triphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylene-diamine-tetraacetic acid</i>
eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>
<i>ELG-Protein</i>	Gen ( ID 55421)
ER	Endoplasmatisches Reticulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat. für "die anderen")
FACS	<i>Fluorescent-activated cell sorting</i>
f.o.i.	Frequenz der Inkorporation
g	Gramm; Erdbeschleunigung
G	Guanin
GAPDH	Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
GRB2	Wachstum-Faktor-gebundenes Protein-2
GUSB	<i>Glucuronidase, beta</i>

---

h	Stunde
HCN	<i>Hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HPRT1	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IFG	Integrierte funktionelle Genomik
IgG	Immunglobulin G
Ik-Kanal	<i>Intermediate conductance-Kanal</i>
IP <sub>3</sub>	Inositol Triphosphat
ITGAE	Integrin alpha E
K	Kontrolle
k	kilo
KCMF1	<i>Potassium channel modulatory factor 1</i>
KCN	<i>Potassium channel</i>
kDa	kilo-Dalton
LAT	Linker für Aktivierung von T-Zellen
LB	<i>Luria Broth</i> (Medium)
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen-1</i>
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar/ Mikromol pro Liter
M	Mol pro Liter
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MF	Membran-Fraktion
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute/-n
ml	Milliliter
mV	Milli Volt
n	n-fache Expressionsänderung; Anzahl der Experimente
n.akt.	nicht aktiviert
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

---

NF	nicht-gebundene Fraktion
NHS	<i>N-Hydroxysuccinimide</i>
nm	Nanometer
norm.	normalisiert
N-Terminus	Amino-Terminus
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
OD	optische Dichte
Oligo-dT	Oligonukleotide mit 16-18 Thyminen
<i>Orail</i>	<i>ORAI calcium release-activated calcium modulator 1</i>
<i>p</i>	p-Wert, Wahrscheinlichkeit
P2(R)X	<i>Purinergic receptor, ligand-gated ion channel</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBMC	<i>peripheral Blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate buffered saline-Tween 20</i>
(q)PCR	<i>(quantitative) Polymerase chain reaction</i>
pg	Picogramm
PGK1	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>
PHA-L	Phytohemagglutinin-L
PIM	<i>Proteinase Inhibitor Mix</i>
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol Bisphosphat
PLC $\gamma$	Phospho-Lipase C $\gamma$
PMCA	Plasmamembran Ca <sup>2+</sup> ATP-ase
pmol	Picomol
PPIA	<i>Peptidylprolyl isomerase A</i>
p-SMAC	peripherer supramolekularer Aktivierungskomplex
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RPLPO	<i>Ribosomal protein, large, PO</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur (22-25°C)
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
s.	siehe
S.E.M.	<i>standard error of the mean</i>

---

SCN	<i>Sodium channel</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SF	Streptavidin-Kügelchen gebundene Fraktion
Shaker	Kalium Kanal aus <i>Drosophila melanogaster</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SSC	<i>Sodium citrate sodium chloride</i>
STIM1	<i>stromal interaction molecule 1</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat EDTA
TBE	Tris-Borat EDTA
TBP	<i>TATA box binding protein</i>
TCR	<i>T-Cell-Receptor</i>
TE	Tris-EDTA
TFRC	<i>Transferrin receptor</i>
Th	T-Helfer-Zelle
TLR	<i>Toll-Like-Receptor</i>
T-Lymphozyte	Lymphozyte, thymusgereift
Tm	Schmelztemperatur
TM2	Transmembrandomäne 2
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i>
TRP	<i>Transient receptor potential channel</i>
TRPC	<i>Transient receptor potential channel, canonical</i>
TRPM	<i>Transient receptor potential channel, melastatin</i>
TRPV	<i>Transient receptor potential channel, vanilloid</i>
T-Zelle	Lymphozyte, thymusgereift
U	<i>Unit</i> (Einheit)
ü. N.	über Nacht
v/v	<i>volume per volume</i>
vgl.	vergleiche
w/v	<i>weight per volume</i>
ZAP	ζ-Kette-assoziierte Proteinkinase

$\beta$	<i>beta</i> (griech.)
$\Delta$	<i>delta</i> (griech.)
$\rho$	Korrelationskoeffizient, <i>rho</i> (griech.)

## 8.2. Oligonukleotide

### 8.2.1. Micro-Arrays

Gen Acc. -Nr.	Sequenz (5' – 3')
<b>18S rRNA</b> NR_003286	GCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCCGATAACGAACGAGACTCTGGCATGCTAACT
<b>ae I</b> s. Vektor pGEM-T Easy aeI	CCAGCAAGTTCTCATGAGAAAGGATCCGGTCTCGAATTCTCTGGTCTCGAATTCTCTGGCTCGGAGTG
<b>AMP</b> s. Vektor pcDNA3-eGFP	GATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGC
<b>B-2M</b> NM_004048	AGGAGGGCTGGCAACTTAGAGGTGGGGAGCAGAGAATTCTTTATCCAACATCAACATCTTGGTCAGAT
<b>beta-actin</b> NM_001101	GCCCAGTCTCTCCCAAGTCCACACAGGGGAGGTGATAGCATTGCTTTTCGTGTAAATTATGTAATGCAAAA
<b>CACNA1A</b> NM_023035	CTCAGCGGGAAACCGTGTGATAAGAAGCTCTGGCATCCTGACTCGAGAGTGTGGCAATGAATTTGCTTATT
<b>CACNA1B</b> NM_000718	CCGTGACCGCTCAGACGCCTGCATGCAGCAGGCGTGTGTTCCAGTGGATGAGTTTTATCATCCACACGG
<b>CACNA1C</b> NM_000719	TCAGGAGGGATTCAGGCTCAGCAGGACTCAGGCTCACTGCCTTCTGCTCAGGAAAGCAAACCCCTCTAG
<b>CACNA1D</b> NM_000720	CTGGCGGATGAAATGATATGCATCACCACCTTGATAGCCCCAGCGAGGGGCAGACTGGCTCTGGCCTCA
<b>CACNA1E</b> NM_000721	AGCCTGACACCACCGCACCATCAGGGCAGAACGAGAACGAACGCTGCGGCACCGATCTGGCCTACGTGTA
<b>CACNA1F</b> NM_005183	CAGGAGATAATGCTTGCCAGCCTTCCCGGAAATCGGTGTGATCCTGAGTCTGACTTCGGCCCTGGTGAAG
<b>CACNA1G</b> NM_198386	AGTTATATTCCCTCTTCTTGCAAAGCACAAGCTGGGACCGCGAGCACATTGCAGCCCCAACGGTGGCCCA
<b>CACNA1H</b> NM_021098	GCGGCAGGTTGCAGCCACCGCGGCCAATGTCACCTTCACTCACAGTCTGAGTTCTTGTCCGCCTGTCA
<b>CACNA1I</b> NM_021096	GCAGTGTCTGCCAGCCAGAAAGGCCAGAAAAGGGCACTGGCACTGGAACCCCTCCCAAGATTGCGCTGC
<b>CACNA1S</b> NM_000069	GGTCAGTGCTGTCCCTAGGGCCACTCCCACCTGCAGGACATTAATAATCTCCAGGCCTGTGACTGGC
<b>CACNA2D1</b> NM_000722	CCCCAAATCTCAGGAGCCAGTAACATTGGATTTCCTTGATGCAGAGTTAGAGAATGATATTAAGTGGAG
<b>CACNA2D2</b> NM_006030	AAACAATCCCCATCAGGTAGCTGTCTAACCCCCAGCTGGGTCTAATCCTTCTCATTACCCACCCGACCT
<b>CACNA2D3</b> NM_018398	ATCACCTTCATCAGAAATGGGACCGCAAGTGGTAGGCAGTGTCCCTTCTGCTTGAACCTATTGAAAC
<b>CACNA2D4</b> NM_172364	AGTGCACGGATACGCCTTCTGAACACCAACAATGGCTACATCCTCTCCCATCCCGACCTCCGGCCCTG



