

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Immunologie

Direktor Prof. Dr. Bernhard Fleischer

**Einsatz von Antikörpern aus Gene-Gun Immunisierungen zur
Charakterisierung von membranständigen P2X Purinorezeptoren**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Sina Möller
aus Hamburg

Hamburg 2011

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 21.06.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Friedrich Haag

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Christoph Schramm

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Das Immunsystem	7
1.1.1	Das angeborene Immunsystem	7
1.1.2	Die spezifische Immunität	8
1.1.3	Die Reifung der T-Zellen und ihre Rolle bei Autoimmunerkrankungen	9
1.2	Purinrezeptoren	10
1.2.1	Die P2X-Familie	12
1.2.2	Der P2X7 Purinrezeptor	16
1.3	ADP-Ribosyltransferasen	19
1.3.1	Die murine ART2.2 und der NICD	25
1.4	ATP und NAD als extrazelluläre Botenstoffe	28
1.4.1	Immunmodulation durch extrazelluläres NAD	29
1.4.2	Immunmodulation durch extrazelluläres ATP	29
1.5	Herstellung von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern mittels Gene-Gun- Immunisierung	30
2	Material und Methoden.....	35
2.1	Materialien	35
2.1.1	Laborgeräte:	35
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	36
2.1.3	Mausstamm	37
2.1.4	Zelllinien	37
2.1.5	Antikörper	38
2.1.6	Chemikalien und Lösungen	40
2.1.7	Enzyme	41
2.1.8	Primer	42

Inhaltsverzeichnis

2.1.9	Plasmide	43
2.1.10	Puffer und Medien	45
2.1.11	ART2 Substrate, Agonist und Inhibitor von P2X7	46
2.2	Methoden	47
2.2.1	Zellbiologische Methoden	47
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	52
2.2.3	Immunologische Methoden	62
3	Ergebnisse	72
3.1	Transfektion von P2X1, P2X4 und P2X7 Purinrezeptoren in CHO- und HEK-Zellen und Charakterisierung der P2X-spezifischen Antikörper	73
3.1.1	Analyse der Reaktivität von Immunsereen und Bestimmung des Antikörpertiters mittels indirekter Immunfluoreszenz an transient transfizierten CHO-Zellen	73
3.1.2	Analyse der Kreuzreaktivität von Purinrezeptor-spezifischen Immunsereen und monoklonalen Antikörpern mittels indirekter Immunfluoreszenz an transient transfizierten CHO-Zellen	77
3.1.3	Analyse der Reaktivität und der Kreuzreaktivität von Purinrezeptor-spezifischen Immunsereen und monoklonalen Antikörpern mittels FACS-Analysen an transient transfizierten HEK-Zellen	79
3.1.4	Analyse der Reaktivität und der Kreuzreaktivität von Purinrezeptor-spezifischen Immunsereen und monoklonalen Antikörpern mittels Western Blot Analysen an transient transfizierten HEK-Zellen	87
3.1.5	Untersuchung der Fähigkeit zur Immunpräzipitation der α -Pinc Immunsereen	89
3.2	Endogene Expression von Purinrezeptoren auf etablierten Zelllinien und primären Zellen	91
3.2.1	Analyse der Purinrezeptor-Expression auf murinen Zelllinien	92
3.2.2	Analyse der Purinrezeptor-Expression auf humanen Zelllinien	94

Inhaltsverzeichnis

3.2.3	Analyse der Purinrezeptor-Expression auf primären murinen Lymphozyten	96
3.2.4	Analyse der Purinrezeptor-Expression auf primären murinen Knochenmarkszellen	99
3.2.5	Analyse der Purinrezeptor-Expression auf primären murinen Blutthrombozyten	100
3.3	Untersuchung der ADP-Ribosylierung von Purinrezeptoren	101
3.3.1	Analyse der ADP-Ribosylierung von nativen Purinrezeptoren nach stabiler Kotransfektion mit der ART2.2 ADP-Ribosyltransferase in CHO-Zellen	101
3.3.2	Zielgerichtete Mutagenese von P2X1 und P2X4 Purinrezeptoren	107
3.3.3	Analyse der ADP-Ribosylierung von Purinrezeptor Mutanten nach transienter Kotransfektion mit der ART2.2 ADP-Ribosyltransferase in HEK-Zellen	109
4	Diskussion.....	113
4.1	α -Pincs als nützliche experimentelle Werkzeuge	113
4.2	Analyse der Expression von P2X1, P2X4 und P2X7 auf nativen Zelllinien und auf primären Zellen	116
4.3	Untersuchung der ADP-Ribosylierung als allgemeiner Regulationsmechanismus für P2X Purinrezeptoren	120
4.4	Spezifität der ART2.2 für bestimmte Argininreste in Purinrezeptoren und anderen Zielproteinen	122
4.5	Ausblick und weiterführende Analysen	129
5	Zusammenfassung.....	133
6	Abkürzungsverzeichnis.....	134
7	Literaturverzeichnis	140
8	Danksagung	150

Inhaltsverzeichnis

9 Eidesstattliche Erklärung 151

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Lebewesen besitzen ein Abwehrsystem gegen Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten und andere körperfremde Moleküle. Dieses wird als Immunsystem bezeichnet und hat die Aufgabe, körpereigene von körperfremden Strukturen zu unterscheiden, damit nur letztere Ziel der Immunreaktion werden. In Vertebraten setzt sich dieses komplexe System aus einem angeborenen unspezifischen Teil und einem adaptiven spezifischen Teil zusammen. Das adaptive Immunsystem ist eng mit dem unspezifischen Weg verknüpft und ergänzt diesen während einer Immunreaktion bei der Abtötung von Pathoorganismen oder der Beseitigung entarteter körpereigener Strukturen. Die Bildung und Reifung der Zellen des Immunsystems aus hämatopoetischen Stammzellen findet in den primären lymphatischen Organen statt, zu denen das Knochenmark und der Thymus zählen. Die sekundären lymphatischen Organe, welche die Milz, die Lymphknoten und die lymphatischen Gewebe der Schleimhäute umfassen, dienen in erster Linie der Initiation von Immunantworten und der Übermittlung von Überlebenssignalen (Janeway 2002).

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem umfasst sowohl zelluläre als auch humorale Bestandteile. Zur zellulären Immunität zählen sowohl phagozytierende Zellen wie Makrophagen (Aderem and Underhill 1999) und neutrophile Granulozyten (Lee, Harrison et al. 2003) als auch zytotoxische Zellen wie Natürliche Killer Zellen (Kirwan and Burshtyn 2007). Die humorale Immunität wird gebildet durch lösliche Faktoren des Komplementsystems (Fearon 1998), Akut-Phase-Proteine (Ramadori and Christ 1999), Zytokine und aggressive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen. Erkannt werden vor allem entwicklungsgeschichtlich konservierte Merkmale von Pathogenen. Aktivierte Granulozyten und Monozyten phagozytieren Antigene und setzen anschließend aus zytosolischen Granula toxische Enzyme wie Peroxidasen, Esterasen, Proteasen und Lipasen frei. Monozyten entwickeln sich weiter zu antigenpräsentierenden Zellen (APZ), welche Lymphozyten stimulieren. Immunkomplexe oder bakterielle Faktoren führen über zwei verschiedene Wege zur kaskadenartigen Aktivierung der primär

Einleitung

inaktiv vorliegenden Plasmafaktoren C1 bis C9. Dadurch kommt es entweder zur Ausbildung eines Membran-Angriffkomplexes, der zur Perforation der Zellmembran der Zielzellen führt und diese damit abtötet oder es werden über einen anderen Weg die Chemotaxis von Granulozyten und Phagozytoseprozesse stimuliert. Die humorale Immunität umfasst weiterhin Bakterienzellwände spaltendes Lysozym und die Entzündungsmediatoren C-reaktives Protein und Interferon (Delves and Roitt 2000; Delves and Roitt 2000; Janeway 2002).

1.1.2 Die spezifische Immunität

Das adaptive Immunsystem besteht aus einer humoralen und einer zellulären Komponente. Durch engen Kontakt mit allen körpereigenen Strukturen während der Entwicklung hat es gelernt, zwischen fremd und eigen zu unterscheiden (1.1.3). Die von den pluripotenten Vorläuferzellen des Knochenmarks abstammenden Zellen entwickeln sich im Thymus zu reifen T-Lymphozyten und im Knochenmark zu reifen B-Lymphozyten, die Antikörper sezernieren können. Bei wiederholtem Antigenkontakt wird dieses System selektiv und verstärkt aktiviert, um eine effektive und gezielte Abwehr zu gewährleisten (Fazilleau, McHeyzer-Williams et al. 2007). Diese Gedächtnisfunktion macht die adaptive Immunität so besonders. B-Zellen verwenden für Erkennungs- und Effektorfunktionen membranständige oder sezernierte Immunglobuline. Bei den T-Lymphozyten erfolgt die Antigenerkennung über membranständige Rezeptoren (TCR), allerdings müssen die Antigene zuvor von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) aufgenommen, prozessiert und als Peptidfragmente mit Hilfe der MHC-Moleküle präsentiert werden. Die Antigenerkennung führt dann zur klonalen Expansion spezifischer T- und B-Zellen, wodurch eine effektive Immunantwort ermöglicht wird (Cohn, Mitchison et al. 2007). Die von den B-Zellen produzierten Antikörper dienen dabei der Markierung (Opsonierung) von Pathogenen für phagozytierende Zellen, deren Neutralisierung oder der Aktivierung des Komplementsystems. Die spezifische zelluläre Immunität lässt sich anhand des exprimierten Korezeptors in CD8-positive zytotoxische T-Zellen und CD4-positive Helfer-T-Zellen unterteilen. T-Zellen erkennen ihr spezifisches Antigen nur in Zusammenhang mit Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen (MHC, *major histocompatibility complex*), von denen es zwei Klassen gibt. MHC-I Moleküle werden von jeder kernhaltigen Zelle exprimiert, MHC-II Moleküle hingegen nur von so

Einleitung

genannten professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APZs). Helfer-T-Zellen erkennen Peptide, die von MHC-II Molekülen präsentiert werden. Zu den professionellen APZs zählen B-Zellen, Makrophagen und Dendritische Zellen (DC), wobei reife DC die effizientesten Aktivatoren von T-Zellen sind (Janeway 2002). Zytotoxische T-Zellen erkennen Peptide, die von MHC-I Molekülen präsentiert werden. Die T-Zell-APZ-Kontaktstelle bezeichnet man als Immunologische Synapse, welche die T-Zelle aktiviert. Dadurch kommt es zur Expression signalübertragender löslicher Zytokine und membrangebundener Proteine wie TNF- α , dem FAS-Liganden oder CD40-Liganden.

1.1.3 Die Reifung der T-Zellen und ihre Rolle bei Autoimmunerkrankungen

Während der Reifung lernen T-Zellen die Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen kennen. Diese Entwicklung ist so bedeutsam, denn die Unfähigkeit zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu unterscheiden, führt zu Autoimmunerkrankungen. Durch eine überschießende Reaktion des Immunsystems werden allergische Reaktionen hervorgerufen, was die Bedeutung des Gleichgewichtes zwischen körpereigener Abwehr und Toleranz gegenüber harmlosen körperfremden Strukturen unterstreicht.

Wie alle Lymphozyten, stammen die T-Zellen von den pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks ab. Von dort migrieren deren Vorläufer über die Blutbahn in den Thymus und proliferieren und differenzieren dort. Während der Reifungsphase kommt es durch Rekombination der für die einzelnen Ketten des T-Zell-Rezeptors (TCR) kodierenden Genabschnitte zu einer Veränderung des Expressionsmusters der Zelloberflächenproteine. Die Rekombinationsmöglichkeiten der TCR-Genabschnitte sind sehr vielfältig. Daher entstehen überwiegend Zellen mit einem unerwünschten T-Zell-Rezeptor. In der Thymusrinde werden zunächst T-Zellen selektioniert, die mit MHC-Molekülen der APZ generell eine Bindung eingehen können (positive Selektion). Anschließend wird bei T-Zellen, die eine zu starke Bindung mit MHC-Molekülen auf APZ präsentierten körpereigenen Peptiden eingehen, der programmierte Zelltod hervorgerufen (negative Selektion). Die den Thymus verlassenden reifen T-Zellen besitzen eine Toleranz gegenüber allen in dort präsentierten Strukturproteinen des Körpers, organspezifische Antigene dagegen werden nur zum Teil präsentiert. Wird eine

Einleitung

im Blut oder im lymphatischen Gewebe zirkulierende reife T-Zelle durch Antigenbindung mit einer APZ und Ko-Stimulation zur Effektorzelle, kann sich diese in Abhängigkeit von umgebenden Entzündungsmediatoren zur $CD8^+$ zytotoxischen T-Zelle, zur $IFN\gamma$ produzierenden $CD4^+$ Th1-Zelle oder zur B-Zellen stimulierenden $CD4^+$ Th2-Zelle entwickeln. Toleranz gegenüber den organspezifischen Antigenen, die im Thymus nicht präsentiert wurden, entwickeln T-Zellen durch direkten Antigenkontakt, d.h. ohne Präsentation durch eine APZ. Werden körpereigene Antigene außerhalb des Thymus jedoch durch eine APZ präsentiert, erfolgt durch den ko-stimulierenden Effekt eine Reaktivierung, welche zu einer Autoimmunreaktion mit Zerstörung körpereigener Strukturen führt. Bei vielen Autoimmunerkrankungen scheint eine Dysregulation der $CD4^+$ Subpopulation der T-Zellen vorzuliegen. Es existieren jedoch regulatorische T-Zellen, die das Auftreten von Autoimmunerkrankungen verhindern können, indem sie autoreaktive T-Zell-Klone kontrollieren und deren Proliferation hemmen (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 2001). Regulatorische T-Zellen wurden ursprünglich definiert über eine niedrige Expression von CD45RB (eine Splicevariante des „leucocyte common antigens“, einer Tyrosin-Phosphatase), bzw. über eine hohe Expression von CD25 definiert (Read, Mauze et al. 1998). Später wurde der Transkriptionsfaktor Foxp3 als Marker für regulatorische T-Zellen entdeckt (Hori, Nomura et al. 2003). Neuere Untersuchungen deuten an, dass regulatorische T-Zellen besonders empfindlich auf extrazelluläre Nukleotide reagieren (Aswad, Kawamura et al. 2005; Elliott, Surprenant et al. 2005).

1.2 Purinrezeptoren

Purinrezeptoren sind Plasmamembranrezeptoren für extrazelluläre Nukleotide und wurden 1976 erstmals entdeckt (Burnstock 1976). Viele Zellen des Körpers tragen verschiedene Purinrezeptoren auf ihrer Oberfläche. Unter ihnen sind Immunzellen, wie Lymphozyten, Dendritische Zellen und Makrophagen. Ebenso vielfältig wie das Vorkommen sind die Funktionen im Organismus, mit denen Purinrezeptoren in Zusammenhang gebracht werden. Das Spektrum der ligandenabhängigen Aktivierung der Purinrezeptoren reicht von Aufgaben bei der Blutgerinnung über die Physiologie des Blutdruckes im Rahmen lokaler Mechanismen (Yamamoto, Sokabe et al. 2006) bis zur Beteiligung an der Signaltransduktion. Konkrete Zusammenhänge mit Pathologien wurden beschrieben für die Thrombose (Hechler, Lenain et al. 2003), den Schmerz

Einleitung

(Kennedy, Assis et al. 2003), das Reizdarmsyndrom (Galligan 2004), die Herzfunktion bei Ischämie oder die Entzündung (Ralevic and Burnstock 1998; Burnstock and Williams 2000; Bodin and Burnstock 2001) sowie für die seltenere Erkrankung Muskeldystrophie vom Typ Duchenne.

Man unterscheidet zwei Gruppen von Purinrezeptoren, die Adenosin sensitiven P1 Rezeptoren (A1, A2a, A2b, A3) und die P2 Rezeptoren, die durch ATP, ADP, UTP, UDP, UDP-Glucose oder NAD aktiviert werden (Ralevic and Burnstock 1998; Dubyak 2003). Die G-Protein gekoppelten A1 und A3 führen zu erniedrigten intrazellulären cAMP Konzentrationen, während A2a und A2b diese erhöhen. A1 und A3 sind auf unreifen DC exprimiert und induzieren dort den Calciumeinstrom und verstärken die Chemotaxis (Panther, Idzko et al. 2001; Panther, Corinti et al. 2003). A2a und A2b erniedrigen die Produktion von IL-12 in LPS-gereiften Dendritischen Zellen und verhindern somit die Spezialisierung der naiven CD4⁺-Zellen in Th1-Zellen. Der A2a wird auch auf Th1-Zellen exprimiert. Dessen Aktivierung verhindert die TCR-vermittelte T-Zell Proliferation, die Hochregulierung des IL-2-Rezeptors und die Effektorfunktionen der zytotoxischen T-Zellen (Huang, Apasov et al. 1997; Koshiba, Kojima et al. 1997). Die A2a und A2b sind die am stärksten auf Immunzellen exprimierten P1 Rezeptoren und sind wichtig für die anti-inflammatorischen Effekte von Adenosin (Sitkovsky and Lukashev 2005).

Die P2 Purinrezeptoren werden weiter in P2X und P2Y unterschieden. Sie unterscheiden sich in der Spezifität für Liganden, der Struktur, der Aktivierung und der Signaltransduktion. Während P2Y Rezeptoren sowohl mit ATP, als auch UTP als Liganden reagieren, besitzen P2X Purinrezeptoren eine Spezifität für ATP. P2Y Purinrezeptoren (P2Y1, -2, -4, -6, -11, -12, -13, -14) durchspannen siebenmal die Membran und gehören zu den Protein-G gekoppelten Rezeptoren. Unreife Dendritische Zellen exprimieren den P2Y11 (Wilkin, Duhant et al. 2001) und reagieren auf nanomolare Mengen ATP mit der Ausreifung der Dendritischen Zellen. P2Y6 und P2Y14 reagieren sensitiv auf UDP und UDP-Glucose, ihr Vorkommen auf T-Zellen wurde ebenfalls beschrieben (Somers, Hammet et al. 1998; Scrivens and Dickenson 2005). Untersuchungen auf RNA Ebene (RT-PCR Untersuchungen und Gene-Array Analysen) deuten an, dass einige Mitglieder der P2X Purinrezeptoren (P2X1, P2X4 und P2X7) von vielen Zellen des Immunsystems ko-exprimiert werden, u.a. von Mastzellen,

Einleitung

B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen und Dendritischen Zellen (Burnstock and Knight 2004; Surprenant and North 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wird ausschließlich die P2X Rezeptorklasse untersucht, weshalb diese im Folgenden ausführlicher vorgestellt wird.

1.2.1 Die P2X-Familie

Bei den P2X Purinrezeptoren handelt es sich um ligandenabhängige Ionenkanäle (P2X1-7) (Fredholm, Abbraccio et al. 1997; Khakh, Burnstock et al. 2001). Die P2X Purinrezeptorklasse durchspannt zweimal die Plasmamembran, so dass sich sowohl das C-terminale Ende des Proteins, als auch der N-Terminus innerhalb der Zelle befinden (**Abb. 1**). Extrazellulär bildet eine große Schleife die Ligandenbindungsregion (North 1996). Mensch und Maus exprimieren sieben verschiedene P2X Rezeptoren, deren Größen von 379 bis 595 Aminosäuren reichen. Der P2X7 Purinrezeptor unterscheidet sich dabei durch ein längeres zytosolisches C-terminales Ende von den anderen Subtypen. Die schematischen Strukturen sind in **Abb. 1** dargestellt. Die Ionenkanäle der P2X Purinrezeptoren werden spezifisch durch ATP aktiviert. Eine Aktivierung führt zur Membrandepolarisation und zum Einstrom von Calcium, was intrazelluläre Ionenveränderungen und eine Signaltransduktion hervorruft. Durch Mutationen und biochemische Analysen werden die Strukturen der P2X Purinrezeptoren detailliert untersucht. Einerseits möchte man so mehr Informationen über die dreidimensionale Struktur erhalten. Andererseits ist es ein Ziel, die genauen Funktionsabläufe der ATP-Bindung, der Ionenleitfähigkeit, der Kanalöffnung und deren Regulation zu erforschen. Man hat herausgefunden, dass die extrazelluläre Schleife etwa 280 Aminosäuren lang ist und mehrere Glykosylierungsstellen besitzt (North 2002). Außerdem enthält diese Schleife 10 konservierte Cysteine (hellblau hinterlegt in **Abb. 3**), zwischen denen Disulfidbrücken gebildet werden. Diese verhelfen dem Protein zu seiner charakteristischen dreidimensionalen Struktur (Clyne, LaPointe et al. 2002; Ennion and Evans 2002). Die ATP-Bindungsstelle liegt wahrscheinlich dort, wo positiv geladene Aminosäuren mit den negativ geladenen Phosphaten des ATPs und aromatische Aminosäuren mit dessen Adenin-Ring interagieren (Ennion, Hagan et al. 2000; Roberts and Evans 2004). Andere Aminosäuren geben dem Rezeptor Flexibilität bei der Konformationsänderung zur Kanalöffnung.

Einleitung

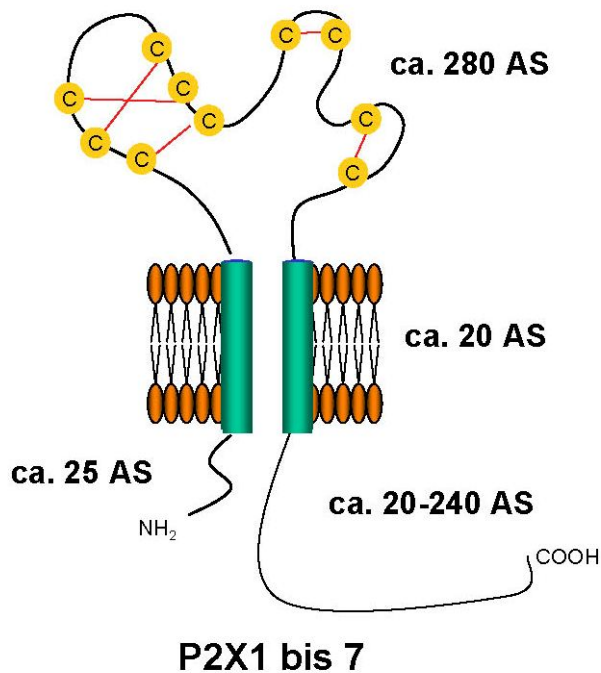


Abb. 1: Die Struktur der P2X Purinrezeptoren. Es wurden 7 Mitglieder dieser Familie identifiziert und als P2X1-P2X7 bezeichnet. Diese werden bei Säugetieren in fast allen Geweben exprimiert (Di Virgilio, Chiozzi et al. 1998). Die schematische Struktur der P2X-Untereinheiten zeigt Proteine, die zwischen 379 und 595 Aminosäuren (AS) lang sind mit jeweils zwei hydrophoben Transmembrandomänen. Gemeinsam ist den P2X Purinrezeptoren eine große, ca. 280 Aminosäuren lange extrazelluläre Schleife, die 10 Cysteine und eine ligandenbindende Domäne enthält. Die für die dreidimensionale Struktur aller Purinrezeptoren wichtigen Cysteine sind mit den von ihnen gebildeten Disulfidbrücken dargestellt. Der P2X7-Subtyp unterscheidet sich von der restlichen Familie durch einen deutlich längeren C-terminalen intrazellulären Anteil (North 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit werden speziell die P2X1, P2X4 und P2X7 Purinrezeptoren näher untersucht, bzw. Antikörper charakterisiert, die gegen diese Purinrezeptoren gerichtet sind. Kreuzreaktionen der Immunsereen sind bei starker Ähnlichkeit der Rezeptoren wahrscheinlicher. Die folgende **Abb. 2** zeigt die Ergebnisse der Aminosäure-Sequenzidentitätsanalysen der extrazellulären Domänen dieser drei P2X Purinrezeptoren. Dabei zeigen die jeweiligen murinen und humanen Orthologen eine Sequenzidentität von 80-90%, während die Paralogen innerhalb einer Spezies eine wesentlich niedrigere Sequenzidentität von nur 40-50% besitzen.

Einleitung

		P2X1		P2X4			P2X7		
		mouse	human	mouse	rat	human	mouse	rat	human
P2X1	mouse	100%	88%	44%	48%	49%	47%	48%	49%
	human	88%	100%	44%	48%	48%	44%	45%	46%
P2X4	mouse	44%	44%	100%	85%	78%	47%	44%	44%
	rat	48%	48%	85%	100%	88%	52%	50%	49%
	human	49%	48%	78%	88%	100%	52%	50%	51%
P2X7	mouse	47%	44%	47%	52%	52%	100%	87%	81%
	rat	48%	45%	44%	50%	50%	87%	100%	91%
	human	49%	46%	44%	49%	51%	81%	91%	100%

Abb. 2: Prozent der Aminosäure-Sequenzidentitäten von P2X1, P2X4 und P2X7 aus Maus, Ratte und Mensch. Diese Abbildung zeigt die prozentuale Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen des extrazellulären Anteils der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mitglieder der P2X Rezeptorfamilie. Dabei zeigen die jeweiligen murinen und humanen Orthologen eine hohe Sequenzidentität von 80-90% in der Proteinsequenz, während die Paralogen innerhalb einer Spezies eine wesentlich niedrigere Sequenzidentität von nur 40-50% besitzen.

Das Alignment der Proteinsequenzen der P2X-Familie in **Abb. 3** bestätigt die Ergebnisse der Sequenzanalyse. In gelb sind die Transmembrandomänen hinterlegt und in blau die konservierten 10 Cysteine, die in der Tertiärstruktur Disulfidbrücken ausbilden und wichtig für die Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur des Proteins sind. Rot hinterlegt sind die Arginine, die als Targets der ADP-Ribosylierung des Maus P2X7 Purinrezeptors dienen (Adriouch, Bannas et al. 2008). Grün hinterlegt sind die Positionen in der Aminosäuresequenz der P2X1 und P2X4 Purinrezeptoren, die im Rahmen dieser Arbeit genetisch verändert wurden. Violett gefärbt sind die C-terminalen Peptide, gegen die kommerziell verfügbare Antikörper (α -Peptids) gerichtet sind. Letztere werden in dieser Arbeit vergleichend mit Antikörpern untersucht, die durch genetische Immunisierung gewonnen wurden.

P2X7, der im Kontext des Immunsystems bisher am besten untersuchte P2X Rezeptor, wird im Folgenden noch näher beschrieben.

Einleitung

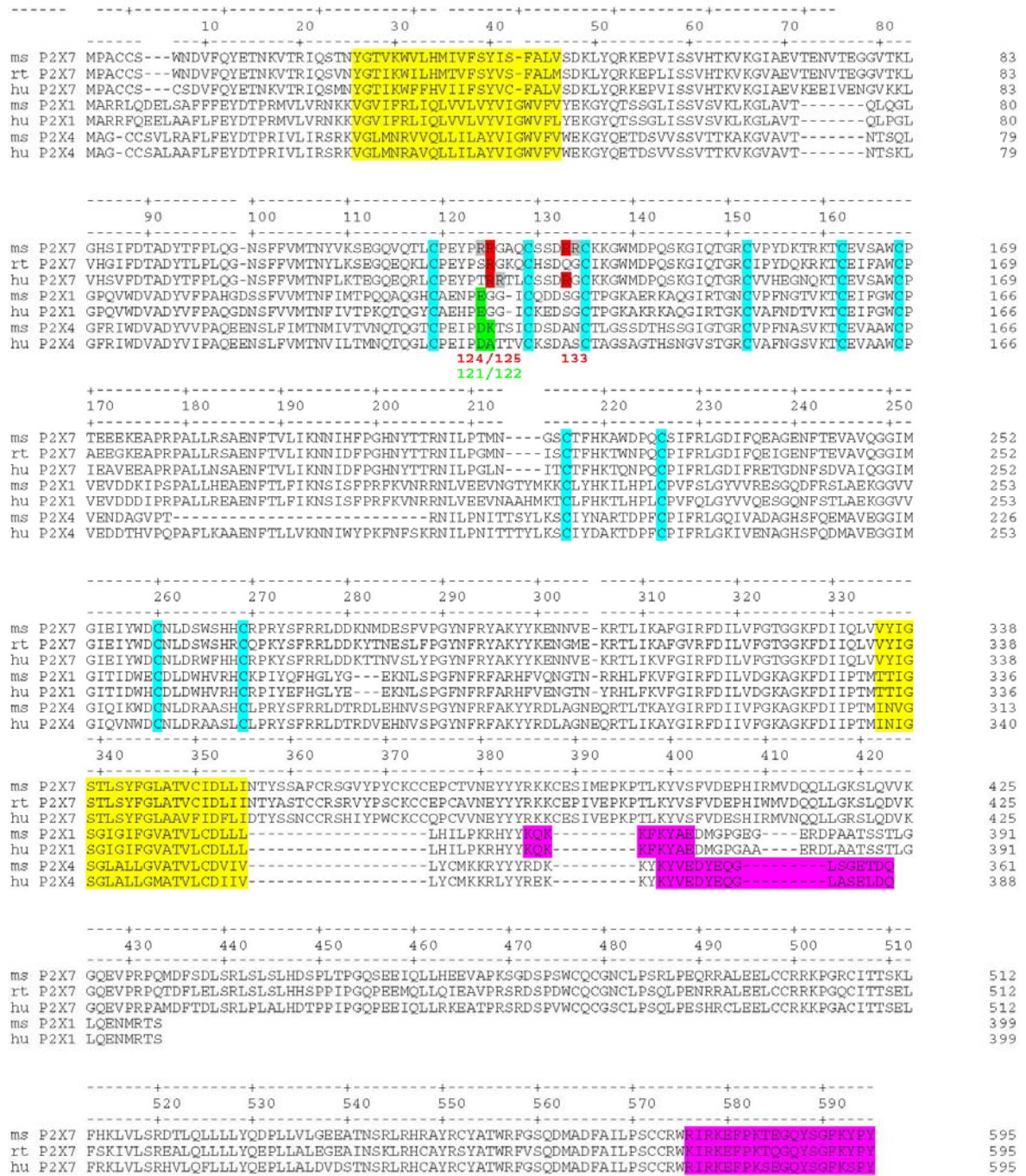


Abb. 3: Alignment der P2X-Serie. Zum Vergleich der Übereinstimmung der Proteinsequenzen der P2X-Familie wurde ein Alignment angefertigt. Gelb markiert sind die Transmembranregionen, hellblau die konservierten Cysteine. Rot hinterlegt sind Arginine, die als Targets der ADP-Ribosylierung des P2X7 Purinrezeptors dienen (z.T. neben dem jeweiligen grau markierten Doppelarginin). In Grün hinterlegt sind die entsprechenden Stellen in der Aminosäuresequenz der P2X1 und P2X4 Purinrezeptoren, die im Rahmen dieser Arbeit genetisch verändert wurden. Violett gefärbt sind die Aminosäurereste, welche die α -Peptids erkennen: Kaninchen-anti-P2X1 C-Terminal (Ratte AS 364-372), Kaninchen-anti-P2X4 C-Terminal (Ratte AS 373-388), Kaninchen-anti-P2X7 C-Terminal (Ratte AS 576-595).

Einleitung

1.2.2 Der P2X7 Purinrezeptor

Das Säugetiergenom kodiert für eine Fülle von Ektoenzymen, die Nukleotide metabolisieren und für Rezeptoren, die auf Nukleotide reagieren. Dabei ist der P2X7 Rezeptor für die Immunologie besonders interessant, da er mit der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und mit dem Zelltod in Verbindung steht. Er wird auf verschiedenen hämatopoetischen Zellen exprimiert, wie z.B. auf T-Lymphozyten (Baricordi, Ferrari et al. 1996; Labasi, Petrushova et al. 2002; Seman, Adriouch et al. 2003; Kawamura, Aswad et al. 2005), auf Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen (Collo, Neidhart et al. 1997; Mutini, Falzoni et al. 1999; Mehta, Hart et al. 2001), sowie auf humanen B-CLL (chronisches B-Zell-Lymphom) (Adinolfi, Melchiorri et al. 2002; Wiley, Dao-Ung et al. 2002). Der P2X7 Purinrezeptor kann durch zwei verschiedene Mechanismen aktiviert werden. Zum einen führen hohe Konzentrationen an ATP nach Ligandenbindung zur Konformationsänderung des homotrimeren Rezeptorkomplexes. Dadurch bildet sich ein nicht-selektiver Ionenkanal der den schnellen Austausch von mono- und divalenten Kationen ermöglicht. Dabei strömen den Konzentrationen entsprechend Kalium aus der Zelle sowie Calcium und Natrium in die Zelle, wodurch es zur Membrandepolarisation kommt. Innerhalb von Sekunden wird daraufhin Phosphatidylserin (PS) (Garcia-Marcos, Pochet et al. 2006) auf die Außenfläche der Plasmamembran geklappt. Außerdem werden membrangebundene Ektopeptidasen wie ADAM17/TACE aktiviert, was zum *Shedding* (Abwerfen) von CD62L/TNF- α auf Lymphozyten führt (Jamieson, Snook et al. 1996; Gu, Bendall et al. 1998; Labasi, Petrushova et al. 2002). Dieses wird assoziiert mit der T-Zell-Aktivierung (Smalley and Ley 2005). Auch die Produktion von TNF- α in Mikrogliazellen wurde beschrieben (Suzuki, Hide et al. 2004). Stimuliert man Zellen länger mit einer größeren Konzentration an ATP, führt dies zur Ausbildung einer nicht-selektiven Riesepore, deren Kanalprotein kürzlich als Pannexin-1 identifiziert wurde. Diese Pore lässt Moleküle bis zu einer Größe von 900 Dalton durch, wie z.B. die DNA-Farbstoffe Ethidiumbromid oder YO-PRO-1 (Steinberg, Newman et al. 1987; Hickman, el Khoury et al. 1994; Schilling, Wasylyna et al. 1999; Virginio, MacKenzie et al. 1999). Kürzere Episoden dieser Riesepore überleben die Zellen durch Neuversiegelung der Zellmembran. Eine längere Exposition führt allerdings zu mitochondrialen Dysfunktionen, DNA-Fragmentierungen und schließlich zum Zelltod (Buisman, Steinberg et al. 1988; Ferrari, Chiozzi et al. 1997; MacKenzie, Wilson et al. 2001;

Einleitung

Seman, Adriouch et al. 2003; Kawamura, Aswad et al. 2005). Als weitere Antwort auf die ATP-Stimulierung werden das „Inflammasome“ und ICE/Caspase1 aktiviert. Dieses wiederum induziert, dass Zytokine wie IL-1 β und IL-18 prozessiert und aus dendritischen Zellen und Makrophagen freigesetzt werden (Ferrari, Chiozzi et al. 1997; Mehta, Hart et al. 2001). Es werden Mikrovesikel mit IL-1 β abgespalten (Shedding) (MacKenzie, Wilson et al. 2001) und es kommt zur Membran-Blasenbildung. Die Kontrolle der Bildung und Freisetzung des IL-1 β durch den P2X7 Purinrezeptor spielt eine bedeutende Rolle bei Entzündungen. Nicht immer führt dieser Prozess direkt zum Zelltod. Die P2X7-Aktivierung führt auch zur Fusion von Phagosom und Lysosom (Lammas, Stober et al. 1997; Fairbairn, Stober et al. 2001; Coutinho-Silva, Stahl et al. 2003), welches wichtig für die Elimination von intrazellulären Pathogenen wie Mykobakterien oder Chlamydien ist. Die Aktivierung des P2X7 Rezeptors durch ATP erfordert relativ hohe Konzentrationen (ca. 0,2-5mM) (**Abb. 4**).

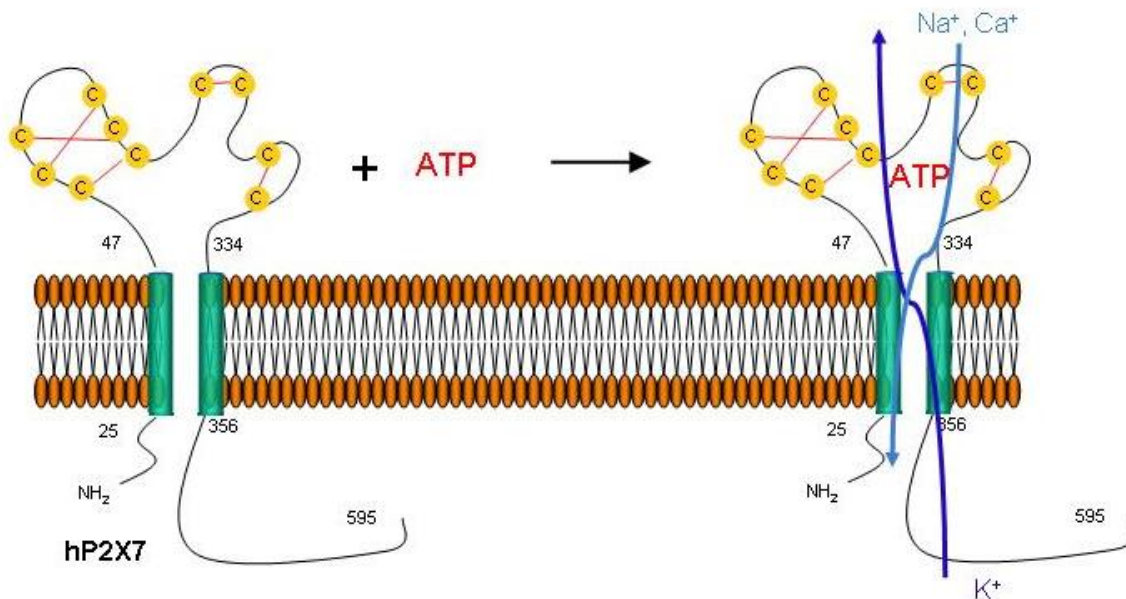


Abb. 4: Aktivierung von P2X7 durch ATP. Der P2X7 Rezeptor fungiert als Trimer. Vermutlich ist die ATP-Bindungsstelle jeweils an der Grenzfläche zweier benachbarter Untereinheiten lokalisiert. Die Bindung von ATP an die freien Bindetaschen führt zur Konformationsänderung und zur Porenbildung. Dadurch kommt es zum Einstrom von Na⁺ und Ca²⁺ in die Zelle und Ausstrom von K⁺ aus der Zelle, was zur Depolarisierung der Zellmembran und einem Anstieg der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration führt. Die hierdurch bedingte Aktivierung verschiedener intrazellulärer Botenstoffe und Enzymkaskaden wurde bisher partiell charakterisiert (Di Virgilio, Chiozzi et al. 2001).

Einleitung

Die zweite Möglichkeit, den P2X7 Purinrezeptor zu stimulieren, ist die ADP-Ribosylierung (**Abb. 5**). Hierfür genügen geringere Konzentrationen an NAD (1-20 μ M). Katalysiert durch die NAD-abhängige ecto-ADP-Ribosyltransferase ART2.2, wird die ADP-Ribose-Gruppe von NAD auf das Zielprotein übertragen und Nikotinamid freigesetzt. Die meisten ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) der Vertebraten modifizieren Arginin-Reste der Zielproteine. Unklar ist bisher, wie P2X7 durch ADP-Ribosylierung aktiviert wird. Möglicherweise ragt die ADP-Einheit der kovalent gebundenen ADP-Ribosegruppe in die ATP-Bindungstasche. Die Aktivierung führt jedenfalls zur Kanalöffnung und zum Calciumeinstrom. Zu den Zielproteinen der ADP-Ribosylierung auf T-Zellen zählen neben dem P2X7 Purinrezeptor (Seman, Adriouch et al. 2003) auch CD8, CD27, CD43, CD44, CD45 (Okamoto, Azhipa et al. 1998), ein bisher nicht identifiziertes an einem Tyrosinrest phosphoryliertes 80 kDa Protein (Koestner 2007) und die beiden Untereinheiten von LFA1 (Nemoto, Yu et al. 1996). Diese posttranslationale Modifizierung steht in engem Kontakt mit der Induktion des Zelltodes in T-Zellen. Bisher ist nicht vollständig geklärt, wie der P2X7 in vivo aktiviert wird. In vitro werden millimolare Konzentrationen an ATP benötigt, während schon mikromolare Mengen an NAD die ART2.2-katalysierte ADP-Ribosylierung ermöglichen (Surprenant, Rassendren et al. 1996; North and Surprenant 2000) und somit eine Alternative der P2X7-Aktivierung darstellen. Für die Aktivierung durch NAD genügt eine kurze Behandlung mit niedriger Dosis und führt zur langen Aktivierung durch die kovalente Ligandenbindung. Durch ATP erfolgt eine lösliche Ligandenbindung mit reversiblen Effekten (MacKenzie, Wilson et al. 2001; Seman, Adriouch et al. 2003).

Gängige experimentelle Merkmale der P2X-Aktivierung nach NAD- oder ATP-Behandlung sind das sog. PS-Flashen, also dem nach außen Kehren (Flashen) von Phosphatidylserin (Garcia-Marcos, Pochet et al. 2006) auf die Außenseite der Zellmembran, das CD62L Shedding (Abspalten) und schließlich der Zelltod (Di Virgilio, Chiozzi et al. 2001; Seman, Adriouch et al. 2003). Es bleibt jedoch zu klären, wie es dazu kommt, dass ein und derselbe Rezeptor stimulierende oder absterbende Signale empfangen/abgeben kann und warum verschiedene Zelltypen unterschiedlich auf die Aktivierung ein und desselben Rezeptors reagieren. Möglicherweise spielt dabei die Stärke der Oberflächenexpression des P2X7 Purinrezeptors auf unterschiedlichen Zelltypen eine Rolle (Aswad and Dennert 2006), die man z.B. mit den α -Pinc

Einleitung

spezifischen Antikörpern untersuchen kann. Jüngste Ergebnisse zeigen, dass der P2X7 Rezeptor nach reversibler Palmitoilierung transient mit cholesterinreichen Membrandomänen, sog. Lipid rafts, assoziiert sein kann (Gonnord, Delarasse et al. 2009).

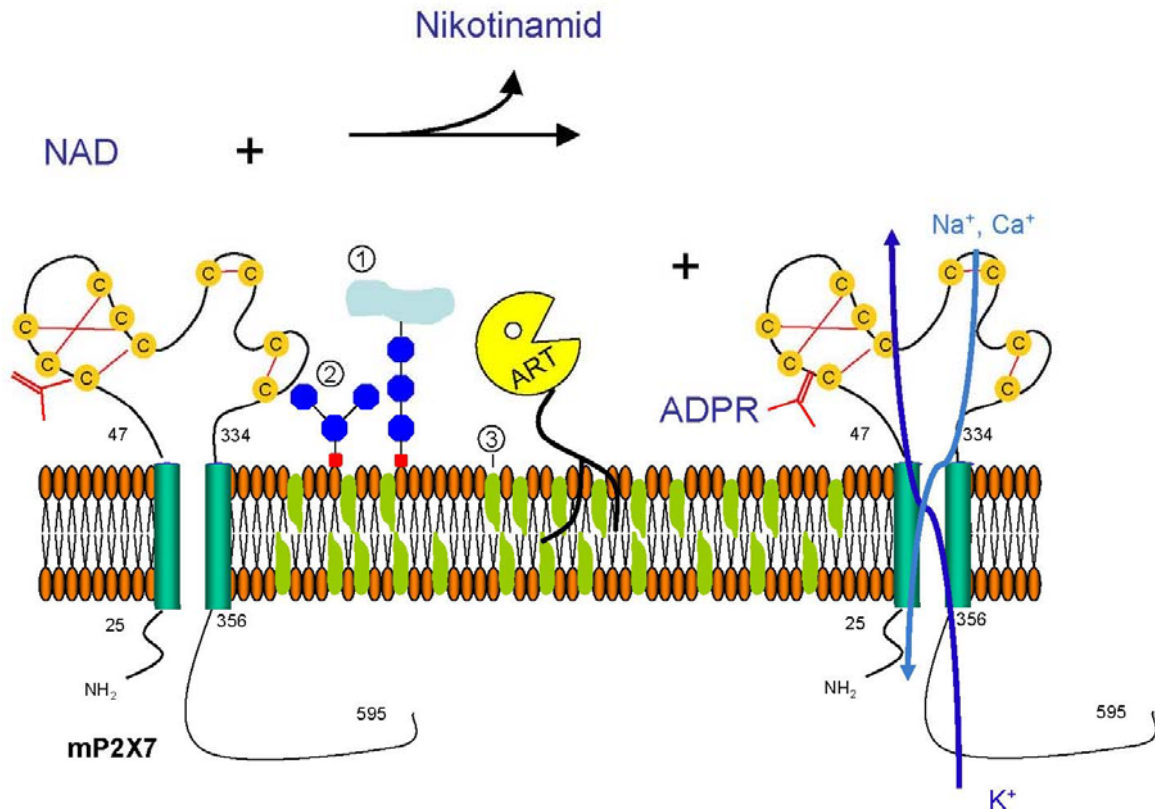


Abb. 5: NAD-vermittelte P2X7-Aktivierung. Wie in Abb. 4 gezeigt, kann der P2X7 Purinrezeptor direkt durch den löslichen Liganden ATP aktiviert werden. Exprimieren Zellen gleichzeitig ART2.2, kann die Aktivierung auch NAD-vermittelt erfolgen. Bei der ADP-Ribosylierung wird die ADP-Ribose-Gruppe vom NAD auf das Zielprotein übertragen und Nikotinamid freigesetzt. Die meisten Vertebraten-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) modifizieren Arginin-Reste der Zielproteine. Unklar ist bisher, wie P2X7 durch ADP-Ribosylierung aktiviert wird. Die Aktivierung führt jedenfalls zur Kanalöffnung und zum Calciumeinstrom. Die ART ist aufgrund ihres GPI-Ankers konstitutiv mit cholesterinreichen Membrandomänen, sog. Lipid rafts assoziiert. 1: GPI-verankertes Protein, 2: Glykolipid, 3: Cholesterin.

1.3 ADP-Ribosyltransferasen

Die pathogene Wirkung von Cholera-, Pertussis-, Diphtherie- und anderen bakteriellen Toxinen beruht auf der ADP-Ribosylierung von Zielproteinen in humanen Wirtszellen (Aktories, Schmidt et al. 2000). Dabei wirken ADP-ribosylierende bakterielle Proteine

Einleitung

als Virulenzfaktoren, welche wirtseigene Regulationsproteine mit Schlüsselfunktionen inaktivieren (Holbourn, Shone et al. 2006; Yates, Jorgensen et al. 2006). Unsere Arbeitsgruppe hat Toxin-verwandte Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ART1-ART5) bei Säugetieren kloniert, die als GPI-verankerte oder sezernierte Ektoenzyme exprimiert werden. Bei Mäusen wurden ART1, ART2.1, ART2.2, ART3, ART4 und ART5 auf der Zelloberfläche nachgewiesen, während beim Menschen nur die ART1, ART3, ART4 und ART5 vorkommen. Für ART2 besitzt das humane Genom ein Pseudogen (Haag, Koch-Nolte et al. 1994; Koch-Nolte, Petersen et al. 1996), während die Maus zwei funktionstüchtige ART2 Genkopien trägt. Die 3D-Struktur der ART2.2 (Abb. 6) (Ritter, Koch-Nolte et al. 2003) zeigt eine hohe strukturelle Verwandtschaft mit ADP-ribosylierenden bakteriellen Toxinen, die in Säugetierzellen die Signaltransduktion inhibieren oder die Zytoskelett-Organisation beeinflussen. Cholera toxin aus *Vibrio cholera* und Pertussis toxin aus *Bordetella pertussis* blockieren durch Mono-ADP-Ribosylierung heterotrimere G-Proteine. GTP-bindende Proteine wie Ras und Rho werden durch Exotoxin S aus *Pseudomonas aeruginosa* oder C3 Exotoxin aus *Clostridium botulinum* ADP-ribosyliert, während ATP-bindende Proteine wie Aktin durch SpvB aus *Salmonella enterica* oder C2 Toxin aus *Clostridium botulinum* verändert werden (Aktories and Barbieri 2005). Während die B-Untereinheit des Cholera toxins an die Zelloberfläche bindet, gelangt die A-Untereinheit, eine ADP-Ribosyltransferase, ins Zellinnere und führt über die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen zur dauerhaften Aktivierung von Adenylatzyklen des Darmepithels mit Elektrolyt- und Wasserverlusten. Für zwei Beispiele stehen bereits Kristallstrukturen der posttranslationalen Modifizierung zur Verfügung: 1.) die durch SpvB oder C2-Toxin katalysierte ADP-Ribosylierung des Aktins an der Stelle Arginin177, welches die Polymerisation des zytoskeletalen Aktins verhindert (Aktories, Ankenbauer et al. 1986; Vandekerckhove, Schering et al. 1988; Margarit, Davidson et al. 2006) und 2.) die durch Diphtherietoxin katalysierte ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2 an Diphthamid699, welches den Elongationszyklus der Proteinsynthese unterbricht (Honjo, Nishizuka et al. 1968; Collier 2001; Jorgensen, Merrill et al. 2005). In beiden Fällen wird durch die toxin-vermittelte ADP-Ribosylierung nicht die Tertiärstruktur des Zielproteins verändert, sondern dessen Interaktion mit anderen Proteinen durch sterische Blockade verhindert (Jorgensen, Merrill et al. 2005; Margarit, Davidson et al. 2006).

Einleitung

ART2 + NAD 1og3

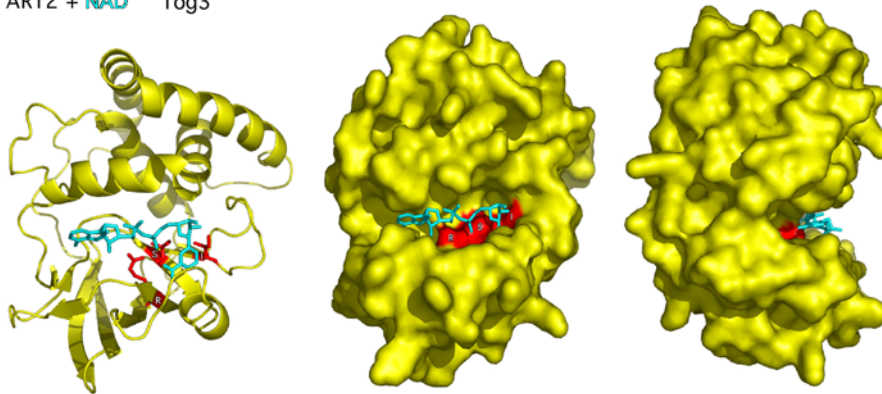


Abb. 6: Tertiärstruktur von RT6 (Ratten ART2.2). Abgebildet ist die kristallographisch aufgeklärte Tertiärstruktur der Ratten ADP-Ribosyltransferase-2 (ART2.2) mit gebundenem NAD (pdb-Code: 1og3). Die 3D-Struktur ähnelt der Struktur eines „Pacmans“, in der die N-terminale und C-terminale Domäne zusammen eine Art „Ober-“ und „Unterkiefer“ bilden. Das ko-kristallisierte NAD ist in cyan als Stickmodell dargestellt. Die NAD Bindungsstelle befindet sich im aktiven Zentrum des Enzyms, dem „Mund“ des Pacmans. Um die Ko-Kristallisation zu ermöglichen, wurde das katalytische Glutamat E189 vor der Kristallisation zu I189 (Ile) mutiert. Diese und zwei weitere konservierte Aminosäuren im aktiven Zentrum, Arginin R126 und Serin S147, sind rot dargestellt (Ritter, Koch-Nolte et al. 2003).

Bei den bisher bei Vertebraten klonierten mono-ADP-Ribosyltransferasen handelt es sich um Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-(GPI)-verankerte Proteine (ART1 bis ART4), meist mit verzweigtem Membrananker. Die ART5 hingegen ist ein sezerniertes Protein (**Abb. 7**) (Okazaki and Moss 1998; Glowacki, Braren et al. 2002).

Einleitung

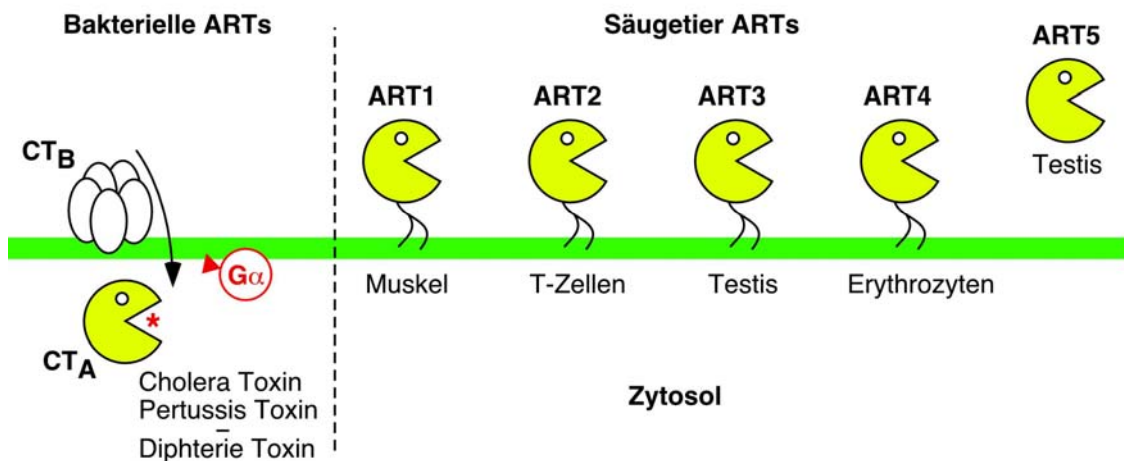


Abb. 7: Die Familie der ADP-Ribosyltransferasen. Stellvertretend für bakterielle ARTs ist auf der linken Seite der Wirkmechanismus des Cholera-Toxins dargestellt: Während die B-Untereinheit an die Zelloberfläche bindet, gelangt die A-Untereinheit, eine ADP-Ribosyltransferase, ins Zellinnere und führt über die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen zur dauerhaften Aktivierung von Adenylatzyklen des Darmepithels mit Elektrolyt- und Wasserverlust infolge. Auf der rechten Seite sind die bisher bei Vertebraten klonierten mono-ADP-Ribosyltransferasen dargestellt. Bei den ART1 bis ART4 handelt es sich um Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-(GPI)-verankerte Proteine, die mit verzweigten Membranankern dargestellt sind. ART5 hingegen ist ein sezerniertes Protein. Die Expression der verschiedenen ARTs ist entsprechend der Beschriftung auf bestimmte Gewebe beschränkt. (Modifiziert nach Koch-Nolte et al. 2006, *Annals of Medicine*)

Die Expression der verschiedenen ARTs ist auf bestimmte Gewebe beschränkt, ART2.2 beispielsweise auf murine T-Zellen. ART2.2 wird vor allem von ruhenden T-Zellen exprimiert und nach T-Zellaktivierung von der Zelle als aktives Enzym freigesetzt (Domenighini and Rappuoli 1996; Koch-Nolte, Petersen et al. 1996; Okazaki and Moss 1998; Kahl, Nissen et al. 2000; Mueller-Dieckmann, Ritter et al. 2002; Bannas, Adriouch et al. 2005). Aufgrund seines Glykolipidankers ist ART2.2 in der Zellmembran mit cholesterin- und gangliosidreichen Regionen assoziiert, die als Lipid rafts bezeichnet werden (Bannas, Adriouch et al. 2005). Die Lokalisation in Lipid rafts fokussiert die Aktivität der ART2.2 auf raft-assoziierte Domänen. Es ist bekannt, dass auch nicht GPI-verankerte Zielproteine der ART2.2 wie LFA-1 und P2X7 transient mit Lipid rafts auf der Zellmembran assoziieren können (Marwali, Rey-Ladino et al. 2003; Bannas, Adriouch et al. 2005; Gonnord, Delarasse et al. 2009). ART1 kommt auf Monozyten, Neutrophilen und CML-Zelllinien vor, jedoch nicht auf Zelllinien aus soliden Tumoren. Humanes ART1 hat kürzlich die CD-Nummer CD296 erhalten (Koch-

Einleitung

Nolte, Glowacki et al. 2005) und wird auf Granulozyten, Herz- und Skelettmuskelzellen, sowie auf Epithelzellen exprimiert (Zolkiewska and Moss 1993; Yadollahi-Farsani, Kefalas et al. 1999; Zhao, Gruszczynska-Biegala et al. 2005). ART4 ist Träger des Dombrock Blutgruppenantigens und hat die Nummer CD297 (Parusel, Kahl et al. 2005). Sonst kommt es vor allem auf Erythrozyten und weniger auf Monozyten und Milzmakrophagen vor. Interessanterweise wurden bisher keine Gene für extrazelluläre ARTs in Pilz-, Wurm-, Insekten- oder pflanzlichen Genomen gefunden.

Die ecto-ARTs sind an der posttranslationalen Modifikation von Proteinen beteiligt, indem sie die ADPR des NADs auf z.B. Arginin transferieren (Koch-Nolte, Reche et al. 2001; Glowacki, Braren et al. 2002). Eine Möglichkeit zur Untersuchung der ADP-Ribosylierung bietet der 1G4-Assay. Die an der Zelloberfläche lokalisierte ART reagiert hier mit dem zugeführten etheno-NAD, indem sie das Nikotinamid abtrennt und den etheno-Adenosin-Rest über ein Arginin an Targetproteine bindet. Die ADP-ribosylierten Proteine können nun durch einen etheno-Adenosin-spezifischen Antikörper 1G4 erkannt werden (**Abb. 8**).

Einleitung

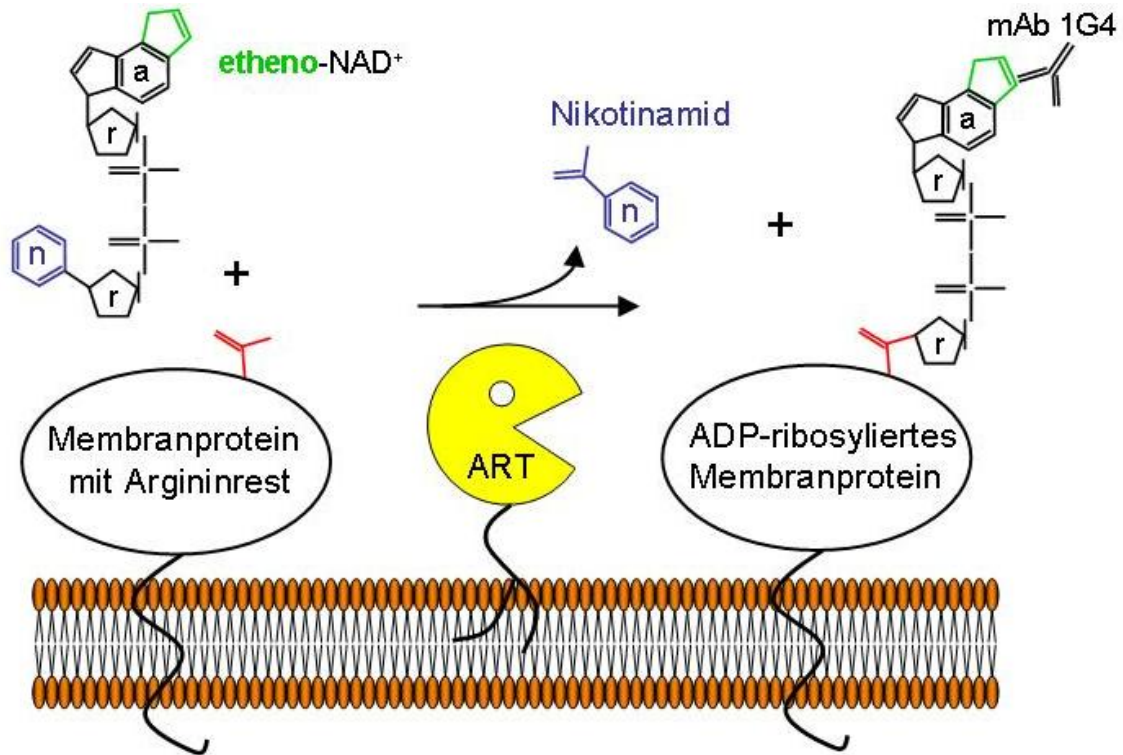


Abb. 8: Immunoassay zur Detektion von (etheno)-ADP-ribosylierten Oberflächenproteinen. Anstelle von NAD können ARTs auch etheno-NAD als Substrat verwenden und so Zielproteine etheno-ADP-ribosylieren. Zur Detektion wird der monoklonale Antikörper 1G4 benutzt, der spezifisch an die etheno-Adenosin-Gruppe bindet und anschließend mit einem Fluoreszenz- oder Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper detektiert werden kann. Damit können ADP-ribosylierte Zielproteine im Westernblot und auf lebenden Zellen in der Durchflusszytometrie oder in der Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden. (Modifiziert nach: Krebs, Koestner et al. 2003).

Eine weitere Untersuchungsmethode bietet die radioaktive Markierung des NADs und Messung markierter Oberflächenproteine mittels SDS-PAGE-Autoradiographie (**Abb. 9**).

Einleitung

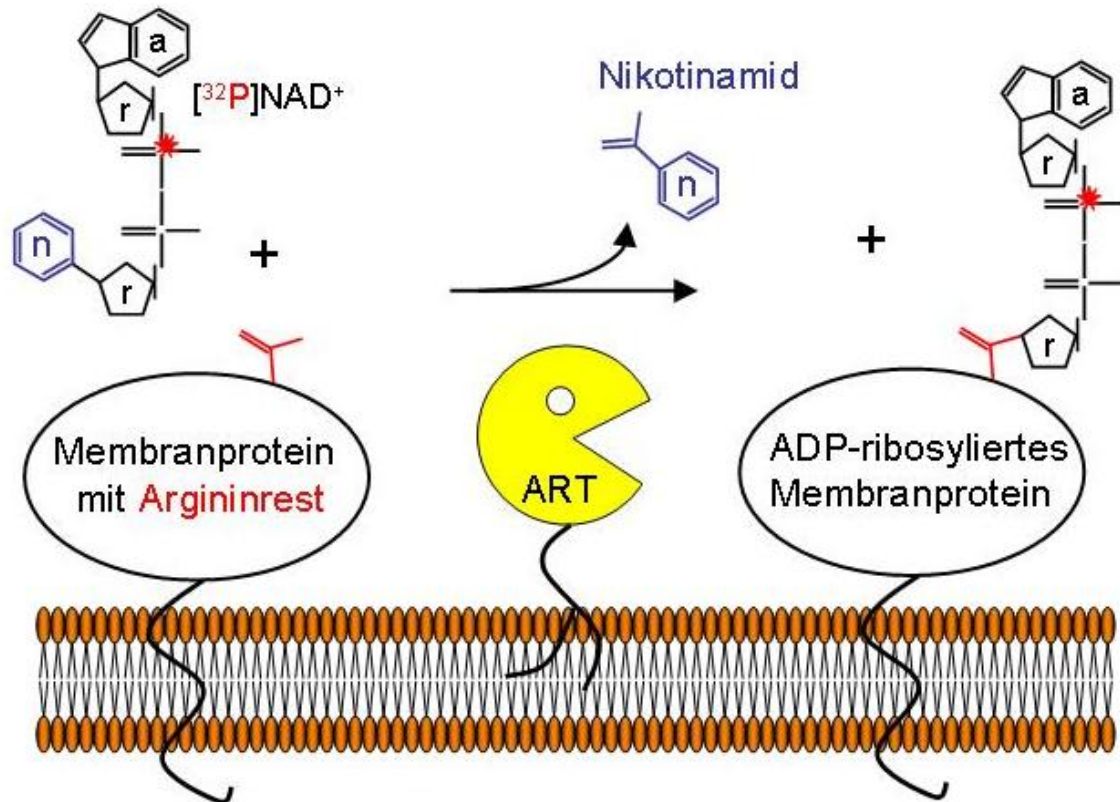


Abb. 9: ³²P-ADP-Ribosylierung von Membranproteinen. Die ART reagiert mit ihrem Substrat, dem ³²P radioaktiv markierten NAD (hier mit einem roten Stern gekennzeichnet), indem sie Nikotinamid absplattet und die weiterhin radioaktiv markierte ADP-Ribose über einen Arginin-Rest an ein Targetprotein bindet. Das radioaktiv markierte Oberflächenprotein kann mittels SDS-PAGE-Autoradiographie sichtbar gemacht werden. (Modifiziert nach: Krebs, Koestner et al. 2003).

1.3.1 Die murine ART2.2 und der NICD

Extrazelluläres NAD ruft in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, jedoch nicht in B-Zellen, den Zelltod hervor (Seman, Adriouch et al. 2003). Dieses bezeichnet man als NAD induzierten Zelltod (NICD). In vitro führt die Behandlung von T-Zellen mit Mitogenen vor der NAD-Inkubation zur relativen Resistenz gegenüber dem NICD. In der überlebenden Fraktion lässt sich eine Vermehrung der CD44^{high}, CD62L^{low} aktivierten/memory Zellen beobachten. Somit führt NAD nur in naiven Maus-T-Zellen zum Zelltod (Adriouch, Ohlrogge et al. 2001). Eine besondere Sensitivität für den NICD besitzen die CD4⁺CD25⁺ Regulator-T-Zellen, die den FoxP3 Transkriptionsfaktor exprimieren (Aswad, Kawamura et al. 2005). Andere T-Zellen sind weniger sensitiv. Bis heute ist nicht genau geklärt, wie NAD zum NICD führt. T-Zellen aus ART2.2 Knock-out Mäusen sind resistent gegenüber dem NICD (Ohlrogge, Haag et al. 2002). Obwohl

Einleitung

T-Zellen aus C57BL/6 Mäusen die ART2.2 stark exprimieren, sind diese Zellen relativ resistent gegenüber dem NICD. Somit wird ART2.2 zwar benötigt, reicht jedoch nicht allein aus zum NICD und es muss einen zusätzlichen Faktor geben (Adriouch, Ohlrogge et al. 2001). Dieser nachgeschaltete Effektor wurde als P2X7 identifiziert (Seman, Adriouch et al. 2003). P2X7-Inhibitoren wie KN-62 oder oATP verhindern den NICD. Bei T-Zellen aus der Wildtyp-Maus führt NAD wie ATP zu anderen charakteristischen Veränderungen, die typisch sind für die P2X7-Aktivierung: Ausbildung einer nichtselektiven Pore (900 Da), Externalisation von PS, CD62L-Abspaltung und Calciumaufnahme. Bei T-Zellen aus P2X7 KO Mäusen können diese Veränderungen weder durch ATP noch durch NAD ausgelöst werden (Scheuplein, Schwarz et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass P2X7 selbst in Gegenwart von ³²P-NAD durch ART2.2 ADP-ribosyliert wird (Seman, Adriouch et al. 2003). Als Ziele der ADP-Ribosylierung wurden kürzlich R125 und R133 identifiziert. Mutageneseversuche zeigten, dass nur die ADP-Ribosylierung an der Stelle 125 den P2X7 Purinrezeptor zu aktivieren vermag (Adriouch, Bannas et al. 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wird untersucht, ob und unter welchen Bedingungen P2X1 und P2X4 ebenfalls ADP-ribosyliert werden können.

Einleitung

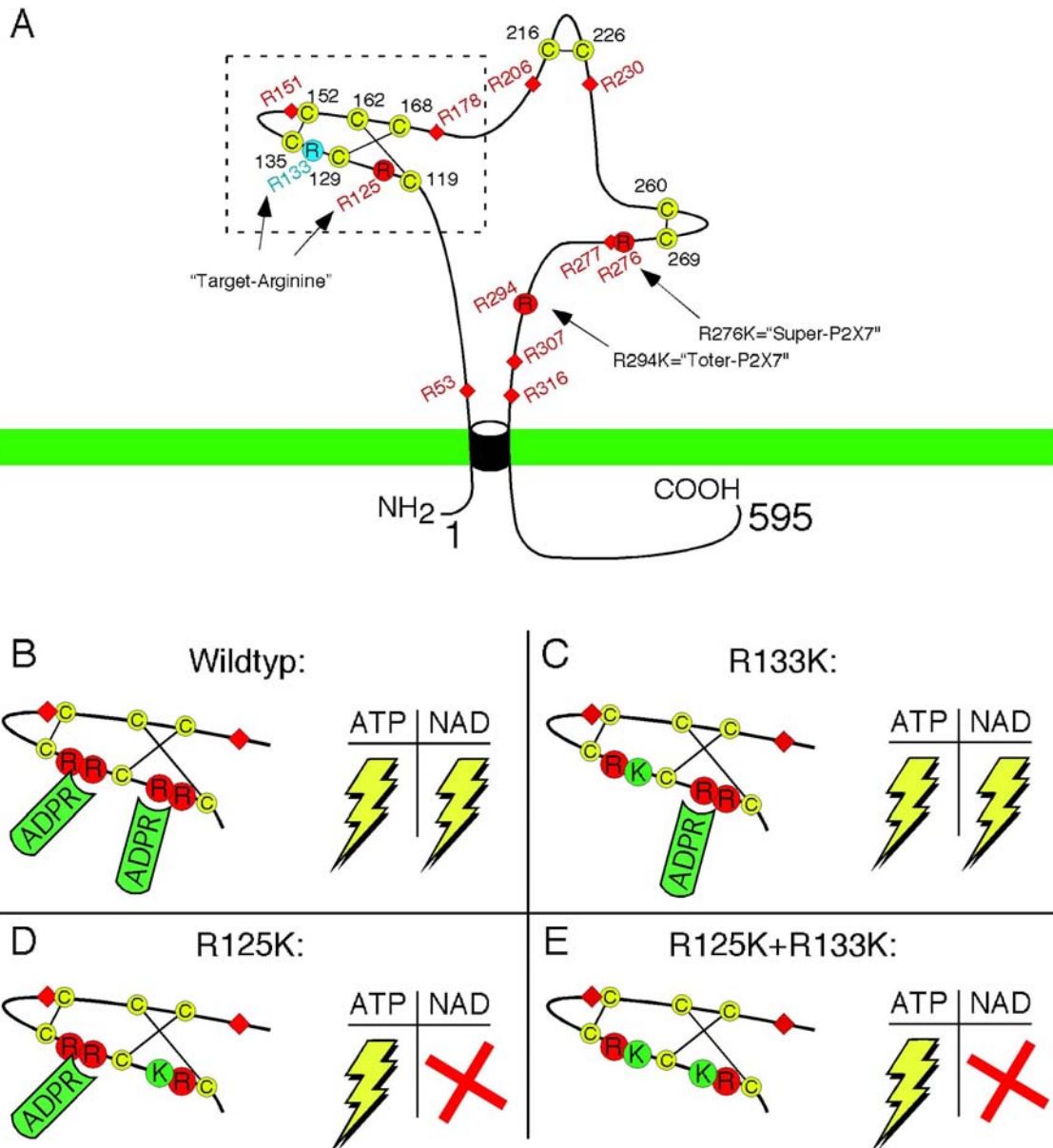


Abb. 10: Schematische Darstellung der durch die ART2.2 ADP-ribosylierten Arginine.
 (A) Schema des murinen P2X7 Purinrezeptors mit den Positionen der 11 konservierten Arginine (rot). Die Arginine, deren Mutation zu Funktionsverlust (R294K) bzw. einer stark erhöhten Empfindlichkeit führen (R276K), sind hervorgehoben. Die für die Tertiärstruktur des Proteins wichtigen ausgebildeten Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen sind zu sehen. (B-E) Vergrößerter Ausschnitt der Cystein-reichen Region von Wildtyp P2X7 (B) und partiell (C, D) bzw. (E) nicht ADP-ribosylierbaren P2X7 Mutanten. Die jeweils kovalent an R125 und/oder R133 gebundene ADP-Ribose, sowie die davon abhängige Empfindlichkeit der Mutanten gegenüber ATP und NAD sind schematisch dargestellt (Bannas 2007).

Nach der T-Zell-Aktivierung wird die ART2.2 durch die Metalloproteinase abgespalten (Kahl, Nissen et al. 2000). Diese Erkenntnis ist konform mit der Annahme, dass der NICD nur naive ruhende T-Zellen betrifft. Andere bekannte Apoptosemechanismen

Einleitung

betreffen aktivierte T-Zellen während der Ausreifungsphase im Thymus oder ausgereifte aktivierte T-Zellen. Eine wichtige Rolle in der Kontrolle der ADP-Ribosylierung auf der Oberfläche von T-Zellen spielt die CD38 NAD-Glycohydrolase, indem sie die extrazelluläre NAD-Konzentration limitiert (Krebs, Adriouch et al. 2005).

1.4 ATP und NAD als extrazelluläre Botenstoffe

NAD und ATP (**Abb. 14**) besitzen nicht nur als Metaboliten des Energiehaushaltes der Zellen Schlüsselfunktionen. Burnstock stellte 1972 erstmals die Hypothese auf, dass Purine aktiv von lebenden Zellen sezerniert werden und als Neurotransmitter fungieren (Burnstock 1972). Daraufhin haben diverse Gruppen bestätigt, dass ATP gemeinsam mit anderen Neurotransmittern aus präsynaptischen Vesikeln sog. *Purinerger Nerven* freigesetzt wird (Schwiebert and Zsembery 2003). NAD wird auf ähnliche Weise gemeinsam mit ATP oder anderen Neurotransmittern aus terminalen postganglionären Enden freigesetzt, die mit Blutgefäßen oder der Harnblase in Verbindung stehen (Smyth, Bobalova et al. 2004). Außerhalb des Nervensystems können ATP und NAD auch durch Kanalproteine wie Connexin43, welches Gap-Junction-Halbkanäle ausbildet, nach extrazellulär gelangen (Bruzzone, Guida et al. 2001; Stout, Costantin et al. 2002). Diese Kanäle öffnen typischer Weise nach mechanischem oder metabolischem Stress (Contreras, Sanchez et al. 2002; Cherian, Siller-Jackson et al. 2005). NAD und ATP als parakrine extrazelluläre Signalmoleküle bzw. Mediatoren werden somit nach Stress, Entzündung, Gewebeschäden, ect. freigesetzt. In vitro kann man die Freisetzung von Purinen mit osmotischen Schocks, mechanischem Stress oder Scherkräften forcieren. Meist führt die Erhöhung des intrazellulären Calciums zur Purinfreisetzung (Boudreault and Grygorczyk 2004; Genetos, Geist et al. 2005). Extrazelluläres ATP kann selber ebenfalls Signal zur ATP-Freisetzung durch den P2X7 sein (Pellegatti, Falzoni et al. 2005). Die lytische Zerstörung der Zellmembran, z.B. bei Entzündungsreaktionen, stellt eine dritte Möglichkeit zur Nukleotidfreisetzung dar. Diese plötzliche und massive Freisetzung von NAD und ATP dient möglicherweise als Gefahrensignal für Zellen des Immunsystems (Atarashi, Nishimura et al. 2008; Elliott, Chekeni et al. 2009). Einmal freigesetzt, können ATP und NAD enzymatisch in weitere Metabolite wie ADP, AMP oder Adenosin verwandelt werden.

Einleitung

1.4.1 Immunmodulation durch extrazelluläres NAD

NAD wird an verschiedenen Stellen in der Zelle synthetisiert (Berger, Lau et al. 2005). Unter physiologischen Bedingungen befindet sich mehr als 70% des NADs in den Mitochondrien als Metabolit. Im Zytoplasma und Kern dient es als Signalmolekül, Präkursor von Calcium freisetzenden Metaboliten und Substrat für PARPs und Sirtuine. Es steht eng mit DNA-Reparaturmechanismen, Transkriptionsregulatoren und Apoptosemechanismen in Verbindung (Di Lisa and Ziegler 2001; Herceg and Wang 2001; Haag, Adriouch et al. 2007). Unter pathophysiologischen Gesichtspunkten wie Ischämie, Oxidativ-Stress, DNA-schädigenden Agenzien, setzt die Zelle NAD aus Mitochondrien frei. Der Mechanismus ist bislang unbekannt (Herceg and Wang 2001). Die physiologische extrazelluläre NAD-Konzentration im Serum liegt bei 0,1-0,5µM (Davies, Perrett et al. 1999; O'Reilly and Niven 2003). Nach extrazellulär gelangt NAD auf unterschiedliche Weisen: bei lebenden Zellen durch Exozytose, z.B. im Rahmen der Neurotransmitterfreisetzung, sowie durch Kanalproteine, insbesondere Connexin 43 oder bei sterbenden Zellen durch mechanische Schädigung der Zellmembran (Bruzzone, Guida et al. 2001; Schwiebert and Zsembery 2003; Smyth, Bobalova et al. 2004).

Extrazelluläres NAD wird rasch durch zwei Familien von Enzymen metabolisiert. Zum einen durch CD38 und CD157, NADasen oder ADPR-Cyclasen, die auf B-Zellen, APZ und aktivierten T-Zellen vorkommen (Cockayne, Muchamuel et al. 1998; Krebs, Adriouch et al. 2005). Diese hydrolysieren NAD zu ADP-Ribose und Nikotinamid oder bilden zyklische ADPR, welche als Second messenger die intrazelluläre Calciumfreisetzung induzieren (Berthelie, Tixier et al. 1998; De Flora, Franco et al. 1998; Guse 2000). Knock-out Mäuse für CD38 zeigen reduzierte Reaktionen auf T-Zell-abhängige Antigene. Eine mögliche Ursache wäre hier die Migrationsstörung der Dendritischen Zellen (Cockayne, Muchamuel et al. 1998; Partida-Sanchez, Goodrich et al. 2004). Die zweite NAD-metabolisierende Enzymfamilie wird durch die E-NPPs gebildet, die z.B. auf Gefäßendothel vorkommen. Diese hydrolysieren NAD (ATP) zu AMP, welches von der 5' Ektonukleotidase CD73 weiter in Adenosin umgewandelt wird.

1.4.2 Immunmodulation durch extrazelluläres ATP

Eine Immunmodulation durch ATP ist sowohl auf direktem Weg als auch durch seine Metabolite möglich (la Sala, Ferrari et al. 2003; Di Virgilio 2005). ATP wird ähnlich wie

Einleitung

NAD durch lytische und nichtlytische Prozesse freigesetzt, u.a. durch Blutplättchen (Holmsen, Day et al. 1972). Extrazelluläres ATP kann durch die ecto-ATPase CD39 und verwandte Nukleotidasen (E-NTPD's) zu ADP und AMP verstoffwechselt werden. Letztere werden von CD73 zu Adenosin umgewandelt, welches wiederum über eine eigene Signalfunktion und Rezeptoren (P1 Purinrezeptoren) verfügt. Wird es nicht vorher verstoffwechselt, kann ATP im Prinzip die komplette P2X-Familie sowie eine Untergruppe der P2Y Rezeptoren aktivieren (P2Y1, 2, 11, 12, 13) (Dubyak 2003). Allerdings unterscheiden sich die Empfindlichkeiten dieser verschiedenen Rezeptoren für ATP deutlich. Die EC_{50} liegt für P2Y im nanomolaren Bereich, für die meisten P2X im niedrigen mikromolaren Bereich und für P2X7 im hohen mikromolaren Bereich (la Sala, Ferrari et al. 2003). Abhängig von Konzentration und Zelltyp kann ATP eine pro- oder eine anti-entzündliche Rolle spielen. Jüngste Untersuchungen zeigen z.B., dass von sterbenden Zellen freigesetztes ATP chemotaktisch auf Makrophagen wirkt und diese zur Phagozytose der sterbenden Zellen anregt (Elliott, Chekeni et al. 2009). Offensichtlich kann auch von der lokalen Darmflora freigesetztes ATP auf die Differenzierung von T-Zellen in der Darmmucosa wirken (Atarashi, Nishimura et al. 2008).

1.5 Herstellung von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern mittels Gene-Gun-Immunisierung

Bei der routinemäßig genutzten Peptidimmunisierung wird ein synthetisches Peptid an ein Trägerprotein gekoppelt, um die Produktion von Antikörpern zu induzieren, die gegen ein lineares Epitop gerichtet sind. Diese Antikörper, im Folgenden als α -Peptid bezeichnet, erkennen meist sehr gut das denaturierte Protein und eignen sich damit z.B. gut für Western-Blot Analysen. Zur Analyse von natürlich gefalteten Proteinen in der Tertiär- oder Quartärstruktur eignen sich die α -Peptids jedoch weniger, da lineare Epitope selten an der Oberfläche eines Proteins liegen und native Proteine von α -Peptids in der Regel nicht erkannt werden. Antikörper, die Proteine in nativer Conformation erkennen (α -Pinc), können effizient mittels DNA-Immunisierung hergestellt werden. Die Methodik der DNA-Immunisierung, sowie deren Vor- und Nachteile werden im Folgenden erläutert.

Einleitung

Bei der DNA-Immunisierung wird das jeweilige DNA-Konstrukt als Plasmid/cDNA an 1µm Goldpartikel gekoppelt und anschließend ballistisch mit einer „Gene-Gun“ in die Haut des Kaninchens, der Ratte oder der Maus geschossen, daher auch die Bezeichnung als Gene-Gun-Immunisierung (**Abb. 12**). Die Tiere erhalten 4 Immunisierungen in 3- bis 6-Wochen-Intervallen mit jeweils 8-12 Schüssen Plasmid-konjugierter Goldpartikel (1µg DNA/mg Gold/Schuss). Serumproben werden jeweils 10 Tage nach der Immunisierung gewonnen. Zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern erhalten die Tiere 3-5 Tage vor der Gewinnung des endgültigen Immunserrums eine letzte Boosterung mit transient transfizierten HEK-Zellen oder aufgereinigtem rekombinanten Protein intravenös. Die frisch präparierten Milzzellen werden mit Sp2/0 Myelomazellen fusioniert. Im anschließenden Screening werden die Überstände der wachsenden Hybridoma-Klone auf die Produktion von spezifischen Antikörpern mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse an transient transfizierten HEK-Zellen getestet (s. **Abb. 11**). Positive Klone werden weitergezüchtet, subkloniert und kryokonserviert. Die Aufreinigung der monoklonalen Antikörper aus den Kulturüberständen erfolgt mittels Affinitätschromatographie an Protein-G-Sepharose (Koch-Nolte, Glowacki et al. 2005).

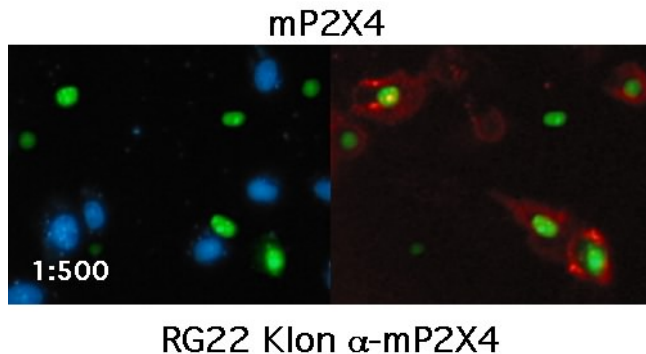


Abb. 11: Positiver Klon der Fusion RG22 α -mP2X4. Frisch präparierte Milzzellen werden mit Sp2/0 Myelomazellen fusioniert. Im anschließenden Screening werden die Überstände der Fusionszellen auf Produktion von spezifischen Antikörpern getestet. Dabei werden die Überstände auf transient transfizierte HEK-Zellen gegeben und nach Immunfärbung die positiven Klone in der Immunfluoreszenz erkannt und isoliert.

Diese Methode ermöglicht die Herstellung von Antikörpern gegen Membranproteine in natürlicher Konformation. Bei der genetischen Immunisierung wird das von der cDNA kodierte Antigen vom immunisierten Versuchstier synthetisiert und prozessiert (Tang, DeVit et al. 1992; Koch-Nolte, Duffy et al. 1999). Die induzierten Antikörper sind in der Regel gegen das nativ gefaltete Genprodukt gerichtet. Im Unterschied zu

Einleitung

Peptidantikörpern, welche nur gegen ein lineares Epitop gerichtet sind, eignen sich die durch genetische Immunisierung hergestellten Antikörper daher besonders gut für Immunzytochemie, Immunpräzipitation, Affinitätsreinigung, Durchflusszytometrie (FACS-Analysen), ELISA, Microarrays und letztendlich für diagnostische und therapeutische Anwendungen. Somit sind diese α -Pincs den α -Peptids meist überlegen bezüglich der Protein-Erkennung in Tertiär- und Quartärstruktur. Die meisten mittels DNA-Immunisierung hergestellten monoklonalen Antikörper (mAbs) reagieren sehr spezifisch mit ihrem jeweiligen Antigen. Manchmal reagieren diese mAbs auch mit dem Orthologen einer nah-verwandten Spezies, jedoch in der Regel nicht mit entfernt verwandten Paralogen innerhalb einer Spezies (Koch-Nolte, Glowacki et al. 2005). Die α -Pincs lassen sich gut nutzen, um primäre Zellen und Zelllinien auf Proteinexpression zu untersuchen.

Einleitung

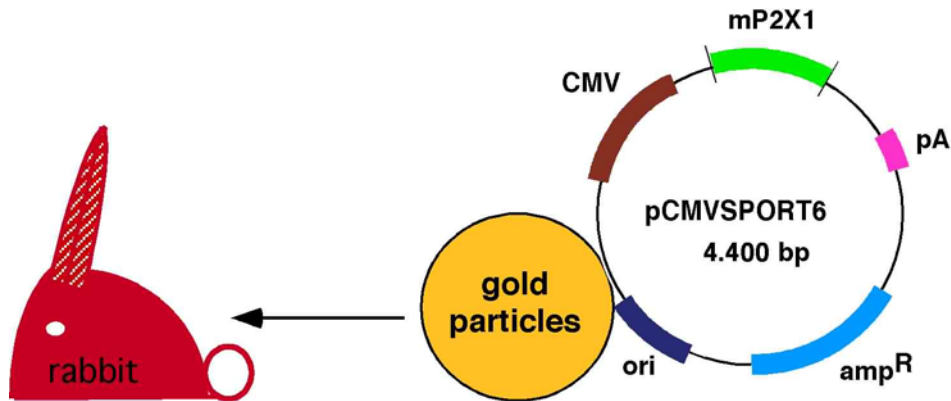


Abb. 12: Schema der Immunisierung eines Kaninchens. Die durch DNA-Immunisierung generierten Antikörper sind denen durch synthetische Peptide hergestellten Antikörpern bezüglich der Protein-Erkennung in Tertiär- und Quartärstruktur überlegen. Bei der DNA-Immunisierung wird das jeweilige DNA-Konstrukt als Plasmid an Goldpartikel gekoppelt und anschließend nach einem bestimmten Immunisierungsschema ballistisch mit einer „Gene-Gun“ in die Haut des Kaninchens geschossen, daher auch die Bezeichnung als Gene-Gun-Immunisierung. 3-5 Tage vor der Gewinnung des endgültigen Immunsereums erhalten die Tiere eine letzte Boosterung mit transient transfizierten HEK-Zellen intravenös. Diese Methode ermöglicht die Herstellung von Antikörpern gegen Membranproteine in natürlicher Conformation (α -Pinc). Hierbei handelt es sich um eine genetische Immunisierung, bei der Antikörper direkt gegen das Genprodukt gebildet werden. Im Unterschied zu Peptidantikörpern, welche nur gegen eine Peptid-Sequenz gerichtet sind, eignen sich die durch genetische Immunisierung hergestellten Antikörper besonders gut für Immunzytochemie, Immunpräzipitation, Affinitätsreinigung, Durchflusszytometrie (FACS-Analysen), ELISA, Microarrays und letztendlich für diagnostische und therapeutische Anwendungen. (modifiziert nach Kahl et al. 2003)

Die folgende **Abb. 13** listet die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten P2X spezifischen α -Pinc Immunsereen und monoklonalen Antikörper auf.

Einleitung

α -Pinc monoklonaler Antikörper aus Ratte oder Maus

Spezies Rezeptor-subtyp	Maus	Ratte	Mensch
P2X1	-	-	-
P2X4	-	-	-
P2X7	RH23 A44	# L4	L4

α -Pinc aus Ratte oder Kaninchen

Spezies Rezeptor-subtyp	Maus	Ratte	Mensch
P2X1	CR30, #9316	-	9316, #CR30
P2X4	116, CR58, RG22, RG23	-	CR29
P2X7	K1G	3428	3429

α -Peptid aus Ratte

Spezies Rezeptor-subtyp	Maus	Ratte	Mensch
P2X1, AS 364-372	# Abcam α-P2X1	Abcam α-P2X1	# Abcam α-P2X1
P2X4, AS 373-388	# Calbiochem α-P2X4	Calbiochem α-P2X4	# Calbiochem α-P2X4
P2X7, AS 576-595	# Alomone α-P2X7	Alomone α-P2X7	# Alomone α-P2X7

Abb. 13: Übersicht der verfügbaren P2X-spezifischen Antikörper. Hier aufgelistet sind die aktuell verfügbaren und in dieser Arbeit verwendeten verschiedenen Antikörper zur Analyse der Purinrezeptoren. Dabei wird zwischen α -Pinc monoklonalen Antikörpern, α -Pinc polyklonalen Immunsereen und α -Peptid unterschieden. Mit einem # versehen sind Kreuzreaktivitäten der Antikörper mit dem entsprechenden orthologen Rezeptor einer anderen Spezies.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte:

Analysewaage	Analytical Plus,	Ohaus
Autoklav	Modell 2540 EK, Varioklav	Tuttnauer H+P Labortechnik GmbH
Brutschrank/CO ₂ -Inkubator		Heraeus
Bakterienbrutschrank	B6060	Heraeus
Computer	iMac, eMac, G3, G4,	Apple
Cooler	Stratacooler	Stratagene
Digitalkamera	DP500	Olympus
Durchflusszytometer	FACScalibur	BD Biosciences
Geldokumentation	Edas290 + Kamera DC290	Kodak
Elektroporator	GenePulser mit <i>Capacitate Extender</i>	Bio-Rad
Entwicklungsmaschine	Fuji FPM 100A	Fuji Photo Film GmbH
Feinwaage	Typ 1412	Sartorius
Heizblock	Thermomixer kompakt	Eppendorf
Inkubator	Incubat	Melag
<i>Laminar air flow</i> im PCR-Labor	Gelaire Class 100	Gelman
Laufkammern für die	Modell 40-0708	PEQLAB Biotechnologie
Agarose-Gelelektrophorese	Modell B2	Owl Separation Systems
Laufkammern für die	XCell SureLock Mini-Cell	Invitrogen
Gelelektrophorese		
Magnetrührer	RCT S 26	Omnilab/ IKA-Labortechnik
Mikro-Pipetten	Typ „Research“	Eppendorf
Mikroskop	Axiovert S100	Zeiss
Mikrowellenofen	M 637 EC	Miele
PCR-Maschine	Biometra T3	Whatman Biometra
Pipettierhilfe	„Express“	Falcon/BD Biosciences
Photometer	SmartSpec 3000	Bio-Rad
Phosphoimager	Fujix BAS2000	Fuji Film
Schüttelinkubator	-	Infors
Sicherheitswerkbank	Herasafe HS12/2	Heraeus
Stickstofftank	K series	Taylor-Wharton

Material und Methoden

Spannungsgerät für die Agarose-Gelelektrophorese	Modell BI0105 LVD High Voltage Power Pack P30	Biometra
Thermocycler	TGradient	Biometra
Tischzentrifuge	Biofuge <i>pico</i>	Heraeus
Ultrazentrifuge	RC26 Plus	Sorvall
Ultrazentrifugenrotoren	SA-300 SLA-3000 SW40	Sorvall Sorvall Beckman-Coulter
Vortex	„press to mix“	Neolab
Wasserbad	Typ 1007	Gesellschaft f. Labortechnik
Wasserdeionisierungsanlage	MilliQ syntFthrombohesis Elix 10	Millipore Millipore
Zentrifuge	GS-6KR	Beckman
-80°C-Truhe	HFC 586 Basic	Heraeus

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Combitips	versch. Größen	Eppendorf
Einwegpipetten, steril	versch. Größen	Falcon/ BD Biosciences
Einwegspritzen	versch. Größen	Braun
Elektroporationsküvetten	GenePulser 0,2 cm	Bio-Rad
FACS-Röhrchen	5ml roundbottom	Falcon/ BD Biosciences
Hyperfilm ECL		Amersham-Pharmacia Biotech
Kanülen	versch. Größen	Braun
Kulturflaschen für adhärent wachsende Zellen	T25, T75	Nunc
Kulturschalen für in Suspension wachsende Zellen	10 cm, 25 cm	Greiner
Pipettenspitzen	Tipstack, versch. Größen	Sarstedt
Reaktionsgefäße	Safelock, versch. Größen	Eppendorf
Röntgenfilm	Kodak Biomax MR	Kodak Company, Connecticut (USA)
Sterilfiltrationsapparaturen	Steriflip, Stericup	Millipore
Untersuchungshandschuhe	Safeskin	Kimberly-Clark
Zentrifugenröhrchen, steril	15ml, 50ml	Falcon/ BD Biosciences

Material und Methoden

2.1.3 Mausstamm

Der Mausstamm C57BL/6H-2^b UKE Hamburg wurde von der Firma Charles Rivers (Sulzfeld) erworben und in der Tierhaltung des UKEs weitergezüchtet. Die Maus steht als P2X7 Knock-out (KO) zur Verfügung. H-2b: Knock-out Maus in der ein Teil des für den carboxyterminalen Teil des P2X7 Rezeptors kodierenden Exons mittels homologer Rekombination durch die Neomycin-Resistenzkassette ersetzt wurde; von Christopher Gabel, Pfizer Inc., Groton, Connecticut

2.1.4 Zelllinien

A20	Maus B-Lymphomzelllinie	Firma ATCC-LGC Promochem
CHO.it	Hamster Ovar-Zelllinie	AG Di Girolamo, Corda, Italien
DO11.10	Maus T-T-Hybridomzelllinie	B. Fleischer, BNI Hamburg
GM-CSF-Zellen Ag8653	Myelomzelllinie transfiziert mit cDNA für murines GM-CSF	AG Ritter, BNI Hamburg
H9	humane kutane T-Lymphomzelllinie	Firma ATCC-LGC Promochem
HEK.CS	humane Embryonale Nierenzelllinie	Firma ATCC-LGC Promochem
293T-HEK-Zelllinie	humane Nierenepithelienzellen transformiert mit Adenovirus 5 DNA	Firma ATCC-LGC Promochem
HEL	humane Erythroleukämiezelllinie	Firma ATCC-LGC Promochem
HeLa	humane Cervix-Ca-Zelllinie	Firma ATCC-LGC Promochem
J774A.1	murine Makrophagen-Zelllinie	Firma ATCC-LGC Promochem
Jurkat	humane T-Lymphomzelllinie	DSMZ
LNCAP	humane Prostata-Ca Lymphknoten-Metastasenzelllinie	Firma ATCC-LGC Promochem
MD27	Maus BALB/c T-T-Hybridomzelllinie	M. Neumaier, UKE, Hamburg
RAW 264.7	murine Makrophagen-Zelllinie	Firma ATCC-LGC Promochem
THP.1	humane AML-Zelllinie	DSMZ
YAC.HH	Maus T-Lymphomzelllinie MLV-transformiert	Firma ATCC-LGC Promochem

Material und Methoden

2.1.5 Antikörper

Antikörperbezeichnung		FACS/ IF	Immunoblot	Herkunft
Kaninchen-anti-Maus P2X1 / CR30	pAk	1:800	1:500	IFI, Hamburg
Kaninchen-anti-Human P2X1 / 9316	pAk	1:800		IFI, Hamburg
Ratte-anti-Maus P2X4 / RG22	pAk	1:800	1:500	IFI, Hamburg
Ratte-anti-Maus P2X4 / RG23	pAk	1:800	1:500	IFI, Hamburg
Kaninchen-anti-Maus P2X4 / 116	pAk	1:800	1:500	IFI, Hamburg
Kaninchen-anti-Maus P2X4 / CR58	pAk	1:400	1:500	IFI, Hamburg
Kaninchen-anti-Human P2X4 / CR29	pAk	1:800	1:500	IFI, Hamburg
Kaninchen-anti-Maus P2X7 / K1G	pAk	1:800		IFI, Hamburg
Kaninchen-anti-Ratte P2X7 / 3428	pAk	1:800		IFI, Hamburg
Kaninchen-anti-Human P2X7 / 3429	pAk	1:400		IFI, Hamburg
Ratte-anti-Maus P2X7 / RH23-A44	mAk	1:100		IFI, Hamburg
Ratte anti-MausP2X7-Alexa488 RH23-A44	mAk	1:100		IFI, Hamburg
Maus-anti-Human P2X7 / L4	mAk	1:100		Gary Buell, Pfizer
Maus-anti-etheno-Adenosin IgG2 α Alexa488 / 1G4	mAk	1:100		IFI, Hamburg
Ratte-anti-Maus ART2.1/2.2 Alexa488 / GUGU 253	mAk	1:100		IFI, Hamburg
Esel-anti-Maus IgG (H+L) F(ab)2 PE		1:100		Dianova
Esel-anti-Ratte IgG (H+L) F(ab)2 PE		1:100		Dianova
Esel-anti-Kaninchen IgG (H+L) F(ab)2 PE		1:100		Dianova
anti-Kaninchen IgG (HRP) Trueblot			1:1000	NatuTec eBioscience, Frankfurt
Esel-anti-Kaninchen (HRP)			1:5000	Amersham Biosciences, UK
Ziege-anti-Maus (HRP)			1:5000	Amersham Biosciences, UK
Kaninchen-anti-P2X1, C-Terminal (Ratte AS 364-372)		1:200	1:2000	Abcam
Kaninchen-anti-P2X4, C-Terminal (Ratte AS 373-388)		1:100	1:250	Calbiochem
Kaninchen-anti-P2X7, C-Terminal (Ratte AS 576-595)		1:200	1:1000	Alomone
Kaninchen-anti-P2X7, Extrazellulär		1:300	1:1000	Alomone

Material und Methoden

FITC, (Maus AS 136-152)

Mensch-anti-Maus CD3e APC	1:100	Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD4 APC	1:100	Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD45RB PE	1:100	Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD41 PE	1:100	Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD11b/Mac-1 PE	1:100	Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD86APC	1:100	Amersham Biosciences, UK
Ratte-anti-Maus CD25 IgG2beta PE, 3C7	1:100	Pharmingen, Heidelberg

Tabelle 1: Übersicht über alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und analysierten Antikörper unter Angabe der für die jeweilige Analyse verwendeten Verdünnungsstufen

Material und Methoden

2.1.6 Chemikalien und Lösungen

Es wurden Chemikalien der höchsten erhältlichen Reinheit benutzt und von den Firmen Boehringer Ingelheim, Merck oder Sigma bezogen.

Aqua ad iniectabilia	Baxter
Aceton, reinst	Merck, Darmstadt

2.1.6.1 Materialien für zellbiologische Arbeiten

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

Blasticidin	Invitrogen, Groningen
Carbenicillin	Serva, Heidelberg
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco BRL, Eggenstein
G418 (Geneticin)	Gibco BRL, Eggenstein
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Hamburg
1640 RPMI	Gibco BRL, Eggenstein
Hepespuffer	Gibco BRL, Eggenstein
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Natriumpyruvat	Gibco BRL, Eggenstein
Nitex-Membran (80µm)	Cadisch Precision Meshes, London, UK

2.1.6.2 Materialien für molekularbiologische Arbeiten

100 mM dNTP Set PCR Grade	Invitrogen, Karlsruhe
DNA Typing Grade Agarose	Gibco BRL, Karlsruhe
5x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
50x TAE Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (50x)	Gibco BRL
6x Loading Dye Solution	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

Enzyme:

AmpliTaq Gold™	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
----------------	--

2.1.6.3 Materialien für proteinchemische Arbeiten

NOVEX® Colloidal Blue Stain Kit	Invitrogen, Karlsruhe
ECL Western blotting detection reagents	Amersham Biosciences, Freiburg
Gel-Dry™ Drying Solution	Invitrogen, Karlsruhe

Material und Methoden

MultiMark® Multi-Colored Standard	Invitrogen, Karlsruhe
Nitrozellulose (NC)-Membran Hybond-C, 0.45 µm	Pharmacia Biotech, Freiburg
NOVEX® Colloidal Blue stain kit	Invitrogen, Karlsruhe
NOVEX® Sharp Pre-Stained Protein Standards	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Antioxidans	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® LDS Probenpuffer 4x	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® MES Laufpuffer 20x	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® MOPS Laufpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® precast Gele, 10% Bis-Tris	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® sample reducing agent (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Transferpuffer 20x	Invitrogen, Karlsruhe
Polyvinylidendifluorid-(PVDF)	Boehringer, Ingelheim
Membran ImmobilonP	
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standards	Novex, San Diego, CA (USA)

2.1.6.4 Materialien für immunologische Arbeiten

BSA	PAA, Pasching, Österreich
Propidiumjodid	Pharmingen, Hamburg
Protein-G-Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare, München
StrataClean™ Resin	Stratagene, Heidelberg

2.1.6.5 Materialien für Aktivitätsuntersuchungen

³² P-NAD	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen

2.1.6.6 Materialien für die Transformation in E.coli

LB-Agar	BD Biosciences
LB-Medium	Gibco BRL, Eggenstein
SOC-Medium	Gibco BRL, Eggenstein

2.1.7 Enzyme

Eco R1 (20.000U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt
Nhe1 (10.000U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt
Not1 (10.000U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt
Sca1 (10.000U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt
Ssp1 (5.000U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt

Material und Methoden

Für Einzelverdau wurden die Enzyme in den mitgelieferten Puffern eingesetzt. Doppelverdau wurden entsprechend der Empfehlungen von New England Biolabs (NEB 2002) durchgeführt. Falls erforderlich wurde gereinigtes bovines Serumalbumin in der Konzentration 100µg/ml zugesetzt.

PFU-Turbo DNA-Polymerase	Stratagene, Amsterdam (Niederlande)
Platinum Blue DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
T4-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.8 Primer

2.1.8.1 P2X-Mutageneseprimer

Primer	Verwendung
CMV-F	Sequenzierung
mP2X1EX122RR for	Mutation des mP2X1 5'-GTGCAGAGAACCCAcgacgaGGTGGCATATGCCAAG-3'
mP2X1EX122RR rev	Mutation des mP2X1 5'-CTTGGCATATGCCACctcgtcgTGGTCTCTGCAC-3'
hP2X1EX122RR for	Mutation des hP2X1 5'-CTGCGCAGAGCACCCAcgacgaGGGGGCATATGCAAG-3'
hP2X1EX122RR rev	Mutation des hP2X1 5'-CTTGCATATGCCCCctcgtcgTGGTGCTCTGCGCAG-3'
mP2X4DK121RR for	Mutation des mP2X4 5'-GTCCAGAGATTCTcgtcggACCAGCATTGCGATTC-3'
mP2X4DK121RR rev	Mutation des mP2X4 5'-GAATCGCAAATGCTGGTccgacgAGGAATCTCTGGAC-3'
hP2X4DA121RR for	Mutation des hP2X4 5'-GCCCCGAGATTCCAcgtcggACCACTGTGTGTAATC-3'
hP2X4DA121RR rev	Mutation des hP2X4 5'-GATTTACACACAGTGGTccgacgTGAATCTCGGGGC-3'
hP2X4A122R for	Mutation des hP2X4 5'-CCCAGATTCCAGATcggACCACTGTGTGTAATC-3'
hP2X4A122R rev	Mutation des hP2X4 5'-GATTTACACACAGTGGTccgATCTGGAATCTCGGG-3'
mP2X7R133K for	Mutation des mP2X7 und mP2X7 RR124KK 5'-CAGTGCTCTTCTGACaagCGTTGTAAAAAGGG-3'
mP2X7R133K rev	Mutation des mP2X7 und mP2X7 RR124KK 5'-CCCTTTTACAACGcttGTCAGAAGAGCACTG-3'
mP2X7R134K for	Mutation des mP2X7 und mP2X7 RR124KK 5'-CTCTTCTGACCGGaaGTGTA AAAAGGGGTGG3'
mP2X7R134K rev	Mutation des mP2X7 und mP2X7 RR124KK 5'-CCACCCCTTTTACActtCCGGTCAGAAGAG-3'
mP2X7RR133KK for	Mutation des mP2X7 und mP2X7 RR124KK 5'-CAGTGCTCTTCTGACaagaagTGTA AAAAGGGGTG-3'
mP2X7RR133KK rev	Mutation des mP2X7 und mP2X7 RR124KK 5'-CACCCCTTTTACActtcttGTCAGAAGAGCACTG-3'
hP2X7R125K for	5'-CCGAGTATCCCACCaaaAGGACGCTCTGTTCC-3'

Material und Methoden

hP2X7R125K rev	5´ - GGAACAGAGCGTCCTtttGGTGGGATACTCGG - 3´
hP2X7R126K for	5´ - GAGTATCCCACCCGCaagACGCTCTGTTCTCTG - 3´
hP2X7R126K rev	5´ - CAGAGGAACAGAGCGTcttGCGGGTGGGATACTC - 3´
hP2X7RR125KK for	5´ - CCCGAGTATCCCACCaagaagACGCTCTGTTCTCTG - 3´
hP2X7RR125KK rev	5´ - CAGAGGAACAGAGCGTcttcttGGTGGGATACTCGGG - 3´
hP2X7R133K for	Mutation des hP2X7 5´ - CTCTGTTCTCTGACaaaGGTTGTAAAAAGGG - 3´
hP2X7R133K rev	Mutation des hP2X7 5´ - CCCTTTTACAACcttGTCAGAGGAACAGAG - 3´
x123R for	Mutation des mP2X1 5´ - GAGACCCAGAAcgtGGTGGCATATGCCAAG - 3´
x123R rev	Mutation des mP2X1 5´ - CTTGGCATATGCCACCacgTTCTGGGTTCTC - 3´

Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer zur Mutagenese

2.1.9 Plasmide

Expressionsvektoren mit vollständigen offenen Leserastern für P2X Familienmitglieder wurden entweder von der „mammalian gene collection“ (www.mgc.nih.nlm.gov) erworben oder von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt (s. **Tabelle 3**). Expressionsvektoren für Maus ART2.2 und für ein Fusionsprotein aus green fluorescent protein (GFP) und der Transaktivierenden Domäne des Transkriptionsfaktors „lung krüppel-like-factor“ (LKLF) wurden in der eigenen Arbeitsgruppe hergestellt (Koch-Nolte, 1999 II; Diessenbacher, 2003).

Vektor	Genbank accession number	insert size	Herkunft
pCMV-SPORT6-hP2X4	BC033826	1.824 bp	Mammalian gene collection
pCMV-SPORT6-hP2X1	BC044657	2.671 bp	mammalian gene collection
pCMV-SPORT6-mP2X1	BC015084	2.489 bp	mammalian gene collection
pcDNA3-mP2X4			Francois Rassendren,

Material und Methoden

			Montpellier
pcDNA6-mP2X1			s. diese Arbeit
pcDNA6-hP2X1			s. diese Arbeit
pcDNA6-hP2X4			s. diese Arbeit
pcDNA6-mP2X7			Sahil Adriouch, Rouen
pcDNA6-rP2X7			Sahil Adriouch, Rouen
pcDNA6-hP2X7			James Wiley, Sydney
pcDNA6-mP2X1 EX122RR			s. diese Arbeit
pcDNA6-hP2X1 EX122RR			s. diese Arbeit
pcDNA3-mP2X4 DK121RR			s. diese Arbeit
pcDNA6-hP2X4 DA121RR			s. diese Arbeit
pcDNA6-mP2X7 RR124KK + RR133KK			s. diese Arbeit
pcDNA6-mP2X7 RR133KK			s. diese Arbeit

Tabelle 3: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Expressionsvektoren

Material und Methoden

2.1.10 Puffer und Medien

2.1.10.1 Zellkulturmedien:

Die für die Medien verwendeten Zusätze werden sterilfiltriert (Porengröße 0,22µm).

Fötales Kälberserum (FCS) und Pferdeserum werden vor der Verwendung zur Inaktivierung von Komplementfaktoren für 30 min bei 56°C erhitzt.

Kulturmedium:

RPMI Komplettmedium für Lymphomzellen und Hybridomzellen:

RPMI 1640, 10% (v/v) FCS, 2mM Glutamin, 1mM Natriumpyruvat

DMEM Komplettmedium für adhären wachsende Zellen:

DMEM, 10% (v/v) FCS, 2mM Glutamin, 1mM Natriumpyruvat, 100mM, HEPES, 1x nicht-essenziellen Aminosäuren (MEM)

BMDC-Medium:

RPMI 1640, 10% (v/v) FCS, 10 bis 20% (v/v) GM-CSF Überstand, 2mM Glutamin, 1mM Natriumpyruvat, 50µM β-Mercaptoethanol, Gentamycin

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

Zusätze: Gentamycin, 50mg/ml (Gibco BRL), Geneticin, 50mg/ml (Gibco BRL), murines M-CSF der Firma PeproTech GmbH (Hamburg)

Das Waschen/Ablösen adhärenter Zellen erfolgte mit PBS (Gibco BRL), Trypsin (Biochrom).

2.1.10.2 Transiente Transfektion

JetPEI-Reagenz der Firma Polyplus Transfection, Illkirch, Frankreich wurde zur transienten Transfektion von CHO-Zellen und HEK-Zellen verwendet. Benötigter Zusatz: Isotone Natriumchloridlösung, 154mM (Braun).

2.1.10.3 Puffer

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

PBS: 2,67mM Kaliumchlorid, 1,47mM Kaliumdihydrogenphosphat, 138mM Natriumchlorid, 8mM Di-Natriumhydrogenphosphat

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

NaCl-Puffer: 140mM Natriumchlorid, 5mM Kaliumchlorid, 10mM Glucose, 10mM HEPES

SDS-PAGE und Western blot:

MOPS-Puffer: 50mM MOPS, 50mM TrisBase, 3.5mM SDS, 1mM EDTA, pH 7.7

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

Material und Methoden

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

Blotpuffer: 50ml 20x Transferpuffer, 100ml Methanol, 1ml Antioxidans (evtl.) ad 1 l H₂O

1xTBS: 8g Natriumchlorid, 0.2g Kaliumchlorid, 3g TrisBase, pH 7.4

TBS-T: 0,05% (v/v) Tween-20, in TBS

Blocklösung: 1xTBS, 10% Ziegen Serum oder 1% Milchpulver

Antikörperverdünnungslösung: 1xTBS, 10% Ziegen Serum oder 5% Milchpulver, 20% Tween 20

Waschlösung: 1xTBS, 0.5% Tween 20

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

2.1.10.4 Isolierung von Plasmid-DNA

„QIAprep Spin Miniprep Kit“ oder „Qiagen Endofree Plasmid Maxiprep Kit“

Puffer P1: 50mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase A

Puffer P2: 200mM NaOH, 1% SDS

Puffer P3: 3M K-Acetat pH 5.5

Waschpuffer PB

Waschpuffer PE

Elutionspuffer EB: 10mM Tris-HCl

2.1.10.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Puffer QG

Waschpuffer PE

Elutionspuffer EB: 10mM Tris-HCl

2.1.11 ART2 Substrate, Agonist und Inhibitor von P2X7

Als Substrate für die ART2.2-vermittelte ADP-Ribosylierung wurden NAD und das NAD-Analogon 6'-etheno-NAD in den jeweils angegebenen Konzentrationen verwendet. Als direkter Agonist des P2X7 Rezeptors wurde ATP in den angegebenen Konzentrationen benutzt. In **Abb. 14** sind die Strukturformeln dieser Moleküle dargestellt.

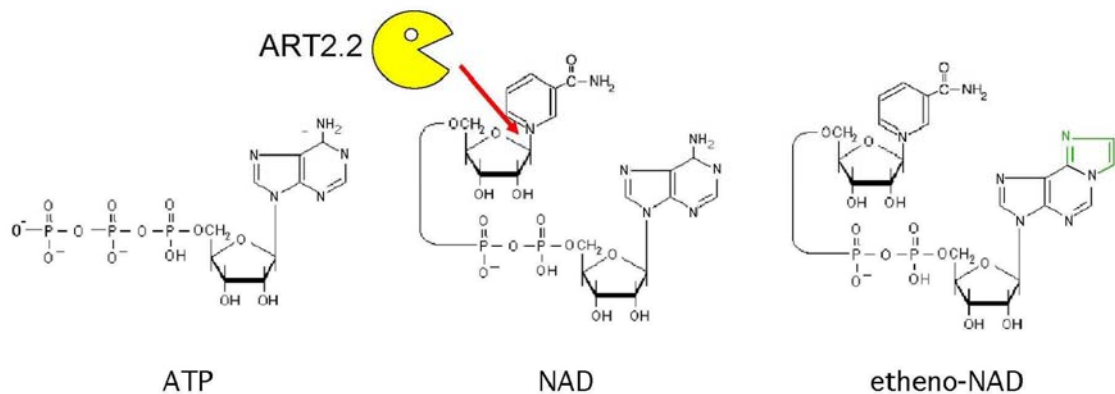


Abb. 14: Strukturformeln von NAD, etheno-NAD und ATP. NAD und 6'-etheno-NAD (eNAD) dienen beide als Substrat für ADP-Ribosyltransferasen. ATP ist ein Agonist für den P2X7 Purinrezeptor. Es ist die Angriffsstelle der ADP-Ribosyltransferase (ART2.2) dargestellt (roter Pfeil).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kryokonservierung von eukaryontischen Zellen

Die Kryokonservierung dient der langfristigen Lagerung von Zellen. Zellen mit einer mittleren Wachstumsdichte (etwa 50% konfluent) werden in vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert und anschließend in einem Kryoröhrchen bei -80°C in der Gefriertruhe für mindestens 24 Stunden langsam eingefroren. Anschließend werden sie in den Stickstofftank überführt und dort dauerhaft aufbewahrt. Für adhären wachsende Zellen verwendet man Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), für Suspensionszellen RPMI-Medium mit 20% fötalem Kälberserum und 10% DMSO. Dabei verhindert Dimethylsulfoxid die schnelle Bildung von Eiskristallen in der Zelle und damit deren Untergang. DMSO selbst ist allerdings toxisch für die Zellen, weshalb das Einfrieren in direktem Anschluss an die Zugabe von DMSO erfolgen sollte. Bei Bedarf können die Zellen jederzeit wieder aufgetaut und kultiviert werden. Hierfür wärmt man 1ml kryokonservierte Zellsuspension in der Hand an und gibt sie dann möglichst schnell in das vorgewärmte Medium. Zusätzlich kann man direkt eine 1:10 Verdünnung in einer gesonderten Zellkulturschale anlegen. Selektionszusätze wie Blasticidin (P2X-Expression) oder Geneticin (ART2-Expression) können nach ca. 24 Stunden zugegeben werden.

Material und Methoden

2.2.1.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Alle Schritte der Zellkultur werden unter sterilen Laminar-Flow-Bedingungen durchgeführt. Die Zellen werden jeweils in 10ml Kulturmedium auf einer 10cm Zellkulturschale bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank gelagert. Etwa alle 3 Tage haben die Zellen eine Konfluenz von 80% erreicht und müssen geteilt werden. Dieses erkennt man an der Färbung des Mediums, bei Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop und nach Auszählung in der Neubauer-Zählkammer. Abhängig vom Wachstum wird meist eine 1:10 Verdünnung der Zellsuspension mit Kulturmedium vorgenommen. Vor der Verwendung für Experimente werden die Zellen mit RPMI oder PBS gewaschen und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.1.3 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Adhärenente Zellen wachsen an der Bodenfläche von T25- oder T75-Flaschen in 5 bzw. 10ml DMEM-komplett Medium fest. Abhängig vom Wachstum werden sie alle 2 bis 3 Tage im Verhältnis 1:5, 1:10 oder 1:20 passagiert. Hierzu wird zunächst das Medium aus der Flasche verworfen und die fest an der Flasche haftenden Zellen werden mit PBS gewaschen, um die für den folgenden Schritt störenden FCS-Rückstände zu entfernen. Um die Zellen von dem Flaschenboden zu lösen, werden 1 oder 2ml (T25- bzw. T75-Flasche) der Protease Trypsin vorsichtig den Zellen zugefügt. Nach 3-6 min lösen sich die Zellen und werden mit 5ml DMEM-komplett Medium in 15ml FALCON Röhrchen überführt. Die Zellen werden bei 4°C und 4600rpm 5 min in der Zentrifuge pelletiert. Anschließend wird der Überstand verworfen, das Zellpellet mit Medium resuspendiert und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nun können die Zellen für Experimente verwendet oder in der gewünschten Verdünnung in einem Volumen von 5ml oder 10ml ausplattiert und weiterkultiviert werden.

2.2.1.4 Herstellung GM-CSF-haltiger Überstände

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

Material und Methoden

2.2.1.5 Präparation von Lymphozyten aus Lymphknoten

Mäuse im Alter von 8-12 Wochen werden mit einem 30% O₂ / 70% CO₂ Gasmisch betäubt und anschließend mit 100% CO₂ getötet. Nach Präparation der zervikalen, axillären, inguinalen, mesenterialen und lumbalen Lymphknoten werden diese bis zur Weiterverarbeitung in eiskaltem RPMI auf Petrischalen gelagert. Mit Hilfe einer NITEX-Membran werden die Zellen aus dem Zellverband gelöst. Hierbei legt man die Lymphknoten zwischen zwei Membranen und zerdrückt diese mit einer Pinzette. Durch das feinmaschige Gewebe werden die Lymphozyten in das Medium freigesetzt, während die Membran Lymphknotenhülle und -bindegewebe zurückhält. Die Zellen werden mehrfach bei 4°C in Kulturmedium gewaschen und nach Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer für Versuche eingesetzt.

2.2.1.6 Präparation von murinen Knochenmarkszellen

Aus 8-12 Wochen alten, getöteten Mäusen werden die langen Röhrenknochen wie Femur und Humerus entnommen. Die Knochen werden kurz in 70%igem Ethanol sterilisiert, die Knochenenden abgeschnitten und mit einer feinen Spritze mit RPMI 1640-Medium vorsichtig mehrmals durchgespült und die Spüllösung in einer 35 mm Petrischale mit eiskaltem RPMI aufgefangen. Nach mehrmaligem Waschen mit eiskaltem RPMI werden die Zellen nach Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer für Experimente eingesetzt.

2.2.1.7 Differenzierung von Knochenmarkszellen zu dendritischen Zellen (BMDCs)

Ein Teil der Knochenmarkszellen wird zur Isolierung der Dendritischen Zellen auf Petrischalen in RPMI kultiviert und zusätzlich nach einem Tagesschema mit 20ng/ml GM-CSF behandelt. Nach 8 Tagen Behandlung mit GM-CSF haben sich sog. BMDC gebildet (Bone marrow derived dendritic cells), die ebenfalls für Experimente zur Verfügung stehen. Hierfür werden 2×10^6 Zellen in BMDC-Medium resuspendiert und in einem Gesamtvolumen von 10ml auf einer 10-cm-Petrischale ausplattiert. Am 3. Tag erfolgt die Zugabe von weiteren 10ml BMDC-Medium, am 6. Tag werden 10ml des Mediums durch 10ml frisches Medium ersetzt. Für Versuche werden die löslichen Zellen verwendet, die zu 65 bis 80% CD11c-positiv sind.

Material und Methoden

2.2.1.8 Isolierung von Thrombozyten aus Mäuseblut

30 Wochen alten Mäusen wird retroorbital je 100µl Blut entnommen und in Heparinröhrchen gelagert. Das Heparinblut wird 10min bei 1400rpm zentrifugiert. Die Thrombozyten befinden sich nun im Überstand, dem Blutplasma, und können für Experimente verwendet werden.

2.2.1.9 Transiente Transfektion von HEK-T und CHO.it-Zellen

Bei den CHO- und HEK-Zellen handelt es sich um adhärent wachsende Zellen. Für eine Transfektion sollten die Zellen 50% konfluent gewachsen sein. Pro Transfektion einer T25-Flasche mit 2×10^6 Zellen werden je 5µg Plasmid-DNA und 10µl JetPEI-Reagenz eingesetzt. Zur optischen Positivkontrolle der transienten Transfektion werden zusätzlich 0,5µg Plasmid-DNA des für eGFP kodierenden Konstrukts verwendet. eGFP ist ein grün fluoreszierendes Protein, das speziell die Zellkerne anfärbt. Zunächst werden die DNA und die JetPEI-Reagenz einzeln in jeweils 250µl NaCl durch wiederholtes Vortexen aufgelöst. Anschließend wird die JetPEI-Lösung zu der DNA-Lösung zugegeben, erneut gevortext und für 30 Minuten bei RT inkubiert (**Abb. 15**). In der Zwischenzeit wird das Medium in den Zellkulturflaschen gewechselt und anschließend die JetPEI-DNA-Lösung zu den Zellen zugegeben.

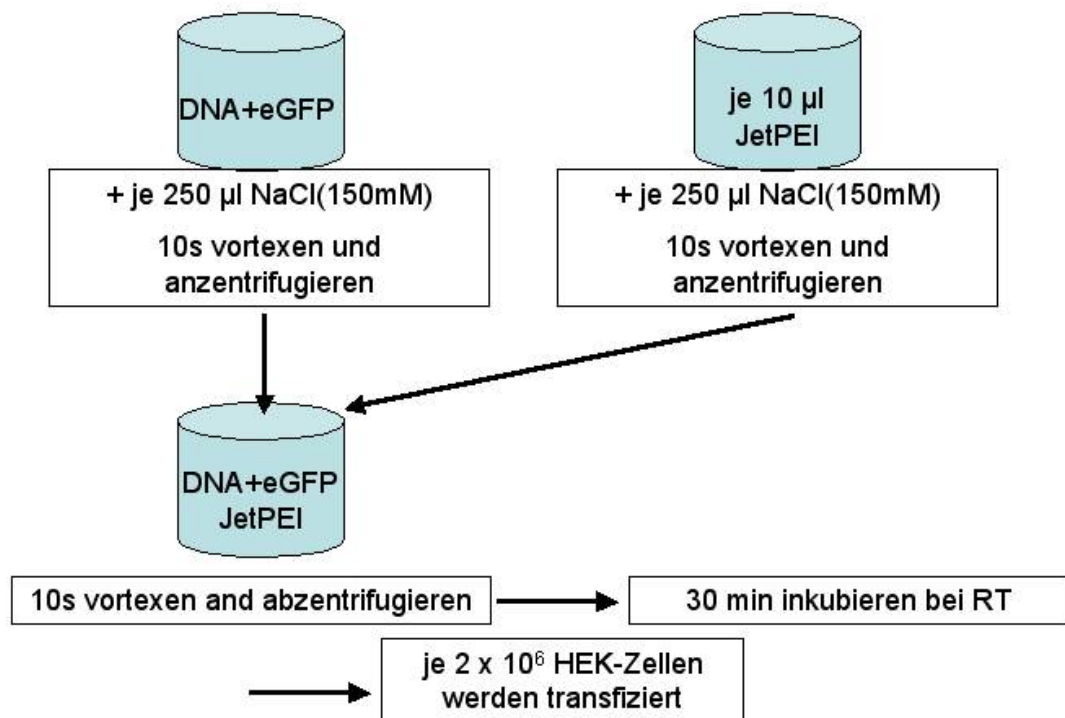


Abb. 15: Schema der JetPEI Transfektion. Diese Methode kann sowohl zur transienten als auch zur stabilen Transfektion verwendet werden.

2.2.1.10 Stabile Transfektion von CHO.NOD-Zellen mit dem P2X Purinrezeptor

Für die Herstellung von Doppeltransfektanten, die sowohl einen Purinrezeptor als auch die ADP-Ribosyltransferase ART2.2 (NOD) an ihrer Zelloberfläche exprimieren, werden bereits hergestellte stabile Transfektanten für die ART2.2, nämlich CHO.NOD-Zellen, verwendet. Um den Anteil der tatsächlich transfizierten Zellen zu steigern, wird zuvor eine Linearisierung der Plasmid-DNA vorgenommen (siehe 2.2.2.12). Lineare DNA wird leichter in Zellen und deren Nukleus aufgenommen, wodurch die Rate an Purinrezeptor exprimierenden Zellen erhöht wird. Unter Verwendung der JetPEI-Transfektionsmethode werden je 2×10^6 Zellen mit $5 \mu\text{g}$ linearisierter plus $2,5 \mu\text{g}$ ringförmiger Plasmid-DNA transfiziert. Am zweiten Tag nach der Transfektion werden die Zellen auf die Expression des jeweiligen Purinrezeptors im FACS untersucht. Bis zu diesem Zeitpunkt besteht kein Unterschied zu einer transienten Transfektion der Zellen. Transient transfizierte Zellen verlieren ihre Expressionsfähigkeit früher oder später

Material und Methoden

wieder, bzw. es erhöht sich der Anteil der negativen Zellen an der Population kontinuierlich, so dass die positiven Transfektanten verdrängt werden. Um den Anteil der positiven Zellen zu erhöhen, werden die Zellen mit dem Easy Sep System sortiert (2.2.3.4). Diejenigen Transfektanten, deren Vektor eine Blasticidin-Resistenz aufweist, werden ab dem zweiten Tag post Transfektion mit einer 1:1000 verdünnten Blasticidin-Konzentration im Kultur-Medium selektioniert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde je nach erwarteter DNA-Ausbeute mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (für DNA-Mengen bis 20µg) oder dem „Qiagen Endofree Plasmid Maxiprep Kit“ aus transformierten *E.Coli* Bakterien gewonnen. Die Anweisungen des Herstellers wurden dabei beachtet. Bei der Minipräparation von Plasmid-DNA werden kleine Mengen Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen isoliert. Dafür wird jeweils eine Einzelkolonie eines Transformationsansatzes von der Agarplatte gepickt und in 5ml LB-Medium und dem entsprechenden Antibiotikum aufgenommen. Die Bakterienklone wurden über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert und am nächsten Morgen wurde die Plasmid-DNA isoliert. Im Prinzip erfolgt bei der Präparation eine alkalische Lyse der Bakterien mit anschließender Fällung von Proteinen und proteinassoziierter genomischer DNA. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wird in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen selektiv an eine Silikatmembran gebunden. Nach zwei Waschschrritten wird die DNA von der Membran mit 50µl Wasser eluiert.

Die Maxipräparation von Plasmid-DNA dient hingegen der Isolierung von größeren Mengen Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen. Hier werden die gepickten Bakterienklone für 6 Stunden im Schüttelinkubator bei 37°C vorkultiviert. Anschließend wird die Hälfte dieser Vorkultur in 100ml LB-Medium zusammen mit dem Antibiotikum als Übernachtskultur in einem 500ml Erlenmeyerkolben im Schüttelinkubator bei 220rpm und 37°C angelegt. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt am nächsten Morgen. Das Prinzip ähnelt dem der Mini-Präparation, allerdings wird hier die im Überstand befindliche Plasmid-DNA an eine Anionen-Austauschersäule gebunden, gewaschen, eluiert und mit Isopropanol ausgefällt. Das DNA-Pellet wird daraufhin mit 70%igem Ethanol gewaschen und in Tris-EDTA-Puffer

Material und Methoden

aufgenommen. Die DNA-Konzentration der Maxipräparation kann dann mittels UV-Photometrie gemessen werden.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Nukleinsäuremengen in Lösungen lassen sich mittels UV-Photometrie bestimmen, da diese ultraviolette Strahlung absorbieren. Die Extinktion misst man mit einer Quarzküvette unter Einbezug des molaren Extinktionsfaktors bei einer Wellenlänge von 260nm. Dieses Verfahren ist für die DNA-Konzentrationsbestimmung allerdings nur einsetzbar, wenn RNA oder Nukleotide vernachlässigbar gering in der zu messenden Lösung enthalten sind. Die Aliquots der zu messenden Plasmidlösungen werden 1:100 verdünnt und davon 100µl in einer Quarzküvette gemessen. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors $V = 100$ und des Multiplikationsfaktors $F = 50$ für doppelsträngige DNA wird mit der Formel $c[\mu\text{g/ml}] = OD_{260} * V * F$ die Nukleinsäure-Konzentration der Lösung berechnet.

2.2.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist ein etabliertes *in vitro*-Verfahren zur Amplifikation von DNA-Segmenten. Unbekannte DNA-Templates können allein über die Kenntnis der flankierenden Sequenz amplifiziert werden. Hierzu werden zwei kurze Oligonukleotide synthetisiert, die je komplementär zu der 5'-gelegenen bekannten flankierenden Sequenz sind. Liegt die DNA als Einzelstrang vor, können diese zwei so genannten *Primer* als Vorwärts- und Rückwärtsprimer an jeweils einen DNA-Strang thermisch hybridisieren. Eine temperaturstabile DNA-Polymerase verlängert die Primer und in weiteren Denaturierungs- und Polymerationszyklen mit Erwärmen und Abkühlen des Reaktionsgemisches wird so die Sequenz zwischen den Primern exponentiell amplifiziert. Diese Amplifikationsreaktion läuft kontrolliert in einem Temperaturwechselgerät, dem so genannten *Thermocycler* ab. Die Polymerasen werden nach erwarteter Fragmentlänge und Fehlerrate der Polymerase ausgewählt. Die Entdeckung der thermostabilen DNA-Polymerasen, welche hohen Denaturierungstemperaturen mit ausreichend langen Halbwertszeiten standhalten, ermöglicht die Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion ohne den Einsatz eines hitzeinaktivierten Enzyms. Für die Mutagenese-PCR kam die *Pfu* DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Stratagene) zum Einsatz. Diese DNA-Polymerase besitzt die Fähigkeit der Fehlerkorrektur durch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität und kann so

Material und Methoden

unerwünschte Mutationen während der Amplifikation minimieren. Abhängig von der Länge der Primer und dem GC-Gehalt der Sequenz werden optimale Schmelztemperaturen gewählt. Der Gehalt an Guanosin- und Cytosinresten der Primer erhöht dabei die Schmelztemperatur. Dagegen haben kurze, adenosin- und thymidinreiche Primer und solche mit Fehlpaarungen eine niedrigere Schmelztemperatur. Die Temperatur während des Hybridisierungsvorganges ist äußerst wichtig, da die Stabilität der Basenpaarung zwischen Primer und Template-DNA eine Funktion der Temperatur ist.

2.2.2.4 Zielgerichtete Mutagenese

Bestimmte Arginine des P2X7 Purinrezeptors werden an den einzelnen Positionen durch „side-directed mutagenesis“ zu Lysin mutiert. Umgekehrt werden Aminosäuren der P2X1 und P2X4 Purinrezeptoren zu Argininen mutiert. Hierfür werden Mutationsprimer in beide Richtungen synthetisiert, die jeweils komplementär zu der Region des jeweiligen Arginins sind. Bei der Generierung der Primer wird das für Arginin kodierende Basentriplett (AGG, AGA, CGA, CGG, CGC oder CGT) in ein für Lysin kodierendes Triplett umgewandelt (AAG oder AAA). Mit diesen Primerpaaren und dem pcDNA6.1-P2X7 Vektor als Matrize wird die PCR durchgeführt. Die PCR-Ansätze für die Mutation wird wie in **Tabelle 4** angesetzt. Anschließend lässt man das PCR-Produkt mit *Dpn* I verdauen. Dieses Enzym schneidet nur methylierte DNA, wodurch die Matrizen-Vektoren und andere nicht mutierte dsDNA entfernt werden können. Mit der DNA können kompetente E.Coli transformiert und ausplattiert werden. Am nächsten Tag werden vier Kolonien gepickt und eine DNA-Mini-Prep laut Herstellerprotokoll (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die DNA wird sequenziert und ein Aliquot kryokonserviert. Nach der Überprüfung der erfolgreichen Mutation werden DNA-Maxi-Preps laut Herstellerprotokoll (Qiagen, Hilden) aus den Kryo-Stocks angefertigt und für die Transfektion von HEK.T-Zellen für die Versuche eingesetzt.

Material und Methoden

Bestandteil	Menge	Anmerkung	
demineralisiertes Wasser		Auffüllen auf insgesamt 50µl	
<i>Pfu</i> PCR-Puffer (10x)	5µl		
dNTP-Mix je 10mM	1µl		
Vorwärtsprimer	1,25µl		
Rückwärtsprimer	1,25µl		
<i>Pfu</i> -Polymerase	1µl		2,5 Units
DNA-Templates	5ng und 50ng		der 1:100 und 1:000 verdünnten Plasmid-Lösung

Tabelle 4: Zusammensetzung der PCR-Klonierungsansätze

Temperatur	Zeit	Zyklus
95°C	30 sek.	1
95°C	30 sek.	2-17
55°C	1 min	2-17
68°C	7 min	2-17
4°C	Ende	1

Tabelle 5: PCR-Programm für die Amplifikation der zu klonierenden DNA-Fragmente

2.2.2.5 E.coli Transformation

Für die Transformation von Vektoren mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ werden superkompetente XL2 blue-Zellen oder XL10 Gold ultrakompetent-Zellen (Stratagene) verwendet. Bei der Transformation wird ein Hitzeschock-Verfahren durchgeführt. Nach dem Auftauen von 120µl Zellen werden 3µl β-Mercaptoethanol-Mix zugegeben und die Zellen für 10 Minuten auf Eis inkubiert, um die Transformationseffizienz zu erhöhen. Hierbei lagert sich die Plasmid-DNA an die Bakterien an. Anschließend wird ca. 1µg DNA zu den Zellen gegeben und die Zellen werden für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wird im Wasserbad bei 54°C für 60 Sekunden durchgeführt. Dieser führt zur Porenbildung in der Bakterienhülle, durch welche die Plasmid-DNA in einige Bakterienzellen eindringt. Im Anschluss werden die Zellen nochmal für 2 Minuten auf Eis gehalten. Dadurch wird die Transformationseffizienz gesteigert, da die Membranfluidität gesenkt wird und die entstandenen Poren länger bestehen bleiben. Anschließend wird 500µl 42°C warmes SOC-Medium zu den Zellen gegeben, um die Produktion der von den Antibiotika-Resistenzgenen kodierten Proteine zu ermöglichen. Die Zellen werden dann für 1 Stunde bei 37°C in einem Schüttelinkubator mit 250rpm gehalten und anschließend auf je 100µl auf vorgewärmte LB-Platten mit Carbenicillin

Material und Methoden

ausplattiert, um die transformierten Zellen zu selektieren. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2.6 DNA-Sequenzierung

Die mutierten P2X-Sequenzen werden sequenziert, um sicher zu gehen, dass bei der PCR-Amplifikation keine ungewollten Mutationen entstanden sind. Die Sequenzierung erfolgt nach der Didesoxy-Methode (Sanger, Coulson et al. 1980). Es wird das BigDye Terminator Sequenzierungskit verwendet. Ca. 500ng DNA und die entsprechenden Primer werden verwendet.

Sequenzierungsprogramm:

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

Nach der Sequenzierungsreaktion wird die DNA mit 20mM Natriumacetat und 50µl 100% Ethanol gefällt und für 10 Minuten auf Eis gehalten. Im Anschluss wird die DNA bei 4°C 30 Minuten bei 13.000g pelletiert, mit 75% Ethanol gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 16.000g pelletiert. Das Pellet wird zuletzt getrocknet. Die Proben werden dann im Servicelabor des Instituts für Zellbiochemie, UKE, Hamburg, mit Hilfe eines DNA-Sequencing Systems (ABI 370A) sequenziert.

2.2.2.7 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen können doppelsträngige DNA an spezifischen Stellen spalten, wobei im Labor beinahe ausschließlich Restriktionsendonukleasen Typ II zum Einsatz kommen, da diese eine palindromische DNA-Sequenz erkennen können und innerhalb dieser Erkennungssequenz beide DNA-Stränge schneiden. Liegen die beiden Schnittstellen nach dem Restriktionsverdau einander direkt gegenüber, so erhält man ein „*blunt-end*“. Erhält man nach dem Restriktionsverdau zueinander komplementäre überhängende Enden, spricht man von einem so genannten „*sticky-end*“. Sowohl das „*blunt-end*“, als auch das „*sticky-end*“ werden für die Ligationen eingesetzt. Der Restriktionsverdau der DNA mit einer oder zwei Restriktionsendonukleasen erfolgt in einem Volumen von 10 bzw. 20µl. mit einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37°C.

Material und Methoden

2.2.2.8 Enzymverdau von Plasmid-DNA zur Umklonierung von Expressionskonstrukten

Enzymverdau mit NotI und EcoRI bzw. NheI für 1h bei 37°C von 4µl Plasmid-DNA im 20µl Ansatz.

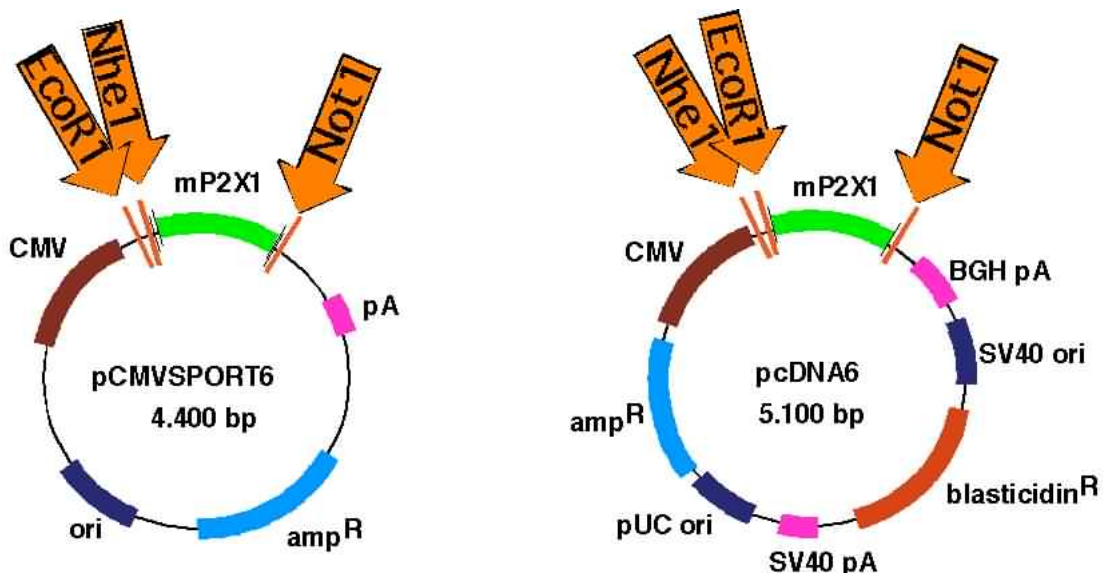


Abb. 16: Schematische Darstellung der pCMV-SPORT6 und pcDNA6 Expressionsvektoren. Auf der linken Seite ist der pCMVSPORT6 Vektor dargestellt, der im Vergleich mit dem auf der rechten Seite gezeigten pcDNA6 Vektor keine Blastidicinresistenz besitzt.

Zum Ausschneiden der P2X-DNA werden jeweils 4µl pCMVSPORT-Plasmid-DNA in einem 20µl-Ansatz zum Restriktionsverdau mit NotI und 2µl des entsprechenden NEB3-Puffers in einer 1:10 Verdünnung angesetzt. Nach einem Enzymverdau von 1 Stunde bei 37°C werden je 10µl für ein Testgel entnommen und die übrigen 10µl für einen weiteren Restriktionsverdau verwendet. Für hP2X1 und hP2X4 erfolgt dieser mit je 2µl EcoRI plus 1µl des EcoRI-Puffers in der 1:10-Verdünnung. Das Konstrukt für mP2X1 besitzt 2 Schnittstellen für EcoRI, weshalb hier mit 2µl NheI und 2µl des NEB3-Puffers in der 1:10-Verdünnung geschnitten wird. Für jeweils 1 Stunde wird bei 37°C verdaut und für 20 min bei 80°C inaktiviert. Der pcDNA6mP2X7 dient in diesem Fall als Spender des Expressionsvektors, weshalb das mP2X7-Gen hier entfernt wird. Um die geeigneten Schnittstellen für die Ligation zu generieren, werden auch mit diesem Vektor beide oben beschriebenen Restriktionsverdaus durchgeführt. Anschließend werden die kompletten verdauten Ansätze auf ein Gel aufgetragen

Material und Methoden

(1%iges Agarosegel aus 100ml 1x TAE-Puffer, 1g Agarose und 10 μ l Ethidiumbromid hergestellt). Als Marker werden 2 μ l des 1kb DNA Ladders verwendet. Alle Proben werden mit der 6x Loading Dye Solution zur Beschwerung gemischt.

2.2.2.9 Agarosegelelektrophorese

Das Prinzip der Elektrophorese ist die Wanderung von Stoffen in einem elektrischen Feld. Dieses kann man auch für die Auftrennung von DNA-Fragmenten nutzen, denn die negativ geladene DNA wandert im elektrischen Feld zur Anode. Erfolgt die Auftrennung nun in einer Matrix mit einer definierten Porengröße, so wandern die längeren Fragmente langsamer als die kürzeren, da diese stärker gebremst werden. Als Matrix wird normalerweise die Agarose verwendet, die in TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer bis zur Auflösung aufgeköcht und nach Abkühlung mit Ethidiumbromidlösung versehen wird, so dass die Ethidiumbromidkonzentration 100ng/ml beträgt. Das Ethidiumbromid dient als Farbstoff, der sich in die (Desoxy)-Ribonukleinsäure-Helices anlagert und in diesem Komplex fluoresziert. Unter UV-Licht gelingt damit ein Nachweis der DNA bis zu einer Grenze von ca. 10ng pro Bande. Durch Variationen der Agarosekonzentration im Gel ändert sich dessen Porengröße, wodurch sich unterschiedliche Trennbereiche der Elektrophorese erzielen lassen. Der Agaroseansatz wird in einen Gelträger mit einem Gelkamm gegossen und erstarrt bei der Abkühlung zu einem Gel. Dieses wird in eine Laufkammer gestellt, die mit TRIS-Acetat-EDTA-Puffer gefüllt ist. Die DNA-Ansätze werden in die durch den Kamm entstandenen Geltaschen pipettiert. Die Agarosegelelektrophorese wird ca. 20min bei 100V mit dem Spannungsgerät von Biometra durchgeführt. Anschließend werden die aufgetrennten DNA-Banden unter UV-Licht betrachtet, zur Dokumentation fotografiert und die benötigten Banden ausgeschnitten. Das heißt, aus dem pcDNA6mP2X7-Verdau wird jeweils die obere Bande ohne P2X7-Gen ausgeschnitten und von den anderen Ansätzen jeweils die untere Bande, die das P2X1- oder P2X4-Gen enthält.

2.2.2.10 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Zur Isolation von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel werden die DNA-Banden auf dem UV-Transilluminator mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen nach Anleitung aufgereinigt.

Material und Methoden

2.2.2.11 Ligation

DNA-Ligasen ermöglichen die *in vitro*-Rekombination von DNA aus verschiedenen Organismen durch eine kovalente Verbindung von DNA-Fragmenten zu einem kontinuierlichen DNA-Strang. Dabei wird in Anwesenheit von ATP die Phosphatgruppe am 3'-Ende des einen mit einer freien Hydroxygruppe am 5'-Ende des anderen DNA-Fragmentes verbunden. Vor der Ligation wird ein Testgel mit je 5 µl der aufgereinigten DNA durchgeführt und der Ligationsansatz für die Ligation über Nacht berechnet. Unter Verwendung des TA Cloning Kits (pCR II, pCR 2.1) von der Firma Invitrogen, dem Ligasepuffer (10x) und der T₄-Ligase der Firma New England Biolabs werden je 1 µl Ligasepuffer (10x) und 1 µl T₄-Ligase mit 0,5 µl geschnittenem, aufgereinigtem Vektor und 2-3 µl geschnittenem DNA-Fragment in einem Volumen von 10 µl (in Wasser) ligiert. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 14°C. Zur Kontrolle werden je ein Ansatz ohne Zugabe des Vektors und ein Ansatz ohne DNA-Fragment ligiert. Im Anschluss erfolgt die Transformation mit je 3 µl der Ligation in XL-10 Gold Ultrakompetent Cells (2.2.2.5) und die Ausplattierung auf LB-Carbenicillin-Platten, auf denen über Nacht bei 37°C Klone wachsen. Es werden je 4 Klone gepickt und Minipräparationen (siehe 2.2.2.1) hergestellt. Nach dem Kontrollverdau der Minipräparationen wird je eine Probe zur Herstellung einer Maxipräparation ausgewählt (**Abb. 17**).

Material und Methoden

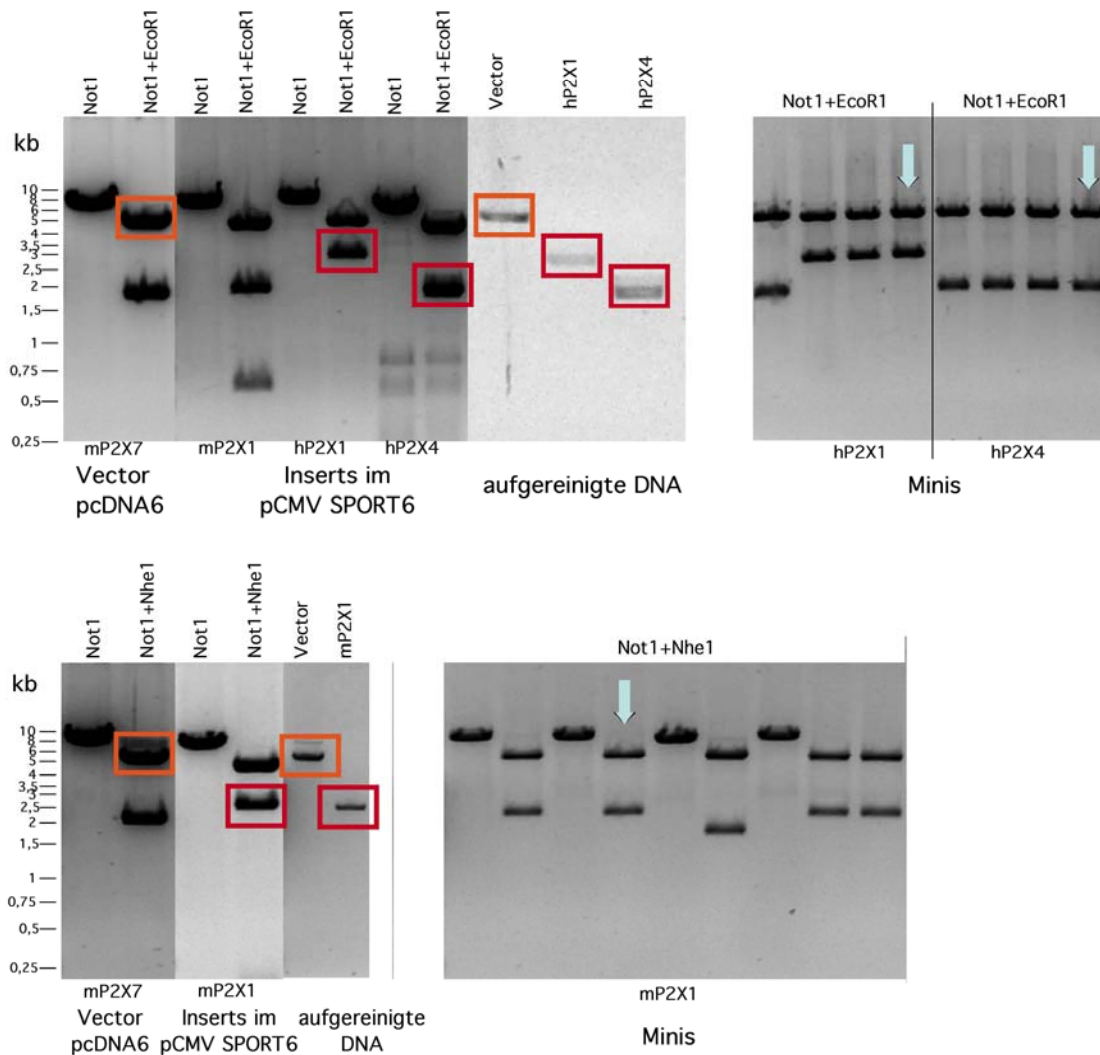


Abb. 17: Agarosegel der Umklonierung von Purinrezeptor Expressionskassetten. Die Abbildung zeigt den Enzymverdau mit Not1 und EcoR1 bzw. Nhe1 für 1h bei 37°C von 4µl Plasmid-DNA im 20µl Ansatz, die anschließende Gelelektrophorese und das Ausschneiden von Vektor und Inserts. Die Aufreinigung von Vektor und Inserts erfolgt mit dem Gel-Extraktionskit von QIAGEN, anschließend erfolgen das Testgel (5µl) und die „Berechnung“ des Ligationsansatzes für die Ligation über Nacht. Nach Transformation in XL-10 Gold Ultrakompetent Cells und Ausplattierung auf LB-Carb.-Platten wachsen die Klone über Nacht bei 37°C. Es wurden je 4 Klone gepickt und Minipreps (Minis) hergestellt. Auf der rechten Seite sieht man den Kontrollverdau der Minis zur Auswahl je einer Mini zur Herstellung einer Maxiprep (hellblauer Pfeil).

2.2.2.12 Linearisierung von Plasmid-DNA und Agarosegelelektrophorese
 Jeweils 5µg Plasmid-DNA der Konstrukte für mP2X1, hP2X1 und hP2X4 werden in einem 20µl-Ansatz zum Restriktionsverdau angesetzt. Als Restriktionsenzym zum Schneiden der pcDNA6 m/hP2X1 werden je 2µl SCA-1 und der entsprechende Puffer

Material und Methoden

verwendet. Der pcDNA6 hP2X4 lässt sich besser mit 3µl Ssp1 und dem entsprechenden Puffer linearisieren. Die Sca1- und Ssp1-Puffer werden mit je 2 bzw. 3µl in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt. Der Ansatz wird 1 Stunde bei 37°C verdaut und für 20 min bei 80°C inaktiviert. Zur Kontrolle der Linearisierung wird ein 1%iges Agarosegel aus 100ml 1x TAE-Puffer, 1g Agarose und 10µl Ethidiumbromid hergestellt und mit je einem Zehntel der verdauten DNA beladen. Zum Vergleich wird das Agarosegel ebenfalls mit 0,5µg unlinearisierter Plasmid-DNA beladen. Als Marker werden 2µl des 1kb DNA Ladders verwendet. Zur Beschwerung werden alle Proben mit der 6x Loading Dye Solution gemischt. Die Agarosegelelektrophorese trennt die DNA etwa 20min bei 100V in Banden auf. Anschließend wird das Gel unter UV-Licht betrachtet und zur Dokumentation fotografiert (**Abb. 18**).

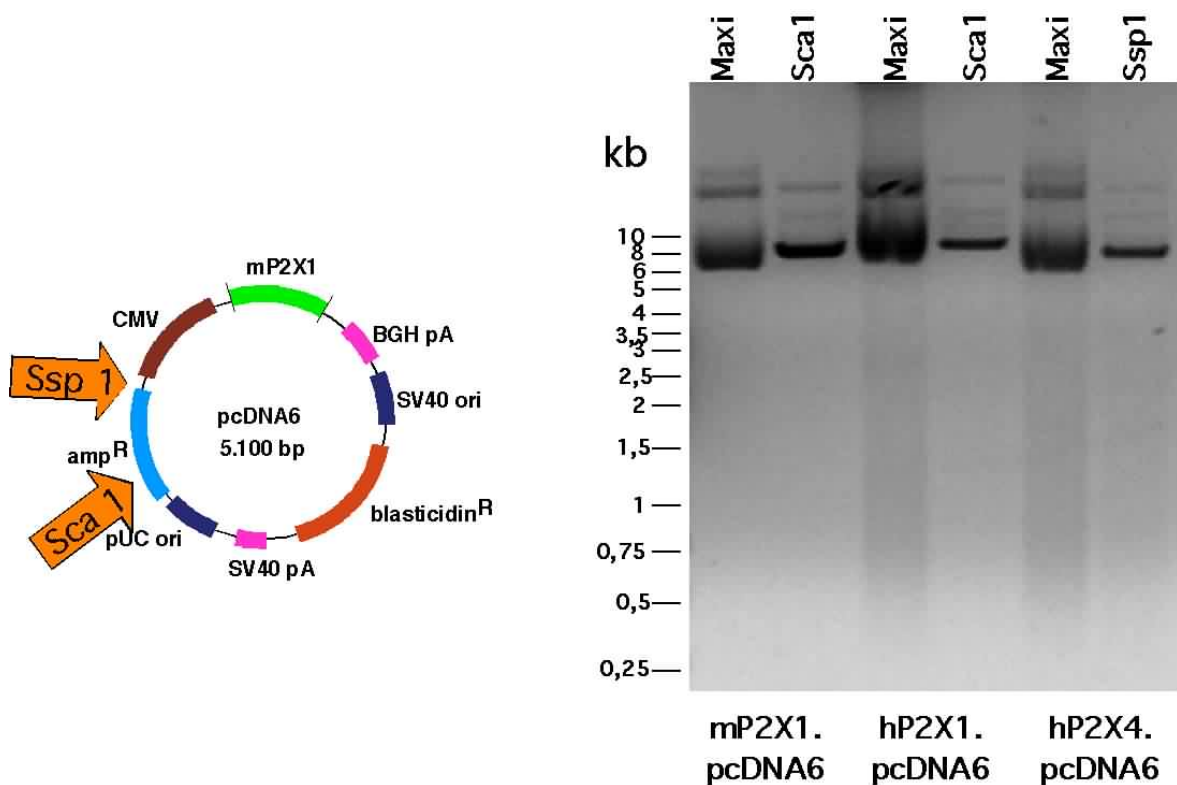


Abb. 18: Agarosegel der Linearisierung von Purinrezeptor-Expressionsvektoren. Auf der linken Seite ist dargestellt, wo die Restriktionsenzyme Ssp1 und Sca1 den Vektor pcDNA6 schneiden. Auf der rechten Seite ist ein Agarosegel zu sehen, das zur Kontrolle der Linearisierung der Purinrezeptor-DNA durchgeführt wurde. Hierfür wurde unverdaute DNA immer links neben verdauter DNA aufgetragen.

Material und Methoden

2.2.3 Immunologische Methoden

2.2.3.1 Vitalzellfärbung für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Transient mit Expressionskonstrukten für P2X und GFP kotransfizierte CHO-Zellen (2.2.1.9) werden entweder sechs Stunden nach der Transfektion trypsinisiert und in 96-well-Platten und Culture Slides ausplattiert oder nach dem „Fast Protokoll“ direkt vor der Transfektion trypsinisiert und zusammen mit dem DNA-JetPEI-Gemisch wie oben beschrieben ausplattiert. Bei dem Fast Protokoll werden 2×10^6 Zellen in 4ml DMEM-Medium resuspendiert, so dass in jedem Napf der 96-well Platte 150µl mit $7,5 \times 10^4$ Zellen und in jeden Napf der Culture Slides in 300µl doppelt so viele Zellen ausplattiert werden. Zwanzig Stunden nach der Transfektion werden die Zellen mit 2% PFA für 10 min bei RT fixiert und anschließend mit DMEM-Medium gewaschen. Die zur Anfärbung verwendeten Erstantikörper sind die gegen m/hP2X1 (CR30 / 9316), m/hP2X4 (116, CR58, RG22, RG23 / CR29), m/rP2X7 (K1G / 3428) gerichteten Immunsereen und die gegen m/hP2X7 (RH23-A44 / L4) gerichteten mAk. Von den Immunsereen und aufgereinigten mAk werden geometrische Verdünnungsreihen von der 1:125- bis zur 1:2000-Verdünnung mit DMEM-Medium hergestellt. Dieser Erstantikörper wird auf die Zellen gegeben und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wird einmal mit DMEM-Medium gewaschen und der mit Phycoerythrin (PE) konjugierte, gegen den Erstantikörper gerichtete Zweitantikörper in einer 1:100 Verdünnung mit DMEM-Medium zugegeben. Für 1 Stunde werden die Zellen im Dunkeln bei RT inkubiert und anschließend zweimal mit PBS^{+/+} gewaschen. Zur Anfärbung aller Zellen, auch der nicht transfizierten, wird der Hoechst-Farbstoff 33342 in einer 1:5000 Verdünnung mit PBS^{+/+} zugegeben und für 45 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS^{+/+} werden die Zellen in der Immunfluoreszenz mit dem Mikroskop Axiovert 25 (Zeiss, Jena) betrachtet und mit der Digitalkamera Canon Powershot G2 dokumentiert. Das Mikroskop ist mit Filtern für den Hoechst-Farbstoff (Zeiss Filterset 01), PE Fluorochrom (Zeiss Filterset 15) und GFP (Zeiss Filterset 10) ausgestattet. Die Fotos wurden mit einer 20-fachen Vergrößerung mit fixen Kameraeinstellungen aufgenommen (digitaler Zoom: 6,2x, Blende: 5.0, Belichtungszeit für GFP 1/4s, für PE 1s und für Hoechst 1/30s). Die Einzel fluoreszenzen wurden mit der Adobe Photoshop Software übereinander gelagert. Ein Schema dieser Färbung zeigt **Abb. 19**.

Material und Methoden

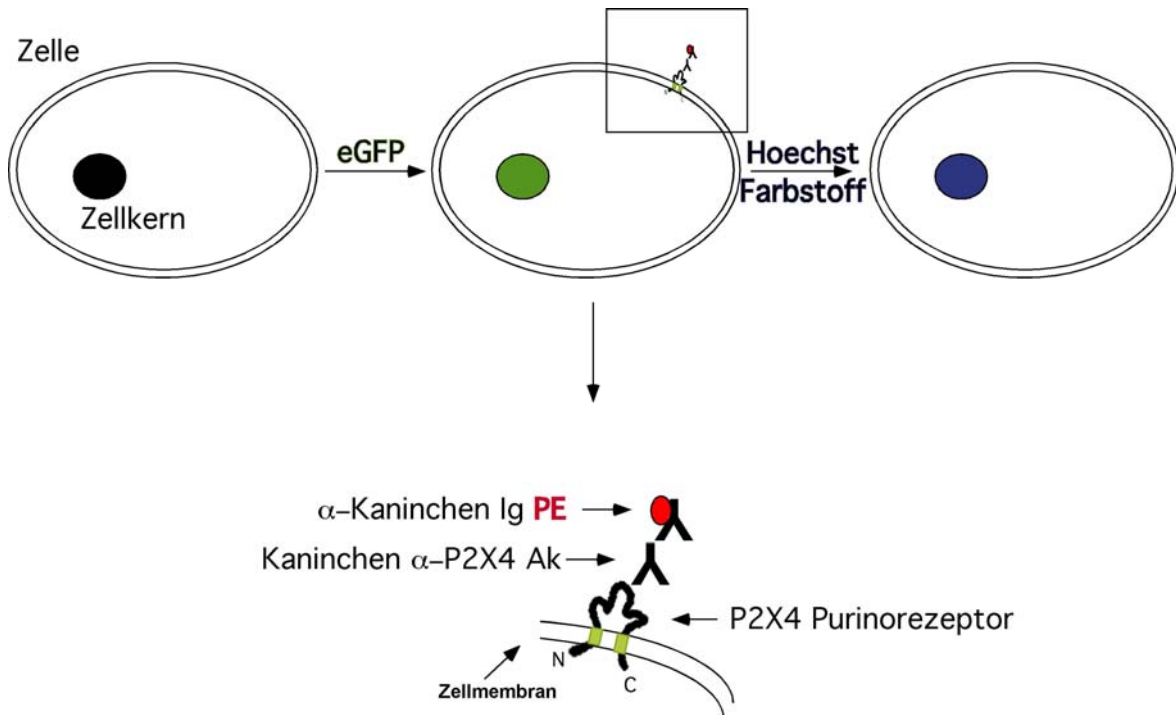


Abb. 19: Vitalzellfärbung für die Immunfluoreszenz und für die Durchflusszytometrie.

Für die Immunfluoreszenz werden einfach oder mit eGFP doppelt transfizierte Zellen 20 Stunden nach der Transfektion fixiert und z.B. mit dem Kaninchen anti-P2X4-Purinrezeptor-Antikörper inkubiert, der sein Targetprotein an der Zelloberfläche erkennt. Ein gegen den Erstantikörper gerichteter Zweitantikörper ist mit Phycoerythrin (PE) konjugiert und erscheint rot in der Immunfluoreszenz. Durch Zugabe des Höchst-Farbstoffs 33342 werden alle Zellen blau gefärbt, unabhängig davon, ob sie transfiziert sind. Für die Durchflusszytometrie werden Proteine auf der Zelloberfläche farblich markiert. Der Erstantikörper ist z.B. gegen den P2X4 Purinrezeptor gerichtet. Ein PE-konjugierter Zweitantikörper erkennt den Erstantikörper und ermöglicht die Messung mit dem FACS-Gerät.

2.2.3.2 „Fluoreszenz Activated Cell Sorting“ (FACS)

Die so genannte Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse einer großen Zahl an Zellen. Hierbei kann die Expression von Zelloberflächenmolekülen nachgewiesen werden, die mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, fluoreszierenden Molekülen oder Farbstoffen angefärbt bzw. ausgestattet sind. Dabei kann sowohl die relative Expression auf der einzelnen Zelle als auch der Anteil exprimierender Zellen in einer Population bestimmt werden. In dieser Arbeit wird die Expression zahlreicher Antigene auf Lymphomzellen, Lymphknotenlymphozyten und Knochenmarkszellen untersucht. Eine weitere Anwendung wird durch bestimmte fluoreszierende Substanzen ermöglicht,

Material und Methoden

mit denen die Zellen angefärbt werden. So kann die Aktivität der ART2.2 ADP-Ribosyltransferase an der Zytoplasmamembran nachgewiesen werden (2.2.3.3).

Bei der Durchflusszytometrie werden die Zellen so durch eine Kapillare gedrückt, dass ein Strom einzelner Zellen entsteht. Die einzelnen Zellen werden daraufhin durch einen Laserstrahl definierter Wellenlänge erfasst. Photodetektoren messen dabei die Lichtstreuung und die Emissionen der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe. Die Informationen werden durch einen Computer mit entsprechender Software analysiert. Die Lichtstreuung wird als Vorwärts-Streuung (Forwardscatter) und seitliche Streuung (Sidescatter) registriert. Der Forwardscatter entspricht dem Schatten, den eine angestrahlte Zelle wirft und damit einem Maß für ihre Größe. Das zur Seite gestreute Licht (Sidescatter) gibt Auskunft über die Granularität der angestrahlten Zelle. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) in den jeweiligen Kanälen entspricht der Expressionsstärke des durch den Fluorochrom-gekoppelten Antikörper angefärbten Moleküls auf der Zelle.

2.2.3.2.1 FACS-Analyse von transient transfizierten 293T-HEK-Zellen, stabil transfizierten CHO-Zellen Zelllinien und primären Zellen

Für jede FACS-Analyse werden etwa $0,5-1 \times 10^6$ Zellen benötigt. Die zu untersuchenden Zellen werden nach Waschung in PBS^{-/-} resuspendiert und je 50 µl der Zellen werden in FACS-Röhrchen überführt. Zur Färbung werden die polyklonalen Immunsereen in der optimalen Verdünnung mit PBS^{-/-} eingesetzt. Die monoklonalen Antikörper werden als aufgereinigte mAk in einer 1:100 Verdünnung mit den Zellen inkubiert. Als Negativkontrolle stehen für die meisten Antikörper zum Vergleich Präimmunsereen (PIS) zur Verfügung, welche nach Möglichkeit stets parallel in einer 1:400 Verdünnung getestet werden. Die meisten Immunsereen zeigen optimale Ergebnisse bei einer 1:800 Verdünnung. Die Inkubationszeit beträgt 1 Stunde bei 4°C. Danach werden die Zellen zweimal mit 1ml PBS^{-/-} durch Zentrifugation von 5min bei 4°C und 4600rpm gewaschen. Nach dem letzten Abdekantieren des Überstandes verbleiben etwa 50 µl Flüssigkeit in dem Röhrchen, mit denen das Zellpellet resuspendiert wird. Zur Markierung des Erstantikörpers wird ein PE-/FITC/oder APC-konjugierter Zweitantikörper eingesetzt, der den Erstantikörper erkennt und bindet. Dieser wird 1:50 vorverdünnt und auf die Zellen gegeben, wo er in einer 1:100 Verdünnung für 1 Stunde im Dunkeln bei 4°C mit dem Erstantikörper reagiert. Nach der Inkubation wird auch der

Material und Methoden

ungebundene Zweitantikörper zweimal herausgewaschen. Einige der P2X spezifischen Antikörper stehen auch bereits in Alexa konjugierter Form zur Verfügung, so dass eine Markierung mittels fluoreszierendem Zweitantikörper nicht mehr nötig ist. Die gefärbten Zellen werden kurz vor der Messung mit dem FACS-Calibur (Becton Dickinson) mit Propidiumiodid (PI) behandelt, um die lebenden von den toten Zellen zu unterscheiden.

2.2.3.2.2 FACS-Analyse von Thrombozyten aus Mäuseblut

Thrombozyten können nach der Färbung nicht gewaschen werden. So können keine ungebundenen Antikörper entfernt werden. Zur Erhöhung der Bindungsfähigkeit werden 0,5µg des mP2X7 α -Pinc (Erstantikörper) und 0,5µg anti-Kaninchen-PE (Zweitantikörper) für 30 min auf dem Roller vorinkubiert, bevor die gekoppelten Antikörper zu dem Blutplasma gegeben werden.

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

Für die Untersuchung von ADP-ribosylierten Aminosäuren wird das NAD-Analogon etheno-NAD eingesetzt (**Abb. 14**), das zur etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen führt (**Abb. 8**). An die etheno-Adenosin-Gruppe bindet der 1G4 Antikörper. Ursprünglich wurde dieser Antikörper entwickelt, um DNA-Modifikationen durch Anilin zu erforschen (Young and Santella 1988). Eine andere Arbeitsgruppe misst mit dem 1G4 die Aktivität von Poly-ADP-Ribosyltransferasen (PARPs) im Zellkern (Davis, Mysore et al. 1998). Dieser Ansatz funktioniert auch auf der Zelloberfläche von Lymphozyten. Für die Untersuchung im FACS-Gerät werden je Anfärbung 0,5-1x10⁶ Zellen in ein FACS-Röhrchen gegeben und 10mM eNAD / 1mM ADPR in 100µl PBS zugeführt. In der Kontrolle wird das etheno-NAD weggelassen. Die Inkubation erfolgt für 10 min bei 37°C im Brutschrank. Um ungebundenes etheno-NAD zu entfernen, werden die Zellen zweimal 5min bei 4°C und 4600rpm zentrifugiert und mit 1ml PBS^{-/-} resuspendiert. Etheno-ADP-ribosylierte Proteine können nun mit einem gegen die etheno-Gruppe gerichteten und Alexa488 konjugierten Antikörper, dem Maus-anti-etheno-Adenosin / 1G4 Alexa, angefärbt werden. Der 1G4 Alexa wird 1:100 verdünnt in 100µl PBS^{-/-} und für 1 Stunde bei 4°C mit den Zellen inkubiert. Ungebundene Antikörper werden durch zweimaliges Waschen entfernt. Direkt vor der FACS-Analyse werden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) behandelt, das die toten Zellen kennzeichnet.

Material und Methoden

2.2.3.4 Sortierung von Zellen mit EasySep Magnetkügelchen

Zur Sortierung werden die Zellen zunächst wie für eine normale FACS-Färbung (siehe 2.2.3.2.1) behandelt. Im Unterschied dazu werden allerdings alle Färbungen unter der sterilen Werkbank durchgeführt und FACS-Röhrchen mit Deckeln verwendet. Vor der Anfärbung wird ein kleiner Teil der Zellen für eine Negativkontrolle abgenommen, nach der Anfärbung wird ein Aliquot der gefärbten Zellen als Positivkontrolle verwendet. Bei der EasySep-Sortierung wird ein Brückenantikörper Komplex („Selection-Cocktail“) zugegeben, der das Phycoerythrin des Zweitantikörpers mit der Dextranhülle der Magnetkügelchen verbindet. Somit werden nur P2X-positive Zellen an Magnetkügelchen gebunden. Die gefärbten und gewaschenen Zellen werden mit 100µl des EasySep-Puffers resuspendiert und für 15 min bei RT mit 10µl Selection-Cocktail behandelt. Anschließend werden für 10 min bei RT die EasySep –Magnetkügelchen zugegeben. In vier Schritten werden jeweils 2ml DMEM-Medium zugegeben und durch Pipettieren werden die Zellen von der Röhrchenwand gespült. Das gefüllte Röhrchen wird dreimal 5 Minuten und einmal 3 Minuten in den Magneten gestellt und anschließend schwungvoll ausgeleert (Abb. **20**). Der erste Auswurf wird für die FACS-Messung aufbewahrt. Die nach dem letzten Auskippen noch im Röhrchen verbleibenden Zellen werden mit 500µl Medium vom Rand gespült und zusammen mit 4,5ml Medium in eine T25-Flasche ausplattiert. Zur Abwehr einer möglichen Kontamination wird Gentamicin zugegeben. Ein geringer Anteil der sortierten Zellen verbleibt immer in dem Röhrchen, das mit 500µl PBS für die FACS-Messung aufgefüllt wird.

Material und Methoden

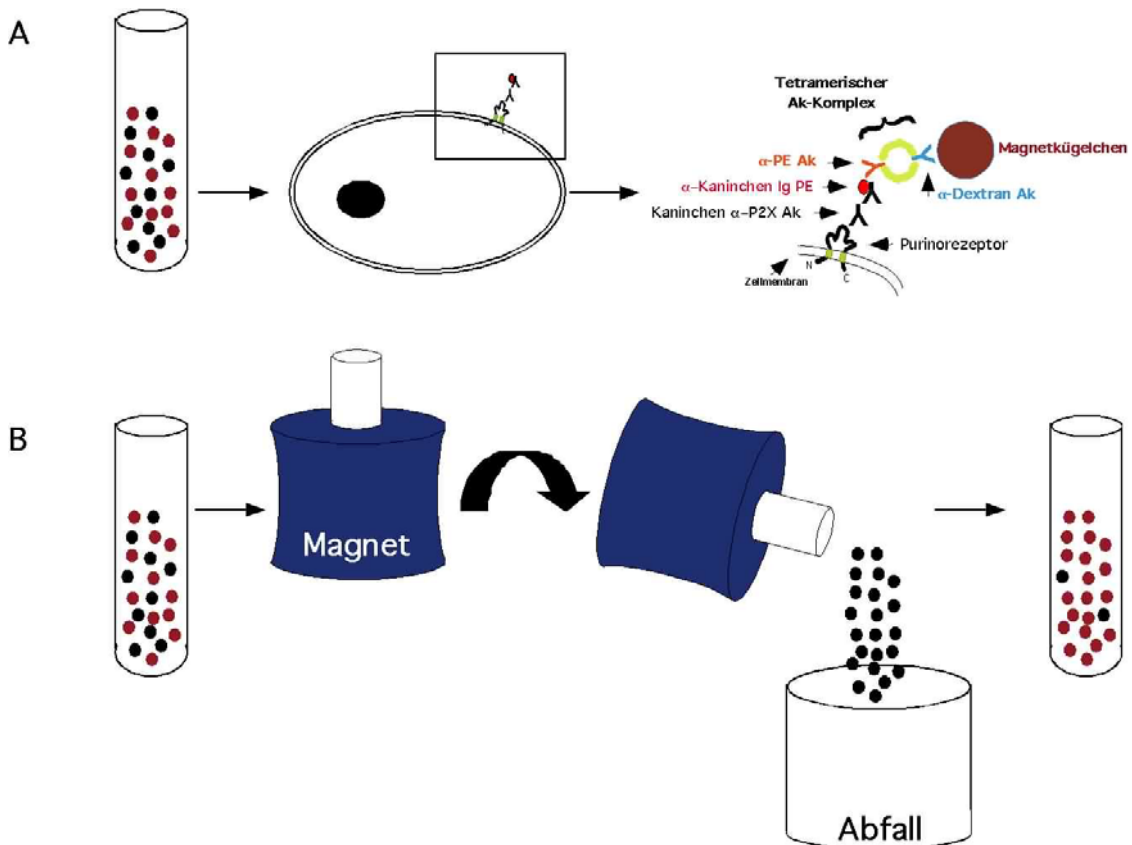


Abb. 20: Schema der EasySep-Sortierung von Zellen. (A) Schematisch vergrößerte schwarze und braune Punkte entsprechen den Zellen in den FACS-Röhrchen. Schwarze Punkte stellen die negativen Zellen dar, die keinen Purinrezeptor exprimieren und daher nicht gefärbt und während der EasySep Sortierung nicht an Magnetkügelchen gebunden werden. Die braunen Punkte entsprechen den P2X-positiven Zellen. (B) Bei der Selektionierung der positiven Zellen enthält das FACS-Röhrchen zunächst noch alle Zellen (braune und schwarze Punkte). Nachdem es 5 min in dem Magneten gestanden hat, wird das noch in dem Magneten stehende Röhrchen gekippt. Die negativen Zellen (schwarz) gelangen in das Abwurfgefäß und die positiven Zellen (braun) werden durch die magnetische Anziehungskraft in dem Röhrchen zurückgehalten. Dieser Vorgang wird mehrfach wiederholt, um möglichst viele negative Zellen auszusortieren.

2.2.3.5 Nachweis von Marker- und Aktivierungsantigenen

Die Zellen werden auf eine Expression der Markerantigene CD3, CD4, CD11b, CD41, CD86, B220, CD45RB, CD25 und mP2X7 untersucht. Die Antikörper wurden nach Angaben des Herstellers oder in einer Konzentration von $1\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ verwendet. Es

Material und Methoden

werden sowohl Zweifach- als auch Dreifach- Färbungen mit FITC-, Alexa-488, APC- oder PE-konjugierten mono- oder polyklonalen Antikörpern durchgeführt.

2.2.3.6 Western blot Analysen

Beim Western blot (Burnette 1981) werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung mittels Gelelektrophorese größenfraktioniert auf eine Membran übertragen und dort einer spezifischen Nachweismethode für bestimmte Proteine unterzogen.

2.2.3.6.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Zelllyse werden entweder einen Tag zuvor transient transfizierte Zellen verwendet oder direkt stabile Transfektanten. Je eine 80% konfluent gewachsene T25-Flasche mit $0,5 \cdot 10^7$ Zellen wird vorsichtig einmal mit 5ml 37°C vorgewärmtem $\text{PBS}^{+/+}$ gewaschen. Durch kräftiges Spülen mit 5ml 4°C gekühltem $\text{PBS}^{-/-}$ lösen sich die Zellen vom Flaschenboden und können in ein Falcon-Röhrchen überführt werden. Es folgt die fünfminütige Zentrifugation bei 4°C und 4600rpm zur Bildung eines Zellpellets. Ein Viertel der Zellen wird zur Kontrollmessung im FACS-Gerät verwendet, die restlichen dreiviertel der Zellen werden für die Zelllyse in ein Eppendorfgesäß überführt und erneut ein trockenes Pellet durch Zentrifugation erzeugt. Zur Lyse werden die Zellen in 100 μl Lysepuffer aufgenommen. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C werden die nicht lysierten Zellbestandteile erst 5 Minuten bei 5000U/min und dann 15 Minuten bei 13.000 U/min abzentrifugiert. Die so gewonnenen Lysate werden direkt für eine SDS-PAGE Analyse oder für eine Immunpräzipitation verwendet oder bei -20°C eingefroren.

2.2.3.6.2 Inkubation mit radioaktiv markiertem NAD und Zelllyse

Für den Nachweis der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen wird radioaktiv markiertes ^{32}P -NAD verwendet. 10^7 aufgereinigte T-Zellen pro Immunpräzipitation werden für 20 Minuten bei RT in Anwesenheit von $20\mu\text{Ci}$ ^{32}P -NAD, $1\mu\text{M}$ unmarkiertem NAD und 1mM ADP-Ribose in $200\mu\text{l}$ PBS inkubiert. Die nicht inkorporierte Aktivität wird durch 7- bis 10-faches Waschen mit 1ml Waschpuffer

Material und Methoden

(PBS, 1% FCS, 0.5mM ADP-Ribose) entfernt. Die Zellen werden pelletiert und für 15 Minuten bei 4°C mit Lysepuffer (PBS, 1% TX-100, 1mM AEBSF, 1mM ADP-Ribose) lysiert. Im Anschluss an die Lyse werden die Zellen für 3 Minuten bei 500g zentrifugiert, um die Zellkerne zu entfernen. Abschließend wird der Überstand dann für 3 Minuten bei 15.000g zentrifugiert, um Membranen zu entfernen. Die so gewonnenen Lysate werden direkt für eine SDS-PAGE Analyse oder für eine Immunpräzipitation verwendet.

2.2.3.6.3 Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation wird ein spezielles Protein eines Lysates an Protein-G-Sepharose gekoppelte Antikörper gebunden. Protein-G besitzt eine hohe Affinität zu den Fc-Regionen der Antikörper. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, werden nicht nur die Antikörper des Immunsersums, sondern auch die des Präimmunsersums an Protein-G-Sepharose gekoppelt.

Für die Immunpräzipitation werden 1µl Immunsersum bzw. Präimmunsersum oder 1µg monoklonaler Antikörper an 20µl Protein-G-Sepharose Matrix in 200µl PBS^{-/-} 1% TX-100, 1mMAEBSF, 1mMADPR (Waschlösung) für 60 min bei 4°C auf dem Dreher gekoppelt. Anschließend wird die Matrix zweimal mit der Waschlösung gewaschen. Zum Vorklären der Zellysate werden je 180µl Lysat für 1 Stunde bei 4°C mit der PIS-gebundenen Protein-G-Sepharose auf dem Dreher vorinkubiert, um unspezifisch bindende Proteine aufzufangen. Anschließend wird die Protein-G-Sepharose in der Efüge für 5 min bei 5000U/Min abzentrifugiert. Der Überstand wird auf die IS-gebundene Protein-G-Sepharose pipettiert und wiederum für 1 Stunde auf dem Dreher inkubiert. Im Anschluss wird jede Matrix viermal gewaschen, davon zweimal 2 min und zweimal 10 min auf dem Dreher und in SDS Ladepuffer aufgenommen.

2.2.3.6.4 SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE Analyse wird das "NuPAGE Electrophoresis" System verwendet. Die Proteine können grundsätzlich unter denaturierenden bzw. reduzierenden Bedingungen (LDS-Ladepuffer + 1mM DTT) oder nicht reduzierenden Bedingungen (ohne das Reduktionsmittel DTT) denaturiert werden. Dieses erfolgt je nachdem, ob zur

Material und Methoden

Detektion der Proteine später ein α -Peptid oder α -Pinc verwendet wird. Beide Methoden werden im Zusammenhang dieser Arbeit durchgeführt. In beiden Fällen werden die durch die Seife Sodiumdodecylsulfat (SDS) denaturierten Proteine in der Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Hierbei bilden die Proteine negativ geladene Komplexe mit SDS, die sich beim Anlegen einer Spannung im elektrischen Feld zum Pluspol bewegen. Die Proteine erzeugen ihrem Molekulargewicht entsprechend Reibung, die der Wanderungsgeschwindigkeit entgegen wirkt und werden somit in 10 Minuten bei 70°C der Größe nach aufgetrennt. Abhängig von den zu untersuchenden Proteingrößen wird der MES- oder MOPS-Laufpuffer (mit oder ohne DTT) verwendet. In einem 10%igen Tricin-Gel werden die denaturierten Proteine neben einem Größenmarker (MultiMark) aufgetragen und ca. 30 Minuten bei 200V und 100mA aufgetrennt. Es folgt ein „Wet blot“ mit dem „X Cell II Blotting“ System. Dabei wird die PVDF Membran 10 Sekunden mit Methanol aktiviert und zusammen mit den Filterpapieren und der Nitrozellulose- (NC) Membran mit Blotpuffer befeuchtet. Das Gel wird luftblasenfrei zwischen die NC-Membran (Anoden-Seite) und die PVDF-Membran (Kathoden-Seite) gelegt. Die Proteine werden erst 1 Minute auf die NC- und dann 90 Minuten auf die PVDF-Membran bei 30V transferiert.

2.2.3.6.5 Coomassie-Färbung

Die Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen nach der SDS-PAGE erfolgt mit dem NOVEX® Colloidal Blue Stain Kit von Invitrogen. Für mindestens zwei Stunden wird das Gel in der Färbelösung (55ml H₂O, 20ml Methanol, 20ml Stain A, 5ml Stain B) geschwenkt. Nach der Entfärbung in Wasser für weitere 24h mit einem Aktivkohlebeutel wird das Gel für etwa zehn Minuten in der Drying Solution geschwenkt, danach zwischen zwei Blätter Zellophanfolie in einen Trockenrahmen eingespannt und über Nacht getrocknet.

2.2.3.6.6 Silberfärbung

Mit der Silberfärbung kann man das Muster aller größenfraktionierten Proteine auf der Nitrozellulosemembran überprüfen. Die Membran wird 1-2 Minuten in einer 10ml Silberlösung unter ständiger Bewegung gefärbt, mit H₂O gewaschen und bei RT getrocknet.

Material und Methoden

2.2.3.6.7 Immundetektion

Die Immundetektion der untersuchten Proteine erfolgt auf einer PVDF-Membran, die zuerst 20 Minuten bei RT in 50ml Falcon-Röhrchen mit einer Blocklösung auf dem Roller inkubiert wird. Zur anschließenden Färbung mit verschiedenen Immunsereen oder Antikörpern wird die PVDF-Membran vorher teilweise zerschnitten. Der Primär-Antikörper wird in der jeweils angegebenen Verdünnung für eine Stunde bei 4°C rotierend unter Zugabe von 20% Tween 20 in einem Volumen von 2,5 oder 5ml 5%iger Milchpulverlösung in die Falcon-Röhrchen gegeben. Anschließend werden die Membranen zweimal für 5 min und dreimal kurz mit 5ml Waschpuffer gewaschen. Für eine weitere Stunde wird mit dem Sekundär-Antikörper Ziege-anti-Maus-IgG-Meerrettich-Peroxidase (HRP) (1:5000), Esel-anti-Kaninchen (HRP) (1:5000) oder Kaninchen IgG Trueblot (HRP) (1:1000) 1 Stunde bei RT unter Zugabe von 20% Tween 20 in einem Volumen von 2,5 oder 5ml 5%iger Milchpulverlösung inkubiert. Wie nach der ersten Färbung, werden die Membranen gewaschen. Danach erfolgt die Chemilumineszenz-Reaktion mit dem "ECL Western blotting detection reagent". Hierfür wird die Membran mit einer Plastikfolie bedeckt, mit einem Hyperfilm ECL (Roche) für wenige Sekunden bis mehrere Minuten in eine Röntgenkassette aufgelegt und entwickelt.

2.2.3.6.8 Autoradiographie

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

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit gliedert sich in drei Abschnitte.

Im ersten Teil wird die Charakterisierung der verfügbaren α -Pinc Immunsereen beschrieben, welche in dieser Arbeitsgruppe durch Gene-Gun-Immunisierung gegen mP2X1, hP2X1, mP2X4, hP2X4, mP2X7, rP2X7 und hP2X7 hergestellt wurden. Mittels Immunfluoreszenz-, FACS-, Immunoblot- und Immunpräzipitations-Analysen an transient transfizierten HEK-Zellen und CHO-Zellen wurde dabei jeweils die spezifische Reaktion des Immunsereums (IS) mit dem jeweiligen P2X Purinrezeptor untersucht. Es wurde jeweils der optimale Titer ermittelt und die Reaktion der α -Pinc Antikörper mit der Reaktion kommerziell verfügbarer α -Peptid Antikörper verglichen.

Der zweite Abschnitt befasst sich mit Untersuchungen zur endogenen Expression von P2X Purinrezeptoren auf etablierten Zelllinien und primären Lymphknoten-, Knochenmarks- und Blutzellen der C57BL/6-Maus im Vergleich zur P2X7 Knock-out Variante (P2X7 KO).

Im dritten Teil werden die Ergebnisse zur ADP-Ribosylierung von P2X Purinrezeptoren vorgestellt. Mit Hilfe von transfizierten Zellen wurde untersucht, ob und unter welchen Bedingungen die ART2.2, neben den bekannten Target-Argininen an den Positionen 125 und 133 im murinen P2X7, weitere Mitglieder der P2X Purinrezeptorfamilie ADP-ribosylieren kann.

3.1 Transfektion von P2X1, P2X4 und P2X7 Purinrezeptoren in CHO- und HEK-Zellen und Charakterisierung der P2X-spezifischen Antikörper

3.1.1 Analyse der Reaktivität von Immunsereen und Bestimmung des Antikörpertiters mittels indirekter Immunfluoreszenz an transient transfizierten CHO-Zellen

In diesem Kapitel wird die spezifische Reaktion der α -Pinc mit transient transfizierten CHO-Zellen in der Immunfluoreszenz untersucht. Um herauszufinden, wie stark ein Immunsereum bzw. ein mAk mit seinem Antigen reagiert, wurden geometrische Verdünnungsreihen der Antikörper hergestellt und auf Bindung an transient mit einem P2X-Rezeptor und eGFP kotransfizierten CHO-Zellen untersucht. Gebundene Antikörper wurden mit einem rot-fluoreszierenden Sekundärantikörper detektiert. Zur Kontrolle wurden entsprechende Anfärbungen mit dem jeweiligen Präimmunsereum vorgenommen. Zellkerne wurden mit einem blau-fluoreszierenden DNA-Farbstoff gegengefärbt und die Zellen mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie betrachtet (**Abb. 21, Abb. 22**). Alle Zellen eines Blickfeldes sind in der Blaufluoreszenz zu sehen. Grün leuchten die Zellkerne der mit eGFP kotransfizierten Zellen und lassen so entscheiden, ob die zu sehende Rotfluoreszenz eine spezifische Anfärbung der P2X Purinrezeptoren ist. Werden alle Zellen rot gefärbt, handelt es sich hingegen wahrscheinlich um eine unspezifische Anfärbung. Um eine vergleichende Auswertung zu ermöglichen, wurden die Zellen bei konstanten Belichtungszeiten photographiert. Die in Abb. 21 gezeigten Fotografien zeigen exemplarisch die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalysen von fünf getesteten Kaninchen-Immunsereen und einem Rattensereum in der jeweils optimalen Verdünnung.

Ergebnisse

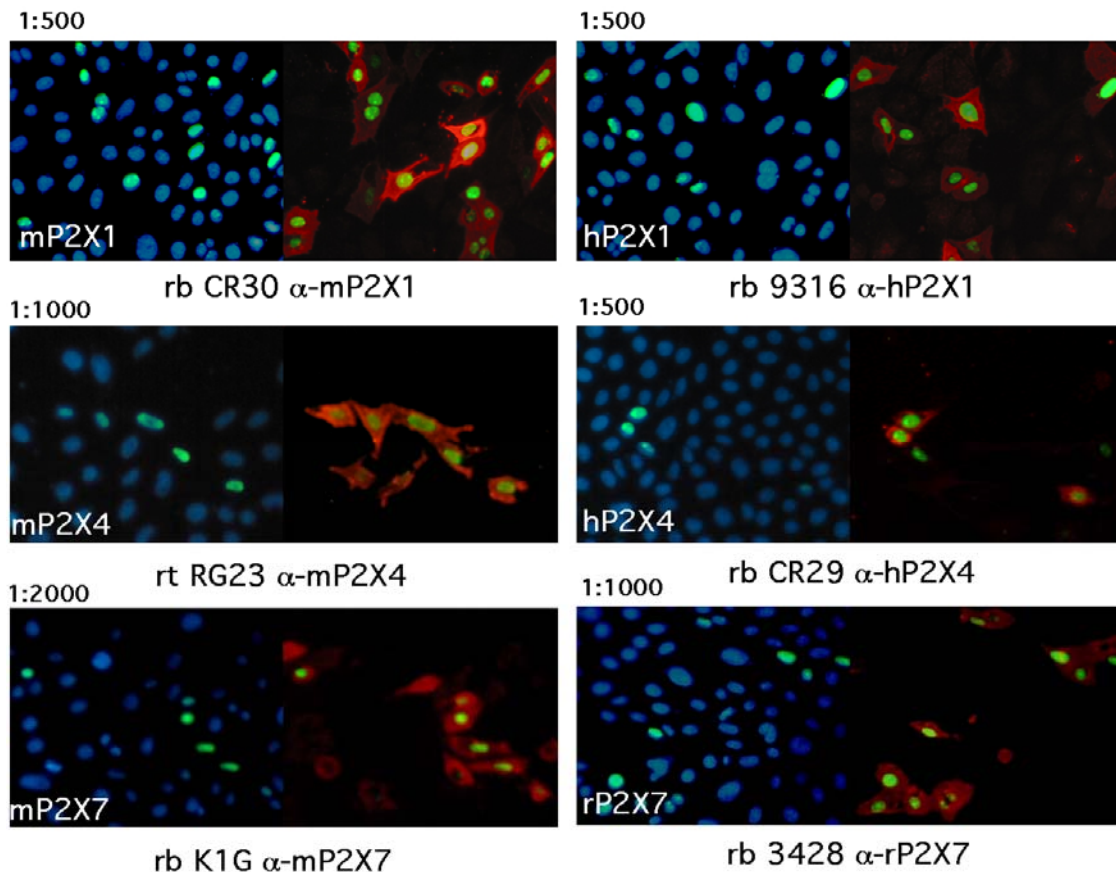


Abb. 21: Immunfluoreszenz-Analyse an transient transfizierten CHO-Zellen zur Bestimmung der spezifischen Reaktivität der α -Pinc Immunsereen. CHO-Zellen wurden transient mit P2X-Expressionskonstrukten und nukleärem GFP (erscheint grün in der IF) kotransfiziert und auf 96-well Schalen plattiert (ca 5×10^4 Zellen/Napf). Zwanzig Stunden nach der Transfektion erfolgte die Anfärbung mit dem jeweiligen gegen das spezielle P2X-Konstrukt gerichteten Immunsereum in geometrischer Verdünnungsreihe zur Ermittlung des Antikörpertiters. Ein PE-konjugierter anti-Kaninchen IgG markiert gebundene Erstantikörper für die Immunfluoreszenz (erscheint rot in der IF). Die Zellkerne wurden mit dem Hoechst Farbstoff 33342 gefärbt (erscheint blau in der IF). Gezeigt wird jeweils die optimale Verdünnungsstufe des Immunsereums. Die Zellen wurden mit dem Zeiss Axiovert25 Mikroskop analysiert, unter der Verwendung der Filter für Hoechst, GFP und PE Fluorochrom. Mittels Photoshop wurden die einzelnen Fluoreszenzanalysen übereinander gelagert.

Am Beispiel der α -Pinc Immunsereen gegen den mP2X4 Purinrezeptor zeigen die in **Abb. 22** dargestellten Ergebnisse die Abschwächung der Immunfluoreszenz bei stärkerer Verdünnung der Immunsereen. Für den mP2X4 Purinrezeptor standen vier verschiedene α -Pinc Immunsereen zur Verfügung, davon je zwei aus Kaninchen (116 und CR58) und Ratten (RG22 und RG23). Alle Seren zeigen eine spezifische Anfärbung der transfizierten Zellen. Das Immunsereum CR58 α -mP2X4 reagiert jedoch deutlich

Ergebnisse

schwächer mit den transfizierten Zellen als die anderen drei α -Pinc. Für weitere Immunfluoreszenz und FACS-Analysen wurde dieses Serum in einer geringeren Verdünnung (1:400) als die anderen α -Pinc (1:800) eingesetzt.

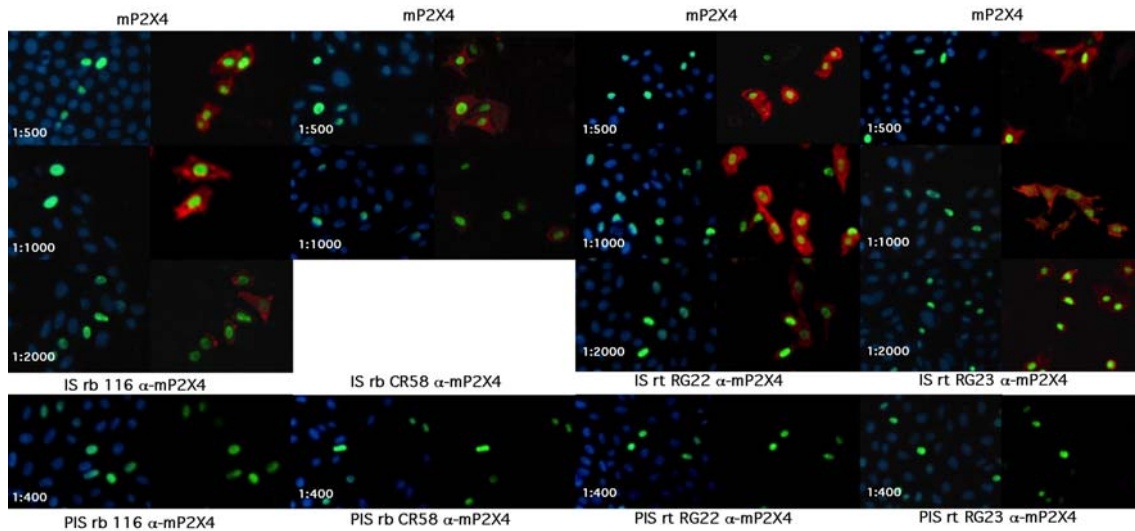


Abb. 22: Titrierungen der α -PINC Immunsere. CHO-Zellen wurden wie in **Abb. 21** transient mit P2X-Expressionskonstrukten und nukleärem GFP kotransfiziert und 20 Stunden nach Transfektion mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Am Beispiel des mP2X4 werden vier verschiedene Immunsere und deren geometrische Verdünnungsreihen, sowie das zugehörige Präimmunserum (untere Reihe) gezeigt. Dabei wurden zwei Immunsere in Kaninchen (rb) hergestellt, weitere zwei in Ratten (rt). Gebundene Erstantikörper wurden mit PE-konjugierten anti-Kaninchen IgG bzw. anti-Ratten IgG detektiert. Die Anfärbung mit dem schwächeren Immunserum CR58 war bei der 1:2000-Verdünnungen nicht von der des Präimmunserums zu unterscheiden.

Die **Tabelle 6** fasst die Ergebnisse der untersuchten Antisere und deren ermittelte optimale Verdünnung zusammen. Von den getesteten, kommerziellen P2X-spezifischen α -Peptid Immunsere zeigte keines eine Anfärbung in der Immunfluoreszenz (hier nicht gezeigt).

Ergebnisse

Antikörper P2X-Familie	Ursprung	Titer	Zielprotein	Immunfluoreszenz
9316	Rb	1:800	hP2X1	+++
CR29	Rb	1:800	hP2X4	+++
CR30	Rb	1:800	mP2X1	+++
116	Rb	1:800	mP2X4	++
RG22	Rt	1:800	mP2X4	+++
RG23	Rt	1:800	mP2X4	+++
CR58	Rb	1:400	mP2X4	++
K1G	Rb	1:800	mP2X7	+++
3428	Rb	1:800	rP2X7	++
3429	Rb	1:400	hP2X7	+
RH23-A44	Rt	1:100	mP2X7	+++
L4	Ms	1:100	hP2X7	+++
Abcam anti-P2X1	Rb	1:200	rP2X1	-
Calbiochem anti-P2X4	Rb	1:100	rP2X4	-
Alomone anti-P2X7	Rb	1:200	rP2X7	-

Tabelle 6: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten α -Pinc und α -Peptid Antikörper und Angabe der ermittelten optimalen Verdünnung für die Immunfluoreszenz-Analysen

Ergebnisse

3.1.2 Analyse der Kreuzreaktivität von Purinrezeptor-spezifischen Immunsereen und monoklonalen Antikörpern mittels indirekter Immunfluoreszenz an transient transfizierten CHO-Zellen

Um Antikörper in Analysen einzusetzen ist es nicht nur wichtig, die optimale Verdünnung zu kennen. Vielmehr möchte man auch Kreuzreaktionen mit den nächsten und entfernter verwandten P2X Purinrezeptoren kennen. Hierfür wurden alle Immunsereen mit ihrem spezifischen P2X Purinrezeptor sowie mit den jeweiligen paralogen und orthologen P2X Purinrezeptoren auf Kreuzreaktivität getestet. Ortholog sind beispielsweise mP2X1 und hP2X1, während die P2X Subtypen innerhalb einer Spezies einander paralog sind. Noch geringere Ähnlichkeiten erwartet man in der übrigen Verwandtschaft. Alle Immunsereen und auch das Präimmunsereum (zur Kontrolle, wird nicht gezeigt) wurden in der Verdünnung 1:400 eingesetzt. Die **Abb. 23** zeigt Überlagerungen der roten, grünen, und blauen Fluoreszenz. Rot entspricht, wie bei der vorigen Analyse, der Membranfluoreszenz der angefärbten P2X Purinrezeptoren. Grün sind die Kerne der mit eGFP transfizierten Zellen und alle Zellkerne sind blau angefärbt. Von allen getesteten α -Pinc zeigt das Immunsereum CR30 α -mP2X1 als Einziges eine Kreuzreaktivität mit dem nächsten Verwandten, dem Orthologen hP2X1. Die übrigen Immunsereen zeigen keinerlei Kreuzreaktionen oder nur eine vermutlich unspezifische Reaktion, wie das 9316 mit dem mP2X1, bei dem im Hintergrund einige rote Fluoreszenzen zu sehen sind. Diese Zellen haben jedoch keinen grünen Zellkern und stellen somit keine transfizierten Zellen dar (**Abb. 23**). Der monoklonale Antikörper L4 α -hP2X7 reagiert mit seinem Orthologen aus der Ratte rP2X7 kreuz (wird nicht gezeigt).

Ergebnisse

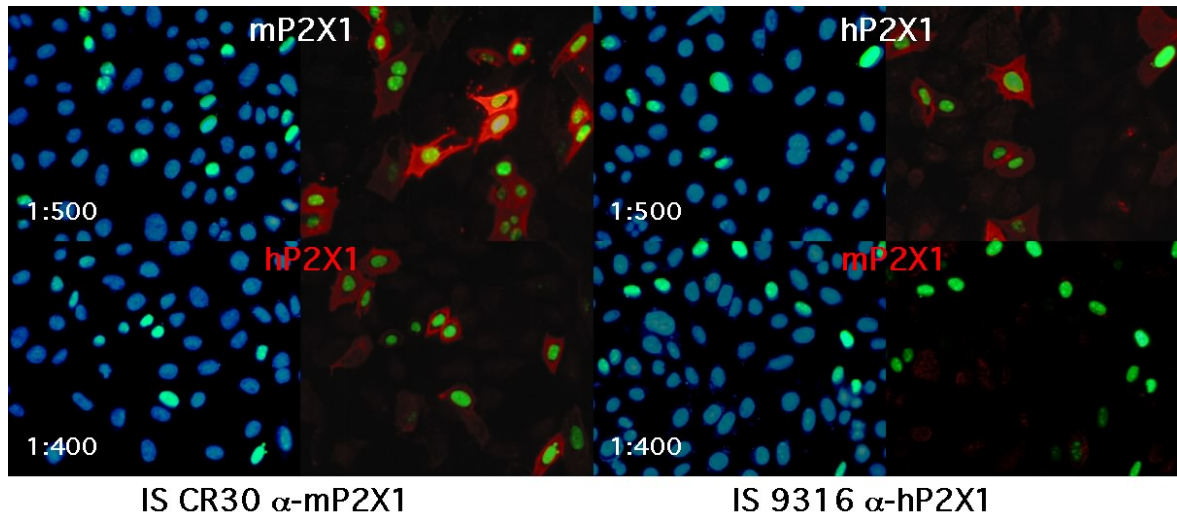


Abb. 23: Kreuzreaktionen der gegen P2X1 gerichteten α -PINC Immunsereen. Alle in der Immunfluoreszenz untersuchten Immunsereen wurden auch auf Kreuzreaktivität mit den jeweiligen paralogen und orthologen Konstrukten getestet. Von allen analysierten Immunsereen zeigt nur CR30 anti-mP2X1 mit dem Orthologen des Menschen eine Kreuzreaktivität. 9316 anti-hP2X1 färbt nur unspezifisch untransfizierte Zellen im Hintergrund, die keinen grünen Zellkern haben. Der ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit analysierte monoklonale Antikörper gegen hP2X7 zeigt eine Kreuzreaktivität mit dem Orthologen der Ratte (hier nicht gezeigt).

Ergebnisse

3.1.3 Analyse der Reaktivität und der Kreuzreaktivität von Purinrezeptor-spezifischen Immunsereen und monoklonalen Antikörpern mittels FACS-Analysen an transient transfizierten HEK-Zellen

Im folgenden Abschnitt wird die Eignung der α -Pinc Immunsereen für ein weiteres häufiges immunologisches Einsatzgebiet, die FACS-Analyse, ermittelt. Außerdem sollen die α -Pincs mit den α -Peptid Antikörpern direkt verglichen werden. Hierfür wurden HEK-Zellen transient mit den P2X Purinrezeptoren transfiziert und vor der FACS-Analyse mit den Immunsereen in der im vorigen Abschnitt als optimal ermittelten Verdünnungsstufe (1:400-1:800) angefärbt (s. **Tabelle 6**). Vergleichsweise wurden entsprechende Anfärbungen mit kommerziell verfügbaren α -Peptids aus dem Kaninchen angefertigt, die jeweils gegen das cytosolische C-terminale Ende von P2X1, P2X4, und P2X7 gerichtet sind. Diese Antikörper wurden etwas höher konzentriert eingesetzt (1:100-1:200), da keine starke Reaktion zu erwarten war. Gebundene Antikörper wurden mit PE-konjugierten anti-Kaninchen IgG Antikörpern detektiert.

Die Ergebnisse (**Abb. 24**) zeigen bei allen α -Pinc eine deutlich stärkere Anfärbung der transient transfizierten Zellen als der untransfizierten Zellen. Dabei ist jedoch eine unterschiedliche Intensität der Anfärbung bei verschiedenen Konstrukten und Immunsereen zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigen die α -Peptid Immunsereen jeweils keine oder nur eine sehr schwache Anfärbung der transfizierten Zellen. Die α -Peptid erzeugen jeweils eine homogene eingipflige Kurve im Histogramm, während die α -Pinc überwiegend heterogene, zweigipflige Kurven mit einer deutlich höheren Fluoreszenzintensität zeigen. Dieses spricht für eine spezifische Anfärbung der transienten Transfektanten durch die α -Pinc und einer unspezifischen Reaktion der α -Peptid.

Ergebnisse

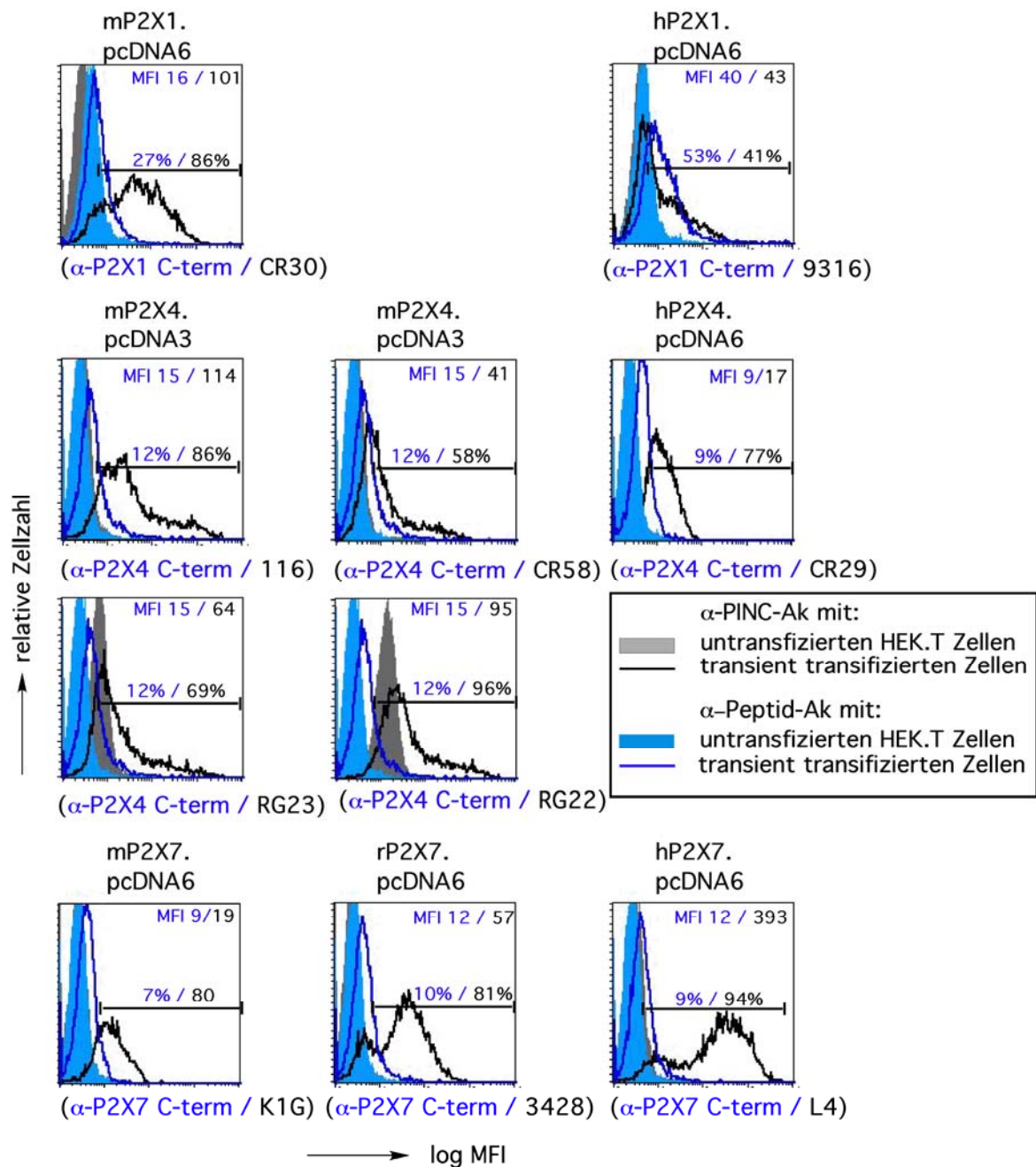


Abb. 24: FACS-Analysen zum Vergleich der Reaktivitäten von α -Peptids und α -Pincs mit P2X Rezeptoren auf transient transfizierten HEK-Zellen. Zur FACS-Analyse wurden HEK-Zellen mit Expressionskonstrukten für die P2X-Reihe transient nach JetPei transfiziert. Die zur Transfektion verwendeten Konstrukte sind über den Histogrammen notiert. Untransfizierte Zellen (gefüllte Histogramme) und transfizierte Zellen (Linien) wurden 24 h nach Transfektion jeweils mit α -Pinc Immunsereen (grau, schwarz) bzw. kommerziell verfügbaren α -Peptid Antiseren (blau) angefärbt (in den in Tabelle 6 aufgeführten Verdünnungsstufen). Die zur Detektion eingesetzten Antikörper sind unter den Histogrammen notiert. Gebundene Antikörper wurden mit PE-konjugierten anti-Kaninchen IgG detektiert.

Ergebnisse

In den folgenden Untersuchungen werden die α -Pincs einerseits eingesetzt um die Effektivität von zwei verschiedenen Expressionsvektoren hinsichtlich der Transfektionseffizienz und Zelloberflächenexpression der P2X Rezeptoren zu analysieren. Darüber hinaus wird untersucht, wie zuvor in der Immunfluoreszenz (3.1.2), ob und inwiefern die α -Pincs auch mit verwandten Paralogen und Orthologen P2X Rezeptoren reagieren. Hierfür wurden wieder wie im vorigen Versuch jeweils HEK-Zellen 24 h nach Transfektion analysiert. **Abb. 25** zeigt die Ergebnisse für P2X1 spezifische α -Pincs, **Abb. 26** und **Abb. 27** die für P2X4 α -Pincs und **Abb. 28** die für P2X7 α -Pincs.

Die Ergebnisse zeigen in allen Fällen eine deutliche, heterogene, zweigipflige Anfärbung der transfizierten Zellen mit dem „passenden“ Immunsereum (schwarze Kurven). Nur in zwei Fällen läßt sich ein ähnlicher, zweigipfliger Kurvenverlauf auch bei Zellen finden, die mit einem paralogen P2X Rezeptor transfiziert wurden (rote Kurven): Das Kaninchen-anti-Maus P2X1 CR30 IS zeigt eine deutliche Kreuzreaktion mit dem hP2X1 Purinrezeptor (**Abb. 25 A**), der monoklonale Maus anti-human P2X7 Antikörper L4 zeigt eine deutliche Kreuzreaktion mit Ratten P2X7 (**Abb. 28 D**). Bei allen anderen Paralogen und Orthologen stellte sich ein homogener eingipfliger Kurvenverlauf dar, der nahezu deckungsgleich war mit dem der untransfizierten Zellen (grau gefüllt). Diese Ergebnisse sprechen für eine hohe Spezifität der untersuchten α -Pincs.

Bei den Vergleichsanaylsen von pCMVSPORT6 und pcDNA6 Expressionsvektoren waren die Ergebnisse der pCMVSPORT6 Transfektanten denen der pcDNA6 Transfektanten in zwei Fällen deutlich überlegen (**Abb. 25 A**: mP2X1, **Abb. 27**: hP2X4), in einem Fall waren sie ähnlich (**Abb. 25 B**: hP2X1).

Ergebnisse

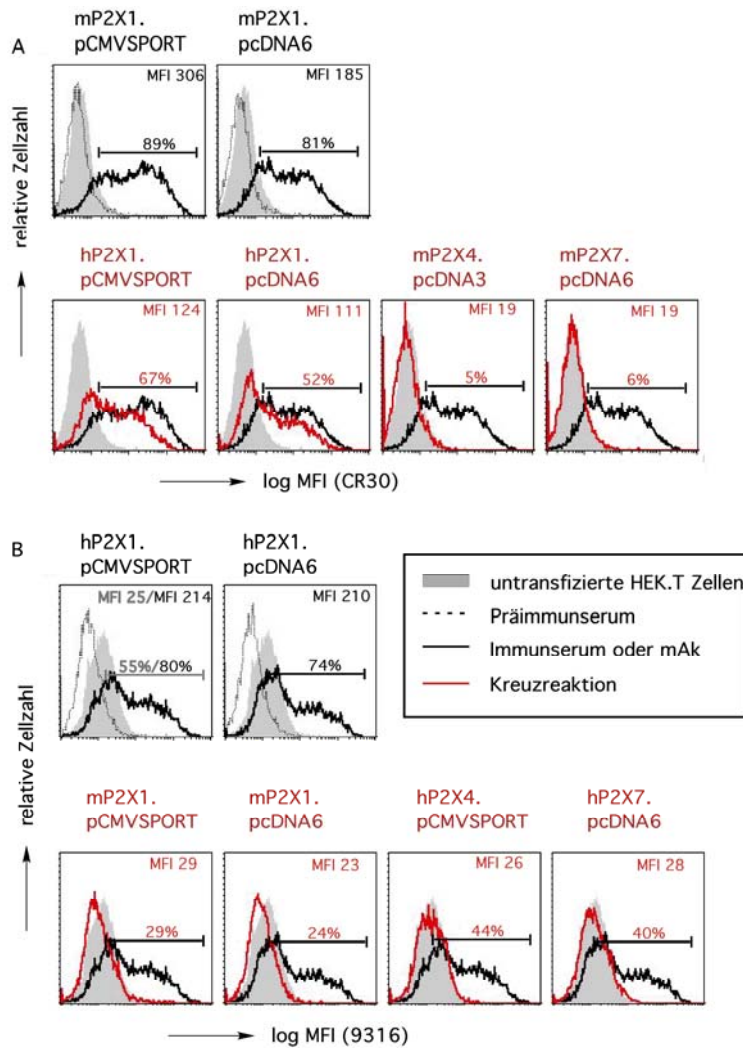


Abb. 25: FACS-Analysen an transient transfizierten HEK-Zellen zur Untersuchung von Reaktivität und Kreuzreaktivität der P2X1 Purinrezeptor spezifischen Immunsereen (CR30, 9316). Zur FACS-Analyse wurden HEK-Zellen mit Expressionskonstrukten für die P2X-Reihe transient transfiziert. Hierfür wurden die Expressionskonstrukte im pCMVSPORT- und pcDNA6-Vektor verwendet, wie über den Histogrammen notiert ist. (A) und (B) zeigen die Ergebnisse der FACS-Färbungen an untransfizierten Zellen (gefüllte Histogramme) und transfizierten Zellen (Linien) 24 h nach Transfektion mit den Immunsereen CR30 α -mP2X1 (A) und 9316 α -hP2X1 (B) (mit den in Tabelle 6 angegebenen Verdünnungsstufen) und anschließender Detektion gebundener Antikörper mittels PE-konjugierter anti-Kaninchen IgG. Die beiden Panel in der oberen Reihe vergleichen jeweils die Expressionsvektoren (graue Füllung: untransfizierte Zellen, gestrichelte Linie: Präimmunsereum, schwarz: Immunsereum). Die vier Panel in der unteren Reihe zeigen zusätzlich zur spezifischen Anfärbung (schwarze Linien) mögliche Kreuzreaktionen mit paralogen und orthologen Purinrezeptoren (rote Linien).

Ergebnisse

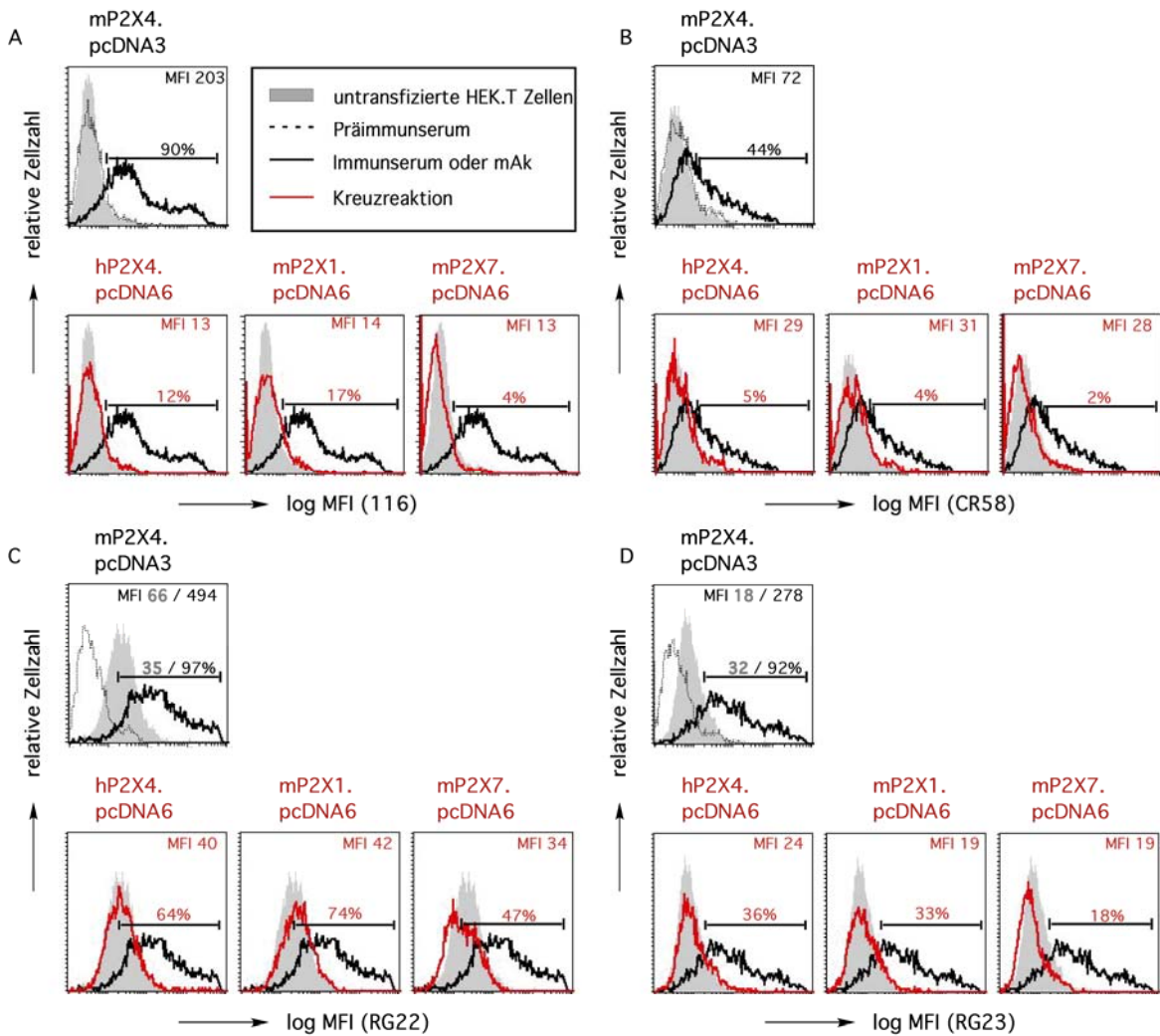


Abb. 26: FACS-Analysen an transient transfizierten HEK-Zellen zur Untersuchung von Reaktivität und Kreuzreaktivität der mP2X4 Purinrezeptor spezifischen Immunsereen (116, CR58, RG22, RG23). Zur FACS-Analyse wurden HEK-Zellen mit Expressionskonstrukten für die P2X-Reihe transient transfiziert. Hierfür wurden die Expressionskonstrukte im pcDNA3- und pcDNA6-Vektor verwendet, wie über den Histogrammen notiert ist. (A) bis (D) zeigen die Ergebnisse der FACS-Färbungen an untransfizierten Zellen (gefüllte Histogramme) und transfizierten Zellen (Linien) 24 h nach Transfektion mit den α -mP2X4 Immunsereen (mit den in Tabelle 6 angegebenen Verdünnungsstufen). Die zur Detektion eingesetzten Antikörper sind unter den Histogrammen notiert. Gebundene Antikörper wurden mit PE-konjugierten anti-Kaninchen, bzw. anti-Ratte IgG detektiert. Das Panel in der oberen Reihe zeigt jeweils die spezifische Anfärbung des α -Pinc im Vergleich zum Präimmunserum (graue Füllung: untransfizierte Zellen, gestrichelte Linie: Präimmunserum, schwarz: Immunserum). Die drei Panel in der unteren Reihe zeigen zusätzlich zur spezifischen Anfärbung (schwarze Linien) mögliche Kreuzreaktionen mit paralogen und orthologen Purinorezeptoren (rote Linien).

Ergebnisse

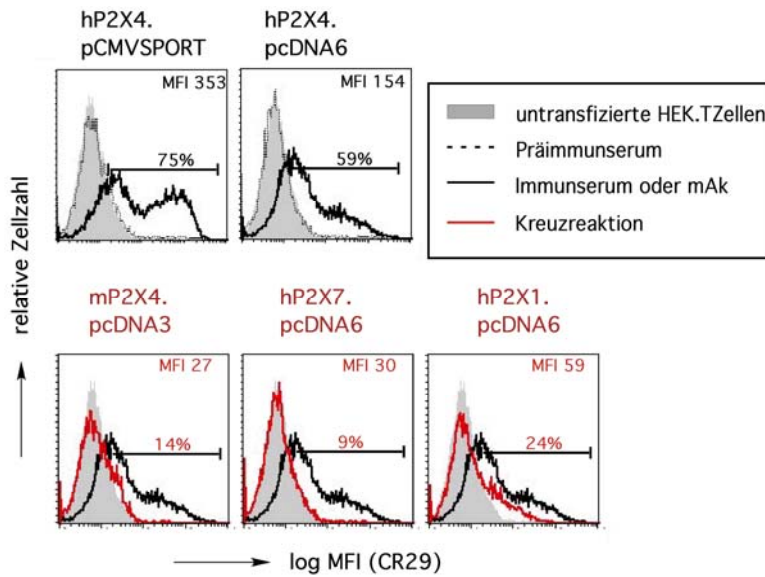
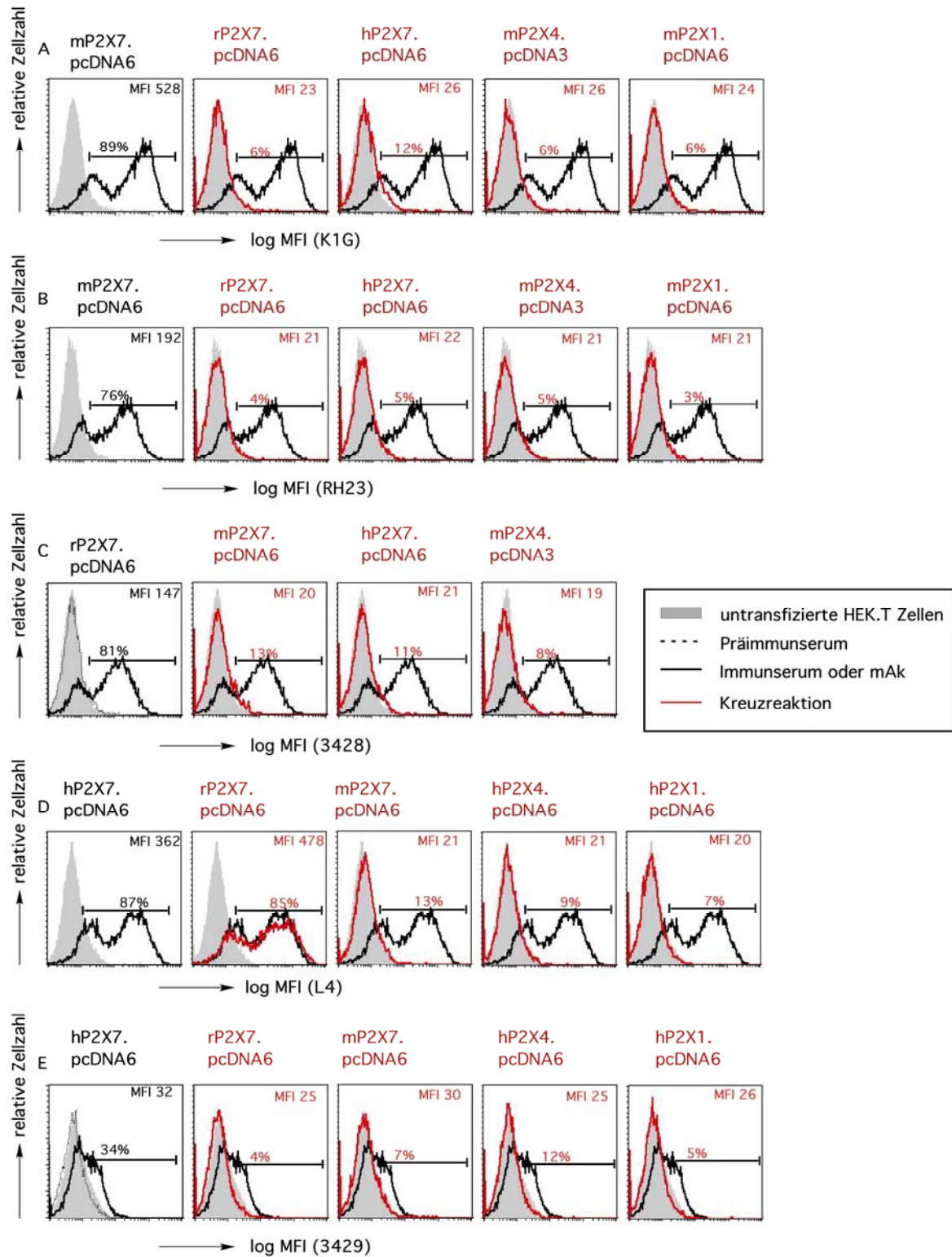


Abb. 27: FACS-Analysen an transient transfizierten HEK-Zellen zur Untersuchung von Reaktivität und Kreuzreaktivität der hP2X4 Purinrezeptor-spezifischen Immunsereen (CR29) Zur FACS-Analyse wurden HEK-Zellen mit Expressionskonstrukten für die P2X-Reihe transient transfiziert. Hierfür wurden die Expressionskonstrukte im pCMVSPORT- und pcDNA6-Vektor verwendet, wie über den Histogrammen notiert ist. **Abb. 27** zeigt die Ergebnisse der FACS-Färbungen an untransfizierten Zellen (gefüllte Histogramme) und transfizierten Zellen (Linien) 24 h nach Transfektion mit dem Immunsereum CR29 α -hP2X4 (in der in Tabelle 6 angegebenen Verdünnungsstufe) und anschließender Detektion gebundener Antikörper mittels PE-konjugierter anti-Kaninchen IgG. Die beiden Panel in der oberen Reihe vergleichen die Expressionsvektoren (graue Füllung: untransfizierte Zellen, gestrichelte Linie: Präimmunserum, schwarz: Immunsereum). Die drei Panel in der unteren Reihe zeigen zusätzlich zur spezifischen Anfärbung (schwarze Linien) mögliche Kreuzreaktionen mit paralogen und orthologen Purinorezeptoren (rote Linien).

Ergebnisse



Ergebnisse

Abb. 28: FACS-Analysen an transient transfizierten HEK-Zellen zur Untersuchung von Reaktivität und Kreuzreaktivität der hP2X7 Purinrezeptor spezifischen Immunsereen (K1G, RH23-A44, 3428, L4, 3429). Zur FACS-Analyse wurden HEK-Zellen mit Expressionskonstrukten für die P2X-Reihe transient transfiziert. Hierfür wurden die Expressionskonstrukte im pcDNA6-Vektor verwendet, wie über den Histogrammen notiert ist. (A) bis (E) zeigen die Ergebnisse der FACS-Färbungen an untransfizierten Zellen (gefüllte Histogramme) und transfizierten Zellen (Linien) 24 h nach Transfektion mit den α -P2X7 Immunsereen (mit den in Tabelle 6 angegebenen Verdünnungsstufen). Die zur Detektion eingesetzten Antikörper sind unter den Histogrammen notiert. Gebundene Antikörper wurden mit PE-konjugierten anti-Kaninchen IgG detektiert. Das jeweils erste Panel pro Reihe zeigt die spezifische Anfärbung des α -Pinc im Vergleich zum Präimmunserum (graue Füllung: untransfizierte Zellen, gestrichelte Linie: Präimmunserum, schwarz: Immunsereum). Die drei bis vier folgenden Panel in derselben Reihe zeigen zusätzlich zur spezifischen Anfärbung (schwarze Linien) mögliche Kreuzreaktionen mit paralogen und orthologen Purinrezeptoren (rote Linien).

Ergebnisse

3.1.4 Analyse der Reaktivität und der Kreuzreaktivität von Purinrezeptor spezifischen Immunsereen und monoklonalen Antikörpern mittels Western Blot Analysen an transient transfizierten HEK-Zellen

Wie im vorigen Abschnitt gezeigt, erkennen die hier untersuchten α -Pinc Antikörper ihr Antigen in der natürlichen Konformation. Im folgenden Abschnitt wird untersucht, ob diese Antikörper auch das Antigen im Western Blot Verfahren erkennen, bei dem das Antigen weitgehend denaturiert vorliegt. Hier wurden die Western Blot Analysen unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt, um die Disulfidbrücken der Proteine und damit die Tertiärstruktur der Proteine zumindest teilweise zu erhalten. Die Silberfärbung der gesamten Proteine zeigt ein heterogenes Muster an Banden (**Abb. 29**). Zur Detektion der Purinrezeptoren wurden die Immunsereen in zwei Verdünnungen eingesetzt, um wie in den anderen immunologischen Analysen den optimalen Antikörpertiter zu bestimmen (s. 2.1.5). Die Ergebnisse zeigen im Falle der α -Peptid Ak jeweils eine prominente Bande auf Höhe des erwarteten Molekulargewichts (Abb. 29, rechts, schwarze Pfeile; in den Spuren der mit murinem P2X Rezeptor transfizierten Zellen jeweils etwas deutlicher als bei den mit hP2X Rezeptoren transfizierten Zellen). Im Gegensatz zu den Präimmunsereen (nicht gezeigt), zeigen auch einige der α -Pinc eine deutliche Bande auf der gleichen Höhe, was für eine spezifische Färbung des P2X Purinrezeptors im Immunoblot spricht. Dieses gilt z.B. für CR30 α -mP2X1, welches eine deutliche Bande mit mP2X1, jedoch keine Kreuzreaktion mit dem Orthologen hP2X1 zeigt. Die Höhe dieser Bande entspricht dem vorhergesagten Molekulargewicht des mP2X1 Purinrezeptors (45 kDa). Den mP2X4 Purinrezeptor konnten alle vier verfügbaren anti-mP2X4 α -Pinc erkennen. Eine Kreuzreaktion wurde hier nicht beobachtet. CR29 α -hP2X4 erkennt ein Protein sehr deutlich, dessen Einzelbande der Höhe des vorhergesagten Molekulargewichts des hP2X4 von ca. 45 kDa ebenfalls sehr nah kommt. Außerdem zeigt dieses Serum eine deutliche Reaktion mit einem Markerprotein des Multi Mark bei ca. 31 kDa (α -Carboanhydrase, mit Stern gekennzeichnet). Das K1G α -mP2X7 Immunsereum erkennt ebenso wie die übrigen getesteten α -Pincs (RH23 A44 α -mP2X7, L4 α -hP2X7, 9316 α -hP2X1, 3428 α -rP2X7, 3429 α -hP2X7) die jeweiligen P2X Purinrezeptoren nicht im Immunoblot (wird nicht gezeigt). Der α -P2X7 C-Term färbt eine deutliche Bande auf Höhe von 75 kDa, welches

Ergebnisse

etwa dem vorhergesagten Molekulargewicht entspricht (Collo 1997), sowie eine zusätzliche Bande bei ca. 120 kDa, die allerdings auch in untransfizierten Zellen erscheint und vermutlich unspezifisch ist.

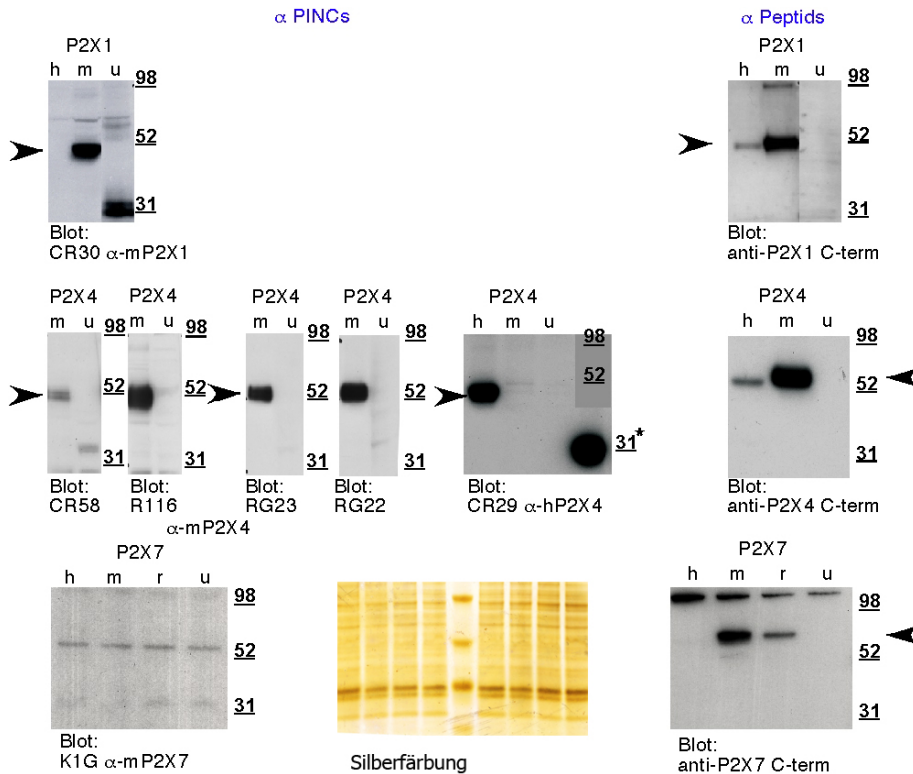


Abb. 29: Untersuchung der Reaktivität und Kreuzreaktivität der P2X Purinrezeptor spezifischen Immuseren im Western Blot. Ganzzelllysate aus transient transfizierten HEK.T-Zellen wurden 24h nach Transfektion mit den jeweiligen Konstrukten für murin (m), human (h) P2X1/4/7 oder untransfizierte Zellen (u) durch Ultraschallbehandlung in SDS-PAGE Probenpuffer angefertigt. Proteine in Lysaten wurden neben dem Größenmarker (MultiMark) aufgetragen und mittels SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen (ohne das Reduktionsmittel DTT, für die α -Pinc) bzw. reduzierenden Bedingungen (für α -Peptid) aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden in zwei Richtungen zunächst für 1 Minute auf eine NC- und dann für 90 Minuten auf eine PVDF-Membran transferiert. Die gesamten übertragenen Proteine wurden mittels Silberfärbung der NC-Membran visualisiert (gezeigt ist ein repräsentativer Blot). Die Immundetektion der P2X Purinrezeptoren erfolgte auf der PVDF-Membran mit dem jeweils unter dem Blot angegeben α -Pinc bzw. α -Peptid Immuserum (mit der in **Tabelle 1** angegebenen Verdünnung). Die α -Peptid Seren sind gegen eine Peptid-Sequenz aus dem jeweiligen Ratten P2X-Rezeptor gerichtet (s. **Abb. 3**). Gebundene Antikörper wurden mit einem Peroxidase konjugierten Esel-anti-Kaninchen IgG detektiert (1:5000). Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem "ECL Western blotting detection reagent".

Ergebnisse

3.1.5 Untersuchung der Fähigkeit zur Immunpräzipitation der α -Pinc Immunseren

Antikörper, die ihr Zielprotein in natürlicher Konformation erkennen, eignen sich unter Umständen auch zur Aufreinigung des Proteins. Um zu testen, ob die hier vorgestellten α -Pincs dafür geeignet sind, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Hierfür wurden transient mit dem P2X Purinrezeptor transfizierte HEK-Zellen mit dem nicht-ionischen Detergenz Triton-X-100 lysiert, welches anders als das für die Western-Blot Versuche verwendete SDS Proteine nicht denaturiert. Für die Immunpräzipitation wurden die α -Pinc Antikörper an Protein-G-Sepharose gekoppelt und anschließend mit Lysaten aus transfizierten und untransfizierten Zellen inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die präzipitierten Proteine in der SDS-Page aufgetrennt. Die Silberfärbung zeigt deutliche erkennbare Banden auf Höhe von 25 kDa und 50 kDa, die der leichten und schweren Kette der an Protein G gebundenen Antikörper entsprechen. Für die folgende Immundetektion der präzipitierten Purinrezeptoren wurden die jeweils passenden Kaninchen α -Peptid Antikörper verwendet. Um eine Reaktion der Zweitantikörper mit den für die Präzipitation eingesetzten Antikörperbanden zu minimieren, wurden zur Detektion der gebundenen α -Peptid Antikörper Zweitantikörper eingesetzt, die spezifisch für die native Konformation von Kaninchen IgG sind (sogenannte Trueblot Ak). Wie in der **Abb. 30** zu sehen ist, ergeben alle untersuchten α -Pinc-Immunpräzipitate aus transfizierten Zellen (t), nicht aber aus untransfizierten Zellen (u), mehr oder weniger starke Banden mit dem erwarteten Molekulargewicht im anschließenden Immunoblot mit dem α -Peptid Antikörper. Bei den schwachen Banden in Höhe von 50 kDa handelt es sich wahrscheinlich um die schwere Kette der Immunglobuline.

Ergebnisse

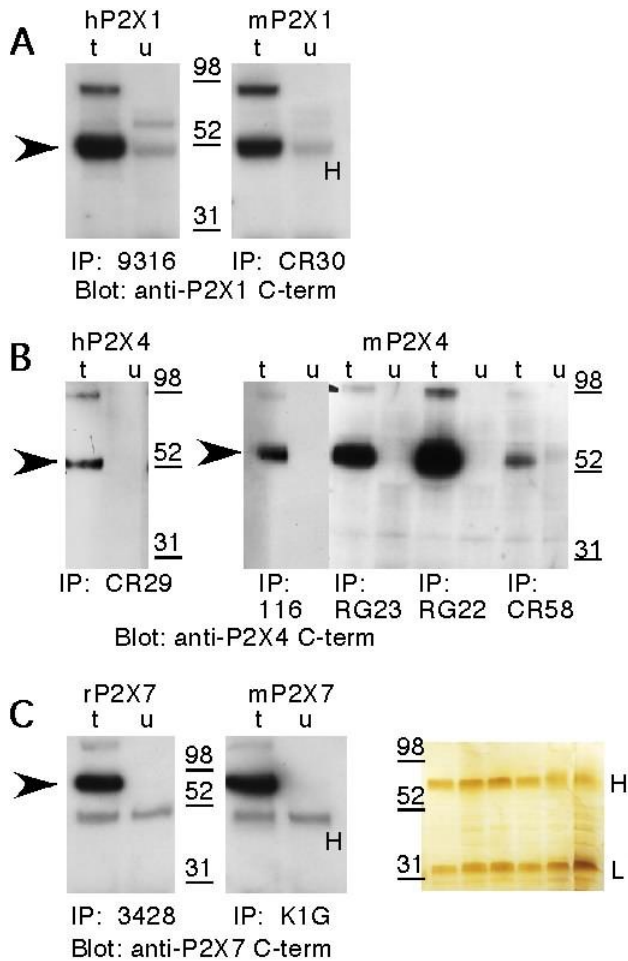


Abb. 30: Untersuchung der Fähigkeit der Immunsereen zur Immunpräzipitation (IP).

Triton X 100 Lysate aus untransfizierten (u) oder transient transfizierten (t) HEK.T-Zellen wurden 24h nach Transfektion mit den jeweiligen o.a. Konstrukten für murin (m), human (h), ratten (r) P2X1/4/7 hergestellt. Nach einer Vorklärung mit Protein-G-Sepharose Matrix, wurden die Lysate jeweils mit den unten angegebenen Protein-G-Sepharose gebundenen Antikörpern (IP) inkubiert. Nach SDS-PAGE der Matrix-gebundenen Proteine erfolgte wie in **Abb. 29** das Blotten der Proteine auf zwei Membranen. Die Gesamtproteine wurden mittels Silberfärbung der NC Membran sichtbar gemacht, gekennzeichnet sind hier jeweils die leichte (L) und die schwere (H) Immunglobulinkette. Die Detektion der präzipitierten Purinrezeptoren erfolgte mit den α -Peptid Antikörpern. Als Zweitantikörper wurde der α -Kaninchen Trueblot (HRP) verwendet.

3.2 Endogene Expression von Purinrezeptoren auf etablierten Zelllinien und primären Zellen

Mit der Frage nach einer möglichen endogenen Expression von P2X Purinrezeptoren wurden im folgenden Abschnitt mit den verfügbaren α -Pins mittels FACS-Analysen zum einen sechs murine und acht humane Zelllinien, zum anderen primäre Lymphknoten-, Knochenmarks- und Blutzellen aus der Maus untersucht. Die Ergebnisse der Zelllinien sind in **Tabelle 7** zusammengefasst und in den **Abb. 31** und **Abb. 32** exemplarisch illustriert.

Zelllinie	CR30 α -mP2X1	9316 α -hP2X1	116 α -mP2X4	CR58 α -mP2X4	RG22 α -mP2X4	RG23 α -mP2X4	CR29 α -hP2X4	K1G α -mP2X7	L4 α -hP2X7
A20	(+)	-	(+)	+	(+)	(+)	(+)	(+)	-
DO11.10	(+)	-	-	+	+	(+)	-	+	-
MD27	-	-	-	+	+	(+)	-	+	-
YAC.HH	-	-	-	+	+	(+)	-	+	-
RAW			-	+	+	(+)	-	-	
J774			-	(+)	(+)	-	-	+	
Jurkat	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H9	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-
THP.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HEK.CS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HEK.T	-	+	-	-	-	-	-	-	-
HeLa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LNCaP	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 7: Untersuchung von etablierten Zelllinien auf endogene Expression von m/hP2X1/4/7-Purinrezeptoren. Sechs Maus- und acht Human-Zelllinien wurden auf endogene Expression der P2X1-/4-/7-Purinrezeptoren im FACS getestet. Im Screening wurden die verfügbaren anti-P2X1/4/7-Antikörper in der jeweils optimalen Verdünnung zur FACS-Färbung eingesetzt (wie in **Tabelle 6** beschrieben). Gebundene Antikörper wurden mit PE-konjugierten anti-Kaninchen bzw. anti-Ratte IgG detektiert. „+“: spezifische Reaktion, „(+“: eine äußerst schwache Färbung oder eine unspezifische Reaktion, beispielsweise eine Färbung mit dem Präimmuns serum, „-“: keine detektierbare Reaktion.

3.2.1 Analyse der Purinrezeptor-Expression auf murinen Zelllinien

Die murine B-Lymphomzelllinie A20 zeigte nach FACS-Färbung mit den α -Pinc lediglich mit CR58 (α -mP2X4) eine eindeutige Reaktion, wie in **Abb. 31** zu sehen ist. Alle anderen Immunsereen reagierten äußerst schwach oder unspezifisch, d.h. das Präimmunsereum färbte die Zellen bereits. DO11.10-Zellen sind T-T-Hybridomzellen aus der Maus und reagieren mit dem K1G (α -mP2X7), CR58 (α -mP2X4) und RG22 (α -mP2X4). MD27 ist ebenfalls eine T-T-Hybridomzelllinie, die etwas schwächer als die DO11.10, aber doch eindeutig mit dem CR58 (α -mP2X4) und RG22 (α -mP2X4) reagiert. K1G (α -mP2X7) färbt auch diese Zellen stark an. Die von einem MLV-transformierten T-Lymphom abstammende YAC.HH Zelllinie lässt sich ebenfalls deutlich mit CR58 (α -mP2X4), RG22 (α -mP2X4) und K1G (α -mP2X7) anfärben. Die beiden Makrophagen-Zelllinien RAW und J774 wurden lediglich auf Expression des mP2X4 und mP2X7 Purinrezeptors getestet. Dabei zeigten die RAW eine Reaktion mit CR58 (α -mP2X4) und RG22 (α -mP2X4), J774 ließ sich zusätzlich mit K1G (α -mP2X7) anfärben. Mit allen anderen α -Pinc gab es gar keine oder nur eine unspezifische Anfärbung (nicht gezeigt).

Ergebnisse

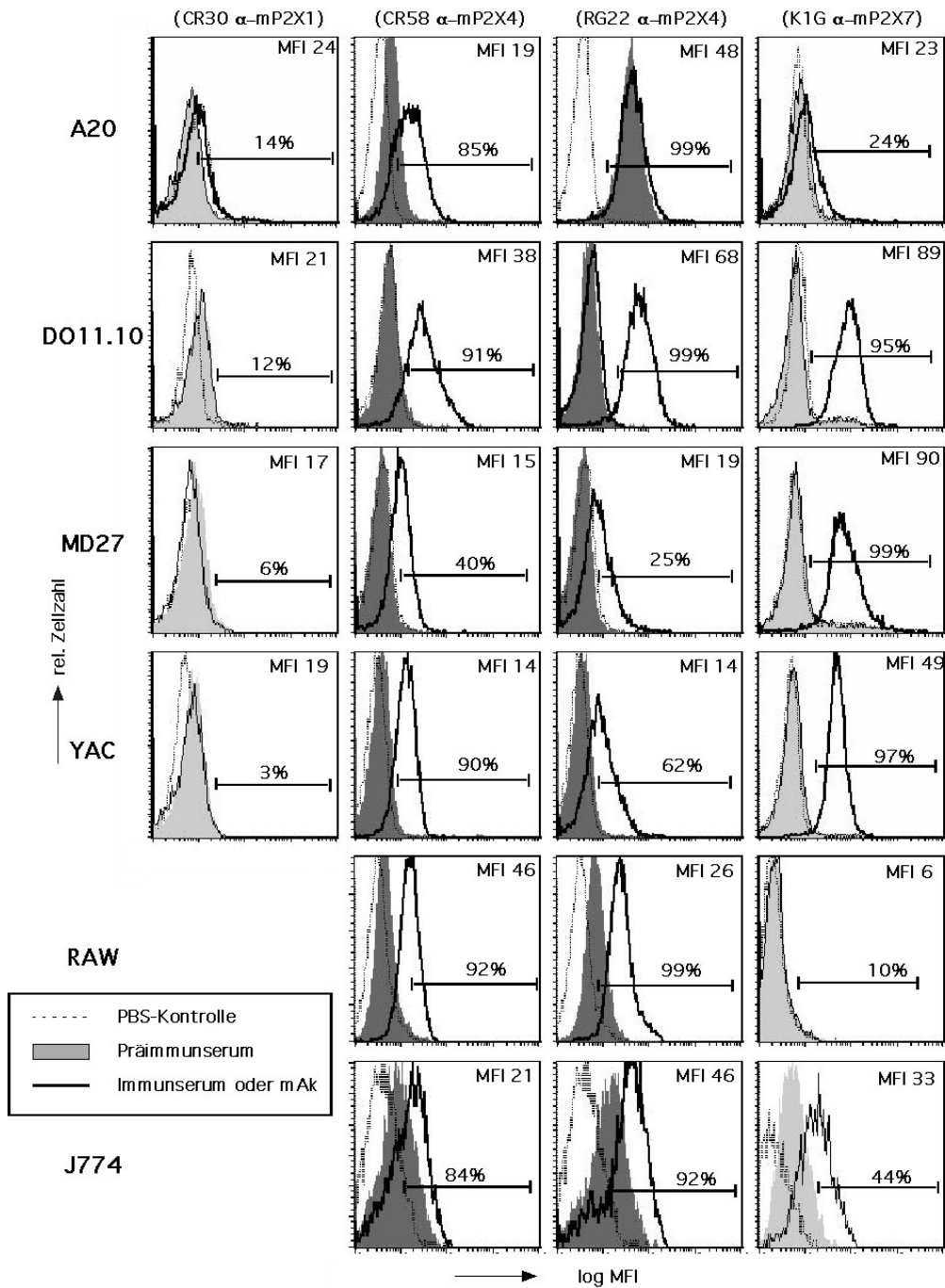


Abb. 31: Untersuchung von etablierten Zelllinien auf natürliche Expression des murinen Purinrezeptors (repräsentative FACS-Analyse). Sechs murine Zelllinien wurden auf endogene P2X1/4/7-Expression im FACS getestet. Im Screening wurden die verfügbaren α -Pincs in der jeweils optimalen Verdünnung zur FACS-Färbung eingesetzt (s. Tabelle 6). Gebundene Antikörper wurden mit PE-konjugierten anti-Kaninchen, bzw. anti-Ratte IgG detektiert. Für jedes Panel wird die spezifische Anfärbung des α -Pinc im Vergleich zum Präimmunserum gezeigt (gestrichelte Linie: PBS-Kontrolle, graue Füllung: Präimmunserum, schwarz: Immunsersum oder mAk).

Ergebnisse

3.2.2 Analyse der Purinrezeptor-Expression auf humanen Zelllinien

Bei der H9 handelt es sich um eine kutane T-Lymphomzelllinie. Wie in **Abb. 32** zu sehen ist, reagieren diese Zellen schwach mit dem 9316 (α -hP2X1). Die embryonale Nierenzelllinie HEK.T lässt sich hingegen stärker mit dem 9316 (α -hP2X1) anfärben. LNCaP-Zellen stammen aus einem Prostatakarzinom aus dem supraclaviculären Lymphknoten eines 50 Jahre alten Mannes. Sie reagieren ebenfalls deutlich mit dem 9316 (α -hP2X1) Immunsereum. Am Beispiel der HeLa-Zellen, einer humanen Zervixkarzinom-Zelllinie, sieht man die fehlende Reaktion der übrigen getesteten α -Pincs. Untersucht wurden dabei unter anderem die T-Lymphomzelllinie Jurkat, die AML-Zelllinie THP.1, die Erythroleukämiezelllinie HEL und die embryonale Nierenzelllinie HEK.CS. Hier konnte jeweils keine endogene P2X-Expression entdeckt werden.

Ergebnisse

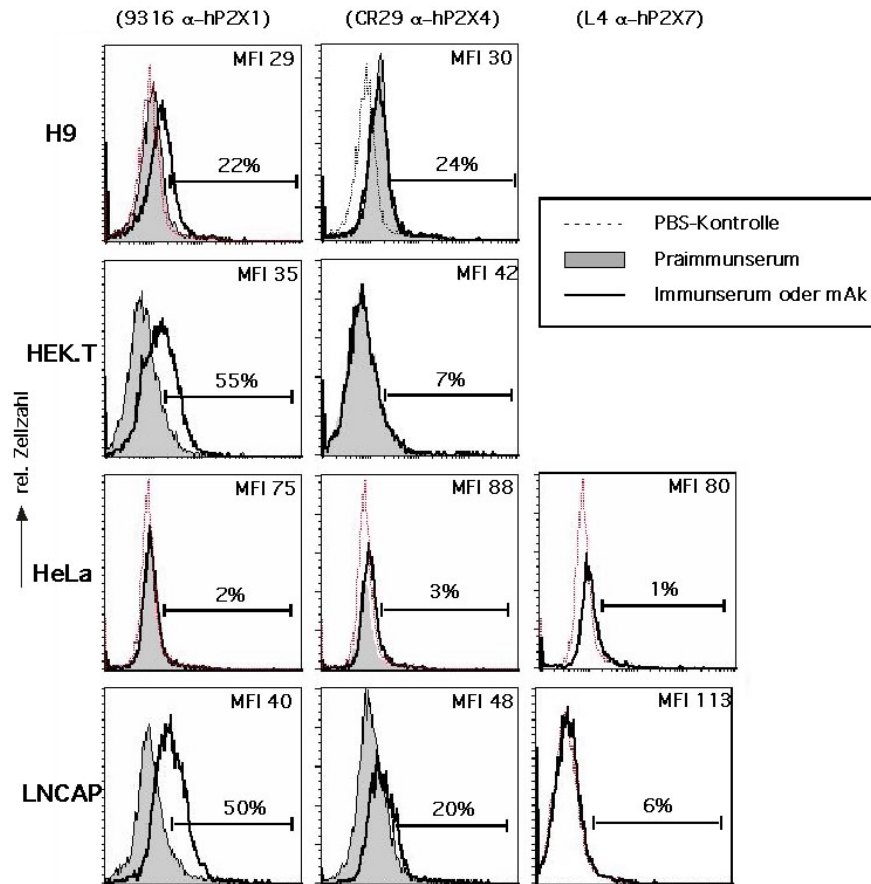


Abb. 32: Untersuchung von etablierten Zelllinien auf natürliche Expression des humanen Purinrezeptors (repräsentative FACS-Analyse). Acht humane Zelllinien wurden auf endogene P2X1/4/7-Expression im FACS getestet. Im Screening wurden die verfügbaren α -Pincs in der jeweils optimalen Verdünnung zur FACS-Färbung eingesetzt (s. Tabelle 6). Gebundene Antikörper wurden mit PE-konjugierten anti-Kaninchen IgG, bzw. anti-Maus IgG detektiert. Für jedes Panel wird die spezifische Anfärbung des α -Pinc im Vergleich zum Präimmunserum gezeigt (gestrichelte Linie: PBS-Kontrolle, graue Füllung: Präimmunserum, schwarz: Immunserum). Für den mAk L4 steht kein Präimmunserum zur Verfügung, daher erfolgt hier nur der Vergleich mit der PBS-Negativkontrolle.

Ergebnisse

3.2.3 Analyse der Purinrezeptor-Expression auf primären murinen Lymphozyten

Neuere Untersuchungen deuten an, dass regulatorische T-Zellen besonders empfindlich gegenüber dem durch extrazelluläre Nukleotide induzierten Zelltod sind (Aswad, Kawamura et al. 2005; Elliott, Surprenant et al. 2005) (s. Einleitung: 1.3.1). Deshalb sollte mit den im nächsten Abschnitt beschriebenen Versuchen insbesondere die Expression von P2X7 auf diesen Zellen näher untersucht werden. Die Abb. 33 zeigt die Ergebnisse der vergleichenden FACS-Analyse von Lymphozyten der B6 Wildtyp Maus mit denen der P2X7 Knock-out Maus (P2X7 KO). Hierfür wurden die frisch präparierten Lymphknotenzellen mit Antikörpern für die T-Zell-Marker CD4 und CD25, sowie für den Purinrezeptor P2X7 gefärbt. Für die Auswertung wurden die Lymphozyten im Vorwärts- und Seitwärts-Scatter der Größe und Granularität nach als Population erkannt und in ein Gate eingeschlossen (**Abb. 33A**, panel 1, 5). Es fällt auf, dass die Population von CD4⁺ CD25⁺ doppelt positiven Lymphozyten, die auch als Tregs bezeichnet werden, bei der P2X7 Knock-out Maus deutlich zellreicher ist als beim Wildtyp (**Abb. 33A**, panel 2, 6). Nach dem ‚gating‘ auf CD4⁺ Th-Zellen fällt auf, dass die CD25⁺ Tregs P2X7 deutlich stärker auf der Zelloberfläche exprimieren als die konventionellen CD25⁻ Th-Zellen (**Abb. 33A**, panel 4, 8 und B, panel 1, 2). Überraschenderweise zeigen auch die Zellen aus P2X7 KO Mäusen eine, wenngleich auch nur sehr schwache, Anfärbung für P2X7 (**Abb. 33A**, panel 4, 8 und B, panel 1, 2).

Ergebnisse

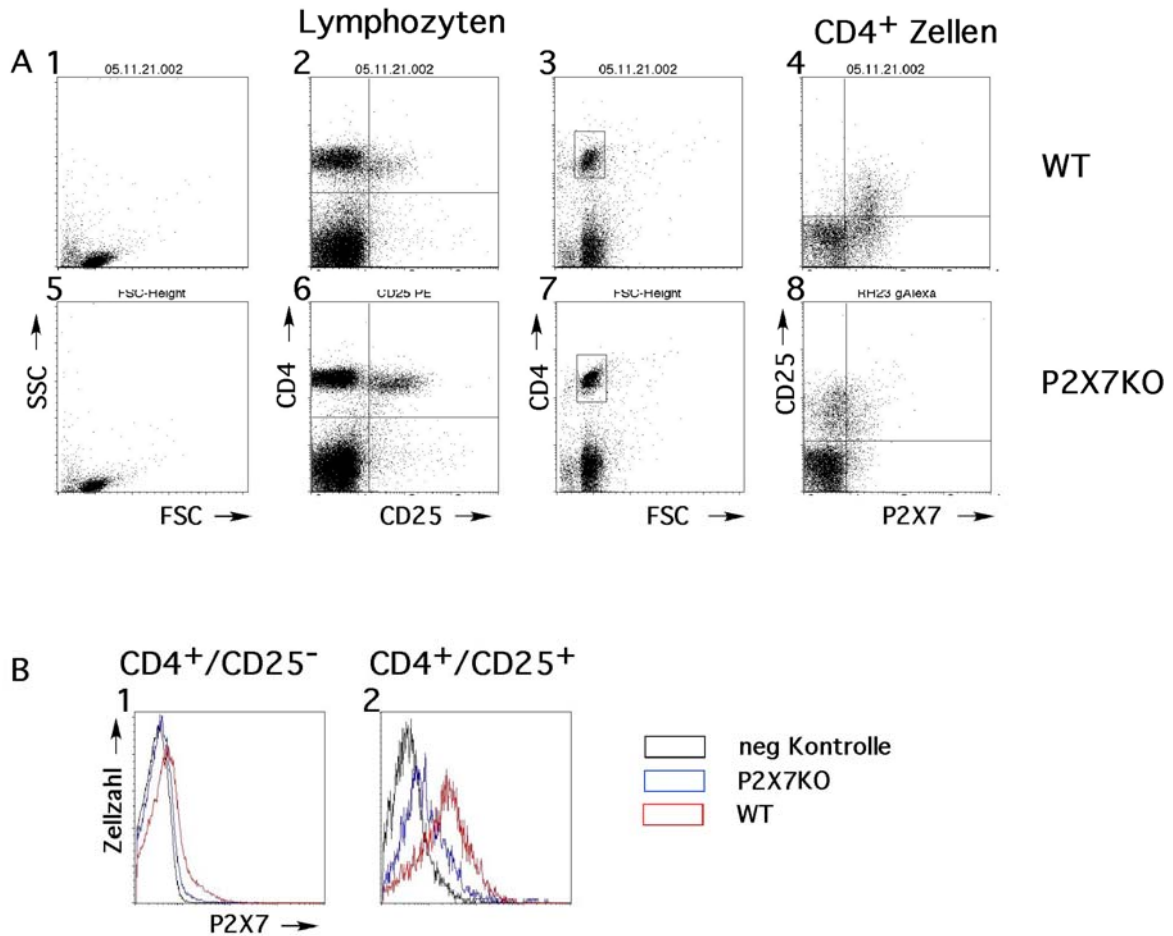


Abb. 33: Analyse der endogenen P2X7 Expression auf primären murinen CD4⁺CD25⁺-Lymphozyten. Für die FACS-Analysen wurden je $1 \cdot 10^6$ Lymphknotenzellen mit α -mP2X7-Alexa488 RH23-A44 (1:100), α -mCD4 APC (1:100) und α -CD25 PE (1:100) gefärbt. (A) Hier werden Zellen der B6 Wildtyp Maus (Panel 1-4) mit denen der P2X7 Knock-out Maus (P2X7KO) (Panel 5-8) verglichen. Die Th-Zellen werden auf eine gleichzeitige Expression der CD4⁺ und CD25⁺ Oberflächenrezeptoren, sowie des P2X7 Purinrezeptors untersucht. (B) Panel 1 zeigt die P2X7 Anfärbung der herkömmlichen CD4⁺ T-Zellen (CD4⁺ CD25⁻), Panel 2 die der regulatorischen T-Zellen (CD4⁺ CD25⁺). Es wird jeweils die Fluoreszenzintensität der P2X7-Färbung von Wildtyp-Zellen (rot) mit der von P2X7-Knock-out-Zellen (blau) verglichen.

Neben der hohen Expression von CD25 zeichnen sich Tregs auch durch eine niedrige Expression von CD45RB aus. Die **Abb. 34** zeigt die Ergebnisse der vergleichenden FACS-Analyse von Lymphozyten der B6 Wildtyp Maus mit denen der P2X7 Knock-out Maus. Hierfür wurden die frisch präparierten Lymphknotenzellen mit Antikörpern für die T-Zell-Marker CD3 und CD45RB, sowie für den Purinrezeptor P2X7 gefärbt. Für die Auswertung wurden die Lymphozyten im Vorwärts- und Seitwärts-Scatter der Größe

Ergebnisse

und Granularität nach als Population erkannt und in ein Gate eingeschlossen. Ähnlich wie bei der vorigen Untersuchung, erscheint auch hier die Population der CD3⁺ CD45RB^{low} T-Lymphozyten beim Wildtyp etwas zellärmer zu sein als bei der P2X7 Knock-out Maus (**Abb. 33A**, panel 2, 5). Diese Population exprimiert zudem den P2X7 Purinrezeptor deutlich kräftiger als die Population der CD45RB^{high}-Zellen (**Abb. 33A**, panel 4, 8). Auch hier fällt eine schwache Anfärbung der CD45RB^{low}-Zellen bei der P2X7 KO Maus auf.

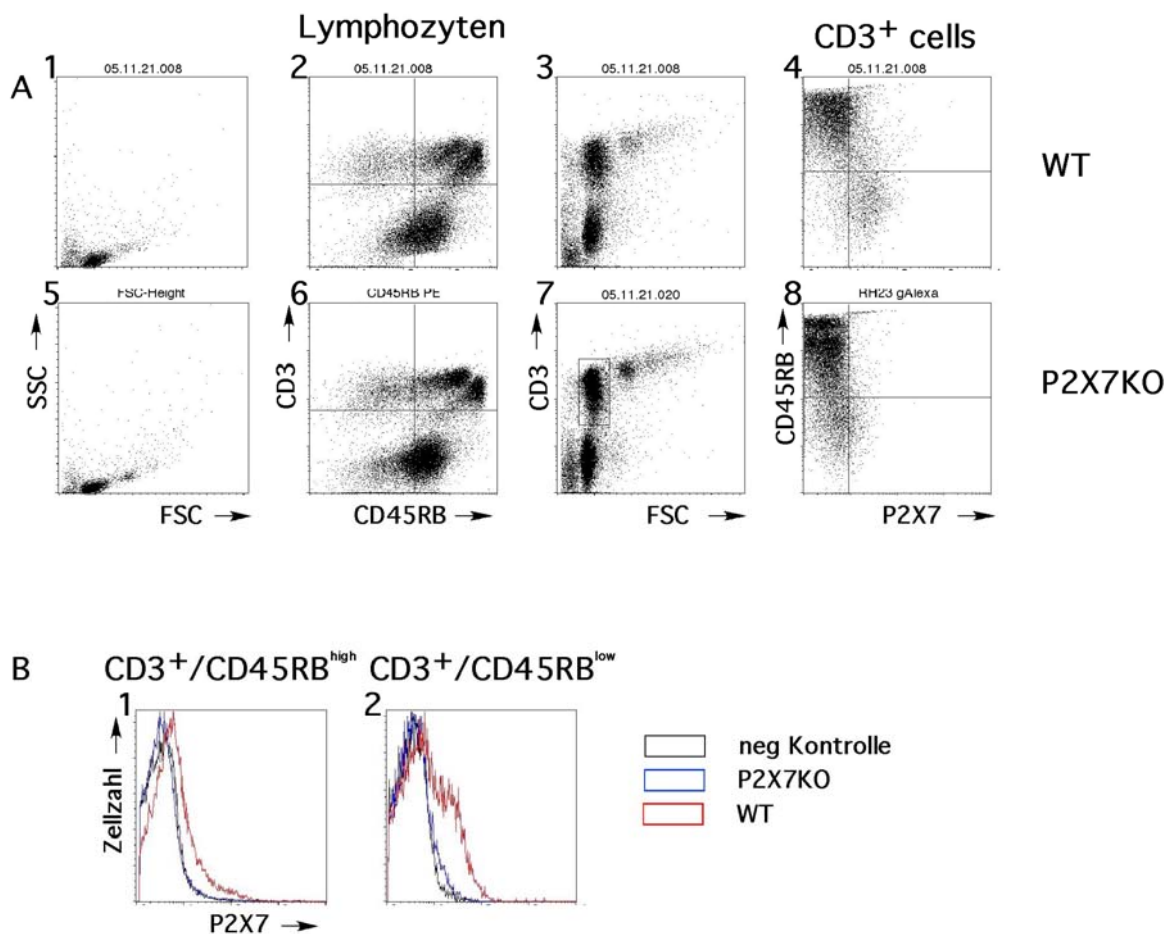


Abb. 34: Analyse der endogenen P2X7 Expression auf primären murinen CD3⁺-CD45RB^{high/low}-Lymphozyten. Für die FACS-Analysen wurden je 1*10⁶ Lymphknotenzellen mit α-mP2X7-Alexa488 RH23-A44 (1:100), α-mCD3e APC (1:100) und α-CD45RB PE (1:100) gefärbt. (A) Hier werden die T-Lymphozyten der B6 Wildtyp Maus (Panel 1-4) mit denen der P2X7 Knock-out Maus (P2X7KO) (Panel 5-8) verglichen. Die T-Zellen werden auf gleichzeitige Expression der CD3⁺ und CD45RB Oberflächenrezeptoren, sowie des P2X7 Purinrezeptors untersucht. (B) Panel 1 zeigt die P2X7 Anfärbung der herkömmlichen CD3⁺ T-Zellen, die CD45RB^{high} stark exprimieren, Panel 2 die der regulatorischen CD45RB^{low} Population. Es wird jeweils die Fluoreszenzintensität der P2X7-Färbung des Wildtyps (rot) mit der Knock-out Maus (blau) verglichen.

Ergebnisse

3.2.4 Analyse der Purinrezeptor-Expression auf primären murinen Knochenmarkszellen

Das Knochenmark liefert eine Fülle von Vorläuferzellen des Immunsystems, welche teilweise bereits die Oberflächenmoleküle der ausgereiften Immunzellen exprimieren. In der Abb. 35 wurde die Expression des P2X7 Purinrezeptors auf den CD11b positiven Makrophagen, den CD3⁺ positiven T-Zellen, den CD41⁺ positiven Megakaryozyten, sowie auf den 8 Tage in vitro unter GM-CSF gereiften Dendritischen Zellen (BMDC, Bone marrow derived dendritic cells) untersucht. Vorläufer der Makrophagen, T-Zellen und Megakaryozyten aus der Wildtyp Maus haben jeweils eine kleine Zellpopulation, die sich mit dem α -mP2X7 mAk RH23-A44 anfärben lässt und nicht in der P2X7 Knock-out Maus zu finden ist. Von den 8 Tage lang gereiften BMDC lassen sich beim Wildtyp fast alle Zellen für P2X7 anfärben, allerdings zeigen auch die BMDCs der P2X7 Knock-out Maus eine schwache Anfärbung im Vergleich zur Negativkontrolle.

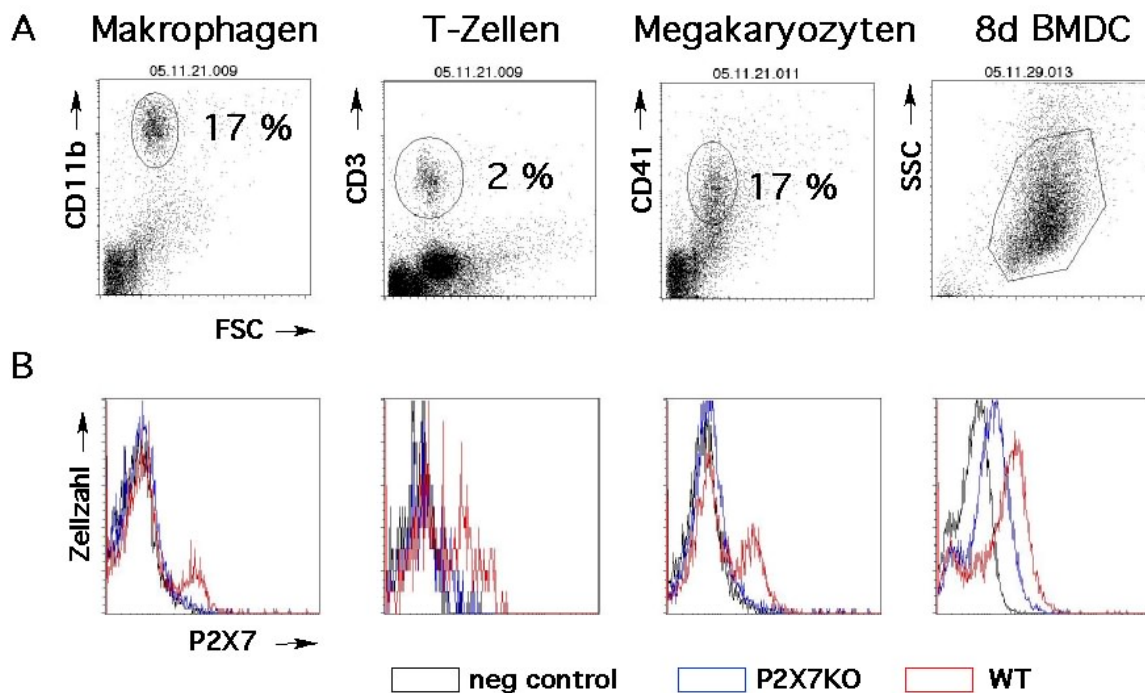


Abb. 35: Analyse der endogenen P2X7 Expression auf primären murinen Knochenmarkszellen und auf in vitro gereiften BMDC. Primäre Knochenmarkszellen wurden mit anti-CD11b-PE oder anti-CD44PE, anti-CD3-APC, und anti-P2X7-Alexa488 angefärbt. (A) Die Gates werden so gesetzt, dass Makrophagen, Lymphozyten, Megakaryozyten und Dendritische Zellen eingeschlossen sind. (B) Die Histogramme zeigen die P2X7-Expression der in A eingegrenzten Zellpopulationen aus WT (rot) und P2X7-KO (blau) Mäusen.

Ergebnisse

3.2.5 Analyse der Purinrezeptor-Expression auf primären murinen Blutthrombozyten

Die im Blutplasma befindlichen Thrombozyten wurden auf eine Expression des P2X7 Purinrezeptors untersucht. Hierfür wurden Thrombozyten aus der B6 Wildtyp Maus mit denen der P2X7 Knock-out Maus verglichen. Wie man in der **Abb. 36** sieht, lassen sich fast alle Thrombozyten des Wildtyps mit dem K1G α -mP2X7 Immunsersum anfärben, während die Thrombozyten der Knock-out Maus eine schwächere Färbung erkennen lassen.

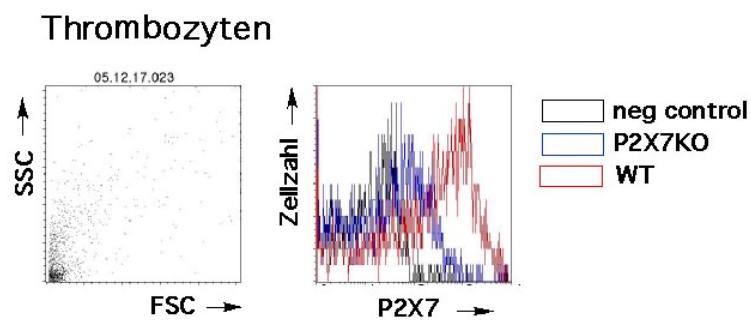


Abb. 36: Analyse der endogenen P2X7 Expression auf murinen Thrombozyten aus dem Blut. Je 100 μ l retroorbital entnommenes Heparinblut wird 10min bei 1400rpm zentrifugiert und die sich im Überstand, dem Blutplasma, befindenden Thrombozyten werden mit zuvor gekoppeltem Erst- und Zweitantikörper (je 5 μ g des mP2X7 pAk's und 0,5 μ g anti-Kaninchen - PE's für 30 min auf dem Roller vorinkubiert) gefärbt.

3.3 Untersuchung der ADP-Ribosylierung von Purinrezeptoren

Frühere Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass der murine P2X7 Rezeptor an zwei Argininresten durch die murine Ecto-ADP-Ribosyltransferase ART2.2 ADP-ribosyliert wird (Adriouch, Bannas et al. 2008), s. Einleitung **Abb. 10**. Ein Aminosäuresequenz-Alignment zeigt, dass R125 neben der Maus bei Ratten und Human P2X7, nicht aber bei P2X1 oder P2X4 konserviert ist und R133 neben der Maus nur bei human P2X7 vorkommt (**Abb. 3**). Es stellte sich die Frage, ob neben P2X7 auch andere P2X Rezeptoren ADP-ribosyliert werden können. Im folgenden Abschnitt wird dieser Frage mit Hilfe von ART2.2 Purinrezeptor kotransfizierten Zellen, einem radioaktiven ADP-Ribosylierungsassay und α -Pinc vermittelter Immunpräzipitation nachgegangen.

3.3.1 Analyse der ADP-Ribosylierung von nativen Purinrezeptoren nach stabiler Kotransfektion mit der ART2.2 ADP-Ribosyltransferase in CHO-Zellen

Doppeltransfektanten, die einerseits eine ART und andererseits einen P2X Purinrezeptor exprimieren, lassen sich gut für ADP-Ribosylierungs-Analysen verwenden. In unserem Institut standen bereits Zellen zur Verfügung, welche zuvor mit der ART2.2 stabil transfiziert wurden, die CHO.NOD-Zellen. Für den mP2X7 Purinrezeptor existierte ferner bereits die Doppeltransfektate CHO.NOD.mP2X7. Eine stabile Transfektion wird durch Selektion mit einem Antibiotikum erleichtert, wenn auf dem gleichen Konstrukt eine Antibiotikaresistenz kodiert ist. Da die Konstrukte für mP2X1, hP2X1 und hP2X4 nur im pCMVSPORT Vektor zur Verfügung standen, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Umklonierung in den pcDNA6 Vektor, siehe 2.2.2.8. Für die Herstellung der weiteren stabilen Ko-Transfektanten wurden die P2X-Expressionsvektoren linearisiert und anschließend in CHO.NOD-Zellen transfiziert. Eine Linearisierung der Plasmide erleichtert die Integration in das Genom nach Transfektion. Anschließend wurden die doppelt transfizierten Zellen mit Blasticidin selektioniert. Teilweise verlieren die Zellen ihre Expressionsfähigkeit nach einiger Zeit wieder, bzw. werden durch negative Zellen im Wachstum verdrängt. Um die Zellen dazu zu bringen, den P2X Purinrezeptor dauerhaft zu exprimieren, wurden die negativen Zellen ohne P2X-Expression

Ergebnisse

aussortiert. Hierzu wurden P2X stark exprimierende Zellen mittels magnetischer Sortierung wiederholt angereichert. Die **Abb. 37** zeigt Kontroll-FACS-Anfärbungen jeweils nach einer Sortierung. Bei den CHO.NOD.mP2X1, CHO.NOD.hp2X1 und CHO.NOD.hp2X4 waren drei Sortierungen notwendig, um einen hohen Anteil an P2X-positiven Zellen zu erhalten. Das Immunsereum 9316 α -hP2X1 färbt dabei die Transfektanten etwas schwächer. Die Immunsereen 3428 α -rP2X7 und der mAk L4 α -hP2X7 sind hingegen viel stärker in ihrer Färbung und somit auch in der Fähigkeit, die positiven Zellen bei der EasySep Methode zu markieren. Daher mussten diese Zellen nur zweimal magnetisch sortiert werden.

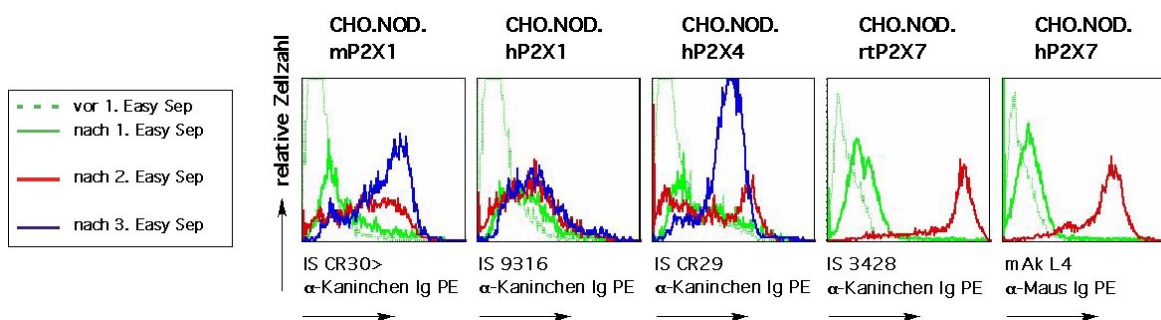


Abb. 37: Herstellung und Sortierung von stabil mit ART2.2 und P2X kotransfizierten CHO-Zellen. Zur FACS-Analyse wurden CHO.NOD-Zellen mit Expressionskonstrukten für die P2X-Reihe transient transfiziert. Hierfür standen zuvor nicht alle Expressionskonstrukte (Beschriftung über den Panels) im pcDNA6-Vektor zur Verfügung und mussten z.T. erst umkloniert werden (s. 2.2.2.8), da dieser eine Blasticidinresistenz besitzt. Ab dem 2. Tag nach Transfektion wurden die Zellen dauerhaft mit Blasticidin selektioniert, so dass Zellen ohne diese Resistenz abstarben. Bei der EasySep-Sortierung werden die Zellen zunächst wie in **Abb. 25** bis **Abb. 28** mit α -Pincs und PE-konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt. Anschließend wird ein Brückenantikörper-Komplex („Selection-Cocktail“) zugegeben, der das Phycoerythrin des Zweitantikörpers mit der Dextranhülle der Magnetkügelchen verbindet, so dass durch Waschen im Magneten P2X-negative Zellen verloren gehen. Die einzelnen Sortierungen sind in verschiedenfarbigen Linien dargestellt (gestrichelt: vor 1. Sortierung, grün: nach 1. Sortierung, rot: nach 2. Sortierung, blau: nach ggf. 3. Sortierung).

Wie in **Abb. 38** zu sehen ist, exprimieren die stabilen Transfektanten auch nach längerer Zeit noch den P2X Purinrezeptor und die ART2.2. Die ART2.2-Aktivität kann mit der 1G4 Methode nachgewiesen werden. Dabei fungiert etheno-NAD als Substrat der ART und die ADP-ribosylierten Zelloberflächenproteine können mit dem Alexa488-konjugierten α -etheno-Adenosin mAk 1G4 im FACS nachgewiesen werden.

Ergebnisse

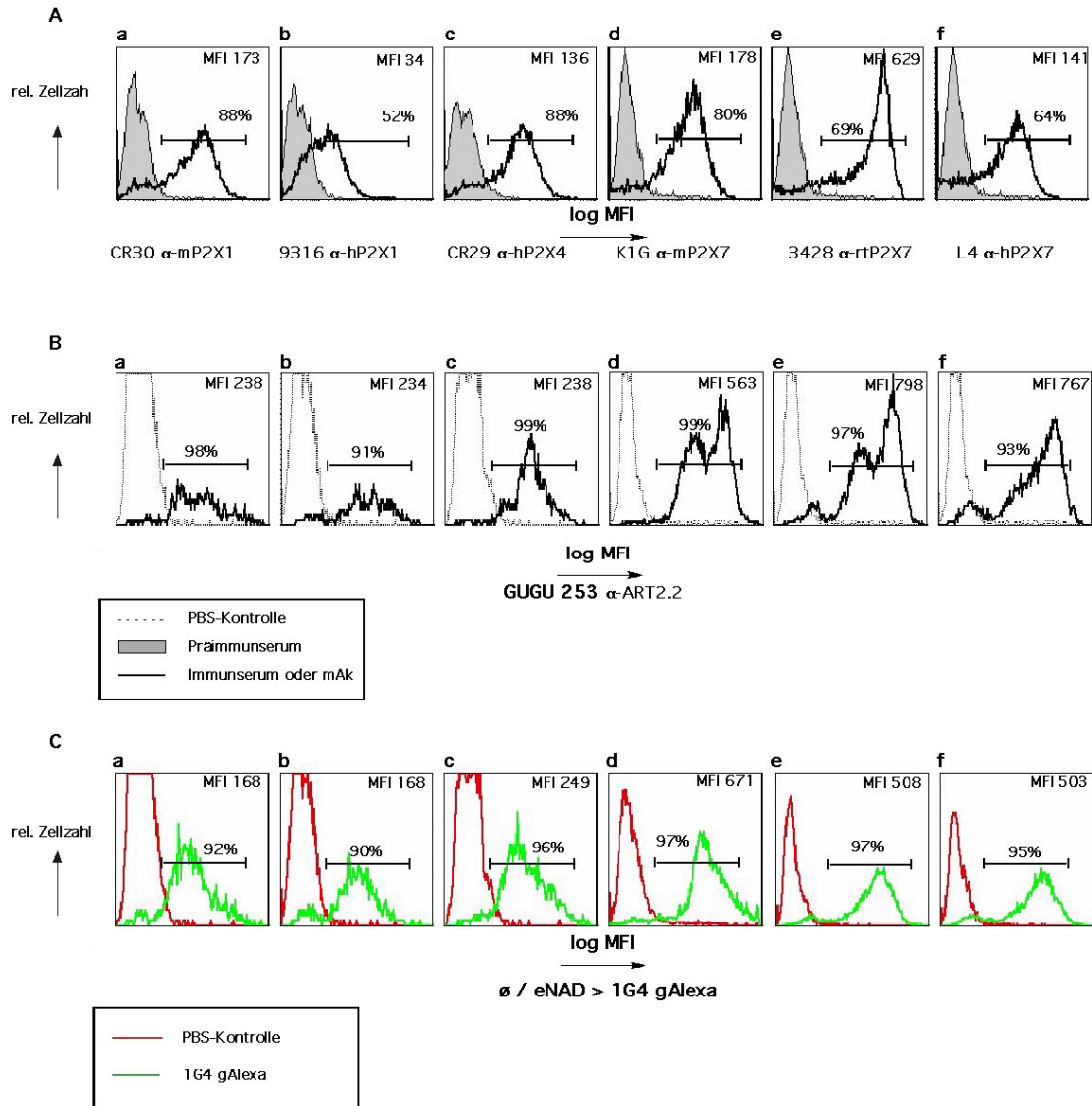


Abb. 38: Nachweis der Expression von P2X Purinrezeptoren, ART2.2 und der ART-Aktivität im FACS an stabil transfizierten CHO-Zellen. (A): Die einzelnen Panels stellen FACS-Färbungen an jeweils ca. $1 \cdot 10^6$ stabil transfizierten Zellen dar (Methode wie in **Abb. 25** bis **Abb. 28**) für a: mP2X1, b: hP2X1, c: hP2X4, d: mP2X7, e: rP2X7, f: hP2X7. (B): Für die ART2.2-Färbung wurde der Alexa488 konjugierte mAk GUGU-53 (1:100) verwendet (Koch-Nolte, Glowacki et al. 2005). (C): Der Nachweis der ADP-Ribosylierung als Zeichen der ART2.2-Aktivität erfolgte mit der 1G4 Methode (Krebs, Koestner et al. 2003). Dabei fungiert etheno-NAD als Substrat der ART2.2 und die Detektion des ADP-ribosylierten Proteins erfolgt mit dem Alexa 488 konjugierten mAk 1G4 (1:100), der spezifisch an die etheno-Adenosin-Gruppe bindet.

Die stabilen Transfektanten sind sehr nützlich, um die ADP-Ribosylierung von Oberflächenproteinen genauer zu untersuchen. Wie man in **Abb. 38** sieht, kann man mit der 1G4 Methode zeigen, dass eine ADP-Ribosylierung stattgefunden hat. Allerdings weiß man dadurch nicht, welche Oberflächenproteine der Zellen dabei markiert wurden.

Ergebnisse

Mit der ^{32}P -ADP-Ribosylierung gelingt eine genauere Charakterisierung der ADP-ribosylierten Proteine, die nach Auftrennung in der SDS-PAGE mittels Autoradiographie detektiert werden können. Um zu untersuchen, ob und welche P2X Purinrezeptoren ADP-ribosyliert werden können, wurden untransfizierte und ART2.2-P2X7 kotransfizierte Zellen für 20 min mit ^{32}P -NAD inkubiert, die Zellen anschließend lysiert und radioaktiv markierte Proteine mittels SDS-PAGE Autoradiographie analysiert (**Abb. 39**). Die Ergebnisse zeigen neben mehreren schwächeren Banden nur bei den mit mP2X7 und rP2X7 transfizierten Zellen (A, Spuren 3 und 4) zwei zusätzliche kräftige Banden auf Höhe von 80kDa, die auf derselben Höhe mit dem im Immunoblot detektierten P2X7 Purinrezeptor liegen (C, Spuren 3 und 4). In den mit P2X1 und P2X4 Purinrezeptoren transfizierten Zellen sind im Immunoblot auf Höhe von 50kDa zwei kräftige Banden (C, Spuren 6 und 7) zu erkennen. In der Autoradiographie lassen sich allerdings keine Banden auf dieser Höhe finden, die eine ADP-Ribosylierung dieser Proteine bedeuten würde.

Da einerseits in den Ganzzelllysaten auch andere Proteine der CHO-Zellen ADP-ribosyliert werden (**Abb. 39A**) und andererseits die verfügbaren α -Peptid Antikörper einige P2X-Proteine wie hP2X4 und hP2X7 nur schwach erkennen (C, Spuren 2, 5), wurden die Purinrezeptoren mit den α -Pincs an Protein-G-Sepharose immunpräzipitiert und anschließend mittels Autoradiographie auf Markierung mit ^{32}P -ADP-Ribose untersucht. In **Abb. 39 B** ist nun eine kräftige Bande auf Höhe von 80kDa, die dem hP2X7 Purinrezeptor entspricht, sowohl in der Autoradiographie (B, Spur 2) als auch im Immunoblot (D, Spur 2) zu erkennen. Hier hat die Immunpräzipitation des rP2X7 Purinrezeptors mit dem 3428 IS offensichtlich nicht optimal funktioniert, so dass die ADP-Ribosylierung des rP2X7 besser bei den Ganzzelllysaten (A, Spur 3) zu erkennen ist.

Bereits aus vorigen Untersuchungen ist bekannt, dass der gegen rP2X4 gerichtete α -Peptid Ak nur schwach mit hP2X4 kreuzreagiert. In C, Spur 5 erkennt man auf der erwarteten Höhe von 50kDa keine Bande. Für den Immunoblot der P2X1 und P2X4 Proteine eignet sich die Immunpräzipitation nur eingeschränkt, da der verwendete Zweit-Antikörper auch mit der schweren Kette der präzipitierenden Ak reagiert (D, Spuren 5-7), die sich auf derselben Höhe wie die erwarteten P2X1 und P2X4 Purinrezeptoren befinden. Die **Abb. 30** zeigte allerdings bereits die Fähigkeit der α -

Ergebnisse

Pinc Immunseren zur Immunpräzipitation. In der Autoradiographie der Immunpräzipitate (**Abb. 39 B**) sieht man auf Höhe der erwarteten P2X1 und P2X4 Purinrezeptoren (B, Spuren 5-7) jedoch keine Banden, was gegen die ADP-Ribosylierung dieser Proteine spricht. Im Immunoblot des Immunpräzipitats von hp2X4 ist auf Höhe von 40kDa eine unbekannte Bande zu sehen (D, Spur 5), die jedoch offensichtlich nicht radioaktiv markiert ist (B, Spur 5).

Ergebnisse

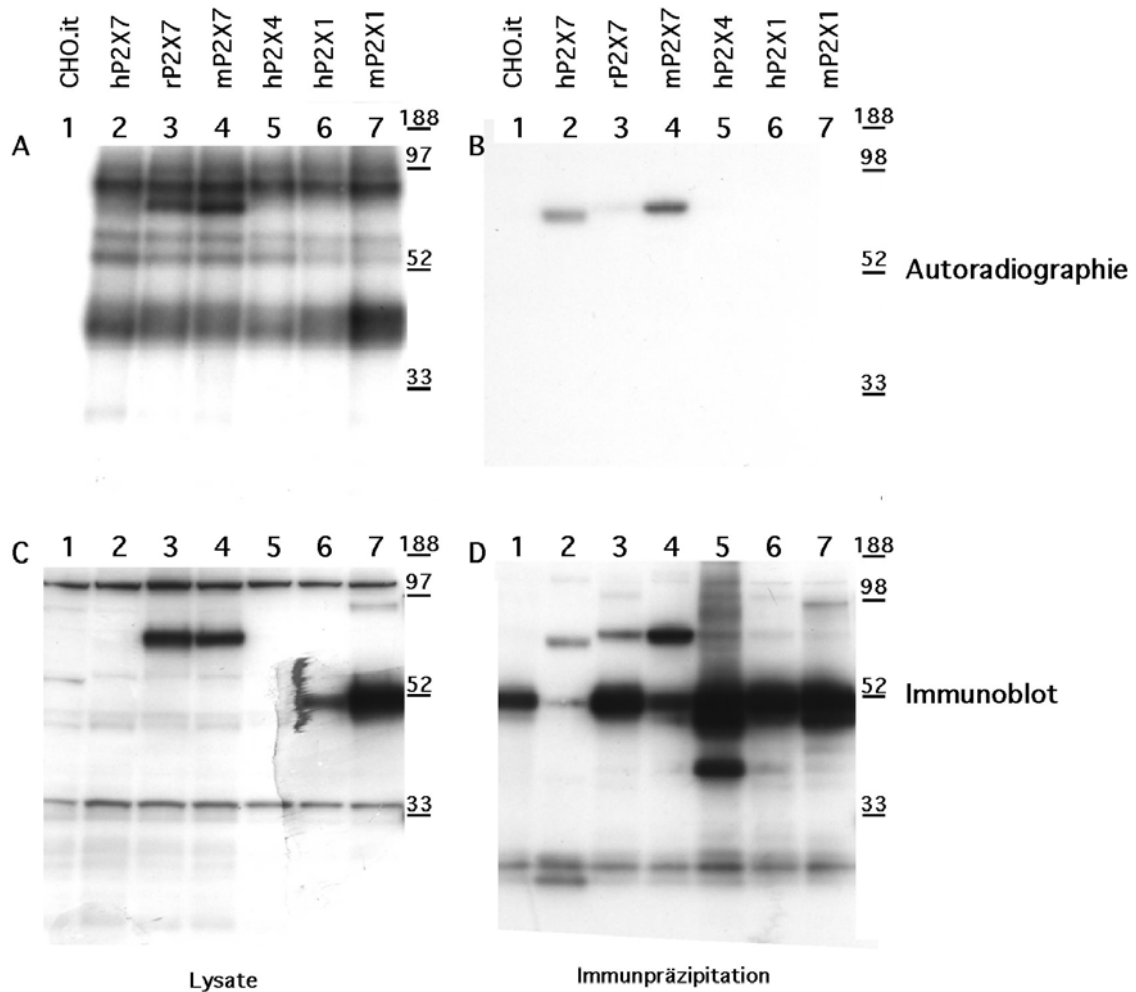


Abb. 39: Autoradiographie und Western Blot Analyse nach ³²P-ADP-Ribosylierung und Immunpräzipitation von P2X Purinrezeptoren in stabil mit ART2.2 kotransfizierte CHO-Zellen. Untransfizierte (CHOit) bzw. ART2-P2X kotransfizierte CHO-Zellen wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur in Anwesenheit von 20 μ Ci ³²P-NAD, 1 μ M unmarkiertem NAD und 1mM ADP-Ribose in 200 μ l PBS inkubiert. Dabei sind die jeweiligen P2X-Expressionskonstrukte über den Spalten angegeben. Nach mehrfachem Waschen wurden die Zellen pelletiert und für 15 Minuten bei 4°C in Triton-X-100 lysiert. A: Die Proteine in den Lysaten wurden direkt mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. B: Einzelne Purinrezeptoren wurden vor der SDS-PAGE Autoradiographie wie in **Abb. 29** mit Protein-G-gekoppelten α -Pincis immunpräzipitiert. C, D: Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF Membran geblottet und die Purinrezeptoren wie in **Abb. 29** mit den α -Peptids detektiert (Methode wie in **Abb. 29**: 1. Ak-Mix: anti-P2X1 Abcam 1:2000, anti-P2X4 Calbiochem 1:250, anti-P2X7 Alomone 1:1000, 2. Ak: α -rb IgPO 1:5000 in 5% Milch).

Ergebnisse

3.3.2 Zielgerichtete Mutagenese von P2X1 und P2X4 Purinrezeptoren

Im vorigen Kapitel wurde gezeigt, dass der P2X7 Purinrezeptor aus Maus, Ratte und Mensch auf Zellen, die gleichzeitig die ART2.2 exprimieren, nach NAD-Behandlung ADP-ribosyliert wird. Die Ergebnisse deuten außerdem an, dass die P2X1 und P2X4 Purinrezeptoren nach NAD-Behandlung nicht ADP-ribosyliert werden können. Da von den beiden bekannten ADP-Ribosylierungsstellen in mP2X7 (Adriouch, Bannas et al. 2008) nur das Arginin an Position 125 auch bei rP2X7 und hP2X7 konserviert ist, sollte mit den folgenden Versuchen die Frage geklärt werden, ob die P2X1 und P2X4 Purinrezeptoren, denen eben dieses Arginin fehlt, nach zielgerichteter Mutation der entsprechenden Position (121/122) zu Arginin die ADP-Ribosylierungsfähigkeit erhalten.

Die **Abb. 40A** zeigt schematisch das Arginin in der Position 125 im mP2X7 Protein, welches nach zielgerichteter Mutation nicht mehr als Target der ADP-Ribosylierung fungiert. **Abb. 40 B** zeigt im Alignment der P2X Aminosäuresequenzen die entsprechenden umgekehrten Mutationen in P2X1 und P2X4, mit denen eine potentielle ADP-Ribosylierungsstelle zielgerichtet mittels PCR geschaffen werden sollte. So wurde in mP2X1 und hP2X1 jeweils die Aminosäure Glutamat durch zwei Arginine ersetzt. In mP2X4 wurden Aspartat und Lysin, beim hP2X4 Aspartat und Alanin jeweils in Arginin umgewandelt. Am Beispiel des mP2X4 Purinrezeptors wird gezeigt, dass die korrekte Mutation jeweils mittels DNA-Sequenzanalyse nachgewiesen wurde (**Abb. 41**).

Ergebnisse

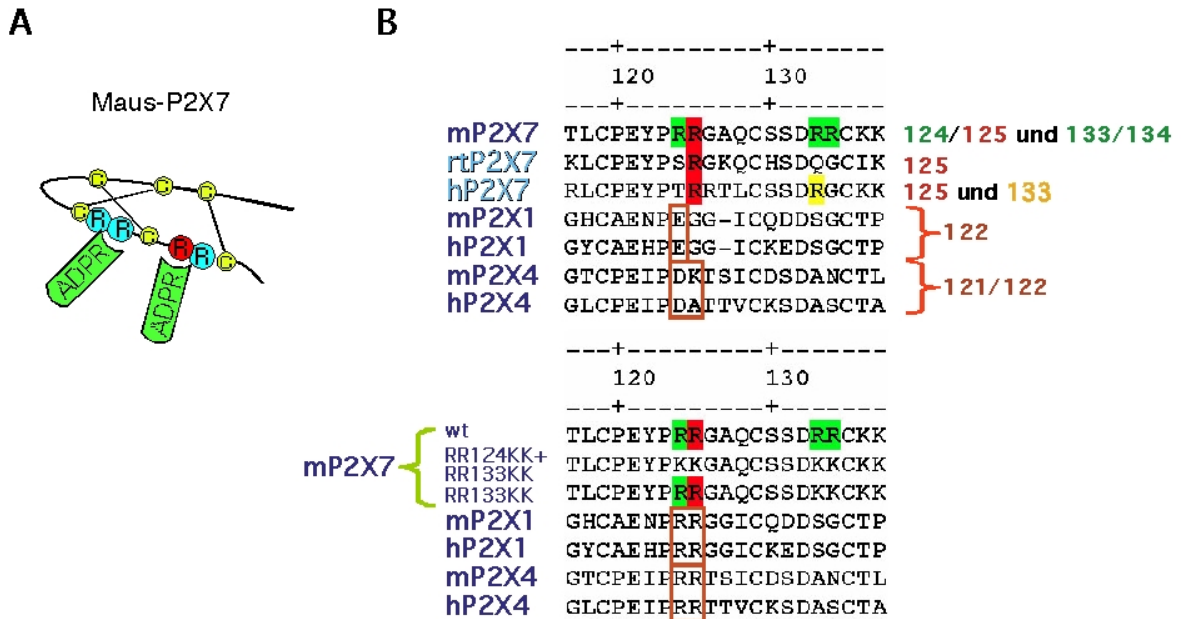


Abb. 40: Schematische Darstellung und Alignment der Mutationsstellen in der Cystein-reichen Kopfdomäne von P2X1/4/7. Während bei den P2X7 Purinrezeptoren Arginine (R) durch Lysine (K) ersetzt wurden, um herauszufinden, welche Arginine für die ADP-Ribosylierung von Bedeutung sind, wurden bei den P2X1 und P2X4 Purinrezeptoren andere Aminosäuren durch entsprechende Arginine an der Position 121 bzw.122 ersetzt. Mit Hilfe dieser Mutanten sollte die Frage geklärt werden, ob dadurch die P2X1/4 Purinrezeptoren als Targetproteine für die ADP-Ribosylierung dienen können.

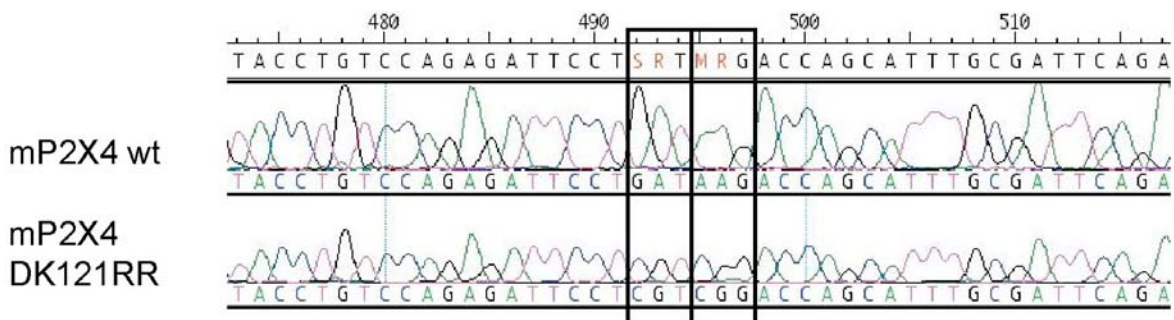


Abb. 41: Sequenzanalyse der zielgerichtet mutierten Purinrezeptor Expressionskassetten. Stellvertretend für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mutationen wird hier die Sequenzierung der mutierten mP2X4 Variante (DK121RR) im Vergleich zum Wildtyp (wt) gezeigt, anhand derer jeweils der Erfolg der zielgerichteten Mutation bestätigt wurde.

Ergebnisse

3.3.3 Analyse der ADP-Ribosylierung von Purinrezeptor Mutanten nach transienter Kotransfektion mit der ART2.2 ADP-Ribosyltransferase in HEK-Zellen

In diesem Abschnitt wurden die mutierten P2X1 und P2X4 Purinrezeptoren analysiert. Zunächst wurde untersucht, ob die α -Pincs HEK.T-Zellen, die mit den mutierten P2X-Konstrukten transient transfiziert wurden, in FACS- und Immunpräzipitationsanalysen spezifisch erkennen können. Zum Vergleich wurden jeweils transiente Transfektanten untersucht, die mit den nativen P2X-Konstrukten transfiziert worden waren. Die Ergebnisse zeigen, dass die α -Pincs Wildtyp und P2X Mutanten jeweils ähnlich stark im FACS erkennen (**Abb. 42 A**). Ferner haben die Mutationen keinen erkennbaren Einfluss auf die Fähigkeit der α -Pincs, diese Proteine an Protein-G-Sepharose zu immunpräzipitieren (**Abb. 42 B**).

Ergebnisse

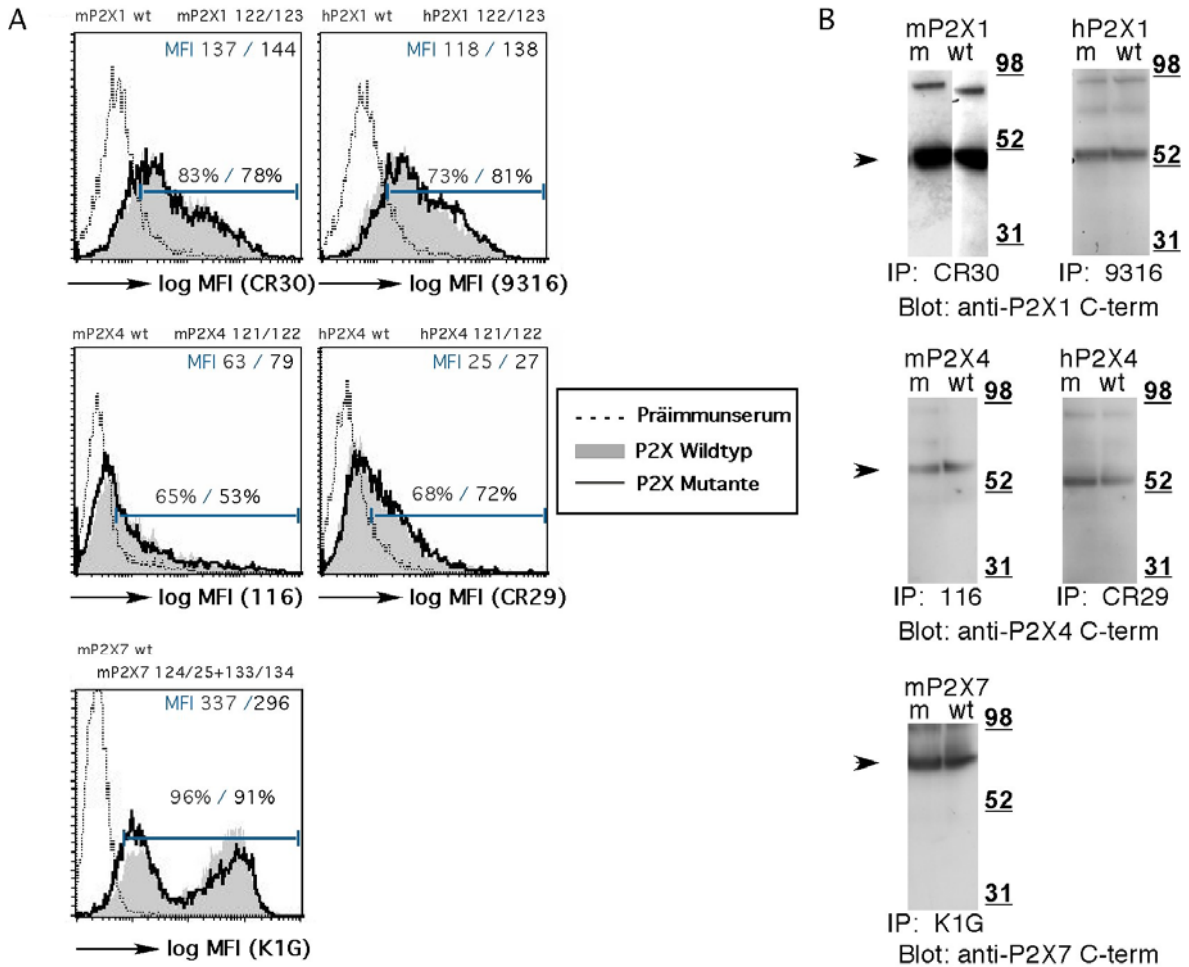


Abb. 42: Vergleichende FACS-Anfärbungen und Immunpräzipitationen von Wildtyp und mutierten P2X Varianten. A) HEK.T-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für Wildtyp P2X (grau hinterlegt) oder P2X Mutanten (schwarze Linien) transfiziert. Je 1×10^6 Zellen wurden 24h nach Transfektion mit den u.g. α -Pincs in der optimalen Verdünnung bzw. mit dem jeweiligen Präimmunsereum (gestrichelte Linien) gefärbt. Als Zweitantikörper wurde ein PE-konjugierter Esel α -Kaninchen IgG verwendet. **B)** Ein weiteres Aliquot der Zellen wurde mit Triton X-100 lysiert und Immunpräzipitationen mit an Protein-G-Sepharose gebundenen Antikörpern wie in **Abb. 29** durchgeführt. Im Immunoblot erfolgte die Detektion mit dem jeweiligen α -Peptid Antikörper: α -P2X1, α -P2X4 und α -P2X7.

Nachdem bereits gezeigt wurde, dass die mutierten P2X-Proteine sich mit den α -Pincs sowohl fürs FACS anfärben lassen als auch immunpräzipitiert werden können, wurde die ADP-Ribosylierung untersucht. Hierfür wurden jeweils HEK.T-Zellen mit Expressionskonstrukten für ART2.2 und Wildtyp (wt) P2X bzw. P2X-Mutanten (m) kointransfiziert (**Abb. 43**). Nach der Inkubation mit ^{32}P -NAD wurden radioaktiv markierte Proteine in Gesamtzelllysaten (A) bzw. in spezifischen P2X Immunpräzipitaten (B) mittels SDS-PAGE Autoradiographie sichtbar gemacht. Zusätzlich dazu wurden die

Ergebnisse

P2X-Proteine im Immunoblot mit den α -Peptids markiert. Die Ergebnisse der Autoradiographien zeigen in den Gesamtzelllysaten wieder mehrere Proteinbanden, unter denen die P2X Rezeptoren nicht eindeutig zu identifizieren sind (A). Hingegen sind bei der Autoradiographie der Immunpräzipitate deutliche Banden mit dem erwarteten Molekulargewicht bei Wildtyp mP2X7 (B, Spur 1) sowie bei sämtlichen P2X1 und P2X4 Mutanten (B, Spuren 4, 6, 8, 10) zu sehen. Die Immunoblot Analysen bestätigen eine annähernd gleichmäßige Transfektionseffizienz und Beladung der Spuren. Während der Austausch der bekannten Target-Arginine im P2X7 Rezeptor zum Verlust der ADP-Ribosylierung führt, werden die P2X1 und P2X4 Purinrezeptoren nach Insertion von Argininen an der Position 121/122 zu Targetproteinen der ADP-Ribosylierung. Die entsprechenden P2X1 und P2X4 Wildtyprezeptoren hingegen sind wie bei den ART2.2/P2X kotransfizierten CHO-Zellen (**Abb. 39**) kein Target für die ADP-Ribosylierung (B, Spuren 3, 5, 7 und 9).

Ergebnisse

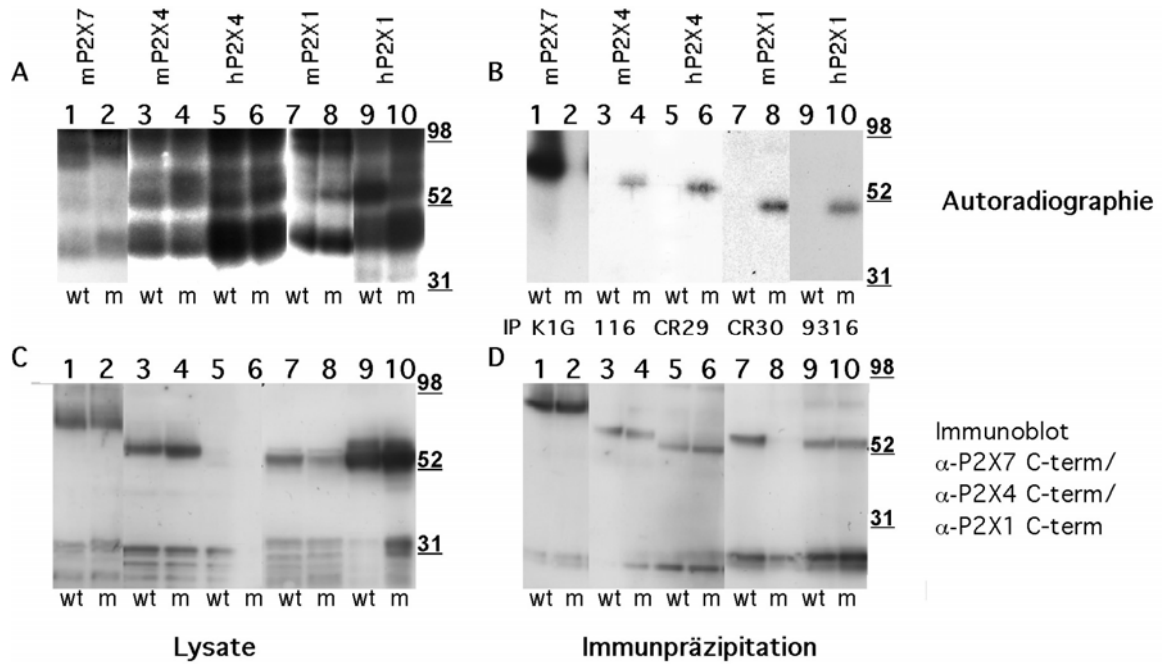


Abb. 43: Autoradiographie und Western Blot Analyse nach ^{32}P -ADP-Ribosylierung und Immunpräzipitation von zielgerichtet mutierten P2X Purinrezeptoren nach transienter Kofransfektion mit ART2.2 in HEK.T-Zellen. Transient transfizierte HEK.T-Zellen wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur in Anwesenheit von $20\mu\text{Ci } ^{32}\text{P-NAD}$, $1\mu\text{M}$ unmarkiertem NAD und 1mM ADP-Ribose in $200\mu\text{l}$ PBS inkubiert. ADP-ribosylierte Proteine in Gesamtzelllysaten (A) und P2X Immunpräzipitaten (B) wurden wie in **Abb. 39** mittels SDS-PAGE Autoradiographie nachgewiesen. P2X-Purinrezeptoren wurden mittels Immunoblotanalyse mit den α -Peptids und Trueblot anti-Kaninchen IgG detektiert (C, D). Dabei sind Wildtyp (wt) und Mutante (m) jeweils nebeneinander aufgetragen. (1) mP2X7, (2) mP2X7 RR124KK+RR133KK, (3) mP2X4, (4) mP2X4DK 121/122RR, (5) hP2X4, (6) hP2X4DA121/122RR, (7) mP2X1, (8) mP2X1EX122RR, (9) hP2X1, (10) hP2X1EX122RR.

4 Diskussion

4.1 α -Pincs als nützliche experimentelle Werkzeuge

In dieser Arbeit wurde die Nützlichkeit der durch genetische Immunisierung hergestellten polyklonalen Immunsereen und monoklonalen Antikörper demonstriert. Die **Tabelle 8** zeigt eine Übersicht der untersuchten Antikörper, ihrer Spezifitäten und ihrer Funktionalität in FACS, Immunfluoreszenz, Western-Blot und Immunpräzipitation. Bisher war ein sicherer Proteinnachweis mittels FACS nur für den P2X7 Purinrezeptor beschrieben (Buell, Chessell et al. 1998), bzw. für andere P2X Purinrezeptoren nur auf Westernblot- oder RNA-Ebene durch den Nachweis der Transkription von Proteinen möglich (Surprenant and North 2009). Die α -Pincs bieten die Möglichkeit, die Proteinexpression direkt auf der Zelloberfläche gesichert nachzuweisen, da sie aufgrund ihrer Genese Proteine in ihrer natürlichen Konformation erkennen (Tang, DeVit et al. 1992; Koch-Nolte, Duffy et al. 1999). Die Nützlichkeit dieser neuartigen Werkzeuge liegt vor allem im Einsatz für Immunfluoreszenz- und FACS-Analysen, sowie für die Immunpräzipitation. Herkömmlich hergestellte α -Peptid-Antikörper eignen sich für solche Untersuchungen weniger, da sie in der Regel nur denaturierte Proteine erkennen. Bislang diente für Purinrezeptoren die RT-PCR als Transkriptionsnachweis. Die Proteine wurden anschließend mit Hilfe der α -Peptids im Western Blot nachgewiesen. Auf intakten Zellen können beide Verfahren keine direkte Aussage über die Lokalisation der Proteine in der Zelle oder auf der Zelloberfläche machen. Indirekte Methoden hierfür sind häufig sehr aufwendig. Eine Möglichkeit besteht beispielsweise in der Biotinylierung von Membranproteinen, der anschließenden Zellyse und Präzipitation der biotinylierten Zelloberflächenproteine an Streptavidin-Kügelchen und Detektion der präzipitierten Proteine im Western Blot (Guo, Masin et al. 2007).

Diskussion

Antikörper P2X-Familie	Ursprung	Titer für: FACS+IFT/ Westernblot	Zielprotein	FACS/ IFT	Western- Blot	Immun- präzipitation
9316	rb	1:800	hP2X1	+++	-	+++
CR29	rb	1:800/1:500	hP2X4	+++	++	++
CR30	rb	1:800/1:500	mP2X1	+++	++	+++
116	rb	1:800/1:500	mP2X4	++	+++	+++
RG22	rt	1:800/1:500	mP2X4	+++	+++	+++
RG23	rt	1:800/1:500	mP2X4	+++	+++	+++
CR58	rb	1:400/1:500	mP2X4	++	++	++
K1G	rb	1:800	mP2X7	+++	-	+++
3428	rb	1:800	rP2X7	++	-	+++
3429	rb	1:400	hP2X7	+	-	n.u.
RH23-A44	rt	1:100	mP2X7	+++	-	+++
L4	ms	1:100	hP2X7	+++	-	+++
Abcam anti-P2X1	rb	1:200/1:2000	rP2X1	(+)	+++	n.u.
Calbiochem anti-P2X4	rb	1:100/1:250	rP2X4	(+)	+++	n.u.
Alomone anti-P2X7	rb	1:200/1:1000	rP2X7	(+)	+++	n.u.

Tabelle 8: Übersicht über die in dieser Arbeit getesteten α -Pinc und α -Peptid Antikörper sowie deren Funktionalitäten. +++: sehr gute Reaktion, ++: gute Reaktion, +: schwache, aber spezifische Reaktion, (+): sehr schwache, fraglich spezifische Reaktion, -: keine Reaktion, n.u.: nicht untersucht.

Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zelloberflächenexpression von Purinrezeptoren auf lebenden Zellen mit Hilfe der α -Pincs charakterisiert. Nach Transfektion von CHO- und HEK-Zellen mit verschiedenen P2X Purinrezeptoren entspricht hier die Färbung der nativen Proteine mit den P2X-spezifischen α -Pincs einer Zelloberflächenexpression (**Abb. 21 bis Abb. 25**). Dabei konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten α -Pinc hoch spezifisch mit dem jeweiligen P2X Rezeptor in der Immunfluoreszenz (**Abb. 21 bis Abb. 23**) und im FACS (**Abb. 25 bis Abb. 28**) reagieren im Vergleich zur Negativkontrolle mit dem Präimmunserum. Keiner der Antikörper reagierte mit dem am nächsten verwandten Mitglied der P2X Familie aus derselben Spezies (Paralogen), bei jeweils ca. 45-50% Sequenzidentität. Die meisten α -Pincs zeigten zudem keine Kreuzreaktion mit dem Orthologen aus Maus, Ratte oder Mensch, die jeweils ca. 78-91% Sequenzidentität besitzen (**Abb. 2**). Für einen Antikörper konnte jedoch eine Kreuzreaktion mit einem Orthologen nachgewiesen werden: sowohl in der Immunfluoreszenz- als auch in der FACS-Analyse wurde eine Reaktion des CR30 α -mP2X1 mit dem hP2X1 Rezeptor gefunden (**Abb. 23 und Abb. 25**). Das 9316 α -hP2X1 Immunserum hingegen zeigte nur eine sehr schwache, eher unspezifisch anmutende Reaktion mit mP2X1-transfizierten CHO-Zellen in der Immunfluoreszenz (**Abb. 23**) und keine spezifische Reaktion mit mP2X1-transfizierten HEK-Zellen im FACS (**Abb. 25**). hP2X1 und mP2X1 zeigen eine hohe Sequenzidentität von 88%. Hier ist es durchaus vorstellbar, dass die Epitope (das Epitop), welche von dem Kaninchenserum CR30 α -mP2X1 erkannt werden, in beiden P2X1 Orthologen in einer ähnlichen dreidimensionalen Konformation vorkommen (**Abb. 2**). Für den von der Arbeitsgruppe Buell hergestellten monoklonalen Antikörper L4 α -hP2X7 wurde in der FACS-Analyse eine Kreuzreaktion mit dem rP2X7 Purinrezeptor festgestellt (**Abb. 28**), die Sequenzidentität beträgt hier 91% (**Abb. 2**). Dieser in der Maus nach Immunisierung mit hP2X7-transfizierten Zellen hergestellte Antikörper zeigt erwartungsgemäß keine Reaktion mit dem mP2X7 Rezeptor. Für alle übrigen analysierten α -Pinc wurde keine Kreuzreaktion mit ortho- oder paralogen Verwandten festgestellt. Für P2X1 und P2X4 standen leider keine Konstrukte der Ratte zur Verfügung, aufgrund der hohen Sequenzidentität wäre hier eine Kreuzreaktion der im Kaninchen hergestellten α -Pinc durchaus möglich. Mit den α -Pinc lassen sich somit methodisch einfach und sicher Zelloberflächenproteine in der Immunfluoreszenz und im

Diskussion

FACS nachweisen, während die α -Peptids hier entweder gar keine bzw. nur eine sehr schwache Anfärbung erkennen ließen (**Abb. 24**). Nach der Permeabilisierung der Zellmembran, z.B. durch Behandlung Paraformaldehyd-fixierter Zellen mit einem nichtionischen Detergenz, wäre auch eine intrazelluläre Färbung von nativen Proteinen mit α -Pinc generell möglich, um z.B. die Frage nach der (Ko)-Lokalisation von verschiedenen P2X Purinrezeptoren in Endosomen, Lysosomen und anderen intrazellulären Vesikeln zu klären.

Obwohl α -Pincs in der Regel Epitope im nativen Protein erkennen, konnten einige der in dieser Arbeit untersuchten α -Pincs auch das denaturierte Ziel-Protein im Westernblot spezifisch erkennen. Dieses trifft für CR30 α -mP2X1 und alle gegen P2X4 gerichteten α -Pinc zu (CR29 α -hP2X4, CR58 α -mP2X4, 116 α -mP2X4, RG22 α -mP2X4 und RG23 α -mP2X4) (**Abb. 29**). Schließlich konnte gezeigt werden, dass sich die α -Pinc sehr gut zur Immunpräzipitation eignen (**Abb. 30**). Auch nach zielgerichteter Mutagenese von zwei benachbarten Aminosäuren in der Cystein-reichen Kopfdomäne von P2X1 und P2X4 (**Abb. 40**) waren die 5 untersuchten polyklonalen α -Pinc noch in der Lage, das mutierte Zieloberflächenprotein sicher immunzupräzipitieren und im FACS zu erkennen (**Abb. 42**). Theoretisch ist es möglich, dass die Mutation einer Aminosäure das Ziel-Epitop direkt verändert bzw. durch eine Konformationsänderung so modifiziert, dass der Antikörper nicht mehr binden kann. Dies ist z. B. von anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe nach zielgerichteter Mutation des R151 an der Spitze der Cystein-reichen Kopfdomäne des mP2X7 Rezeptors beobachtet worden: diese Mutante wurde unverändert durch den monoklonalen Antikörper RH23-A44, nicht aber von RH24-A43 oder dem K1G α -Pinc, erkannt (Adriouch, Bannas et al. 2008). Dieses Ergebnis deutet an, dass das polyklonale K1G Immunsereum monospezifisch ist, bzw. ein dominantes Epitop erkennt, welches durch R151 beeinflusst wird.

4.2 Analyse der Expression von P2X1, P2X4 und P2X7 auf nativen Zelllinien und auf primären Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass die α -Pincs die Zelloberflächenexpression von P2X1, P2X4 und P2X7 auf transfizierten Zellen sicher nachweisen können (**Abb. 21** und **Abb. 24**). Aus diesem Grunde kann man die α -Pincs auch zum Screening etablierter

Diskussion

Zelllinien für die Expression von P2X Purinrezeptoren verwenden, wie es im Rahmen dieser Arbeit erfolgte. Die Ergebnisse zeigen, dass die drei untersuchten murinen T-Zelllinien (DO11.10, MD27 und YAC) P2X4 und P2X7, nicht aber P2X1 exprimieren (**Abb. 31**). Die murine B-Zelllinie A20 zeigte hingegen nur eine Anfärbung für P2X4. Hier färbte das Immunsereum des Kaninchens CR58 die A20-Zellen deutlich spezifisch, während das Immunsereum der Ratte RG22 eine ähnlich starke Anfärbung zeigte wie das RG22 Präimmunsereum. Letzteres könnte möglicherweise auf einer Reaktion des Sekundärantikörpers mit murinem Zelloberflächen-Immunglobulin auf diesen B-Zellen beruhen. Für die beiden untersuchten Makrophagen-Zelllinien RAW und J774 stellte sich eine Anfärbung mit dem anti-P2X4 Immunsereum heraus, während die J774 Linie zusätzlich auch eine Anfärbung für P2X7 zeigte. Die schwache Anfärbung der J774-Zellen auch mit den jeweiligen Präimmunsereen könnte möglicherweise auf einer Bindung von Antikörpern über Fc-Rezeptoren beruhen. Die beobachtete Expression von P2X4 und P2X7 auf J774-Zellen steht in Einklang mit anderen publizierten Ergebnissen von RT-PCR Untersuchungen, bei denen P2X4, P2X7, P2Y2 und P2Y6 Transkripte nachgewiesen wurden (Ito and Matsuoka 2008). Für RAW-Zellen wurde in der Literatur allerdings auch die Expression von P2X7 beobachtet (Hiken and Steinberg 2004; Pfeiffer, Aga et al. 2004). Möglicherweise liegt das Expressionsniveau auf den von uns untersuchten RAW-Zellen unterhalb der Detektionsgrenze von FACS-Untersuchungen oder die Zellen haben die Expression verloren. Von den untersuchten humanen Zelllinien zeigten lediglich die HEK.T (humane embryonale Niere) und die LNCAP (Prostata Carcinom Zelllinie) eine, wenngleich auch nur schwache Anfärbung für P2X1 (**Abb. 25** und **Abb. 32**). Die untersuchten humanen Lymphomzelllinien zeigten keine erkennbare Expression von P2X1, P2X4 oder P2X7.

Kürzlich wurde gezeigt, dass P2X4 in Ratten-Mikroglia, Gefäßendothelzellen und Peritonealmakrophagen vorwiegend in Lysosomen lokalisiert ist und unter physiologischen Bedingungen nur vorübergehend auf der Zelloberfläche erscheint, während P2X7 vorwiegend auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Boumechache, Masin et al. 2009). Eine Stimulation der Phagozytose triggert jedoch die Akkumulation des P2X4 Rezeptors an der Phagosomenmembran und Stimuli der lysosomalen Exozytose wie Ionomycin oder Methylamin führen zur Verstärkung der P2X4

Diskussion

Zelloberflächenexpression (Qureshi, Paramasivam et al. 2007). Ein intrazelluläres Vorkommen wurde jedoch auch für den P2X7 Rezeptor beschrieben. P2X7 Rezeptoren wurden in Phagosomen von J774 Makrophagen beobachtet. Hier führt Sphingosin-1-Phosphat (S1P) zur Sekretion von ADP mit luminaler Konversion zu ATP und dann zur P2X7-abhängigen Aktivierung der Aktin-Phagosomen-Anordnung (Kuehnel, Rybin et al. 2009).

Neben dem Screening der Zelllinien auf mögliche Oberflächenexpressionen lassen sich die α -Pinc Antikörper auch für FACS-Analysen an primären Immunzellen einsetzen. In das Interesse der Forscher sind seit einigen Jahren regulatorische T-Zellen gerückt, die auch als Tregs bezeichnet werden (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 2001). Man vermutet, dass diese das Auftreten von Autoimmunerkrankungen verhindern können, indem sie autoreaktive T-Zell-Klone kontrollieren und deren Proliferation hemmen. Regulatorische T-Zellen wurden ursprünglich über die fehlende bzw. sehr niedrige Expression von CD45RB (CD45RB^{low}) definiert (Read, Mauze et al. 1998), später über die hohe Zelloberflächen-Expression von CD25 (CD4⁺CD25⁺) (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 2001), bzw. über den Transkriptionsfaktor FoxP3 (Hori, Nomura et al. 2003). Verminderte Treg Populationen korrelieren mit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen. Die Übertragung von CD45RB^{high}- oder von CD25⁻-Zellen führt in den Empfängertieren zur Genese von Autoimmunerkrankungen. Dies kann durch eine Beimischung von CD45RB^{low} bzw. CD25⁺-Zellen verhindert werden kann (Powrie, Leach et al. 1993).

Es gibt verschiedene Hinweise auch für eine Rolle des P2X7 Rezeptors bei Autoimmunerkrankungen (Elliott and Higgins 2004). P2X7-KO Mäuse sind beispielsweise relativ resistent gegenüber antikörperinduzierter Kollagenarthritis (Labasi, Petrushova et al. 2002) und gegenüber Concanavalin A induzierter Autoimmuner Hepatitis (Kawamura, Aswad et al. 2006). Die Expression des P2X7 Purinrezeptors auf Tregs wurde daher in dieser Arbeit näher untersucht. Die FACS-Analyse zeigte bei Wildtyp Mäusen eine deutlich stärkere P2X7 Expression auf CD4⁺CD25⁺ doppelt positiven Lymphozyten (Tregs) als auf konventionellen CD4⁺CD25⁻ Lymphozyten (Th-Zellen) (**Abb. 33**). Zudem hat die Wildtyp Maus einen deutlich geringeren Anteil an Tregs als die P2X7 Knock out Maus (**Abb. 33A**).

Diskussion

Ähnliche Ergebnisse ergeben auch die Ko-Anfärbungen mit CD45RB und P2X7: Bei Wildtyp Mäusen zeigen CD45RB^{low}-Zellen eine deutlich stärkere P2X7 Expression als CD45RB^{high} und CD45RB^{intermediate}-Zellen (**Abb. 34**). Darüber hinaus ist die Population der CD45RB^{low}-Zellen bei Wildtyp Mäusen gegenüber P2X7-KO Mäusen vermindert. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den von anderen Arbeitsgruppen publizierten Ergebnissen. So wurde von der AG Dennert gezeigt, dass CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in vitro eine höhere Sensitivität gegenüber dem NAD- oder ATP-induzierten Zelltod aufweisen als Th-Zellen und dass P2X7-defiziente Zellen komplett resistent sind gegenüber dem Nukleotid induzierten Zelltod (Aswad and Dennert 2006). Die AG Elliott berichtete, dass ein hoher Anteil von CD45RB^{low}-Zellen konstitutiv Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche exponieren und ebenfalls empfindlicher auf den P2X7 Liganden reagieren als CD45RB^{high}-Zellen. Eine erhöhte Empfindlichkeit von regulatorischen Zellen für ATP und NAD könnte auch eine Erklärung für den beobachteten niedrigeren Anteil von regulatorischen Zellen bei Wildtyp vs. P2X7-KO Mäusen liefern (**Abb. 33** und **Abb. 34**), denn ein Kontakt mit extrazellulärem NAD oder ATP würde bei Wildtyp Mäusen zum Tod dieser Zellen führen, während sie bei P2X7-KO Mäusen durch das Fehlen von P2X7 geschützt wären. Basierend auf diesen Beobachtungen könnte man spekulieren, dass eine pharmakologische Hemmung von P2X7 durch Inhibitoren oder Antikörper regulatorische Zellen vor dem Nukleotid induzierten Zelltod (NICD) schützen und somit möglicherweise einen therapeutischen Nutzen bei Autoimmunerkrankungen darstellen könnte.

Als Ausblick für weitere Analysen könnten als Marker für Tregs Antikörper gegen das intrazelluläre Protein FoxP3 oder Mäuse, die transgen ein FoxP3-GFP Fusionsprotein exprimieren, verwendet werden. Dieses würde eine genauere Identifizierung dieser T-Zell-Subpopulation erlauben (Hori, Nomura et al. 2003; Lahl, Loddenkemper et al. 2007).

In dieser Arbeit wurden auch murine Thrombozyten auf mP2X7 Expression untersucht. Wie man in der **Abb. 36** sieht, lassen sich Thrombozyten bei Wildtyp Mäusen, nicht aber bei P2X7-KO Mäusen deutlich mit dem K1G α -mP2X7 Immunsereum anfärben. Dies wirft die Frage auf, inwiefern und unter welchen Umständen die bekanntermaßen vorwiegend über ADP (über den P2Y12 Rezeptor) und ATP (über den sensitiven P2X1

Rezeptor) gesteuerte Regulation der Plättchenaggregation durch den sehr viel weniger sensitiven P2X7 Rezeptor beeinflusst wird. ADP wirkt über die Bindung an zwei G-Protein gekoppelten Rezeptoren, dem Gq-gebundenen P2Y1 Rezeptor und dem Gi-gebundenen P2Y12 Rezeptor. ATP hingegen aktiviert den P2X1 und den P2X7 Rezeptor. Die Stimulierung von Thrombozyten mit ADP führt zur Oberflächenveränderung der Thrombozyten, zur Plättchenaggregation und Thromboxan A₂-Bildung (Kahner, Shankar et al. 2006). Thienopyridine wie Ticlopidin oder Clopidogrel sind Antagonisten der ADP Rezeptoren P2Y12 auf Blutplättchen und wirken hier als effiziente antithrombotische Medikamente (Cattaneo 2007). Jüngere Ergebnisse weisen darauf hin, dass ATP konzentrationsabhängig zur Aktivierung oder Inhibierung der Plättchenaggregation über eine Stimulation des P2X1 Rezeptors führt (Karunarathne, Ku et al. 2009). Möglicherweise wird durch höhere ATP-Konzentrationen neben dem P2X1 Rezeptor auch der weniger empfindliche P2X7 Rezeptor aktiviert, was zu einer Änderung der Plättchenaggregation führen könnte.

4.3 Untersuchung der ADP-Ribosylierung als allgemeiner Regulationsmechanismus für P2X Purinrezeptoren

Die Versuche dieses Kapitels gehen der Frage nach, ob es sich bei der ADP-Ribosylierung um einen allgemeinen Regulationsmechanismus für P2X Purinrezeptoren handelt oder um eine Besonderheit des P2X7 Rezeptors. Zur Identifikation des Target-Arginins für die ADP-Ribosylierung im P2X7 Rezeptor waren in Vorarbeiten mittels zielgerichteter Mutagenese Argininreste im extrazellulären Teil des murinen P2X7 gegen Lysin-Reste ausgetauscht und diese Mutanten hinsichtlich ihrer ADP-Ribosylierbarkeit nach Kotransfektion mit ART2.2 in HEK-Zellen untersucht worden. Die Ergebnisse zeigten, dass zwei Arginin-Reste in einer Cystein-reichen Region des P2X7, R125 und R133, durch ART2.2 ADP-ribosyliert werden können. Die Mutation dieser beiden Arginine zu Lysin führte zu einem vollständigen Verlust der ADP-Ribosylierung (Adriouch, Bannas et al. 2008). Das bedeutet, dass die übrigen 16 Arginin-Reste in der extrazellulären Domäne des murinen P2X7 Rezeptors nicht als Targets für die ART2.2 dienen.

Diskussion

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der P2X Rezeptoren stellte sich die Frage, ob auch andere Mitglieder der Familie ADP-ribosyliert werden können. Ein Sequenz-Alignment zeigt, dass R125 auch bei Ratte und Human P2X7 vorkommen, bei P2X1 und P2X4 jedoch durch andere Aminosäuren ersetzt sind. R133 ist nur bei Maus und Human P2X7 konserviert (Abb. 44). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, ob neben dem P2X7 Purinrezeptor auch andere P2X Purinrezeptoren durch die ART2.2 ADP-ribosyliert werden. In (Abb. 39) wurde gezeigt, dass die P2X1 und P2X4 Purinrezeptoren nach NAD-Behandlung nicht ADP-ribosyliert werden. Das bedeutet, dass auch die zahlreichen anderen Argininreste in diesen Rezeptoren (13 für mP2X1, 13 für hP2X1, 14 für mP2X4 und 13 für hP2X4, s. Abb. 44) nicht als Targets für die ART2.2 dienen.

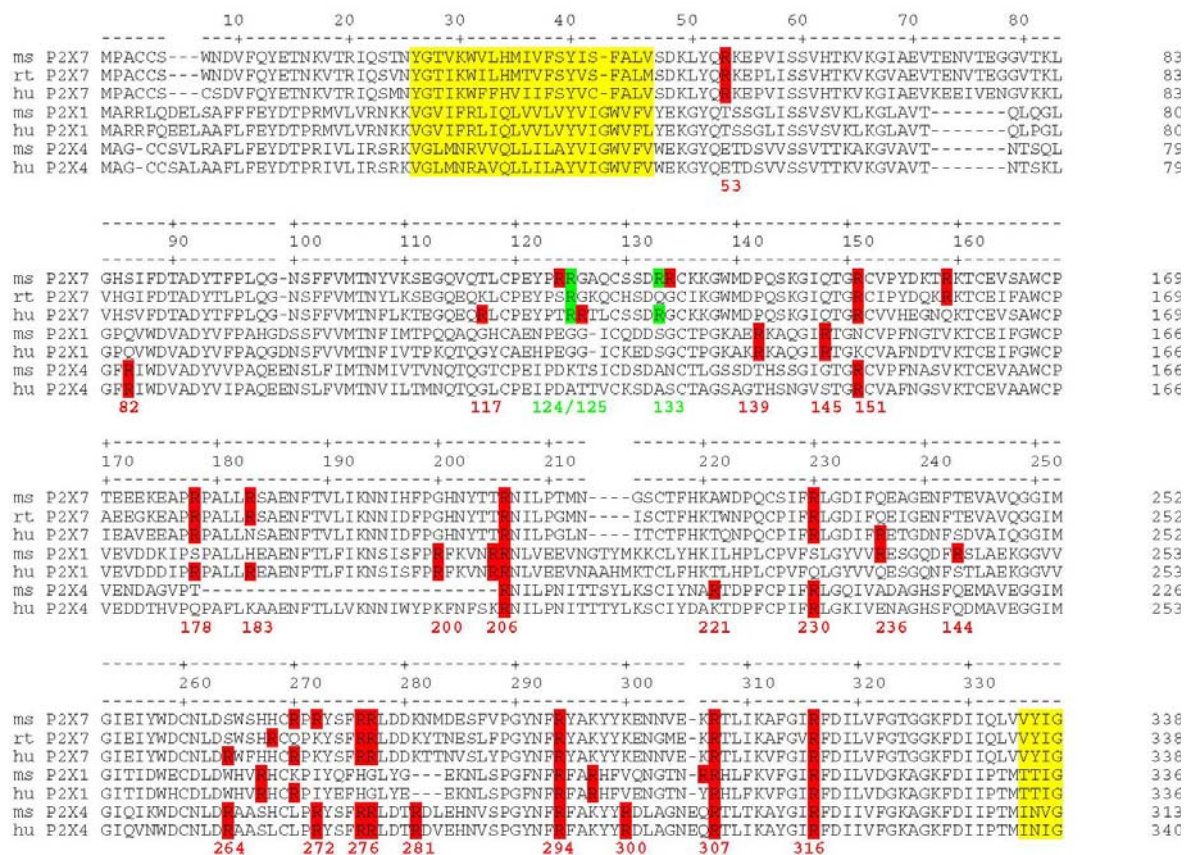


Abb. 44: Alignment von P2X1, P2X4 und P2X7 zur Markierung aller Arginine. Rot markiert wurden alle Arginine der extrazellulären Domäne bis auf die grün markierten Targetarginine der ADP-Ribosylierung. Gelb markiert sind die Transmembrandomänen.

Als nächstes wurde untersucht, ob diese P2X Purinrezeptoren nach zielgerichteter Mutation an der Position, die der primären ADP-Ribosylierungsstelle des P2X7

entspricht, als Targets für die ADP-Ribosylierung fungieren können. Tatsächlich lassen sich die mutierten P2X1 und P2X4 Purinrezeptoren nach Einbringen eines Doppelarginins in der Position 121/122 der Aminosäuresequenz durch die ART2.2 ADP-ribosylieren (**Abb. 43**). Eine Punktmutation genügt somit, um auch die P2X1 und P2X4 Purinrezeptoren zu Targetproteinen der ART2.2 zu machen. Dieses spricht zum einen für eine strukturelle Ähnlichkeit der P2X Purinrezeptoren. Zum anderen wirft es die Frage nach der Erkennungs-Spezifität der ART2.2 auf: warum werden *diese* Argininreste, nicht aber die vielen anderen Arginine in der extrazellulären Domäne ADP-ribosyliert?

4.4 Spezifität der ART2.2 für bestimmte Argininreste in Purinrezeptoren und anderen Zielproteinen

Verschiedene Hypothesen zur Spezifität der ART2.2 für einzelne Argininreste des Wildtyp P2X7 und der mutierten P2X1 und P2X4 sind denkbar: Zum einen könnte es ein Erkennungsmotiv für die ART2.2 geben, d.h. einen Argininrest innerhalb einer bestimmten Sequenz oder einer räumlichen Struktur im Zielprotein. Zum anderen könnten nur bestimmte Arginine im Zielprotein für die ART2.2 räumlich zugänglich sein. Einerseits müsste ein Target-Arginin an der Oberfläche des Zielproteins liegen, andererseits müsste es für das aktive Zentrum der ART2.2 zugänglich sein.

Ein Erkennungsmotiv wäre am einfachsten identifizierbar durch den Vergleich mehrerer Target-Arginine in verschiedenen Zielproteinen. Bisher wurden jedoch nur für eine weitere Säugetier-ART (die ART1 des Menschen) Zielarginine in einem Targetprotein identifiziert. Dabei handelt es sich um ein kleines lösliches Protein, das HNP-1 (human neutrophil peptide), ein antimikrobielles Protein, das von Immunzellen freigesetzt wird. Es gehört zur Gruppe der α -Defensine und besitzt einen hohen Anteil an Argininen (4 von 30 Aminosäuren) und drei Paare an durch Disulfidbrücken verbundenen Cysteinen. Arginin 14 und Arginin 24 wurden als primäre und sekundäre Ziele der ADP-Ribosylierung identifiziert (Paone, Stevens et al. 2006). Im Vergleich der Sequenzen von HNP-1 und P2X7 fällt auf, dass primäre und sekundäre ADP-Ribosylierungsstellen in einem ähnlichen, relativ kurzem Abstand voneinander liegen (von 8 bzw. 10 Aminosäuren). Beide Stellen liegen zudem in einer Cystein-reichen Region, wobei jeweils ein Cystein zwischen primärer und sekundärer ADP-Ribosylierungsstelle liegt.

Diskussion

Allerdings unterscheiden sich die Aminosäuresequenzen ansonsten erheblich voneinander. Auch die räumlichen Strukturen zeigen keine auffälligen Ähnlichkeiten (s. u.).

Im Falle der membranständigen ARTs und ihrer Zielproteine könnte auch der Abstand von der Zellmembran eine Rolle für die Präferenz bestimmter Arginine als Targets der ADP-Ribosylierung spielen. ART2.2 ist über die C-terminale Aminosäure an einem Glykolipid (GPI-Anker) in der Zellmembran fixiert, so dass das aktive Zentrum der ART2 - je nach Beweglichkeit des Enzyms - nur in einem bestimmten Abstand von der Zellmembran lokalisiert sein kann und damit der Abstand des Zielarginins zur Zellmembran möglicherweise von Bedeutung ist.

Nach Fertigstellung der experimentellen Arbeiten wurde die erste Prototyp-Struktur eines P2X Rezeptors publiziert, welche interessante Hinweise für die Beantwortung dieser Fragestellung liefert (**Abb. 45**) (Kawate, Michel et al. 2009). Bei der Struktur handelt es sich um die des P2X4 Rezeptors des Zebrafisches (*Danio rerio*, drP2X4) als Trimär in geschlossenem Zustand ohne Ligand. In der 3D-Struktur des drP2X4 erinnert jede Untereinheit des Trimärs an einen Delphin mit Kopf, zwei Vorderflossen, sowie jeweils einer Rücken- und Schwanzflosse. Dabei entspricht die Kopfdomäne der Cystein-reichen Region, welche im P2X7 die ADP-Ribosylierungsstellen enthält (**Abb. 10**). Das der primären ADP-Ribosylierungsstelle (R125) entsprechende Prolin 125 liegt exponiert an der Unterseite der Kopfdomäne (dunkelblau in **Abb. 45**). Die der sekundären ADP-Ribosylierungsstelle (R133) entsprechende Aminosäure ist bei drP2X4 ebenfalls ein Arginin (bei mP2X4 und hP2X4 jedoch ein Alanin) und liegt ebenfalls gut exponiert etwas weiter oberhalb (nicht gezeigt).

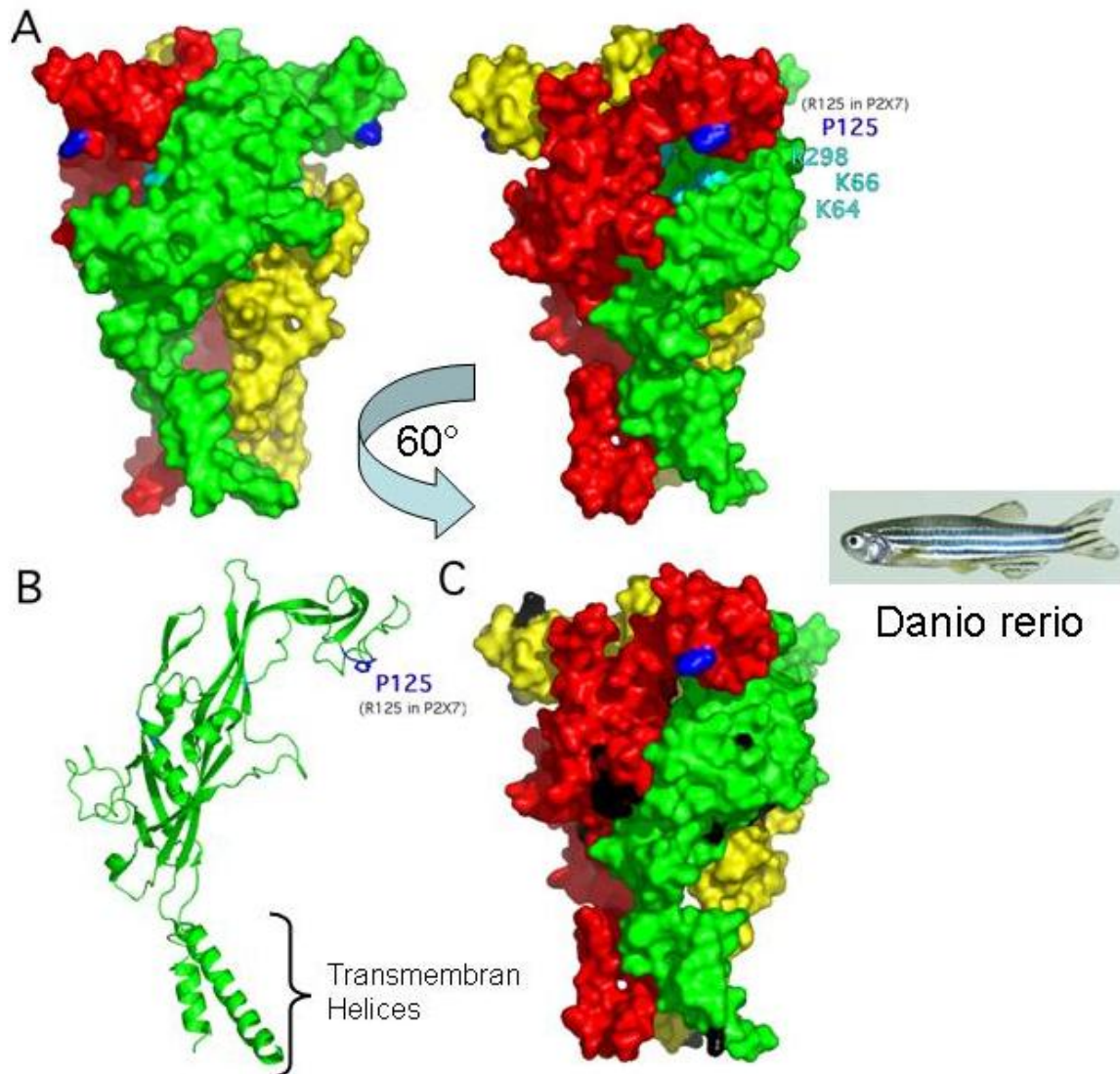


Abb. 45: 3-D Struktur von P2X4 aus dem Zebrafisch (*danio rerio*). Während der Fertigstellung dieser Arbeit hat eine amerikanische Arbeitsgruppe die trimäre Kristallstruktur des P2X4 Purinrezeptors im geschlossenen Zustand ohne Liganden veröffentlicht (Kawate, Michel et al. 2009). Die zur Verfügung stehende 3D-Struktur der extrazellulären Domäne des P2X4 Purinrezeptors wurde hier mit Hilfe von Pymol dargestellt. A: In rot, grün und gelb sind jeweils die Oberflächendarstellungen eines P2X4 Proteins zusammen als Trimär dargestellt. Jedes einzelne Protein erinnert dabei an einen Delphin mit Kopf, zwei Vorderflossen, sowie jeweils einer Rücken- und Schwanzflosse. Markiert wurde in blau die Targetamino-säure der ADP-Ribosylierung, denn im Alignment entspricht das Prolin P125 im Zebrafisch P2X4 dem Target-Arginin des P2X7 R125. Direkt unterhalb liegt die vermutete ATP-Bindungsstelle. B: Hier sieht man, dass das Protein nahezu komplett bis auf die Transmembrandomäne und kurze mittlere Verbindungsstücke aus β -Faltblattstrukturen aufgebaut ist. C: Alle für Zebrafisch, Mensch, Maus und Ratte konservierten Arginine sind hier sichtbar an der Oberfläche schwarz markiert.

Diskussion

Stellt man ein Alignment der P2X4 Purinrezeptoren aus dem Zebrafisch, Mensch, Maus und Ratte her (**Abb. 46**), sieht man, dass neben mehreren nicht-konservierten Argininen (cyan hinterlegt) auch 10 konservierte Arginine (rot) vorhanden sind. Acht der konservierten Arginine sind ebenfalls bei P2X7 konserviert und lassen sich allesamt auf der Oberfläche der 3D-Kristallstruktur wiederfinden (schwarz in **Abb. 45**). Einige davon befinden sich in einem ähnlichen Abstand von der Zellmembran wie P125 und R133, sind aber offensichtlich nicht für die ART2.2 erreichbar. Soweit bekannt, wurde für P2X4 aus *Danio rerio* bisher noch nicht untersucht, ob es ADP-ribosyliert wird. Das wäre jedoch eine interessante Fragestellung, denn dieses Protein besitzt an der Position 133 ein Arginin, welches der sekundären ADP-Ribosylierungsstelle des murinen und humanen P2X7 Rezeptors entspricht. Zudem kodiert das entschlüsselte Genom des Zebrafisches für zahlreiche, vorhergesagte Arginin-spezifische ARTs (R-S-EXE).

Diskussion

```

drP2X4      -----GSSKKVGT125LNRF133TQALVIAYVIGYVCVY133YNKGYQDTDTV
hsP2X4a    MAGCCAALAAFLFEYDTPRIVLIRSRKVGLMNRVQ133LLILAYVIGWV133FWWEKGYQETDSV
mmP2X4    MAGCCSVLRAFLFEYDTPRIVLIRSRKVGLMNRV133VQ133LLILAYVIGWV133FWWEKGYQETDSV
rnP2X4    MAGCCSVLGSFLFEYDTPRIVLIRSRKVGLMNRV133Q133LLILAYVIGWV133FWWEKGYQETDSV
          *:*:* :*:* . * *::*****:* *::*****:*:*

drP2X4      LSSVTTKVKGIALTNTSELGERIWDVADYIIPQEDGSFFVLTNMIITTNQTQSKCAENP
hsP2X4a    VSSVTTKVKGVAVTNTSKLGFRIWDVADYVIPAQEENSLFVMTNVIILTMNQTQGLCPEIIP
mmP2X4    VSSVTTKAKGVAVTNTSQLGFRIWDVADYVVPQAQEENSLFIMTNMIITVNQTQGTCPPIIP
rnP2X4    VSSVTTKAKGVAVTNTSQLGFRIWDVADYVIPAQEENSLFIMTNMIITVNQTQGTCPPIIP
          :*****.*:*:*:*****:* *****:.*:*:.*:*:*:* * * * * . * * *

drP2X4      TPASTCTSHR125DCR133GFNDAR133GDGVRTGR133CVSYSASVKTCEVLSWC133PLEKIVDPNP133PLLA
hsP2X4a    DATTVCKSDASCTAGSAGTHSNGVSTGR133CVAFNGSVKTCEVA133AWCPVEDDTHV133QPAPFLK
mmP2X4    DKTSICDSANCTLGSSDTHSSGIGTGR133CVPFNASVKTCEVA133AWCPVENDAGVPT-----
rnP2X4    DKTSICNSDADCTPGSVDTHSSGVATGR133CVPFNESVKTCEVA133AWCPVENDVGVPTPAPFLK
          : * * . * . * . : : . * : * * * * . : . * * * * * : * * * * . *

drP2X4      DAENFTVLIKNNIR133YPKFNFNKR133NILPNINSSYLTHCVFSR133KTD133DPDCPIFRLGDI133VGAEAE
hsP2X4a    AAENFTLLVKNNIWYPKFNFSKR133NILPNI133TT133Y133LKSCIYDAKTD133PF133CPIFRLGKI133VENAG
mmP2X4    -----RNILPNI133TT133Y133LKSCIYNA133RTD133PF133CPIFRLGQI133VADAG
rnP2X4    AAENFTLLVKNNIWYPKFNFSKR133NILPNI133TT133Y133LKSCIYNA133QT133DP133PF133CPIFRLGTI133VGDAE
          *****.:*:* . * : : . * * * * * * * * * * * * * *

drP2X4      EDFQIMAVRGGVMGVQIR133WDCDLMPQSWCVP133RYTF133RRLDNKDPDNNVAPGYNF133FAKY
hsP2X4a    HSFQDMAVEGGIMGIQVNWDCNLDRAASLCLP133YSFR133RLDTRDVEHNVSPGYNF133FAKY
mmP2X4    HSFQEMAVEGGIMGIQIKWDCNLDRAASHCLP133YSFR133RLDTRDLEHNVSPGYNF133FAKY
rnP2X4    HSFQEMAVEGGIMGIQIKWDCNLDRAASLCLP133YSFR133RLDTRDLEHNVSPGYNF133FAKY
          . * * * * . * : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

drP2X4      KNSDGTET133TLIKGYGIR133FDVMVFGQAGKFNIIPTLLNIGAGLALLGLVNVI133CDWIV133VLTF
hsP2X4a    RDLAGNEQ133TLIKAYGIR133FDIIVFGKAGKFDIIPTMINIGSGLALLGMATVLC133DIIVLYC
mmP2X4    RDLAGNEQ133TLTKAYGIR133FDIIVFGKAGKFDIIPTMINVGSGLALLGVATVLC133DIIVLYC
rnP2X4    RDLAGKEQ133TLTKAYGIR133FDIIVFGKAGKFDIIPTMINVGSGLALLGVATVLC133DIIVLYC
          : : * * * * * . * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

drP2X4      MKRKQHYKEQKYTYVDD-----F
hsP2X4a    MKKRLYYREKKYKYVEDYEQGLASELDQ
mmP2X4    MKKRYYYRDKKYKYVEDYEQGLSGETDQ
rnP2X4    MKKKYYYRDKKYKYVEDYEQGLSGEMNQ
          ** : : * : : * * . * * : *

```

Abb. 46: Alignment von P2X4 aus dem Zebrafisch, Mensch, Maus und Ratte. Im Alignment der P2X4 Rezeptoren wurden die 10 konservierten Arginine rot markiert. Zusätzlich vorkommende Arginine, die nicht in allen Orthologen konserviert vorkommen, wurden türkis hinterlegt. In grün hinterlegt wurden die im Rahmen dieser Arbeit mutierten Aminosäuren bzw. das entsprechende Korrelat in *danio rerio*, dem Prolin 125, welches im P2X7 dem Targetarginin der ADP-Ribosylierung entspricht in der Nähe der vermuteten ATP-Bindungsstelle. An der Stelle 133 befindet sich im drP2X4 ein Arginin, welches jedoch nicht in allen Orthologen konserviert vorkommt.

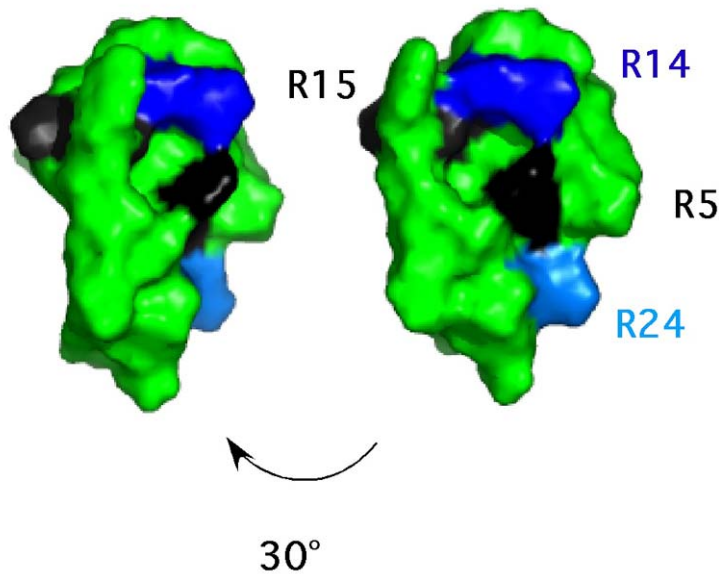
Auch andere Autoren haben sich der Frage nach der Bedeutung des Abstandes zur Zellmembran für die ADP-Ribosylierung eines Membranproteins durch eine membranständige ART gewidmet: wie am Beispiel des Integrin $\alpha 7\beta 1$ als Target der ART1. Die $\alpha 7$ Untereinheit wird ebenfalls an einer primären und sekundären Stelle

Diskussion

ADP-ribosyliert, die allerdings erst grob lokalisiert werden konnten (aufgrund von partieller proteolytischer Fragmentierung der $\alpha 7$ Kette). Die primäre ADP-Ribosylierungsstelle liegt in dem Fragment zwischen Aminosäuren 605 und 914, das 20 potentielle Arginine als Targets enthält (Zhao, Gruszczynska-Biegala et al. 2005). Anhand eines Vergleichs der 3D-Strukturen des $\alpha\beta 3$ -Integrins und der ART2 ließ sich aufgrund der Distanz zur Zellmembran und des Durchmessers der ART2 die Zahl der potentiellen Targetarginine von 20 auf 10 eingrenzen (Zolkiewska 2005), darunter 6 Einzelarginine und eine auffällige Kette von vier nebeneinander liegenden Argininen. Die genaue Bestimmung der Targetarginine steht jedoch noch aus.

In der Orientierung zueinander sowie dem Abstand zur Zellmembran liegt vermutlich jedoch nicht allein die Lösung des Rätsels der Arginin-Spezifität. Für lösliche Proteine wie das HNP-1 müssen andere Erkennungsmerkmale gelten. Kürzlich wurde die Kristallstruktur von HNP-1 veröffentlicht (Zhang, Doherty et al.). Die farbliche Hervorhebung der Target-Arginine lässt keine besonderen strukturellen Merkmale der primären ADP-Ribosylierungsstelle (dunkelblau) gegenüber der sekundären (hellblau) bzw. den schwarz dargestellten übrigen zwei Argininen erkennen, die keine Targets darstellen (**Abb. 47**). Für R14 und R24 gilt jedoch, dass sie beide gut auf der Oberfläche zugänglich sind. Ein Merkmal von Proteinen der ADP-Ribosylierung scheint ein hoher Anteil an Argininen zu sein. Das dem HNP-1 verwandte HBD-1 besitzt beispielsweise nur ein Arginin und wird nicht ADP-ribosyliert (**Abb. 47**). Interessanterweise besitzt das HNP-1 wie das humane und murine P2X7 in der Cysteinreichen Region das ADP-Ribosylierungs-Motiv RR-R, also ein Doppelarginin und in etwas Abstand ein Einzelarginin. In beiden Proteinen ist das primäre Targetarginin eines der beiden Doppelarginine.

Diskussion



Aminosäuresequenz HNP-1: ACYCRIPACIAGER^RRYGTCIYQGR^RLWAFCC

Aminosäuresequenz

HBD-1: DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCY^RGKAKCCK

Abb. 47: 3D-Struktur von HNP-1. Dunkelblau markiert wurde das primäre Targetarginin R14, der ADP-Ribosylierung sowie in hellblau die sekundäre ADP-Ribosylierungsstelle R24 (auch farbgleich hinterlegt in der Aminosäuresequenz). Insgesamt besitzt das Protein 4 Arginine, von denen 2 Arginine keine Targets der ADP-Ribosylierung darstellen. Das dem HNP-1 verwandte HBD-1 besitzt nur ein Arginin (gelb), pdb code: 2kht.

Obwohl ART1 und ART2 in vitro viele verschiedene Targetproteine ADP-ribosylieren können, zeigen sie dennoch eine gewisse Substratspezifität, selbst als lösliche Proteine. So wird z.B. von der hART1 aus einer Gruppe getesteter Wachstumsfaktoren PDGF-BB bevorzugt ADP-ribosyliert, das nah verwandte PDGF-AA hingegen nicht (Saxty, Yadollahi-Farsani et al. 2001). Beide Moleküle enthalten zahlreiche Arginine, die in der 3D Struktur (1pdg) auf der Proteinoberfläche liegen (nicht gezeigt). Interessanterweise enthält PDGF-BB ein Doppelarginin, das einem Einzelarginin in PDGF-AA entspricht. Die Identifizierung der Target-Arginine in PDGF-BB steht jedoch noch aus.

Diskussion

Eine Identifizierung der Targetamino­säuren der ADP-Ribosylierung könnte helfen, die funktionellen Konsequenzen der Modifikation zu verstehen. Im Falle von P2X7 führt die ADP-Ribosylierung an R125 zur Öffnung des Ionenkanals (Adriouch, 2007). Da die Zielamino­säure R125 direkt über der ATP-Bindungstasche liegt, ist vorstellbar, dass die ADP-Ribosegruppe in diese Tasche bindet und dadurch P2X7 aktiviert. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die in dieser Arbeit mutierten, an der entsprechenden Position ADP-ribosylierbaren P2X1 und P2X4 Rezeptoren ebenfalls hierdurch aktiviert werden können. Die zweite ADP-Ribosylierungsstelle in P2X7, R133, liegt weiter entfernt von der Ligandenbindungstasche. Die ADP-Ribosylierung allein an dieser Position führt nicht zur Aktivierung von P2X7, erleichtert jedoch die Aktivierung durch ADP-Ribosylierung, möglicherweise durch eine allosterische Wirkung (Adriouch 2007).

Bei HNP-1 führt die ADP-Ribosylierung zu einem Verlust der antimikrobiellen Wirkung, stimuliert jedoch die IL-8 Freisetzung durch Lungenepithelzellen und verstärkt dadurch möglicherweise die Rekrutierung von Granulozyten. Diese Eigenschaften deuten an, dass ADP-ribosyliertes HNP-1 möglicherweise als ein Agens in der Therapie pulmonaler Infektionen und Lungenerkrankungen eingesetzt werden könnte. Interessanterweise konnte ADP-ribosyliertes HNP-1 in der bronchoalveolären Lavage von Rauchern nachgewiesen werden (Paone, Stevens et al. 2006).

Im Falle von Integrin $\alpha 7$ und PDGF-BB könnte die Identifizierung der ADP-Ribosylierungsstellen möglicherweise Hinweise auf die molekulare Grundlage für die verstärkte bzw. verminderte Bindung an Lamin bzw. den PDGF Rezeptor liefern.

4.5 Ausblick und weiterführende Analysen

Die in dieser Arbeit untersuchten P2X Rezeptoren und ADP-Ribosyltransferasen stellen einen Teil eines komplexen Systems für die Wahrnehmung von extrazellulären Nukleotiden dar, die durch Zellschädigung freigesetzt wurden (**Abb. 48**). Dieses Rezeptorsystem hilft Zellen des Immunsystems und Epithelzellen, angemessen auf eine Zellschädigung zu reagieren (la Sala, Ferrari et al. 2003; Haag, Adriouch et al. 2007). Interessanterweise sind ARTs konstitutiv, P2X Rezeptoren dynamisch mit sogenannten

Diskussion

lipid rafts assoziiert (Bannas, Adriouch et al. 2005; Gonnord, Delarasse et al. 2009), die für die Signaltransduktion bekanntermaßen eine wichtige Rolle spielen (Vacca, Amadio et al. 2004; Garcia-Marcos, Pochet et al. 2006; Barth, Weinhold et al. 2007; Parton and Simons 2007). Obwohl schon viele Rätsel, wie die Struktur des P2X4 Rezeptors und die ADP-Ribosylierungsstelle im P2X7 Rezeptor, gelöst wurden, bleiben wichtige Fragen offen, z.B. bezüglich der Bedeutung der Koexpression von unterschiedlich sensitiven P2X Rezeptoren (Qiao, Zhou et al. 2003; Chen, Jin et al. 2004) und der subzellulären Kompartimentierung in unterschiedlichen Zellkompartimenten wie Plasmamembran und Lysosomen. Die in dieser Arbeit hergestellten und charakterisierten α -Pincs stellen nützliche Werkzeuge für die weitere strukturelle und funktionelle Charakterisierung dieser interessanten Rezeptoren bereit.

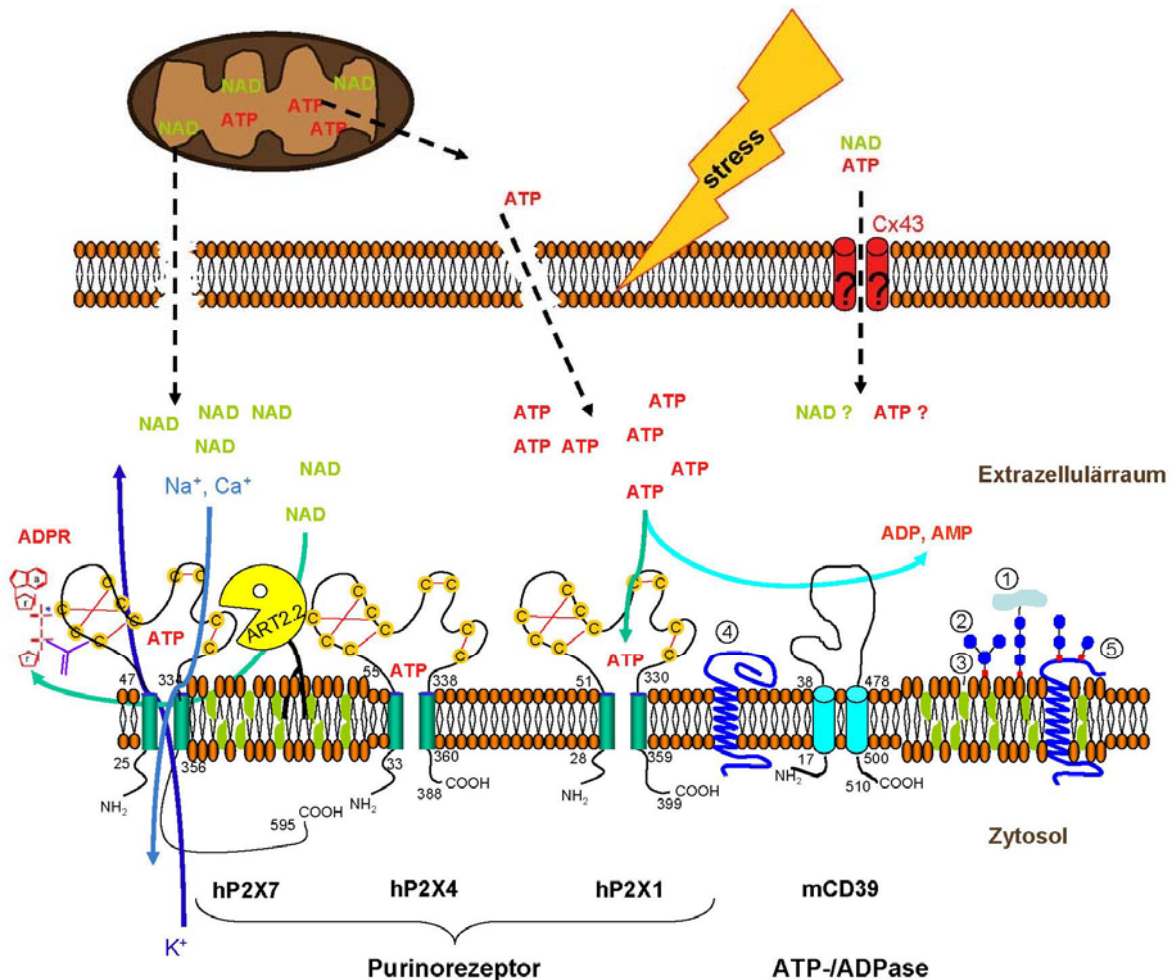


Abb. 48: Schema der Aktivierung der P2X-Purinrezeptoren. Schematische Darstellung der Freisetzung von NAD und ATP aus gestressten Zellen und der Interaktion von ART2.2, Purinrezeptoren und ATP-hydrolysierenden Ektoenzymen. 1: GPI-verankertes Protein, 2: Glykolipid, 3: Cholesterin, 4: Nicht-Raft assoziiertes Transmembranprotein, 5: Lipid-Raft assoziiertes Transmembranprotein mit glykosylierter Modifikation (Glykoprotein und Glykolipide).

Um die Funktion der P2X Purinrezeptoren besser zu verstehen, ist ein nahe liegendes Ziel die Aufklärung der 3-D-Strukturen, wie kürzlich für den P2X4 Rezeptor des Zebrafisches im geschlossenen Zustand gelungen. Im P2X7 Purinrezeptor führt die ADP-Ribosylierung an R125 zur Öffnung des Ionenkanals. Interessant wäre es zu klären, ob auch die in dieser Arbeit generierten, P2X1 und P2X4 Purinrezeptor-Mutanten durch ADP-Ribosylierung aktiviert werden. Da die hier charakterisierten α -Pincs die Purinrezeptoren in nativem Zustand immunpräzipitieren konnten, eignen sich

Diskussion

diese Ak möglicherweise auch für die Reinigung von P2X Rezeptoren in größerem Maßstab für Kristallisationszwecke.

Funktionsstörungen der P2X Rezeptoren wurden mit verschiedenen Erkrankungen des inflammatorischen (Di Virgilio 2007), immunogenen, kardiovaskulären, neuronalen und malignen (White and Burnstock 2006) Formkreises in Verbindung gebracht. Somit stellen P2X Rezeptoren mögliche Targets für neue therapeutische Ansätze dar. Die Generierung weiterer P2X-spezifischer Antikörper im Zusammenhang mit dem Fortschritt der Funktions- und Strukturanalysen der P2X Purinrezeptoren münden somit in dem Ziel, letztendlich weitere Therapieoptionen von Autoimmunerkrankungen aufzudecken. Ein Beispiel hierfür wäre die Herstellung von Antikörpern, die P2X Rezeptoren blockieren und somit als potentielle Immunmodulatoren wirken könnten.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression der membranständigen P2X1, P2X4, und P2X7 Purinrezeptoren auf der Zelloberfläche von murinen und humanen Immunzellen näher zu charakterisieren. Mit Hilfe neu hergestellter und kommerziell verfügbarer P2X-Antikörper sollte die Frage geklärt werden, auf welchen Zellen und Zelllinien welche Purinrezeptoren exprimiert werden. Hierfür wurden Immunfluoreszenz-, Immunpräzipitations-, Western Blot- und FACS-Analysen eingesetzt. Dabei wurden die Antikörper auch auf eine mögliche Kreuzreaktivität mit orthologen und paralogen Purinrezeptoren untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die α -Pincs die Zelloberflächenexpression von P2X1, P2X4 und P2X7 auf transfizierten Zellen sicher nachweisen können. Aus diesem Grunde konnten die α -Pincs zum Screening etablierter Zelllinien für die Expression von P2X Purinrezeptoren verwendet werden und ließen sich für FACS-Analysen an primären Immunzellen, wie den regulatorischen T-Zellen, einsetzen.

Mit Hilfe von ADP-Ribosylierungsassays wurde der Frage nachgegangen, ob neben dem murinen P2X7 auch weitere Purinrezeptoren als Ziel für die ADP-Ribosylierungen fungieren können. Die Analysen ergaben, dass eine Punktmutation genügt, um auch die P2X1 und P2X4 Purinrezeptoren zu Targetproteinen der ART2.2 zu machen. Dieses spricht zum einen für eine strukturelle Ähnlichkeit der P2X Purinrezeptoren. Zum anderen wirft es die Frage nach der Erkennungs-Spezifität der ART2.2 auf. Verschiedene Hypothesen zu dieser Frage wurden diskutiert.

Für verschiedene Experimente wurden Zellen benötigt, die nur einen P2X Purinrezeptor auf der Oberfläche exprimieren. Hierfür wurden CHO-Zellen, die bereits die ART2 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, stabil mit murinen und humanen P2X1, P2X4, und P2X7 transfiziert.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ADPR	Adenosin-5'-diphosphoribose
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
α -Peptid	Anti-Peptid-Antikörper
α -Pinc	abgeleitet von ADAPINC (Anibodies directed against proteins in native conformation)
APC	antigenpräsentierende Zelle
ART	ADP-Ribosyltransferase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BMDC	aus dem Knochenmark ausdifferenzierte dendritische Zelle (<i>bone marrow derived dendritic cell</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BzATP	2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat
cAMP	cyclisches Adenosin-5'-monophosphat
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle

Abkürzungsverzeichnis

DMEM	Medium für adhärent wachsende Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminiscent
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF2 α	eukaryotischer Initiationsfaktor 2 α
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
E-NPP	Ekto-Nukleotidpyrophosphatasen /phosphodiesterasen
E-NTPD	Ekto-Nukleosidtriphosphat- diphosphohydrolasen
etheno-NAD	Nicotinamid-1,N6-Etheno-Adenin- Dinucleotide
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinthiocyanat
Foxp3	ein Transkriptionsfaktor
FSC	Vorwärtsstreuung (<i>forward scatter</i>): gibt bei durchflusszytometrischen Analysen Aufschluss über die Größe der Zellen
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-kolonie- stimulierender Faktor
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinsulfonat

Abkürzungsverzeichnis

HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül (<i>intercellular adhesion molecule</i>)
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IS	Immunsrum
Kb	Kilobase
KN62	(S)-5-Isoquinolinsulfonsäure 4-[2-[(5-isoquinolinylsulfonyl)methylamino]-3-oxo-3-(4-phenyl-1-piperaziny)propyl]phenylester 1-[N,O-bis(5-Isoquinolinsulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazin
KO	gezielte Deaktivierung eines oder mehrerer Gene (<i>knockout</i>)
LB-Medium	Medium zur Transformation von E.coli
LDS	lithium-dodecyl-sulfate
LFA	funktionelles Leukozytenantigen (<i>leukocyte functional antigen</i>)
Lk	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
M-CSF	Makrophagen-koloniestimulierender Faktor

Abkürzungsverzeichnis

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MES	2-(N-morpholino)ethane sulfonic acid
MOPS	3-(N-morpholino)propane sulfonic acid
NAADP	Nikotinsäureadeninindinukleotid-2'- phosphat
NAD	β-Nikotinamidadenindinukleotid
NADase	NAD-Glykohydrolase
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NC	Nitrozellulose
NICD	NAD-induzierter Zelltod (<i>NAD-induced cell death</i>)
NK Zelle	„Natürliche Killer“ Zelle
oATP	oxidiertes ATP: Adenosin-5'- triphosphat-2',3'-dialdehyd
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAk	polyklonaler Antikörper
PARP	Poly-ADP-Ribosylpolymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration an H ₃ O ⁺ - Ionen
PI	Propidiumiodid

Abkürzungsverzeichnis

PIS	Präimmunserum
PO	Peroxidase
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Rounds per minute
RPMI	Medium für Suspensionszellen
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese
SSC	Seitwärtsstreuung (<i>side scatter</i>): gibt bei durchflusszytometrischen Analysen Aufschluss über die Granularität der Zellen
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TACE	Metalloprotease, die TNF- α von der Zelloberfläche abspaltet (<i>TNF-α converting enzyme</i>)
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TE	Tris-EDTA

Abkürzungsverzeichnis

TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
Treg	regulatorische T-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TX-100	Triton X 100
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp

7 Literaturverzeichnis

- Aderem, A. and D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." Annu Rev Immunol **17**: 593-623.
- Adinolfi, E., L. Melchiorri, et al. (2002). "P2X7 receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia." Blood **99**(2): 706-8.
- Adriouch, S., P. Bannas, et al. (2008). "ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site." FASEB J **22**(3): 861-9.
- Adriouch, S., W. Ohlrogge, et al. (2001). "Rapid induction of naive T cell apoptosis by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide: requirement for mono(ADP-ribosyl)transferase 2 and a downstream effector." J Immunol **167**(1): 196-203.
- Aktories, K., T. Ankenbauer, et al. (1986). "ADP-ribosylation of platelet actin by botulinum C2 toxin." Eur J Biochem **161**(1): 155-62.
- Aktories, K. and J. T. Barbieri (2005). "Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches." Nat Rev Microbiol **3**(5): 397-410.
- Aktories, K., G. Schmidt, et al. (2000). "Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins." Biol Chem **381**(5-6): 421-6.
- Aswad, F. and G. Dennert (2006). "P2X7 receptor expression levels determine lethal effects of a purine based danger signal in T lymphocytes." Cell Immunol **243**(1): 58-65.
- Aswad, F., H. Kawamura, et al. (2005). "High sensitivity of CD4+CD25+ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors." J Immunol **175**(5): 3075-83.
- Atarashi, K., J. Nishimura, et al. (2008). "ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation." Nature **455**(7214): 808-12.
- Bannas, P. (2007). Die murine T-Zell Ecto-ADP-Ribosyltransferase ART2.2: Nachweis ihrer Lokalisation in Lipid Rafts und Identifizierung ihrer Zielproteine.
- Bannas, P., S. Adriouch, et al. (2005). "Activity and specificity of toxin-related mouse T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 depends on its association with lipid rafts." Blood **105**(9): 3663-70.
- Baricordi, O. R., D. Ferrari, et al. (1996). "An ATP-activated channel is involved in mitogenic stimulation of human T lymphocytes." Blood **87**(2): 682-90.
- Barth, K., K. Weinhold, et al. (2007). "Caveolin-1 influences P2X7 receptor expression and localization in mouse lung alveolar epithelial cells." FEBS J **274**(12): 3021-33.
- Berger, F., C. Lau, et al. (2005). "Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms." J Biol Chem **280**(43): 36334-41.
- Berthelier, V., J. M. Tixier, et al. (1998). "Human CD38 is an authentic NAD(P)+ glycohydrolase." Biochem J **330** (Pt 3): 1383-90.
- Bodin, P. and G. Burnstock (2001). "Purinergetic signalling: ATP release." Neurochem Res **26**(8-9): 959-69.
- Boudreault, F. and R. Grygorczyk (2004). "Cell swelling-induced ATP release is tightly dependent on intracellular calcium elevations." J Physiol **561**(Pt 2): 499-513.

Literaturverzeichnis

- Boumechache, M., M. Masin, et al. (2009). "Analysis of assembly and trafficking of native P2X4 and P2X7 receptor complexes in rodent immune cells." J Biol Chem **284**(20): 13446-54.
- Bruzzo, S., L. Guida, et al. (2001). "Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells." FASEB J **15**(1): 10-12.
- Buell, G., I. P. Chessell, et al. (1998). "Blockade of human P2X7 receptor function with a monoclonal antibody." Blood **92**(10): 3521-8.
- Buisman, H. P., T. H. Steinberg, et al. (1988). "Extracellular ATP induces a large nonselective conductance in macrophage plasma membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(21): 7988-92.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem **112**(2): 195-203.
- Burnstock, G. (1972). "Purinergetic nerves." Pharmacol Rev **24**(3): 509-81.
- Burnstock, G. (1976). "Purinergetic receptors." J Theor Biol **62**(2): 491-503.
- Burnstock, G. and G. E. Knight (2004). "Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems." Int Rev Cytol **240**: 31-304.
- Burnstock, G. and M. Williams (2000). "P2 purinergetic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential." J Pharmacol Exp Ther **295**(3): 862-9.
- Cattaneo, M. (2007). "Platelet P2 receptors: old and new targets for antithrombotic drugs." Expert Rev Cardiovasc Ther **5**(1): 45-55.
- Chen, Z., N. Jin, et al. (2004). "Identification of two novel markers for alveolar epithelial type I and II cells." Biochem Biophys Res Commun **319**(3): 774-80.
- Cherian, P. P., A. J. Siller-Jackson, et al. (2005). "Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin." Mol Biol Cell **16**(7): 3100-6.
- Clyne, J. D., L. D. LaPointe, et al. (2002). "The role of histidine residues in modulation of the rat P2X(2) purinoceptor by zinc and pH." J Physiol **539**(Pt 2): 347-59.
- Cockayne, D. A., T. Muchamuel, et al. (1998). "Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses." Blood **92**(4): 1324-33.
- Cohn, M., N. A. Mitchison, et al. (2007). "Reflections on the clonal-selection theory." Nat Rev Immunol **7**(10): 823-30.
- Collier, R. J. (2001). "Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century." Toxicon **39**(11): 1793-803.
- Collo, G., S. Neidhart, et al. (1997). "Tissue distribution of the P2X7 receptor." Neuropharmacology **36**(9): 1277-83.
- Contreras, J. E., H. A. Sanchez, et al. (2002). "Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 495-500.
- Coutinho-Silva, R., L. Stahl, et al. (2003). "Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation." Immunity **19**(3): 403-12.

Literaturverzeichnis

- Davies, C. A., D. Perrett, et al. (1999). "Simultaneous analysis of nitrite, nitrate and the nicotinamide nucleotides by capillary electrophoresis: application to biochemical studies and human extracellular fluids." Electrophoresis **20**(10): 2111-7.
- Davis, R. E., V. Mysore, et al. (1998). "In situ staining for poly(ADP-ribose) polymerase activity using an NAD analogue." J Histochem Cytochem **46**(11): 1279-89.
- De Flora, A., L. Franco, et al. (1998). "Ectocellular CD38-catalyzed synthesis and intracellular Ca(2+)-mobilizing activity of cyclic ADP-ribose." Cell Biochem Biophys **28**(1): 45-62.
- Delves, P. J. and I. M. Roitt (2000). "The immune system. First of two parts." N Engl J Med **343**(1): 37-49.
- Delves, P. J. and I. M. Roitt (2000). "The immune system. Second of two parts." N Engl J Med **343**(2): 108-17.
- Di Lisa, F. and M. Ziegler (2001). "Pathophysiological relevance of mitochondria in NAD(+) metabolism." FEBS Lett **492**(1-2): 4-8.
- Di Virgilio, F. (2005). "Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells." Purinergic Signal **1**(3): 205-9.
- Di Virgilio, F. (2007). "Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome." Trends Pharmacol Sci **28**(9): 465-72.
- Di Virgilio, F., P. Chiozzi, et al. (1998). "Cytolytic P2X purinoceptors." Cell Death Differ **5**(3): 191-9.
- Di Virgilio, F., P. Chiozzi, et al. (2001). "Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells." Blood **97**(3): 587-600.
- Domenighini, M. and R. Rappuoli (1996). "Three conserved consensus sequences identify the NAD-binding site of ADP-ribosylating enzymes, expressed by eukaryotes, bacteria and T-even bacteriophages." Mol Microbiol **21**(4): 667-74.
- Dubyak, G. R. (2003). "Knock-out mice reveal tissue-specific roles of P2Y receptor subtypes in different epithelia." Mol Pharmacol **63**(4): 773-6.
- Elliott, J. I. and C. F. Higgins (2004). "Major histocompatibility complex class I shedding and programmed cell death stimulated through the proinflammatory P2X7 receptor: a candidate susceptibility gene for NOD diabetes." Diabetes **53**(8): 2012-7.
- Elliott, J. I., A. Surprenant, et al. (2005). "Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes." Nat Cell Biol **7**(8): 808-16.
- Elliott, M. R., F. B. Cheken, et al. (2009). "Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance." Nature **461**(7261): 282-6.
- Ennion, S., S. Hagan, et al. (2000). "The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X1 receptors." J Biol Chem **275**(45): 35656.
- Ennion, S. J. and R. J. Evans (2002). "Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface." Mol Pharmacol **61**(2): 303-11.
- Fairbairn, I. P., C. B. Stober, et al. (2001). "ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X(7)-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion." J Immunol **167**(6): 3300-7.

Literaturverzeichnis

- Fazilleau, N., L. J. McHeyzer-Williams, et al. (2007). "Local development of effector and memory T helper cells." Curr Opin Immunol **19**(3): 259-67.
- Fearon, D. T. (1998). "The complement system and adaptive immunity." Semin Immunol **10**(5): 355-61.
- Ferrari, D., P. Chiozzi, et al. (1997). "ATP-mediated cytotoxicity in microglial cells." Neuropharmacology **36**(9): 1295-301.
- Ferrari, D., P. Chiozzi, et al. (1997). "Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin." J Exp Med **185**(3): 579-82.
- Fredholm, B. B., M. P. Abbracchio, et al. (1997). "Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors." Trends Pharmacol Sci **18**(3): 79-82.
- Galligan, J. J. (2004). "Enteric P2X receptors as potential targets for drug treatment of the irritable bowel syndrome." Br J Pharmacol **141**(8): 1294-302.
- Garcia-Marcos, M., S. Pochet, et al. (2006). "Characterization and comparison of raft-like membranes isolated by two different methods from rat submandibular gland cells." Biochim Biophys Acta **1758**(6): 796-806.
- Genetos, D. C., D. J. Geist, et al. (2005). "Fluid shear-induced ATP secretion mediates prostaglandin release in MC3T3-E1 osteoblasts." J Bone Miner Res **20**(1): 41-9.
- Glowacki, G., R. Braren, et al. (2002). "The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse." Protein Sci **11**(7): 1657-70.
- Gonnord, P., C. Delarasse, et al. (2009). "Palmitoylation of the P2X7 receptor, an ATP-gated channel, controls its expression and association with lipid rafts." FASEB J **23**(3): 795-805.
- Gu, B., L. J. Bendall, et al. (1998). "Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases." Blood **92**(3): 946-51.
- Guo, C., M. Masin, et al. (2007). "Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors." Mol Pharmacol **72**(6): 1447-56.
- Guse, A. H. (2000). "Cyclic ADP-ribose." J Mol Med **78**(1): 26-35.
- Haag, F., S. Adriouch, et al. (2007). "Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation." Purinergic Signal **3**(1-2): 71-81.
- Haag, F., F. Koch-Nolte, et al. (1994). "Premature stop codons inactivate the RT6 genes of the human and chimpanzee species." J Mol Biol **243**(3): 537-46.
- Hechler, B., N. Lenain, et al. (2003). "A role of the fast ATP-gated P2X1 cation channel in thrombosis of small arteries in vivo." J Exp Med **198**(4): 661-7.
- Hereg, Z. and Z. Q. Wang (2001). "Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death." Mutat Res **477**(1-2): 97-110.
- Hickman, S. E., J. el Khoury, et al. (1994). "P2Z adenosine triphosphate receptor activity in cultured human monocyte-derived macrophages." Blood **84**(8): 2452-6.
- Hiken, J. F. and T. H. Steinberg (2004). "ATP downregulates P2X7 and inhibits osteoclast formation in RAW cells." Am J Physiol Cell Physiol **287**(2): C403-12.
- Holbourn, K. P., C. C. Shone, et al. (2006). "A family of killer toxins. Exploring the mechanism of ADP-ribosylating toxins." FEBS J **273**(20): 4579-93.

Literaturverzeichnis

- Holmsen, H., H. J. Day, et al. (1972). "Secretory mechanisms. Behaviour of adenine nucleotides during the platelet release reaction induced by adenosine diphosphate and adrenaline." Biochem J **129**(1): 67-82.
- Honjo, T., Y. Nishizuka, et al. (1968). "Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis." J Biol Chem **243**(12): 3553-5.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-61.
- Huang, S., S. Apasov, et al. (1997). "Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion." Blood **90**(4): 1600-10.
- Ito, M. and I. Matsuoka (2008). "Regulation of purinergic signaling by prostaglandin E2 in murine macrophages." J Pharmacol Sci **107**(4): 443-50.
- Jamieson, G. P., M. B. Snook, et al. (1996). "Extracellular ATP causes loss of L-selectin from human lymphocytes via occupancy of P2Z purinoceptors." J Cell Physiol **166**(3): 637-42.
- Janeway, C., A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2002). Immunologie.
- Jorgensen, R., A. R. Merrill, et al. (2005). "Exotoxin A-eEF2 complex structure indicates ADP ribosylation by ribosome mimicry." Nature **436**(7053): 979-84.
- Kahl, S., M. Nissen, et al. (2000). "Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation." J Immunol **165**(8): 4463-9.
- Kahner, B. N., H. Shankar, et al. (2006). "Nucleotide receptor signaling in platelets." J Thromb Haemost **4**(11): 2317-26.
- Karunaratne, W., C. J. Ku, et al. (2009). "The dual nature of extracellular ATP as a concentration-dependent platelet P2X1 agonist and antagonist." Integr Biol (Camb) **1**(11-12): 655-63.
- Kawamura, H., F. Aswad, et al. (2006). "P2X7 receptors regulate NKT cells in autoimmune hepatitis." J Immunol **176**(4): 2152-60.
- Kawamura, H., F. Aswad, et al. (2005). "P2X7 receptor-dependent and -independent T cell death is induced by nicotinamide adenine dinucleotide." J Immunol **174**(4): 1971-9.
- Kawate, T., J. C. Michel, et al. (2009). "Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state." Nature **460**(7255): 592-8.
- Kennedy, C., T. S. Assis, et al. (2003). "Crossing the pain barrier: P2 receptors as targets for novel analgesics." J Physiol **553**(Pt 3): 683-94.
- Khakh, B. S., G. Burnstock, et al. (2001). "International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits." Pharmacol Rev **53**(1): 107-18.
- Kirwan, S. E. and D. N. Burshtyn (2007). "Regulation of natural killer cell activity." Curr Opin Immunol **19**(1): 46-54.
- Koch-Nolte, F., T. Duffy, et al. (1999). "A new monoclonal antibody detects a developmentally regulated mouse ecto-ADP-ribosyltransferase on T cells: subset distribution, inbred strain variation, and modulation upon T cell activation." J Immunol **163**(11): 6014-22.

Literaturverzeichnis

- Koch-Nolte, F., G. Glowacki, et al. (2005). "Use of genetic immunization to raise antibodies recognizing toxin-related cell surface ADP-ribosyltransferases in native conformation." Cell Immunol **236**(1-2): 66-71.
- Koch-Nolte, F., D. Petersen, et al. (1996). "Mouse T cell membrane proteins Rt6-1 and Rt6-2 are arginine/protein mono(ADPribosyl)transferases and share secondary structure motifs with ADP-ribosylating bacterial toxins." J Biol Chem **271**(13): 7686-93.
- Koch-Nolte, F., P. Reche, et al. (2001). "ADP-ribosyltransferases: plastic tools for inactivating protein and small molecular weight targets." J Biotechnol **92**(2): 81-7.
- Koestner, W. (2007). Identifizierung und molekulare Charakterisierung der Zielproteine von mono-ADP-Ribosyltransferasen.
- Koshiba, M., H. Kojima, et al. (1997). "Memory of extracellular adenosine A2A purinergic receptor-mediated signaling in murine T cells." J Biol Chem **272**(41): 25881-9.
- Krebs, C., S. Adriouch, et al. (2005). "CD38 controls ADP-ribosyltransferase-2-catalyzed ADP-ribosylation of T cell surface proteins." J Immunol **174**(6): 3298-305.
- Krebs, C., W. Koestner, et al. (2003). "Flow cytometric and immunoblot assays for cell surface ADP-ribosylation using a monoclonal antibody specific for ethenoadenosine." Anal Biochem **314**(1): 108-15.
- Kuehnel, M. P., V. Rybin, et al. (2009). "Lipids regulate P2X7-receptor-dependent actin assembly by phagosomes via ADP translocation and ATP synthesis in the phagosome lumen." J Cell Sci **122**(Pt 4): 499-504.
- la Sala, A., D. Ferrari, et al. (2003). "Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides." J Leukoc Biol **73**(3): 339-43.
- Labasi, J. M., N. Petrushova, et al. (2002). "Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response." J Immunol **168**(12): 6436-45.
- Lahl, K., C. Loddenkemper, et al. (2007). "Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease." J Exp Med **204**(1): 57-63.
- Lammas, D. A., C. Stober, et al. (1997). "ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors." Immunity **7**(3): 433-44.
- Lee, W. L., R. E. Harrison, et al. (2003). "Phagocytosis by neutrophils." Microbes Infect **5**(14): 1299-306.
- MacKenzie, A., H. L. Wilson, et al. (2001). "Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding." Immunity **15**(5): 825-35.
- Margarit, S. M., W. Davidson, et al. (2006). "A steric antagonism of actin polymerization by a salmonella virulence protein." Structure **14**(8): 1219-29.
- Marwali, M. R., J. Rey-Ladino, et al. (2003). "Membrane cholesterol regulates LFA-1 function and lipid raft heterogeneity." Blood **102**(1): 215-22.
- Mehta, V. B., J. Hart, et al. (2001). "ATP-stimulated release of interleukin (IL)-1beta and IL-18 requires priming by lipopolysaccharide and is independent of caspase-1 cleavage." J Biol Chem **276**(6): 3820-6.

Literaturverzeichnis

- Mueller-Dieckmann, C., H. Ritter, et al. (2002). "Structure of the ecto-ADP-ribosyl transferase ART2.2 from rat." J Mol Biol **322**(4): 687-96.
- Mutini, C., S. Falzoni, et al. (1999). "Mouse dendritic cells express the P2X7 purinergic receptor: characterization and possible participation in antigen presentation." J Immunol **163**(4): 1958-65.
- Nemoto, E., Y. Yu, et al. (1996). "Cell surface ADP-ribosyltransferase regulates lymphocyte function-associated molecule-1 (LFA-1) function in T cells." J Immunol **157**(8): 3341-9.
- North, R. A. (1996). "P2X receptors: a third major class of ligand-gated ion channels." Ciba Found Symp **198**: 91-105; discussion 105-9.
- North, R. A. (2002). "Molecular physiology of P2X receptors." Physiol Rev **82**(4): 1013-67.
- North, R. A. and A. Surprenant (2000). "Pharmacology of cloned P2X receptors." Annu Rev Pharmacol Toxicol **40**: 563-80.
- O'Reilly, T. and D. F. Niven (2003). "Levels of nicotinamide adenine dinucleotide in extracellular body fluids of pigs may be growth-limiting for *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis*." Can J Vet Res **67**(3): 229-31.
- Ohlrogge, W., F. Haag, et al. (2002). "Generation and characterization of ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.1/ART2.2-deficient mice." Mol Cell Biol **22**(21): 7535-42.
- Okamoto, S., O. Azhipa, et al. (1998). "Expression of ADP-ribosyltransferase on normal T lymphocytes and effects of nicotinamide adenine dinucleotide on their function." J Immunol **160**(9): 4190-8.
- Okazaki, I. J. and J. Moss (1998). "Glycosylphosphatidylinositol-anchored and secretory isoforms of mono-ADP-ribosyltransferases." J Biol Chem **273**(37): 23617-20.
- Panther, E., S. Corinti, et al. (2003). "Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells." Blood **101**(10): 3985-90.
- Panther, E., M. Idzko, et al. (2001). "Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells." FASEB J **15**(11): 1963-70.
- Paone, G., L. A. Stevens, et al. (2006). "ADP-ribosyltransferase-specific modification of human neutrophil peptide-1." J Biol Chem **281**(25): 17054-60.
- Partida-Sanchez, S., S. Goodrich, et al. (2004). "Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity." Immunity **20**(3): 279-91.
- Parton, R. G. and K. Simons (2007). "The multiple faces of caveolae." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(3): 185-94.
- Parusel, I., S. Kahl, et al. (2005). "A panel of monoclonal antibodies recognizing GPI-anchored ADP-ribosyltransferase ART4, the carrier of the Dombrock blood group antigens." Cell Immunol **236**(1-2): 59-65.
- Pellegatti, P., S. Falzoni, et al. (2005). "A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion." Mol Biol Cell **16**(8): 3659-65.

Literaturverzeichnis

- Pfeiffer, Z. A., M. Aga, et al. (2004). "The nucleotide receptor P2X7 mediates actin reorganization and membrane blebbing in RAW 264.7 macrophages via p38 MAP kinase and Rho." J Leukoc Biol **75**(6): 1173-82.
- Powrie, F., M. W. Leach, et al. (1993). "Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice." Int Immunol **5**(11): 1461-71.
- Qiao, R., B. Zhou, et al. (2003). "Identification of three genes of known function expressed by alveolar epithelial type I cells." Am J Respir Cell Mol Biol **29**(1): 98-105.
- Qureshi, O. S., A. Paramasivam, et al. (2007). "Regulation of P2X4 receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis." J Cell Sci **120**(Pt 21): 3838-49.
- Ralevic, V. and G. Burnstock (1998). "Receptors for purines and pyrimidines." Pharmacol Rev **50**(3): 413-92.
- Ramadori, G. and B. Christ (1999). "Cytokines and the hepatic acute-phase response." Semin Liver Dis **19**(2): 141-55.
- Read, S., S. Mauze, et al. (1998). "CD38+ CD45RB(low) CD4+ T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro." Eur J Immunol **28**(11): 3435-47.
- Ritter, H., F. Koch-Nolte, et al. (2003). "Substrate binding and catalysis of ecto-ADP-ribosyltransferase 2.2 from rat." Biochemistry **42**(34): 10155-62.
- Roberts, J. A. and R. J. Evans (2004). "ATP binding at human P2X1 receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists." J Biol Chem **279**(10): 9043-55.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (2001). "Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance." Immunol Rev **182**: 18-32.
- Saxty, B. A., M. Yadollahi-Farsani, et al. (2001). "Inactivation of platelet-derived growth factor-BB following modification by ADP-ribosyltransferase." Br J Pharmacol **133**(8): 1219-26.
- Scheuplein, F., N. Schwarz, et al. (2009). "NAD+ and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells." J Immunol **182**(5): 2898-908.
- Schilling, W. P., T. Wasylyna, et al. (1999). "Maitotoxin and P2Z/P2X(7) purinergic receptor stimulation activate a common cytolytic pore." Am J Physiol **277**(4 Pt 1): C766-76.
- Schwiebert, E. M. and A. Zsembery (2003). "Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells." Biochim Biophys Acta **1615**(1-2): 7-32.
- Scrivens, M. and J. M. Dickenson (2005). "Functional expression of the P2Y14 receptor in murine T-lymphocytes." Br J Pharmacol **146**(3): 435-44.
- Seman, M., S. Adriouch, et al. (2003). "NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor." Immunity **19**(4): 571-82.

Literaturverzeichnis

- Sitkovsky, M. and D. Lukashev (2005). "Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors." Nat Rev Immunol **5**(9): 712-21.
- Smalley, D. M. and K. Ley (2005). "L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage." J Cell Mol Med **9**(2): 255-66.
- Smyth, L. M., J. Bobalova, et al. (2004). "Release of beta-nicotinamide adenine dinucleotide upon stimulation of postganglionic nerve terminals in blood vessels and urinary bladder." J Biol Chem **279**(47): 48893-903.
- Somers, G. R., F. M. Hammet, et al. (1998). "Expression of the P2Y6 purinergic receptor in human T cells infiltrating inflammatory bowel disease." Lab Invest **78**(11): 1375-83.
- Steinberg, T. H., A. S. Newman, et al. (1987). "ATP4- permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes." J Biol Chem **262**(18): 8884-8.
- Stout, C. E., J. L. Costantin, et al. (2002). "Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels." J Biol Chem **277**(12): 10482-8.
- Surprenant, A. and R. A. North (2009). "Signaling at purinergic P2X receptors." Annu Rev Physiol **71**: 333-59.
- Surprenant, A., F. Rassendren, et al. (1996). "The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7)." Science **272**(5262): 735-8.
- Suzuki, T., I. Hide, et al. (2004). "Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia." J Neurosci **24**(1): 1-7.
- Tang, D. C., M. DeVit, et al. (1992). "Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response." Nature **356**(6365): 152-4.
- Vacca, F., S. Amadio, et al. (2004). "P2X3 receptor localizes into lipid rafts in neuronal cells." J Neurosci Res **76**(5): 653-61.
- Vandekerckhove, J., B. Schering, et al. (1988). "Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates cytoplasmic beta/gamma-actin in arginine 177." J Biol Chem **263**(2): 696-700.
- Virginio, C., A. MacKenzie, et al. (1999). "Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor." J Physiol **519 Pt 2**: 335-46.
- White, N. and G. Burnstock (2006). "P2 receptors and cancer." Trends Pharmacol Sci **27**(4): 211-7.
- Wiley, J. S., L. P. Dao-Ung, et al. (2002). "A loss-of-function polymorphic mutation in the cytolytic P2X7 receptor gene and chronic lymphocytic leukaemia: a molecular study." Lancet **359**(9312): 1114-9.
- Wilkin, F., X. Duhant, et al. (2001). "The P2Y11 receptor mediates the ATP-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells." J Immunol **166**(12): 7172-7.
- Yadollahi-Farsani, M., P. Kefalas, et al. (1999). "Polymorphic forms of human ADP-ribosyltransferase-1 differences in their catalytic activities revealed by labeling of membrane-associated substrates." Eur J Biochem **262**(2): 342-8.
- Yamamoto, K., T. Sokabe, et al. (2006). "Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice." Nat Med **12**(1): 133-7.

Literaturverzeichnis

- Yates, S. P., R. Jorgensen, et al. (2006). "Stealth and mimicry by deadly bacterial toxins." Trends Biochem Sci **31**(2): 123-33.
- Young, T. L. and R. M. Santella (1988). "Development of techniques to monitor for exposure to vinyl chloride: monoclonal antibodies to ethenoadenosine and ethenocytidine." Carcinogenesis **9**(4): 589-92.
- Zhang, Y., T. Doherty, et al. "Resonance Assignment and Three-Dimensional Structure Determination of a Human alpha-Defensin, HNP-1, by Solid-State NMR." J Mol Biol.
- Zhao, Z., J. Gruszczynska-Biegala, et al. (2005). "ADP-ribosylation of integrin alpha7 modulates the binding of integrin alpha7beta1 to laminin." Biochem J **385**(Pt 1): 309-17.
- Zolkiewska, A. (2005). "Ecto-ADP-ribose transferases: cell-surface response to local tissue injury." Physiology (Bethesda) **20**: 374-81.
- Zolkiewska, A. and J. Moss (1993). "Integrin alpha 7 as substrate for a glycosylphosphatidylinositol-anchored ADP-ribosyltransferase on the surface of skeletal muscle cells." J Biol Chem **268**(34): 25273-6.

Danksagung

8 Danksagung

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

Frau Fenja Braasch, Frau Fabienne Seyfried und Frau Gudrun Dubberke danke ich für die hervorragende Einarbeitung in die angewandten Techniken und die praktische Unterstützung bei meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Haag, Frau Anette Brass, Herrn Dr. Sahil Adriouch und Frau Nicole Schwarz danke ich für ihre Ratschläge und freundliche Unterstützung, sowie für den permanenten kritischen Gedankenaustausch. Frau Caroline Jung danke ich darüber hinaus für die exzellente Zusammenarbeit bei unseren gemeinsamen Projekten.

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

Herrn Prof. James Wiley danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe im Nepean Hospital in Sydney, Australien.

Für ihre unermüdliche Unterstützung und die Ermunterung zur wissenschaftlichen Arbeit danke ich schließlich meiner Familie, meinen Eltern Renate Möller und Jürgen Möller, sowie meiner Schwester Heinke Möller.

9 Eidesstattliche Erklärung

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

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

Unterschrift: