

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Immunologie

Direktor Prof. Dr. Bernhard Fleischer

**Einsatz von Antikörpern aus Gene-Gun Immunisierungen zur
Charakterisierung von membranständigen Ekto-Nukleosid-
Triphosphat-Diphosphohydrolasen (ENTPDs) und Ekto-Nukleotid-
Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen (ENPPs)**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Caroline Jung
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. F. Haag

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. F. Koch-Nolte

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. B. Fleischer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Das Immunsystem	5
1.1.1	Das angeborene, unspezifische Immunsystem	5
1.1.2	Das erworbene, spezifische Immunsystem	6
1.1.3	Reifung der T-Zellen und ihre Rolle bei Autoimmunerkrankungen	7
1.2	Ektonukleotidasen	8
1.2.1	Die Familie der ENTPDs	10
1.2.2	ENTPD 1 und seine Rolle im Immunsystem	14
1.2.3	Die Familie der ENPPs	16
1.3	ADP-Ribosyltransferasen	24
1.4	NAD und ATP im Extrazellularraum	26
1.4.1	Immunmodulation durch extrazelluläres ATP	28
1.4.2	Immunmodulation durch extrazelluläres NAD	30
1.4.3	Die Regulation von purinergen Signalen durch nukleotidkatabolisierende Enzyme	31
1.5	Herstellung von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern mittels Gene-Gun-Immunisierung	32
1.5.1	Techniken der DNA-Immunisierung	32
1.5.2	Gegenüberstellung von DNA-Immunisierung und Proteinimmunisierung	33
2	Material und Methoden	36
2.1	Materialien	36
2.1.1	Laborgeräte:	36
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	37
2.1.3	Mausstamm	38
2.1.4	Zelllinien	38
2.1.5	Antikörper	39
2.1.6	Enzyme	40
2.1.7	Primer	41
2.1.8	Chemikalien und Lösungen	42
2.1.9	Medien	45
2.1.10	Puffer und Lösungen	46
2.1.11	Reagenzsysteme (<i>Kits</i>)	48
2.1.12	ENPP-, ENTPD- und ART2 Substrate	48
2.2	Methoden	49
2.2.1	Methoden der Zellbiologie	49
2.2.2	Methoden der Immunologie	51
2.2.3	Methoden der Proteinbiochemie	55
2.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	56
2.2.5	Methoden der Molekularbiologie	57

Inhaltsverzeichnis

2.2.6	Aktivitätsuntersuchungen	63
3	Ergebnisse	66
3.1	Klonierung von Expressionskonstrukten	67
3.1.1	Herstellung von Expressionsvektoren	67
3.1.2	Herstellung von HA.CD38 Transmembran-konstrukten	68
3.2	Untersuchung der Spezifität der Immunseren gegen ENTPDs und ENPPs an transfizierten CHO- und HEK-Zellen	71
3.2.1	Untersuchungen mittels indirekter Immunfluoreszenz an transient transfizierten CHO-Zellen	71
3.2.2	Untersuchungen mittels FACS-Analysen an transient transfizierten HEK-Zellen	81
3.2.3	Untersuchungen der ENTPD-spezifischen Immunseren mittels Western Blot Analysen an transient transfizierten HEK-Zellen	83
3.3	Endogene Expression von ENTPDs auf etablierten Zelllinien und primären Zellen	85
3.3.1	Analyse der ENTPD-Expression auf humanen Zelllinien	86
3.3.2	Analyse der ENTPD-Expression auf murinen Zelllinien	89
3.3.3	Analyse der ENTPD-Expression auf primären murinen Milzzellen mittels FACS-Analysen	91
3.4	Analyse der Enzymaktivitäten von ENPPs	98
3.4.1	Untersuchung der potenziellen NADase Aktivität von hENPP2 in transient transfizierten HEK.T-Zellen mittels Dünnschichtchromatographie	98
3.4.2	Analyse der De-ADP-Ribosylierungsaktivität von ENPPs	100
3.4.3	Charakterisierung der Phosphodiesteraseaktivitäten von ENPPs anhand klassischer ENPP Substrate im optischen Test	102
4	Diskussion	106
4.1	ADAPINCs als Werkzeuge zur Charakterisierung von Ektonukleotidasen	106
4.2	ENTPDs, ihre Expressionen und Funktionen	110
4.3	ENPPs und ihre Funktionen	117
4.4	Ausblick und Perspektiven	121
5	Zusammenfassung	124
6	Abkürzungsverzeichnis	125
7	Literaturverzeichnis	129
8	Danksagung	135
9	Eidesstattliche Erklärung	136

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Als Immunsystem bezeichnet man das Abwehrsystem von Lebewesen. Der menschliche Körper wird kontinuierlich von krankmachenden, pathogenen Keimen wie Bakterien und Viren und von Pilzen, Einzellern und Parasiten in seiner Existenz bedroht und mit körperfremden Proteinen oder Zellen konfrontiert. Die Fähigkeit, sich aus eigener Kraft dagegen zu wahren, wird als Immunität bezeichnet. Eine Haupteigenschaft des Immunsystems ist seine Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Nichtselbst“, wodurch ein Schutz der körpereigenen Zellen erzeugt wird. Man unterscheidet eine angeborene, unspezifische und eine erworbene, spezifische Immunität. Zwischen diesen zellulären und humoralen spezifischen und unspezifischen Mechanismen gibt es eine große Zahl von Wechselwirkungen, die z.B. durch Zytokine und den Immunglobulinen vermittelt werden. Als primäre lymphatische Organe werden Knochenmark, fetale Leber und Thymus bezeichnet, in denen die lymphatischen Stammzellen zu reifen Lymphozyten proliferieren und differenzieren und ihre Immunkompetenz erwerben. Zu den sekundären lymphatischen Organen gehören die Milz, Lymphknoten und die lymphatischen Gewebe der Schleimhäute. Diese sind Speicher für die reifen, immunkompetenten Zellen und zugleich Hauptort ihrer funktionellen Interaktionen (Janeway 2002).

1.1.1 Das angeborene, unspezifische Immunsystem

Die angeborene Immunität wird sowohl durch humorale als auch durch zelluläre Bestandteile vermittelt. Zur humoralen Immunität gehören das Komplementsystem, das Bakterienwände andauende Lysozym und die Entzündungsmediatoren wie die Interferone und das C-reaktive Protein. Das Komplement ist ein extrazelluläres, insbesondere im Blutplasma lokalisiertes, immunologisches Effektorsystem, das aus wenigstens 23 Plasmaproteinen und etwa 15 Oberflächenrezeptoren besteht. Bei Aktivierung durch Immunkomplexe oder direkt durch Mikroorganismen kommt es zur kaskadenartigen Kettenreaktion der primär inaktiv vorliegenden Faktoren C1 bis C9 und somit zu folgenden Reaktionen: 1. Zytolyse durch porenbildende Membranangriffskomplexe, 2. Aktivierung von Entzündungszellen (Mastzelldegranulation, Chemotaxis...), 3. Opsonierung, d.h. Steigerung der Phagozytierbarkeit verschiedener Partikel durch Beladung mit z.B. C3b und 4. Abtransport C3b-opsonierter

Einleitung

Immunkomplexe durch CR1-tragende Erythrozyten (Delves and Roitt 2000; Delves and Roitt 2000; Janeway 2002).

Die zur zellulären Immunität gehörenden Makrophagen (Aderem and Underhill 1999) und neutrophilen Granulozyten (Lee, Harrison et al. 2003) sind phagozytierende Zellen und zerstören durch freigesetzte Enzyme aus ihren Granula wie Proteasen, Lipasen, Esterasen, Myeloperoxidasen und Phosphatasen die körperfremden Strukturen. Makrophagen präsentieren den Lymphozyten die phagozytierten Antigene (APC Zellen, antigen-präsentierende Zellen) und schlagen damit die Brücke zur erworbenen, spezifischen Immunität.

1.1.2 Das erworbene, spezifische Immunsystem

Auch die spezifische Immunität besteht aus einer humoralen und zellulären Komponente. Sie fußt auf spezifischen Zellen, den B- und T-Lymphozyten und ist das Ergebnis eines Lernprozesses. 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 erworbene Immunität so besonders. B- und T-Zellen stammen aus dem Pool der pluripotenten Knochenmarksstammzellen, wobei sie im Thymus zu T- und im Knochenmark zu B-Lymphozyten heranreifen. B-Zellen verwenden für Erkennungs- und Effektorfunktionen membranständige oder sezernierte Immunglobuline. Diese Antikörper dienen der Markierung (Opsonierung) von Pathogenen für phagozytierende Zellen, deren Neutralisierung oder der Aktivierung des Komplementsystems. Differenzierte T-Zellen sind Träger der zellulären Immunität und weisen den T-Zellen-Rezeptor (TCR) auf, über den die Antigenerkennung erfolgt. Allerdings müssen die Antigene zuvor von Antigen-Präsentierenden-Zellen (APCs) aufgenommen, prozessiert und als Peptidfragmente mit Hilfe der MHC-Moleküle präsentiert werden. Von diesen Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen (MHC, „major histocompatibility complex“) gibt es zwei Klassen. MHC-I Moleküle werden von jeder kernhaltigen Zelle produziert und von den CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen erkannt. MHC-II Moleküle werden hingegen nur von sogenannten professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs) gebildet und von den CD4 positiven T-Helfer-Zellen erkannt. Reife dendritische Zellen (DC) sind die effizientesten Aktivatoren der T-Zellen, aber auch B-Zellen und Makrophagen gehören zu den professionellen APCs (Janeway 2002). Als immunologische Synapse wird die T-Zell-APC-Kontaktstelle bezeichnet. Durch die T-

Zell-Aktivierung kommt es zur Expression signalübertragender löslicher Zytokine und membrangebundener Proteine wie TNF- α , dem FAS-Liganden oder CD40-Liganden.

1.1.3 Reifung der T-Zellen und ihre Rolle bei Autoimmunerkrankungen

Kommt es zu einer überschießenden Antwort des Immunsystems auf ein eigentlich harmloses Pathogen, wird dies als allergische Reaktion bezeichnet. Auf einer Dysregulation der Immunzellen beruhen ebenfalls die Autoimmunerkrankungen. Hier ist das Immunsystem nicht in der Lage, zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu unterscheiden.

Bei vielen Autoimmunerkrankungen, auch bei solchen bei denen Immunglobuline vordergründig das pathogenetische Prinzip darstellen, scheint es so zu sein, dass eine Dysregulation der CD4⁺ T-Zellen vorliegt.

Während der T-Zell-Entwicklung im Thymus werden wichtige Grundlagen der Toleranz gelegt. Die T-Vorläuferzellen, die ursprünglich von den pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks abstammen, wandern über die Blutbahn in den Thymus, wo sie proliferieren und differenzieren. Im Laufe ihrer Reifungsphase kommt es unter anderem durch die vielfältigen Rekombinationen der für die einzelnen Ketten des T-Zell-Rezeptors kodierenden Genabschnitte, zu einer Veränderung ihres Expressionsmusters der Zelloberflächenproteine. Dabei entstehen überwiegend T-Zellen mit einem T-Zellrezeptor (TCR), der physiologisch unerwünscht ist. Deshalb finden zwei Verfahren zur Selektion der physiologisch günstigen T-Zellen statt. Zunächst reifen in der Thymusrinde durch eine positive Selektion nur T-Zellen heran, deren TCR mit MHC-II-Molekülen der Antigen-Präsentierenden Zellen (APCs) eine Bindung eingehen können. Anschließend erfolgt die negative Selektion durch den programmierten Zelltod bei denjenigen T-Zellen, die eine feste Bindung mit körpereigenem Antigen auf den APCs eingehen. Eine weitere Selektion erfolgt über die Präsentation von bestimmten organspezifischen Proteinen, deren ektopische Expression über das „AIRE“-Gen reguliert wird. Die den Thymus verlassenden reifen T-Zellen besitzen nun eine Toleranz gegenüber allen ihnen dort präsentierten Strukturproteinen des Körpers, sowie gegenüber bestimmten organspezifischen Antigenen. Kommt es zur Bindung einer zirkulierenden T-Zelle an eine APC, erfolgt durch die Antigenpräsentierung und Ko-Stimulation die Ausdifferenzierung der T-Zelle zur Effektorzelle. CD8⁺ Zellen werden zu zytotoxischen Zellen und CD4⁺ Zellen

Einleitung

werden in Abhängigkeit ihres Umgebungsmilieus zu Th1-Zellen, die Entzündungsmediatoren freisetzen oder zu Th2-Zellen, die B-Zellen stimulieren. Toleranz gegenüber organspezifischen Antigenen, die im Thymus nicht präsentiert wurden, erlangen die T-Zellen z.B. durch Bindung des Antigens in Abwesenheit einer professionellen APC. Werden körpereigene Antigene außerhalb des Thymus jedoch durch eine professionelle APC präsentiert, kann eine Reaktivierung der T-Zelle durch den ko-stimulierenden Effekt der APC erfolgen, und es kann zu einer Autoimmunreaktion mit Zerstörung körpereigener Strukturen kommen. Um dies zu verhindern, gibt es regulative T-Zell-Subpopulationen, die autoreaktive T-Zell-Klone kontrollieren und deren Proliferation hemmen. T-Zellen dieser CD4 und CD25 positiven T-Zellpopulation werden als regulatorische T-Zellen oder auch als Tregs bezeichnet (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 2001).

1.2 Ektonukleotidasen

In den letzten 20 Jahren konnten viele neue Erkenntnisse über die extrazellulären Nukleotide im Hinblick auf ihre Signalwirkung auf Zellen und physiologische Stoffwechselfvorgänge gewonnen werden. Immer mehr rückten die Ektonukleotidasen, Enzyme, die außerhalb der Zelle Nukleotide spalten und abbauen können, in den Fokus wissenschaftlicher Arbeiten. Es gibt vier bedeutende Familien von Ektonukleotidasen, die ENTPDasen (Ektonucleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen, CD39-Familie), die ENPPs (Ektonukleotid Pyro-phosphatasen/Phosphodiesterasen, CD203-Familie), die alkalischen Phosphatasen und Ekto-5'-nukleotidasen (CD73). Extrazelluläre Nukleotide sind an der Regulation vielfältiger Prozesse im Organismus, wie z.B. der Blutgerinnung, der Entzündungs- und Immunreaktion und der Übertragung neuronaler Signale beteiligt. Im Wesentlichen gibt jede Zelle im Organismus eines Säugetieres diese Mediatoren frei, die ihre Wirkung auf Zellen über sogenannte Purinorezeptoren ausüben, von denen bisher sieben ionotrope (P2X-Familie) und acht metabotrope G-Protein gekoppelte (P2Y-Familie) Rezeptorsubtypen, sowie vier Adenosin-sensitive P1 Rezeptoren bekannt sind. Die Einteilung der P1-Purinorezeptoren in vier Subtypen (A1, A2A, A2B und A3) beruht auf den verschiedenen Molekülstrukturen. Sie zeigen unterschiedliche Gewebeverteilungen und pharmakologische Profile. Sie alle sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die über Hemmung (A1, A3) oder Stimulation (A2A) der Adenylatzyklase wirken bzw. Phospholipase C aktivieren (A1, A2B, A3).

Einleitung

Die Bindung der Nukleotide an die P2 Purinorezeptoren führt entweder zu einem Kurzzeit- oder zu einem Langzeiteffekt (Boeynaems, Communi et al. 2005). Ein Kurzzeiteffekt, wie Hormonsekretion, Neurotransmission, Adhäsion oder Migration wird in der Regel durch P2X-Rezeptoren vermittelt, die durch ATP aktiviert werden. P2Y-Rezeptoren weisen eine breitere Substratspezifität auf. Sie können, je nach Rezeptor, durch ATP, ADP, UTP, UDP, ITP oder Nukleotidzucker aktiviert werden und vermitteln Langzeiteffekte, wie Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose (Burnstock 2002; Burnstock 2002; Sak, Boeynaems et al. 2003; Agresti, Meomartini et al. 2005). Wegen ihrer potenten Wirkung auf viele Zellen unterliegt die Konzentration extrazellulärer Nukleotide einer strengen Kontrolle. Nukleotide können einerseits aus Zellen durch Exozytose oder selektiven Membrantransport freigesetzt werden (Lazarowski, Boucher et al. 2003; Boeynaems, Communi et al. 2005) und andererseits extrazellulär von Nukleosid-Diphosphokinasen und Adenylatkinasen generiert werden (Yegutkin, Henttinen et al. 2001; Donaldson, Picher et al. 2002; Picher and Boucher 2003). **Abb. 1** gibt einen Überblick über die extrazellulär nukleotidmetabolisierenden Enzyme. Eine wichtige Rolle in diesem physiologischen System spielen die Ektonukleotidasen. Die unterschiedlichen Familien dieser Enzyme arbeiten häufig zusammen oder nacheinander, sodass z.B. durch den Abbau von ATP nicht nur dessen Signalwirkung gestoppt wird, sondern auch neue Metabolite entstehen, die wiederum eine eigene, andere Signalwirkung besitzen. So interagiert ADP mit einigen P2 Rezeptorsubtypen und ist ein wesentlicher Rekrutierungsfaktor für Thrombozyten (Kunapuli, Dorsam et al. 2003; Dorsam and Kunapuli 2004), während Adenosin über den P1 Rezeptor eine bedeutende Rolle in der Immunantwort spielt (**Abb. 9**) (Adair 2005; Hershfield 2005; Sitkovsky and Lukashev 2005). Der relative Beitrag der verschiedenen Ektonukleotidasen zur Regulierung der purinergen Signale ist abhängig von der unterschiedlichen Gewebe- und Zellverteilung, der Expression, aber auch von der Substratverfügbarkeit und der Substratvorliebe (Stefan, Jansen et al. 2006). Das katalytische Zentrum der Ektoenzyme liegt im Extrazellularraum. Die Aktivität ist somit an das Milieu außerhalb der Zelle angepasst und erfordert die Anwesenheit von divalenten Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} und einen alkalischen pH (Zimmermann 2000).

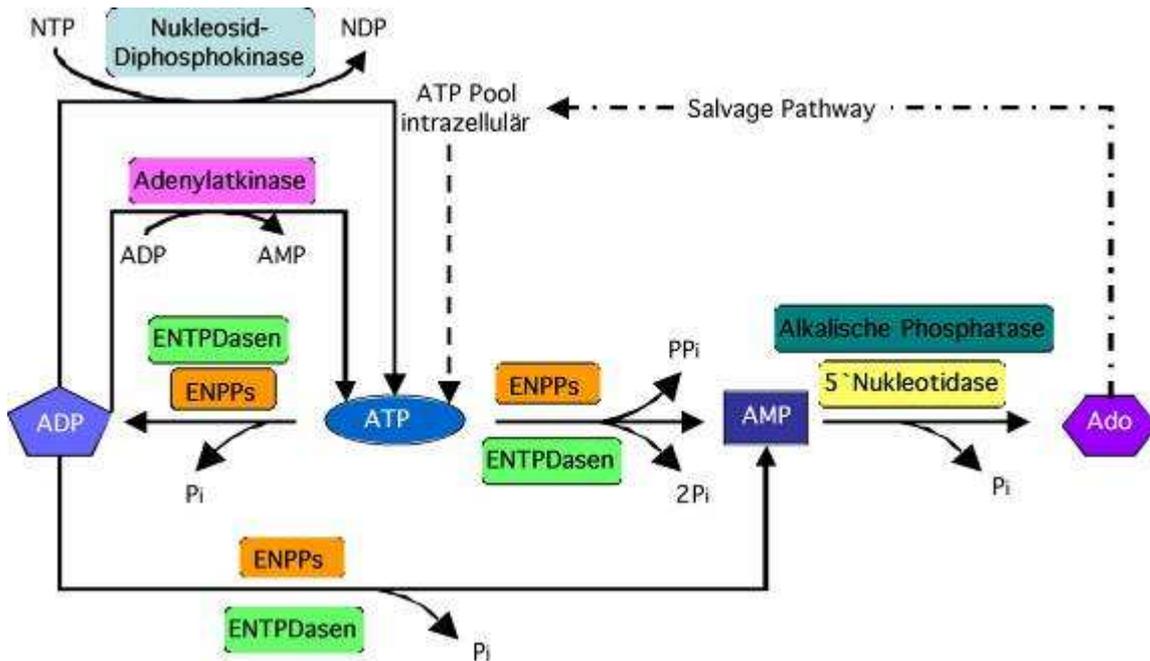


Abb. 1: Überblick über die extrazellulär nucleotidmetabolisierenden Enzyme.

Die Konzentration von Nucleotiden im extrazellulären Milieu wird bestimmt durch ihre Freilassung aus Zellen, ihre Synthese durch Nucleosid-Diphosphokinase und Adenylatkinase und durch ihre Hydrolyse durch Ektonucleotidasen. Die hier gezeigten Beispiele beziehen sich auf ATP, dem Prototypen der extrazellulären Nucleotide. Die ENTPDasen, auch bekannt als Apyrasen, agieren normalerweise als ATP Diphosphohydrolasen und hydrolysieren ATP zu ADP + Pi und ADP zu AMP + Pi, oder ATP direkt zu AMP + 2Pi. Die einzelnen Familienmitglieder haben unterschiedliche Substratpräferenzen. So metabolisiert ENTPD1 gleichermaßen ATP und ADP, wohingegen ENTPD2 ATP als Substrat vorzieht. ATP kann aus ADP durch Nucleosid-Diphosphokinase und Adenylatkinase wieder hergestellt werden. ENPPs, zumindest ENPP1-3 können als Nucleotid-Pyrophosphatasen ATP direkt zu ADP + Pi oder zu AMP + PPi metabolisieren. Die Hydrolyse von AMP zu Adenosin durch die Ekto-5'-Nucleotidase/CD73 vervollständigt die Dephosphorylierung von ATP. Adenosin kann von Zellen wie Lymphozyten aufgenommen werden und zur intrazellulären Nucleotidsynthese wieder verwendet werden („Nucleotid salvage“) (modifiziert nach Stefan et al. 2006).

1.2.1 Die Familie der ENTPDs

Die ENTPD-Familie umfasst bei den Säugetieren acht verschiedene Mitglieder und besitzt außerdem Mitglieder bei den Wirbellosen, den Pflanzen, der Hefe und den Protozoen (Handa and Guidotti 1996; Vasconcelos, Ferreira et al. 1996; Smith, Kirley et al. 1997; Zimmermann 1999; Zimmermann and Braun 1999). Das „Gründungsmitglied“ der Familie, ENTPD1 (CD39) war ursprünglich als Aktivitätsmarker für epidermale dendritische Zellen (DCs), sogenannte Langerhanszellen entdeckt worden und wird in hohem Maße auf Endothelzellen und dendritischen Zellen exprimiert. Seine Aktivität

Einleitung

reguliert zahlreiche physiologische Vorgänge, wie die Hormonsekretion, Herzfunktion, Immunantwort, Neurotransmission und Plättchenaggregation, indem es die Anzahl der zirkulierenden Nukleotide im Blut moduliert. Die Enzyme der CD39-Familie unterscheiden sich in Hinblick auf ihre Transmembrandomänen und auf ihre Lokalisation. In Abb. 2 sind die in dieser Arbeit näher untersuchten ENTPDs gezeigt. Von den ENTPDs sind vier, ENTPD1, 2, 3 und 8, typische auf der Zelloberfläche lokalisierte Enzyme mit einer extrazellulären katalytischen Domäne. ENTPD 4 und 7 sind vollkommen intrazellulär lokalisiert, zeigen ins Lumen der zytoplasmatischen Organellen und sitzen auf dem Golgi Apparat (UDPase; (Wang and Guidotti 1998) bzw. auf den lysosomalen und autophagischen Vakuolen (LALP 70; (Biederbick, Rose et al. 1999).

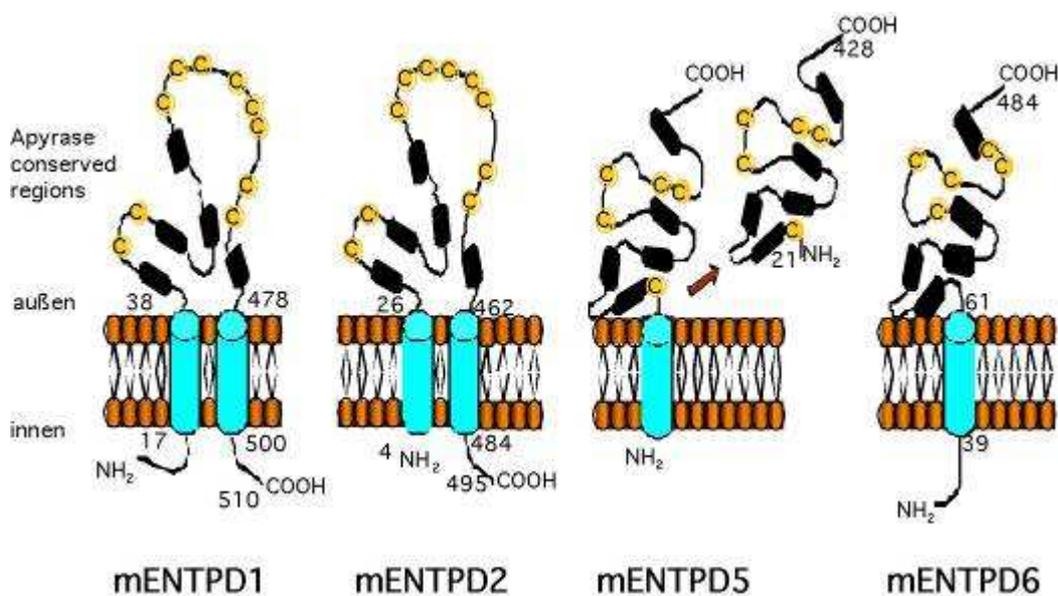


Abb. 2: Struktur der Ektonukleotid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen.

Die ENTPD-Familie umfasst beim Menschen und anderen Säugetieren acht Mitglieder und kommt außer beim Menschen auch bei Wirbellosen, Pflanzen, Hefen und Protozoen vor (Handa and Guidotti 1996; Vasconcelos, Ferreira et al. 1996; Smith, Kirley et al. 1997; Zimmermann 1999; Zimmermann and Braun 1999). Die ENTPDs, die als Proteine zwischen 428 und 616 Aminosäuren lang sind, können hinsichtlich ihrer Membrantopographie in zwei Gruppen aufgeteilt werden. ENTPD1-4 sind über zwei Transmembrandomänen am N- und C-Terminus in der Zellmembran verankert und ENTPD 5 und 6 werden im Gegensatz dazu als sezernierte Enzyme nachgewiesen. Gemeinsam ist den extrazellulären Domänen eine Ligandenbindungsstelle und fünf „ACR“ („apyrase conserved regions“), die für die katalytische Aktivität verantwortlich scheinen (modifiziert nach Zimmerman et al. 2000).

Einleitung

ENTPD1, 2, 3, 4, 7 und 8 besitzen zwei Transmembrandomänen, eine am C- und eine weitere am N-Terminus. ENTPD 5 und 6 fehlt die zweite Transmembrandomäne, und werden nach heterologer Expression sezerniert. Die bei den anderen Mitgliedern hydrophobe N-terminale Transmembrandomäne dient bei ENTPD5 als Signalpeptid, das zur Sekretion von ENTPD5 führt. ENTPD6 ist ein Typ II Transmembranprotein mit nur einer N-terminalen Transmembrandomäne (Zimmermann 2000) (Abb. 2 und Abb. 3). Die extrazelluläre Domäne von ENTPD1, 2, 3 und 8 enthält die Liganden-Bindungsstelle und 10 konservierte Cysteinreste, die 5 Disulfidbindungen bilden (Ivanenkov, Murphy-Piedmonte et al. 2003). Die Kennzeichen aller ENTPDs sind die fünf hoch konservierten Sequenzdomänen, die „Apyrase Conserved Regions“ , abgekürzt und bekannt als ACR1 bis ACR5 (Handa and Guidotti 1996; Vasconcelos, Ferreira et al. 1996; Schulte am Esch, Seigny et al. 1999). Sie sind von großer Relevanz für die katalytische Aktivität, was durch mehrere Deletions- und Mutationsexperimente gezeigt werden konnte (Schulte am Esch, Seigny et al. 1999; Hicks-Berger, Yang et al. 2001; Yang, Hicks-Berger et al. 2001; Zimmermann 2001; Murphy and Kirley 2003; Kirley, Crawford et al. 2006). Die ACRs wurden zuerst beschrieben in der Sequenz der Apyrase, einer löslichen ATP-Diphosphohydrolase, die aus der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) isoliert wurde. Apyrase hydrolysiert ATP und ADP als Substrat und stellt das Kartoffel-Ortholog des humanen CD39 dar (Bock 1980; Handa and Guidotti 1996). Außerdem teilen die ENTPDs zwei gemeinsame Sequenzmotive mit den Mitgliedern der „actin/HSP70/sugar kinase superfamily“, das actin-HSP 70-hexokinase β - und γ -phosphat bindende Motiv [(I/L/V)X(I/L/V/C)DXG(T/S/G)(T/S/ G)XX(R/K/C)] (Flaherty, McKay et al. 1991; Handa and Guidotti 1996; Kegel, Braun et al. 1997; Smith and Kirley 1999). Diese Motive konnten in der ACR1 und ACR4 identifiziert werden. Desweiteren gibt es auffallende Ähnlichkeiten in der Sekundär- und Tertiärstruktur mit diesen Mitgliedern der „actin/HSP70/sugar kinase superfamily“ (Ivanenkov, Murphy-Piedmonte et al. 2003; Vorhoff, Zimmermann et al. 2005; Kirley, Crawford et al. 2006). ENTPDs ordnen sich als Homo-Oligomere an. ENTPD1 bis ENTPD3 liegen als Dimere, Trimere oder Tetramere vor. Oligomere Formen führen zu einer gesteigerten katalytischen Aktivität und der Zustand der Oligomerisation kann die katalytischen Eigenschaften beeinflussen (Stout and Kirley 1996; Lewis Carl, Smith et al. 1998; Wang, Ou et al. 1998; Schulte am Esch, Seigny et al. 1999; Smith and Kirley 1999; Grinthal and Guidotti 2000; Failer, Aschrafi et al. 2003; Grinthal and Guidotti 2006).

Einleitung

Die individuellen Subtypen der ENTPDs unterscheiden sich nicht nur in ihrer zellulären Lokalisation, sondern auch in ihren funktionellen Eigenschaften. Die vier an der Zelloberfläche lokalisierten Mitglieder (ENTPD1, 2, 3, 8) können entsprechend ihrer Substratpräferenz, ihres Gebrauchs an divalenten Kationen und ihres Abbauproduktes differenziert werden. Alle vier benötigen Ca^{2+} oder Mg^{2+} Ionen im millimolaren Bereich für maximale Aktivität und sind bei ihrer Abwesenheit inaktiv (Zimmermann 2001; Kukulski, Levesque et al. 2005). Alle vier an der Zelloberfläche lokalisierten ENTPDs hydrolysieren Nucleosid Triphosphate einschließlich der physiologisch aktiven ATP und UTP. Anzumerken ist, dass die Hydrolyserate von Nucleosid Diphosphaten beträchtlich zwischen den Subtypen variiert (**Abb. 3**). Während ENTPD1 ATP und ADP mit gleicher Präferenz hydrolysiert ($\text{ATP:ADP} = 1:0,5$ bis $1:0,9$), bevorzugen ENTPD3 und ENTPD8 ATP gegenüber ADP als Substrat. Nach Mutation von nur zwei Aminosäureresten (D218E/W459A) von ENTPD3 steigt die Präferenz zum Abbau von Nucleosid 5`-triphosphaten (Smith, Lewis Carl et al. 1999). ENTPD2 sticht mit seiner hohen Vorliebe für Nucleosid Triphosphat hervor und wurde deshalb früher als ecto-ATPase klassifiziert ($\text{ATP:ADP} = 1:0,03$ oder weniger) (Kegel, Braun et al. 1997; Kirley 1997; Mateo, Harden et al. 1999). Im Gegensatz zu ENTPD1 und ENTPD2 werden murine ENTPD3 und 8 bevorzugt durch Ca^{2+} gegenüber Mg^{2+} aktiviert (Bigonnesse, Levesque et al. 2004; Lavoie, Kukulski et al. 2004; Vorhoff, Zimmermann et al. 2005). ENTPD4, das „Golgi-Enzym“ weist eine hohe Substratspezifität für UDP auf, kann aber auch andere Nucleosid-5`-di- und triphosphate hydrolysieren, jedoch kein ATP und ADP. Seine Funktion liegt möglicherweise darin, Nucleotidzucker in die Golgi Zisternen zu importieren. Vermutlich ergeben sich die verschiedenen katalytischen Eigenschaften der Subtypen sowohl aus den Unterschieden in ihrer Sequenz als auch in ihrer Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur (Heine, Braun et al. 2001; Grinthal and Guidotti 2004).

Einleitung

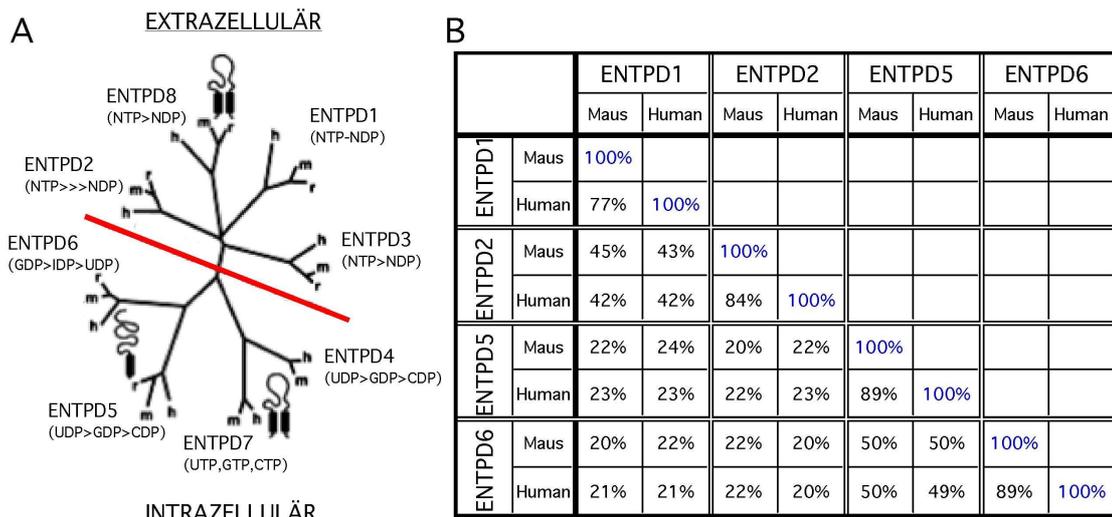


Abb. 3: Stammbaum der ENTPD-Familie und prozentuale Sequenzidentitäten von ENTPD1, 2, 5, 6 aus Maus und Mensch.

A: Hypothetischer Stammbaum von 22 ausgesuchten Mitgliedern der ENTPD Familie (ENTPD1 bis 8) aus Ratte (r), Mensch (h) und Maus (m) in Anlehnung an die Aminosäuresequenz. Die Länge der Linien deuten die Unterschiede in der Aminosäuresequenz an. Die Graphik stellt eine klare Trennung zwischen den zelloberflächlichen (oben) und den intrazellulären (unten) ENTPDasen dar. Zusätzlich werden die bedeutendsten Substratpräferenzen und die unterschiedlichen Membrantopographien gezeigt (modifiziert nach Zimmermann et al. 2006). **B:** Diese Tabelle zeigt die prozentuale Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen des extrazellulären Anteils der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Unterklassen der ENTPD Familie. 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% bzw. 20-30% besitzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden speziell ENTPD1, ENTPD2, ENTPD5 und ENTPD6 näher untersucht, bzw. Antikörper charakterisiert, die gegen diese Ektonukleotidasen gerichtet sind. Kreuzreaktionen der Immunsereen sind bei starker Ähnlichkeit der Enzyme wesentlich wahrscheinlicher. **Abb. 3** zeigt die Ergebnisse der Sequenzidentitätsanalysen der Aminosäuren dieser vier ENTPDs. 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 30-50% besitzen.

1.2.2 ENTPD 1 und seine Rolle im Immunsystem

ENTPD1 ist wie schon beschrieben ein integrales Membranprotein mit zwei Transmembran- domänen und einem katalytischen Zentrum außerhalb der Zelle.

Einleitung

Außerdem besitzt das Enzym sechs mögliche Glykosylierungsstellen und 11 Cysteinreste, die wahrscheinlich bei der Bildung von Oligomeren eine Rolle spielen (Maliszewski, Delespesse et al. 1994; Kaczmarek, Koziak et al. 1996; Carl 1998). Zusätzlich gibt es intrazelluläre Proteinkinase C - Phosphorylierungsstellen und verschiedene Stellen, die durch Ektoproteinkinasen modifiziert werden (Kegel, Braun et al. 1997). Ursprünglich als Aktivitätsmarker von B-Lymphozyten eingesetzt, konnte nachgewiesen werden, dass ENTPD1 auf aktivierten T-Zellen (Kansas, Wood et al. 1991; Stockl, Majdic et al. 2001) und dendritischen Zellen (Mizumoto, Kumamoto et al. 2002) exprimiert wird. Seine enzymatische Funktion auf dendritischen Zellen beeinflusst die Rekrutierung, Aktivierung und Polarisierung von naiven T-Zellen.

Es ist bekannt, dass z.B. eine topisch aufgetragene reizende Chemikalie über die Freisetzung von ATP und ADP aus zerstörten Keratinozyten zu einer Entzündungsreaktion der Haut führt. ENTPD1 auf Langerhanszellen (LCs) unterdrückt diese Hyperreaktivität der LCs (Mizumoto, Kumamoto et al. 2002). Desweiteren zeigten ENTPD1 defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine geringere Ausprägung von Kontakt-Überempfindlichkeit und eine reduzierte T-Zellen abhängige Immunantwort auf Antigene, die auf der Haut aufgetragen wurden. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass ENTPD1 eine wichtige Rolle in der Aktivierung von T-Zellen durch LCs und vielleicht auch anderen DCs spielt und für eine optimale Stimulation von haptenspezifischen T-Zellen nötig ist. Weitere Untersuchungen ergaben, dass ENTPD1 zur Interaktion zwischen DCs und T-Zellen während der Antigenpräsentation über die Regulation der Nukleotidkonzentration beiträgt und als zusätzliche Erkennungsstruktur für HLA-A1 restringierte, haptenspezifische zytotoxische T-Zellen fungiert (Kansas, Wood et al. 1991; Stockl, Majdic et al. 2001; Mizumoto, Kumamoto et al. 2002). Die Tatsache, dass aktivierte T-Zellen die Bildung von ATP verursachen und ENTPD1^{+/+} DCs nach Behandlung mit ATP IL-6 sezernieren, spricht dafür, dass ATP Einfluss auf die Aktivierung von DCs hat. Dieses ATP könnte über die Aktivierung von P2-Rezeptoren zum Zelltod der DCs führen. Durch den Abbau von ATP schützt ENTPD1 diese vor dem Zelltod und wirkt somit bei der antigenpräsentierenden Funktion der DCs mit. Neueste Studien weisen darauf hin, dass regulatorische CD4⁺ und CD25⁺ T-Zellen (Tregs) eine entscheidende Rolle in der Bewahrung der immunologischen Reaktivität und Toleranz spielen (Holm, Nielsen et al. 2004). In kürzlich erschienenen Arbeiten wurde eine bevorzugte Expression von ENTPD1 auf Tregs berichtet, und damit die Frage aufgeworfen, ob dieses Ektoenzym für die Funktion der Tregs von Bedeutung ist.

Einleitung

Eine weitere Fähigkeit von ENTPD1 ist es, das für Blutplättchen aggregatorisch wirkende ADP in das nicht-aggregatorisch wirkende Adenosin umzuwandeln und somit die Ausdehnung der intravaskulären Plättchenaggregation zu limitieren (Kaczmarek, Koziak et al. 1996; Marcus, Broekman et al. 1997; Imai, Kaczmarek et al. 1999). Das rekombinant lösliche und katalytisch aktive ENTPD1 blockiert die ADP induzierte Plättchenaggregation in vitro und stellt somit ein mögliches neues Therapeutikum in der Behandlung von Thrombosen dar (Gayle, Maliszewski et al. 1998). Die Generierung von ENTPD1 defizienten Mäusen bestätigt die bedeutende Rolle dieses Ektoenzym in der Kontrolle von Hämostase und Thromboregulation (Enjyoji, Sevigny et al. 1999; Zimmermann 1999).

Desweiteren ist die Hydrolyse von ATP bei einer Ischämie von großer Bedeutung, denn auch hier wirkt das ATP zytotoxisch und ein Entgegenwirken durch Ectonukleotidasen ist wichtig. So führt eine transiente globale zerebrale Ischämie zu einer vermehrten Hydrolyse von ATP zu Adenosin (Braun, Zhu et al. 1998; Schetinger 1998). An den Tagen nach einer transienten zerebralen Ischämie im Rattenhirn konnte durch Northern Blotting eine vermehrte Expression von ENTPD1 (CD39) und auch von Ekto-5'-nukleotidase festgestellt werden.

1.2.3 Die Familie der ENPPs

Die Familie der ENPPs besteht aus sieben Mitgliedern und steht in keiner phylogenetischen Beziehung zu der Familie der ENTPDs. Ekto-Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phospho-diesterasen (ENPPs) sind ubiquitär vorkommende membranassoziierte oder sezernierte Ektoenzyme, die eine Funktion in der Regulation des extrazellulären Nukleotidmetabolismus haben und eine breite Substratspezifität aufweisen. Pyrophosphat- und Phosphodiester-Bindungen können in einer Vielzahl von unterschiedlichen Substraten gespalten werden. ENPPs sind somit in der Lage 3',5'-cAMP zu AMP, ATP zu AMP und PPi, ADP zu AMP und PPi oder NAD⁺ zu AMP und Nikotinamid zu hydrolysieren, wobei Purin- und Pyrimidin-Nukleotide als Substrate dienen (Goding, Terkeltaub et al. 1998). Trotzdem besitzt jeder Subtyp eine wohldefinierte Substratspezifität (**Abb. 4**).

A

		ENPP1		ENPP2		ENPP3	
		Human	Maus	Human	Maus	Human	Ratte
ENPP1	Human	100%					
	Maus	80%	100%				
ENPP2	Human	45%	43%	100%			
	Maus	45%	44%	95%	100%		
ENPP3	Human	54%	52%	45%	45%	100%	
	Ratte	51%	49%	45%	46%	82%	100%

B

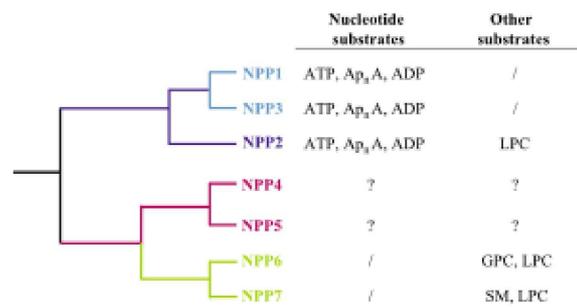


Abb. 4: Stammbaum der ENPP-Familie und prozentuale Sequenzidentitäten von ENPP1, 2, 3 aus Mensch, Maus und Ratte.

A: Diese Tabelle zeigt die prozentuale Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen des extrazellulären Anteils von ENPP1-3. Dabei zeigen die jeweiligen 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.

B: Stammbaum der ENPP Familie und einige Substrate. Proteinsequenzen für die humanen Isoformen wurden von der Genbank erworben und mit CLUSTAL W abgeglichen. Gezeigt sind auch die repräsentativen Nukleotid- und/oder Lipidsubstrate für die ENPP Isoenzyme. ENPP1-3 haben einen gemeinsamen Vorfahren und sind die einzigen bekannten ENPPs, die Nukleotide hydrolysieren können. (LPC Lysophosphatidylcholine, GPC Glycerophosphorylcholine, SM Sphingomyelin) (modifiziert nach Stefan 2006).

Nur ENPP 1 bis 3, die einen gemeinsamen Vorfahren haben, werden mit der Hydrolyse von Nukleotiden in Zusammenhang gebracht (Bollen, Gijsbers et al. 2000; Zimmermann 2000; Vollmayer, Clair et al. 2003), während von ENPP6 und 7 nur die Hydrolyse von Phosphodiester-Bindungen in Lysophospholipiden oder anderen Cholin-Phosphodiestern bekannt ist (Duan, Bergman et al. 2003; Sakagami, Aoki et al. 2005; Wu, Cheng et al. 2005). Bemerkenswerterweise agiert ENPP2 sowohl mit Nukleotiden als auch mit Lysophospholipiden (Tokumura, Majima et al. 2002; Umezu-Goto, Kishi et al. 2002). Interessant ist auch, dass ENPP2 und ENPP6 unterschiedliche Phosphodiesterbindungen in Lysophosphatidylcholin spalten und dementsprechend entweder Cholin oder Phosphocholine bilden. Die Determinanten für die Substratspezifität der ENPPs sind nur schlecht verstanden.

Cimpean et al. konnten durch zielgerichtete Mutagenese und durch das Austauschen von Domänen zeigen, dass sowohl nicht-katalytische Domänen als auch Reste in der Nähe des katalytischen Zentrums die Aktivität und Substratspezifität von ENPP1 und ENPP2 beeinflussen (Cimpean, Stefan et al. 2004). Von ENPP7 weiß man, dass es als

Einleitung

alkalische Sphingomyelinase fungiert. Deswegen vermutet man, dass möglicherweise auch noch andere Mitglieder der ENPP Familie auf Phospholipide einwirken. ENPP6 ist eine cholinspezifische Glycerophosphodiesterase und man geht davon aus, dass es durch die Hydrolyse von mehrfach ungesättigtem LPC, von Glycerophosphorylcholin oder Sphingosylphosphoryl-cholin eine spezielle Rolle in den Organen der Niere und des Gehirn spielt.

Die katalytische Aktivität der ENPPs ist abhängig von divalenten Kationen (Rebbe, Tong et al. 1991; Belli, Sali et al. 1994; Deissler, Lottspeich et al. 1995; Grobber, Anciaux et al. 1999; Hosoda, Hoshino et al. 1999). Die Km-Werte der ENPPs sind ähnlich denen der ENTPD Familie und liegen für ATP zwischen 20 μM und 50 μM . Das pH Optimum liegt *in vitro* im alkalischen Bereich (Grobber, Anciaux et al. 1999; Hosoda, Hoshino et al. 1999).

Alle ENPPs sind bis auf ENPP2 über eine einzige Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert und können, wie auch die ENTPDs, hinsichtlich ihrer strukturellen Charakteristika in zwei Gruppen, ENPP1-3 und ENPP4-7 unterteilt werden. ENPP1 und 3 sind Typ 2 Membranproteine aus ungefähr 900 Aminosäuren mit einem molekularen Gewicht von ungefähr 110-125kDa (van Driel, Wilks et al. 1985; van Driel and Goding 1987). Sie besitzen eine kurze amino-terminale intrazelluläre Domäne, eine einzelne Transmembrandomäne, zwei Somatomedin-B ähnliche Motive, ein konserviertes katalytisches Zentrum, eine Nuklease ähnliche Sequenz und ein mutmaßliches „EF-Hand“ Motiv am Carboxylende (**Abb. 5**). ENPP2 ist ein Prä-Pro-Enzym und kommt nur als sezerniertes Protein vor (Jansen, Stefan et al. 2005). Im Gegensatz dazu sind ENPP4 bis 7 Typ I Transmembranproteine aus etwa 450 Aminosäuren. Sie bestehen aus einer kurzen intrazellulären carboxylterminalen Domäne und einem extrazellulären katalytischen Zentrum, das lediglich ein Phosphodiesterase-Motiv beinhaltet (Bollen, Gijsbers et al. 2000; Duan, Bergman et al. 2003; Sakagami, Aoki et al. 2005; Wu, Cheng et al. 2005). Lösliche Formen wurden auch von ENPP1, ENPP3 und ENPP6 entdeckt. Es ist aber noch unklar, wie diese entstehen (Belli, van Driel et al. 1993; Meerson, Delautier et al. 1998; Hosoda, Hoshino et al. 1999; Yegutkin, Samburski et al. 2003; Sakagami, Aoki et al. 2005). Darüberhinaus kann ENPP7 durch Trypsin von der Plasmamembran abgespalten und sezerniert werden.

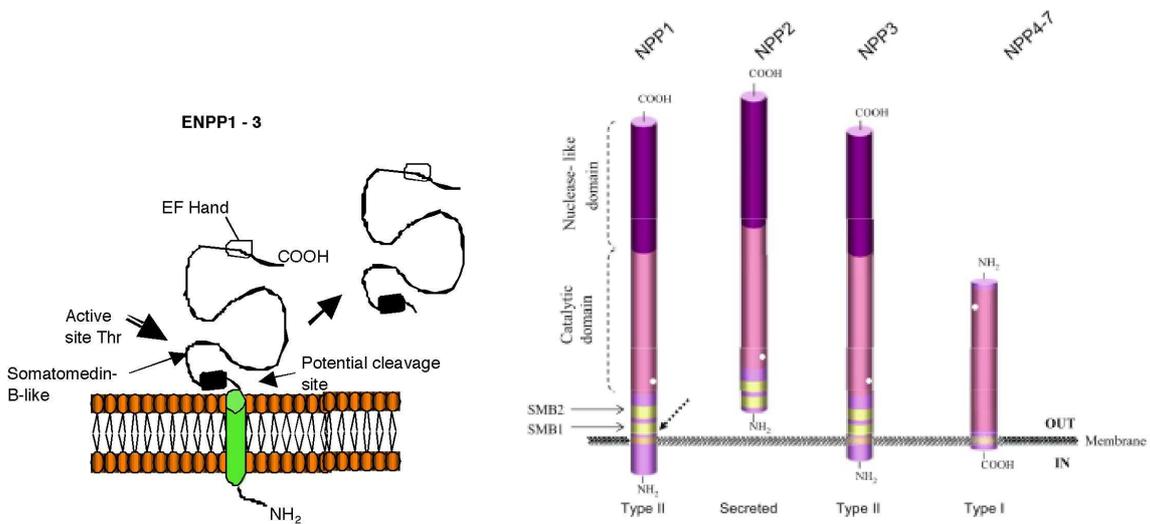


Abb. 5: Enzymstruktur und subzelluläre Lokalisation der ENPPs.

Bis auf ENPP2, das in den Extrazellulärraum sezerniert wird, sind alle ENPPs Single-Transmembranproteine mit einer Typ II (ENPP1 und ENPP3) oder einer Typ I Orientierung (ENPP4-7). Der Hauptteil des Proteins liegt dabei jeweils außerhalb der Zelle, mit nur einem kurzem intrazellulärem Fragment. Lösliches ENPP1 kann durch Abspaltung der Membran-assoziierten Form entstehen (Pfeil). Die intrazelluläre Domäne von ENPP1 und ENPP3 besitzt eine Determinante, die eine basolaterale oder apikale Lokalisierung in der Membran bestimmt. Allen ENPPs gemeinsam ist die katalytische Domäne. Threonin/Serin vermitteln die Formation dieser Domäne (weißer Punkt). Die Nuklease-ähnliche Domäne und die zwei Somatomedin B ähnlichen Domänen (SMB1 und SMB2) sind nur in ENPP1-3 vorhanden.

1.2.3.1 Die unterschiedlichen Domänen der ENPPs und ihre Funktionen

Wie schon beschrieben sind die ENPPs aus mehreren Bausteinen, bzw. Domänen aufgebaut (**Abb. 5**). Neben ihrer katalytischen besitzen sie außerdem regulatorische Domänen sowie Domänen zur Verankerung oder zum subzellulären Targeting. Die katalytische Domäne aller ENPPs besteht aus etwa 400 Aminosäureresten und zeigt bei den humanen Isoformen eine Sequenzidentität von bis zu 60%. Sie ähnelt der katalytischen Domäne der alkalischen Phosphatase und der Phosphopentomutase, die zur Familie der Phospho-/Sulfo-kordinierenden Metallenzyme gehören (Galperin, Bairoch et al. 1998; Gijsbers, Ceulemans et al. 2001). So sind die Aminosäurereste, die im katalytischen Zentrum der alkalischen Phosphatase zwei Metalle und ihre räumliche Anordnung koordinieren, in den ENPPs konserviert. Hinzu kommt, dass der Reaktionsmechanismus wie bei den anderen Phospho-/Sulfo-kordinierenden Metalloenzymen in zwei Schritten abläuft (Bollen, Gijsbers et al. 2000). Zum Beispiel wird ATP entweder zu AMP + Ppi oder zu ADP + Pi, über ein AMP- oder Phosphat

Einleitung

gebundenes Zwischenprodukt abgebaut, abhängig davon, wie das Substrat das katalytische Zentrum erreicht (Bollen, Gijbers et al. 2000).

Für die subzelluläre Lokalisation der humanen ENPPs sind die N-terminalen 21-76 Aminosäuren die entscheidende Determinante. Bei ENPP1 und ENPP3 sichert diese Region die Verankerung mit Typ II-Orientierung in der Zellmembran, wobei ENPP1 durch ein intrazelluläres Di-Leucin-Motiv auf der basolateralen Membran sitzt (Vaingankar, Fitzpatrick et al. 2004). Die ersten 25 Aminosäurereste von ENPP2 werden als Signalpeptid ko-translational von der Signalpeptidase im endoplasmatischem Retikulum entfernt. Um das ausgereifte und aktive ENPP2 zu erlangen wird das lösliche Pro-ENPP2 zusätzlich von einer Furin-ähnlichen Protease gespalten (Jansen, Stefan et al. 2005). Der N-Terminus von ENPP6 und 7, bestehend aus etwa 20 Aminosäuren, wird als Signalpeptid ebenfalls ko-translational gespalten.

Zwei cysteinreiche Somatomedin-B ähnliche Domänen liegen zwischen der Transmembran- und der katalytischen Domäne von ENPP1, 2 und 3. Ihnen wird die Funktion als stabiler/ dauerhafter Stiel zugeschrieben, der das katalytische Zentrum von der Membran entfernt hält (Zimmermann 2000). In der kristallinen Struktur der Somatomedin-B ähnlichen Domäne konnte die Bildung eines Disulphidknoten gezeigt werden, in dem alle acht Cysteinreste eine Disulphidbindung eingehen (Zhou, Huntington et al. 2003). Als Calcium-bindende Region stellt sich die Sequenz der EF-Hand dar. Sie ist notwendig für die enzymatische Aktivität. ENPP1 besitzt diese in vollständiger Form, ENPP2 und 3 in etwas veränderter Form. Ein weiteres Sequenzmotiv, das nur bei ENPP2 und ENPP3 vorkommt, ist ein RGD-Tripeptid. Dieses Motiv kann von verschiedenen Integrinen erkannt werden, scheint eine funktionelle Calcium Abhängigkeit zu implizieren und interagiert möglicherweise mit Zelloberflächenrezeptoren (Zimmermann 2000).

Die Nuklease-ähnliche Domäne, die aus etwa 250 Aminosäuren besteht und C-terminal der katalytischen Domäne liegt, zeigt Ähnlichkeiten mit der unspezifischen DNA/RNA-Endoribonuklease (Gijbers, Ceulemans et al. 2003). Die ENPPs besitzen allerdings keine Nuklease-Aktivität, weil die Aminosäuren, die für diese Katalyse notwendig wären, in ENPP1, 2 und 3 nicht konserviert sind. Trotzdem scheinen diese Domänen die enzymatische Aktivität von ENPP1 und ENPP2 zu beeinflussen, denn ein Austausch dieser Domänen führt zu einem inaktivem ENPP2, während ENPP1 mit der Nuklease-ähnlichen Domäne von ENPP2 normal aktiv ist (Cimpean, Stefan et al. 2004). Außerdem scheint diese Domäne notwendig für die Translokation der ENPPs vom

Einleitung

endoplasmatischen Reticulum in den Golgi-Apparat zu sein, weil es möglicherweise für die korrekte Faltung der ENPPs benötigt wird (Gijsbers, Ceulemans et al. 2003). Neueste Belege sprechen dafür, dass die Nuklease-ähnliche Domäne von ENPP2 eine anti-Adhäsions-Funktion besitzt und als Ligand für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren dient (Fox, Alexander et al. 2004).

ENPP1 und 2 werden im Rahmen dieser Arbeit genauer im nächsten Abschnitt besprochen.

1.2.3.2 ENPP1 (PC-1)

ENPP1 ist eines der besser charakterisierten Enzyme aus der Familie der ENPPs. ENPP1 besitzt eine Vielzahl von unterschiedlichen physiologischen Rollen und greift so in viele Prozesse und Regulationen des Organismus ein. So wird ENPP1 z.B. auf B-Lymphozyten exprimiert und dient hier als Marker der Antikörperproduzierenden B-Zellen im späten Stadium der Differenzierung. Für die Synthese und Sekretion von Antikörpern ist ENPP1 allerdings nicht notwendig. Auch auf T-Zellen konnten niedrige Konzentrationen von ENPP1 nachgewiesen werden. Diese Expression auf T-Zellen wird, genau wie die Expression von NAD⁺ Glykohydrolase (CD38), durch Aktivierung der Signalkaskaden der Proteinkinasen A und C gesteigert (Deterre, Gelman et al. 1996).

Die koordinierte Expression von ENPP1 und CD38 erlaubt die Hydrolyse von extrazellulärem NAD⁺ durch aktivierte T-Zellen zu Nicotinamid, Mononukleotiden und AMP, oder zu Nikotinamid und ADP-Ribose. Somit sind diese zwei Enzyme in der Lage, die Verfügbarkeit der Substrate für die NAD⁺ abhängige ADP-Ribosylierung durch ADP-Ribosyltransferasen auf der Zelloberfläche zu kontrollieren und die T-Zelle vor Apoptose zu schützen, denn die ADP-Ribosylierung führt zur Aktivierung des proapoptotischen P2X7 Rezeptors (Seman, Adriouch et al. 2003; Krebs, Adriouch et al. 2005). Über den gleichen Mechanismus dienen ENPP1 und CD38 ebenfalls als Schutz gegen ADP-ribosylierende bakterielle Toxine, wie Cholera- oder C. botulinum C3-Toxin (Bortell, Moss et al. 2001). Eigentlich wirken NAD⁺ und die daraus entstandene ADP Ribose als Inhibitoren auf die T-Zell Proliferation. Ihre Hydrolyse durch ENPP1 und CD38 führt somit genau zum Gegenteil, nämlich zur T-Zell Proliferation (Popoff 1998).

Bekannt ist außerdem, dass ENPP1 vermehrt in Chondrozyten synthetisiert wird und eine wichtige Rolle in der Knochenmineralisation und der Verkalkung von Gewebe spielt, indem es Pyrophosphat, einen bedeutenden Inhibitor der Verkalkung, aus ATP

Einleitung

freisetzt (Goding, Terkeltaub et al. 1998; Bachner, Ahrens et al. 1999). Mäuse mit der natürlich vorkommenden Mutation Ttw (tip-toe walking), die von einer Ossifikation der spinalen Bänder und einer abnormalen Ossifikation an vielen anderen Stellen begleitet ist, haben eine Nonsense-Mutation im ENPP1-Gen (Okawa, Nakamura et al. 1998). Ebenfalls konnte bei Patienten mit einer degenerativen Arthritis ein erhöhter Serumspiegel von ENPP1 nachgewiesen werden (Cardenal, Masuda et al. 1998).

Neben dem Einfluss von ENPP1 auf die Signalwirkung von Insulinrezeptoren konnte auch eine abweichende Expression des Enzyms bei Typ 2 Diabetikern festgestellt werden.

1.2.3.3 ENPP2 (Autotaxin)

ENPP2 (ATX) ist ein Glycoprotein von 125kDa und wird von verschiedenen Zellen und Geweben synthetisiert (Bachner, Ahrens et al. 1999; Stefan, Gijbers et al. 1999; Bollen, Gijbers et al. 2000; Ferry, Tellier et al. 2003).

Ursprünglich wurde es als autokriner Motilitäts-Stimulationsfaktor entdeckt, der von Melanomzellen sezerniert wurde (Stracke, Krutzsch et al. 1992; Murata, Lee et al. 1994). Später fand man heraus, dass ENPP2 von malignen Zellen wie z.B. beim Brust- und Lungenkarzinom vermehrt gebildet wird und mit einer stärkeren Invasivität der Krebszellen einhergeht (Kohn, Hollister et al. 1993; Lee, Murata et al. 1996; Kawagoe, Stracke et al. 1997; Yang, Mou et al. 1999; Zhang, Zhao et al. 1999; Debies and Welch 2001; Euer, Schwirzke et al. 2002; Yang, Lee et al. 2002; Kehlen, Englert et al. 2004). Seifert et al. 2008 konnten zeigen, dass die Motilität der Schilddrüsentumorzellen durch ATX gesteigert wird und dass diese biologische Funktion vor allem durch die sezernierte Form von ATX bedingt ist (Seifert, Klonisch et al. 2008). Die Expression von ENPP2 steigt außerdem um das hundertfache während der Umwandlung des Onkoproteins v-Jun (Black, Clair et al. 2004). In der Behandlung von Karzinomen stellt sich ENPP2 als attraktives Zielprotein dar, weil es extrazellulär agiert und die Kaskade der Metastasenbildung auf verschiedenen Ebenen stimuliert. Gewiss stimuliert ENPP2 nicht nur das Wachstum von Krebszellen (Umezū-Goto, Kishi et al. 2002), sondern agiert auch als Motilitätsfaktor der Tumorzellen (Kohn, Hollister et al. 1993; Lee, Murata et al. 1996), erhöht das karzinogene Potential von ras-transformierten Zellen (Nam, Clair et al. 2000) und führt zu einer starken Angiogenese (Nam, Clair et al. 2001). All diese biologischen Effekte können nicht durch die Hydrolyse von Nukleotiden erklärt werden, sondern beruhen auf der Aktivität von ENPP2 als extrazelluläre Lysophospholipase D (Moolenaar 2002; Moolenaar, van Meeteren et al.

2004; Tokumura 2004; Xie and Meier 2004). Diese setzt Lysophosphatidcholine in Lysophosphatsäure (LPA) und Cholin um (Tokumura, Majima et al. 2002; Umezugoto, Kishi et al. 2002; Hama, Aoki et al. 2004). Über G-Protein-gekoppelte LPA Rezeptoren verursacht LPA verschiedene biologische Antworten und stimuliert: 1. die Zellproliferation über ras Aktivierung; 2. das Überleben der Zellen über Aktivierung der Proteinkinase B; 3. das Runden von Zellen über die RhoA GTPase und 4. die Streuung, Verbreitung und Migration von Zellen über die Aktivierung von der Rac GTPase. Es ist vorstellbar, dass ENPP2 zusätzlich durch seine Fähigkeit, Nukleotide zu hydrolysieren, als Tumorwachstumsfaktor agiert. In der Tat lassen solide Tumore Adenin-Nukleotide frei und ENPP2 kann ATP, das als Inhibitor für Tumorzellproliferation gilt, hydrolysieren (Agteresch, Dagnelie et al. 1999). Hinzu kommt, dass die gemeinsame Wirkung von ENPP2 und Ekto-5'-Nukleotidase auf ATP und ADP zur Entstehung von Adenosin führt, und dieses ebenfalls stimulierend auf Tumorwachstum und Angiogenese, sowie inhibierend auf die Immunantwort wirkt (**Abb. 6**) (Spsychala 2000; Cronstein 2004; Desai, Victor-Vega et al. 2005). In dieser Hinsicht sollte auch erwähnt werden, dass durch die gesteigerte Expression von ENPP2 (Tice, Szeto et al. 2002; Kenny, Enver et al. 2005) und von Ekto-5'-Nukleotidase (Spsychala and Kitajewski 2004) auf den Tumorzellen der Wnt/b-Catenin Signalweg aktiviert wird.

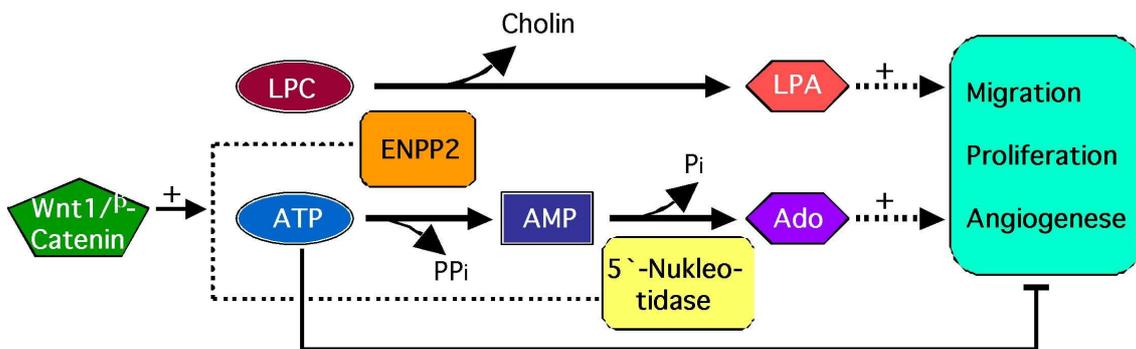


Abb. 6: Tumorwachstum und Metastasierung: Die Rolle von ENPP2 katalysierten Reaktionen.

Im extrazellulären Milieu bildet ENPP2 als Tumormotilitäts-stimulierender Faktor LPA aus LPC. LPA fördert die Zellproliferation, Migration und Angiogenese. In einer gekoppelten Reaktion mit der Ekto-5'-Nukleotidase wird ATP, das zytotoxisch auf Tumore wirkt, zu Adenosin hydrolysiert, welches als Tumorwachstumsfaktor und als Stimulationsfaktor für Angiogenese wirkt. Die Expression von beiden (ENPP2 und Ekto-5'-Nukleotidase) wird verstärkt durch den Signalweg über Wnt/b-Catenin, der bei vielen Tumoren aktiviert ist.

Einleitung

Außerdem wirkt ENPP2 angiogenetisch durch die Steigerung der Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor). Ein weiteres Substrat des ENPP2 in seiner Eigenschaft als Lysophospholipase D ist das Sphingosylphosphorylcholin, welches in Sphingosin-1-phosphat und Cholin hydrolysiert wird (Clair, Aoki et al. 2003). Sphingosin-1-phosphat ist ebenfalls ein Modulator der Zellmotilität, aber seine Effekte sind komplex und abhängig vom jeweiligen Zelltyp.

Beide Enzymaktivitäten des ENPP2, die Hydrolyse von Nukleotiden und von Lysophospholipiden, werden über das gleiche katalytische Zentrum gesteuert. Obwohl sich ENPP1-3 strukturell sehr ähnlich sind, besitzt lediglich ENPP2 eine Lysophospholipase D Aktivität, über die es zur Steigerung von Zellproliferation, Zellmotilität und Angiogenese beiträgt. ENPP1 und 3 weisen dagegen eine wesentlich höhere Nukleotid-Pyrophosphatase-Aktivität auf (Gijsbers, Ceulemans et al. 2003).

1.3 ADP-Ribosyltransferasen

Da im Rahmen dieser Dissertation die Enzymaktivität von ENPP2 im Hinblick auf eine De-ADP-Ribosylierung untersucht wurde, gebe ich hier einen kurzen Überblick über die ADP-Ribosyltransferasen, den Mechanismus der ADP-Ribosylierung sowie die Familie der ADP-Ribosyltransferasen.

Ekto-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs), Poly-ADP-Ribosyltransferasen (PARPs) und bakterielle ADP-Ribosyltransferasen können NAD binden und die Übertragung der ADP-Ribosegruppe auf eine spezifische Zielaminosäure katalysieren. (Jacobsen 1989; Aktories 1991). Hierbei wird Nikotinamid freigesetzt. Diese ADP-Ribosylierung ist, wie auch die Phosphorylierung, eine posttranslationale Proteinmodifikation. Fünf Mono-ADP-Ribosyltransferasen sind bisher bei Säugetieren nachgewiesen worden. Sie werden in verschiedenen Geweben als membranständige, mit einem Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-(GPI)-Anker versehene Ekto-Enzyme (ART1-4) oder als sezernierte Enzyme (ART5) exprimiert, und sind in einer einheitlichen Nomenklatur zusammengefasst worden (ART1-ART8). Seit kurzem sind ART1 (CD296) und ART4 (CD297) auch in der CD-Nomenklatur vertreten. Von Zellen des Immunsystems werden ART2 und ART4 exprimiert (Hauschildt, Scheipers et al. 1994; Pellat-Deceunynck, Wietzerbin et al. 1994; Glowacki, Braren et al. 2002). Bei Mäusen wurden ART1, ART2.1, ART2.2, ART3 und ART4 auf der Zelloberfläche nachgewiesen, während beim Menschen nur die ART1, ART3, ART4 auf Zelloberflächen vorkommen.

Einleitung

Verschiedene ARTs ADP-ribosylieren die Akzeptoraminosäuren Arginin, Cystein, Asparagin, Diphthamid (modifiziertes Histidin) und Glutamat (Haag 1997). Dieses ist jedoch bisher nur für ART1, 2, und 5 bekannt. Wie bei der Phosphorylierung kann dadurch die Funktion des modifizierten Proteins reguliert werden. So wurde die ADP-Ribosylierung erstmalig als Mechanismus der Pathogenität des Diphtherie-Toxins beschrieben, welches eine modifizierte Aminosäure (Diphthamid) des eukaryotischen Elongationsfaktors 2 (EF2) ADP-ribosyliert und dadurch die Proteinsynthese in den betroffenen Zellen blockiert (Honjo, Nishizuka et al. 1968). Später wurde die ADP-Ribosylierung auch als pathogener Mechanismus des Cholera-, Pertussis- und anderer bakteriellen Toxinen beschrieben.

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

Die **Abb. 7** zeigt eine Methode, wie man die ADP-Ribosylierung untersuchen kann. Einerseits kann dies über die radioaktive Markierung des NADs und den anschließenden Nachweis der markierten Oberflächenproteine in der Autoradiographie geschehen. Andererseits gibt es den 1G4-Assay. In diesem verwendet die an der Zelloberfläche lokalisierte ART etheno-NAD als Substrat und überträgt den etheno-Adenosin-Rest auf ein Arginin eines Zielproteins. Die ADP-ribosylierten Proteine können nun durch den für etheno-Adenosin spezifischen monoklonalen Antikörper 1G4 erkannt werden. In der Abbildung 7 ist außerdem die De-ADP-Ribosylierung durch die ENPPs dargestellt.

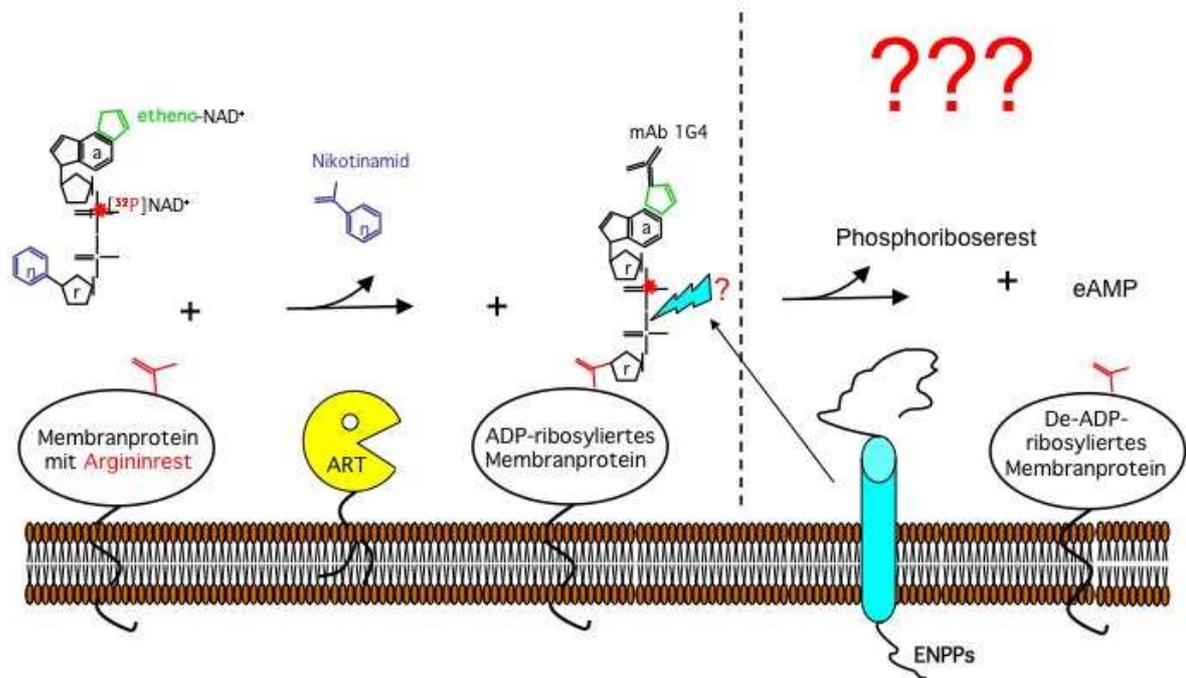


Abb. 7: Immunoassay zur Detektion von (etheno)-bzw. ³²P-ADP-ribosylierten Membranproteinen und ihre De-ADP-Ribosylierung.

Wird NAD radioaktiv mit ³²P markiert (roter Stern), kann die weiterhin radioaktiv markierte ADP-Ribose am Targetprotein im Western Blot durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Verwendet man etheno-NAD als Substrat, kann man über den monoklonalen 1G4 Antikörper und einen Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörper ADP-ribosylierte Zielproteine auf lebenden Zellen in der Durchflusszytometrie oder in der Immunfluoreszenz, sowie im Western Blot nachweisen. Bei der De-ADP-Ribosylierung durch NPPs wird etheno-AMP und somit auch die 1G4 Bindungsstelle entfernt. (Modifiziert nach Krebs et al. (2003) Analytical Biochemistry)

1.4 NAD und ATP im Extrazellarraum

ATP und NAD sind als klassische intrazelluläre Metaboliten des Energiehaushaltes und des Elektronentransfers bekannt. Intrazellulär wird das meiste NAD (mehr als 70%) gespeichert und in den Mitochondrien in erster Linie für metabolische Vorgänge verbraucht (Berger, Lau et al. 2005). Im Zytoplasma und im Kern dient es als Signalmolekül, als Vorläuferstoff von Calcium freisetzenden Metaboliten und als Substrat für PARPs und Sirtuin, die beide im Kern lokalisiert sind und mit DNA-Reparaturmechanismen, Transkriptionsregulatoren und Apoptosemechanismen in Verbindung stehen (Di Lisa and Ziegler 2001; Herceg and Wang 2001; Haag, Adriouch et al. 2007). Unter pathophysiologischen Bedingungen wie Ischämie, oxidativem Stress oder Gewebeschaden lassen die Zellen ihr in den Mitochondrien gespeichertes NAD in das Zytoplasma und in den Nukleus frei, wobei der genaue Mechanismus noch nicht

Einleitung

bekannt ist (Di Lisa and Ziegler 2001). Folglich spielt NAD eine entscheidende Rolle in der zellulären Antwort auf Stress.

In den letzten Jahren wurde es allerdings offensichtlich, dass diese Purin-Nukleotide auch eine wichtige Rolle im Extrazellularraum einnehmen, sei es als Substrat für eine Vielzahl von Ektonukleotidasen oder im Falle von ATP als Ligand für Zelloberflächenrezeptoren (**Abb. 8 und Abb. 9**).

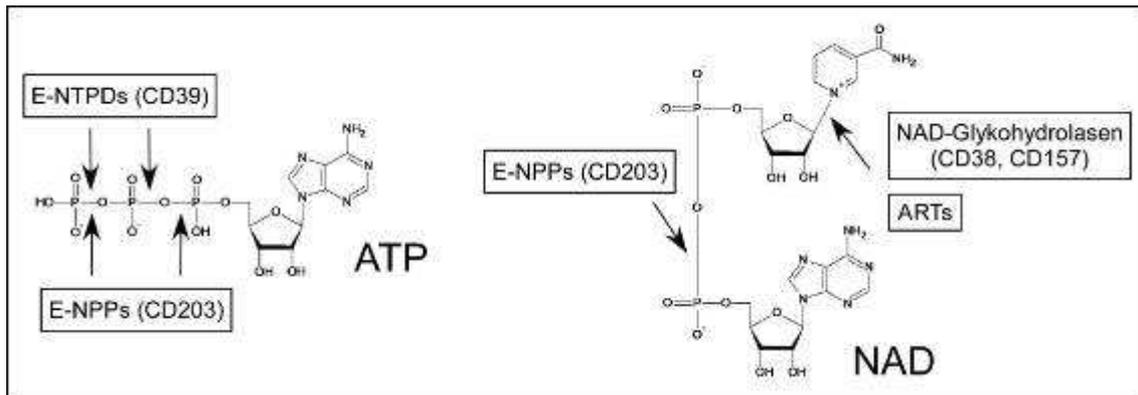


Abb. 8: Chemische Struktur von ATP und NAD mit Angabe möglicher Spaltstellen durch Ektoenzyme. Mögliche Spaltstellen von ATP und NAD durch NAD-Glykohydrolasen, ADP-Ribosyltransferasen (ARTs), Ekto-Nukleosidtriphosphatdiphospho-hydrolasen (E-NTPDs) und Ekto-Nukleotidpyrophosphatasen/phosphodiesterasen (E-NPPs) (modifiziert nach Haag et al. 2007)

Burnstock stellte 1972 erstmals die Hypothese auf, dass Purin-Nukleotide aktiv von lebenden Zellen sezerniert werden und als Neurotransmitter fungieren (Burnstock 1972). NAD wird auf ähnliche Weise gemeinsam mit ATP oder anderen Neurotransmittern aus terminalen Enden von postganglionären Enden freigesetzt, die mit Blutgefäßen oder der Harnblase in Verbindung stehen (Smyth, Bobalova et al. 2004). Außerhalb des Nervensystems gelangen ATP und NAD beispielsweise auch durch Connexin-43 Gap-Junction-Halbkanäle in den Extrazellularraum (Bruzzone, Guida et al. 2001; Stout, Costantin et al. 2002). Diese Kanäle öffnen typischerweise nach mechanischem oder metabolischem Stress (Contreras, Sanchez et al. 2002; Cherian, Siller-Jackson et al. 2005).

Heute weiß man, dass ATP und NAD als Antwort auf zellulären Stress und Entzündungen aus den intrazellulären Speichern in den Extrazellularraum freigegeben werden. Dies könnte durch unterschiedliche Mechanismen erfolgen, wie aktive Exozytose, Diffusion über Transmembrantransporter in lebenden Zellen oder durch

passives Austreten über Membranen in sterbenden Zellen (Bruzzone, Guida et al. 2001; Schwiebert and Zsembery 2003; Smyth, Bobalova et al. 2004). Die Erhöhung des intrazellulären Calciums führt stets zur Purinfreisetzung (Boudreault and Grygorczyk 2004; Genetos, Geist et al. 2005). Extrazelluläres ATP kann selber ebenfalls Signal zur ATP-Freisetzung durch P2X7 sein (Pellegatti, Falzoni et al. 2005). Kürzlich wurde die Vermutung geäußert, dass extrazelluläre Purine als Gefahrensignal das Immunsystem aktivieren (la Sala, Ferrari et al. 2003; Hanley, Musset et al. 2004; Di Virgilio 2005). Einmal freigesetzt, können ATP und NAD in weitere Metabolite wie ADP, AMP oder Adenosin verwandelt werden.

1.4.1 Immunmodulation durch extrazelluläres ATP

ATP oder seine Nebenprodukte aktivieren verschiedene Mitglieder der Purinrezeptorfamilie. Zu den Purinrezeptoren gehören Adenosin-sensitive P1 Rezeptoren (A1, A2a, A2b und A3) und P2 Rezeptoren, die durch ATP, ADP, UTP, UDP oder UDP-Glucose aktiviert werden (Ralevic and Burnstock 1998; Dubyak 2003). Neuere Studien zeigen, dass auch P2Y11 durch mikromolare Konzentrationen von ekto-NAD stimuliert wird (Moreschi, Bruzzone et al. 2006). Extrazelluläres NAD⁺ ist ein Agonist des humanen P2Y11 Rezeptors in humanen Granulozyten (Moreschi, Bruzzone et al. 2006). P2 Rezeptoren werden in zwei Gruppen geteilt: die G-Protein gekoppelten P2Y Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen (P2Y1, -2, -4, -6, -11, -12, -13, -14) und die P2X Liganden-abhängigen Ionenkanäle (P2X1-7) (Fredholm, Abbracchio et al. 1997; Khakh, Burnstock et al. 2001). Purinrezeptoren regulieren wichtige physiologische Funktion wie die Blutplättchenaggregation, die lokale Regulation des Blutdrucks, die Anpassung der Herzfunktion unter ischämischen Bedingungen und die Ausprägung einer Entzündung (Ralevic and Burnstock 1998; Burnstock and Williams 2000; Bodin and Burnstock 2001). ATP kann im Prinzip über die komplette P2X-Familie sowie über eine Untergruppe der P2Y Rezeptoren (P2Y1, 2, 11, 12, 13) seine Signale vermitteln (Dubyak 2003). Allerdings unterscheiden sich die Empfindlichkeiten der verschiedenen Rezeptoren für ATP deutlich. Die EC₅₀ für ATP liegt für P2Y-Rezeptoren im nanomolaren Bereich, für die meisten P2X-Rezeptoren im niedrigen mikromolaren Bereich, und für P2X7 im hohen mikromolaren Bereich (la Sala, Ferrari et al. 2003). Komplizierend kommt hinzu, dass ATP sehr schnell metabolisiert wird und die anfallenden Abbauprodukte (v.a. ADP und Adenosin) eigene, neue Signalfunktionen haben, die sie über andere Rezeptoren weitergeben. Abhängig von

Einleitung

Konzentration und Zelltyp kann ATP eine pro- und eine anti-inflammatorische Rolle spielen (Abb. 9).

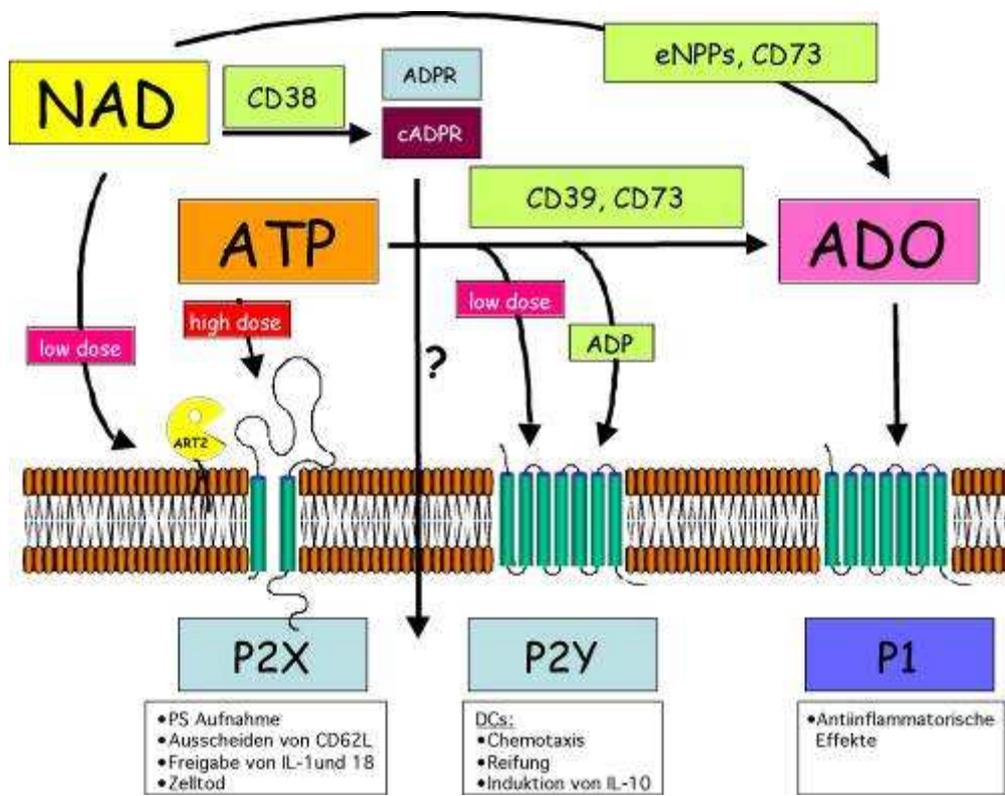


Abb. 9: Aktivität von extrazellulärem ATP und NAD und ihren Metaboliten an unterschiedlichen Zelloberflächenrezeptoren. ATP in hoher, mittlerer oder niedriger Konzentration kann P2X7-, andere P2X- oder P2Y-Rezeptoren aktivieren oder es wird sequentiell durch ENTPDs (CD39) und Ecto-5'-Nucleotidasen (CD73) zu ADP und Adenosin (ADO) abgebaut. ADP kann an P2Y Rezeptoren und Adenosin an den P1 Rezeptor binden. Extrazelluläres NAD dient als Substrat für ADP-Ribosyl-transferasen (ART2) oder wird durch NADase (CD38) zu ADP-Ribose hydrolysiert. CD38 kann auch cyclische ADP-Ribose (cADPR) herstellen, die intrazelluläres Calcium mobilisiert, wobei noch nicht geklärt ist, wie cADPR in die Zelle kommt. NAD (und ATP) können außerdem durch ENPPs abgebaut werden zu AMP, das wiederum durch die Ecto-5'-Nucleotidase zu Adenosin hydrolysiert wird. (modifiziert nach Haag et al. 2007)

Die proinflammatorischen Effekte von ATP werden normalerweise durch den P2X7 Purinrezeptor vermittelt, wenn er durch eine hohe Konzentration von ATP für eine kurze Zeit stimuliert wird. Es kommt zur Freisetzung von Interleukin (IL-) 1 und IL-18 in DCs und Makrophagen zum induzierten Zelltod von T-Lymphozyten (Ferrari, Chiozzi et al. 1997; Mehta, Hart et al. 2001), sowie zur vermehrten Produktion von Tumornekrose Faktor alpha (TNF α) in Mikroglia Zellen (Suzuki, Hide et al. 2004). Die

anti-inflammatorischen Effekte entstehen einerseits durch die direkte Wirkung des ATPs auf P2Y₁₁ oder andere P2Y-Rezeptoren, wodurch die Synthese von IL-12 inhibiert und die von IL-10 stimuliert wird (MacKenzie, Wilson et al. 2001; Wilkin, Stordeur et al. 2002) oder durch die Wirkung von Adenosin auf P1 Rezeptoren. Diese werden von reifen dendritischen Zellen und aktivierten T-Zellen exprimiert und inhibieren bei DCs die Synthese von IL-12 und bei T-Zellen die Aktivierung.

1.4.2 Immunmodulation durch extrazelluläres NAD

Ähnlich wie ATP wird auch NAD im extrazellulären Kompartiment abgebaut und neue entstandene Metabolite wie die ADP-Ribose oder Adenosine übermitteln ihrerseits eigene Signale. Im Gegensatz zu ATP gibt es zwar keine speziellen Membranrezeptoren, die NAD als Liganden erkennen, aber NAD reguliert zelluläre Funktionen über zwei Enzymfamilien. Die erste Gruppe von Enzymen, die als Mediatoren von NAD-Signalen dienen, sind die Mono-(ADP-Ribosyl-) Transferasen (ARTs). Die zweite Enzymgruppe sind die funktionell verwandten Ektoenzyme CD38 und CD157, eine NADase oder ADPR Cyclase, die auf B-Zellen, APC und aktivierten T-Zellen vorkommen (Cockayne, Muchamuel et al. 1998; Krebs, Adriouch et al. 2005). Diese Enzyme hydrolysieren NAD zu Nikotinamid und entweder „normaler“ oder cyclischer ADP-Ribose (cADPR) oder führen zur Bildung von NAADP aus Nikotinsäure und NADP (Aarhus, Graeff et al. 1995). cADPR und NAADP sind kürzlich als „second messenger“ bekannt geworden, die die IP₃-unabhängige intrazelluläre Calciumfreisetzung triggern und somit eine wichtige regulatorische Rolle für die Zellaktivierung einnehmen (De Flora, Franco et al. 1998; Guse 2000). Unklar ist weiterhin, ob diese „second messenger“ erst von CD38 extrazellulär gebildet werden und dann ins Cytosol transloziert werden, oder ob sie von einer intrazellulären Form von CD38 aus intrazellulärem NAD generiert werden. CD38 scheint darüber hinaus Einfluss auf die Immunfunktion zu nehmen, indem es die Substratverfügbarkeit für ADP-Ribosyltransferasen limitiert (Krebs, Adriouch et al. 2005). CD38 defiziente Mäuse zeigen reduzierte Reaktionen auf T-Zell-abhängige Antigene. Dafür ist eine Migrationsstörung der Dendritischen Zellen verantwortlich, die auf eine defekte Signalübertragung durch Chemokinrezeptoren aufgrund gestörter Calcium-Antworten zurückzuführen ist (Cockayne, Muchamuel et al. 1998; Partida-Sanchez, Goodrich et al. 2004).

Extrazelluläres NAD induziert den selektiven Zelltod von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, aber nicht den von B-Zellen. Die zum Auslösen des NAD-induzierten Zelltodes (NICD) benötigte Konzentration liegt im mikromolaren Bereich (Seman, Adriouch et al. 2003) und damit über der physiologischen extrazellulären NAD-Konzentration von 100-500nM (Davies, Perrett et al. 1999; O'Reilly and Niven 2003). NAD führt zur Apoptose der Zelle, da es als Substrat für die ADP-Ribosylierung von P2X7 durch die ARTs dient (Seman, Adriouch et al. 2003). Übereinstimmend mit dieser Hypothese konnte gezeigt werden, dass sowohl ART2- als auch P2X-Knockout Mäuse resistent gegen NICD sind. Die Sensitivität gegenüber NAD hängt von dem Aktivierungszustand der Lymphozyten ab. So sind es vor allem die naiven T-Zellen, die vom NICD betroffen sind, weil die ART2.2 nach der Aktivierung der T-Zellen durch Metalloproteasen von der Zelloberfläche abgespalten wird.

1.4.3 Die Regulation von purinergen Signalen durch nukleotidkatabolisierende Enzyme

Die Zellen des Immunsystems exprimieren eine Vielzahl von purinergen Sensoren auf ihrer Zelloberfläche, sei es in Form von Purinrezeptoren oder Ektonukleotidasen. Für viele dieser Moleküle ist eine detaillierte Expressionsanalyse durch das Fehlen von adäquaten Antikörpern erschwert. Sowohl Enzyme, die ATP zu Adenosin abbauen (Ekto-ATPasen und 5'-Nukleotidasen), als auch die Ekto-Adenylat Kinasen, die ATP aus Adenosin wieder herstellen, sind auf den Lymphozyten lokalisiert (Yegutkin, Henttinen et al. 2002). Desweiteren kann ADP aus extrazellulärem NAD durch das sequenzielle Zusammenarbeiten von ENPPs und 5'-Nukleotidasen generiert werden. Schließlich exprimieren Immunzellen auch eine NADase und eine ADP-Ribosyltransferase. In der Maus kommt die CD38 NADase/ADPR-Cyclase auf B-Zellen und anderen Antigen präsentierenden Zellen vor, sowie auf aktivierten T-Zellen (Cockayne, Muchamuel et al. 1998; Krebs, Adriouch et al. 2005). Umgekehrt wird die ART2.2 ADP-Ribosyltransferase auf ruhenden murinen T-Zellen, aber nicht auf aktivierten oder antigenpräsentierenden Zellen exprimiert.