<b>Gen</b> Acc. No	<b>Sequenz (5' – 3')</b>
<b>CACNB1</b> NM_000723	TACTTCAAAGGCTCATCAAGTCCCGAGGAAAGTCTCAGTCCAAACACCTCAATGTCCAAATAGCGGCCTC
<b>CACNB2</b> NM_201570	GGTATGGCTGCAGTCTCCGGTTGCATACTGGACTCTTCAAAAACTGTTTTGGGTAGCTGCCACTTGAAC
<b>CACNB3</b> NM_000725	GCTTGATGCCCTCTGATGAGGCCAGCGAGAGCTCCCGCCAAGCCTGGACAGGATCTTCACAGCGTAGCTC
<b>CACNB4</b> NM_000726	GGCCCAAGCATAGCTGGTTATGTGAAATATAAAAATGGGGTGTGTCTCCCTTAATCAATCTGAGCAC
<b>CACNG1</b> NM_000727	TCCTTTATGAACATTGCAGGGACAACCTGTGTTTGCCAGCTGGGTGTTCCGTGTAATAGCCAGCCTGTC
<b>CACNG2</b> NM_006078	TTGATCGAGGTGTTCAAATGCTTTTAAACCACCGTTGGTGCTTTCGCTGCCTTCAGCCTGATGACCATAG
<b>CACNG3</b> NM_006539	AGGGGGGATTTCGAATCTCCATCAGGCGCGCTCATAGTTGTCCCATTTGTCTACCCACACAAAATCCTC
<b>CACNG4</b> NM_014405	CAACTGGCCCCACAACCTCTGTCAATTGTAAGTTATTCTGCCACCACCTAACAGGACGGAGTGGAGTGAGT
<b>CACNG5</b> NM_145811	CCCTGCAGATGAACAGCAACTACCCCGCCTTGCTCAAGTGCCCGACTATGATCAGATGTCTCTTACC
<b>CACNG6</b> NM_145814	CATGGCCTGGGGTGCCTCTGTATCATCATGGTGCTCAGTAAAGGTGCAGAGTTCTGCTCCGAGTTGG
<b>CACNG7</b> NM_031896	CGGAGATCAATTTGGTGACGAAAACACGGAGAATATTCTGAAGACAGTGCACGGCCACCCCTTCC
<b>CACNG8</b> NM_031895	GCCTCCCGCTTACAAAGTCCAAGAGGAACATCATTCTGGGCGCAGGGATCCTGTTCTGTTGGCAGCAGGC
<b>CD25</b> NM_000417	ATTTGGCCTGCACTAATTTGATGTTTACAGGTGGACACACAAGGTGCAAATCAATGCGTACGTTTCTCTG
<b>CD3</b> NM_000073	CCATATCTGGCTTCTCTTTGCTGAAATCGTCAGCATTTTCGTCCTTGCTGTTGGGGTCTACTTCATTG
<b>CD69</b> NM_001781	GAAAATCTGCACTGTGGGCTTTTATTGCCATGAGCTAGAAGCATCACAGGTTGACCAATAACCATGCCC
<b>CE11</b> s. Vektor pGEM-T Easy CE11	CGAGCTGGAGAGTCCATCTCCTGCTGAGAGATGTTTGTTTTACCCTTCTTTGCTTCCTCCACCTTACACC
<b>CLCA1</b> NM_001285	CCAGAGACACCTAGTCCTGATGAAACGTCTGCTCCTTGCTTAATATTCATATCAACAGCACCATTCTT
<b>CLCA2</b> NM_006536	AACACATGAAAGCCACAGAATTTATGTTGCAATACGAGCAATGGATAGGAACTCCTTACAGTCTGCTGT
<b>CLCA3</b> NM_004921	AAGCAACTAACTTTTATTCTCCACAGGAACCCAGCATTCTGATCTGGGTACCAATATTTCTGCAATCA
<b>CLCA4</b> NM_012128	CCTTCCCTTGCTGACCAATACCCACCAAGTCAAATCACAGACCTTGATGCCACAGTTCATGAGGATAA
<b>CLCN1</b> NM_000083	GGAGTGCTATTTAGCATCGAGGTACCTCCACCTACTTTGCTGTTTCGGAACCTACTGGAGAGGATTCTTTG
<b>CLCN2</b> NM_004366	ATTCTGGAGTGGGAGGAGCAGCAACTAGATGAACCTGTCAACTTCAGTGACTGCAAAAATTGATCCTGCTC
<b>CLCN3</b> NM_173872	TCTTGGATGCAAAAAGAAGAATCACTCATAACCACCTGGCTGCTGACGTTATGAGACCTCGAAGGAATGA

<b>Gen</b> Acc. No	<b>Sequenz (5' – 3')</b>
<b>CLCN4</b> NM_001830	TTGACTGGAAGTCTGTACGTGGCTCCCCCTAGCCGCACACTAGTGTGGGAAGGAAAATATTGAGCTAG
<b>CLCN5</b> NM_000084	ATACACTCCACCCACTCTAAAGCTTCGGAACATCCTCGATCTCAGCCCCCTTACTGTGACTGACCTTAC
<b>CLCN6</b> NM_021736	CCAGTGATCAGTCGCCTCAGTAAAGCAGATCTGTGGATGGGGAGCCTACGGGTGGTAAGAAGTGGTGT
<b>CLCN7</b> NM_001287	CTCTCCTCGTCTAGGTTTCTTACCTCCAGGGATCAGCTGTGTGTGTGACCTCCCTACCGGGCTATC
<b>CLCNKA</b> NM_004070	CCCACCTTGGGCAGAGCTGAGTGTGAGAAGATGGAAAACCAGTATCTGCCAGGTGCTCAGTGACTGGCC
<b>CLCNKB</b> NM_000085	AAGAAAGCAATTTCCAACCTGACAAATCCGCCAGCCCCAAAGTGAGCCGGCCAGCAAGATGAAACAGGG
<b>CLNS1A</b> NM_001293	TGCACAGGAGCTTGGTAGACTGCGGGGGAAAGAGAGAGCTCCTTTCGCCATGTTTTACCAGTCTGCTGT
<b>CLNS1B</b> AL031885	TTCTGCTCCTATTGTGGTGAGCAGAGATCGTGCCATTGCATTCCAACCTGGGCAACAAGAACAAACTCC
<b>DD1B</b> s. Vektor pGEM-T Easy DD1B	CTGGATTCATAACCTGGGGTGGTTATACTAGGAGTCCCAATGGAAATGCAAGTCTCCCATGGGCAATGG
<b>DPPX</b> NM_130797	GCAGATCGGAAGTAACTGCTCCCTCCTCAAGTTGTCTTCAGACGTCTTGGGGACGTTCTAAACTGA
<b>eGFP</b> s. Vektor pcDNA3-eGFP	CAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCC
<b>GAPDH</b> NM_002046	TGAAGAGGGGAGGGGCTAGGGAGCCGCACCTTGTCTGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACC
<b>GUSB</b> NM_000181	ACTGTTACGGCAGACCAGAACGTTTCTGGCCTGGGTTTTGTGGTCATCTATTCTAGCAGGGAACACTA
<b>HCN1</b> NM_021072	CAGCCAGGGCACTTCGCATTGTGAGGTTTACAAAAATTCTCAGTCTCTTGGGTTTATTACGACTTTCAAG
<b>HCN2</b> NM_001194	GATCGTTTTCTAAGTGAATACTTGGCCCGCCGGCTTCCCGCTGCCCCATCGCGCTCAGCAATAACC
<b>HCN3</b> NM_020897	AACCTTGAGTACATCCAGCCTTAGTTCTTGGGGTGCAGTAGTATGTACCCAAGGGCAGATGCCTCTTGG
<b>HCN4</b> NM_005477	GTTGGCGGTTCTTAGAGCAGATGTGTCATTGTGTTTCATTTAGAGAAACAGCTGCCATCAGCCCGTTAGC
<b>HPRT1</b> NM_000194	GTTTGAAACATCTGGAGTCTATTGACATCGCCAGTAAAATTATCAATGTTCTAGTTCTGTGGCCATCT
<b>KCMF1</b> NM_020122	TTGAATGATCCTAAAATGTCTGAAACGGAGCGCCAGTCCATGAAAGCGAGCGTGCAGACCGCAGCCTG
<b>KCNA1</b> NM_000217	TTGCTCCACGTGAGTCCCCTAACTTAGCCTCTGACAGTGACCTCAGTCGCCGAGTTCCTCTACTATGA
<b>KCNA10</b> NM_005549	AGAATGGGCAGCACAGACTCTCTTAATAAGACCAATGGTGGCTGTCCACAGAGAAGTCTAGGAAATGA
<b>KCNA2</b> NM_004974	GGAGAGGAACAGGCCAATACTTGCAAGTGACAAGCTGTCCAAAGATCCCATCCTCCCCTGACCTAAAGA

Gen Acc. No	Sequenz (5' – 3')
<b>KCNA3</b> NM_002232	AGTCGGAGTATATGGTGATCGAAGAGGGGGTATGAACCATAGCGCTTCCCCAGACCCCTTCAAAC
<b>KCNA4</b> NM_002233	TGGCGGCTACAGTTCAGTCCGCTACAGTGAAGTGTGTGAACGTGTGGTGATAAATGTGTCAGGCCTACGC
<b>KCNA5</b> NM_002234	TTGCGGAGGTCCCTTATGCCCTCTGCTGGACACCAGCCGGGAAACAGATTGTGAAAGGAGATTCAG
<b>KCNA6</b> NM_002235	CCCCAGTCCGTGTAGATGGTCGAGGTGGAAACAATGGTGGTGTGAGTCGAGTCTCCCCAGTTCCAGGG
<b>KCNA7</b> NM_031886	AGAGTGATGTACAGTCTATTCCATAGAATCACAGAAACAATCCTGAACCAGGCCTGTCACCTACCCTCCC
<b>KCNAB1</b> NM_172160	GATGACATCACATGTGGTAAATGAGATTGATAACATACTGCGCAACAAGCCCTACAGCAAGAAGGACTAT
<b>KCNAB2</b> NM_003636	GTCCCCTCTGGCCTGTGGCATTGTTCTGGCAAGTACGACAGTGGCATCCCACCTACTCAAGAGCCTCC
<b>KCNAB3</b> NM_004732	GGATCAGTCACTTGGTACCCTCTAGCCTGTGGTCTCATTACTAGCAAGTATGATGGGCGAGTCCCAGAT
<b>KCNB1</b> NM_004975	TTTTGAGATACCATCAGGGTGAGTTGCACCACTTGTACTCAATTCTAATTGCCCCCTGGCAATCTGGGAA
<b>KCNB2</b> NM_004770	GCCTGTGAACTAAAAAATGGGAAGCCCTCCCCAAAAAAGTGCATAAAATGTTATTTTTGCATGGCATG
<b>KCNC1</b> NM_004976	TCTGTCGTAAACTCTCCACACCACAGTACTCAGAGTGACACATGTCCGCTGGCCCAGGAAGAAATTTAG
<b>KCNC2</b> NM_139137	AATCCCGAAGCTTAAACAACATAGCGGGCTTGGCAGGCAATGCTCTGAGGCTCTCTCCAGTAACATCACC
<b>KCNC3</b> NM_004977	TTGCAGAAACCACACACTGTTGCTGGATCTTGAGTCCCATTAGCTGTGAGATGCCTGTGAGAGCCTT
<b>KCNC4</b> NM_004978	ATGCGACCCTCGGGGCCAGAGCCATCTGGGTCTGATGTTCTGTTCCATTGTACATCGAAGAGATATATA
<b>KCND1</b> NM_004979	GGGCTGTATTTGGAGATCATGGGCTGATTCCATGTTCTTGGGCAACAGTCCAGAAGCATCAGGGGCTCC
<b>KCND2</b> NM_012281	GTTTGTGGACGAACAAGTCTTTGAAGAAAGCTGCATGGAAGTTGCAACTGTTAATCGTCTTCAAGTCAC
<b>KCND3</b> NM_172198	CCTGCCCCATTGTACCCTAGCACTGAGACTTGTGCCTGGAAGGAAAAAGAGGTAGCAAAGGGGCACCTG
<b>KCNE1</b> NM_000219	GTCGTTGAAAACCATCTGGCCATAGAACAACCAACACACACCTCCTGAGACGAAGCCTTCCCCATGA
<b>KCNE1L</b> NM_012282	CCAAGGGCGACGACGCCTATCTCTACATCCTGCTCATCATGATCTTCTACGCTGCTTGGCCGGAGGCCT
<b>KCNE2</b> NM_172201	GAATCGAAGGCCACCATCCATGAGAACATTGGTGCAGGCTGGGTTCAAAATGTCCCCCTGATAAGGGAGA
<b>KCNE3</b> NM_005472	ACTCCCAGCCACATTGCCAGGCAACAGGACTAACTACCTCCAAAGCAAGCAGTCTTTTCAGTTTTGA
<b>KCNE4</b> NM_080671	GACGCCCTCAACGAGAGCAGCGAAGGTCTCGGAGAACATCCATCAGAATTCTTAGCACCCCCGGGA
<b>KCNF1</b> NM_002236	TGGACAGATGGGTAGATGTGGCAGGCATGTCATCGACAGCACAGAAGGGCTGTCTGTGTCCCCCAACC

Gen Acc. No	Sequenz (5' – 3')
<b>KCNG1</b> NM_002237	CTGAGCGTGTCCCAGGACAGTGACATCTTGTTCGGAAGTGCCTCCTCGGACACCAGAGACAATAACTGA
<b>KCNG2</b> NM_012283	TTCCTGCGCGGCCACTCAACATCATTGACATCCTGGCGCTCCTGCCGTT
<b>KCNG3</b> NM_133329	AGGGATTGGGAAGTGGTGGGTGATGGAGGACCTGGATATATTTATCAAATAAAGGGTTACCAGAAGTGTT
<b>KCNG4</b> NM_172347	CAGTGAACATGAGCTCATGAACGATGTCAATGACCTAATCCTGGAGGGCCCAGCCTTGCCATCATGCAC
<b>KCNH1</b> NM_172362	GAGAGGTCTATTTAAAAAAAAGTCAGAGACAGATACCTCCAACCCTGCCGTACCACCACCCCTACCAC
<b>KCNH2</b> NM_172056	GTCTAACTGCCCGGAGGCACCCGGCCCTGGGCCTTAGGCACCTCAAGGACTTTTCTGCTATTTACTGCT
<b>KCNH2-USO</b> NM_172057	ATCAAATCTAGATCCTCTAGCCTGGGCAGTAGAGGAAGAAATGCTAGCCTGGAAGCTCGGCATTTGGTTT
<b>KCNH3</b> NM_012284	CCAGCCCTAGAACTCAGCGTTGCCAGGTGTGCTGCCATCTGCTGTTTCGGCCCAACCTCAGAGTGAAGCA
<b>KCNH4</b> NM_012285	TCTGGACTTTTTAATGAAGCGTGGTTACCTCTGACGCTATTCCCTTTTCCAAGCCTTCCCAACCTCCC
<b>KCNH5</b> NM_139318	AGGGTGACCTGCTGGGTGTGAAACTGCTGCACGACTTCCTACTTCACCCATTCTATCCGAGTTTTCA
<b>KCNH6</b> NM_030779	TTCCCTCTAAGGGCTACAGCCTCCTGGGTCTGGGAGCCAGAACTCCATGGGGGCAGGA
<b>KCNH7</b> NM_173162	GGCCTTACCTGACTGACAAAATCGGATGGTTGGATTCCCTTAGGACAGCAAATTGGGAAACGTTACAATGA
<b>KCNH8</b> NM_144633	AGACTGGAATCTCCATACTATGGCAACAATACCTTGGGGGGCCCGTCGATCCGAAGTGCCTATATTGCCG
<b>KCNIP2</b> NM_173197	ATTCATTGAGTCTGTCAAAAAGGTACAGCTCCCTGCCCTCTACATTACCCTGACCTGGACTCAGGCCTGA
<b>KCNIP3</b> NM_013434	CTTTGTGGTTGGCCTCTCCATCCTGCTGCGGGGCACAGTCCACGAGAAGCTCAAGTGGGCCTTTAATCTC
<b>KCNIP4</b> NM_025221	CGCAGCATTAAAGAGCGGCTCATGAAGCTCTTGCCCTGCTCAGCTGCCAAAACGTCGTCTCCTGCTATTC
<b>KCNJ1</b> NM_000220	CAGTAGCGTACATTCACAAAGACCTCCCGGAATTCCATCCTTCTGCCAATCACACTCCCTGTGTGGAGA
<b>KCNJ10</b> NM_002241	TAAGGAATACTACCCGGGTTTACTGGAGATCCCCGAAGCACCCATCCTCCACTCCCTCTCTTTAACC
<b>KCNJ11</b> NM_000525	GGTGTACAAGGCACTTGCTACTATGCTATTTCTGGCCTCAGCAGGAACCTGTACTGGGTATTTTTGTC
<b>KCNJ12</b> NM_021012	CAGTGCCTGGGTTGCAGACTCAGTAGCGTTTTAGTCGTTTTATGTTTCTTTGCAACGGCCTCAGAAGT
<b>KCNJ13</b> NM_002242	AAATAAATACTAGCTGAGTAAAGGCAAGCAGGTGTGAAGAGCAGGGCTCAGCAGCAAGTCACATTTTTC
<b>KCNJ14</b> NM_013348	TGTTGCTTCTCAACTCAGCCAAGTGTAGTAAATCATTGTTCTAGACCACCTAAGGAGGAAGGTTA
<b>KCNJ15</b> NM_170737	GATTCGGAAAAGCCAGATTGCACATTTTACTGTGCAGATTCTGAGAAAACAGCAACTCGAGGAGAAGTA

<b>Gen</b> Acc. No	<b>Sequenz (5' – 3')</b>
<b>KCNJ16</b> NM_170741	GTCAATATCAGAATAGGGGCATCAGTGTCCCGTGAAATACATTTTGTGTGCTATGAGCCTCTGTAATC
<b>KCNJ2</b> NM_000891	ACCTGCCCATCCCCAACCTCAGCAAAGTAGAATCTCTTTTCTGGTAATTTTGGGTTCCGCTCTGGGC
<b>KCNJ3</b> NM_002239	ACGGAGGGAGGACATCATAAGGAAGTTATTAACGGGCATGTATTATCACATCAAGCATGCAATAATGTG
<b>KCNJ4</b> NM_152868	CCTCCCCACTGACTCTTCAAGGACGTGCCCTCTTGTCTCAGAACCTTGGGAAGGTGGCTGGACT
<b>KCNJ5</b> NM_000890	CCTCTAGTCTGGGATGAGCTCACAGAGCCCTCATGAGTTAAGATCCATCCATATCACATAGGCAATTCC
<b>KCNJ6</b> NM_002240	TGCCCTGAGTTGGTCTGTATCCAGCAAACCTCAACCAACATGCAGAACTGGAGACTGAAGAGGAAGAAA
<b>KCNJ8</b> NM_004982	TCCCCTGTATGACATCTCAGCAACTGACCTGGCCAACCAAGACTTGGAGGTCATAGTTATTCTGGAAGG
<b>KCNJ9</b> NM_004983	CCCAGGCTGAAGAGTTAACTTTGGGCCAGAACTCAACCATCAATGGAAACAGGGCAGTGACAAGTGG
<b>KCNK1</b> NM_002245	ACCATTGAGCGTAGGATTTGTTGCATTATGCTAGAGCACCAGGGTCAGGGTGAAGGAAGAGGCTTAAG
<b>KCNK10</b> NM_138317	AAGGAATCAGAGAACAAAGAACTTCATTTTCAGATAGCAAACGCAGGACACACCAAGAGTGCCGTGCACG
<b>KCNK12</b> NM_022055	CTGCTCGGCGTGTGCTGCATTTACTCGCTCTTCAACGTCATCTCCATCCTCATCAAGCAGGTGCTCAAC
<b>KCNK13</b> NM_022054	AAAGCAGCATTAGACATTGCCTTGTTTCATTAATCTTGTTTCAGAGCTTTAGCTGCCTGAGGAGATAGG
<b>KCNK15</b> NM_022358	AGCTATCAGGGCACCTCCCCAGGGATTGGAAACGGATGACGGGCCTCTAGGGCGTCTTC
<b>KCNK16</b> NM_032115	AGAGGCTCTACAGCAGCAAGAGGAGTCCAAGTCACACCCAGGACTTCCCATATCCAAGAAAGGACTG
<b>KCNK17</b> NM_031460	ATACAGCATCTGGAACCTTCTGCTCACGCTGCAGGCTGTGGCAAGGACAGCTAGTTATACTCCATTCTTT
<b>KCNK2</b> NM_014217	CAATGTCTGATGCCTTTTTGTGCCAGACTGTTTTCTCTCTTTCCCTAATGTGCCATAAGGCCTCA
<b>KCNK3</b> NM_002246	AACTCTATGCTGGCCACTGATTCCTTTGAGTCTCACAAAACCTACTTAGGTCATCAGGGCAGGAGTTCT
<b>KCNK4</b> NM_016611	CGTGCCAGCCCGGTCCCCAGACCCAAGCCTGACCCCATCCGAGTGAATTTGAGTCCTAAAGAAATAAAA
<b>KCNK5</b> NM_003740	CCTCCGAGTCCACCTTACCAGCACTGAGTCTGAGCTCTCTGTGCCTTACGAACAGCTGATGAATGAGTA
<b>KCNK6</b> NM_004823	AGCCCAGATCTGAATGGCATGGGAGGTGCTGCCCTTAACCATGACACCATTGTAAGAGCTGTCCACATT
<b>KCNK7</b> NM_033455	CCGTGCCATGGGGAAGTTCTTCAGACCCAGTGGTCTGTGACTGCTGAGGACCAAGGTGGCATCCTAGGG
<b>KCNK9</b> NM_016601	AGCTTACCAGACCAGAGGCTGATGAAACGCCGGAAGTCCGTTTAGGGGAACCTAACTGCACATTCAA
<b>KCNMA1</b> NM_002247	CGGAGGCAGCAGTCTTAGAATGAGTAGCAATATCCACGCGAACCATCTCAGCCTAGACGCGTCTCTCTCC

<b>Gen</b> Acc. No	<b>Sequenz (5' – 3')</b>
<b>KCNMB1</b> NM_004137	GAAGCTGTCCCCAGCGAGCCTCCCTTCTTTGTTTGAATTCTCTAATAAGAGCAACAGCAGCTCCCATT
<b>KCNMB2</b> NM_005832	GGGTGTGGCAATTGTTGCCATGGTGAACTTACACAGTACCTCTCCCTACTATGTGAGAGGATCCAACGG
<b>KCNMB3</b> NM_171830	AGATGGACTTTTCACCAAGCTCTGAACTGGGATTTTCATTTTGTGTCATTCATCCTGCTCACGAGACACAG
<b>KCNMB4</b> NM_014505	CGCAAGTTCTCTTAAAGGGGAAGGAGGCTTGTAGAAAGCAAAGTACAGAAGCTGTACTCATCGGCACGC
<b>KCNN1</b> NM_002248	CTCAGGGAGACGTGGCTCATCTACAAACATACCAGGCTGGTGAAGAAGCCAGACCAAGCCCAGGTTTCGGA
<b>KCNN2</b> NM_170775	TCAGCGTTATCCGGTCTGATGTCAGAATCTGGGAACCTGAACTAAGTTTATAGGCCAAAATGAGT
<b>KCNN3</b> NM_002249	ACACAGGAGGGCCCTGTTGAAAAGAGAAAGCGACTGAGTACTATGCTCTGATTTTTGGGATGTTTGA
<b>KCNN4</b> NM_002250	CTGGATGTTCTACAAACATACTCGCAGGAAGGAGTCTCATGCTGCCCCGAGGCATCAGCGCAAGCTGCT
<b>KCNQ1</b> NM_181798	TGTGAGAGGCCCGGAAGGCACTGTCTTTGCGCCTGCACATGTGTGTGTCTGGAGTGTAGGATGGCACTG
<b>KCNQ2</b> NM_172107	TAGATATGATTGTGGGTCCCCGCCCCCTTCAACTCCCCGGCACAAGAAGTACCCACCAAAGGACCCAC
<b>KCNQ3</b> NM_004519	GCTGCCTGGAGGTATTATGCTACCAACCCCAACAGGATTGACCTGGTGGCGACATGGAGATTTTATGAAT
<b>KCNQ4</b> NM_004700	ACCTCTGCTGAGGATGCCCCCTCAGAGGAAGTAGCAGAGGAGAAGAGCTACCAGTGTGAGCTCACGGTG
<b>KCNQ5</b> NM_019842	CAGACTTTCTACGCGCTTAGCCCTACTATGCACAGTCAAGCAACACAGGTGCCAATTAGTCAAAGCGATG
<b>KCNRG</b> NM_199464	GTTAGCCAAATCTACACTCAGCCTAACTCTGGCTTCATCTGCTGCCATGCCGTCTCTGGGCAACCAGGC
<b>KCNS1</b> NM_002251	TACACAGGGCCTAGTACATAGTGGGCCCCCTACATACGCATGGATTCTGGGTCTCCAGATTGGAACAGA
<b>KCNS2</b> NM_020697	TATCGTCTCCCTGAGGTGAACGTTGTTGGGTTGCTAGCAAGGGCAGTAGCTTAAATACTTTTGTGCCTA
<b>KCNS3</b> NM_002252	AAGGACATTGATGTGGACCAGTGCAGTGAGGATGCACCAGAGAAGTGTGATGAGCTACCTTACTTTAAC
<b>KCNT1</b> XM_029962	AGAAGACGCCATTTCTCTACTTCACACTGAACTGTCCAGCCACTGCATCTAGGGGGCATTGGGCGGAA
<b>KCNU1</b> NM_001031836	GAATGGAAGCATGCCATTTTCTGCCCATTTGCTTAGTGGTTTCATGAAGGCCACACTGTTTTGGGTGAGAC
<b>KCNV1</b> NM_014379	GTAAACCACTGGTCACAAATGAACTGATCTCTGTATCCCATTATTACTATAAGAGGTGGGAATCCCAA
<b>KCNV2</b> NM_133497	TGGAAGCAACCCACAGCTCACCCCAAGACAAGAGAATTAGTATTTTATAGGACATGTGGCTGGTAGATTC
<b>KCRI</b> NM_032834	CTCTGCGTTCACACGGCCTTTCCCTCTGTCTTTTCATTACCTTTAAGGACAGTGTCTTTGAATGTAGGG
<b>PGK1</b> NM_000291	AAAGTCAAGGCTTATAACAAAAAGCCCCAGCCATTCTCCCATTCAGATTCCCACTCCCCAGAGGTG

<b>Gen</b> Acc. No	<b>Sequenz (5' – 3')</b>
<b>PPIA</b> NM_203431	TTTTGCAGACGCCACCGCCGAGGAAAACCGTGTACTATTAGCCATGGTCAACCCACCGTGTCTTCGAC
<b>RPLPO</b> NM_001002	GCCCCAGCTAAGGATGAAGCCAAGGAAGAGTCGGAGGGAGGAGTCAGACGAGGATATGGGATTGGGTCT
<b>SCN10A</b> NM_006514	CCCATGTGTGCCAGAGCTGAGGAGGAGGCTGCATCACTCCCAGATGAAGGTTTTGTTGCATTACAGC
<b>SCN11A</b> NM_014139	CTGAGCTCCAGGGGTCAGCAGCTTAGTGTATCAACAGGGAGTGGATTACCAAATTAGCCATTCCATTT
<b>SCN12A</b> AF109737	GCTCATGCCTGGAATCCCAGCACTTTGAGAGGCCAAGGCAGGTGGATCACGAGGTCAAGAGATCGAGACC
<b>SCN1A</b> NM_006920	GACTCTGTGTAAAGGGGAGATGACCTTGACAGGAGGTTACTGTTCTCACTACCAGCTGACACTGCTGAAG
<b>SCN1B</b> NM_001037	CGCGTGGTGTGGAATGGCAGCCGGGACACAAAGACCTGCAGGATCTGTCTATCTTCATCACCAATGTCA
<b>SCN2A2</b> NM_021007	CTGTGTTCTGTCTAAGCGTGTTCGCGCTAATAGGATTGCAGTTGTTTCATGGGCAACCTACGAAATAAATG
<b>SCN2B</b> NM_004588	TGAGAACTCTCCAGTTGCCCTTGGTGGGGTTCCACCTGGCTTTTGGCTACAGAGAGGGAAGGGAAAAG
<b>SCN3A</b> NM_006922	TTTTCCCAAGACGCAATAGCAAAAACAAGCATTTTCAGTTTCAGAGGTCGGGCAAAGGATGTTGGATCTG
<b>SCN3B</b> NM_018400	AGCTCTAGCCTAGACCTTAGTGTGCCATGCAGTCACAGGTCTGAAAAGCAGCATCATCCAAACCTTAC
<b>SCN4A</b> NM_000334	TCCCACGCCAGGCCAGCAGGGCGGGCTCCTTTGTACAGTTCTTACAATAAACCTCCTTGGTGCCTCTGG
<b>SCN4B</b> NM_174934	GGGGAATGACAACACGGAGAACGGCTTGCTGGCTCCAAGGCAGAGGAGAAACCACCTTCAAAAAGTGTGA
<b>SCN5A</b> NM_000335	GGAGCAGCCGGAAGTCTGTTCTCAAAGCAGAAGTGAATCCAGTGTGGCTCCCACAGGTCTCACTGCC
<b>SCN7A</b> NM_002976	AAGGTGCCTATTTTGACAAAGCTAAGGAAAAGTCACCTATTCAAAGCCAGATCTAATACCACTTACCAC
<b>SCN8A</b> NM_014191	CTGGATTAACCTGGTGTGTTGTTATCTTCTCACCTGTGAGTGTGTGCTCAAAAATGTTTGCCTGAGGCAC
<b>SCN9A</b> NM_002977	GTCTGAGTGTGTTTGCCTAATTGGACTACAGCTGTTTCATGGGAAACCTGAAGCATAAATGTTTTCGAAA
<b>SCNM1</b> NM_024041	CTCCTACCAAAGCCATGCCAAGCGTCAGCTGCATCAGCCTGGTGCCTATTAATAAGACTGTCAAAAAG
<b>SCNN1A</b> NM_001038	TGCCCGTTTATGTATGCTCCATGTCTAGCCATCATCCTGCTTGGAGCAAAGTAGGCAGGAGCTCAATAA
<b>SCNN1B</b> NM_000336	AGAGGTCATACCCCTTCATCAGAGATGAGGGCATCTACGCCATGTCGGGGACAGAGACGTCCATCGGGGT
<b>SCNN1D</b> NM_002978	TAGGTGAACAGGGGCTGCCGCATCAGAGCCACAGACAGAGGAGCAGCCTGGCCAAAATCAACATCGTCT
<b>SCNN1G</b> NM_001039	GGTTAGCATAGGGGACTGCAAATGGTGTTCGCAAAGCAAATCCTGTTTTTGACCATGAACTAAGAATTT
<b>Shaker</b> NM_078669	CGGAAGCTGGAAGCGAAAATTCCTTCTTCAAGTCCATACCCGATGCATTTTGGTGGGCGGTCGTTACC

<b>Gen</b> Acc. No	<b>Sequenz (5' – 3')</b>
<b>STIM1</b> NM_003156	TTGAAGTTTGTCTTTGGTATTGATGTGGGTCAGAAGGAGCCTCATCCTAATCTCACTCAGGCCTCCAGG
<b>TBP</b> NM_003194	CGTGACTGTGAGTTGCTCATACCGTGTCTATCTGGGCAGCGCTGCCCATTTATTTATATGTAGATT
<b>TCR</b> BC106077	GCTGTGGTCCAGCTGAGATCTGCAAGATTGTAAGACAGCCTGTGCTCCCTCGCTCCTTCTCTGCATTGC
<b>TFRC</b> NM_003234	GCTAACAGGCTCAATATTCCTGAATGAAATATCAGACTAGTGACAAGCTCCTGGTCTTGAGATGTCTTCT
<b>TRPA1</b> NM_007332	GATCATAAAGACAAGGGGTCTTTTCAGTCTTCCCTCTCCTCAAACCTTGTGTAGCATTGCACAATATAG
<b>TRPC1</b> NM_003304	TGGCAATCGACTCTGAAGTAGTGGGAGCTGTTGATATACTACTTAATCATCGACCAAAAACGATCATCAAG
<b>TRPC2</b> AB231779	GCGGAAAGATCTGGGCAACAGACTCACAGAGCTGACCAAGACCATATCTCGACTGCAAAGCGAGGTAGCC
<b>TRPC3</b> NM_003305	TGAATCCCAGCATGCTGAGATGTGAATGATGCAGCAACCTGGATTGGCTTTGACTATAGCACAAATGT
<b>TRPC4</b> NM_016179	GAAAGAGAGTGTGTCCATTCAAGTCAGAGAAGGTGGTGGTGGAGGACACGGTTCCTATAATACCAAAGG
<b>TRPC4AP</b> NM_199368	GACATTTAGCATTAGCTCTGTGTGAGCTCTGCCGGTTTCTTGGCTGTCAGTCAGTCCCAGAGTGGGGA
<b>TRPC5</b> NM_012471	AGTTGGGTGCTTAACCTTTTTGCTTTGCTTTTCTCACCCATGCTTCCTTGAAGCCCCAGGTGCCACTTTG
<b>TRPC6</b> NM_004621	TCTTTCTGGTTTACGACAGCAGACAATGGCGGTCAAGTTCCTTGTGGTCCCTTGCTGTTGCCATTGGACTG
<b>TRPC7</b> NM_020389	CTACTGGTGAGCTGGCAGACCTGATTCAACAACCTCAGCGAGAAGTTTGGAAAGAACTTAAACAAAAGACC
<b>TRPM1</b> NM_002420	GGTCGGTGGGGTTAACCAGGATGTAGAGTACAGTTCAATCACGGACCAGCAATTGACGACGGAATGGCAA
<b>TRPM2</b> NM_003307	AGCCATCTGCAGGAAGAGCATAAAGAAGATGCTGGAAGTGTGGTGGTGAAGTCCCTCTCTCCGAGCAC
<b>TRPM3</b> NM_020952	GCACGCTCCATGCCAGGAGGCATCTGTTGATTTCTGACCATTATCAAGAGTTGTAGGATGCAGGGCTAAA
<b>TRPM4</b> NM_017636	CTCCGGCTCTCTGACCGAACGGATCCAGCTGCAGTTTATAGTCTGGTCACACGCACATGGGGCTTCCGTG
<b>TRPM5</b> NM_014555	CCACAGAGTGGACTTCATTGCCAAGTACCTCGGGGGCTGAGAGAGCAAGAAAAGCGCATCAAGTGCTCT
<b>TRPM6</b> NM_017662	ATACAGGCCCTTCGCTAGGAGTCATAGTTTATAGATTCCATAAAGGAGGAGAAATTGATGAAGATCTGTAAG
<b>TRPM7</b> NM_017672	AGGTATGAGAAGCCTGAACTGAAGACCATTTTCAAGAGGGACGGTATTTATGAATCAGGGTTAGGCTCC
<b>TRPM8</b> NM_024080	GGAACTACAAGAAACACACCAAGGAATTTCTACCGACGCCTTTGGGGATATTGAGTTGAGACTG
<b>TRPV1</b> NM_018727	GGGGAGACCACTTCTCTCCACACGAGCCAGCTCTCCCTTCGAGTAGCAACCGCTTCAAGCTCACAAG
<b>TRPV2</b> NM_016113	GTGAACTGGGCTTCATGGGAGCAGACGCTGCCTACGCTGTGTGAGGACCCGTCAGGGGCA

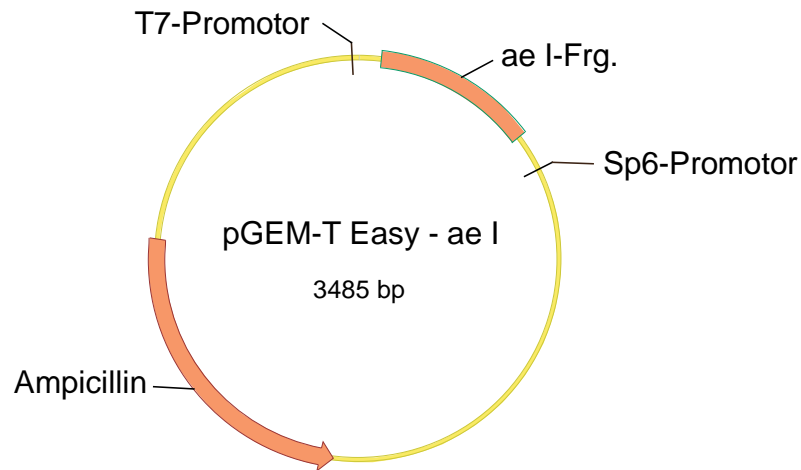


<b>Gen Acc. No</b>	<b>Sequenz (5' – 3')</b>
<b>TRPV3</b> NM_145068	CTCGTGCTCAGTGCTCAGTGGGTGTCTGAACTGAGGGGCAGTTGTCAATTTGTCTGAGTGGGAAACATCC
<b>TRPV4</b> NM_147204	CAGAACTTGGGCATCATCAACGAGGACCCGGGCAAGAATGAGACCTACCAGTATTATGGCTTCTCGCAT
<b>TRPV5</b> NM_019841	ACCCTGGGGCACTTGAATCTTGGACTGAACCTTAGTGAGGGGGATGGAGAGGAGGTCTACCATTTTGA
<b>TRPV6</b> NM_018646	CTCTCCTTCTAGCTGCCAAAGATAATGATGTCCAGGCCCTGAACAAGTTGCTCAAGTATGAGGATTGCAA

### 8.2.2. PCR

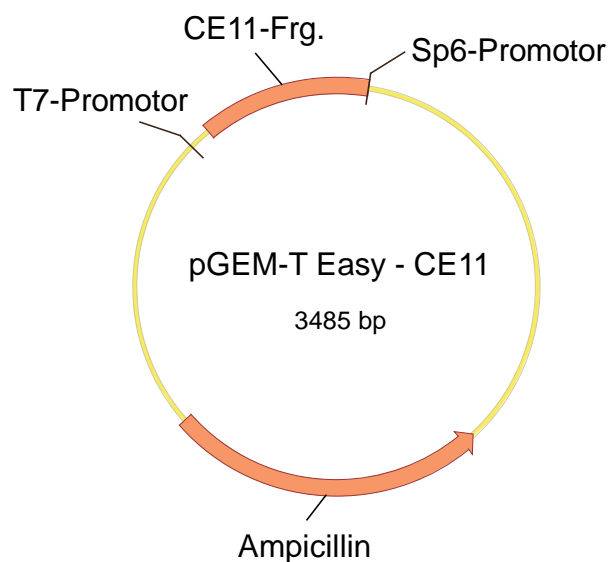
<b>Oligonukleotid-Nr.</b>	<b>Sequenz (5' – 3')</b>
<b>2254</b>	TCCCCAAATTCAACTTCTCC
<b>2255</b>	TTCTGACTGCTGCTTCCACG
<b>2256</b>	GCAATGTGATGGACGTCAAGG
<b>2257</b>	TGAGCTGCTCAGATAGCCCC

### 8.3. Klonkarten



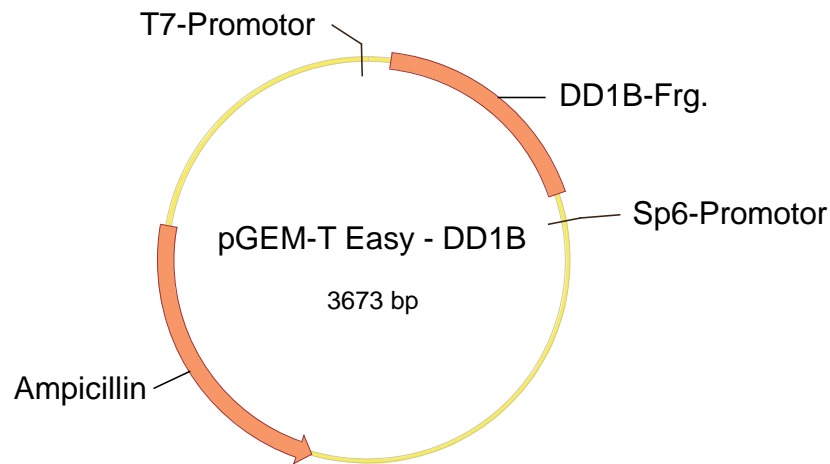
**Abb. 8-1: Klonkarte pGEM-T Easy – ae I**

Das Plasmid wurde von S. Scholten und Mitarbeitern kloniert und zur Verfügung gestellt.

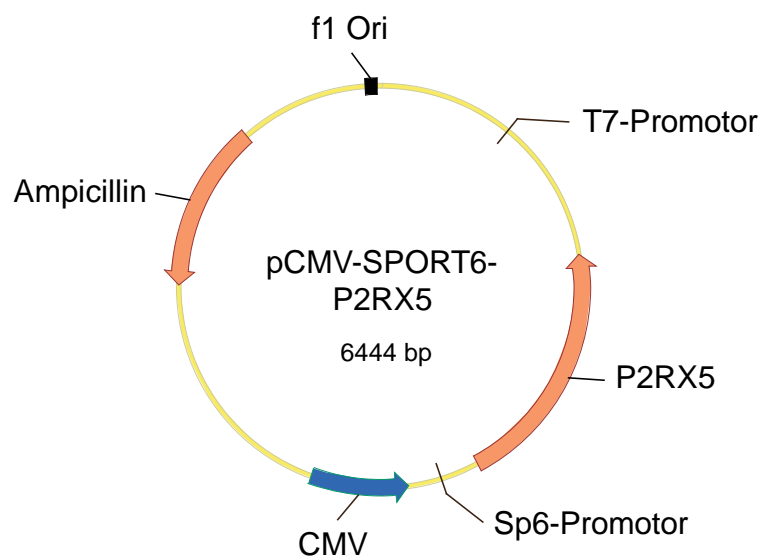


**Abb. 8-2: Klonkarte pGEM-T Easy – CE11**

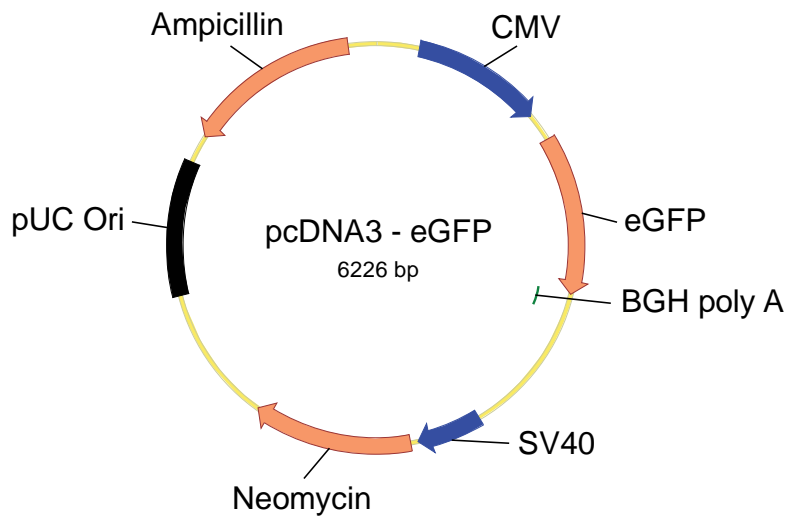
Das Plasmid wurde von S. Scholten und Mitarbeitern kloniert und zur Verfügung gestellt.

**Abb. 8-3: Klonkarte pGEM-T Easy – DD1B**

Das Plasmid wurde von S. Scholten und Mitarbeitern kloniert und zur Verfügung gestellt.

**Abb. 8-4: Klonkarte pCMV-SPORT6 – P2RX5**

Das Plasmid wurde über das Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD), Berlin mit der Nr. „IRATp970E0258D“ bezogen.



**Abb. 8-5: Klonkarte pcDNA3 - eGFP**

Das Plasmid wurde von Mitarbeitern des ZMNH kloniert.

#### 8.4. Kongressbeiträge

Ogrodowczyk C. and Pongs O. (2008)

**Activation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells dramatically upregulates expression of P2RX5 channel protein**

Oral Poster Presentation. World Immune Regulation Meeting II, Davos, Switzerland

March 17-20, 2008

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. O. Pongs danke ich für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas, für seine geistige und materielle Unterstützung, für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. M. Böttger danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit als externe Promotion zu betreuen.

Ganz besonders möchte ich mich bei allen wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für neurale Signalverarbeitung für das gute Arbeitsklima, die stete Bereitschaft zur Unterstützung und vor allem auch interessanten Diskussionen bedanken.

Birgit Engeland danke ich für die anfängliche Einarbeitung und Betreuung.

Mein ganz besonderer Dank gilt den Mitgliedern der Essensgruppe: Jacqueline Alig, Jan Barghaan, Sönke Hornig, Quyen Le und Kathrin Sauter für die sehr schöne Zeit im und außerhalb des Labors. Für die netten „Schmidt“-Abende danke ich Sabine Wehrmann (Coffee-to-go???)

Herrn Prof. Dr. R. Martin und Dr. Eva Tolosa möchte ich für interessante und effiziente Diskussionen in immunologischen Fragen sowie der Überlassung verschiedener Materialien danken.

Bei Dr. Stefan Scholten und Dr. Stephanie Meyer möchte ich mich für die Bereitstellung von Plasmiden und die tolle Unterstützung bei den Microarray-Analysen bedanken.

Daniel Schwarz bin ich sehr dankbar für die Lektoren-Arbeit sowie seiner immer geleisteten „Aufbau“-Hilfe.

Mein persönlicher Dank gilt auch meinen Eltern, die mich sowohl moralisch als auch materiell ständig unterstützt haben, meinen Geschwistern, gr. und kl. Oma sowie allen guten Freunden und Freundinnen für ihr Interesse an dieser Arbeit.

Nicht vergessen möchte ich auch ein nicht näher bekanntes Abschleppunternehmen...