Bei in vitro Experimenten führt die ADP-Ribosylierung von P2X7 bei mehr als 70% der Zellen zum NAD-induzierten Zelltod (Adriouch, Ohlrogge et al. 2001; Seman, Adriouch et al. 2003). In lebenden Organismen wird die Konzentration von extrazellulärem NAD und ATP allerdings durch eine Vielzahl von Ektonukleotidasen reguliert. Wie oben schon beschrieben kann NAD durch CD38 und CD157 oder durch

ENPPs hydrolysiert werden, wobei CD38 die bedeutendste NAD-Glycohydrolase/ADP-Ribosylcyclase darstellt (Cockayne, Muchamuel et al. 1998). Durch in vitro Experimente konnte einerseits nachgewiesen werden, dass das Vorhandensein von CD38 das Ausmaß der ADP-Ribosylierung auf der T-Zellenoberfläche nach Behandlung mit NAD senkt, und andererseits die selektive Blockierung von CD38 zu einer verstärkten ADP Ribosylierung führt. Lymphozyten von CD38-Knockout Mäusen zeigten ebenfalls eine erhöhte Aktivität ihrer ADP-Ribosyltransferase. In vivo spielen aber neben CD38 auch noch andere NAD-metabolisierenden Enzyme eine entscheidende Rolle.

Ähnlich wie CD38 spielt die CD39 Ectonukleotidase die bedeutendste Rolle für die Regulation der extrazellulären ATP Konzentration im Blut.

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

1.5.1 Techniken der DNA-Immunisierung

Die Methode der ballistischen DNA-Immunisierung von Versuchstieren mittels einer sogenannten Gene-Gun haben wir zur Herstellung spezifischer monoklonaler Antikörper angewendet. Bei diesem Verfahren wird das jeweilige DNA-Konstrukt als Plasmid/cDNA an 1µm Goldpartikel gekoppelt und diese Goldpartikel an der Innenseite eines Plastikschlauches fixiert, der in 2-3 cm große Patronen zerteilt wird. Diese Patronen werden in die Gene-Gun eingespannt und ballistisch in die Haut eines Kaninchens, einer Ratte oder einer Maus geschossen (**Abb. 10**). In 3-bis 6-Wochen-Intervallen erhalten die Tiere 4 Immunisierungen mit jeweils 8 Schüssen Plasmid-konjugierten Goldpartikeln (1µg DNA/mg Gold/Schuss). Serumproben werden jeweils 10 Tage nach der Immunisierung gewonnen. Zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern erhalten die Tiere 3 Tage vor der Gewinnung des endgültigen Immunserums einen „*final boost*“ mit transient transfizierten HEK-Zellen i.v. oder aufgereinigtem rekombinantem Protein (50µg in 200µl PBS i.v.). Die frisch präparierten Milzzellen werden mit Sp2/0 Myelomazellen fusioniert, und im anschließenden Screening werden die Überstände der Fusionszellen auf die 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 (Koch-Nolte, Glowacki et al. 2005).

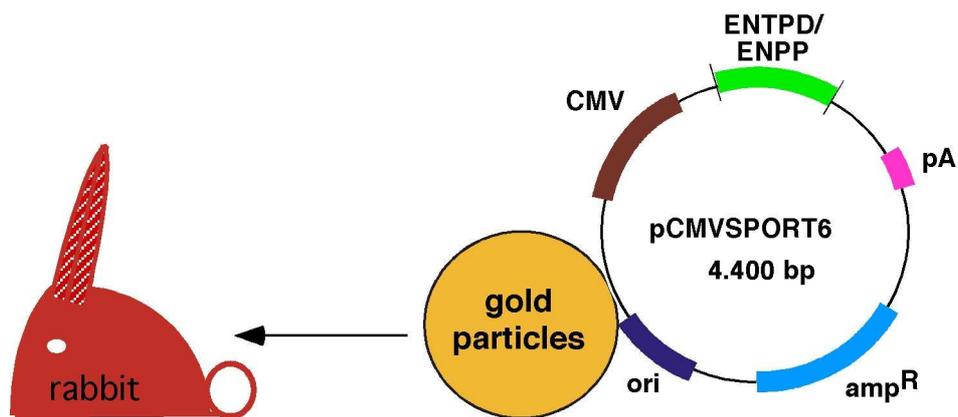


Abb. 10: Schema der Immunisierung eines Kaninchens. Die durch DNA-Immunisierung generierten Antikörper sind denen durch synthetische Peptide hergestellten Antikörpern bezüglich der Protein-Erkennung in Tertiär- und Quartärstruktur überlegen. Bei der DNA-Immunisierung wird das jeweilige DNA-Konstrukt 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. Zehn Tage vor der Gewinnung des endgültigen Immuserums erhalten die Tiere einen „final boost“ mit transient transfizierten HEK-Zellen i.v. Diese Methode ermöglicht die Herstellung von Antikörpern gegen Membranproteine in natürlicher Konformation. Hierbei handelt es sich um eine genetische Immunisierung, bei der Antikörper direkt gegen das Genprodukt gebildet werden. Im Unterschied zu Peptidantikörpern, welche nur gegen die Peptid-Sequenz des C-Terminus der Proteine 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)

Diese Methode ermöglicht die Herstellung von Antikörpern gegen Membranproteine in natürlicher Konformation. Bei der genetischen Immunisierung werden die Antigene vom immunisierten Versuchstier nach dem DNA-Bauplan des verabreichten Plasmids synthetisiert und prozessiert (Tang, DeVit et al. 1992; Koch-Nolte, Duffy et al. 1999)

1.5.2 Gegenüberstellung von DNA-Immunisierung und Proteinimmunisierung

Der DNA Immunisierung steht die herkömmliche Methode der Proteinimmunisierung gegenüber, bei der Versuchstiere durch eine intravenöse, intramuskuläre oder intraperitoneale Injektion eines aufgereinigten Proteins oder eines synthetischen Peptids

Einleitung

immunisiert werden. Werden beide Techniken verglichen, entdeckt man einige Vorteile der DNA-Immunsierung gegenüber der Proteinimmunsierung (Koch-Nolte 1998).

Zunächst sind im Falle der Proteinimmunsierung die Produktion und Isolierung eines rekombinanten Proteins oft recht zeitaufwendig, schwierig und teuer (Tang, DeVit et al. 1992). Das letztendlich produzierte Protein oder Peptid verfügt häufig nur über eine begrenzte Haltbarkeit und bedarf einer speziellen Lagerung (Cohen, Boyer et al. 1998). Die zur DNA-Immunsierung benötigten Plasmide hingegen sind schneller und günstiger herzustellen und können zudem auch unter einfacheren Bedingungen gelagert werden. Insbesondere werden für einen vergleichbaren Immunsierungseffekt wesentlich geringere Mengen an DNA als an Protein benötigt (Boyle, Silva et al. 1997). Aber die jeweiligen Antigene unterscheiden sich nicht nur in Bezug auf Kosten und Geschwindigkeit ihrer Herstellung. Bei der routinemäßig genutzten Peptidimmunsierung werden synthetische Peptide an Transportproteine gekoppelt, um die Produktion von Antikörper zu induzieren, die gegen lineare Epitope bzw. gegen die Peptid-Sequenz des C-Terminus der Proteine gerichtet sind. Diese Antikörper vermögen aufgrund dessen das Protein nur in denaturierter Form erkennen. Da die Mehrzahl der aus genetischer Immunsierung hergestellten Antikörper die natürlich gefalteten Proteine in der Tertiär- oder Quartärstruktur erkennt, eignen sich diese besonders gut für Immunzytochemie, Immunpräzipitation, Affinitätsreinigung, Durchflusszytometrie (FACS-Analysen), ELISA, Microarrays und somit für diagnostische und therapeutische Anwendungen. Die meisten mAbs reagieren sehr spezifisch mit ihrem jeweiligen Antigen. Beispielsweise reagierten die meisten mAbs der ART-Fusionen schwach mit dem jeweiligen Orthologen einer anderen Spezies jedoch abgesehen von einer Ausnahme mit hoher Sequenzidentität innerhalb der Aminosäuresequenz nicht mit dem jeweiligen Paralogen (Koch-Nolte, Glowacki et al. 2005). Die in unserer Arbeitsgruppe hergestellten ADAPINCs (Antikörper gegen Proteine in nativer Konformation) lassen sich außerdem gut nutzen, um primäre Zellen und Zelllinien auf Proteinexpression zu untersuchen.

Die folgende **Abb. 11** listet die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten ENTPD und ENPP spezifischen ADAPINC Immunsereen auf.

Einleitung

Spezies Ektonukleotidase	Mensch	Maus
ENTPD1	-	CR44
ENTPD2	5441, #CR45	CR45, #5441
ENTPD5	5446	CR47
ENTPD6	-	CR46
ENPP2	Kan 32*, K2G	-
ENPP4	-	CR65
ENPP5	-	CR66
ENPP6	-	CR67

Abb. 11: Übersicht der ENTPD und ENPP spezifischen Antikörper. Hier aufgelistet sind die in dieser Arbeit verwendeten ADAPINC Immunsereen zur Analyse der Ektonukleotidasen. Mit einem # versehen sind die Kreuzreaktivitäten der Antikörper mit einem anderen Ektoenzymsubtyp. Das „*“ am Kan32 bedeutet, dass dieses Immunsereum nicht von unserer Arbeitsgruppe hergestellt wurde.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte:

Analysewaage	Analytical Plus,	Ohaus
Brutschrank/CO ₂ -Inkubator	MCO-20AIC	Sanyo
Bakterienbrutschrank	B6060	Heraeus
Cooler	Stratacooler	Stratagene
Digitalkamera	DP500	Olympus
Durchflusszytometer	FACScalibur	BD Biosciences
Geldokumentation	Edas290 + Kamera DC290	Kodak
ELISA		
Elektroporator	GenePulser mit <i>Capacitate Extender</i>	Bio-Rad
Entwicklungsmaschine	Fuji FPM 100A	Fuji Photo Film GmbH
Feinwaage	Typ 1412	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert S100	Zeiss
Heizblock	Thermomixer kompakt	Eppendorf
Inversmikroskop	-	Leitz
<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 SDS-Page	XCell SureLock Mini-Cell	Invitrogen
Mikro-Pipetten	Typ „Research“	Eppendorf
Neubauer Zählkammer		Labor Optik
PCR-Maschine	Biometra T3	Whatman Biometra
Pipettierhilfe	„Express“	Falcon/BD Biosciences
Photometer	SmartSpec 3000	Bio-Rad
Röntgenfilmkassetten	Surprema	Dr. Goos
Schüttelinkubator	-	Infors
Sicherheitswerkbank	HeraSafe HS12/2	Heraeus
Stickstofftank	K series	Taylor-Wharton
Spannungsgerät für die	Modell BI0105 LVD	Biometra
Agarose-Gelelektrophorese		
Spannungsgerät für SDS-Page	Power Pac 200	Bio Rad
Thermocycler	TGradient	Biometra
Tischzentrifuge	Biofuge <i>pico</i>	Heraeus

Material und Methoden

Ultraschallsonde	MSE	
Ultrazentrifuge	RC26 Plus	Sorvall
Ultrazentrifugenrotoren	SA-300	Sorvall
	SLA-3000	Sorvall
	SW40	Beckman-Coulter
UV-Spektrometer	Ultrospec2000	Pharmacia
UV-Transilluminator	Typ TI 1	Neolab
Vortex	„press to mix“	Neolab
Wasserbad	Typ 1007	Gesellschaft f.Labortechnik
Wasserdeionierungsanlage	MilliQ syntFthrombohesis	Millipore
	Elix 10	Millipore
Zentrifuge	GS-6KR	Beckman
-80°C-Truhe	HFC 586 Basic	Heraeus

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Combitips	versch. Größen	Eppendorf
Deckgläser, 0,17mm	9 x9 mm	Science Services, München
Dünnschichtchromatographieplatten	Polyethylenimin-Cellulose	Merck
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
Filterpapier	Wharman	Schleicher & Schuell
Hyperfilm ECL		Amersham- PharmaciaBiotech
Kanülen	versch. Größen	Braun
Kulturflaschen für adhärent wachsende Zellen	T25, T75	Nunc
Kulturschalen für in Suspension wachsende Zellen	10 cm, 25 cm	Greiner
Kryoröhrchen	1 ml	Nunc
96-well Mikrotiterplatten		Greiner
Nitex Membran	80µM Maschenweite	Cadish Precision Meshes
Nitrocellulosemembran	HyBond C	Pharmacia/GE Healthcare
Objektträger mit zellkulturbehandeltem Plastikboden in Deckglasdicke, steril	8 well µ-Slide	Ibidi

Material und Methoden

Parafilm		VWR
Pipettenspitzen	Tipstack, versch. Größen	Sarstedt
Polyacrylamid-Gele	Novex Bis-Tris Gele	Invitrogen
Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF)	ImmobilonP	Boehringer Ingelheim
Reaktionsgefäße	Safelock, versch. Größen	Eppendorf
Röntgenfilm	Kodak Biomax MR	Kodak Company, Connecticut (USA)
Sterilfiltrationsapparaturen	Steriflip, Stericup	Millipore
Untersuchungshandschuhe	Safeskin	Kimberly-Clark
Zentrifugenröhrchen, steril	15 ml, 50 ml	Falcon/ BD Biosciences

2.1.3 Mausstamm

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

BALB/c	H-2 ^d , Wildtyp Maus	UKE, Hamburg
BALB/c ART2.2.KO	H-2 ^d , Knockout Maus, Exon der ART2.2 ersetzt durch Hygromycin-Resistenzkassette	UKE, Hamburg

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
HEK.CS	humane Embryonale Nierenzelllinie	Firma ATCC-LGC Promochem
293T-HEK-Zelllinie	humane Nierenepithelienzellen transformiert mit Adenovirus 5 DNA	Firma ATCC-LGC Promochem
HeLa	humane Cervix-Ca-Zelllinie	Firma ATCC-LGC Promochem
Jurkat	humane T-Lymphomzelllinie	DSMZ
K-562	humane CML Zelllinie	Firma ATCC-LGC Promochem
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

2.1.5 Antikörper

Tab. 1: Übersicht über alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und analysierten Antikörper.

Anti	Antikörper	Aus	Konjugiert	Firma
Maus	CR44 anti ENTPD1	Kaninchen	Serum	AG Nolte, UKE
Maus	CR45 anti ENTPD2	Kaninchen	Serum	AG Nolte, UKE
Human	5441 anti ENTPD2	Kaninchen	Serum	AG Nolte, UKE
Maus	CR46 anti ENTPD6	Kaninchen	Serum	AG Nolte, UKE
Maus	CR47 anti ENTPD5	Kaninchen	Serum	AG Nolte, UKE
Human	5446 anti ENTPD5	Kaninchen	Serum	AG Nolte, UKE
Human	K2G anti ENPP2	Kaninchen	Serum	AG Nolte, UKE
Human	Kan32 anti ENPP2	Kaninchen	Serum	
Maus	CR65 anti ENPP4	Kaninchen	Serum	AG Nolte, UKE
Maus	CR66 anti ENPP5	Kaninchen	Serum	AG Nolte, UKE
Maus	CR67 anti ENPP6	Kaninchen	Serum	AG Nolte, UKE
	HA	Ratte	Purif.	Roche
	V5	Maus		Invitrogen (R960-25)
	GFP	Maus	Purif.	Boehringer (1814460)
Maus	CD4	Ratte	APC	Pharmingen (553051)
Maus	CD3e	Human	APC	Pharmingen (553066)
Maus	CD3e	Hamster	PE	Pharmingen (553063)
Maus	CD25	Ratte	PE	Pharmingen (553075)
Maus	CD45R / B220	Ratte	PE	Pharmingen (553090)
Kaninchen	IgG (H+L) F(ab') ₂	Esel	RPE	Dianova (711116152)
Maus	IgG (H+L) F(ab') ₂	Esel	RPE	Dianova (715116151)
Maus	CD3	Human	FITC	Pharmingen (553062)
Maus	CD4	Ratte	FITC	Pharmingen (553047)
Maus	CD8	Ratte	FITC	Pharmingen (553031)
Maus	CD11b	Ratte	FITC	Pharmingen (553010)
Maus	CD25	Ratte	FITC	Pharmingen (01094D)
Maus	CD38	Ratte	FITC	Pharmingen (558813)
Maus	CD45R / B220	Ratte	FITC	Pharmingen (553087)
Maus	CD62L	Ratte	FITC	Pharmingen (553150)
Maus	CD69	Human	FITC	Pharmingen (553236)
P2X7	RH23 A44	Ratte	gAlexa	AG Nolte, UKE
Maus	IgG (H+L)	Esel	FITC	Dianova (715095151)
eNAD	1G4 #72 anti eNAD	Maus	gAlexa	AG Nolte, UKE
Kaninchen	IgG (HRP)	Esel		Amersham, Bioscience, UK

2.1.6 Enzyme

Apa1	New England Biolabs, Frankfurt
Bam H1	New England Biolabs, Frankfurt
Eco R1 (20.000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt
Kpn1	New England Biolabs, Frankfurt
Nhe1 (10.000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt
Not1 (10.000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt
NotR	New England Biolabs, Frankfurt
Sac1	New England Biolabs, Frankfurt
Xma1	New England Biolabs, Frankfurt
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostik GmbH

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 100 µg/ml zugesetzt.

PFU-Turbo DNA-Polymerase	Stratagene, Amsterdam (Niederlande)
Platinum Blue DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
T4-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
AmpliTaq Gold™	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

2.1.7 Primer

Tab. 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer.

Primer	Sequenzierung
CD38tm(Apa)- for	5'-AAG CCA AGG GCC CAC TAT GAA TTT AGC- 3'
CD38tm(Bam)- rev	5'-CTT AGA GAT CCA AGC ACC TGC CCT TGC- 3'
hENPP1(Xma)- for	5'-GGG TTG AAA CCC GGG TGT GCC AAA GAA- 3'
hENPP1 (Not)- rev	5'-GAT AAG CGG CCG CTC AGT CTT CTT GGC- 3'
hENPP1 (Bam)- for	5'-GGG TTG GAT CCA AGC TGT GCC AAA GAA G- 3'
hENPP1 (Not)- rev2	5'-CCTGAG GCG GCC GCA TCA CCG AGG GCT CCG- 3'
hENPP2 (Xma)- for	5'-AAC ATC CCC GGG TCT TGC AAG GGC AGG- 3'
hENPP2 (Not)- rev	5'-ATG CTG CGG CCG CTA AAT CTC GCT CTC- 3'
mENPP2 (Xma)- for	5'-CAA CAC ACC CGG GTC CTG CAA AGG TAG- 3'
mENPP2 (Not)- rev	5'-AGG CCG CGG CCG CTA AAT CTC GCT CTC- 3'
hENPP3 (Bam)- for	5'-ACT CAG GGA TCC GGA AAA GCA AGG CAG- 3'
hENPP3 (Not)- rev	5'-GAC AGC GGC CGC TTA AAT AGT GGT TTC AAA TGT TGG- 3'
rENPP3 (Bam)- for	5'-CTCAGG GAT CCT GAA GAG CAT ATA GGC- 3'
rENPP3 (Not)- rev	5'-TTA CGC GGC CGC TCA AAT AAT GGT TTC GAA TGT GGG- 3'

2.1.8 Chemikalien und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben wurden Chemikalien der höchsten erhältlichen Reinheit benutzt.

Aceton	Merck
Agarose, Elektrophoresequalität	Invitrogen
4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF)	MP Biomedicals
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumchlorid	Merck
Aqua ad iniectabila	Baxter
Bacto-Agar	Gibco-BRL
Bacto-Trypton	Gibco-BRL
Bacto-Hefeextrakt	Gibco-BRL
BSA	PAA, Pasching, Österreich
Carbenicillin	Serva
Calciumchlorid	Merck
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Concanavalin A	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Serva
Essigsäure	Merck
Ethylendiamintetraacetat, Natriumsalz (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ethanol, 100%	Merck
Ethidiumbromid	Molecular Probes
³² P-NAD	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
Eisen(II)sulfat Heptahydrat	Merck
Formaldehydlösung, mind. 37	Fluka
Glukose	Merck
Glycerol Gelatin	Sigma GG-1
4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Serva
Igepal	Nonidet P40
Imidazol	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycinsulfat	Roche Applied Science
Lithiumchlorid	Merck
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Fluka
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck
Milchpulver	Carl Roth
Methanol p.a.	Walter CMP GmbH
Natriumcitrat	Merck

Material und Methoden

Natriumchlorid	J. T. Baker
Natriumdodecylsulfat (SDS), 10 % (w/v)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	Merck
Ni-NTA Agarose	Qiagen
Paraformaldehyd	Merck
ProLong Gold antifade reagent	Molecular Probes
Propidiumjodid	Pharmingen, Hamburg
Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare, München
Silbernitrat	Merck
Trichloressigsäure	Merck
Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck
Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan, Chloridsalz (TRIS-HCl)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Serva
Tween-20	USB Biochemicals

2.1.8.1 Materialien für zellbiologische Arbeiten

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

Blasticidin S	Invitrogen, Groningen
Carbenicillin	Serva, Heidelberg
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco BRL, Eggenstein
1 x Dulbecco's PBS	Gibco BRL, Eggenstein
G418 (Geneticin)	Gibco BRL, Eggenstein
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Hamburg
1640 RPMI	Gibco BRL, Eggenstein
HEPES Puffer, 1M	Gibco BRL, Eggenstein
L-Glutamin, 200mM	Gibco BRL, Eggenstein
Natriumpyruvat, 100mM	Gibco BRL, Eggenstein
Natriumchloridlösung, iston, 154mM	Braun
Nicht-essenzielle Aminosäuren, 100x	GibcoBRL

Material und Methoden

2.1.8.2 Materialien für SDS Page und Western Blot

ECL Western blotting detection reagents	Amersham Biosciences, Freiburg
Gel-Dry™ Drying Solution	Invitrogen, Karlsruhe
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)

2.1.8.3 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

2.1.8.4 Materialien für die Transformation in E.coli

LB-Agar (Formulierung nach Miller)	Difco/BD Biosciences
LB-Medium (Formulierung nach Miller)	1 % Trypton, 1 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt (Invitrogen)
SOC-Medium	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 8,6 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose (Gibco-BRL)

2.1.8.5 Reagenssysteme (Kits)

Gelextraktion	QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
PCR-Aufreinigung	QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen

Material und Methoden

Plasmid-Präparation	QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
	Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Sequenzierreaktionen	BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems

2.1.9 Medien

2.1.9.1 Zellkulturmedien

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

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

Kulturmedium	RPMI Komplettmedium: RPMI 1640, 10% (v/v) FCS, 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat DMEM Komplettmedium: DMEM, 10% (v/v) FCS, 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 mM HEPES, 1x nicht-essenziellen Aminosäuren (MEM)
Einfrier-Medium Zusätze	in 1640 RPMI (Gibco BRL) + 20 % FCS + 10 % Dimethylsulfoxid DMSO Gentamycin, 50 mg/ml (Gibco BRL), Geneticin, 50 mg / ml (Gibco BRL)

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

2.1.9.2 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, 154 mM (Braun).

2.1.10 Puffer und Lösungen

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

PBS	2,67 mM Kaliumchlorid, 1,47 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 138 mM, Natriumchlorid, 8 mM Di-Natriumhydrogenphosphat
Lysispuffer	1 % TritonX100, 1mM AEBSF, 1mM ADP-Ribose, 1mM NAD, 2mM EDTA in PBS
NaCl-Puffer	140 mM Natriumchlorid, 5 mM Kaliumchlorid, 10 mM Glucose, 10 mM HEPES

2.1.10.1 Gey's Puffer zur Erythrozytenlyse:

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

Lösung A	35g Ammoniumchlorid, 1,85g Kaliumchlorid, 1,5g Dinatriumhydrogenphosphat, 0,119g Kaliumdihydrogenphosphat, 5g Glukose, 0,05g Phenolrot ad 1l H ₂ O
Lösung B	0,42g Magnesiumchlorid, 0,14g Magnesiumsulfat, 0,34g Calciumchlorid ad 100ml H ₂ O
Lösung C	2,25g Natriumhydrogencarbonat ad 100ml H ₂ O
Lösung D	H ₂ O

2.1.10.2 Lösungen für SDS-PAGE und Western blot

Antikörperpuffer	10 % Ziegenserum , 20 % Tween 20 in 1xTBS
Blockpuffer	10 % Ziegenserum oder 1% Milchpulver in 1xTBS
Blotpuffer	10 % Methanol, 0,1 % Antioxidans, 1x Transferpuffer
MES Laufpuffer	50mM MES, 50mM TRIS-Base, 3,5 mM Natriumdodecylsulfat (SDS), 1 mM EDTA, pH 7,3
MOPS-Laufpuffer	50mM MOPS, 50mM TRIS-Base, 3,5 mM Natriumdodecylsulfat (SDS), 1 mM EDTA, pH 7,3
TBS	8g Natriumchlorid, 0.2g Kaliumchlorid, 3g TrisBase, pH 7.4
Transferpuffer (1x)	3.027g TrisBase, 14.4g Glycin, pH8.3, 20 % Methanol
Waschpuffer	0,5 % Tween-20 in 1xTBS
Silberlösung	20 % AgNO ₃ , 40 % Na Citrat, 20 % FeSO ₄ in 1xTBS

Material und Methoden

2.1.10.3 Lösungen für Immunfluoreszenzanfärbungen

Fixierungslösung	für intrazelluläre Anfärbung: 4% Paraformaldehyd in 1x PBS für vitale Anfärbung: 2% Paraformaldehyd in 1x PBS
Blockierlösung	2 % BSA, 3 % Ziegenserum, 0,5 % Igepal in 1x PBS
Antikörperlösung	3% Ziegenserum, 0,1 % Igepal in 1x PBS
Waschlösung	0,1 % Triton X-100 in PBS
Hoechst 33342	10 µg/ml Hoechst 33342 in PBS

2.1.10.4 Lösungen für Isolierung von Plasmid-DNA

Puffer P1	50 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
Puffer P2	200 mM NaOH, 1% SDS
Puffer P3	3 M K-Acetat pH 5.5
Waschpuffer PB	
Waschpuffer PE	
Elutionspuffer EB	10 mM Tris-HCl

2.1.10.5 Lösungen für Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Puffer QG	
Waschpuffer PE	
Elutionspuffer EB	10 mM Tris-HCl

2.1.10.6 Lösungen für enzymatische Untersuchungen

DC-Laufpuffer 1	1 M Essigsäure
DC-Laufpuffer 2	300 mM LiCl in 0,9 M Essigsäure
PNPP Substratpuffer	PBS

2.1.11 Reagenssysteme (Kits)

Gelextraktion	QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
PCR-Aufreinigung	QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Plasmid-Präparation	QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
	Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Sequenzierreaktionen	BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems

2.1.12 ENPP-, ENTPD- und ART2 Substrate

Für die nähere Charakterisierung der Enzymaktivitäten der ENPPs wurden bekannte, klassische Substrate der Phosphodiesterasen eingesetzt. Als Substrate für die ART2-vermittelte ADP-Ribosylierung wurden NAD und das NAD-Analogon 6'-N-etheno-NAD in den jeweils angegebenen Konzentrationen verwendet. ATP, sowie andere Nucleotiddi- und monophosphate gelten als Substrate für die ENTPDs. In der **Abb. 12** sind die Strukturformeln dieser Moleküle dargestellt.

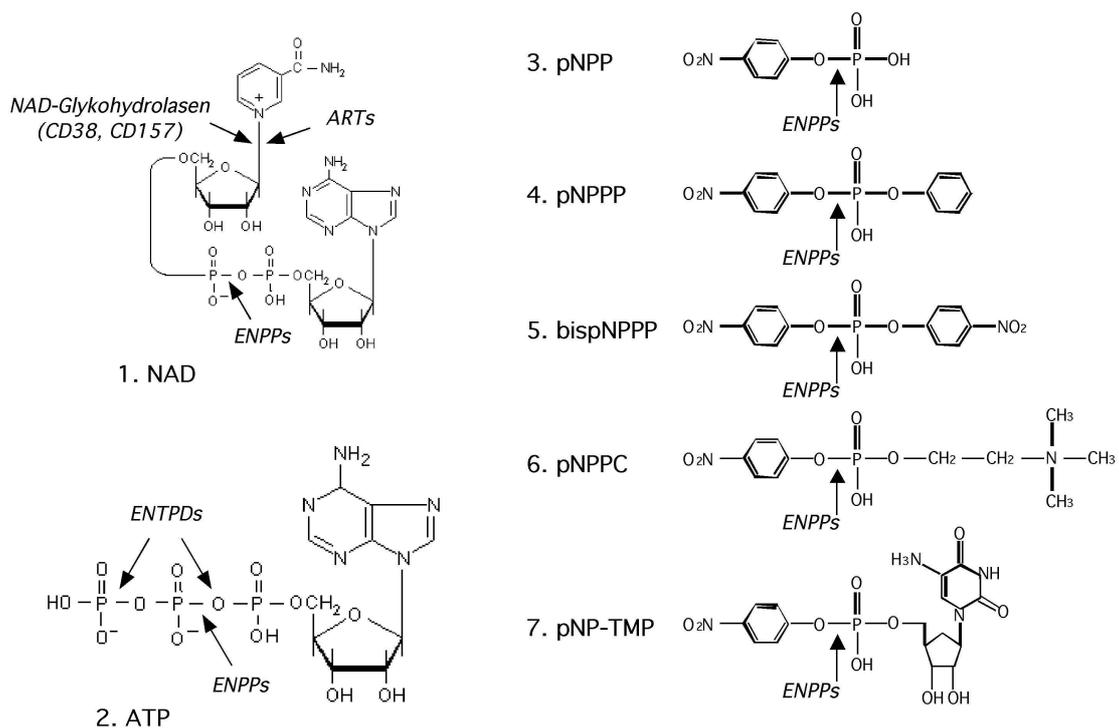


Abb. 12: Strukturformeln von NAD, ATP und klassischen Phosphodiesterase Substraten mit Angabe möglicher Spaltstellen durch Ektoenzyme. Mögliche Spaltstellen von ATP und NAD durch NAD-Glykohydrolasen, ADP-Ribosyltransferasen (ARTs), Ekto-Nucleosidtriphosphatdiphosphohydrolasen (E-NTPDs) und Ekto-Nucleotidpyrophosphatasen/phosphodiesterasen (E-NPPs). Die Moleküle 3. – 7. sind klassische Substrate der Phosphodiesterasen (modifiziert nach Haag et al. 2007 und Sakagami et al. 2005).

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden der Zellbiologie

2.2.1.1 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Die Kryokonservierung dient der langfristigen Lagerung von Zellen. Ca. 10^6 Zellen wurden in 1 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden in einem Cooler (Stratagene) bei -80 °C langsam gefroren und nach mindestens 24 h bei -80 °C in flüssigen Stickstoff überführt.

Für Suspensionszellen verwendet man RPMI-Medium mit 20% fötalem Kälberserum und 10% DMSO, für adhärent wachsende Zellen Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM). Dabei verhindert Dimethylsulfoxid die schnelle Bildung von Eiskristallen in der Zelle und damit deren Untergang. Da DMSO toxisch auf die Zellen wirkt, sollte das Einfrieren in direktem Anschluss an die Zugabe von DMSO erfolgen. Bei Bedarf können die Zellen jederzeit wieder aufgetaut und kultiviert werden. Hierfür wärmt man 1ml kryokonservierte Zellsuspension in der Hand an, anschliessend bei 37 °C 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 oder Geneticin können nach ca. 24 Stunden zugegeben werden.

2.2.1.2 Kultur von adhärennten Zellen

Bei der Zellkultur unterscheidet man zwischen der Kultivierung von adhärennt und nicht adhärennt wachsenden Zellen. Beide Arten von Zellen bedürfen unterschiedlicher Behandlung, die ihren Wachstumseigenschaften und Bedürfnissen gerecht werden.

Adhärennte eukaryotische Zellen wurden in DMEM Komplettmedium in T25 oder T75 Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5% CO_2 in einem Brutschrank kultiviert. Abhängig vom Wachstum wurden die Zellen alle 2 bis 3 Tage umgesetzt. Dazu wurde das alte Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS^{++} gewaschen, um FCS Rückstände zu entfernen und durch Zugabe von TrypLETM Express und kurze Inkubation bei Raumtemperatur (RT) abgelöst. Das TrypLETM Express wurde durch Medienzugabe inaktiviert, die Zellen in 15ml Falcon Tubes überführt und bei 4 °C und 4600 RPM 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung in einem Volumen von 5ml oder 10ml ausplattiert und weiterkultiviert.

2.2.1.3 Kultur von Suspensionszellen

Eukaryotische Suspensionszellen wurden in RPMI Kompletmedium in 10-cm-Petrischalen bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Abhängig von der Wachstumsrate und Vitalität der Zellen wurden sie alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:5, 1:10 oder 1:20 umgesetzt. Zur Teilung der Zellen im Verhältnis 1:10 in einer 10cm Petrischale überführte man nach guter Vermischung 1ml der Zellsuspension auf eine frische Petrischale mit 9ml RPMI Vollmedium.

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Waschschrirte bei 4°C und 4600 RPM für 5 min durchgeführt.

2.2.1.4 Präparation muriner Milzzellen

8 bis 12 Wochen alte Mäuse wurden mit einem Gasgemisch (30% O₂, 70% CO₂) betäubt und anschließend durch 100% CO₂ getötet. Die Milz wurde präpariert, entnommen und in eine 35-mm-Petrischale mit eiskaltem RPMI 1640 gegeben. Anschließend wurde die Milz mit einer Pinzette zwischen zwei Nitex-Membranen zerdrückt, wodurch die Zellen freigesetzt wurden. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem RPMI 1640 wurden die Zellen in Gey's Puffer (25 ml pro Milz) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Die Zellen wurden erneut zweimal mit RPMI 1640 gewaschen und nach Bestimmung der Zellzahl für Versuche eingesetzt.

2.2.1.5 Transiente Transfektion von 293HEK-T Zellen und CHO.it Zellen

Für transiente Transfektionen mit eGFP-Expressionsplasmiden wurde jetPEI (Polyplus) eingesetzt. Bei den CHO- und HEK-Zellen handelt es sich um adhärenr wachsende Zellen. Pro Transfektion einer T25-Flasche mit ungefähr 2×10^6 Zellen werden je 5µg Plasmid-DNA des zu transfizierenden Proteins und 10µl JetPEI-Reagenz eingesetzt. Die zusätzliche Verwendung von 0,5µg Plasmid-DNA des für eGFP kodierenden Konstrukts dient der optischen Positivkontrolle. 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

Material und Methoden

und für 30 Minuten bei RT inkubiert (**Abb. 13**). In der Zwischenzeit wird das Medium in den Zellkulturflaschen gewechselt und anschließend die JetPEI-DNA-Lösung zu den Zellen in den T25-Flaschen gegeben.

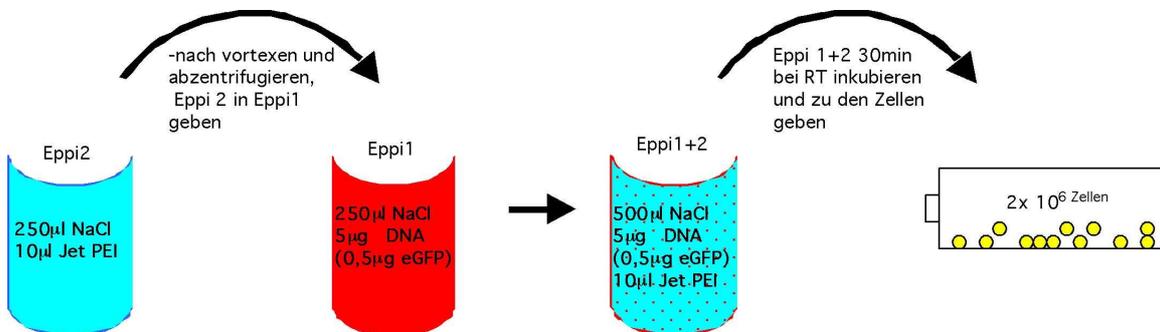


Abb. 13: Schema der JetPEI Transfektion. Diese Methode wird zur transienten Transfektion von Zellen verwendet.

2.2.1.6 Stimulation von Milzzellen

Primäre murine Milzzellen wurden 20 Stunden vor Beginn des Versuches mit Concanavalin A (ConA) 5mg/ml vorstimuliert. Nach Präparation der Milzzellen wurden diese in 10ml RPMI mit FCS und 10µl Gentamycin in 10-cm-Petrischalen kultiviert und mit Concanavalin A für 20 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Vor der Verwendung der Zellen für die jeweiligen Versuche wurden diese dreimal mit RPMI 1640 gewaschen.

2.2.2 Methoden der Immunologie

2.2.2.1 „Fluoreszenz Activated Cell Sorting“ FACS

Die so genannte Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse von mikroskopisch kleinen Partikeln. So können Zellen anhand ihrer Größe, Struktur und Oberflächeneigenschaften charakterisiert werden. Die in Lösung befindlichen Zellen werden durch eine Kapillare gedrückt und durch eine Trägerflüssigkeit in einen laminaren Strom überführt. Die in dem Probenstrom hinterinander liegenden Zellen werden in der Messküvette von einem Laserstrahl definierter Wellenlänge erfasst. Photodetektoren messen die Lichtstreuung, die ein Maß für die Größe und Granularität der Zelle darstellt. So wird die Messung der Vorwärtsstreuung als Forwardscatter (FSC) bezeichnet und gibt Auskunft über die Größe der Zelle. Das im Winkel von 90° zur Seite abgelenkte Licht wird durch den Sidescatter (SSC) gemessen. Bei einer sehr

heterogenen Zelloberfläche nimmt dieser Wert zu und gibt damit Auskunft über die Granularität einer Zelle.

Desweiteren kann durch die Durchflusszytometrie die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf unterschiedlichen Zellpopulationen durch Fluorochromgekoppelte Antikörper untersucht werden. Diese Fluorochrome absorbieren das monochrome Laserlicht und emittieren es in einem anderen Wellenbereich. Der Nachweis erfolgte entweder mit direkt an ein Fluochrom gekoppelten Antikörper oder ungekoppelten Antikörpern, die durch einen sekundären, Fluochrom-konjugierten Antikörper nachgewiesen wurden. Es kann hierbei sowohl die relative Expression auf der einzelnen Zelle als auch der Anteil exprimierender Zellen in einer Population bestimmt werden. Die Intensität der detektierten Fluoreszenz in den jeweiligen Kanälen entspricht der Expressionsstärke des durch den Fluorochrom-gekoppelten Antikörper angefärbten Moleküls auf der Zelle bzw. Stärke der Anfärbung mit fluoreszierenden Molekülen. Es wurden in dieser Arbeit die Fluorochrome Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Alexa 488 (gAlexa), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), Alexa Fluor 647 und Propidiumjodid (PI) verwendet.

2.2.2.2 FACS-Analyse an transient transfizierten HEK-T Zellen und an primären Zelllinien

Die Zellen wurden für jede FACS-Analyse auf 10^7 Zellen pro 0,5ml in PBS⁺⁺ resuspendiert und pro Anfärbung 50 μ l Zellsuspension (10^6 Zellen) eingesetzt. Die in dieser Arbeit zu untersuchenden polyklonalen Immunsereen werden in einer Verdünnung von 1:800 in PBS⁻ eingesetzt. Die entsprechenden Präimmunsereen (PIS) dienen als Negativkontrolle und wurden 1:400 verdünnt. Die Inkubation der Zellen mit je 50 μ l Antikörperlösung erfolgte für 1 Stunde bei 4 °C, um durch einen niedrigen Zellstoffwechsel zusätzliche Interaktionen mit den Antikörpern zu verringern. Die Zellen wurden zweimal mit 1ml PBS⁻ durch Zentrifugation bei 4°C und 4600RPM für 5 min gewaschen. Zur Markierung des Erstantikörpers wird ein PE-/FITC/oder APC-konjugierter Zweitantikörper eingesetzt, der den Erstantikörper erkennt und bindet (**Abb. 14**). Dieser wird 1:50 vorverdünnt und auf die Zellen gegeben, wo er in einer Verdünnung von 1:100 für 1 Stunde im Dunkeln bei 4°C mit dem Erstantikörper reagiert. Nach der Inkubation wird auch der ungebundene Zweitantikörper zweimal herausgewaschen. Ist der Erstantikörper bereits Fluochrom-konjugiert, wird kein Zweitantikörper zur Markierung benötigt und die Messung am Durchflusszytometer

kann direkt erfolgen. Vor dem Messen wurden 10 µg/ml Propidiumjodid zugegeben. Dieser DNA-bindende Farbstoff tritt in apoptotische Zellen ein und erlaubt es, lebende von toten Zellen zu unterscheiden. Für die Messungen und die anschließenden Auswertungen wurden das FACSCalibur mit der CellQuest Software von Becton, Dickinson and Company, Heidelberg verwendet.

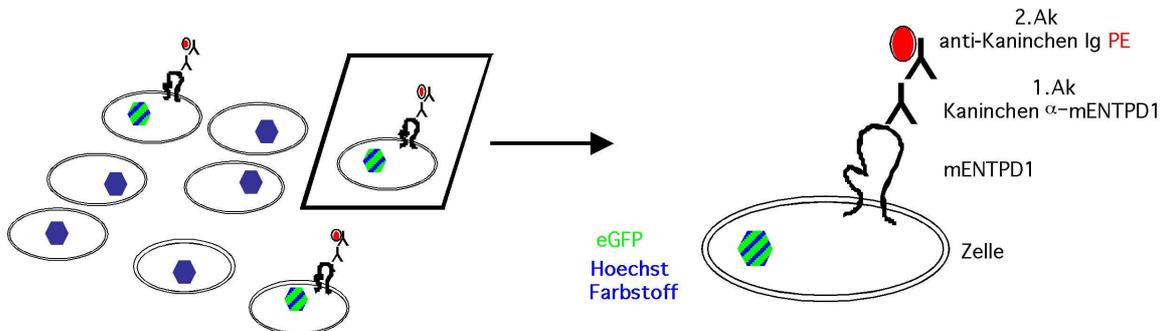


Abb. 14: Vitalzellfärbung für die Immunfluoreszenz und für die Durchflusszytometrie. Für die Immunfluoreszenz werden einfach oder mit eGFP doppelt transfizierte Zellen 20 Stunden nach der Transfektion fixiert und z. B. mit dem Kaninchen anti-mENTPD1-Antikörper inkubiert, der sein Targetprotein an der 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 Zellkerne blau gegengefärbt, unabhängig davon, ob sie transfiziert sind oder nicht. Für die Durchflusszytometrie werden Proteine auf der Zelloberfläche farblich markiert. Der Erstantikörper ist z.B. gegen mENTPD1 gerichtet. Ein PE-konjugierter Zweitantikörper erkennt den Erstantikörper und ermöglicht die Messung mit dem FACS-Gerät.

2.2.2.3 Nachweis von Marker- und Aktivierungsantigenen mittels FACS

Die Zellen werden auf ihre Expression der Markerantigene B220, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD25, CD38, CD62L, CD69, mP2X7 und mENTPD1 untersucht. Vor der Anfärbung der Zellen mit Antikörpern gegen diese Markerantigenen wurde die Zellsuspension (1ml) für 20 min bei RT mit 5µl Fc-Block (anti CD16/CD56) versetzt. Anschließend werden die Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 bzw. PIS und CR44 anti mENTPD1 in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es werden sowohl Zweifach- als auch Dreifach- Färbungen mit FITC-, Alexa-488, APC- oder PE-konjugierten mono- oder polyklonalen Antikörpern durchgeführt.

2.2.2.4 Vitalzellfärbung für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Sechs Stunden nach der transienten Transfektion der CHO Zellen mit Expressionskonstrukten für ENTPD oder ENPP und der Kotransfektion mit GFP wurden die Zellen trypsinisiert und in 96-well-Mikrotiterplatten oder Culture Slides ausplattiert. Geht man nach dem „Fast Protokoll“ vor, werden die Zellen direkt vor Transfektion trypsinisiert und zusammen mit dem DNA-JetPEI-Gemisch wie oben beschrieben ausplattiert. Es werden etwa 2×10^6 Zellen in 4ml DMEM-Medium resuspendiert und je 150 μ l (ca. $7,5 \times 10^4$ Zellen) in jeden Napf der 96-well- Platte, bzw. je 300 μ l (ca. 15×10^4 Zellen) in jeden Napf der Culture Slides überführt. Die Fixierung der Zellen erfolgt 20 Stunden nach der Transfektion mit 2% PFA für 10min bei Raumtemperatur.

Die zur Anfärbung verwendeten Erstantikörper sind die gegen mENTPD1 (CR44), m/hENTPD2 (CR45 / 5441), m/hENTPD5 (CR47 / 5446), mENTPD6 (CR46), hENPP2 (K2G, Kan32), mENPP4 (CR65), mENPP5 (CR66) und mENPP6 (CR67) gerichteten Immunsereen. Diese Erstantikörper werden in unterschiedlicher Verdünnung (geometrische Verdünnungsreihe von 1:125 bis 1:2000 in DMEM Medium) für 1 Stunde bei RT auf die Zellen gegeben. Nach Waschung mit DMEM Medium erfolgt die Inkubation mit dem Phycoerythrin (PE) konjugierten Zweitantikörper (1:100) für 1 Stunde im Dunkeln bei RT. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Zur Anfärbung aller auch nicht transfizierten Zellen 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 in 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 Einzelfluoreszenzen wurden mit der Adobe Photoshop Software übereinander gelagert. Ein Schema dieser Färbung zeigt **Abb. 14**.

2.2.2.5 Intrazellulärfärbung für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Im Folgenden werden die Unterschiede der intrazellulären Färbung im Gegensatz zur vitalen Zellfärbung dargestellt. Die Fixation der Zellen erfolgt mit 4%PFA/PBS. Anschließend müssen die Zellen mit der Blockierlösung für 30-60min inkubiert werden. Im Unterschied zur vitalen Färbung werden der 1. und der 2. Antikörper in einer Antikörperlösung verdünnt und nicht in PBS⁺⁺. Ohne Waschen der Platte wird der erste Antikörper in seinen unterschiedlichen Verdünnungen (geometrische Verdünnungsreihe) hinzugefügt. Nach 1-3h Inkubation bei RT wird die Platte zuerst zweimal mit high salt PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend mit PBS⁺⁺. Der weitere Ablauf gleicht dem der vitalen Färbung.

2.2.3 Methoden der Proteinbiochemie

2.2.3.1 Herstellung von Zelllysat mit 1% TritonX100

Etwa 1×10^7 Zellen werden einen Tag nach transienter Transfektion vorsichtig mit 5ml 37°C vorgewärmtem PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend durch kräftiges Spülen mit 5ml 4°C gekühltem PBS⁻ in ein Falcon-Röhrchen überführt. Es folgt die fünfminütige Zentrifugation bei 4°C und 4600 RPM zur Bildung eines Zellpellets. Zur Kontrolle der erfolgreichen Transfektion wird 1/4 der Zellen zur Messung am FACS-Gerät verwendet. Die restlichen Zellen werden für die Zelllyse in ein Eppendorfgefäß gegeben und durch erneute Zentrifugation für 3 min bei 2.800 RPM ein trockenes Pellet hergestellt. Zur Lyse werden die Zellen mit je 150 µl Lysispuffer (1% TritonX 100 + 1mM AEBSF in PBS⁺⁺) 30 min auf Eis inkubiert. Die nicht lysierten Zellbestandteile werden anschließend erst 3 Minuten bei 2.800 RPM und der Zellüberstand erneut 3 Minuten bei 13.000 RPM abzentrifugiert. Die so gewonnenen Lysate wurden entweder direkt für eine Untersuchung verwendet oder bei -20°C eingefroren.

2.2.3.2 Herstellung von Zelllysat mit Ultraschall

Im Folgenden werden die Unterschiede zur Zelllyseherstellung mit TritonX 100 dargestellt. Zur Lyse werden die Zellen in je 500µl Lysispuffer (1% SDS in PBS⁻ + 1mM AEBSF) 20 min bei RT inkubiert. Anschließend werden diese zweimal für jeweils 10-15 sec mit Ultraschall behandelt und auf Eis gestellt. Es erfolgt die Abzentrifugation

Material und Methoden

bei 13.00 RPM für 3 min. Die so gewonnenen Lysate wurden entweder direkt für eine Untersuchung verwendet oder bei -20°C eingefroren.

2.2.3.3 Einengung des Zellüberstandes

Einen Tag nach transienter Transfektion der Zellen wird das alte Medium mit neuem 1% FCS DMEM Medium ersetzt und die Zellen für weitere 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Anschließend wird der Zellüberstand abgenommen und von 5ml auf 500µl reduziert. Dies erfolgt durch das Abzentrifugieren des Überstandes für 5min bei 3.600 RPM durch einen Amicon Ultra-4 Filter. Der so gewonnene Zellüberstand kann direkt für eine Untersuchung verwendet werden oder bei -20°C eingefroren werden.

2.2.3.4 Quantifizierung von Proteinen

Bevor die Zelllysate für Western Blot Analysen eingesetzt wurden, wurde ihr Proteingehalt mit dem BCA-Protein Assay Reagent (Pierce) colorimetrisch im Vergleich zu einer parallel angesetzten BSA-Verdünnungsreihe bekannter Konzentration quantifiziert.

2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe erfolgte mittels SDS-PAGE mit dem "NuPAGE Electrophoresis" System. Die Gele, bestehend aus einem Trenn- und einem Sammelgel, wurden käuflich erworben. Zum Einsatz kamen 10%ige Bis-Tris Gele von Invitrogen. Vor dem Auftragen wurden die Proteine entweder unter denaturierenden/reduzierenden Bedingungen (LDS-Ladepuffer + 1 mM DTT) oder unter nicht reduzierenden Bedingungen (ohne das Reduktionsmittel DTT) für 10 min bei 70 °C erhitzt. Abhängig von den zu untersuchenden Proteingrößen wird der MES- oder MOPS-Laufpuffer (mit oder ohne DTT) verwendet. Zur Größenbestimmung wurden 5 µl eines Protein-Markers (Multi-Mark[®] oder NOVEX[®] Sharp) eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte mittels Gelelektrophorese bei 200 V und 100mA für ca. 30 min. 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

Material und Methoden

(Kathoden-Seite) gelegt. Die Proteine werden erst 1 Minute auf die NC- und dann 90 Minuten auf die PVDF-Membran bei 30V transferiert.

2.2.4.1 Silberfärbung

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

2.2.4.2 Immundetektion

Die Immundetektion der untersuchten Proteine erfolgt auf einer PVDF-Membran, die zuerst für 20 Minuten mit 5ml 5% Ziegen Serum in TBS bei RT geblockt wird. Anschließend wird die Membran mit dem entsprechenden Immuns Serum für eine Stunde bei 4 °C (rotierend) inkubiert. Die Immunsereen werden in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper Ziege-anti-Maus-IgG-Meerrettich-Peroxidase (HRP) (1:5000) erfolgt für eine weitere Stunde rotierend bei 4°C. Nach jeder Antikörperinkubation folgen drei einminütige und zwei zehnminütige Waschstufen mit je 5ml Waschpuffer. Danach wird die Chemilumineszenz-Reaktion mit dem "ECL Western blotting detection reagent" durchgeführt. Hierfür wird die Membran mit einer Plastikfolie bedeckt, ein Hyperfilm ECL (Roche) für wenige Sekunden bis mehrere Minuten in einer Röntgenkassette aufgelegt und entwickelt.

2.2.5 Methoden der Molekularbiologie

2.2.5.1 Transformation von Bakterien

Für die Transformation von Vektoren mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ wurden superkompetente XL10Gold-Zellen (Stratagene) verwendet. Diese chemisch kompetenten Bakterien wurden nach Herstellerangaben durch ein Hitzeschock-Verfahren transformiert. Nach dem Auftauen der Zellen auf Eis wurden je 70µl Zellen mit 2,4µl β-Mercaptoethanol-Mix für 10 min auf Eis inkubiert, um die Transformationseffizienz zu steigern. Anschließend werden 2µl DNA aus den Ligationsansätzen zu den Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock, der im Wasserbad bei 42°C für 30 Sekunden durchgeführt wird, verursacht eine Porenbildung in der Bakterienhülle, durch welche die Plasmid DNA

eindringen kann. Anschließend werden die Zellen für 2 min auf Eis gelagert, was zur Senkung der Membranfluidität führt und die entstandenen Poren somit länger bestehen bleiben. Im Anschluss wurden die Zellen mit 450µl 42°C warmes SOC-Medium für 1 Stunde bei 37°C in einem Schüttelinkubator (230Upm) inkubiert und anschließend auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.5.2 Kryokonservierung von transformierten Bakterien

Werden transformierte Bakterien in einem glycerolhaltigen Medium bei -80 °C eingefroren, können diese konserviert werden. Um eine mögliche Selektion auf schlechte Expression zu vermeiden, wurden hierfür BL21 (DE3)-Expressionsstämme ausschließlich in nichtinduzierendem laktosefreiem MDG-Medium kultiviert. Eine einzelne Kolonie der Retransformation wurde mit 5 ml MDG-Medium mit 100 µg/ml Kanamycin inokuliert und bis zur beginnenden Trübung bei 37 °C und 250 Upm inkubiert. Anschließend wurden 700 µl der Bakteriensuspension mit 300 µl sterilem 50 % (w/v) Glycerol versetzt, gemischt und in einem Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Kryoröhrchen wurde anschließend in eine -80 °C Tiefkühltruhe überführt.

2.2.5.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist ein etabliertes *in vitro*-Verfahren zur Amplifikation von DNA-Segmenten, durch das unbekanntes DNA-Templates allein über die Kenntnis der flankierenden Sequenz amplifiziert werden können. Für die Klonierungen wurden Primer eingesetzt, die 5' von einer ausreichend spezifischen DNA-Sequenz eine Erkennungsstelle für zwei verschiedene Restriktionsendonukleasen trugen. Eine temperaturstabile DNA-Polymerase verlängert die Primer und durch Wiederholen der Denaturierungs- und Polymerationszyklen mit Erwärmen und Abkühlen des Reaktionsgemisches wird 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 thermostabile DNA-Polymerase hält hohen Denaturierungstemperaturen mit ausreichend langer Halbwertszeit stand und ermöglicht so die Durchführung der PCR ohne den Einsatz eines hitzeinaktivierten Enzyms. Um Mutationen während der Amplifikation zu

Material und Methoden

minimieren, wurde die *PfuUltra DNA-Polymerase* aus *Pyrococcus furiosus* von Stratagene benutzt, weil diese DNA-Polymerase die Fähigkeit besitzt, Fehler durch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität zu korrigieren. Nach der Polymerase-Ketten-Reaktion und der Aufreinigung des Amplifikats konnten die Amplifikate mit den beiden Restriktionsendonukleasen inkubiert und nach erneuter Aufreinigung über ihre kompatiblen Enden in entsprechend geschnittene Plasmide kloniert werden.

Die PCR-Ansätze für Klonierungen in pCMV-SPORT6, pEGFP-N1, pBluescript und p38tm.hENPP2 wurden folgendermaßen angesetzt (**Tab. 3 und Tab. 4**):

Tab. 3: Zusammensetzung der Klonierungs-PCR-Ansätze.

Bestandteil	Volumen (50µl)	Bemerkung
H2O demineralisiert	31,5 µl	
(5x) Phusion HF Puffer	10 µl	
10mM dNTP-Mix	1 µl	je 200 µM Endkonzentration
Vorwärtsprimer	2,5 µl	0,5 µM Endkonzentration
Rückwärtsprimer	2,5 µl	0,5 µM Endkonzentration
Phusion DNA Polymerase	1 µl	0,02 U/µl
Matrizen-DNA	1,5 µl	der auf ca. 1 ng/µl verdünnten Plasmid-Lösung

Tab. 4: PCR-Programm für die Amplifikation zu klonierender DNA-Fragmente.

Zyklusstufe	Temperatur	Dauer	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1x
Denaturierung	98 °C	10 s	} 30x
Annealing	60 °C	30 s	
Extension	72 °C	60 s	
Final Extension	72 °C	5 min	1x
	4 °C	halten	1x

2.2.5.4 Isolierung von Plasmid DNA

Plasmid-DNA wurde je nach erwarteter DNA-Ausbeute mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (für DNA-Mengen bis 20 µg) oder dem „Qiagen Endofree Plasmid Maxiprep Kit“ aus transformierten *E.Coli* Bakterien gewonnen. Die Durchführung erfolgte wie in den Gebrauchsanweisungen beschrieben. Im Prinzip erfolgt bei der Präparation eine alkalische Lyse der Bakterien mit anschließender Fällung von Proteinen und proteinassoziiertes genomischer DNA. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wird in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen selektiv an eine Silikatmembran gebunden. Nach zwei Waschschrinen wird die DNA von der Membran mit 50µl Wasser eluiert.

Material und Methoden

Für die Mini-Präparation von Plasmid DNA wird jeweils eine Einzelkolonie des Transformationsansatzes von der Agarplatte gepickt und in 5 ml LB-Medium plus des entsprechenden Antibiotikums über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert.

Zur Herstellung von größerer Mengen Plasmid DNA dient die Maxipräparation. Dafür werden die gepickten Bakterienklone für 8 Stunden in 4ml LB-Medium plus Antibiotikum im Schüttelinkubator bei 37 °C vorkultiviert. Anschließend wird diese Vorkultur in 150 ml LB-Medium plus Antibiotikum als Übernachtskultur in einem 500 ml Erlenmeyerkolben im Schüttelinkubator bei 220 Upm und 37 °C angelegt. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt am nächsten Morgen. Im Gegensatz zur Mini-Präparation wird 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 aufgenommen. Die DNA-Konzentration der Maxipräparation kann dann mittels UV-Photometrie gemessen werden.

2.2.5.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Da Nukleinsäuren ultraviolette Strahlung absorbieren, kann ihre Konzentration in Lösungen mittels UV-Photometrie bestimmen werden. Unter Einbezug des molaren Extinktionsfaktors misst man die Extinktion mit einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dieses Verfahren ist für die DNA-Konzentrationsbestimmung allerdings nur einsetzbar, wenn RNA oder Nukleotide vernachlässigbar gering in der zu messenden Lösung enthalten sind. Jeweils 100µl der verdünnten Plasmidlösungen (1:100) werden zur Konzentrationsbestimmung in einer Quarzküvette eingesetzt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors $V = 100$ und des Multiplikationsfaktors $F = 50$ für doppelsträngige DNA wird mit der Formel $c[\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} * V * F$ die Nukleinsäure-Konzentration der Lösung berechnet.

2.2.5.6 Restriktionsverdau von DNA

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. Die zu schneidende DNA wurde mit einer oder zwei Restriktionsendonukleasen

Material und Methoden

(je 5 U/Ansatz) in einem Volumen von 20 µl unter Verwendung des vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffers für eine Stunde bei 25°C oder 37°C inkubiert. Falls zwei Restriktionsenzyme eingesetzt wurden, die ein unterschiedliches Temperaturoptimum aufwiesen, wurde die DNA sequentiell, in zwei Schritten verdaut, wobei nach jedem Verdau die DNA aufgereinigt wurde. Bei einem Verdau mit nur einem Restriktionsenzym wurde die DNA anschließend mit CIP (calf intestinal phosphatase) dephosphoryliert. CIP ist ein DNA-modifizierendes Enzym und verhindert eine Wiederausammenlagerung der DNA-Überstände, indem es das 5'-Phosphat von DNA-Molekülen entfernt. Dafür wurde die verdaute DNA in einem Volumen von 50µl mit der alkalischen Phosphatase und entsprechenden Dephospholyrationspuffer für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung bei 65°C für 10 min und danach für 10 min auf Eis. Zum Schluss wurde die DNA mit 10µl Strata Clean Resin behandelt und viermal abzentrifugiert.

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.

2.2.5.7 DNA Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Hierfür wurde 1g Agarose in 100ml TRIS-Acetat-EDTA (TAE-) Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und nach kurzem Abkühlen mit 10µl Ethidiumbromid (1mg/ml) versetzt. Die Agaroselösung wurde in einen Gelträger mit Gelkamm gegossen und gelierte bei der Abkühlung. Das Gel wurde in eine Laufkammer überführt, die so mit TAE-Puffer gefüllt war, dass das Gel vollständig bedeckt war. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 1/6 Volumen Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 bis 100 V. Nukleinsäurebanden wurden nach der Elektrophorese durch UV-Strahlung sichtbar gemacht und mit Hilfe einer digitalen Kamera dokumentiert. Zur Größenbestimmung wurde die GeneRulerTM 1kb DNA Ladder mit auf das Gel aufgetragen.

2.2.5.8 Aufreinigung von DNA Fragmenten

Um die DNA-Fragmente aus dem 1% Agarosegel aufzureinigen, wurden diese auf dem UV-Transilluminator ausgeschnitten und das „QIAquick Gel Extraktion Kits“ (Qiagen) verwendet. Die Agarose wird durch eine zehnmünütige Inkubation bei 50° C in einem Puffer, der eine hohe Konzentration eines chaotropen Salzes, Guanidiniumchlorid, enthält und durch die Erniedrigung des pH Wertes unter 7.5 aufgelöst. Dadurch bindet die DNA an eine SilikaGel-Matrix. Die Durchführung erfolgte wie in der Gebrauchsanweisung beschrieben und zum Schluss wurde die DNA durch Wasser, oder einen 10 mM Trispuffer pH 8.5 eluiert.

Alternativ wurden PCR-Reaktionen ohne vorherige Gelelektrophorese mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Auch hier erfolgte die Durchführung nach Herstellerangaben.

2.2.5.9 Ligation von DNA Fragmenten

Die T4-Ligase ist ein Enzym, das DNA-Fragmente unter ATP-Verbrauch kovalent zu einem kontinuierlichen DNA-Strang verknüpft. Hierfür müssen die Fragmente an ihrem 3'-Ende eine Phosphatgruppe aufweisen bzw. am 5'-Ende des anderen Stranges ein freie Hydroxygruppe. Diese Ligation von DNA-Fragmenten ist zur Grundlage der Gentechnik geworden, weil dadurch die künstliche Rekombination von DNA aus unterschiedlichen Organismen möglich ist.

Unter Verwendung des TA Cloning Kits (pCR II, pCR 2.1) von der Firma Invitrogen, je 1 µl Ligasepuffer (10x) und 1 µl T₄-Ligase der Firma New England Biolabs wird der Vektor und das geschnittene DNA-Fragment in einem Verhältnis von 3:1 in einem Volumen von 10 µl (in Wasser) ligiert. Die Reaktion wurde über Nacht bei 14° C durchgeführt. Zur Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne zu klonierendes DNA-Fragment religiert. Vom Ligationsansatz wurden 2 µl für die Transformation von XL-10 Gold Ultrakompetent Cells benutzt.

2.2.5.10 DNA Sequenzierung

Um die Basenfolge bestimmter DNA Moleküle zu ermitteln, wurde die Sequenzierung nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1980) durchgeführt. Das verwendete BigDye-Terminator Sequenzierungskit (BigDye, Applied Biosystems) enthielt Pufferkomponenten, Enzym, Desoxynukleotide und die vier mit unterschiedlichen

Material und Methoden

Fluorochromen markierten Terminatoren. Zur Sequenzierung wurden 0,6 – 1,0 µg Matrizen-DNA, 4 µl des BigDye-Reaktionsmixes und 2 µl des Sequenzierungsprimers in einem Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt.

Sequenzierprogramm: 1. 96° C, 40 sec
2. 50° C, 15 sec } 28 Zyklen
3. 60° C, 4 min
4. 4° C, halten

Anschließend wurde das Sequenzierprodukt mit 2 µl Natriumacetat (3M) und 50 µl 100%igem Ethanol gefällt und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Nach der Zentrifugation für 30min bei 4° C mit 13.000. RPM wird die im Pellet noch unrein enthaltene DNA erneut mit 180 µl 70%igen Ethanol gewaschen und für 10min bei RT mit 13.000 RPM pelletiert. Das Pellet wurde zuletzt unter dem Abzug getrocknet. Die Auswertung der Proben erfolgte dann im Servicelabor des Instituts für Zellbiochemie, UKE, Hamburg, mit Hilfe eines DNA-SequencingSystems (ABI 370A)

2.2.6 Aktivitätsuntersuchungen

2.2.6.1 Enzymaktivitäten der ENPPs

Um die Enzymaktivität der unterschiedlichen ENPPs zu untersuchen, wurden HEK.T-Zellen transient mit je 5µg DNA der Konstrukte HA.CD38tm.hENPP1, HA.CD38tmhENPP2, HA.CD38tm.rENPP3, sowie hENPP4, hENPP5 und hENPP6 im EGFP-N1 Vektor nach dem long protocol transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden 1×10^7 Zellen mit TritonX 100 lysiert und jeweils 10µl Zelllysate in die Näpfe der Mikrotiterplatte gegeben. Als Positivkontrolle wurde pro Napf 1µl der Phosphodiesterase aus Schlangengift verwendet und als Negativkontrolle wurden 10µl Zelllysate von untransfizierten HEK.T-Zellen, sowie 100µl Puffer (100mM Tris HCL) eingesetzt. Es erfolgte die Inkubation mit 2mM *p*-Nitrophenyl phosphat (pNPP), 2mM *p*-Nitrophenyl Thymidin 5` Monophosphat (pNP-TMP), 4mM *p*-Nitrophenyl phosphorylcholin (pNP-PC), 4mM *p*-Nitrophenyl phenylphosphat (pNPPP) und 4mM bis *p*-Nitrophenylphosphat (bis pNPP) in jeweils 100µl 100mM Tris HCL Puffer bei pH 8,9 für 2 Stunden bei 37°C. Die Produktion von *p*-Nitrophenyl wurde kinetisch analysiert durch die Messung der optischen Dichte bei 405nm alle 15 Minuten für 2 Stunden in einem Mikroplatten Reader.

2.2.6.2 NADase Aktivität in HEK.T-Zellen transient transfiziert mit hENPP2

HEK.T-Zellen wurden transient mit jeweils 5µg DNA der Konstrukte pcDNA3.1/hENPP2, P38tm/hENPP2 und d.n.lklf.eGFP nach dem long protocol transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen in RPMI pur gewaschen und 3×10^6 Zellen in 100 µl RPMI pur resuspendiert, wobei jeweils 1×10^6 Zellen zum Test verwendet werden. Als Positivkontrolle wurden 1µl Phosphodiesterase (PD; 1%) aus Schlangengift und 1µl NADase (0,5U) in 100µl RPMI pur eingesetzt. Die Inkubation erfolgte mit 1µM „kaltem“ NAD und 0,5µci ^{32}P NAD für 30min bei 37°C. Anschliessend wurden die Zellen für 5min bei 1000g abzentrifugiert und 10µl des Zellüberstandes auf TLC-Platten geladen. Die Dünnschichtchromatographie erfolgte für 5min in 1M Essigsäure und für etwa 20 bis 30min in 0,9M Essigsäure und 0,3M Lithiumchlorid. Danach wurden die Spots auf der TLC-Platte mittels Autoradiographie sichtbar gemacht.

2.2.6.3 Analyse der De-ADP-Ribosylierungsfähigkeit von ENPPs

CHO.NOD-Zellen wurden transient mit jeweils 5µg DNA der Konstrukte HA.CD38tm.hENPP1, HA.CD38tm.hENPP2, pcDNA3.1/hENPP2, P38tm/hENPP2, sowie hENPP4, hENPP5 und hENPP6 im peGFP-N1 Vektor und mENTPD1 als Negativkontrolle nach dem long protocol transfiziert. Einen Tag nach Transfektion wurden die Zellen (ca. 1×10^7 Zellen) gewaschen und in DMEM pur resuspendiert. 1/5 der Zellen wurden auf Eis gelagert und die restlichen Zellen wurden in 1ml DMEM pur mit 2µM eNAD für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit DMEM pur gewaschen und auf jeweils vier Facs-Röhrchen geteilt. Nach dem Waschen wurde die erste Charge Facs-Röhrchen auf Eis gestellt. Die anderen wurden jeweils für 30min, 60min und 120min bei 37°C weiter inkubiert und dann auf Eis gestellt. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit DMEM pur erfolgte die Anfärbung der Zellen mit Antikörpern für die anschließende Analyse in der Durchflusszytometrie. Tab. 5 zeigt die verwendeten Antikörper in ihren eingesetzten Verdünnungen.

Tab. 5: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper für den De-ADP-Ribosylierungsassay am FACS.

CHO.NOD transfiziert mit	1. Anfärbung	2.Anfärbung
CD.38tm.hENPP1	%	1G4g ALEXA 1:100
CD38tm.hENPP2	K2G 1:200	Anti-Rb PE 1:100 + 1G4g ALEXA 1:100
pcDNA3.1/hENPP2	K2G 1:200	Anti-Rb PE 1:100 + 1G4g ALEXA 1:100
P38tm/hENPP2	K2G 1:200	Anti-Rb PE 1:100 + 1G4g ALEXA 1:100
hENPP4 im pEGFP-N1	%	1G4g ALEXA 1:100
hENPP5 im pEGFP-N1	%	1G4g ALEXA 1:100
hENPP6 im pEGFP-N1	%	1G4g ALEXA 1:100
mENTPD1	CR44 1:800	Anti-Rb PE 1:100 + 1G4g ALEXA 1:100

3 Ergebnisse

Im Folgenden stelle ich die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen in vier Abschnitten dar.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird die Umklonierung von ENPPs in Expressionsvektoren und die Herstellung von HA.CD38.ENPP Transmembrankonstrukten beschrieben.

Der folgende zweite Teil dieser Arbeit widmet sich der Untersuchung und Charakterisierung der ADAPINC Antikörper, die, wie in der Einleitung beschrieben, von der Arbeitsgruppe dieses Instituts durch Gene-Gun-Immunisierung selbst hergestellt wurden. Die untersuchten Immunsereen sind gegen Mitglieder der ENTPD Familie (mENTPD1, mENTPD2, hENTPD2, mENTPD5, hENTPD5, mENTPD6) sowie gegen Mitglieder der ENPP Familie (hENPP2, mENPP4, mENPP5 und mENPP6) gerichtet. Eine Auflistung aller analysierten Antikörper zeigt Tab. 1. An transient transfizierten HEK- und CHO-Zellen erfolgte mit Hilfe von Immunfluoreszenz-, FACS- und Immunoblot-Analysen die nähere Charakterisierung der ADAPINCs. Dabei wurde die spezifische Reaktion und Kreuzreaktion des Immunsereums mit dem jeweiligen Ektoenzym im Vergleich mit dem Präimmunsereum geprüft und der optimale Titer ermittelt.

Der dritte Abschnitt der vorliegenden Arbeit zeigt die endogene Expression von Mitgliedern der ENTPD Familie auf etablierten Zelllinien und primären Milzzellen durch FACS- Untersuchungen.

Im vierten und letzten Teil wird mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie, Elisa und einem De-ADP-Ribosylierungsassay die katalytische Aktivität von hENPP2 und mENPP1, rENPP3 und mENPP4-6 näher untersucht. Dabei steht vor allem die Fragestellung im Vordergrund, ob ENPP2, oder eines der anderen ENPPs als Gegenspieler der ART fungiert, indem es NAD spaltet, oder ADP-ribosylierte Proteine de-ADP-ribosyliert.

3.1 Klonierung von Expressionskonstrukten

3.1.1 Herstellung von Expressionsvektoren

Da nicht alle vorhandenen Gene der in dieser Arbeit untersuchten Ektoenzyme bereits in Expressionsvektoren vorlagen, war es notwendig, diese entsprechend umzuklonieren, um eine genauere Analyse dieser Enzyme zu ermöglichen. Expressionsvektoren sind Klonierungsvektoren, die die Vervielfältigung eines inklonierten DNA-Fragmentes in beliebig großer Anzahl ermöglichen. Desweiteren erlauben diese Vektoren auch die Expression einer Protein-kodierenden DNA in prokaryotischen (z.B. *Escherichia coli*) oder eukaryotischen Zellen (z.B. Hefe und Insektenzellen). So wurden die Gene für die humanen ENPPs 1, 4, 5 und 6 vom Bluescript Vektor in den pEGFP-N1 Expressionsvektor umkloniert. **Abb. 15** zeigt den Ablauf der Umklonierung. Der Verdau von jeweils 5µg DNA von hENPP1, hENPP4 und hENPP5 erfolgte in einem 20µl Ansatz mit den Restriktionsenzymen SacI und KpnI im NEB1 Puffer in einer Verdünnung von 1:10 für eine Stunde bei 37°C. hENPP6 wurde mit EcoRI im EcoR I Puffer ebenfalls in einer Verdünnung von 1:10 für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Aufarbeitung des pEGFP-N1 Vektors erfolgte in gleicher Weise mit den jeweiligen Enzymen. Nachfolgend wurde der komplette Ansatz der jeweils verdauten DNA-Konstrukte auf ein Gel aufgetragen (1%iges Agarosegel aus 100ml 1x TAE-Puffer, 1g Agarose und 10µl Ethidiumbromid hergestellt) und aus diesem das gewünschte DNA Fragment, nachdem die DNA Banden voneinander abgrenzbar waren, mittels Qia quick Gel Extraction Kit extrahiert. Zur Größenbestimmung wurden 2µl des 1kb und 2µl des Markers 100bB DNA Ladder verwendet. Da hENPP6 sowie pEGFP-N1 mit nur einem Enzym, nämlich EcoRI verdaut worden sind, war es notwendig, eine Wiederausammenlagerung der DNA-Überstände zu verhindern. Deswegen wurde vor der Ligation von Insert und Vektor eine Dephosphorylierung durchgeführt. Um den richtigen Ansatz für die Ligation zu berechnen, wurde ein Kontrollgel mit je 5µl der aufgereinigten DNA gemacht. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 14 °C. Zur Kontrolle wurden je ein Ansatz ohne Zugabe des Vektors und ein Ansatz ohne DNA-Fragment ligiert. Im Anschluss erfolgte die Transformation mit je 2 µl ligierter DNA in XL-10 Gold Ultrakompetent *E. coli* Zellen (2.2.5.1) und die Ausplattierung auf LB-Kanamycin-Platten, auf denen über Nacht bei 37°C Klone wuchsen. Es wurden 4 oder 5 Klone gepickt und Minipräparationen (2.2.5.4) hergestellt. Nach dem Kontrollverdau der Minipräparationen und der DNA Sequenzierung der neuen Konstrukte mit CMV-F

Ergebnisse

Primern wurde eine Minipräparation zur Anfertigung einer Maxipräparation ausgewählt.

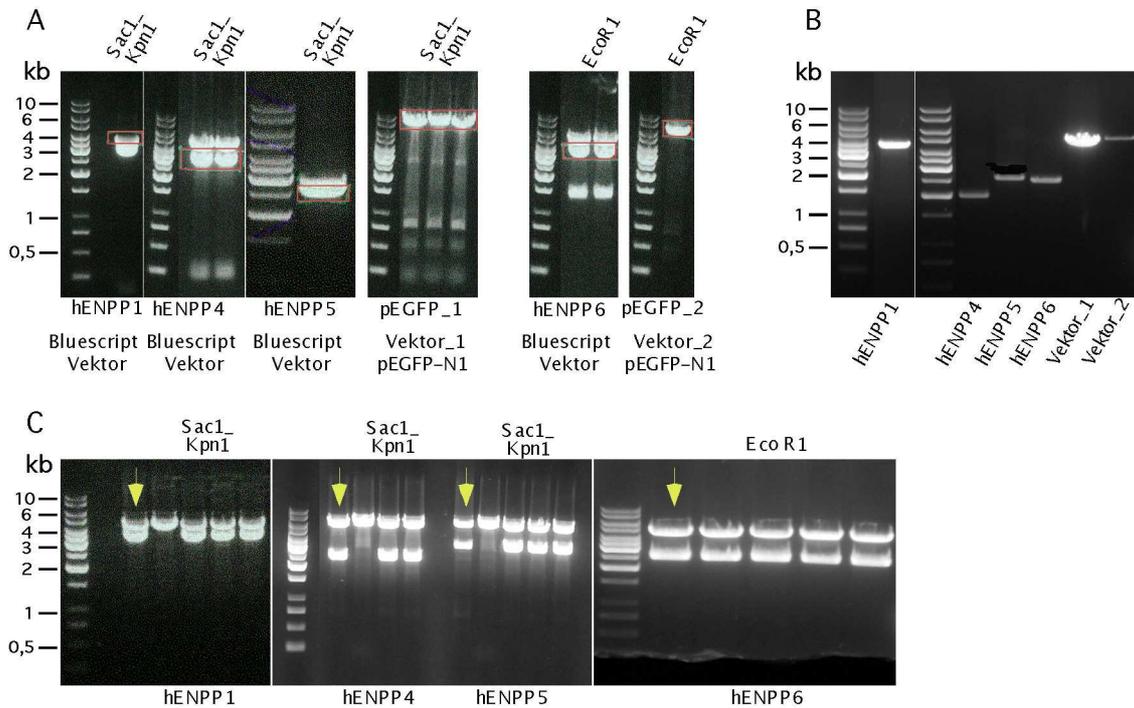


Abb. 15: Agarosegele der Umklonierung von ENPPs in EGFP-N1 Expressionsvektoren.

A: Enzymverdau mit Sac1 und Kpn1 bzw. EcoR1 für 1h bei 37°C von 5µg Plasmid DNA in 20µl Ansatz, anschliessend Gelelektrophorese und Ausschneiden von Vektor und Inserts (rote Kästen).

B: Aufreinigung von Vektor und Inserts mit dem Gel-Extraktionskit von QIAGEN, Testgel (5µl bzw. 10 µl) und „Berechnung“ des Ligationsansatzes für die Ligation über Nacht. Im Anschluss Transformation in XL-10 Gold Ultrakompetent Cells und Ausplattierung auf LB-Kan.-Platten, auf denen über Nacht bei 37°C Klone wachsen. Es wurden 4-5 Klone gepickt und Mini Preps hergestellt.

C: Kontrollverdau der Minis und Auswahl je einer Mini zur Herstellung einer Maxi (gelber Pfeil).

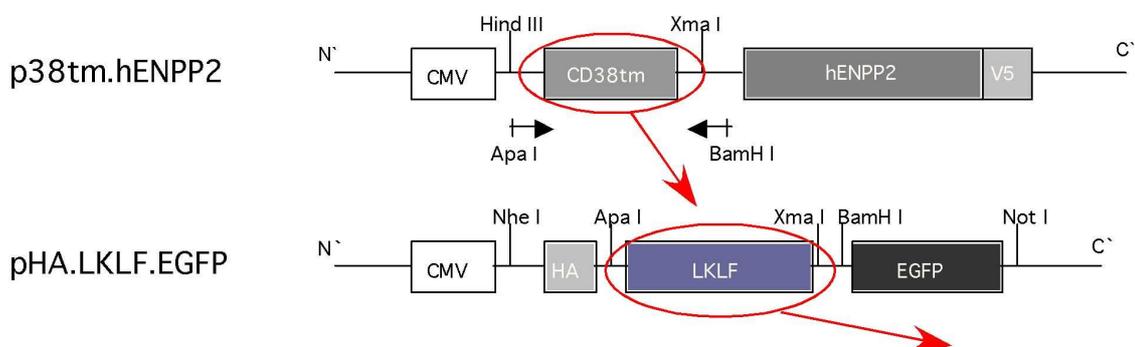
3.1.2 Herstellung von HA.CD38 Transmembran-konstrukten

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, sind ENPP1 und ENPP3 über eine N-terminale Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert und stellen somit Typ II Membranproteine dar. Von ENPP2 weiß man, dass es als Prä-Pro-Enzym von der Zelle sezerniert wird und im Gegensatz zu allen anderen ENPPs nicht in der Zellmembran verankert ist. Durch die lösliche Form von ENPP2 ist es schwieriger, dieses Enzym und seine Funktion bzw. Aktivität näher zu charakterisieren. Deswegen wurden humanes

Ergebnisse

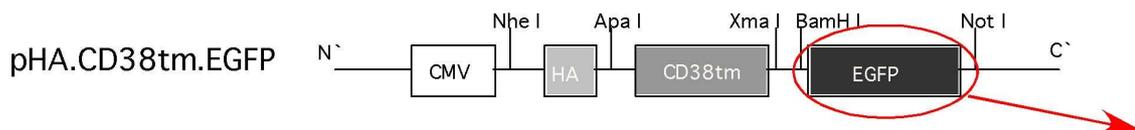
ENPP1, humanes ENPP2, murines ENPP2 und rENPP3 in einen Vektor mit einer definierten N-terminalen Transmembrandomäne und einem Epitoptag, den HA.CD38tm.EGFP-Vektor, umkloniert,. Durch diese Umklonierung sollten zwei Ziele erreicht werden: 1. eine Verankerung des ENPP2 in der Zellmembran durch den Einbau der CD38-Transmembrandomäne und 2. die Möglichkeit der genaueren Untersuchung der Enzymaktivität der ENPPs, z.B. dadurch, dass der eingebaute HA-tag eine Quantifizierung der ENPP-Menge im SDS-Page/Western Blot ermöglicht. **Abb. 16** zeigt die Klonierungsstrategie.

Ausgangsmaterial:



1. Amplifikation von CD38tm mit Primern, die Apa I und BamH I - Stellen inkorporieren
2. Ersetzen von LKLF in pHA.LKLF.EGFP durch CD38tm

Zwischenprodukt:



3. Ersetzen von EGFP in pHA.CD38tm.EGFP durch extrazelluläre Domäne der ENPPs

Endprodukt:

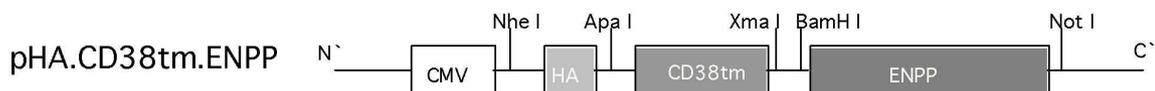


Abb. 16: Klonierungsstrategie zur Herstellung von HA.CD38 Transmembrankonstrukten.

Die Transmembrandomäne von CD38 wurde aus dem p38tm.hENPP2 Vektor mittels PCR (Phusion High Fidelity Polymerase Kit) amplifiziert und durch die verwendeten Primer wurden Apa I- und BamH I – Stellen für den anschliessenden Enzymverdau eingebaut. Nach dem Kontrollgel und der Aufreinigung des PCR-Produktes mittels Qiaquick Gel Extraction Kit wurde der Restriktionsverdau sequenziell in zwei Schritten

Ergebnisse

durchgeführt. Zum Ausschneiden der LKLF-Domäne wurden 10µl pHA.LKLF.EGFP Vektor in einem 20µl-Ansatz zum Restriktionsverdau mit Apa I und 3µl des entsprechenden NEB4- Puffers in einer 1:10 Verdünnung angesetzt. Nach dem Enzymverdau von 1 Stunde bei 25°C wurde die DNA mittels PCR Purification Kit aufgereinigt. Im zweiten Schritt wurde die gesamte DNA durch BamH I im BamH I-Puffer in einer 1:10 Verdünnung für 1 Stunde bei 37°C weiterverdaut. Die vorher amplifizierte CD38 Transmembrandomäne wurde nach selbigem Procedere verdaut. Anschließend wurde die verdaute CD38 Transmembrandomäne mittels QIA PCR Purification Kit aufgereinigt und der komplette verdaute Ansatz des pHA.LKLF.EGFP-Vektors auf ein Gel aufgetragen, aus dem die verdauten DNA Fragmente mittels Qiaquick Gel Extraction Kit extrahiert wurden. Anschließend erfolgte die Ligation, die Transformation mit je 2 µl ligierter DNA in XL-10 Gold Ultrakompetent Cells, die Ausplattierung auf LB-Kanamycin-Platten, die Herstellung von Minipräparationen und nach dem Kontrollverdau dieser die Anfertigung von Maxipräparationen.

Um zu zeigen, dass der pHA.CD38tm.EGFP-Vektor erfolgreich hergestellt wurde, erfolgte eine DNA-Sequenzierung mit dem CMV-Primer. Ausserdem zeigten HEK-T Zellen, die transient mit dem neuen Vektor transfiziert wurden, eine membranständige, extrazelluläre Expression von EGFP in der Immunfluoreszenzmikroskopie und in der FACS Analyse. Um die extrazelluläre Lokalisation des EGFP nachzuweisen, wurden im FACS als Erstanfärbung der unkonjugierte Anti-GFP Antikörper aus der Maus in einer Verdünnung von 1:400 und in der Zweitanfärbung der Anti-Maus PE-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt.

Der zweite Teil der Umklonierung zur Herstellung des CD38 Transmembrankonstruktes beinhaltete die Amplifikation und den Restriktionsverdau von hENPP1 im Blusecript Vektor, hENPP2 im p38tm.hENPP2 Vektor, mENPP2 im pCMV-Sport6 Vektor und rENPP3 im Vektor, sowie von pHA.CD38tm.EGFP. Die Amplifikation mittels Phusion High Fidelity DNA Polymerase Kit erfolgte bei hENPP1, hENPP2 und mENPP2 mit Primern, die Xma I und Not I Stellen inkorporierten. Da in der kodierenden Sequenz für rENPP3 allerdings eine Schnittstelle für Xma I vorlag, wurde rENPP3 mit Primern amplifiziert, die BamH I und Not I Stellen einbauten. Nach dem Kontrollgel und der Aufreinigung des PCR-Produktes mittels Qiaquick Gel Extraction Kit wurden die amplifizierten hENPP1-, hENPP2- und mENPP2- Konstrukte als erstes mit Xma I in NEB4 Puffer und nach erneuter Aufreinigung als zweites mit Not I in NEB3 Puffer für 1 Stunde bei 37°C verdaut. Der pHA.CD38tm.EGFP wurde auf die gleiche Weise

Ergebnisse

aufgearbeitet. Der Verdau vom amplifizierten rENPP3-Konstrukt und des dazu passenden pHA.CD38tmEGFP-Vektors mit den Restriktionsenzymen BamH I und Not I erfolgte in einem Schritt im BamH I-Puffer für 1 Stunde bei 37°C. Nach Ligation, Transformation, Wachstum der Klone, Herstellung von Minipräparationen und Kontrollverdau konnten Maxipräparationen gewonnen werden. Zur Kontrolle wurde von den Minipräparationen aller HA.CD38tm.ENPP-Konstrukten DNA Sequenzierungen mit Hilfe des CMV-F Primers gemacht. Ausserdem zeigten HEK-T Zellen, die transient mit den neuen HA.CD38tm.ENPP-Konstrukten transfiziert wurden, eine Expression des HA-tags in der Immunfluoreszenzmikroskopie (**Abb. 17**). Dabei wurden alle Ansätze mit Ausnahme von HA.CD39tm EGFP mit 0,5µg Plasmid-DNA eines für kernständiges eGFP kodierenden Konstrukts kotransfiziert. Zum Nachweis des intrazellulär gelegenen HA-tags wurden die Zellen vor der Anfärbung fixiert und permeabilisiert.

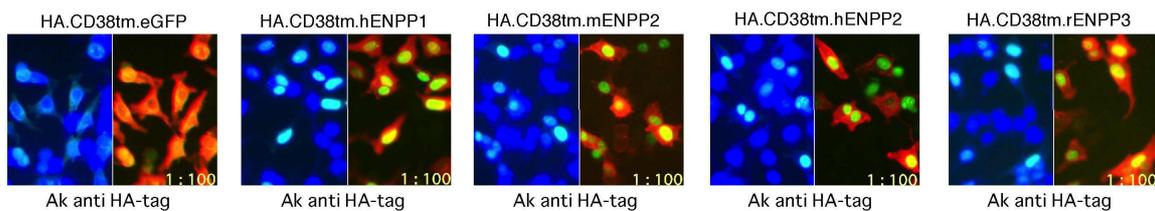


Abb. 17: Immunfluoreszenzanalyse der transient mit HA.CD38-Transmembrankonstrukten transfizierten CHO Zellen. CHO Zellen wurden transient mit den neu klonierten HA.CD38 Transmembrankonstrukten transient transfiziert und anschliessend intrazellulär mit anti-HA_Antikörpern angefärbt.

3.2 Untersuchung der Spezifität der Immunseren gegen ENTPDs und ENPPs an transfizierten CHO- und HEK-Zellen

3.2.1 Untersuchungen mittels indirekter Immunfluoreszenz an transient transfizierten CHO-Zellen

In diesem Abschnitt meiner Arbeit wurde mit Hilfe von transient transfizierten Zellen die spezifische Reaktion der ADAPINCs gegen ihre jeweiligen Antigene in der Immunfluoreszenz getestet. CHO Zellen wurden mit 5 µg des für das jeweilige Ektoenzym kodierenden Expressionskonstrukts und mit 0,5 µg des Konstrukts, das für kernständiges EGFP kodiert, kotransfiziert. Die so transfizierten CHO-Zellen wurden

Ergebnisse

mit den Immunseren in unterschiedlichen Verdünnungen und dem entsprechenden Präimmunserum als Negativkontrolle angefärbt. Um zu ermitteln, wie stark ein Immunserum mit seinem Antigen reagiert, wurde eine geometrische Verdünnungsreihe der Antikörper hergestellt. Die gefärbten Zellen wurden in der Immunfluoreszenz betrachtet. In der Blaufluoreszenz sind durch die Gegenfärbung der Zellkerne mit dem Farbstoff Hoechst 33342 alle Zellen eines Blickfeldes zu sehen. Grün leuchten die Kerne derjenigen Zellen, die mit eGFP kotransfiziert und somit auch mit dem zu untersuchenden Antigen transfiziert sind. Dadurch lassen sich spezifische Anfärbungen der Ektoenzyme in der Rotfluoreszenz von unspezifischen unterscheiden. Fehlt bei einer rot gefärbten Zelle ein grüner Zellkern, handelt es sich wahrscheinlich um eine unspezifische Anfärbung.

3.2.1.1 Immunseren gegen ENTPDs

Wie in der Einleitung beschrieben, sind nicht alle Mitglieder der ENTPD Familie in der Membran verankert. So wird ENTPD5 in den Extrazellularraum sezerniert und ENTPD6 kann ebenfalls von der Zelle sezerniert werden. Deswegen wurden die Immunseren und ihre Reaktivität sowohl in der Zelloberflächenfärbung als auch in der intrazellulären Färbung von transient transfizierten CHO Zellen untersucht.

Die in **Abb. 18** dargestellten Fotografien der Immunfluoreszenzanalysen zeigen die Reaktivität der Antikörper gegen die membranständigen ENTPDs in ihrer optimalen Verdünnung. Sowohl in der Zelloberflächenfärbung als auch in der intrazellulären Färbung war es möglich, die Antigene auch noch mit einer Verdünnung der Antikörper von 1:6400 zu detektieren. Allerdings wurden insgesamt bessere Titer in der Zelloberflächenfärbung erlangt.

Ergebnisse

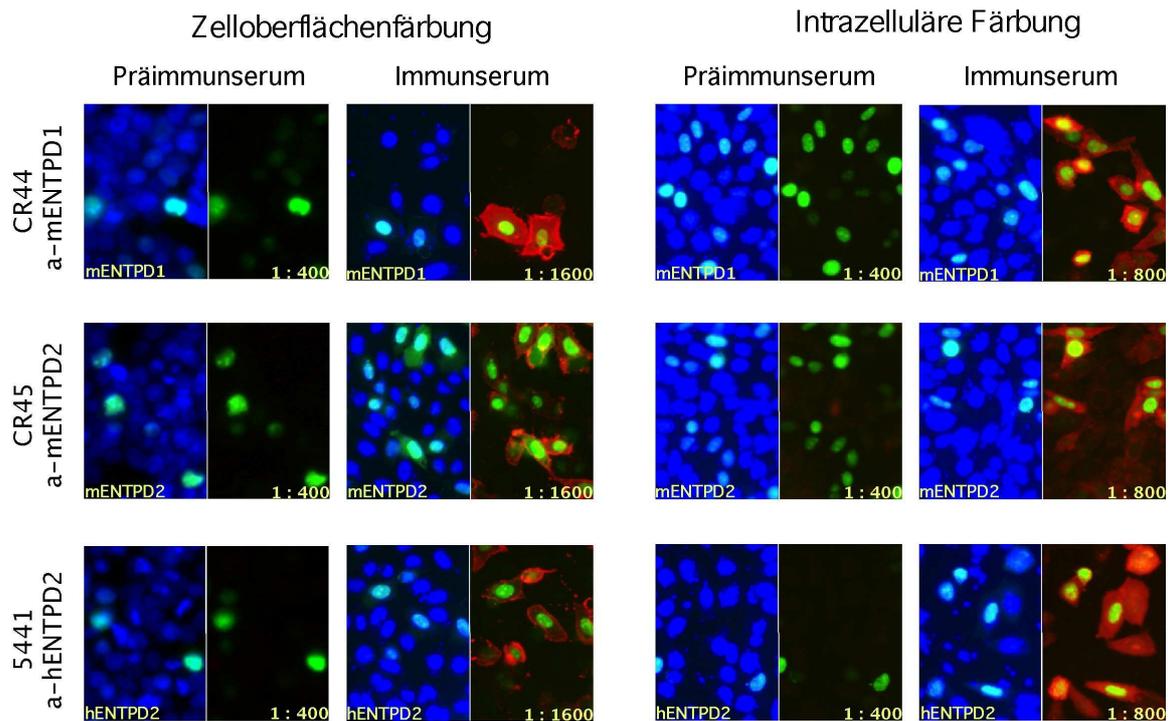


Abb. 18: Immunfluoreszenz-Analyse an transient transfizierten CHO Zellen zur Bestimmung der Reaktivität der Immunsereen gegen membranständige ENTPDs. $1 \cdot 10^6$ CHO-Zellen wurden transient mit ENTPD-Expressionskonstrukten und nukleärem GFP (erscheint grün in der IF) kotransfiziert. Zwanzig Stunden nach der Transfektion erfolgte die Anfärbung mit dem jeweiligen gegen das spezielle ENTPD-Konstrukt gerichteten Immunsereum in geometrischer Verdünnungsreihe zur Ermittlung des Antikörpertiters. Ein PE-konjugierter anti-Kaninchen IgG Antikörper markiert den 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. In Photoshop wurden die einzelnen Fluoreszenzanalysen übereinander gelagert.

Abb. 19 zeigt die Reaktivität der Immunsereen in der indirekten Immunfluoreszenz gegen das von den Zellen sezernierte ENTPD5 und das mögliche sezernierte ENTPD6. Auch hier erfolgte die Anfärbung der transient transfizierten CHO Zellen zum Vergleich auf der Zelloberfläche und intrazellulär.

Ergebnisse

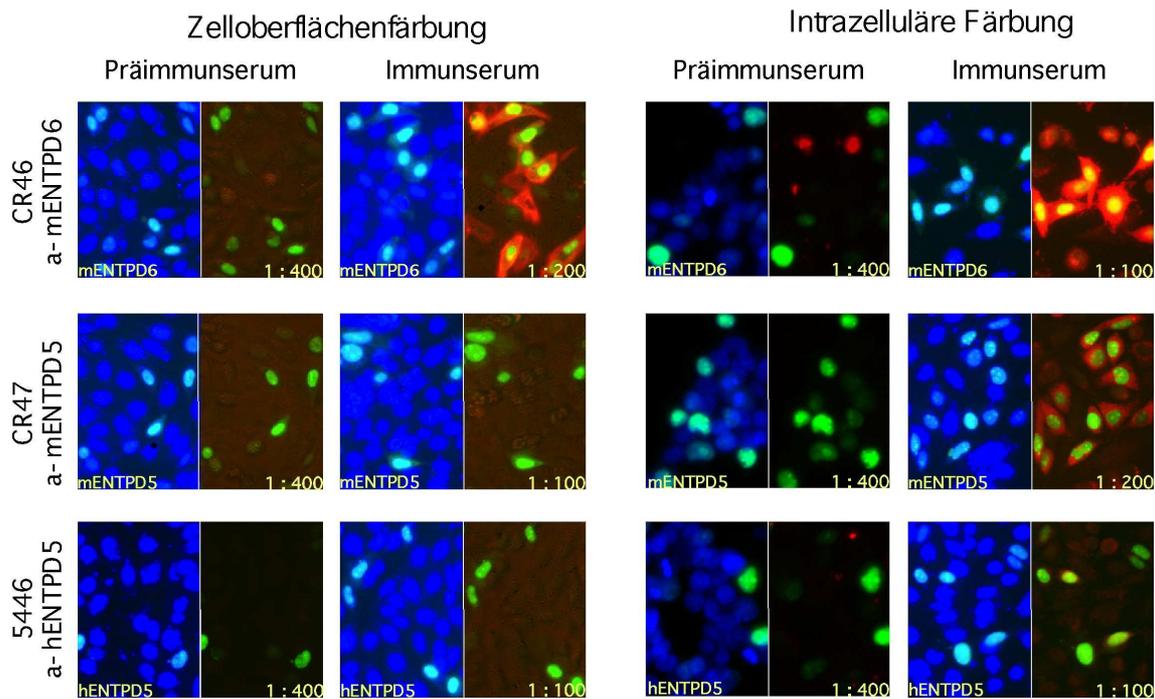


Abb. 19: Immunfluoreszenz-Analyse an transient transfizierten CHO Zellen zur Bestimmung der Reaktivität der Immuneseren gegen sezernierte ENTPDs. Nach transienter Transfektion von ca. $1 \cdot 10^6$ CHO-Zellen erfolgte die Anfärbung mit dem jeweiligen gegen das spezielle ENTPD-Konstrukt gerichteten Immuneserum in geometrischer Verdünnungsreihe. Ein PE-konjugierter anti-Kaninchen IgG Antikörper markiert den Erstantikörper für die Immunfluoreszenz (erscheint rot in der IF). Die Zellkerne wurden mit dem Hoechst Farbstoff 33342 gegengefärbt (erscheint blau in der IF). Gezeigt wird jeweils die optimale Verdünnungsstufe des Immuneserums.

Da ENTPD6 entweder in der Zellmembran verankert bleibt oder von der Zelle sezerniert wird, konnte es sowohl in der Oberflächen- als auch in der intrazellulären Färbung nachgewiesen werden. In der intrazellulären Färbung war allerdings eine höhere Titrierung des Antikörpers bei gleicher Immunfluoreszenzstärke möglich. ENTPD5 wurde dagegen von der Zelle ins extrazelluläre Milieu abgegeben. Somit reagierten die Immuneseren CR47 anti mENTPD5 und 5441 anti hENTPD5 nur in der intrazellulären Färbung mit ihrem Antigen, nicht aber in der vitalen Färbung. Diese beiden Immuneseren wiesen eine etwas schwächere Titrierung als die übrigen auf.

Tab. 6 gibt einen Überblick über die Abschwächung der Immunfluoreszenz bei stärkerer Verdünnung der Immuneseren, wobei drei Pluszeichen (+++) für eine starke Reaktivität des Immuneserums steht und ein Pluszeichen für eine sehr schwache oder auch unspezifische Anfärbung des Antigens.

Tab. 6: Die Reaktionsstärke der Immunsereen gegen die ENTPDs bei unterschiedlichen Titrierungen. In blau sind die unterschiedlichen Reaktionsstärken der Immunsereen bei der vitalen Färbung und in grün bei der intrazellulären Färbung dargestellt (+++ = starke Reaktivität; + = schwache Reaktivität; (+) = unspezifische oder sehr schwache Reaktivität; - = keine Reaktivität).

		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
CR44 anti mENTPD1	vital	+++	+++	+++	+++	++	+	+
	intrazellulär	+++	+++	+++	+++	++	+	(+)
CR45 anti mENTPD2	vital	+++	+++	+++	+++	++	+	(+)
	intrazellulär	+++	+++	+++	++	+	(+)	(+)
5441 anti hENTPD2	vital	+++	+++	+++	+++	++	+	(+)
	intrazellulär	+++	+++	+++	+++	++	+	(+)
CR47 anti mENTPD5	vital	+	(+)	(+)	-	-	-	-
	intrazellulär	+++	+++	++	++	++	+	(+)
5446 anti hENTPD5	vital	(+)	(+)	-	-	-	-	-
	intrazellulär	+	(+)	-	-	-	-	-
CR46 anti mENTPD6	vital	+++	++	+	(+)	-	-	-
	intrazellulär	+++	+++	+++	++	+	+	(+)

3.2.1.2 Analyse der Kreuzreaktivität von ENTPD-spezifischen Immunsereen

Für die Nutzung der ADAPINCs in weiteren Untersuchungen ist es neben der Kenntnis der optimalen Verdünnung ausserdem wichtig, über mögliche Kreuzreaktionen mit verwandten Mitgliedern der ENTPD Familie bescheid zu wissen. In der Einleitung wurde dargestellt, dass ein hoher Verwandtschaftsgrad zwischen den Spezies-Orthologen der untersuchten Enzyme besteht. Um zu ermitteln, ob die hier untersuchten Antikörper mit den Spezies-Orthologen ihrer Zielantigene kreuzreagieren, wurden sowohl in der Zelloberflächen- als auch in der intrazellulären Färbung alle Immunsereen mit ihrem spezifischen ENTPD sowie mit den jeweiligen paralogen und orthologen ENTPD auf Kreuzreaktivität geprüft. Als ortholog bezeichnet man einander entsprechende Gene in unterschiedlichen Spezies, beispielsweise mENTPD2 und hENTPD2, während die ENTPD Subtypen innerhalb einer Spezies einander paralog sind. Noch geringere Ähnlichkeiten erwartet man in der übrigen Verwandtschaft. Alle Immunsereen und auch das Präimmuserum (zur Kontrolle, wird nicht gezeigt) wurden in der Verdünnung 1:400 eingesetzt. Die **Abb. 20** zeigt die einzige ermittelte Kreuzreaktion von allen getesteten Immunsereen. CR45 anti mENTPD2 und 5441 anti hENTPD2 reagierten jeweils mit ihrem nächsten Verwandten, dem Orthologen. In den

Ergebnisse

Fotografien wurden rote, grüne, und blaue Fluoreszenz überlagert, wobei Rot, wie bei den vorigen Analysen, der Membranfluoreszenz der angefärbten ENTPDs entspricht. Grün sind die Kerne der mit eGFP transfizierten Zellen und blau gegengefärbt sind alle Zellen. Die übrigen Immunseren zeigten weder in der Zelloberflächen- noch in der intrazellulären Färbung eine Kreuzreaktion.

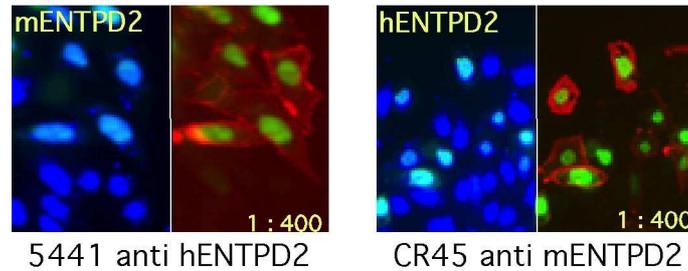


Abb. 20: Kreuzreaktion der gegen ENTPD2 gerichteten ADAPINC Immunseren. Alle in der Immunfluoreszenz untersuchten Immunseren wurden auch auf Kreuzreaktivität mit den jeweiligen paralogen und orthologen Konstrukten getestet. Von allen analysierten Immunseren zeigten nur CR45 anti-mENTPD2 und 5441 anti-hENTPD2 mit dem Orthologen der Maus bzw. des Menschen eine Kreuzreaktivität. Färbung analog zur Abb.18.

3.2.1.3 Analyse der Reaktivität von ENTPD-spezifischen Immunseren an Formalin-fixierten CHO-Zellen

Um die Eigenschaften und Reaktivitäten der Immunseren weiter zu testen, wurde ermittelt, in wie weit sich die ADAPINCs zum Einsatz an formalinfixierten Gewebeproben eignen. In der Pathologie werden Gewebeschnitte mit Formalin fixiert, um die Autolyse und Zersetzung der Proben aufzuhalten. Die meisten Proteine verlieren durch die Fixierung ihre Funktion und einen großen Teil ihrer antigenen Eigenschaften. Viele enzymhistochemische und immunhistologische Untersuchungen können daher nicht an Formalin-fixiertem Material durchgeführt werden. Deswegen sollte geklärt werden, ob die ADAPINCs in der Lage sind, Formalin-fixierte Epitope zu erkennen. Hierfür wurden die mit den ENTPD Konstrukten transient transfizierten CHO-Zellen nicht mit PFA sondern mit 4% gepuffertem Formalin, das wir von den Kollegen aus dem Institut für Pathologie am UKE bekommen haben, für 6 Stunden bei Raumtemperatur fixiert. **Abb. 21** zeigt die Reaktivität der Immunseren in der Zelloberflächenfärbung an den Formalin-fixierten CHO-Zellen.

Ergebnisse

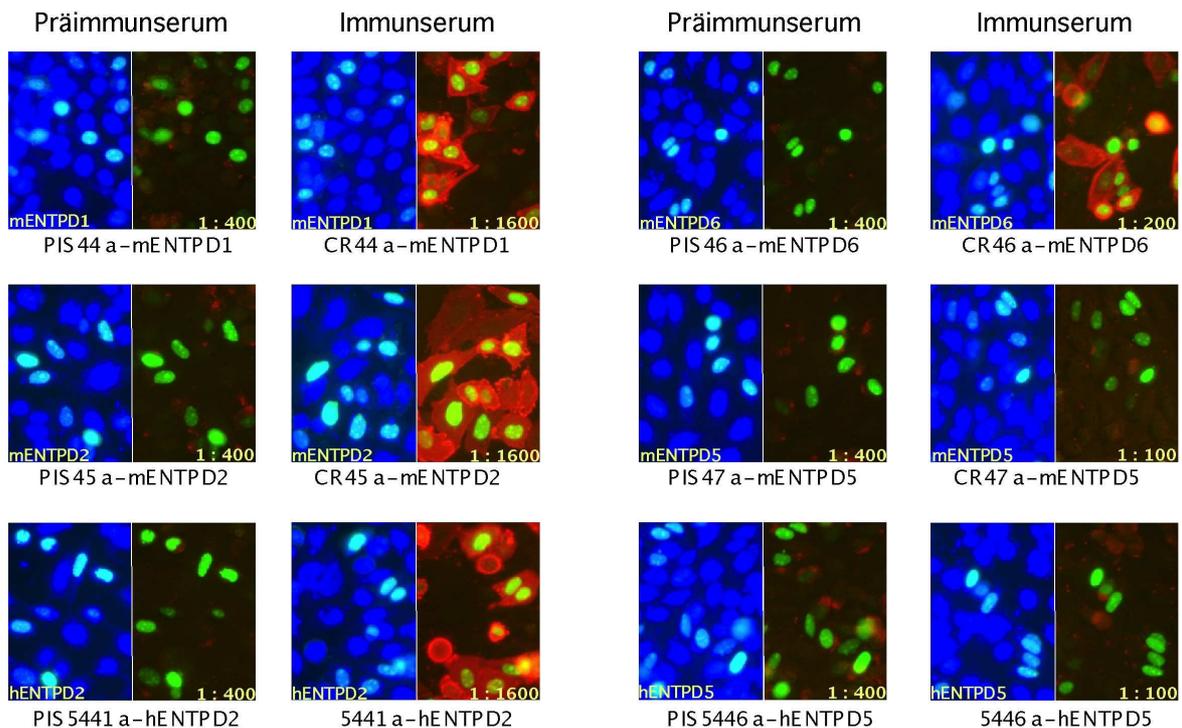


Abb. 21: Immunfluoreszenz-Analyse an Formalin-fixierten CHO Zellen zur Bestimmung der Reaktivität der Immunsereen gegen Formalin-fixierte ENTPDs. Die CHO Zellen wurden nach der transienten Transfektion mit 4 % gepuffertem Formalin für 6 h bei Raumtemperatur fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Anfärbung mit dem jeweiligen gegen das spezielle ENTPD-Konstrukt gerichteten Immuneserum in geometrischer Verdünnungsreihe.

Die Fähigkeit der Immunsereen, ihr Epitop an Formalin-fixierten Zellen zu erkennen, gleicht der Reaktivität der Immunsereen an 2% PFA fixierten CHO-Zellen. Die ADAPINCS CR44, CR45 und 5441 gegen die membranständigen ENTPD1 und ENTPD2 wiesen auch in höheren Verdünnungen noch eine gute Immunfluoreszenzstärke auf, wohingegen das Immuneserum CR46 anti mENTPD6 bei zunehmender Verdünnung eine größere Abschwächung der Immunfluoreszenzstärke erkennen ließ. Die Oberflächenanfärbung vom sezernierten ENTPD5 war, wie in den anderen Immunfluoreszenzanalysen schon gezeigt wurde, nicht möglich. Deswegen wurden CHO-Zellen, die transient mit mENTPD5 und hENTPD5 transfiziert wurden, nach ihrer Fixierung mit 4% gepuffertem Formalin auch intrazellulär angefärbt. Hier konnte keine Reaktivität von CR47 anti mENTPD5 und 5446 anti hENTPD5 nachgewiesen werden. Folglich bleibt festzuhalten, dass die Immunsereen gegen ENTPD1, 2, 4 und 6 ihre Epitope auch an Formalin-fixierten Zellen detektieren können, die Antiseren gegen ENTPD5 jedoch ihre Reaktivität unter diesen Bedingungen verlieren.

3.2.1.4 Immunseren gegen ENPPs

Die zweite Familie der Ektoenzyme, die in dieser Arbeit näher charakterisiert wurden, ist die der ENPPs. Zu diesem Zwecke wurden ebenfalls Antikörper gegen diese Enzyme mittels Gene-Gun Immunisierung von der Arbeitsgruppe dieses Labors produziert, die im Folgenden näher untersucht wurden.

Die Reaktivität des Immunserums Kan32 anti hENPP2, das bereits 2003 durch Gene-Gun Immunisierung hergestellt worden war, wurde mittels Immunfluoreszenzanalyse mit dem von unserer Arbeitsgruppe produzierten Immunserum K2G anti hENPP2 verglichen (**Abb. 22**).

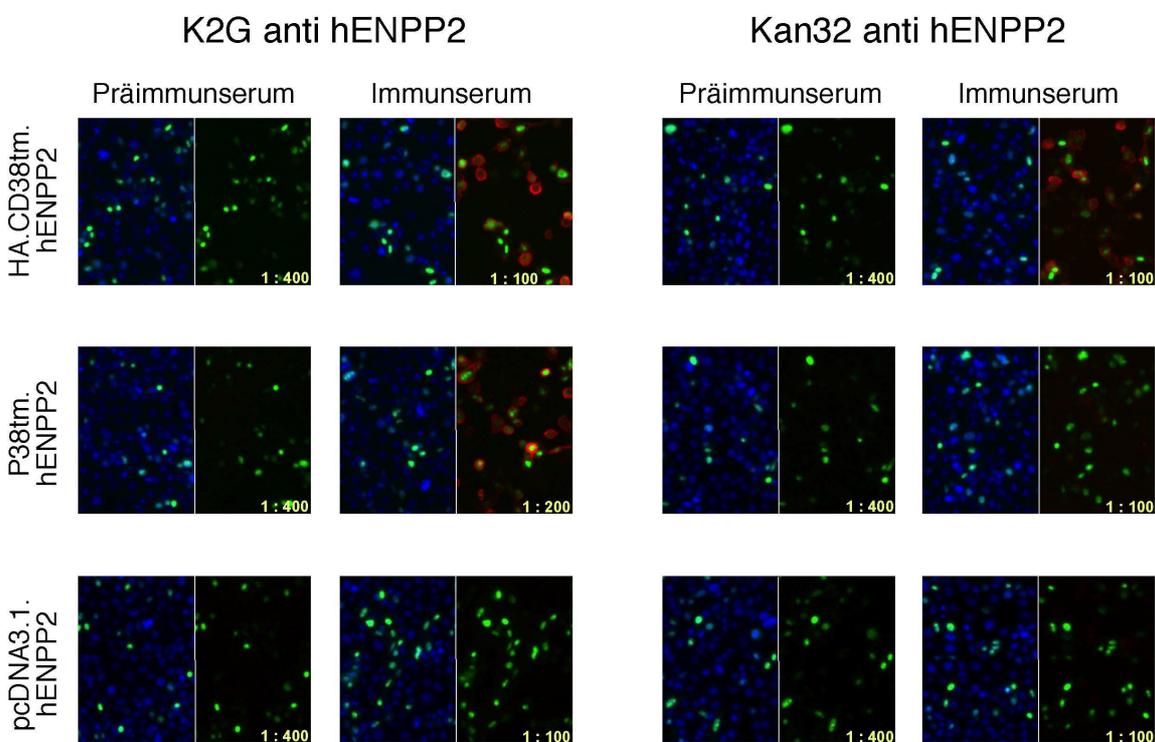


Abb. 22: Immunfluoreszenz-Analyse an transient transfizierten CHO Zellen zur Bestimmung der Reaktivität der Immunseren K2G und Kan32 gegen unterschiedliche hENPP2 Konstrukte. Nach transienter Transfektion von ca. $1 \cdot 10^6$ CHO-Zellen erfolgte die Anfärbung mit dem jeweiligen gegen das spezielle ENPP-Konstrukt gerichteten Immunserum in geometrischer Verdünnungsreihe. Ein PE-konjugierter anti-Kaninchen IgG Antikörper markiert den Erstantikörper für die Immunfluoreszenz (erscheint rot in der IF). Die Zellkerne wurden mit dem Hoechst Farbstoff 33342 gegengefärbt (erscheint blau in der IF). Gezeigt wird jeweils die optimale Verdünnungsstufe des Immunserums. Wie in den Abbildungen zuvor wurden die Zellen mit einem Konstrukt für kernständiges EGFP ko-transfiziert (erscheint grün in der IF).

Hierfür wurden CHO Zellen mit unterschiedlichen hENPP2 Konstrukten transient transfiziert und an der Zelloberfläche angefärbt. Als Konstrukte kamen

Ergebnisse

pcDNA3.1.hENPP2, P38tm.hENPP2 mit V5-tag und HA.CD38tm.hENPP2, das im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurde, zum Einsatz. Das Präimmenserum diente als Negativkontrolle. hENPP2 im pcDNA3.1 Vektor war nicht über die CD38 Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert, wurde somit in den Extrazellularraum sezerniert und wurde daher weder vom Kan32 anti hENPP2 noch vom K2G anti hENPP2 detektiert. Die von den anderen beiden Konstrukten kodierten hENPP2 Proteine wurden von beiden Immunsereen auf der Zelloberfläche erkannt. Allerdings wies das Immenserum K2G eine bessere Reaktivität gegenüber seinem Antigen auf als das Kan32 und erkannte P38tm/hENPP2 mit V5-Tag in der Immunfluoreszenz besser als das HA.CD38tm.hENPP2.

Drei weitere gegen spezielle ENPP Konstrukte gerichtete Immunsereen wurden mittels Immunfluoreszenzanalyse untersucht (**Abb. 23**). Diese sind das CR65 anti mENPP4, das CR66 anti mENPP5 und das CR67 anti mENPP6.

Ergebnisse

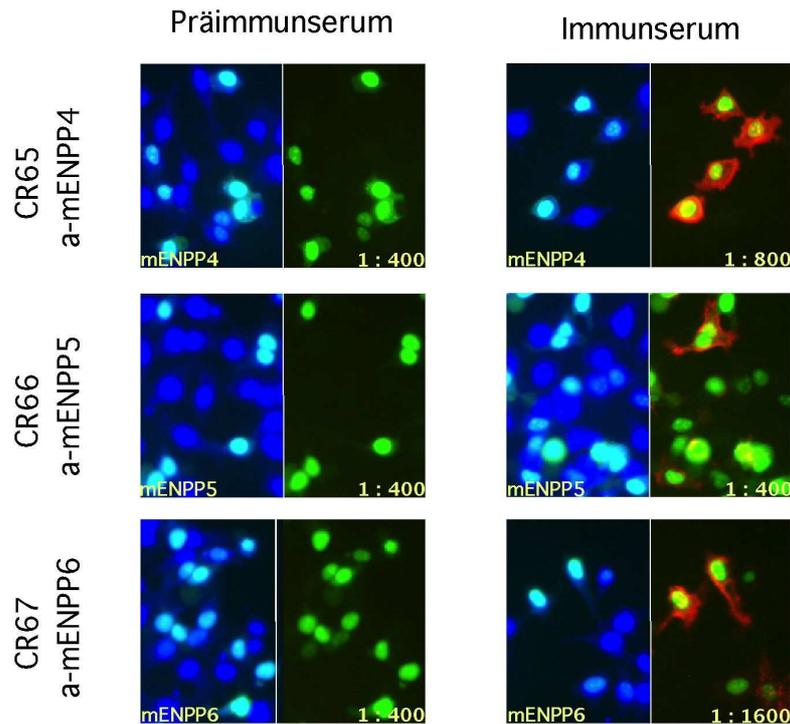


Abb. 23: Immunfluoreszenz-Analyse an transient transfizierten CHO Zellen zur Bestimmung der Reaktivität der Immunsereen gegen membranständige ENPPs. Nach transienter Transfektion von ca. $1 \cdot 10^6$ CHO-Zellen erfolgte die Anfärbung mit dem jeweiligen gegen das spezielle ENPP-Konstrukt gerichtete Immunsereum in geometrischer Verdünnungsreihe. Ein PE-konjugierter anti-Kaninchen IgG Antikörper markiert den Erstantikörper für die Immunfluoreszenz (erscheint rot in der IF). Die Zellkerne wurden mit dem Hoechst Farbstoff 33342 gegengefärbt (erscheint blau in der IF). Gezeigt wird jeweils die optimale Verdünnungsstufe des Immunsereums. Wie in den Abbildungen zuvor wurden die Zellen mit einem Konstrukt für kernständiges EGFP ko-transfiziert (erscheint grün in der IF).

Alle drei Antikörper zeigten auch noch bei höherer Verdünnung (CR65 und CR67 bei 1:6400, CR66 bei 1:3200) eine messbare Anfärbung. Wie die Immunsereen gegen die ENTPDs wurden auch die Immunsereen gegen die ENPPs auf Kreuzreaktivität mit ihren Spezies-Orthologen geprüft. Es konnte gezeigt werden, dass in der Immunfluoreszenzmikroskopie keine der getesteten Immunsereen mit ihrem Ortho- oder Paralogen kreuzreagierten.

3.2.2 Untersuchungen mittels FACS-Analysen an transient transfizierten HEK-Zellen

Eine weitere wichtige Untersuchungsmethode in Forschung und Diagnostik stellt die Durchflusszytometrie dar. In diesem Abschnitt meiner Arbeit wurde getestet, ob die ADAPINCs sich zum Einsatz bei FACS Analysen eignen. Hierfür wurden HEK-Zellen transient mit den ENTPD Konstrukten transfiziert und für das FACS angefärbt. Sowohl das Immunerum als auch das Präimmunerum als Negativkontrolle wurden in einer Verdünnung von 1:800 verwendet (**Abb. 24**).

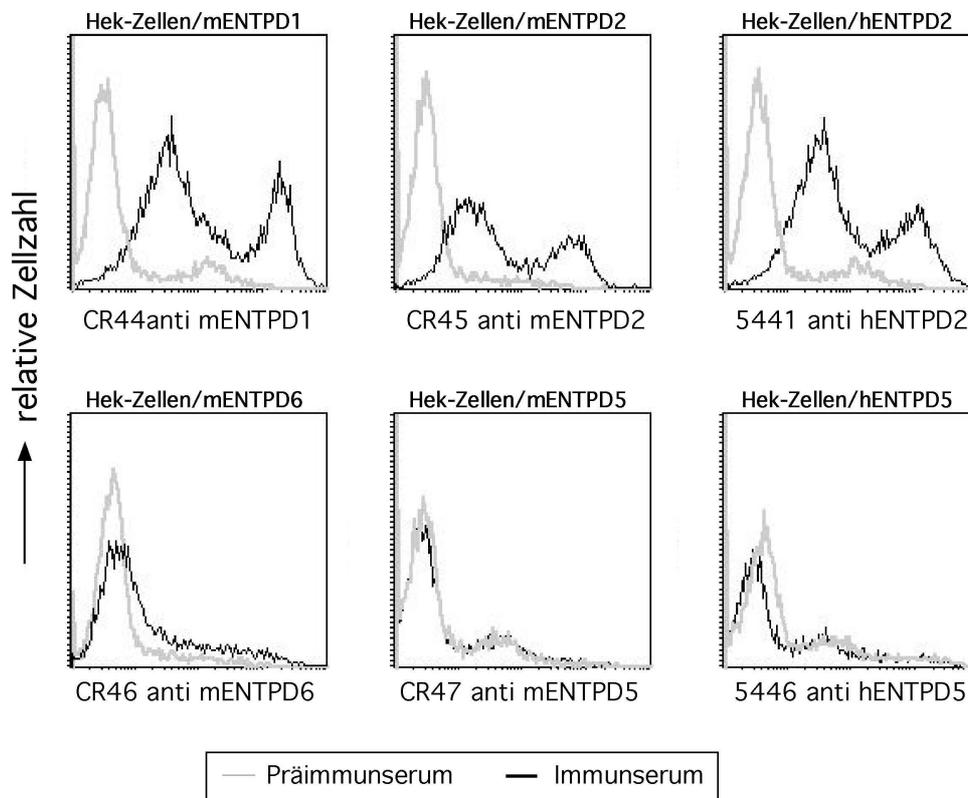


Abb. 24: FACS-Analysen an transient transfizierten HEK-Zellen zur Untersuchung der Reaktivität der ENTPD spezifischen Immuneren. Zur FACS-Analyse wurden HEK-Zellen mit Expressionskonstrukten für die ENTPD-Reihe transient nach JetPei transfiziert. Danach erfolgte die Anfärbung mit dem jeweiligen gegen das spezielle ENTPD-Konstrukt gerichteten Immunerum in einer Verdünnung von 1:800. Ein PE-konjugierter anti-Kaninchen IgG Antikörper markiert den Erstantikörper für die FACS Analyse (graue Linie: Präimmunerum, schwarze Linie: Immunerum).

Die erzielten Ergebnisse der Reaktivität der Immuneren in der FACS Messung lassen sich mit denen in der Immunfluoreszenz-Analyse vergleichen, denn auch hier gibt es Ungleichheiten im Hinblick auf die Bindungsfähigkeit der Immuneren, bedingt durch die unterschiedliche Membrantopographie der Antigene. Die membranständigen

Ergebnisse

Enzyme ENTPD1 und ENTPD2 wurden von ihren jeweiligen Antikörpern, dem CR44 anti mENTPD1, CR45 anti mENTPD2 und 5441 anti hENTPD2 gut erkannt und gaben das beste Signal in der FACS Messung. Das Signal durch CR46 anti mENTPD6 war wie in der Immunfluoreszenz etwas schwächer, da das ENTPD6 von der Zelle sezerniert werden kann. Eine Oberflächenanfärbung von ENTPD5 mittels CR47 anti mENTPD5 bzw. 5446 anti hENTPD5 war auch in der Durchflusszytometrie nicht möglich.

In einer weiteren Untersuchung wurde getestet, wie gut das Immunsereum K2G und der Antikörper V5 mit den unterschiedlichen hENPP2-Konstrukten im FACS reagierten (Abb. 25).

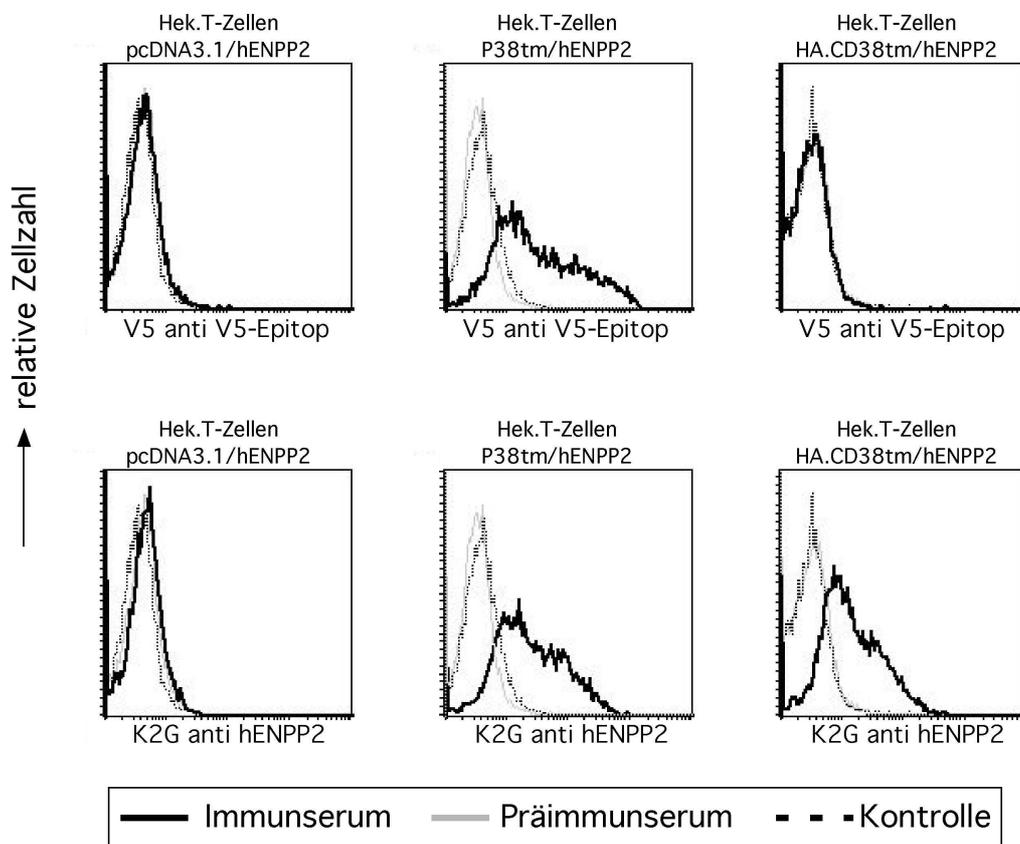


Abb. 25: FACS-Analysen an transient transfizierten HEK-Zellen zur Untersuchung der Reaktivität von K2G und V5 gegen unterschiedliche hENPP2 Konstrukte. Zur FACS-Analyse wurden HEK-Zellen mit den entsprechenden Expressionskonstrukten transient transfiziert. Danach erfolgte die Anfärbung mit den Antikörpern in einer Verdünnung von 1:800. Ein PE-konjugierter anti-Kaninchen bzw. anti-Maus-IgG Antikörper markiert den Erstantikörper für die FACS Analyse (graue Linie: Präimmunsereum, gestrichelte Linie: Negativkontrolle, Anfärbung mit PBS, schwarze Linie: Immunsereum).

Der V5-Antikörper von der Firma Invitrogen stammt aus der Maus und richtet sich gegen das synthetische V5-Epitop. Bevor man hENPP2 durch das Immuneserum K2G selbst detektieren konnte, geschah dies über den V5-tag. Dafür wurde die Sequenz für das V5-Epitop in das P38tm.hENPP2 Konstrukt integriert. Es wurden HEK-Zellen transient mit den unterschiedlichen hENPP2 Konstrukten transfiziert und mittels FACS analysiert. Der anti V5 Antikörper reagierte wie erwartet nur mit Zellen, die mit dem P38tm.hENPP2 Konstrukt transfiziert gewesen waren. In den anderen beiden Expressionsvektoren gab es keinen V5-tag. K2G erkannte wie in der Immunfluoreszenz auch die beiden in der Membran verankerten hENPP2 Konstrukte. Die mit dem pcDNA3.1.hENPP2 Konstrukt transfizierten Zellen sezernierten das Enzym, daher konnte dieses durch die Oberflächenanfärbung mit K2G nicht sichtbar gemacht werden.

3.2.3 Untersuchungen der ENTPD-spezifischen Immuneseren mittels Western Blot Analysen an transient transfizierten HEK-Zellen

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, ist die Immunisierungsstrategie mittels DNA-Vakzinierung darauf ausgerichtet, Antikörper zu erzeugen, die ihre Antigene in ihrer natürlichen dreidimensionalen Konformation erkennen. Es stellte sich daher die Frage, ob diese Immuneseren auch in Western-Blot Analysen eingesetzt werden können.

In SDS-PAGE/Western Blot Analysen werden die Antigene vor allem durch Wirkung des starken ionischen Detergens SDS (Na-Dodecyl-Sulfat) denaturiert. Zusätzlich werden Disulfidbrücken durch den Einsatz des Reduktionsmittels DTT (Dithiothreitol) gespalten. DTT (auch als Clelands Reagenz bekannt) leitet sich vom Zuckeralkohol Threit oder Threitol ab. Es verhindert die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen (SH-) zu Disulfidbrücken durch Luftsauerstoff, und trägt dadurch dazu bei, die Faltung von Proteinen, deren Struktur durch Disulfidbrücken stabilisiert wird, zu zerstören. Um die natürliche Konformation der Proteine möglichst stark zu erhalten, wurden die Western Blot Analysen daher vorwiegend unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt, entsprechend ohne DTT-Zusatz.

Abb. 26 zeigt die Reaktivität der Immuneseren im Western Blot.

Ergebnisse

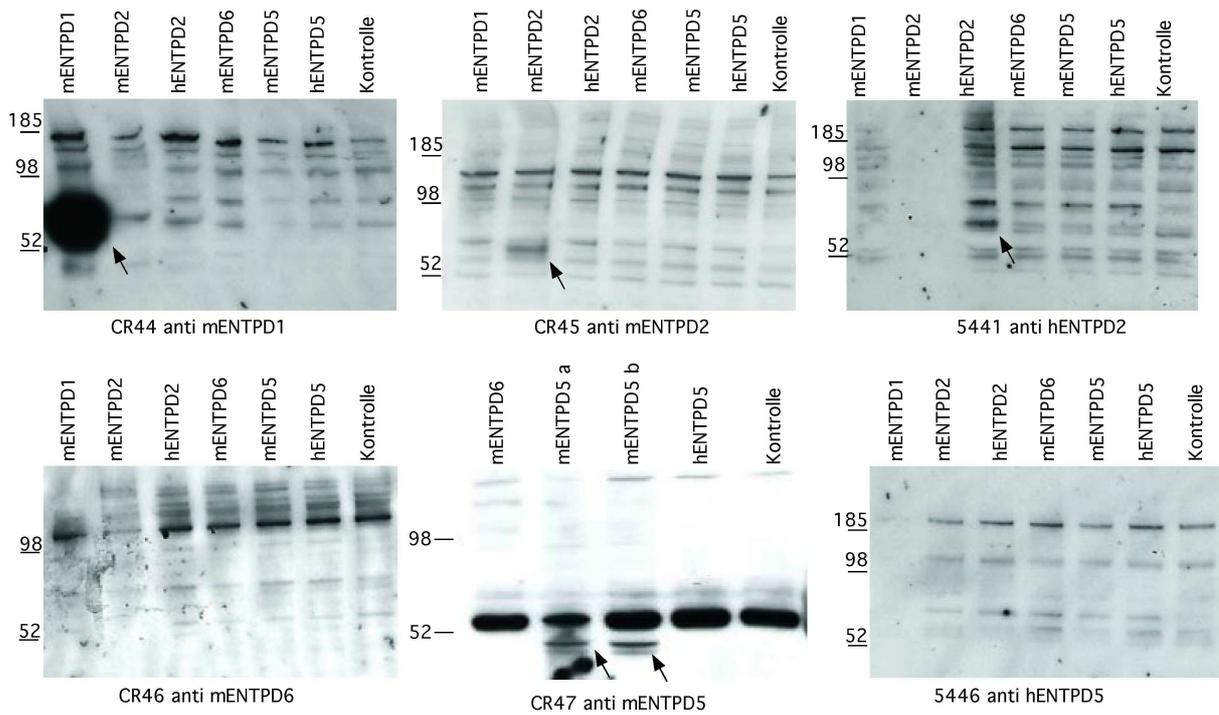


Abb. 26: Untersuchung der Reaktivität der ENTPD spezifischen Immunsereen im Western Blot. Verwendet wurden dafür Ganzzelllysate aus transient transfizierten HEK.T Zellen mit den jeweiligen Konstrukten für murines (m) oder humanes (h) ENTPD1,2,5,6. Untransfizierte Zellen wurden zur Kontrolle verwendet. Die Immunsereen wurden in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Als 2. Antikörper wurde der Esel anti-Kaninchen (HRP) verwendet.

Auch im Western Blot als Untersuchungsmethode liessen sich die membranständigen ENTPD1 und -2 mittels der entsprechenden Immunsereen gut nachweisen. Besonders kräftig reagierte der CR44 anti mENTPD1 mit seinem Antigen, so dass in folgenden Versuchen eine höhere Verdünnung dieses Antikörpers eingesetzt werden sollte. Die Immunsereen CR45 anti mENTPD2 und 5441 anti hENTPD2 zeigten jeweils eine spezifische Proteinbande, die der erwarteten Proteingrösse ihres jeweiligen Antigens in etwa entsprach. Abgeleitet von der primären Struktur und der deglykosylierten Form beträgt die molekulare Masse der Enzyme etwa 55-60 kDa (Christoforidis, Papamarcaki et al. 1995). 70-80 kDa beträgt sie bei den glykosylierten Enzymen nach heterologer Expression in z.B. CHO-Zellen (Wang, Rosenberg et al. 1997; Nagy, Knowles et al. 1998; Smith and Kirley 1998; Heine, Braun et al. 1999). Da in der ersten Western Blot Analyse CR47 sein Antigen mENTPD5 nicht erkannte, wurden im folgenden Versuch Zelllysate von unterschiedlichen mit mENTPD5 transient transfizierten Zellen auf das Gel geladen. Desweiteren wurde hier die Reaktivität des Immunsereums unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen verglichen. Sowohl in der Western Blot Analyse mit DTT, als auch in der ohne DTT konnte mENTPD5 durch seinen

Antikörper CR47 angefärbt werden. Dahingegen konnten hENTPD5 und mENTPD6 mittels der verwendeten ADAPINCs (5446 anti hENTPD5 und CR46 anti mENTPD6) weder unter reduzierenden noch unter nicht reduzierenden Bedingungen detektiert werden. Um zu überprüfen, ob die sezernierten Enzyme ENTPD5 und ENTPD6 im Zellüberstand von den ADAPINC Antikörpern erkannt werden, wurden diese ebenfalls auf das Gel geladen. In den Zellüberständen konnten allerdings keine positiven spezifischen Banden nachgewiesen werden (hier nicht gezeigt).

3.3 Endogene Expression von ENTPDs auf etablierten Zelllinien und primären Zellen

Mitglieder der ENTPDs kommen auf einer Vielzahl verschiedener Zellen in unterschiedlichen Geweben im Organismus von Säugetieren vor. Um festzustellen, auf welchen Zellen die ENTPDs natürlicherweise exprimiert werden, wurden die von mir charakterisierten Immunsereen eingesetzt, um murine und humane Zelllinien, sowie primäre Milzzellen aus der Maus mittels FACS-Analyse zu untersuchen. Für das Screening der Zelllinien wurden dabei die ADAPINCs CR44 (erkennt mENTPD1), CR45 (erkennt mENTPD2), CR46 (erkennt mENTPD6) und 5441 (erkennt hENTPD2) eingesetzt. Die Immunsereen CR47 und 5446 gegen das sezernierte murine bzw. humane ENTPD5 wurden nicht verwendet, weil diese, wie in 3.2.2 gezeigt, ihr Antigen mittels FACS Analyse nicht erkannten. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen an Zelllinien sind in der (Tab. 7) zusammengefasst. Dort sind alle untersuchten Zelllinien aufgelistet und bei spezifischer Reaktion mit den ADAPINCs mit einem „+“ gekennzeichnet. Ein in Klammern gesetztes Pluszeichen „(+“ bedeutet, dass entweder nur eine äußerst schwache Färbung zu erkennen war oder eine unspezifische Reaktion stattgefunden hat, beispielsweise wenn eine Färbung auch mit dem Präimmunsereum erfolgte.

Tab. 7: Untersuchung von etablierten Zelllinien auf natürliche Expression von mENTPD1, 2, 6 und hENTPD2. Fünf Maus- und sechs Human-Zelllinien wurden auf endogene Expression von ENTPDasen im FACS getestet. Im Screening wurden die verfügbaren anti-ENTPD-Antikörper jeweils in einer Verdünnung von 1:100 zur FACS-Färbung eingesetzt.

Zelllinie		CR44 anti mENTPD1	CR45 anti mENTPD2	CR46 anti mENTPD6	5441 anti hENTPD2
Murine Zelllinien	A 20	(+)	(+)	(+)	(+)
	DO 11.10			(+)	(+)
	MD 27			+	
	RAW	+	(+)	(+)	(+)
	Yac HH			(+)	
Humane Zelllinien	HEK.CS				
	HeLa	(+)	(+)	(+)	++
	Jurkat				
	K 562				(+)
	LNCaP	(+)	(+)	(+)	+
	THP-1				

3.3.1 Analyse der ENTPD-Expression auf humanen Zelllinien

Das Serum 5441 wurde eingesetzt, um sechs im Labor verfügbare humane Zelllinien auf die Expression von ENTPD2 zu untersuchen. Als Kontrollen wurden die Seren CR45 (anti mENTPD2, kreuzreagiert mit humanem ENTPD2) und CR44 (anti mENTPD1, keine Kreuzreaktion mit humanem ENTPD1, diente als Negativkontrolle) eingesetzt.

Wie in **Abb. 27** zu sehen ist, reagierte das Serum am stärksten mit der Zelllinie HeLa, einer humanen Zervixkarzinom-Zelllinie. Eine weitere positive Expression von hENTPD2 konnte auf den LNCaP Zellen, die aus einem Prostatakarzinom aus dem supraklavikulären Lymphknoten eines 50 Jahre alten Mannes stammen, festgestellt werden. Die Anfärbung mit 5441 war hier allerdings etwas schwächer. Eine fragliche Reaktion zeigte 5441 mit den K562 Zellen, einer Zelllinie, die aus einer humanen chronisch myeloischen Leukämie abgeleitet wurde. Bei allen mit Serum 5441 positiv reagierenden Zelllinien war die Reaktivität mit dem gegen murines ENTPD2 gerichteten CR45 deutlich schwächer, teilweise gar nicht festzustellen. Dies mag daran liegen, dass die Bindung an die kreuzreagierenden Epitope insgesamt schwach ausgeprägt ist, so dass sie zwar in einem System der forcierten Überexpression sichtbar

Ergebnisse

wird, aber unter den Bedingungen der normalen endogenen Expression nicht festgestellt werden kann. Alternativ ist es auch möglich, dass die kreuzreagierenden Epitope in den endogen exprimierenden Zelllinien z.B. aufgrund unterschiedlicher Glykosylierungsmuster im Vergleich zu transfizierten HEK-Zellen, verdeckt sind.

Auf den übrigen getesteten humanen Zelllinien konnte keine endogene Expression von hENTPD2 dargestellt werden. Untersucht wurden dabei unter anderem die T-Lymphomzelllinie Jurkat, die embryonale Nierenzelllinie HEK.CS und die AML-Zelllinie THP-1.

Ergebnisse

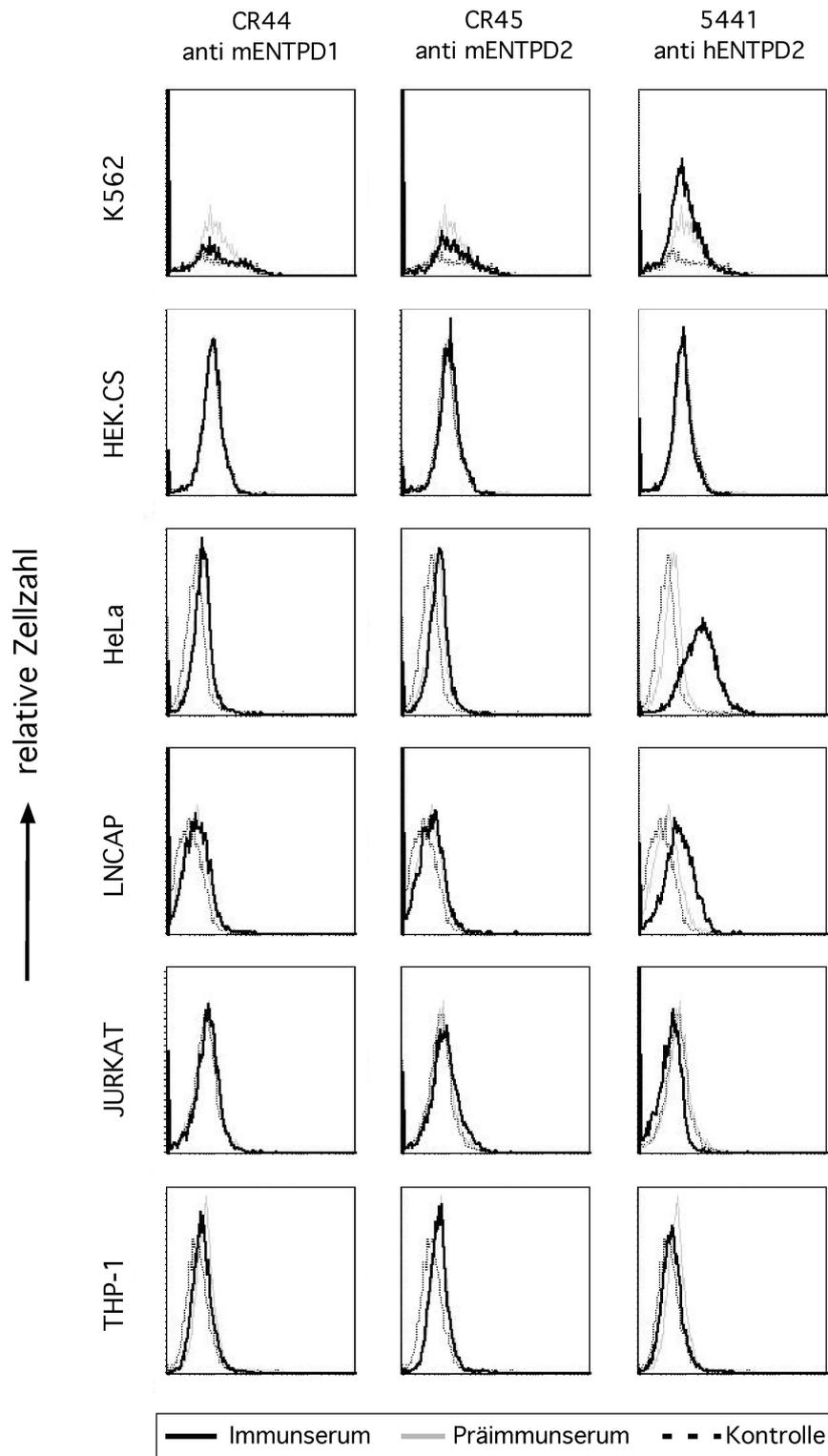


Abb. 27: Untersuchung von etablierten Zelllinien auf natürliche Expression von humanen ENTPDs (repräsentative FACS-Analyse). Sechs humane Zelllinien wurden auf endogene ENTPD2 -Expression im FACS getestet. Im Screening wurden die verfügbaren ADAPINCs jeweils in einer Verdünnung von 1:100 zur FACS-Färbung eingesetzt, gefolgt von dem PE konjugierten Zweitantikörper. Als Negativkontrollen wurden Präimmunserum und PBS verwendet.

3.3.2 Analyse der ENTPD-Expression auf murinen Zelllinien

Um eine spezifische Anfärbung mit dem jeweiligen Immuns serum zu überprüfen, wurden zum einen das jeweilige Präimmuns serum und PBS und zum anderen das gegen das humane ENTPD2 gerichtete Immuns serum 5441 als Negativkontrolle eingesetzt. Hierbei ist zu beachten, dass, wie unter (3.2.1.2) beschrieben, CR45 anti mENTPD2 und 5441 anti hENTPD2 mit dem Orthologen der Maus bzw. des Menschen eine Kreuzreaktivität zeigten und somit das Immuns serum 5441 nur bedingt als Negativkontrolle angesehen werden kann. Eine Reaktion der getesteten murinen Zellen mit 5441 anti hENTPD2 war also möglich, wenn diese Zellen auch mit CR45 anti mENTPD2 reagierten.

Bei den untersuchten murinen Zelllinien liess sich nur eine einzige Reaktivität mit großer Sicherheit feststellen: die MD27 Zellen, eine T-T-Hybridomzelllinie aus der Maus, reagierten mit CR46 (anti mENTPD6), jedoch mit keinem der anderen eingesetzten Seren oder den eingesetzten Negativkontrollen (**Abb. 28**). Bei den A20 Zellen, B-Lymphomzellen aus der Maus, handelt es sich wahrscheinlich um unspezifische FACS-Färbungen, weil diese Zellen sowohl mit dem CR44 (anti mENTPD1) als auch mit allen anderen eingesetzten Immuns seren inklusive dem Präimmuns seren reagierten, welches als Negativkontrolle eingesetzt wurde. Die murine Makrophagen-Zelllinie RAW zeigte, vermutlich aufgrund der Expression von Fc-Rezeptoren, ebenfalls ein hohes Maß an unspezifischen Anfärbungen. Einen etwas deutlicheren Unterschied gegenüber der Anfärbung mit dem Präimmuns serum zeigt die Reaktion mit CR44 (anti-mENTPD1). Weitere Kontrollen sind jedoch notwendig, um die Spezifität dieser Anfärbung zu bestätigen. Eine schwache Reaktion ließ sich bei den von einem MLV-transformierten T-Lymphom abstammenden YAC.HH Zellen mit CR46 (anti mENTPD6) darstellen. DO11.10-Zellen sind T-T-Hybridomzellen aus der Maus und wurden nur unspezifisch mit CR46 (anti mENTPD6) und 5441 (anti hENTPD2) angefärbt.

Ergebnisse

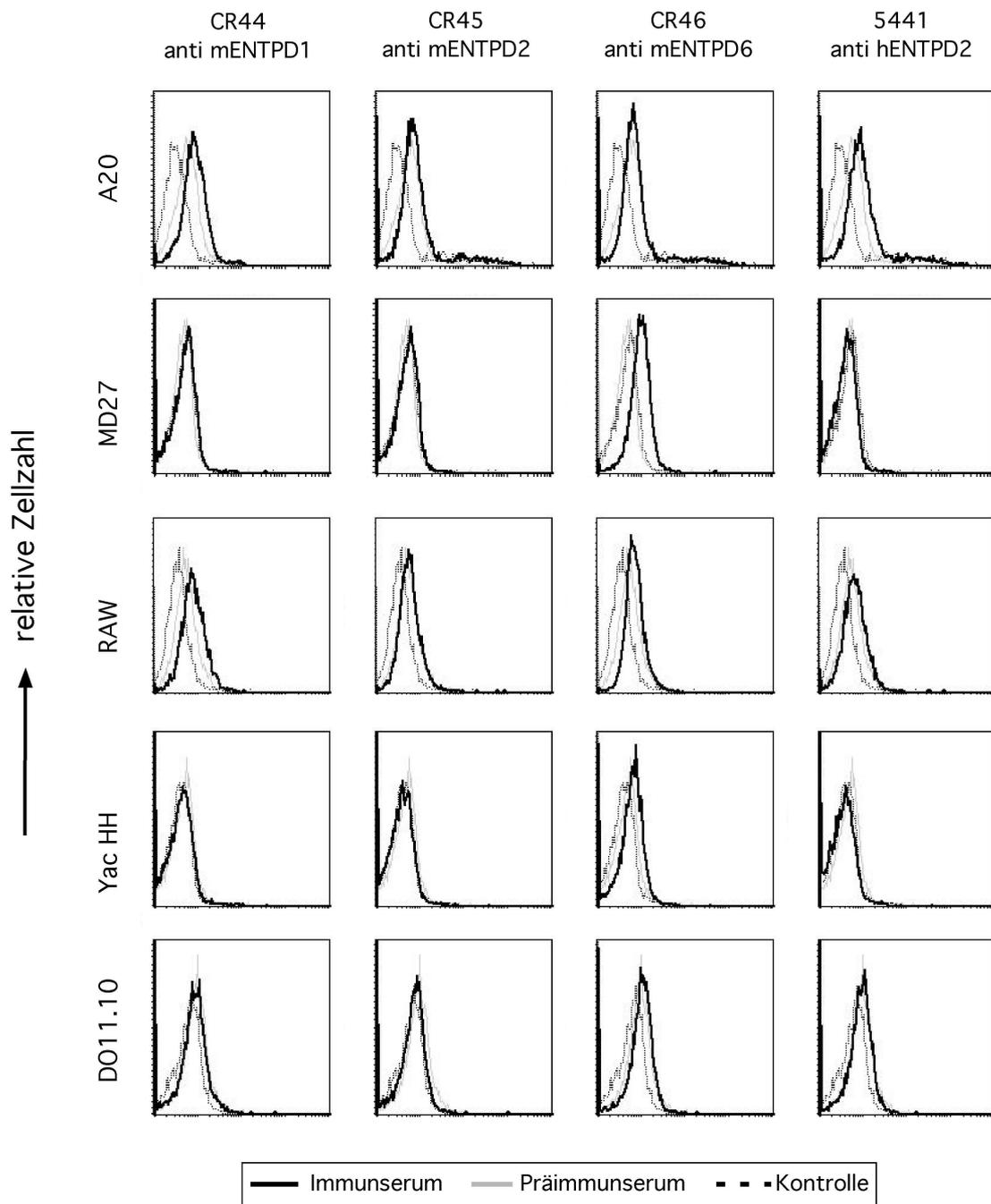


Abb. 28: Untersuchung von etablierten Zelllinien auf natürliche Expression von murinen ENTPDs (repräsentative FACS-Analyse). Fünf murine Zelllinien wurden auf endogene ENTPD1, 2 und 6-Expression im FACS getestet. Im Screening wurden die verfügbaren ADAPINCs jeweils in einer Verdünnung von 1:100 zur FACS-Färbung eingesetzt, gefolgt von dem PE konjugierten Zweitantikörper (schwarze Linie). Als Negativkontrollen wurden Präimmunserum (graue Linie) und PBS (gestrichelte Linie) verwendet.

3.3.3 Analyse der ENTPD-Expression auf primären murinen Milzzellen mittels FACS-Analysen

Die Ektonukleotidasen beeinflussen, wie in der Einleitung beschrieben, durch den Abbau von Nukleotiden die Aktivität von P2X7 Purinorezeptoren und anderen Rezeptoren im Organismus und spielen somit unter anderem eine wichtige Rolle im Immunsystem und in der Funktion der regulatorischen T-Zellen (Tregs). Mittels FACS-Analyse sollte ermittelt werden, welche unterschiedlichen Leukozytenpopulationen die ENTPD1 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Um die Populationen voneinander abzugrenzen, wurden frisch präparierte Milzzellen mit verschiedenen T-Zell-Markern (CD3, CD4, CD8, CD25), mit dem B-Zell-Marker B220, und mit anderen Leukozytenmarkern (CD11b, CD38, CD62L, CD69 und P2X7), sowie mit CR44 (anti-mENTPD1) gefärbt.

Für die Auswertung wurden einzelne Zellpopulationen aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften (Vorwärts- und Seitwärts-Scatter; Größe und Granularität) bzw. der Expression von Oberflächenmarkern definiert und in ein Gate eingeschlossen. Dabei wurden jeweils unstimulierte Milzzellen verglichen mit solchen, die über Nacht mit 50µg ConA stimuliert wurden. ConA ist ein pflanzliches Lektin aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*), das T- und B-Lymphozyten zur Proliferation stimuliert.

3.3.3.1 Analyse der ENTPD1-Expression auf B- und T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen

Wie schon beschrieben, kommt ENTPD1 auf einer Vielzahl von unterschiedlichen Zellen des Immunsystems vor. So konnte ENTPD1 mit Hilfe des eingesetzten ADAPINCS CR44 auf den drei definierten Zellsubpopulationen (T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen) nachgewiesen werden. (**Abb. 29.**) Nahezu alle B-Lymphozyten exprimierten ENTPD1 auf ihrer Zelloberfläche. Desweiteren waren 80% der natürlichen Killerzellen (NK) und 35% der T-Lymphozyten ENTPD1 positiv. Nach Stimulation der Zellen mit ConA, ein Mitogen konnte vor allem eine Zunahme der Expression von ENTPD1 auf den T-Zellen nachgewiesen werden. Bei den NK-Zellen blieb diese so gut wie gleich und bei den B-Zellen nahm die Expression etwas ab. Als Kontrolle für die Spezifität von CR44 wurden die Zellen mit dem Präimmunserum angefärbt. Dieses zeigte keine Reaktion mit den untersuchten Milzzellen.

Ergebnisse

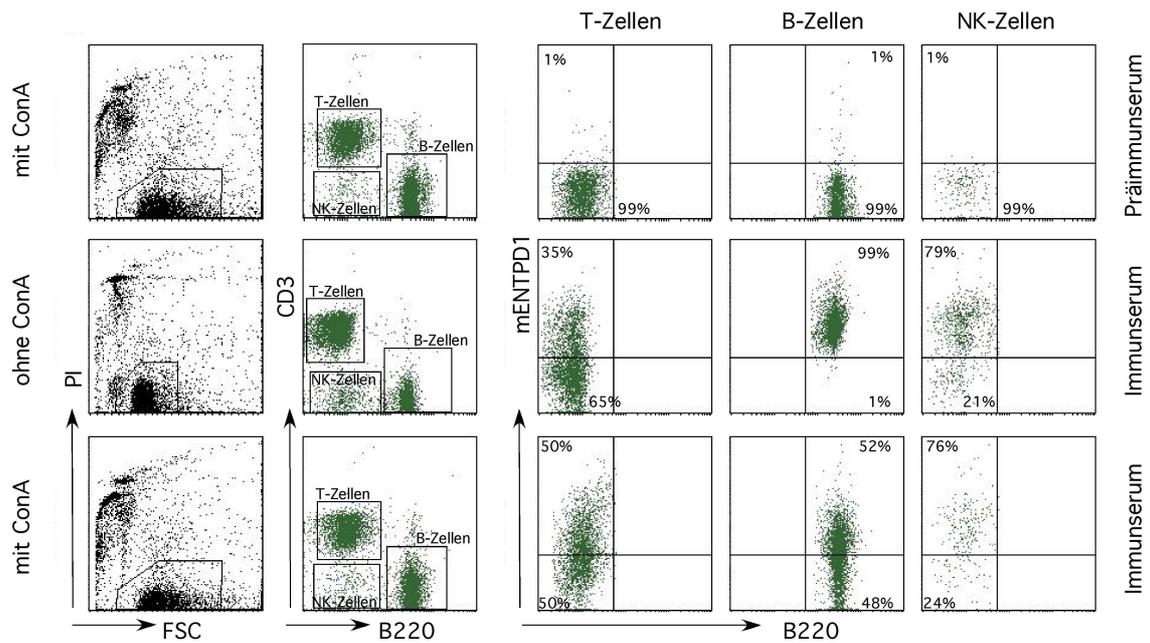


Abb. 29: Analyse der endogenen ENTPD1 Expression auf primären murinen Milzzellen. Zur Definition der Lymphozytenpopulationen wurde zunächst aufgrund der Scatter-Eigenschaften ein Analyse-Gate auf die Lymphozyten gesetzt (linke Spalte). Innerhalb dieses Gates wurden T- Lymphozyten (CD3+/B220-) und B- Lymphozyten (CD3-/B220+) definiert. Die verbleibenden CD3-/B220- Lymphozyten wurden hier als natürliche Killerzellen (NK-Zellen) definiert. Eine ENTPD1-Expression ist auf T- und B- Lymphozyten, sowie auf den NK-Zellen erkennbar. Nach der Stimulation mit ConA (untere Reihe) steigt die ENTPD1-Expression auf den T- Zellen, wohingegen sie bei den NK-Zellen gleich bleibt und bei den B-Zellen etwas abnimmt. Als Negativkontrolle wurden die Milzzellen mit dem Präimmunserum angefärbt (obere Reihe).

3.3.3.2 Analyse der ENTPD1 Expression auf T-Lymphozyten

Aufgrund der Anfärbung mit CD3 und CD4 wurden die T-Lymphozyten weiter eingeteilt in CD3+/CD4+ Zellen (T-Helferzellen) und in CD3+/CD4- Zellen (zytotoxische T-Zellen). Auf beiden T-Zellsubpopulationen konnte ENTPD1 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden, wobei sich bei den CD4-, zytotoxischen Zellen ein Kontinuum von negativen, schwach positiven und positiven Zellen zeigt (**Abb. 30**). Diese ENTPD1 Expression wird nach der ConA-Stimulation auf der gesamten Zellpopulation hochreguliert. Bei den CD4+ T-Helferzellen ist eine Subpopulation von ENTPD1-positiven Zellen abzugrenzen. Ein Teil dieser positiven Zellen entspricht wahrscheinlich den regulatorischen T-Zellen (Tregs). Die ENTPD1 Expression auf den T-Helferzellen scheint nach Stimulation mit ConA in etwa gleich zu bleiben, betrachtet

Ergebnisse

man allerdings die vorher gut abgrenzbare Subpopulation von ENTPD1 positiven Zellen, sieht es so aus, als ob auch hier die ENTPD1-Expression hochreguliert wurde.

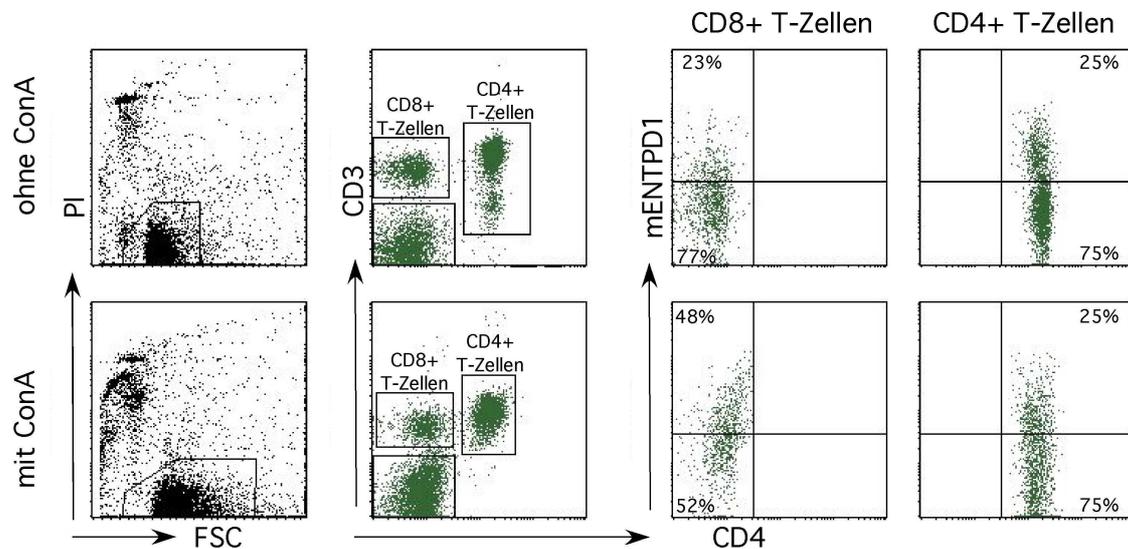


Abb. 30: Analyse der endogenen ENTPD1 Expression auf primären murinen T-Zellsubpopulation aus der Milz. Aufgrund der Anfärbung der Milzzellen mit CD3 und CD4 wurden die T-Lymphozyten als T-Helferzellen (CD3+/CD4+) oder zytotoxische T-Zellen (CD3+/CD4-) definiert und in entsprechende Gates eingeschlossen. Die Expression von ENTPD1 ist auf beiden T-Zellsubpopulationen erkennbar. Nach der Stimulation mit ConA steigt die ENTPD1-Expression deutlich auf den CD8+ T-Zellen und auch die vorher abgrenzbare Subpopulation von mENTPD1-positiven CD4+ T-Zellen scheint eine einheitlichere, hochregulierte mENTPD1 Expression aufzuweisen.

3.3.3.3 Analyse der endogenen ENTPD1 Expression auf primären murinen CD4⁺/CD25⁺ -Lymphozyten

In der Abbildung 31 sieht man, dass ein Teil der ENTPD1 positiven CD4+ T-Helferzellen auch CD25 positiv sind, und dass vor allem nahezu alle CD4⁺/CD25⁺ doppelt positiven Lymphozyten, eine positive Expression von ENTPD1 auf ihrer Zelloberfläche zeigen (**Abb. 31**). Die Markerkombination CD4⁺/CD25⁺ in einer naiven Maus ist typisch für die Population der regulatorischen T-Zellen (Tregs). Nach der Stimulation der Zellen mit ConA steigt zum einen die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf den CD4+ Zellen erwartungsgemäß an, zum anderen steigt auch die Expression von ENTPD1 auf diesen CD4⁺/CD25⁺ doppelt positiven Lymphozyten.

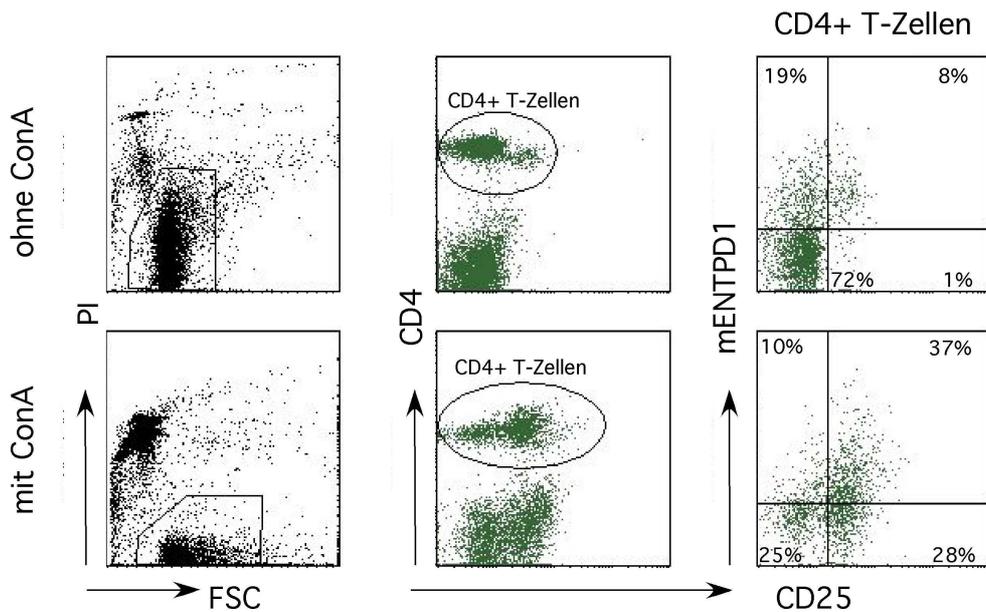


Abb. 31: Analyse der endogenen ENTPD1 Expression auf primären murinen CD4+CD25+-Lymphozyten. Für die FACS-Analysen wurden je $1 \cdot 10^7$ Zellen nach Inkubation mit oder ohne ConA mit CR44 anti mENTPD1 (1:400), anti mCD4 APC (1:100) und anti mCD25 FITC (1:100) und anti rabbit PE (1:100) gefärbt.

3.3.3.4 Analyse der ENTPD1 Expression auf primären murinen Makrophagen

CD11b (Mac-1) ist ein Zelloberflächenprotein auf Makrophagen und wird als Marker für diese Zellpopulation genutzt. Wie in der Abbildung 32 dargestellt, weisen fast alle CD11b positiven Zellen ENTPD1 auf ihrer Zelloberfläche auf (**Abb. 32**). Nach der Stimulation mit ConA nimmt die Expressionsrate von ENTPD1 allerdings etwas ab, wobei zu beachten ist, dass die Zellzahl nach der Inkubation mit ConA über Nacht und die Anzahl der CD11b positiven Zellen insgesamt weniger geworden ist

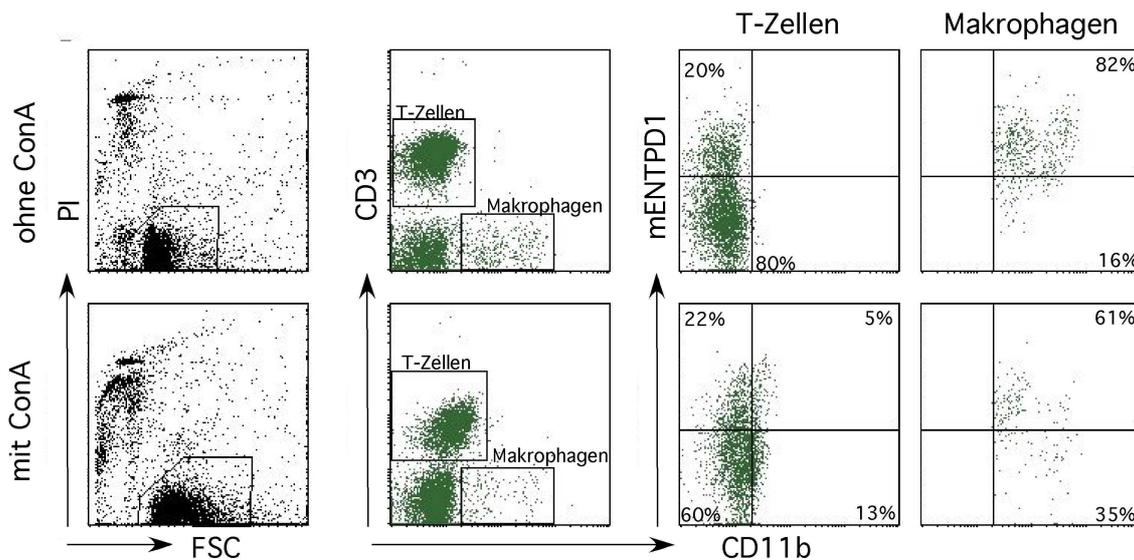


Abb. 32: Analyse der endogenen ENTPD1 Expression auf primären murinen Makrophagen aus der Milz. Aufgrund der Anfärbung der Milzzellen mit CD3 und CD11b wurden die CD3+/CD11b-Zellen als T-Zellen und die CD3-/CD11b+ Milzzellen als Makrophagen definiert und in entsprechende Gates eingeschlossen. Etwa die Hälfte der T-Zellen und nahezu alle Makrophagen sind ENTPD1 positiv. Nach der Stimulation mit ConA nimmt die ENTPD1-Expression auf den T-Zellen etwas zu. Die Zahl der Makrophagen und ihre Expression von ENTPD1 sinken nach der Behandlung mit ConA.

3.3.3.5 Koexpression von ENTPD1 mit CD38

CD38 ist ein Ektoenzym mit NADase, ADPR-Zyklase, sowie cADPR-Hydrolase-Aktivitäten. Es kommt beim Menschen auf einer Vielzahl von Immunzellen, wie CD4+ und CD8+ T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen vor. In der Immundiagnostik gilt CD38 als ein Marker für aktivierte T-Zellen, und wird als Differenzierungsmarker von B-Zellen genutzt. Die **Abb. 33** zeigt, dass nahezu alle B-Zellen (definiert als CD3-Zellen) ENTPD1 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Dies stimmt mit der ENTPD1 Expression der B220 angefärbten B-Lymphozyten in Abbildung 29 überein. Nach der Stimulation mit ConA nimmt die ENTPD1 Expression etwas ab. Bei den CD38+ T-Zellen (CD3+/CD38+) konnte ENTPD1 ebenfalls auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. So sind alle CD38 positiven T-Zellen auch ENTPD1 positiv. Durch Stimulation der Zellen mit ConA exprimierten die CD3+ T-Zellen zum einen mehr CD38 und zum anderen stieg die Expression von ENTPD1 auf den CD3+/CD38+ Zellen an.

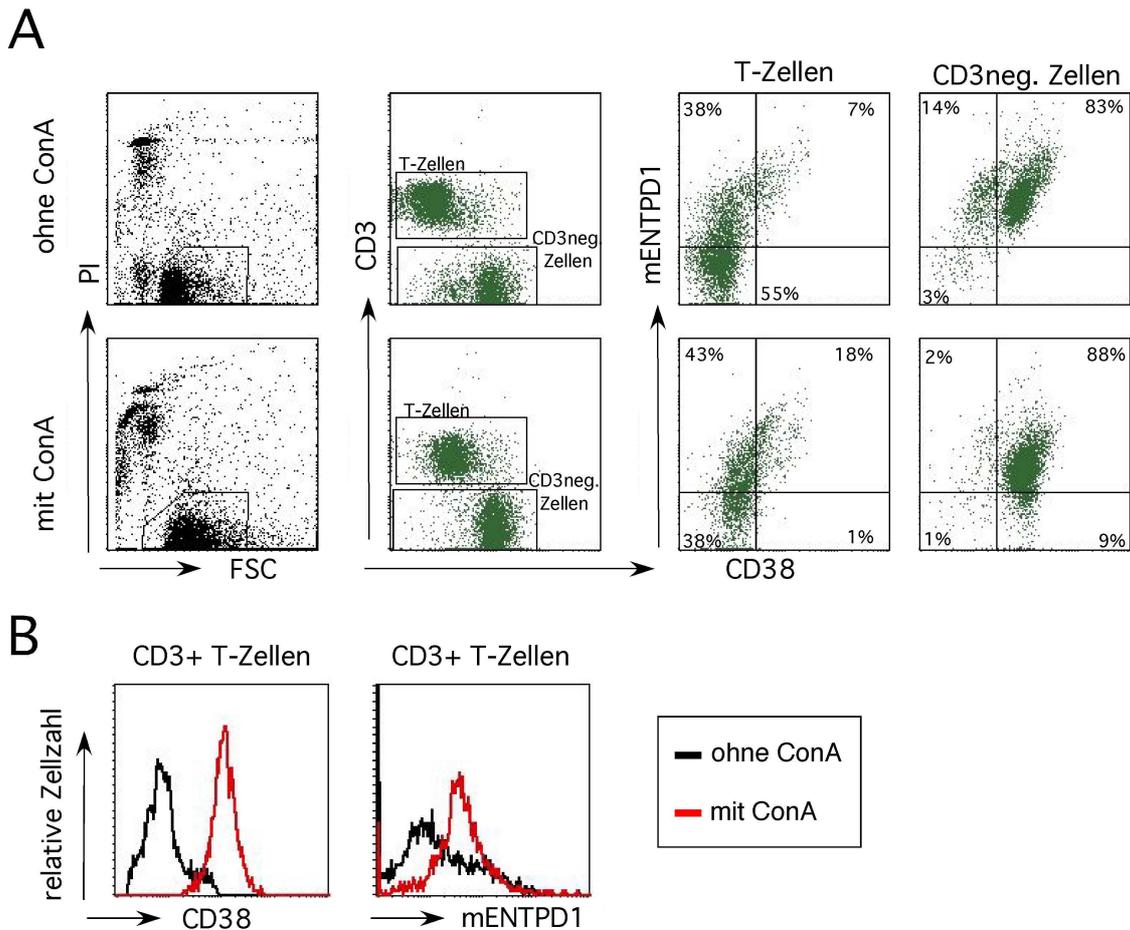


Abb. 33: Analyse der endogenen ENTPD1 Expression auf primären murinen CD38+ Zellen aus der Milz. (A) Aufgrund der Anfärbung der Milzzellen mit CD3 wurden die CD3+ Zellen als T-Zellen und die CD3- Zellen als B-Zellen definiert und in entsprechende Gates eingeschlossen. Diejenigen T-Zellen, die CD38 exprimieren, besitzen auch ENTPD1 auf ihrer Oberfläche. Nach Stimulation mit ConA nimmt die Anzahl der CD38+/ENTPD1+ doppelt positiven T-Zellen zu. Nahezu alle B-Zellen sind CD38+/ENTPD1+ doppelt positiv. **(B)** Das linke Histogramm zeigt die Zunahme der CD38 Expression, das rechte die Zunahme der ENTPD1 Expression auf den hier definierten T-Zellen nach Stimulation mit ConA.

3.3.3.6 Koexpression von ENTPD1 mit CD62L

CD62L ist ein Zelloberflächenprotein, das auf ruhenden T-Zellen nachgewiesen werden kann und dessen Expression bei aktivierten T-Zellen abnimmt. So ist auch in **Abb. 34** zu sehen, dass die Zahl der CD62L positiven T-Zellen nach der Stimulation mit ConA kleiner wird. In Einklang mit den oben dargestellten Ergebnissen zeigt sich auch hier, dass die ENTPD1-Expression auf aktivierten, also CD62L-negativen Zellen, besonders hoch ist.

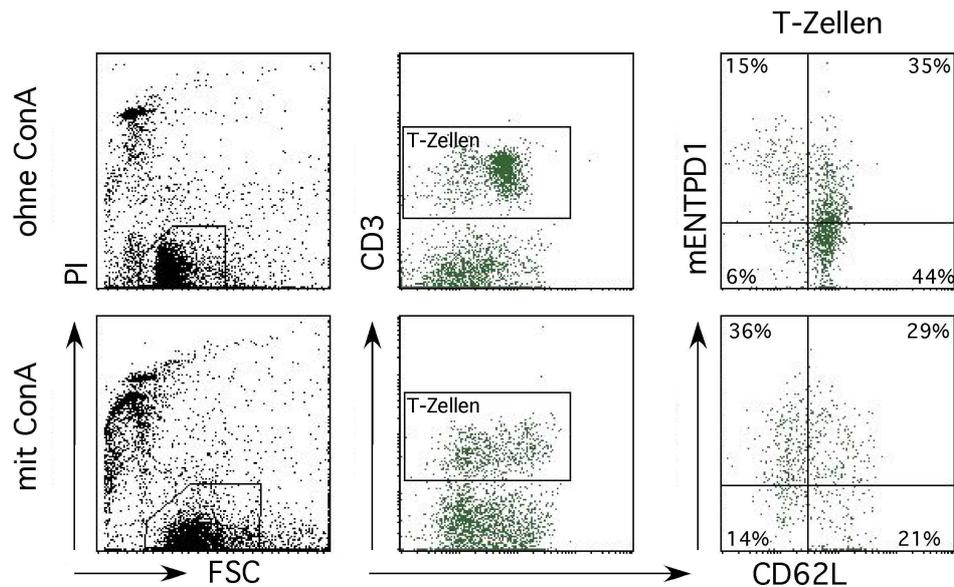


Abb. 34: Analyse der endogenen ENTPD1 Expression auf primären murinen CD62L+ Zellen aus der Milz. Aufgrund der Anfärbung der Milzzellen mit CD3 wurden die CD3+ Zellen als T-Zellen und die CD3- Zellen als B-Zellen definiert und in entsprechende Gates eingeschlossen. Die Expression von CD62L ist auf den ruhenden T-Zellen grösser als auf den durch ConA aktivierten T-Zellen. Die untersuchte ENTPD1 Expression ist unabhängig von der CD62L Expression.

3.3.3.7 Koexpression von ENTPD1 mit CD69

CD69 ist ein klassischer Aktivierungsmarker. Er zeichnet sich dadurch aus, dass seine Expression nach Stimulierung früh und schnell hochreguliert wird. Sowohl auf den T-Zellen, als auch auf den B-Zellen nimmt die Anzahl der CD69 positiven Zellen nach der Stimulation mit ConA zu.

3.3.3.8 Koexpression von ENTPD1 mit P2X7

P2X7 konnte auf den hier untersuchten Milzzellen nur in sehr geringem Maße nachgewiesen werden. Allerdings zeigt die **Abb. 35**, dass die wenigen B- und T-Zellen, die höher positiv für P2X7 sind, auch ENTPD1 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Eine Aussage darüber, wie sich die Expression von ENTPD1 und P2X7 nach Stimulation mit ConA verändert, ist aufgrund der geringen positiven Zellzahl schwierig. Zur Anfärbung der Zellen wurde der monoklonale Antikörper Ratte-anti-Maus P2X7 / RH23-A44 verwendet.

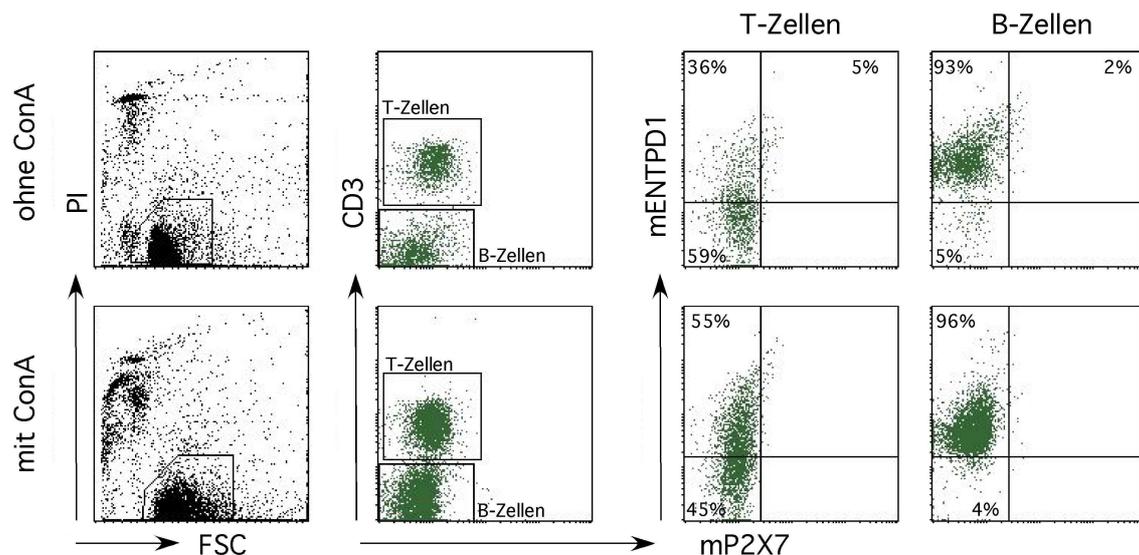


Abb. 35: Analyse der endogenen ENTPD1 Expression auf primären murinen P2X7+ Zellen aus der Milz. Aufgrund der Anfärbung der Milzzellen mit CD3 wurden die CD3+ Zellen als T-Zellen und die CD3- Zellen als B-Zellen definiert und in entsprechende Gates eingeschlossen. Es geht hervor, dass diejenigen B- und T-Zellen, die P2X7 positiv sind, auch ENTPD1 auf ihrer Oberfläche exprimieren.

3.4 Analyse der Enzymaktivitäten von ENPPs

Dieser Teil meiner Arbeit widmet sich der genaueren Analyse der enzymatischen Aktivitäten der einzelnen Familienmitglieder der ENPPs und wie sie sich in diesen Aktivitäten unterscheiden. Es soll vor allem die Frage geklärt werden, ob ENPPs als Gegenspieler von ARTs agieren, indem sie das Substrat NAD spalten oder die ADP-Ribosylierung von Proteinen teilweise rückgängig machen durch Abspaltung von AMP unter Zurücklassung eines Phosphoribose-Restes (**Abb. 7**). Hierfür wurden unterschiedliche Untersuchungsmethoden, wie FACS-Analysen, ELISA und Dünnschichtchromatographien angewandt.

3.4.1 Untersuchung der potenziellen NADase Aktivität von hENPP2 in transient transfizierten HEK.T-Zellen mittels Dünnschichtchromatographie

Wie in der Einleitung schon beschrieben, kann es bei Vorkommen von NAD im Extrazellularraum zur ADP-Ribosylierung von Proteinen durch die Aktivität der ADP-Ribosyltransferase-2 (ART2) kommen. Die ADP-Ribosylierung von P2X7 durch ART2 führt bei naiven T-Lymphozyten zum NAD induzierten Zelltod, der vermutlich einen regulatorischen Mechanismus des Immunsystems darstellt. Phosphodiesterasen wie

Ergebnisse

ENPP2 sind theoretisch in der Lage, NAD zu spalten, und könnten daher möglicherweise auch ADP-Ribosylreste von Proteinen der Zelloberfläche entfernen. Damit könnten sie als Gegenspieler von ART2 Einfluss auf das Immunsystem nehmen. Um eine mögliche NADase Aktivität von ENPP2 zu ermitteln, wurden HEK.T-Zellen mit hENPP2-Konstrukten transfiziert. Zwei Tage nach der transienten Transfektion mit den Konstrukten pc.DNA3.1/hENPP2 (sezernierte Form), P38tm/hENPP2 (membranverankerte Form) oder EGFP als Negativkontrolle wurden je 1×10^6 Zellen mit $0,5 \mu\text{Ci } ^{32}\text{P}$ NAD in $1 \mu\text{M}$ „kaltem“ NAD für 30min inkubiert. Anschliessend wurden je $10 \mu\text{l}$ des Zellüberstands auf Dünnschichtchromatographie-Platten geladen. Als Positivkontrollen wurden eine NADase und eine Phosphodiesterase aus Schlangengift eingesetzt (**Abb. 36**).

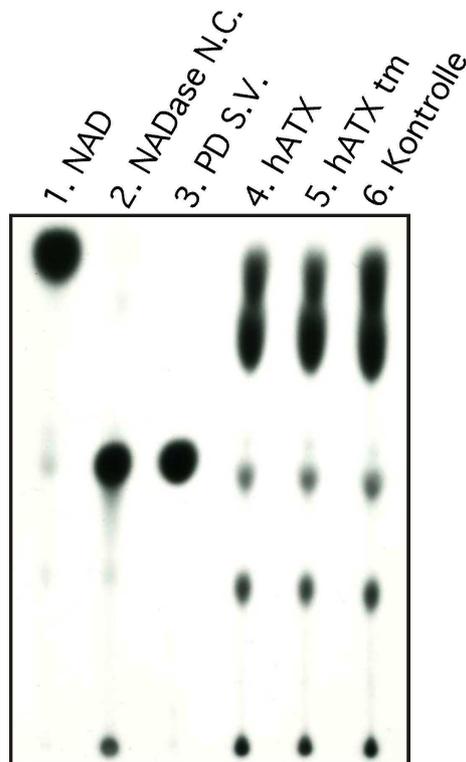


Abb. 36: Analyse der NADase Aktivität in HEK.T-Zellen transient transfiziert mit hENPP2 mittels Dünnschichtchromatographie. 2 Tage nach der transienten Transfektion der HEK.T-Zellen mit pcDNA3.1/hENPP2, P38tm/hENPP2 und EGFP (Kontrolle) wurden 1×10^6 Zellen in $100 \mu\text{l}$ RPMI mit $1 \mu\text{M}$ „kaltem“ NAD und $0,5 \mu\text{Ci } ^{32}\text{P}$ NAD für 30min bei 37°C inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren wurden $10 \mu\text{l}$ vom Zellüberstand auf die TLC-Platte geladen, sowie $1 \mu\text{l}$ NADase ($0,5\text{U}$) in $100 \mu\text{l}$ RPMI pur und $1 \mu\text{l}$ Phosphodiesterase (PD 1%) aus S.V. (Schlangengift, snake venom) in $100 \mu\text{l}$ RPMI pur als Positivkontrolle und $1 \mu\text{l}$ NAD in $100 \mu\text{l}$ RPMI pur. Die Platte wurde für 5min in 1M Essigsäure bzw. für 20-30min in $0,9\text{M}$ Essigsäure + $0,3\text{M}$ Lithiumchlorid gestellt.

Ergebnisse

Wie erwartet, setzten die Positivkontrollen, nämlich die NADase und die Phosphodiesterase aus dem Schlangengift, NAD um. Die mit hENPP2 transfizierten Zellen verhielten sich allerdings genauso wie die mit der Negativkontrolle EGFP transfizierten Zellen. Eine NADase Aktivität von hENPP2 konnte somit nicht nachgewiesen werden.

3.4.2 Analyse der De-ADP-Ribosylierungsaktivität von ENPPs

Um zu überprüfen, ob die ENPPs in der Lage sind, die ADP-Ribosylierung von Proteinen rückgängig zu machen, wurden CHO.NOD-Zellen verwendet, die stabil mit der ART2 transfiziert sind. Diese wurden einen Tag nach der transienten Transfektion mit den jeweiligen ENPP Konstrukten für 30min bei 37°C mit 25µM etheno-NAD (eNAD) inkubiert, um die Zelloberflächenproteine zu ADP-ribosylieren. Noch lösliches eNAD wurde durch zweimaliges Waschen mit DMEM Medium pur entfernt und die Zellen nach 0min, 30min, 60 min und 120min auf Eis gestellt. Um das Ausmaß der Oberflächen-ADP-Ribosylierung zu messen, folgte die Anfärbung im FACS mit dem monoklonalen Antikörper 1G4, der in die Oberflächenproteine eingebautes etheno-Adenosin erkennt. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem Immunserum gegen das entsprechende ENPP angefärbt. Als Negativkontrollen wurden zum einen CHO.NOD-Zellen mit mENTPD1 transfiziert, von dem man keine De-ADP-Ribosylierungsaktivität erwartet und zum anderen wurden die CHO.NOD-Zellen, die nicht mit eNAD inkubiert wurden, ebenfalls mittels FACS-Analyse gemessen. **Abb. 37** und **Abb. 38** zeigen die Ergebnisse.

In allen drei Graphen erkennt man, dass bei den Zellen, die mit eNAD inkubiert wurden, eine ADP-Ribosylierung der Oberflächenproteine durch die ART2 stattgefunden hat. Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen, die nicht mit eNAD inkubiert wurden, keine Reaktion mit dem Antikörper 1G4. Bei beiden hENPP2 Konstrukten ließ sich ein Rückgang der 1G4 Anfärbung nach 120min feststellen, was auf eine mögliche De-ADP-Ribosylierungsaktivität dieser Enzyme hinweisen könnte. Betrachtet man allerdings die Negativkontrolle, die mit mENTPD1 transfizierten Zellen, so war auch hier eine Abnahme der 1G4 Anfärbung sichtbar.

Ergebnisse

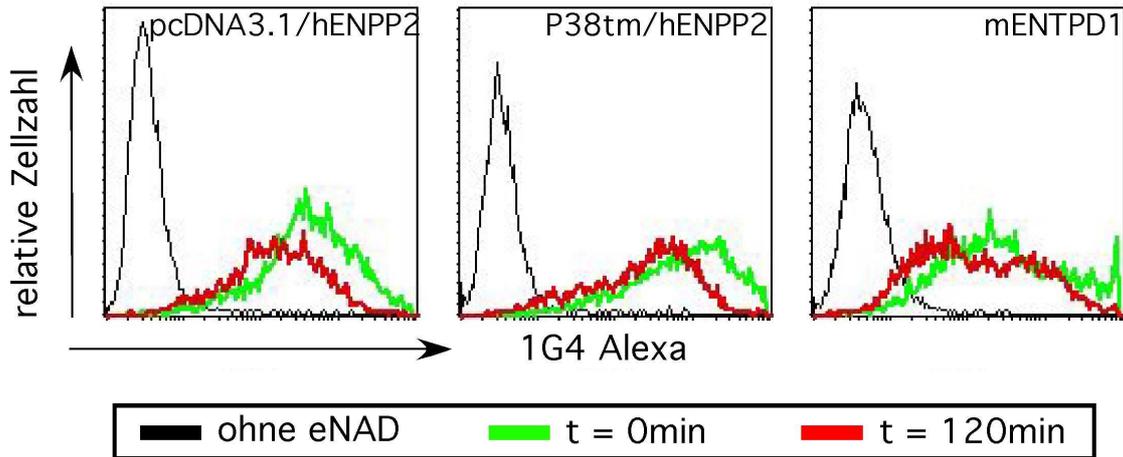


Abb. 37: Analyse der De-ADP-Ribosylierungsaktivität von hENPP2 mittels FACS. Einen Tag nach der transienten Transfektion mit dem jeweiligen hENPP2 bzw. mENTPD1 Konstrukt wurden die CHO.NOD Zellen, die stabil mit der ART2 transfiziert sind, für 30min bei 37°C mit 25µM eNAD inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit DMEM Medium pur wurden die Zellen nach 0min, 30min, 60 min und 120min auf Eis gestellt. Es folgte die Anfärbung im FACS mit 1G4 Alexa (1:100) und dem Immunsereum (1:800) gegen das entsprechende ENPP. Als Negativkontrolle wurden CHO.NOD-Zellen mit mENTPD1 transfiziert (schwarz: Zellen, die nicht mit eNAD inkubiert wurden; grün: Zellen, die direkt nach der Inkubation mit eNAD auf Eis gestellt wurden; rot: Zellen, die 120min nach der Inkubation mit eNAD auf Eis gestellt wurden).

Diese Ergebnisse würden eher für eine endogene De-ADP-Ribosylierungsaktivität der CHO.NOD-Zellen sprechen. Um dies zu testen, wurde ein erneuter Versuch, diesmal mit mehreren unterschiedlichen ENPPs, durchgeführt (**Abb. 38**).

Dieser bestätigt die Ergebnisse des ersten Versuchs. So ist sowohl die ADP-Ribosylierung der Zielproteine nach der Inkubation mit eNAD bei allen Zellen zu erkennen, als auch die Abnahme der 1G4 Anfärbung nach 120min. Dabei ist kein wesentlicher Unterschied zwischen den ENPPs und des mENTPD1 als Negativkontrolle festzustellen. Zusammengefasst bleibt festzuhalten, dass aufgrund der hohen endogenen De-ADP-Ribosylierungsaktivität auf den eingesetzten CHO.NOD- Zellen mit diesem Versuchsaufbau eine zusätzliche De-ADP-Ribosylierungsaktivität durch ENPPs nicht sicher nachgewiesen werden kann.

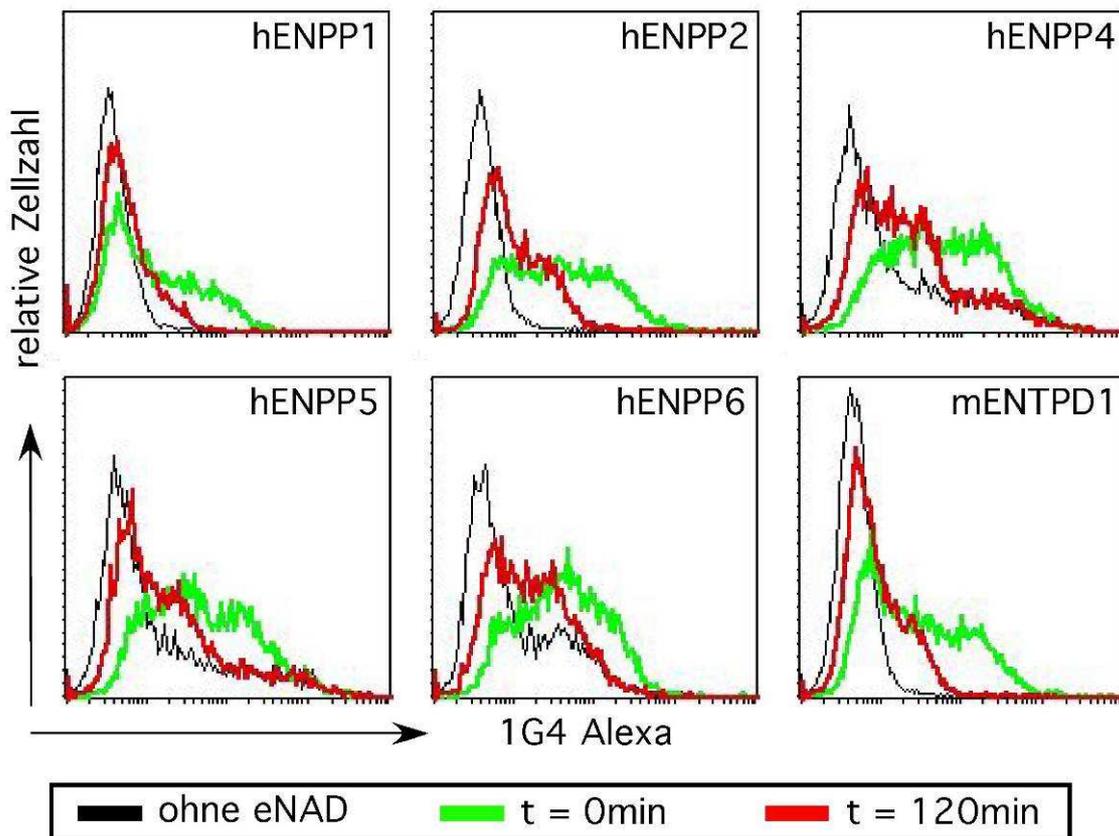


Abb. 38: Analyse der De-ADP-Ribosylierungsaktivität von hENPP1, 2, 4, 5, 6 mittels FACS an transient transfizierten CHO.NOD Zellen. Nach der Inkubation der CHO.NOD Zellen mit 25 μ M eNAD für 30min wurden diese zweimal mit DMEM Medium pur gewaschen und nach 0min, 30min, 60 min bzw. 120min auf Eis gestellt. Es folgte die Anfärbung im FACS mit 1G4 Alexa (1:100) und dem Immunsereum (1:800) gegen das entsprechende ENPP. Als Negativkontrolle wurden CHO.NOD Zellen mit mENTPD1 transfiziert. Bei allen Zellen ist sowohl eine ADP-Ribosylierung der Oberflächenproteine durch die 1G4 Färbung als auch eine Abnahme dieser Färbung nach 120min sichtbar. (schwarz: Zellen, die nicht mit eNAD inkubiert wurden; grün: Zellen, die direkt nach der Inkubation mit eNAD auf Eis gestellt wurden; rot: Zellen, die 120min nach der Inkubation mit eNAD auf Eis gestellt wurden).

3.4.3 Charakterisierung der Phosphodiesteraseaktivitäten von ENPPs anhand klassischer ENPP Substrate im optischen Test

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von ENPP1, 2 und 3 stellte sich die Frage, inwieweit sich die Mitglieder der ENPP-Familie in ihren Enzymaktivitäten unterscheiden, bzw. Gemeinsamkeiten aufweisen. Auch die Beobachtung, dass ENPP3 genau wie ENPP2 die Zellmotilität beeinflusst (Deissler, Blass-Kampmann et al. 1999), warf die Frage auf, ob und inwieweit sich die Substratspezifitäten überschneiden.

Ergebnisse

Die enzymatischen Aktivitäten der ENPPs wurden anhand ihrer Fähigkeit, unterschiedliche chromogene Substrate umzusetzen, fotometrisch untersucht. Anhand von mit HA.CD38tm.hENPP1 transient transfizierten HEK.T-Zellen und unter Verwendung von TMP-pNPP als Substrat wurden zunächst einmal die optimalen Pufferbedingungen für die fotometrischen Tests ermittelt. Dabei wurde PBS mit verschiedenen pH-Werten (7,0; 8,0; 8,9), sowie 100mM Tris HCl pH 8,9 eingesetzt. Weiterhin wurden Zelllysate mit lebenden Zellen als Quellen der Enzyme verglichen. Den stärksten Farbumschlag im ELISA zeigten dabei die Zelllysate im 100mM Tris HCl pH 8,9 Puffer. Somit wurden weitere Untersuchungen unter diesen Bedingungen durchgeführt. Nur pNPP wurde im Substratpuffer angesetzt.

Nach der transienten Transfektion von HEK.T-Zellen mit hENPP1, hENPP2 und rENPP3 (jeweils im HA.CD38tm Konstrukt) sowie hENPP4, hENPP5 und hENPP6 (jeweils im EGFP-N1 Expressionsvektor) wurden 1×10^7 Zellen für die Herstellung von Triton X 100 Zelllysaten eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Zelllysate aus untransfizierten HEK.T-Zellen und dem Substratpuffer. Als Positivkontrolle wurde die Phosphodiesterase aus Schlangengift eingesetzt. Es wurden pNPPP, pNP-TMP, pNPPC und bis pNPP als Vertreter der klassischen Substrate für Phosphodiesterasen ausgewählt (**Abb. 12**). Die Zelllysate wurden 2 Stunden bei 37°C mit den Substraten inkubiert, wobei alle 15min eine Messung am Fotometer erfolgte. Gemessen wurde die Hydrolyse der Substrate durch die Entstehung von p-Nitrophenol, das eine optische Dichte bei 405nm besitzt. **Abb. 39** zeigt die Ergebnisse.

Ergebnisse

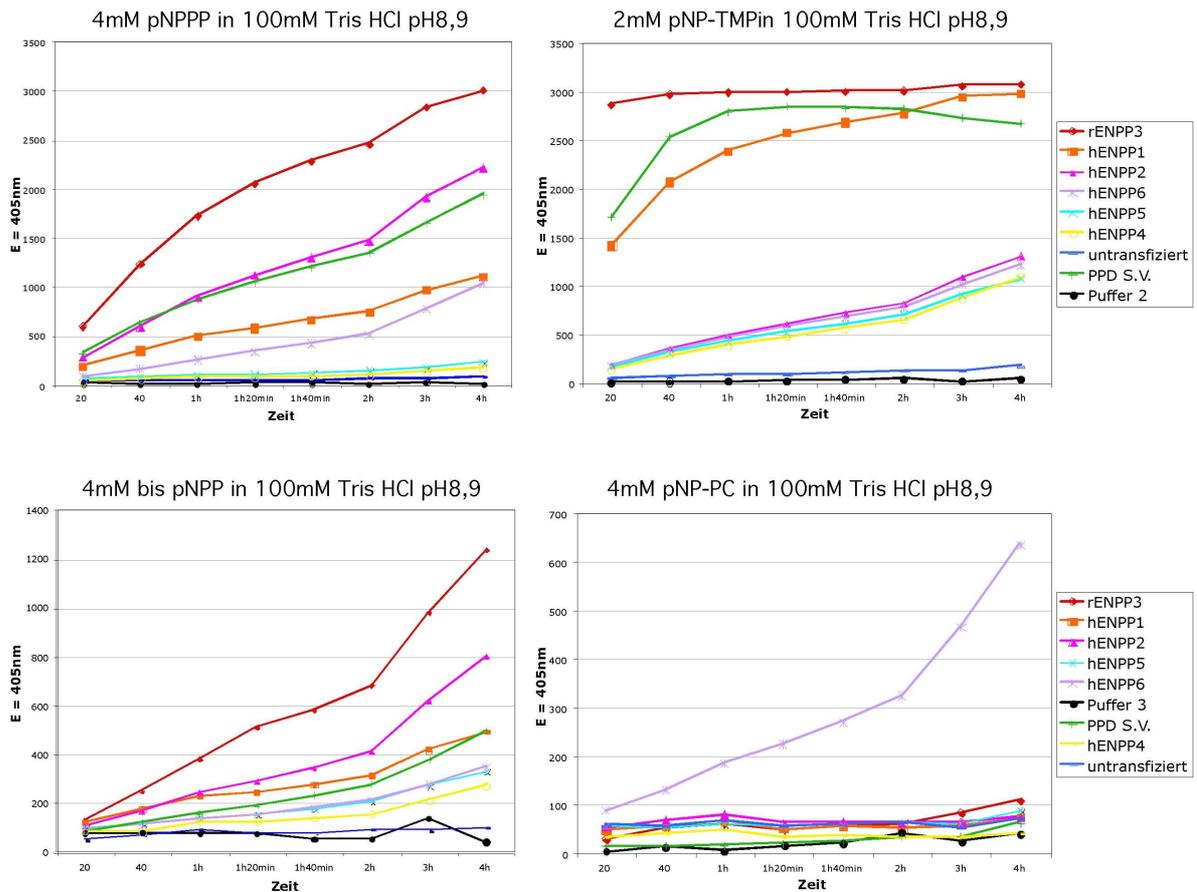


Abb. 39: Analyse der Substratspezifität der ENPP1, 2, 3, 4, 5 und 6 mittels ELISA. Hek.T-Zellen wurden transient mit hENPP1, hENPP2, rENPP3, hENPP4, hENPP5 und hENPP6 transfiziert. Die Zellysate von 1×10^7 dieser transient transfizierten Zellen wurden mit dem jeweiligen Substrat (pNPPP, pNP-TMP, bis pNPP und pNP-PC) für 2 Stunden bei 37°C inkubiert, wobei alle 15min die optische Dichte bei 405nm am Fotometer gemessen wurde. (Negativkontrolle: Puffer und Zellysate aus untransfizierten Zellen; Positivkontrolle: Phosphodiesterase aus Schlangengift).

Obwohl für die Herstellung der Zellysate jeweils die gleiche Zellzahl verwendet wurde, lässt sich keine genaue Aussage darüber machen, wieviel Enzym pro Ansatz eingesetzt wurde. Daher lässt sich vor allem die Aussage machen, ob das jeweilige Substrat vom Enzym umgesetzt wurde und nicht wie gut bzw wie schnell es abgebaut wurde. pNPPP, das zu den klassischen ENPP Substraten gezählt wird, kann mit Ausnahme von hENPP4 und hENPP5 von allen untersuchten ENPPs umgesetzt werden. Ein besonders starkes Substrat war pNP-TMP für hENPP1 und rENPP3, aber ebenso konnten alle anderen ENPPs pNP-TMP, wenn auch in schwächerer Form, hydrolysieren. Ein anderes Substrat, das klassischerweise genutzt wird, um eine Nukleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase zu prüfen ist bis-pNPP. Dies ist insofern ein ungewöhnliches Substrat, weil es weder ein Nukleotid- noch ein Lysophospholipid-

Ergebnisse

Derivat ist. Alle getesteten ENPPs vermögen bis-pNPP zu hydrolysieren, wobei rENPP3 und hENPP2 dies anscheinend besonders gut machen. Ein Produkt bei der Hydrolyse von bis-pNPP ist pNPP, das in vitro ein klassisches Substrat der alkalischen Phosphatase ist. Trotz der strukturellen und katalytischen Ähnlichkeiten zwischen den ENPPs und der alkalischen Phosphatase, war kein ENPP in der Lage, pNPP zu hydrolysieren (in der Abbildung nicht gezeigt). Desweiteren wurde die Enzymaktivität an pNP-PC, einem klassischen Substrat für Phospholipase C, geprüft. Nur hENPP6 konnte dieses abbauen und alle anderen ENPPs waren uneffektiv. Sogar die Phosphodiesterase aus dem Schlangengift, die alle anderen getesteten Substrate umgesetzt hat, konnte pNP-Pc nicht hydrolysieren. Auffällig ist ausserdem, dass hENPP4 und hENPP5, die sich strukturell innerhalb der ENPP Familie am nächsten stehen, alle untersuchten Substrate in etwa gleich stark umsetzen.

4 Diskussion

Die Diskussion der Ergebnisse gliedert sich in drei Teile. Als erstes erfolgt die Darstellung der ADAPINCs und ihrer Fähigkeit, ihr Antigen in den unterschiedlichen Untersuchungsmethoden zu erkennen. Der zweite Teil beschäftigt sich mit der Expression der ENTPDs auf murinen und humanen Zelllinien, wobei insbesondere auf die Expression von ENTPD1 auf den primären murinen Milzzellen eingegangen wird. Desweiteren werden die Funktionen und die Rolle von ENTPD1 und anderer ENTPDs besprochen. Im dritten Teil werden die unterschiedlichen Enzymaktivitäten der ENPPs und ihre Funktionen erörtert. Zum Schluss werden Perspektiven für weiterführende Arbeiten gegeben, die zusätzliche Einblicke in die Interaktionen zwischen den Ektonukleotidasen erlauben könnten.

4.1 ADAPINCs als Werkzeuge zur Charakterisierung von Ektonukleotidasen

Ektonukleotidasen wie die ENTPDs und die ENPPs sind Enzyme, die, wie man heute weiß, auf vielen unterschiedlichen Zelloberflächen und Gewebearten vorkommen. Die genauere Untersuchung dieser Enzyme im Hinblick auf ihre individuellen Eigenschaften wurde bisher durch das Fehlen von geeigneten Antikörpern erschwert. Der Mangel an brauchbaren Antikörpern lässt sich auf verschiedene Ursachen zurückführen. Zum einen sind einige Mitglieder dieser Enzymfamilien erst vor kurzer Zeit durch Homologiesuchen in Gendatenbanken identifiziert worden, sodass noch keine Werkzeuge verfügbar sind. Zum anderen mag der Grund darin liegen, dass Immunisierungen gegen Membranproteine, insbesondere solche, die mehr als eine Transmembranregion haben, häufig schwierig sind. Außerdem ist die Herstellung von rekombinanten Antikörpern schwer, weil die korrekte Faltung häufig von der Membranverankerung abhängig ist. Die einfachste Methode ist es, anti-Peptid-Antikörper zu generieren. Diese können aber nur gegen lineare Epitope hergestellt werden, und erkennen ihr Antigen häufig nur in der denaturierten Form. Sie sind somit geeignet für Western Blot Untersuchungen, aber z.B. nicht für Immunfluoreszenz-Analysen, Durchflusszytometrie oder Affinitätschromatographien.

In dieser Arbeit habe ich eine Serie von Antiseren und Antikörpern untersucht, die gegen verschiedene Mitglieder der Enzymfamilien der Ektonukleotid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen (ENTPDs) und der Ektonukleotid Pyrophosphatasen/

Diskussion

Phosphodiesterasen (ENPPs) gerichtet sind. Diese Antiseren wurden mit dem ausdrücklichen Ziel erzeugt, ihre Zielantigene in ihrer natürlichen dreidimensionalen Konformation zu erkennen. Daher wurde zu ihrer Herstellung die Methode der genetischen Immunisierung angewendet. Die genetische Immunisierung verbindet die Einfachheit der Peptid-Immunisierung (direkter Zugang zur Immunisierung aus der Kenntnis der Sequenz ohne die Notwendigkeit der rekombinanten Herstellung des Proteins) mit dem Vorteil, dass Antikörper gegen das Antigen in seiner nativen Konformation gebildet werden (Tang, DeVit et al. 1992; Koch-Nolte, Duffy et al. 1999).

Zunächst war es notwendig nachzuweisen, dass die Antiseren in der Lage sind, ihre Zielantigene spezifisch in ihrer nativen Form zu erkennen. Da in der Regel keine gesicherten Informationen über die Expression auf bestimmten Zellpopulationen vorlagen, wurde dieser Nachweis anhand spezifisch mit dem Zielantigen transfizierter Zellen geführt. Diese Vorgehensweise erlaubte eine saubere Analyse der Spezifität der Antiseren, da die Untersuchung parallel an Zellen geführt werden konnte, die sich nur durch die Expression des Zielantigens unterscheiden. In diesem System wurde die Eignung der Antikörper für Immunfluoreszenz (Mikroskopie sowie Durchflusszytometrie), als auch für den Western Blot untersucht.

Für die Immunfluoreszenz wurde ein Verfahren entwickelt, das erlaubte, in einem einzigen Ansatz die Spezifität der Antikörperbindung zu beurteilen. Da in jedem Transfektionsansatz auch Zellen dabei sind, die nicht transfiziert wurden, enthalten die Ansätze ihre eigene Spezifitätskontrolle. Um transfizierte von nicht transfizierten Zellen in einem Ansatz unterscheiden zu können, wurden transfizierte Zellen durch Ko-Transfektion eines in seiner Expression auf den Zellkern begrenzten grün fluoreszierenden Proteins (EGFP) kenntlich gemacht. Dies wurde dadurch erreicht, dass das GFP mit dem Kernlokalisierungssignal aus dem Transkriptionsfaktor LKLF fusioniert wurde. Dieses Vorgehen machte es möglich, die Reaktivität der Antikörper in einem einzigen Ansatz mit eingebauter Spezifitätskontrolle zu beurteilen, und führte daher zu einer erheblichen Arbeitseinsparung.

Die **Tab. 8** gibt einen Überblick über die von mir im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Antikörper, ihre Spezifität und ihre Eignung für verschiedene Anwendungen. Zusammenfassend ist zu sagen, dass alle der hier näher untersuchten Immunsereen gegen ENTPD1, 2, 5, und 6 ihr Antigen erkannten, wobei diese Immunsereen unterschiedlich starke Reaktivität gegenüber ihrem spezifischen Epitop in den verschiedenen getesteten

Diskussion

Untersuchungsmethoden aufwiesen. Durch den Einsatz des Präimmunserums als Negativkontrolle konnte eine unspezifische Bindung ausgeschlossen werden.

Tab. 8: Übersicht über die von mir untersuchten Antiseren. Aufgeführt sind die in dieser Arbeit ermittelten optimalen Titer (+++ = sehr gute Reaktion; ++ = gute Reaktion; + = Reaktion sichtbar; - = keine Reaktion; n.u. = nicht untersucht).

Antikörper	Aus	Spezifität	Titer in der IF	FACS (1:800)	WB (1:500)
ENTPD Familie					
CR44	Kaninchen	mENTPD1	1:6400 +++	+++	+++
CR45	Kaninchen	mENTPD2	1:1600 +++	++	++
5441	Kaninchen	hENTPD2	1:1600 +++	++	+
CR46	Kaninchen	mENTPD6	1:400 +++	+	-
CR47	Kaninchen	mENTPD5	1:200 +++	-	+
5446	Kaninchen	hENTPD5	1:100 +++	-	-
ENPP Familie					
Kan32	Kaninchen	hENPP2	1:100 +++	n.u.	n.u.
K2G	Kaninchen	hENPP2	1:200 +++	+++	n.u.
CR65	Kaninchen	mENPP4	1:800 +++	n.u.	n.u.
CR66	Kaninchen	mENPP5	1:400 +++	n.u.	n.u.
CR67	Kaninchen	mENPP6	1:800 +++	n.u.	n.u.

CR44 (anti-mENTPD1) erwies sich als stärkstes Immunserum und ließ auch bei höheren Verdünnungen sowohl in der Immunfluoreszenz, als auch in der FACS-Analyse und im Western Blot eine sehr gute Anfärbbarkeit seines spezifischen Antigens erkennen (**Abb. 18**; **Abb. 24**; **Abb. 26**). Als ähnlich gut stellten sich die beiden ADAPINCs CR45 und 5441 gegen das murine und humane ENTPD2 dar. Sie konnten in allen Analysen ihr Antigen erkennen, allerdings mit etwas schwächerer Reaktivität als CR44 (anti-mENTPD1). Die Reaktivität von CR46 (anti-mENTPD6), CR47 (anti-mENTPD5) und 5446 (anti-hENTPD5) war schwieriger zu beurteilen, da die Zielantigene ganz oder teilweise von der Membran abgespalten werden können oder es sich von vornherein um sezernierte Proteine handelt. In diesen Fällen wurde die Immunfluoreszenz-Untersuchung an fixierten und permeabilisierten Zellen durchgeführt, um das Antigen vor der Sekretion intrazellulär anzufärben. CR47 konnte

Diskussion

das sezernierte mENTPD5 in der intrazellulären Immunfluoreszenz-Analyse (**Abb. 19**) und im Western Blot (**Abb. 26**) spezifisch detektieren. Keine Anfärbbarkeit, auch nicht nach Permeabilisierung der Zellen, zeigte sich jedoch im FACS. Die Reaktivität von CR46 (anti-mENTPD6) in der Oberflächenanfärbung glich in der Immunfluoreszenz-Analyse der Reaktivität in der intrazellulären Anfärbung. Nur schwach konnte CR46 sein Antigen im FACS detektieren, wohingegen eine Anfärbbarkeit im Western Blot nicht gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit publizierten Beobachtungen, dass ENTPD6 teilweise in der Zellmembran verankert bleibt und teilweise von der Zelle sezerniert wird (Robson, Seigny et al. 2006). Das Antiserum 5446 gegen das sezernierte hENTPD5 erwies sich als schwächstes der in dieser Arbeit untersuchten Immunsereen. Lediglich in der Immunfluoreszenz-Analyse ließ es eine schwache Reaktivität mit seinem Antigen erkennen, wenn die Zellen intrazellulär angefärbt wurden. Weder im FACS noch im Western Blot konnte es sein Antigen erkennen.

In weiteren Versuchen wurden die (Kreuz-)Reaktivitäten der Antiseren gegen orthologe und paraloge Familienmitglieder untersucht. Als ortholog bezeichnet man einander entsprechende Gene in unterschiedlichen Spezies, beispielsweise mENTPD2 und hENTPD2, während die ENTPD Subtypen innerhalb einer Spezies einander paralog sind. Dabei konnte festgestellt werden, dass keiner der Antikörper mit dem am nächsten verwandten Mitglied der ENTPD Familie aus derselben Spezies reagierte. Die paraloge Familienmitglieder wiesen untereinander Sequenzidentitäten von ca. 40-50% bzw. 20-30% auf (**Abb. 3**). Die meisten ADAPINCs zeigten zudem keine Kreuzreaktionen mit den jeweiligen Orthologen der Maus, Ratte oder Mensch. Hierbei betrug die Sequenzidentität jeweils ca. 80-90%.

Für zwei Antikörper konnte jedoch eine Kreuzreaktion mit dem jeweiligen Orthologen nachgewiesen werden: CR45 (anti-mENTPD2) und 5441 (anti-hENTPD2) reagierten jeweils mit ihrem Orthologen in der Immunfluoreszenz (**Abb. 20**). Humanes und murines ENTPD2 zeigen eine hohe Sequenzidentität von 84%. Es wäre möglich, dass die jeweiligen Epitope der beiden Enzyme in einer ähnlichen dreidimensionalen Konformation vorkommen (**Abb. 3**). Obwohl zwischen dem humanen und murinen ENTPD5 ebenfalls eine hohe Sequenzidentität von 89% besteht, zeigten die jeweiligen Antiseren keine Kreuzreaktion. Eine Erklärung wäre, dass diese beiden Enzyme sich im zur Erkennung notwendigen Epitop unterscheiden. Es ist bekannt, dass schon

Unterschiede von einer einzelnen Aminosäure ausreichen, um vom Antikörper erkannt bzw. nicht erkannt zu werden.

Die zweite Enzymfamilie, die in dieser Arbeit näher charakterisiert wurde, war die Familie der ENPPs. Die Immunsereen gegen diese Proteine, nämlich CR65 (anti-mENPP4), CR66 (anti-mENPP5) und CR67 (anti-mENPP6) zeigten in der Immunfluoreszenz eine vergleichbare gute Reaktivität auch bei höherer Verdünnung gegenüber ihrem Epitop (**Abb. 23**).

Zwei früher gegen das humane ENPP2 hergestellte Immunsereen (Kan32 und K2G) konnten ihr Epitop in der Immunfluoreszenz erkennen (**Abb. 22**). Dies war allerdings nur dann möglich, wenn dieses durch eine künstliche Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert war. Bei den ENPPs 1-3 handelt es sich im Prinzip um sog. Typ II-Membranproteine, bei denen der N-Terminus intrazellulär und der C-Terminus extrazellulär liegen. Bei ENPP2 ist die N-terminale cytosolische Domäne jedoch nicht ausgeprägt und das synthetisierte Prä-Pro-Enzym wird sezerniert (Jansen, Stefan et al. 2005). Um die Reaktivität der Antiseren in der Immunfluoreszenz sichtbar zu machen, wurde in dem Expressionskonstrukt für ENPP2 die N-terminale Transmembrandomäne durch die cytosolische Transmembrandomäne von CD38 ausgetauscht, einem anderen Typ-II Membranprotein. In diesem System zeigte K2G eine bessere Anfärbbarkeit als Kan32 sowohl in der Immunfluoreszenz als auch im FACS.

Keiner der untersuchten Antikörper gegen die Enzyme der ENPP Familie zeigte eine Kreuzreaktion mit dem jeweiligen Para- bzw. Orthologen

4.2 ENTPDs, ihre Expressionen und Funktionen

Nachdem ich gezeigt hatte, dass die von mir untersuchten Seren ihre Zielantigene auf transfizierten Zellen spezifisch erkennen konnten, war es ein wichtiges Ziel meiner Arbeit, zu untersuchen, ob die Antiseren auch zum Nachweis der endogenen Expression der Zielantigene auf Zelllinien oder primären Zellen eingesetzt werden konnten. Wie in der Einleitung beschrieben, sind Ektonukleotidasen wie die ENTPDs Enzyme, die außerhalb der Zelle Nukleotide wie ATP zu Nukleosiden hydrolysieren. Nukleotide sind ubiquitär verbreitete Signalmoleküle und dienen im Extrazellularraum der interzellulären Signalübertragung. Diese Nukleotide und Nukleoside werden von Zellen entweder im Rahmen des Zelluntergangs oder durch bisher noch nicht in allen Einzelheiten verstandene Mechanismen reguliert freigesetzt. Der Effekt der extrazellulären Nukleotide hängt im Wesentlichen von drei Faktoren ab: 1. von

Diskussion

welchem Gewebe die Nukleotide freigesetzt werden und ihrer lokalen Konzentration, 2. der Expression spezifischer Rezeptoren für diese molekularen Transmitter und 3. der Anwesenheit von Ektonukleotidasen, die die zelluläre Antwort durch den schrittweisen Abbau der Nukleotide zu Nukleosiden modulieren.

Das bisher am besten untersuchte Beispiel für interzelluläre Signalübertragung durch extrazelluläre Nukleotide ist ATP. ATP wirkt im ZNS z.B. als Neurotransmitter und als Modulator für neuronale Erregbarkeit mit toxischen oder trophischen Effekten, spielt allerdings in vielen anderen Geweben ebenfalls eine wichtige Rolle, indem es auf Phänomene wie die Sekretion, die Vasodilatation, die Blutgerinnung, die männliche Fertilität, Schmerz und die Embryogenese Einfluss hat (Volonte, Amadio et al. 2003; Burnstock 2004). Für die lokale Regulation der extrazellulären ATP-Konzentration stellt die Expression der ENTPD-Familienmitglieder, insbesondere von ENTPD1, vermutlich den bedeutsamsten Faktor dar. Nachdem ich die Fähigkeit der ADAPINC-Antiseren, ihr Zielantigen zu erkennen, am Modell transfizierter HEK-Zellen bestätigt hatte, habe ich sie daher eingesetzt, um im Labor verfügbare Zelllinien auf die Expression von Mitgliedern der CD39-Familie zu untersuchen.

Von den untersuchten murinen Zelllinien wies lediglich die Makrophagenzelllinie RAW eine mögliche Expression von ENTPD1 auf (**Abb. 28**). Dieses Resultat steht im Einklang damit, dass ich ENTPD1 ebenfalls auf der Zelloberfläche von primären Milzzellen, die den für myeloische Zellen charakteristischen Oberflächenmarker CD11b trugen, nachweisen konnte (**Abb. 32**). Ähnliche Befunde wurden auch von anderen Gruppen publiziert (Koziak, Seigny et al. 1999). ENTPD1 ließ sich auf keiner der untersuchten humanen Zelllinien nachweisen. In einer Untersuchung von Leukämiezelllinien von unterschiedlichen Leukämiepatienten konnten Pulte et al. die Expression von ENTPD1 lediglich auf Zellen von CLL- und CML, nicht jedoch von AML oder ALL Patienten nachweisen (Pulte, Broekman et al. 2007). In meinen durchgeführten Analysen konnte keine Expression von ENTPD1 auf THP-1 Zellen (die aus einer AML stammen) und Jurkat Zellen (die aus einer ALL stammen) detektiert werden und steht in Einklang mit diesen Ergebnissen.

Humanes ENTPD2 ließ sich auf zwei der getesteten humanen Zelllinien nachweisen. Besonders stark war die Expression auf der humanen Zervixkarzinom Zelllinie HeLa, etwas schwächer auf der Prostatakarzinom Zelllinie LNCAP. Diese Befunde stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Knowles und Chiang, die ebenfalls die Expression von ENTPD2 auf HeLa Zellen zeigen konnten (Knowles and Chiang 2003). Mehrere

Diskussion

Gruppen konnten zeigen, dass die Mitglieder der ENTPD-Familie eine Rolle spielen in der Entwicklung und Progression von Karzinomen (Saphner, Tormey et al. 1991; Rathbone, Middlemiss et al. 1992). Neueste Klonierungen humaner und muriner cDNA von Ekto-ATPasen aus Tumorzellen (Gao, Dong et al. 1998; Mateo, Harden et al. 1999; Knowles and Chiang 2003) sprechen für eine hohe Expression von ENTPD2 in einigen Tumoren und für eine daraus resultierende Tumorgenese (Knowles and Chiang 2003). Desweiteren konnte eine ATPase Aktivität in Verbindung mit dem neuralem Zelladhäsionsmolekül (NCAM) gefunden werden (Skladchikova, Ronn et al. 1999). Zelluläre Adhäsionsmoleküle (CAMs) sind kritische Komponenten in Prozessen wie der Tumormetastasierung (Cavenagh, Cahill et al. 1998). Der erhöhte Nachweis von ENTPD2 im Blut von Krebspatienten und im besonderen Maße von Patienten mit einem Zervixkarzinom kann sich somit als Tumormarker erweisen und eine weitere Möglichkeit der Therapiekontrolle darstellen.

Die Expression von ENTPD6 konnte lediglich auf der murinen T-Zelllinie MD27 nachgewiesen werden. Die weiteren murinen T-Zellen (DO11.10 und YAC), sowie die murine B-Zelllinie A20 zeigten allenfalls eine unspezifische Anfärbung mit dem Immuns Serum bzw. dem Präimmuns Serum.

Neben dem Screening von etablierten Zelllinien auf eine mögliche Zelloberflächenexpression von Mitgliedern der ENTPD Familie habe ich die ADAPINCs auch für FACS-Analysen an primären Immunzellen eingesetzt. Hierzu wurden primäre Milzzellen der Maus angefärbt. Da von der Familie der ENTPDs das ENTPD1 das dominante Ektoenzym im Immunsystem ist (Mizumoto, Kumamoto et al. 2002) wurden die Zellen im Hinblick auf dieses Enzym angefärbt.

Zu Beginn meiner Arbeit war über die Eigenschaften und Funktionen von ENTPD1 im Hinblick auf seine Rolle im Immunsystem noch wenig bekannt. Die meisten Arbeiten beschäftigten sich mit der näheren Beschreibung der thromboregulatorischen Aufgabe von ENTPD1 angesichts der Plättchen- und Endothelaktivierung. Dabei wurde ENTPD1, wie bereits erwähnt, zuerst als B-Lymphozyten-Aktivierungsmarker beschrieben. Meine Expressionsanalysen und auch andere Arbeiten haben gezeigt, dass ENTPD1 auf über 90% der B-Zellen, auf über 80% der NK-Zellen und auf einer Subpopulation von T-Zellen exprimiert wird. Desweiteren konnte eine Hochregulierung der ENTPD1 Expression auf den T-Lymphozyten nach Aktivierung mit ConA festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass ENTPD1 neben seiner thromboregulatorischen Aufgabe auch eine wichtige Rolle in der Immunmodulation

Diskussion

spielt. Über den genauen Mechanismus und die Relevanz von ENTPD1 in der Regulation des Immunsystems ist noch wenig bekannt. Im Gegensatz dazu ist der Einfluss von extrazellulärem ATP auf das Immunsystem schon genauer untersucht worden. ATP wirkt als Indikator für Gewebedestruktion und als „danger signal“, welches das Immunsystem aktiviert. Da die intrazelluläre Konzentration von ATP ziemlich hoch (etwa 3-5mM) (Ia Sala, Ferrari et al. 2003) ist, wird bei einer Zellerstörung eine signifikante Menge an ATP freigelassen. Über die purinergen P2 Rezeptorfamilien P2X und P2Y wirkt es in den meisten Fällen proinflammatorisch. Außerdem führt ATP zur Freilassung von IL-1 β , einem Pyrogen aus Monozyten und zur Chemotaxis bei dendritischen Zellen. ENTPD1 ist in der Lage, diesen proinflammatorischen Stimulus von ATP zu vermindern, indem es ATP zu AMP hydrolysiert. Desweiteren arbeitet es möglicherweise mit CD73 zusammen, einer 5'-Nukleotidase, die auf Lymphozyten und anderen Zellen exprimiert wird, und AMP zu Adenosin dephosphoryliert. Adenosin übt über den zu den P1-Rezeptoren gehörenden A2A-Rezeptor inhibitorische und antiproliferative Effekte auf T-Zellen aus. In dieser Arbeit wurde die Koexpression von ENTPD1 und CD73 auf den Zellen des Immunsystems nicht untersucht. Die Koexpression beider Rezeptoren auf bestimmten T-Zellpopulationen wurde jedoch inzwischen in anderen Studien beschrieben (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 2001; Deaglio, Dwyer et al. 2007). Zusammengefasst ist zu sagen, dass ENTPD1 durch den Abbau von ATP und durch die Zusammenarbeit mit CD73 eine immunsuppressive Wirkung hat.

In den Fokus vieler Forscher sind seit einigen Jahren die regulatorischen T-Zellen (Tregs) gerückt (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 2001). Tregs sind ein Schlüsselmechanismus zur Erhaltung der immunologischen Toleranz und unterdrücken die Immunantwort auf eigene oder fremde Antigene. Sie verhindern das Auftreten von Autoimmunerkrankungen, indem sie autoreaktive T-Zell-Klone kontrollieren und deren Proliferation hemmen. Der genaue Mechanismus, wie sie ihre immunsuppressive Wirkung entfalten, ist noch nicht bekannt. Regulatorische T-Zellen wurden ursprünglich über die fehlende bzw. sehr niedrige Expression von CD45RB (CD45RB^{low}, eine Splicevariante des „leucocyte common antigens, einer Tyrosin-Phosphatase) definiert (Read, Mauze et al. 1998) und später über die hohe Zelloberflächen-Expression von CD25 (CD4⁺CD25⁺) (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 2001). Von CD45 gibt es zelltypabhängig unterschiedliche Splice- und Glykosylierungsvarianten. So werden CD45RA und CD45RB vor allem von naiven T-Zellen exprimiert, wohingegen

Diskussion

CD45RO auf reifen T-Zellen vermehrt vorkommt. 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 (Powrie, Leach et al. 1993).

In dieser Arbeit wurden die Tregs über die Kombination der Oberflächenmarker CD4⁺ und CD25⁺ definiert. Der Marker CD25 ist jedoch, ebensowenig wie andere „Treg Oberflächenmarker“ wie GITR, PD-1, oder der Verlust von CD127 nicht spezifisch für Tregs. Insbesondere CD25 wird nicht nur auf Tregs exprimiert, sondern nach Aktivierung auch auf Effektor T-Zellen hochreguliert.

Als definierender Marker für Tregs wurde mittlerweile der Transkriptionsfaktor „Forkhead box protein P3“ (FoxP3) identifiziert (Hori, Nomura et al. 2003) (**Abb. 40**). Im Rahmen meiner Arbeit konnte ich diesen zur Definition der Tregs nicht verwenden, da mir keine Antikörper zur Verfügung standen. Allerdings ist davon auszugehen und mittlerweile auch vielfach gezeigt worden, dass in einer nicht manipulierten, weitgehend pathogen-freien Maus die Population der CD4⁺/CD25⁺ T Zellen mit der Population der FoxP3⁺ Tregs weitgehend identisch ist.

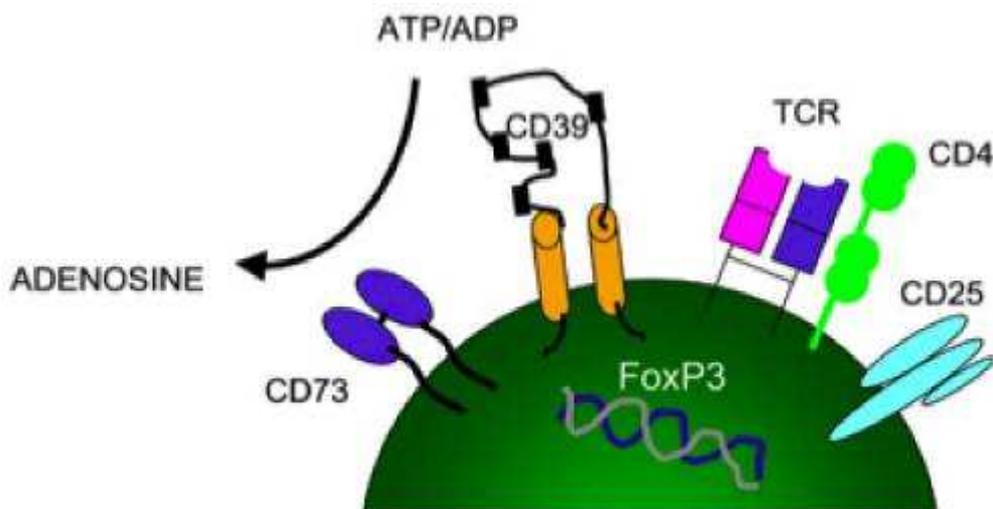


Abb. 40: Schematische Darstellung der postulierten Funktion von CD39 und CD73 auf Tregs. Wie in meiner Arbeit gezeigt, exprimiert die Mehrzahl der CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen auch CD39. Dieses könnte in Zusammenspiel mit CD73 extrazelluläres ATP zu Adenosin umwandeln, welches über die A2A-Rezeptoren eine suppressive Wirkung auf aktivierte T-Effektorzellen auswirken könnte. Ob CD73 von Tregs mit CD39 koexprimiert wird, und ob die Produktion von Adenosin eine Rolle für die immunsuppressive Wirkung von Tregs spielt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden (Dwyer et al. 2007).

Diskussion

Mit den durchgeführten Expressionsanalysen im FACS konnte ich zeigen, dass die meisten Zellen, die CD4 und CD25 doppelpositiv sind, auch für ENTPD1 positiv sind. Das bedeutet, dass die Mehrheit der als Tregs definierten Zellen auch den Marker ENTPD1 tragen. Im Laufe meiner Arbeit und in den darauf folgenden Jahren haben viele Gruppen die Expression von ENTPD1 auf den Tregs in den Fokus ihrer Arbeit genommen. Zhou et al. zeigten, dass ENTPD1 auf etwa 80% der CD4+FoxP3+ Tregs detektiert werden kann (Zhou, Yan et al. 2009). Die in unseren Versuchen festgestellte Expression von ENTPD1 auf den CD4+/CD25+ T-Zellen und auf den CD11b-positiven Zellen (Monozyten/Makrophagen) konnte von K.M. Dwyer et al. mit der reversen Transkription- Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) bestätigt werden. Nicht nur CD11b-positive Monozyten/Makrophagen, sondern auch CD11c-positive dendritische Zellen, wiesen eine hohe Expression von ENTPD1 mRNA auf. Des Weiteren konnte diese Gruppe zeigen, dass nicht die CD4+/ENTPD1- T-Zellen, sondern die CD4+/ENTPD1+ T-Zellen diejenigen waren, die die für die Tregs bekannten Marker, wie FoxP3, CD25, GITR und CTLA4 stabil exprimierten.

Ist die Expression von ENTPD1 somit ein Marker, um die wirklichen Tregs zu definieren? Zhou et al. 2009 haben gezeigt, dass bei der Maus ENTPD1 sowohl auf FoxP3+ als auch auf Foxp3- CD4+ T-Zellen exprimiert wird. Während die CD4+FoxP3+ENTPD1+ Population eine stark suppressive Wirkung haben, und somit echte Tregs darstellen, ist die CD4+FoxP3-ENTPD1+ Population nicht suppressiv, sondern weist typische Memorymarker auf. Diese Zellen produzieren Zytokine wie Th1, Th2 und Th17, und sind an der Abstoßung von Hauttransplantaten beteiligt. CD39 ist sowohl auf Tregs als auch auf einer Subpopulation von Memoryzellen exprimiert, und kann daher als alleiniger Marker die Tregs nicht definieren.

Im Gegensatz zur Maus, ist es beim Menschen schwieriger, die Tregs zu definieren und sichtbar zu machen, da sowohl CD25 als auch FoxP3 im Rahmen der T-Zell-Aktivierung transient hochreguliert werden. Jedoch wurde auch beim Menschen die Expression von ENTPD1 auf einem Teil der aktivierten FoxP3+ regulatorischen effector/memory-like T-Zellen (T_{REM}) festgestellt (Borsellino, Kleinewietfeld et al. 2007). Diese CD39+ Zellen exprimieren ebenfalls CD45RO, einem Marker für humane Memoryzellen (Lim, Broxmeyer et al. 2006).

Im Kontext der Multiplen Sklerose (MS) wurden interessante Beobachtungen gemacht, die den potenziellen Wert von CD39 als wichtigen Marker für Tregs im humanen Immunsystem untermauern. Patienten mit einer schubförmigen

Diskussion

rezidivierenden/remittierenden MS wiesen reduzierte Zahlen von CD39+ Tregs im Blut auf (Borsellino, Kleinewietfeld et al. 2007). Die suppressive Fähigkeit der Tregs ist bei MS Patienten reduziert (Viglietta, Baecher-Allan et al. 2004) und obwohl anscheinend keine große Veränderung in der Größe der CD25 hochpositiven Treg-Population vorliegt, wurden erniedrigte FoxP3 Levels bei MS Patienten beschrieben (Huan, Culbertson et al. 2005; Venken, Hellings et al. 2006). Diese Kombination aus reduziertem FoxP3 Expressionsniveau und verminderter suppressiven Fähigkeit der Tregs wurde auch bei Patienten mit aktivem systemischen Lupus Erythemathodus (SLE) festgestellt (Valencia, Yarboro et al. 2007). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression und Aktivität von CD39 auf den Lymphozyten von MS Patienten erhöht ist. Auf der anderen Seite ist die Aktivität der Adenosindeaminase (ADA), die das immunsuppressive Adenosin abbaut, auf den Lymphozyten signifikant erniedrigt im Vergleich zu Gesunden (Spanevello, Mazzanti et al. 2010). ATP, das infolge der Entzündung vermehrt ausgeschüttet wird, wirkt proinflammatorisch und stimuliert die Lymphozyten (Trautmann 2009). Werden Lymphozyten aktiviert, erhöhen sie die Expression von CD39 auf ihrer Zelloberfläche (Pulte, Broekman et al. 2007). Diese Beobachtung konnte ich in meinen FACS-Analysen bestätigen. So wurde auf CD38+ und CD69+ (beides Marker für aktivierte B- und T-Zellen) Zellen eine erhöhte Expression von ENTPD1 nachgewiesen, die nach Aktivierung der Zellen durch die Stimulation mit ConA nochmals hochreguliert wurde. Auf der anderen Seite zeigten naive T-Zellen, markiert durch CD62L eine niedrige Expression von ENTPD1, die nach Behandlung mit ConA weiter abnahm (**Abb. 34**). Heute ist bekannt, dass CD4+/CD39+ Zellen mehrheitlich CD45RBlow und CD62Llow sind (Deaglio, Dwyer et al. 2007; Dwyer, Deaglio et al. 2007).

Bei der MS kommt es neben der Demyelinisierung zu einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und somit zu einer entzündlichen Reaktion als Folge der Einwanderung von Makrophagen, T- und B-Zellen. Die freigelassenen proinflammatorischen Moleküle, wie das ATP im Extrazellularraum, führen zu kompensatorischen Gegenregulationen: 1. Die Expression von CD39 wird hochreguliert, um das proinflammatorische ATP abzubauen, und 2. die Inhibition der Adenosindeaminase (ADA) führt zu einer erhöhten Konzentration von Adenosin, einem Molekül mit immunsuppressiven Eigenschaften (Spanevello, Mazzanti et al. 2010). Neben der Bedeutung von CD39 als diagnostisches Werkzeug sollte auch die Bedeutung von

CD39 und ADA vom therapeutischen Standpunkt aus weiter erforscht werden, um neue Strategien zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen zu entwickeln.

4.3 ENPPs und ihre Funktionen

Die Enzymfamilie der ENPPs rückte in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus wissenschaftlicher Arbeiten, so dass sich die Anzahl der bekannten ENPP Isoenzyme in nur wenigen Jahren mehr als verdoppelt hat. Ihre katalytischen und nichtkatalytischen Funktionen werden nach und nach aufgedeckt, wobei noch viele Fragen ungeklärt sind. Man weiß, dass die bis jetzt bekannten sieben strukturverwandten Mitglieder der ENPP-Familie eine außerordentlich breite Substratspezifität aufweisen. Sie sind in der Lage, Pyrophosphat- und Phosphodiester-Bindungen in (Di-)Nukleotiden, Nukleinsäuren und Nukleotidzuckern zu spalten, sowie Cholinphosphataseester und Lysophospholipide zu hydrolysieren (Stefan, Jansen et al. 2005). Trotz dieser großen Varianz an Substraten weist jedes Isoenzym eine definierte Substratspezifität auf. So sind z.B. NTPs und Diadenosinpolyphosphate lediglich Substrate für ENPP1-3, während Lysophosphatidylcholin nur von ENPP2 und ENPP6 hydrolysiert wird. Bemerkenswert ist, dass ENPP2 und ENPP6 verschiedene Phosphodiesterbindungen im Lysophosphatidylcholin spalten und unterschiedliche Produkte, Cholin und Phosphocholin generieren. Eine wichtige Rolle in der Regulierung der purinergen Signalkaskade spielen somit lediglich ENPP1-3 (Goding, Grobbs et al. 2003). Desweiteren ist wenig bekannt über die Determinanten der Substratspezifität, und die Frage nach der Substratspezifität von ENPP4 und ENPP5 ist bis jetzt ungeklärt.

In dieser Arbeit wurden Zellen mit den ENPP-Konstrukten transient transfiziert, und unterschiedliche Enzymassays durchgeführt. Es sollte zum einen die bekannte Phosphodiesterase- und Pyrophosphatase-Aktivität der ENPPs genauer charakterisiert werden und zum anderen die Hypothese überprüft werden, ob die ENPPs eine durch die ART2.2 hervorgerufene ADP-Ribosylierung rückgängig machen können.

In der Literatur bekannt und beschrieben ist, dass die Substrate von ENPP1-3 ATP, NAD und p-Nitrophenyl Thymidin 5`Monophosphat (pNP-TMP) umfassen (Bollen, Gijssbers et al. 2000; Goding 2000; Zimmermann 2000). In meiner Arbeit konnte ich mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie eine NADase Aktivität von hENPP2 nicht nachweisen. Die mit membrangebundenem oder löslichem hENPP2 transient transfizierten HEK.T-Zellen verhielten sich in gleicher Weise wie die als Negativkontrolle mit eGFP transfizierten HEK.T-Zellen, und zeigten die gleichen

Diskussion

Abbauprodukte von NAD. Die festgestellte Spaltung von NAD konnte also nicht auf die Aktivität von ENPP2, sondern am ehesten auf eine unbekannte endogene NADase-Aktivität der HEK.T-Zellen zurückgeführt werden.

Eine weitere Frage, die in dieser Arbeit beantwortet werden sollte, war die Frage nach der Fähigkeit der ENPPs, ADP-ribosylierte Proteine zu de-ADP-ribosylieren. Wie in der Einleitung beschrieben (siehe 1.3; 1.4) führt NAD, wenn es z.B. bei oxidativem Stress von der Zelle ausgeschüttet wird, zum Zelltod, indem es als Substrat der ARTs für die ADP-Ribosylierung von P2X7 dient (Seman, Adriouch et al. 2003). Als Gegenspieler dieser ARTs sind die ADP-Ribosylhydrolasen bekannt, die eine ADP-Ribosylierung rückgängig machen und die Zelle vor der Apoptose schützen können. Da die ENPPs ebenfalls in der Lage sind, Pyrophosphatbindungen, wie sie in ADP-Ribose enthalten sind, zu spalten, ist es vorstellbar, dass die ENPPs aus ADP-ribosylierten Proteinen AMP abspalten könnten. Dabei würde allerdings eine Phosphoribosegruppe am Protein verbleiben. Da diese jedoch räumlich kleiner und ladungsmäßig neutral ist, ist es vorstellbar, dass dadurch einige der funktionellen Auswirkungen der ADP-Ribosylierung auf ihre Zielproteine rückgängig gemacht werden könnten.

Um diese Frage zu beantworten wurden ART2 tragende CHO.NOD Zellen transient mit Expressionskonstrukten für ENPP1 sowie für zwei unterschiedliche Varianten von ENPP2 transfiziert und untersucht. In den durchgeführten FACS-Untersuchungen konnte kein Nachweis einer De-ADP-Ribosylierungsfähigkeit der ENPPs festgestellt werden. Die Abnahme der ADP-ribosylierten Membranproteine im Verlauf der Zeit war am ehesten auf eine endogene De-ADP-Ribosylierungs-Aktivität auf CHO.NOD Zellen zurückzuführen, da sie auf denen mit einem Kontrollkonstrukt transfizierten Zellen in gleicher Weise stattfand. Vollmayer et al. (Vollmayer, Clair et al. 2003) konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass ENPP1, ENPP2 und ENPP3 bedeutende Enzymkandidaten in der Hydrolyse von extrazellulären Dinukleosidpolyphosphaten in vertebralem Gewebe sind.

Um die Substratspezifitäten der ENPPs genauer zu untersuchen, wurden HEK.T-Zellen mit unterschiedlichen ENPP Konstrukten transient transfiziert und ihre Zelllysate mit klassischen Substraten der Phosphodiesterasen inkubiert. Wie in der Literatur beschrieben konnte auch ich mit meinen Ergebnissen zeigen, dass die unterschiedlichen ENPPs sich bemerkenswert in ihrer Substratspezifität unterscheiden. **Tab. 9** gibt einen Überblick über die von mir untersuchten Substrate und ihre Umsetzung im Vergleich zu

Diskussion

den Arbeiten von Gijsbers et al. und Sakagami et al. (Gijsbers, Aoki et al. 2003; Sakagami, Aoki et al. 2005).

Tab. 9: Gegenüberstellung meiner Ergebnisse mit denen von Gijsbers und Sakagami.

Schwarz: meine Ergebnisse; rot: Ergebnisse nach Gijsbers 2003; blau: Ergebnisse nach Sakagami 2005; SVP: Snake Venom Phosphodiesterase; n.u. = nicht untersucht; + = kaum umgesetzt, ++ = gut umgesetzt, +++ = sehr gut umgesetzt, - = nicht umgesetzt.

	ENPP1		ENPP2		ENPP3		ENPP4		ENPP5		ENPP6		SVP	
pNPPP	+	n.u.	++	n.u.	+++	n.u.	-	n.u.	-	n.u.	+	++	++	n.u.
PNP-TMP	+++	+++	+	+	+++	++	+	n.u.	+	n.u.	+	+	+++	++
Bis-pNPP	+	-	+	++	++	-	+	n.u.	+	n.u.	+	+	+	+
PNP-PC	-	n.u.	+++	+++	-	n.u.								
pNPP	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	-	n.u.	-	n.u.	-	-

Es ist zu beachten, dass ein „Pluszeichen“ nicht als spezifische Umsetzung des Substrates durch das jeweilige ENPP interpretiert werden kann. Da ganze Zellysate verwendet wurden, können auch andere Proteine der Zelle an der Hydrolyse beteiligt gewesen sein. In den meisten Fällen stimmen meine Ergebnisse mit denen von Gijsbers und Sakagami überein. So war, wie auch von Gijsbers et al. beobachtet, keines der ENPPs in der Lage, das für die alkalische Phosphatase typische Substrat pNPP umzusetzen. Abweichend sind meine Ergebnisse im Hinblick auf Bis-pNPP, das klassischerweise benutzt wird, um Nukleotidpyro-phosphatase/phosphodiesterase Aktivitäten zu messen (Kelly, Dardinger et al. 1975). Gijsbers et al. 2003 konnten zeigen, dass ENPP2 im Gegensatz zu ENPP1 und 3, dieses ungewöhnliche Substrat umsetzt, wohingegen meine Untersuchungen eine Spaltung dieses Substrat durch ENPP3 zeigten. Es ist insofern ein ungewöhnliches Substrat, da es weder ein Nukleotid noch ein Lysophospholipid Derivat darstellt. PNP-TMP, das wiederum als klassisches Nukleotid-Phosphodiesterase Substrat gilt, wurde in meinen Untersuchungen sehr gut von ENPP1 und ENPP3 gespalten, wohingegen die Ergebnisse von Gijsbers eine deutliche schlechtere Umsetzung des Substrates durch ENPP3 zeigten.

Es bleibt festzustellen, dass die beobachteten Substratspezifitäten in vitro mit den bekannten biologischen Funktionen der ENPPs korrespondieren. So ist ENPP1 z.B. bei weitem die beste ATP-hydrolysierende Isoform in vitro, und überzeugende Anzeichen weisen darauf hin, dass ENPP1 dieses Substrat auch in vivo spaltet (Gijsbers, Aoki et al. 2003). Ähnlich so das ENPP2: Der Zellmotilität-steigernde Effekt wird zurückgeführt auf die Lyso-Phospholipase D Aktivität des Enzyms. Gijsbers et al. zeigten, dass

Diskussion

ENPP2 die einzige Isoform mit dieser Aktivität ist. Es ist bis jetzt unbekannt, wodurch die Substratspezifität der ENPPs definiert und determiniert wird. Gijsbers et al. haben ENPP1-3 aus gleichem Ursprung miteinander verglichen und konnten somit ausschließen, dass die beobachteten Unterschiede in der Substratspezifität auf die Anwendung verschiedener Expressionssysteme oder auf die Anwendung von löslichen bzw. membrangebundenen Enzymen zurückzuführen sind. Es liegt demzufolge nahe, dass die Substratspezifität von ENPP1-3 durch ein Substrat-Erkennungsmotiv determiniert ist. So besitzen ENPP1 und ENPP2 ein sogenanntes GxGxxG Motiv, das ebenso in Proteinkinasen und anderen Nukleotidbindenden Proteinen vorkommt und in der Erkennung von Nukleotiden als Substrat involviert sein kann (Bollen, Gijsbers et al. 2000). Dieses Motiv ist in ENPP2 nicht vorhanden, was die Tatsache erklären könnte, dass ENPP2 eine wesentlich schlechtere Nukleotidpyrophosphatase/-phosphodiesterase ist. Auf der anderen Seite könnte ENPP2 ein Lysophospholipid bindendes Motiv besitzen.

Von den von mir untersuchten Substraten konnte das humane ENPP6 lediglich PNP-PC spalten. Allerdings ist ENPP6 auch das einzige von mir untersuchte ENPP-Familienmitglied mit dieser Fähigkeit. PNP-PC ist ein klassisches Substrat der Phospholipase C. Meine Ergebnisse stimmen mit denen von Sakagami et al. überein, der ebenfalls keine Umsetzung von pNPPP, pNP-TMP, Bis-pNPP durch ENPP6 zeigen konnte (Sakagami, Aoki et al. 2005). Ebenso konnte Sakagami et al. zeigen, dass ENPP6 eine Lysophospholipase C aber keine Lysophospholipase D Aktivität, wie ENPP2 sie hat, aufweist. Interessant ist, dass ENPP6 eine merkliche Präferenz für Phospholipide oder Phosphodiester aufweist, die Choline beinhalten, wie z.B. das LPC, SPC, LysoPAF, PAF und GPC, aber keine Diacylphospholipide wie PC und SM hydrolysiert (Sakagami, Aoki et al. 2005).

Im Vergleich dazu weist ENPP2 eine breite Substratspezifität auf. Es zeigt keine Präferenz für Cholinreste, und ist in der Lage LPC, LPE, LPS, LPI und SPC zu hydrolysieren (Hynie, Meuffels et al. 1975; Aoki, Taira et al. 2002). Desweiteren spaltet ENPP2 nicht GPC. Insofern scheinen ENPP2 und ENPP6 durchaus unterschiedliche Substratspezifitäten zu zeigen. Man kann spekulieren, dass, im Gegensatz zu ENPP2, ENPP6 eine Domäne besitzt, die spezifisch Cholinreste erkennt. Die Gruppe von Sakagami konnte außerdem beobachten, dass bei ENPP6 exprimierenden Zellen nach der Zugabe von LPC weder LPA noch Cholin entsteht, und ENPP6 somit keine Lyso-Phospholipase D, sondern eine Lyso-Phospholipase C-Aktivität aufweist. Dies weist

darauf hin, dass ENPP6 spezifisch an der Phosphodiesterbindung zwischen der Phosphatgruppe und dem Glycerol von LPC agiert. Dies steht im Gegensatz zu ENPP1 und ENPP3, die keine Präferenz für bestimmte Phosphodiester- oder Pyrophosphatbindungen in ihrem Substrat wie ATP oder GTP zeigen. ENPP2 und ENPP6 erkennen beide ihr Substrat und führen ihre katalytische Aktivität an spezifischen chemischen Bindungen ihres Substrates aus.

ENPP4 und ENPP5 konnten keine der untersuchten Substrate spezifisch spalten. So bleibt die Frage nach der Substratspezifität für diese beiden ENPP-Mitglieder weiterhin offen und unbeantwortet.

Es bleiben noch viele Funktionen der ENPPs zu identifizieren, und zwar nicht nur diejenigen der zurzeit noch funktionslosen ENPP4-6, sondern auch von den besser charakterisierten ENPP1-3. Es ist ungeklärt, welche die molekularen Determinanten für die Substratspezifität der ENPPs sind oder was die Liganden für die Somatomedin-B-ähnlichen und Nuklease-ähnlichen Domäne sind.

Genauere Untersuchungen zur Charakterisierung der ENPPs und ENTPDs stellen sich außerdem als schwierig dar, weil die eindeutige Unterscheidung zwischen den Mitgliedern der ENPP- und ENTPD-Familien durch ihre Ko-Expression auf einer Vielzahl von unterschiedlichem Geweben und ihrer Ähnlichkeit in der Substratspezifität häufig erschwert ist (Zimmermann 2000; Zimmermann 2007). Die Verteilung dieser zwei Nukleotidase-Familien kann durch autoradiographische Analysen abgeschätzt werden, indem man die relative Menge des erzeugten $^{32}\text{P}_i$ und $^{32}\text{PP}_i$ aus $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ misst (Yegutkin, Samburski et al. 2007). Trotzdem darf man nicht vergessen, dass einige ENPPs aufgrund ihrer breiten Substratspezifität in der Lage sind, ATP auf gleichem Wege wie die ENTPDasen via ADP zu AMP zu dephosphorylieren.

4.4 Ausblick und Perspektiven

Extrazelluläre Nukleotide und Adenosin sind vielfältige Signalmoleküle, von denen bekannt ist, dass sie sowohl auf parakrinem als auch auf autokrinem Wege in einer großen Anzahl von zellspezifischen Antworten involviert sind. **Abb. 41** gibt einen Überblick über die Interaktion von ATP-hydrolysierenden Ektoenzymen mit ATP und NAD.

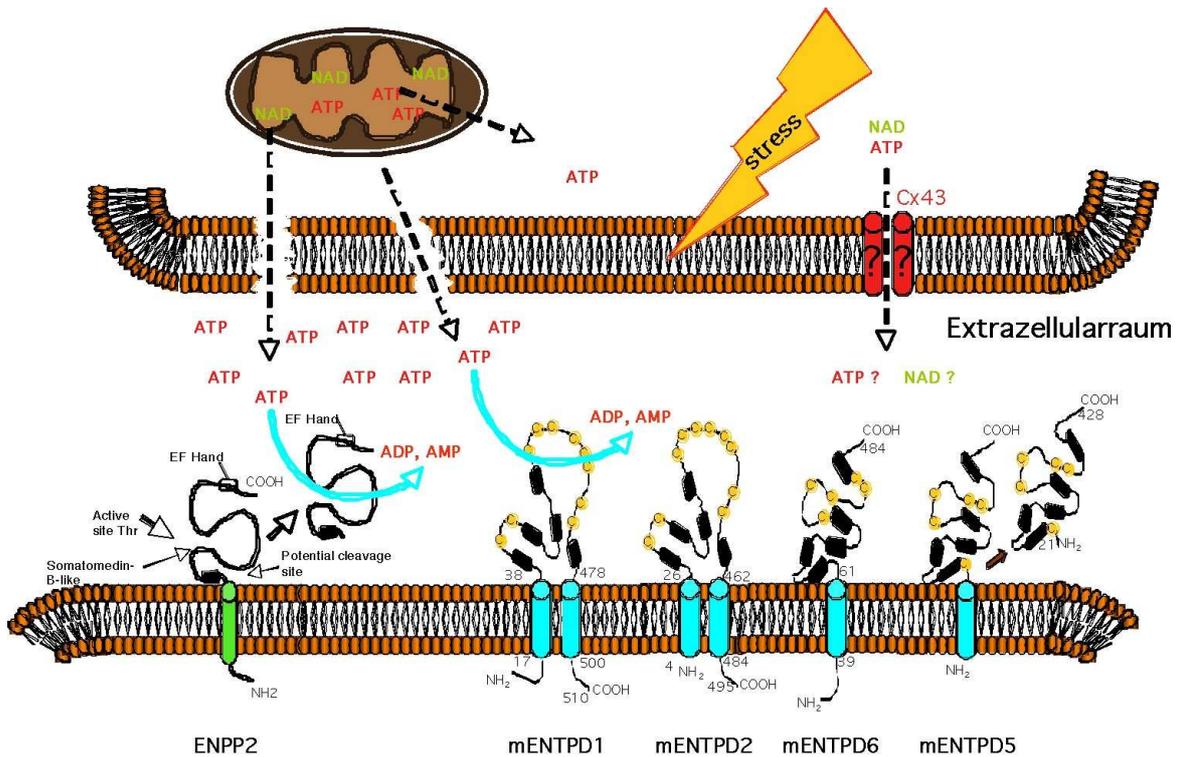


Abb. 41: Schema der Aktivierung von ENTPD1, 2, 5 und 6 und ENPP2. Schematische Darstellung der Freisetzung von NAD und ATP aus gestressten Zellen und der Interaktion von ATP-hydrolysierenden Ektoenzymen.

Die von mir durchgeführten Arbeiten zeigen exemplarisch, wie die genetische Immunisierung verwendet werden kann, um Erkenntnisse über die Mitglieder zweier bisher nur unvollständig erforschter Genfamilien von Ektoenzymen zu gewinnen. Aus den bekannten Gensequenzen wurden in den Repositorien der Genomprojekte vorhandene Expressionskonstrukte identifiziert, welche zur Herstellung spezifischer Antisera verwendet wurden, die ihre Zielantigene in ihrer nativen Konformation erkannten. Diese Antisera und Expressionskonstrukte wiederum konnten dazu eingesetzt werden, um Aufschlüsse über Expressionsprofil, Funktion und enzymatische Aktivität der verschiedenen Genfamilienmitglieder zu erhalten.

In dieser Arbeit wurden Expressionsanalysen auf primären Zellen vor allem mit Hilfe der Durchflusszytometrie an Zellpopulationen durchgeführt, die leicht als Suspensionen herzustellen waren. Eine wichtige Perspektive, die in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht wurde, wäre der Einsatz der durch genetische Immunisierung hergestellten Antikörper in der Histologie. Gerade für Ektoenzyme kann aufgrund ihrer Bedeutung für Stoffwechselfvorgänge und ihrer Beteiligung an Signalübertragungsprozessen angenommen werden, dass ihr Nachweis im Kontext solider Tumoren möglicherweise diagnostische oder prognostische Bedeutung gewinnen könnte.

Diskussion

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden mit polyklonalen Seren durchgeführt. Eine weitere Perspektive, die aus Zeitgründen in dieser Arbeit nicht realisiert werden konnte, ist die Gewinnung monoklonaler Antikörper aus den Immunisierungen, die an Ratten durchgeführt wurden. Für einige der in dieser Arbeit untersuchten Ektoenzyme ist dies bereits geschehen. So ist zum Beispiel in der Zwischenzeit ein monoklonaler Antikörper gegen das murine ENTPD1 entwickelt worden, welcher gegenwärtig eingesetzt wird, um die Bedeutung der ENTPD1 Expression auf regulatorischen T-Zellen näher zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Extrazelluläre Nukleotide (z.B. ATP und NAD) sind durch Einwirkung auf Purinrezeptoren und Nukleotid-metabolisierende Enzyme wie ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) an der Regulation vielfältiger Prozesse im Organismus (z.B. Blutgerinnung, Übertragung neuronaler Signale, Regulation von Immunzellen) beteiligt. Wegen ihrer potenten Wirkung auf viele Zellen unterliegt die Konzentration extrazellulärer Nukleotide einer strengen Kontrolle, bei der Enzyme der ENTPD- und ENPP-Familien eine zentrale Rolle spielen. In Vorarbeiten haben wir durch genetische Immunisierung eine Serie von Antikörpern gegen ENTPDs und ENPPs des Menschen und der Maus hergestellt, die die Grundlage der vorliegenden Arbeit bildeten.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurden die hergestellten Antikörper zunächst an transfizierten Zellen auf ihre Eignung als experimentelle Werkzeuge untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass alle getesteten Immunseren ihr Antigen in der Immunfluoreszenz erkennen. Die nicht intrazellulär gelegenen ENTPDs konnten auch im Western Blot und im FACS mit Hilfe der ADAPINCs gut detektiert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Immunseren die Frage untersucht, auf welchen etablierten Zelllinien und auf welchen Zellen des Immunsystems die Mitglieder der ENTPD-Enzymfamilie exprimiert werden. Besonders hoch war hier die Expression von ENTPD1 auf den regulatorischen T-Zellen.

Im letzten Teil der Arbeit wurde die Aktivität der einzelnen ENPP-Familienmitglieder anhand von Enzymassays vergleichend analysiert. Dabei sollte insbesondere untersucht werden, ob ENPPs als Gegenspieler von ARTs fungieren, indem sie das Substrat NAD spalten oder die ADP-Ribosylierung von Proteinen durch Abspaltung von AMP unter Zurücklassung eines Phosphoribose-Rests teilweise rückgängig machen können. Um diese Frage zu klären, wurden die Enzyme mit radioaktiv markiertem NAD oder eNAD inkubiert und im FACS analysiert. Eine Aussage über die Fähigkeit von ENPPs, Proteine zu de-ADP-ribosylieren, kann mit Hilfe der hier durchgeführten Experimente nicht sicher gemacht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich die in unserer Arbeitsgruppe hergestellten Antikörper als experimentelle Werkzeuge eignen, um die Funktionen und Aktivitäten der ENTPDs und ENPPs näher zu charakterisieren. Ausserdem weisen die Ergebnisse daraufhin, dass vor allem ENTPD1 durch seine Expression auf den regulatorischen T-Zellen eine wichtige Rolle in der Immunmodulation spielt.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACR	apyrase conserved regions
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ADPR	Adenosin-5'-diphosphoribose
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ADAPINC	Anibodies directed against proteins in native conformation
APC	antigenpräsentierende Zelle
ART	ADP-Ribosyltransferase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATX	Autotaxin
Bis-pNPP	bis(<i>p</i> -nitrophenyl) phosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CAM	Zelladhäsionsmolekül
cAMP	cyclisches Adenosin-5'-monophosphat
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
ConA	Concanavalin A
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle
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
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENPP	Ekto-Nukleotidpyrophosphatasen /phosphodiesterasen

Abkürzungsverzeichnis

ENTPD	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 durchfluss- zytometrischen Analysen Aufschluss über die Größe der Zellen
GPC	Glycerophosphorylcholin
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinsulfonat
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IS	Immunserum
ITP	Inosintriphosphat
Kb	Kilobase
KO	gezielte Deaktivierung eines oder mehrerer Gene (<i>knockout</i>)
LB-Medium	Medium zur Transformation von E.coli
LDS	lithium-dodecyl-sulfate
Lk	Lymphknoten
LPA	Lysophosphatsäure
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPE	Lysophosphatidylethanolamine
LPI	Lysophosphatidylinositol
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	monoklonaler Antikörper
MES	2-(N-morpholino)ethane sulfonic acid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
Min	Minuten

Abkürzungsverzeichnis

MOPS	3-(N-morpholino)propane sulfonic acid
NAADP	Nikotinsäureadeninindinukleotid-2'-phosphat
NAD	β -Nikotinamidadenindinukleotid
NADase	NAD-Glykohydrolase
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NC	Nitrozellulose
NCAM	neurales Zelladhäsionsmolekül
NICD	NAD-induzierter Zelltod (<i>NAD-induced cell death</i>)
NK Zelle	„Natürliche Killer“ Zelle
PAF	“platelet-activating factor”
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAk	polyklonaler Antikörper
PARP	Poly-ADP-Ribosylpolymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung(<i>phosphate buffered saline</i>)
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration an H_3O^+ -Ionen
Pi	anorganisches Phosphat
PI	Propidiumiodid
PIS	Präimmunserum
pNPP	<i>p</i> -Nitrophenyl phosphat
pNPPP	<i>p</i> -Nitrophenyl phenylphosphat
pNPPC	<i>p</i> -Nitrophenyl phosphorylcholin
pNP-TMP	<i>p</i> -Nitrophenyl Thymidin 5` Monophosphat
PO	Peroxidase
PPi	anorganisches Pyrophosphat
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Rounds per minute
RPMI	Medium für Suspensionszellen
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)

Abkürzungsverzeichnis

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
SM	Sphingomyelin
SPC	Sphingosylphosphorylcholin
SSC	Seitwärtsstreuung (<i>side scatter</i>): gibt bei durchfluss- zytometrischen Analysen Aufschluss über die Granularität der Zellen
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
Treg	regulatorische T-Zellen
TNF	Tumornekrosisfaktor
TX-100	Triton X 100
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
WT	Wildtyp

7 Literaturverzeichnis

- Aarhus, R., R. M. Graeff, et al. (1995). "ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP." J Biol Chem 270(51): 30327-30333.
- Adair, T. H. (2005). "Growth regulation of the vascular system: an emerging role for adenosine." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 289(2): R283-R296.
- Aderem, A. and D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." Annu Rev Immunol 17: 593-623.
- Agresti, C., M. E. Meomartini, et al. (2005). "ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, and differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors." Brain Res Brain Res Rev 48(2): 157-165.
- Agteresch, H. J., P. C. Dagnelie, et al. (1999). "Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications." Drugs 58(2): 211-232.
- Aktorics, K. (1991). "ADP-ribosylating toxins." Springer Verlag Berlin.
- Biederbick, A., S. Rose, et al. (1999). "A human intracellular apyrase-like protein, LALP70, localizes to lysosomal/autophagic vacuoles." J Cell Sci 112 (Pt 15): 2473-2484.
- Bigonnesse, F., S. A. Levesque, et al. (2004). "Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8." Biochemistry 43(18): 5511-5519.
- Bock, P. (1980). "Adenine nucleotides in the carotid body." Cell Tissue Res 206(2): 279-290.
- Boeynaems, J. M., D. Communi, et al. (2005). "Overview of the P2 receptors." Semin Thromb Hemost 31(2): 139-149.
- Bollen, M., R. Gijssbers, et al. (2000). "Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move." Crit Rev Biochem Mol Biol 35(6): 393-432.
- 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.
- Boyle, J. S., A. Silva, et al. (1997). "DNA immunization: induction of higher avidity antibody and effect of route on T cell cytotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A 94(26): 14626-14631.
- Bruzzone, 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.
- Burnstock, G. (1972). "Purinergic nerves." Pharmacol Rev 24(3): 509-581.
- Burnstock, G. (2002). "Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signalling." Clin Med 2(1): 45-53.
- Burnstock, G. (2002). "Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death." Arterioscler Thromb Vasc Biol 22(3): 364-373.
- Cardenal, A., I. Masuda, et al. (1998). "Serum nucleotide pyrophosphohydrolase activity; elevated levels in osteoarthritis, calcium pyrophosphate crystal deposition disease, scleroderma, and fibromyalgia." J Rheumatol 25(11): 2175-2180.
- Cavenagh, J. D., M. R. Cahill, et al. (1998). "Adhesion molecules in clinical medicine." Crit Rev Clin Lab Sci 35(5): 415-459.
- 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): 3100-3106.
- Christoforidis, S., T. Papamarcaki, et al. (1995). "Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase." Eur J Biochem 234(1): 66-74.
- 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): 1324-1333.
- Cohen, A. D., J. D. Boyer, et al. (1998). "Modulating the immune response to genetic immunization." FASEB J 12(15): 1611-1626.
- 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.
- 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): 2111-2117.
- 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): 108-117.
- 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): 205-209.
- Donaldson, S. H., M. Picher, et al. (2002). "Secreted and cell-associated adenylate kinase and nucleoside diphosphokinase contribute to extracellular nucleotide metabolism on human airway surfaces." Am J Respir Cell Mol Biol 26(2): 209-215.
- Dorsam, R. T. and S. P. Kunapuli (2004). "Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation." J Clin Invest 113(3): 340-345.
- Dubyak, G. R. (2003). "Knock-out mice reveal tissue-specific roles of P2Y receptor subtypes in different epithelia." Mol Pharmacol 63(4): 773-776.
- Failor, B. U., A. Aschrafi, et al. (2003). "Determination of native oligomeric state and substrate specificity of rat NTPDase1 and NTPDase2 after heterologous expression in *Xenopus* oocytes." Eur J Biochem 270(8): 1802-1809.
- Fazilleau, N., L. J. McHeyzer-Williams, et al. (2007). "Local development of effector and memory T helper cells." Curr Opin Immunol 19(3): 259-267.
- Flaherty, K. M., D. B. McKay, et al. (1991). "Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein." Proc Natl Acad Sci U S A 88(11): 5041-5045.
- 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): 41-49.
- Gijsbers, R., J. Aoki, et al. (2003). "The hydrolysis of lysophospholipids and nucleotides by autotaxin (NPP2) involves a single catalytic site." FEBS Lett 538(1-3): 60-64.
- Goding, J. W., R. Terkeltaub, et al. (1998). "Ecto-phosphodiesterase/pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: structure and function of the PC-1 family." Immunol Rev 161: 11-26.
- Grinthal, A. and G. Guidotti (2000). "Substitution of His59 converts CD39 apyrase into an ADPase in a quaternary structure dependent manner." Biochemistry 39(1): 9-16.

- Grinthal, A. and G. Guidotti (2004). "Dynamic motions of CD39 transmembrane domains regulate and are regulated by the enzymatic active site." Biochemistry 43(43): 13849-13858.
- Grinthal, A. and G. Guidotti (2006). "CD39, NTPDase 1, is attached to the plasma membrane by two transmembrane domains. Why?" Purinergic Signal 2(2): 391-398.
- Guse, A. H. (2000). "Cyclic ADP-ribose." J Mol Med 78(1): 26-35.
- Haag, F. (1997). "ADP-Ribosylation in Animal Tissues: Structure, Function and Biology of Mono(ADP-Ribosyl)transferases and Related Enzymes." Plenum Press New York.
- Haag, F., S. Adriouch, et al. (2007). "Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation." Purinergic Signal 3(1-2): 71-81.
- Handa, M. and G. Guidotti (1996). "Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*)." Biochem Biophys Res Commun 218(3): 916-923.
- Hanley, P. J., B. Musset, et al. (2004). "Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca²⁺ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A 101(25): 9479-9484.
- Heine, P., N. Braun, et al. (2001). "The C-terminal cysteine-rich region dictates specific catalytic properties in chimeras of the ectonucleotidases NTPDase1 and NTPDase2." Eur J Biochem 268(2): 364-373.
- Herceg, 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.
- Hershfield, M. S. (2005). "New insights into adenosine-receptor-mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine deaminase deficiency." Eur J Immunol 35(1): 25-30.
- Holm, T. L., J. Nielsen, et al. (2004). "CD4+CD25+ regulatory T cells: I. Phenotype and physiology." APMIS 112(10): 629-641.
- 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): 3553-3555.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science 299(5609): 1057-1061.
- Ivanenkov, V. V., D. M. Murphy-Piedmonte, et al. (2003). "Bacterial expression, characterization, and disulfide bond determination of soluble human NTPDase6 (CD39L2) nucleotidase: implications for structure and function." Biochemistry 42(40): 11726-11735.
- Jacobsen, M. K. (1989). "ADP-ribose Transfer Reactions: Mechanismus and Biological Significance." Springer Verlag New York.
- Janeway, C., A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2002). Immunologie.
- Janeway, C. A. (2002). Immunologie.
- Kegel, B., N. Braun, et al. (1997). "An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain." Neuropharmacology 36(9): 1189-1200.
- Kelly, S. J., D. E. Dardinger, et al. (1975). "Hydrolysis of phosphonate esters catalyzed by 5'-nucleotide phosphodiesterase." Biochemistry 14(22): 4983-4988.
- Kirley, T. L. (1997). "Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase. Homology with the lymphoid cell activation antigen CD39." J Biol Chem 272(2): 1076-1081.
- Kirley, T. L., P. A. Crawford, et al. (2006). "The structure of the nucleoside

- triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) as revealed by mutagenic and computational modeling analyses." Purinergic Signal 2(2): 379-389.
- Koch-Nolte, F. (1998). "DNA Immunisierung: eine interessante Option zur Herstellung von Antikörpern gegen molekular charakterisierte Proteine." Versuchstierkunde: Mittler zwischen Forschung und Tierschutz. J Dimigen, Hamburg, Gesellschaft für Versuchstierkunde.
- 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): 6014-6022.
- 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.
- Krebs, C., S. Adriouch, et al. (2005). "CD38 controls ADP-ribosyltransferase-2-catalyzed ADP-ribosylation of T cell surface proteins." J Immunol 174(6): 3298-3305.
- Kunapuli, S. P., R. T. Dorsam, et al. (2003). "Platelet purinergic receptors." Curr Opin Pharmacol 3(2): 175-180.
- la Sala, A., D. Ferrari, et al. (2003). "Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides." J Leukoc Biol 73(3): 339-343.
- Lavoie, E. G., F. Kukulski, et al. (2004). "Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3." Biochem Pharmacol 67(10): 1917-1926.
- Lazarowski, E. R., R. C. Boucher, et al. (2003). "Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules." Mol Pharmacol 64(4): 785-795.
- Lee, W. L., R. E. Harrison, et al. (2003). "Phagocytosis by neutrophils." Microbes Infect 5(14): 1299-1306.
- Lewis Carl, S. A., T. M. Smith, et al. (1998). "Cross-linking induces homodimer formation and inhibits enzymatic activity of chicken stomach ecto-apyrase." Biochem Mol Biol Int 44(3): 463-470.
- MacKenzie, A., H. L. Wilson, et al. (2001). "Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding." Immunity 15(5): 825-835.
- Mateo, J., T. K. Harden, et al. (1999). "Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase." Br J Pharmacol 128(2): 396-402.
- Moss, J., A. Zolkiewska, et al. (1997). "ADP-ribosylarginine hydrolases and ADP-ribosyltransferases. Partners in ADP-ribosylation cycles." Adv Exp Med Biol 419: 25-33.
- 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): 229-231.
- 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): 279-291.
- 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): 3659-3665.
- Picher, M. and R. C. Boucher (2003). "Human airway ecto-adenylate kinase. A mechanism to propagate ATP signaling on airway surfaces." J Biol Chem 278(13): 11256-11264.
- Popoff, M. R. (1998). "Interactions between bacterial toxins and intestinal cells."

- Toxicon 36(4): 665-685.
- 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): 1461-1471.
- Robson, S. C., J. Seigny, et al. (2006). "The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance." Purinergic Signal 2(2): 409-430.
- Sak, K., J. M. Boeynaems, et al. (2003). "Involvement of P2Y receptors in the differentiation of haematopoietic cells." J Leukoc Biol 73(4): 442-447.
- 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.
- Schulte am Esch, J., 2nd, J. Seigny, et al. (1999). "Structural elements and limited proteolysis of CD39 influence ATP diphosphohydrolase activity." Biochemistry 38(8): 2248-2258.
- 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): 571-582.
- 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): 712-721.
- Smith, T. M., Jr., T. L. Kirley, et al. (1997). "A soluble ecto-ATPase from Tetrahymena thermophila: purification and similarity to the membrane-bound ecto-ATPase of smooth muscle." Arch Biochem Biophys 337(2): 351-359.
- Smith, T. M. and T. L. Kirley (1999). "Glycosylation is essential for functional expression of a human brain ecto-apyrase." Biochemistry 38(5): 1509-1516.
- Smith, T. M. and T. L. Kirley (1999). "Site-directed mutagenesis of a human brain ecto-apyrase: evidence that the E-type ATPases are related to the actin/heat shock 70/sugar kinase superfamily." Biochemistry 38(1): 321-328.
- Smith, T. M., S. A. Lewis Carl, et al. (1999). "Mutagenesis of two conserved tryptophan residues of the E-type ATPases: inactivation and conversion of an ecto-apyrase to an ecto-NTPase." Biochemistry 38(18): 5849-5857.
- 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): 48893-48903.
- Stefan, C., S. Jansen, et al. (2005). "NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity." Trends Biochem Sci 30(10): 542-550.
- Stefan, C., S. Jansen, et al. (2006). "Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases." Purinergic Signal 2(2): 361-370.
- 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): 10482-10488.
- Stout, J. G. and T. L. Kirley (1996). "Control of cell membrane ecto-ATPase by oligomerization state: intermolecular cross-linking modulates ATPase activity." Biochemistry 35(25): 8289-8298.
- Tang, D. C., M. DeVit, et al. (1992). "Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response." Nature 356(6365): 152-154.
- Trautmann, A. (2009). "Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal"." Sci Signal 2(56): pe6.
- Valencia, X., C. Yarburo, et al. (2007). "Deficient CD4+CD25high T regulatory cell

- function in patients with active systemic lupus erythematosus." J Immunol 178(4): 2579-2588.
- Vasconcelos, E. G., S. T. Ferreira, et al. (1996). "Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. Immunological cross-reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase." J Biol Chem 271(36): 22139-22145.
- Vorhoff, T., H. Zimmermann, et al. (2005). "Cloning and characterization of the ecto-nucleotidase NTPDase3 from rat brain: Predicted secondary structure and relation to other members of the E-NTPDase family and actin." Purinergic Signal 1(3): 259-270.
- Wang, T. F. and G. Guidotti (1998). "Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase." J Biol Chem 273(18): 11392-11399.
- Wang, T. F., Y. Ou, et al. (1998). "The transmembrane domains of ectoapyrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure." J Biol Chem 273(38): 24814-24821.
- Wilkin, F., P. Stordeur, et al. (2002). "Extracellular adenine nucleotides modulate cytokine production by human monocyte-derived dendritic cells: dual effect on IL-12 and stimulation of IL-10." Eur J Immunol 32(9): 2409-2417.
- Yegutkin, G. G., T. Henttinen, et al. (2001). "Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via phosphotransfer reactions." FASEB J 15(1): 251-260.
- Yegutkin, G. G., S. S. Samburski, et al. (2007). "Intravascular ADP and soluble nucleotidases contribute to acute prothrombotic state during vigorous exercise in humans." J Physiol 579(Pt 2): 553-564.
- Zhou, A., J. A. Huntington, et al. (2003). "How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration." Nat Struct Biol 10(7): 541-544.
- Zimmermann, H. (1999). "Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function." Trends Pharmacol Sci 20(6): 231-236.
- Zimmermann, H. (2000). "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 362(4-5): 299-309.
- Zimmermann, H. (2007). "Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact." Anales Real Academia Nacional Farmacia 73: 537-566.
- Zimmermann, H. and N. Braun (1999). "Ecto-nucleotidases--molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system." Prog Brain Res 120: 371-385.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Friedrich Haag für die Überlassung des spannenden Themas, für seine fürsorgliche Betreuung in allen Phasen der Arbeit und für seine Anleitung zum selbständigen wissenschaftlichen Arbeiten danken.

Mein weiterer Dank gilt besonders Frau Gudrun Dubberke, Frau Fenja Braasch und Frau Fabienne Seyfried für die hervorragende Einarbeitung in die Geheimnisse der angewandten Techniken und die immer geduldige praktische Unterstützung bei meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte, Frau Dr. Anette Braß, Herrn Dr. Sahil Adriouch, Herrn Dr. Stefan Kernstock und Herrn Dr. Jan Reyelt danke ich für ihre Ratschläge, ihre freundliche Unterstützung und unersetzliche Hilfe, sowie für den permanenten kritischen Gedankenaustausch. Frau Sina Möller danke ich für die zahlreichen konstruktiven und lustigen Stunden im Labor und die tolle Zeit in Ferrara.

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 gute Betreuung und Hilfe, die freundliche Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit im Labor.

Für ihre unermüdliche Unterstützung und die Ermunterung zur wissenschaftlichen Arbeit danke ich schließlich meiner Familie, meinen Eltern Florentine Busse-Jung und Bernd Jung, sowie meinen Brüdern Philipp und Tilman. Ihr ward mir immer eine große Stütze und habt mir stets den Rücken frei gehalten. Danke!

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: