

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Neurologie im Labor „Experimental Research in Stroke and Inflammation“  
(ERSI)

Klinikdirektor: Prof. Dr. Christian Gerloff

Arbeitsgruppenleiter: Prof. Dr. Tim Magnus

## **Identifikation und Charakterisierung einer *P2rx7* passenger Mutation in der P2X4ko Maus ( $P2rx4^{tm1Rass}$ )**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. biol. hum. / PhD  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Marco Er-Lukowiak (Gebürtig: Lukowiak)

aus Hamburg, Deutschland

Hamburg 2021

**(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)**

**Angenommen von der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:** 06.08.2021

**Veröffentlicht mit Genehmigung der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:** Prof. Dr. Tim Magnus

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:** Prof. Dr. Eva Tolosa

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:** /

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

1.1	Passenger Mutationen und wie sie entstehen.....	S.7
1.1.1	Die Generierung von „knockout“ Mäusen.....	S.7
1.1.1.1	Die klassische Generierung von ko-Mäusen.....	S.8-9
1.1.1.2	Moderne Methoden zur Generierung von ko-Mäusen.....	S.10
1.1.2	Back crossing in der B6 Maus.....	S.11-12
1.1.3	Beispiele für passenger Mutationen.....	S.13
1.2	Der purinerge Rezeptor P2X7.....	S.14
1.2.1	Purinerge Rezeptorfamilien.....	S.14-15
1.2.2	Der murine P2X7 Rezeptor.....	S.15-16
1.2.3	P2X7 Aktivierung und dessen Auswirkung.....	S.17
1.2.3.1	ATP abhängige Aktivierung von P2X7.....	S.17-18
1.2.3.2	NAD <sup>+</sup> vermittelte Aktivierung von P2X7.....	S.18
1.2.3.3	Die NAD <sup>+</sup> vermittelte Aktivierung von P2X7 durch den Präparationseffekt.....	S.18-19
1.3	Das Immunsystem.....	S.19
1.3.1	Das angeborene Immunsystem.....	S.20
1.3.1.1	Makrophagen.....	S.20-21
1.3.1.2	Dendritische Zellen.....	S.21-22
1.3.1.3	Mastzellen.....	S.22
1.3.1.4	Mikroglia.....	S.23
1.3.2	Das adaptive Immunsystem.....	S.23-24
1.3.2.1	CD4 <sup>+</sup> T-Helferzellen.....	S.24
1.3.2.2	CD4 <sup>+</sup> regulatorische T-Zellen.....	S.24-25
1.3.2.3	CD8 <sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen.....	S.25
1.4	Fragestellung.....	S.26

## **2. Material und Methoden**

2.1 Materialien.....	<b>S.27</b>
2.1.1 Laborgeräte.....	<b>S.27-28</b>
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	<b>S.28-30</b>
2.1.3 Materialien zum Präparieren von Organen aus Mäusen.....	<b>S.30</b>
2.1.4 Verwendete Chemikalien (Einzel verwendet) .....	<b>S.30-31</b>
2.1.5 Medien und Puffer (Ansetzung).....	<b>S.31-33</b>
2.1.6 Verwendete Kits.....	<b>S.33-34</b>
2.1.7 Antikörper.....	<b>S.35</b>
2.1.8 Mausstämme.....	<b>S.36</b>
2.2 Methoden.....	<b>S.37</b>
2.2.1 Durchführung der Tierversuche.....	<b>S.37</b>
2.2.1.1 EAE Induktion.....	<b>S.37-39</b>
2.2.1.2 Injektion des ARTC2.2 blockierenden Nanobody s+16a.....	<b>S.39</b>
2.2.2 Präparation von Lymphozyten aus Mausorganen.....	<b>S.39</b>
2.2.2.1 Präparation von Immunzellen aus der Milz.....	<b>S.39</b>
2.2.2.2 Präparation von Immunzellen aus Lymphknoten.....	<b>S.40</b>
2.2.2.3 Präparation von Immunzellen aus dem Blut.....	<b>S.40</b>
2.2.2.4 Präparation von Makrophagen und Mastzellen aus der peritoneal Lavage.....	<b>S.41</b>
2.2.2.5 Präparation von Immunzellen aus murinem Knochenmark....	<b>S.41-43</b>
2.2.3 Durchflusszytometrische Methoden.....	<b>S.43</b>
2.2.3.1 Durchflusszytometrie.....	<b>S.43-44</b>
2.2.3.2 Zellanfärbungen von extrazellulären Antigenen (EC-Färbung)..	<b>S.44</b>
2.2.3.3 Durchflusszytometrische Sortierung von Zellpopulationen.....	<b>S.45</b>
2.2.3.4 Messung der CD27 Abspaltung nach P2X7 Aktivierung.....	<b>S.45-46</b>
2.2.3.5 Vitalitätsanalysen von T Zellen nach einer 37°C Inkubation....	<b>S.46</b>
2.2.3.6 PMA/Ionomycin induzierte Zytokinsekretion in T Zellen.....	<b>S.46-47</b>
2.2.3.7 Durchflusszytometrische Echtzeit-Analyse der P2X7 Aktivierung.....	<b>S.48</b>
2.2.3.8 Migrationsanalyse von gesorteten T-Zellen.....	<b>S.49</b>

2.2.3.9 Mastzellen Degranulationsanalyse.....	<b>S.49</b>
2.2.4 Molekularbiologische Methoden.....	<b>S.50</b>
2.2.4.1 RNA Isolation.....	<b>S.50</b>
2.2.4.2 Reverse Transkriptase PCR zur Gewinnung von cDNA.....	<b>S.50</b>
2.2.4.3 Genexpressionsanalysen durch quantitative PCR (qPCR)....	<b>S.50-51</b>
2.2.4.4 Gewinnung von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien.....	<b>S.51</b>
2.2.4.5 Sequenzierung von amplifizierten <i>P2rx7</i> DNA-Fragmenten..	<b>S.51-52</b>
<b>3. Ergebnisse</b>	
3.1 Untersuchung von <i>P2X4ko</i> Mäusen im EAE Mausmodell.....	<b>S.53</b>
3.2 Charakterisierung von T-Zellen aus <i>P2X4ko</i> Mäusen.....	<b>S.54</b>
3.2.1 Untersuchung der <i>P2X7</i> Expression auf T Zellen aus B6- <i>P2X4ko</i> Mäusen.....	<b>S.54-55</b>
3.2.2 B6- <i>P2X4ko</i> Mäuse exprimieren die 451P Variante des <i>P2X7</i> Rezeptors als passenger Mutation.....	<b>S.56-57</b>
3.2.3 Balb/c- <i>P2X4ko</i> exprimieren die <i>P2X7</i> 451P Variante des <i>P2X7</i> Rezeptors.....	<b>S.58-59</b>
3.2.4 Die <i>P2rx7</i> passenger Mutation in den B6- <i>P2X4ko</i> Mäusen resultiert in einer erhöhten Sensitivität von B6- <i>P2X4ko</i> CTL und Th gegenüber ATP und NAD <sup>+</sup> .....	<b>S.60-62</b>
3.2.5 Die <i>P2rx7</i> passenger Mutation in den B6- <i>P2X4ko</i> Mäusen resultiert in einer erhöhten Anfälligkeit von B6- <i>P2X4ko</i> CTL und Th gegenüber dem NAD <sup>+</sup> vermittelten Zelltod.....	<b>S.62-63</b>
3.2.6 Die verstärkte NICD Sensitivität der B6- <i>P2X4ko</i> T-Zellen beeinflusst die Ergebnisse von <i>in vitro</i> Zytokinanalysen.....	<b>S.63-64</b>
3.2.7 Die verstärkte NICD Sensitivität der B6- <i>P2X4ko</i> T-Zellen beeinflusst die Ergebnisse von <i>in vitro</i> Migrationsversuchen.....	<b>S.65-66</b>
3.3 Die <i>P2rx7</i> passenger Mutation lässt sich auch in anderen Ko-Mäusen nachweisen.....	<b>S.67</b>
3.3.1 B6 Ko Mäuse von Genen, die in derselben Region liegen wie der <i>P2rx7</i> Genlocus, können auch Träger der <i>P2x7(P)</i> Variante sein.....	<b>S.67-68</b>
3.3.2 Untersuchung der Auswirkungen der <i>P2rx7</i> passenger Mutation auf T-Zellen aus in B6- <i>Hvcn1ko</i> Mäusen.....	<b>S.68-69</b>

3.4 Analyse der <i>P2rx7</i> passenger Mutation in Zellen des angeborenen Immunsystems aus P2X4ko Mäusen.....	<b>S.70</b>
3.4.1 Viele Zellen des angeborenen Immunsystems von B6 und Balb/c P2X4ko Mäusen zeigen eine reduziert P2X7 Expression.....	<b>S.70-71</b>
3.4.2 Die reduzierte P2X7 Expression auf Zellen des angeborenen Immunsystems von P2X4ko ist assoziiert mit einer geringeren <i>P2rx7</i> mRNA Expression.....	<b>S.71-72</b>
3.4.3 Zellen des angeborenen Immunsystems aus P2X4ko Mäusen zeigen reduzierte P2X7-abhängige Effektorfunktionen.....	<b>S.72-74</b>
Ergebnisse Anhang.....	<b>S.75-78</b>
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>S.79-87</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>S.88-89</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>S.90</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>S.91-100</b>
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>S.101</b>
<b>9. Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>S.102</b>

## Publikationsliste

Zabala, A., Vazquez-Villoldo, N., Rissiek, B., Gejo, J., Martin, A., Palomino, A., Perez-Samartín, A., Pulagam, K. R., **Lukowiak, M.**, Capetillo-Zarate, E., Llop, J., Magnus, T., Koch-Nolte, F., Rassendren, F., Matute, C., & Domercq, M. (2018). „P2X4 receptor controls microglia activation and favors remyelination in autoimmune encephalitis”. *EMBO molecular medicine*, 10(8).

Rissiek, B., **Lukowiak, M.**, Raczkowski, F., Magnus, T., Mittrücker, H. W., & Koch-Nolte, F. (2018). *In Vivo* Blockade of Murine ARTC2.2 During Cell Preparation Preserves the Vitality and Function of Liver Tissue-Resident Memory T Cells. *Frontiers in immunology*, 9, 1580.

Rissiek B., **Lukowiak M.**, Haag F., Magnus T., Koch-Nolte F. (2018). “Monitoring the Sensitivity of T Cell Populations Towards NAD<sup>+</sup> Released During Cell Preparation”. *Methods Mol Biol.* 2018;1813:317-326.

**Er-Lukowiak, M.**, Duan, Y., Rassendren, F., Ulmann, L., Nicke, A., Ufer, F., Friese, M. A., Koch-Nolte, F., Magnus, T., & Rissiek, B. (2020). „A *P2rx7* Passenger Mutation Affects the Vitality and Function of T cells in Congenic Mice”. *iScience*, 23(12), 101870.

# 1. Einleitung

## 1.1 Passenger Mutationen und wie sie entstehen

Diese Dissertation beschäftigt sich mit passenger Mutationen in kongenen Mausstämmen und zeigt am Beispiel der P2X4ko Maus (P2rx4<sup>tm1Rass</sup>), welchen Einfluss diese auf Experimente, Ergebnisse, Interpretation und Schlussfolgerung haben können. Passenger Mutationen haben ihren Ursprung in den embryonalen Stammzellen (ES Zellen), welche für die Erzeugung von knockout Mäusen verwendet werden. Sind diese beispielsweise aus einer 129 Mauslinie, und die später zu generierende knockout Mauslinie soll den C57BL/6 (B6) genetischen Hintergrund haben, kann es dazu kommen, dass Genvarianten aus den ES Zellen in der unmittelbaren genetischen Umgebung des ausgeknockten Ziel Gens persistieren. Je näher diese, in den beiden Linien unterschiedlich vorliegenden oder exprimierten Gene am knockout Lokus liegen, desto unwahrscheinlicher ist ein erfolgreicher Austausch von 129 gegen B6 Genvariante im Rahmen der Rückkreuzung. Ist ein derartiges Nachbargen in 129 Mäusen beispielsweise durch eine internes STOP Codon inaktiv, kann dieses inaktive Gen als passenger Mutation auf die knockout Maus übertragen werden. Dies kann, wie der knockout selbst, einen bestimmten Phänotypen erzeugen. Es ist essenziell, dass man sich dessen bewusst ist, da man ansonsten diesen Phänotypen allein auf das ausgeknockte Gen zurückführen würde. Im Folgenden wird die Generierung von knockout Mäusen genauer erklärt.

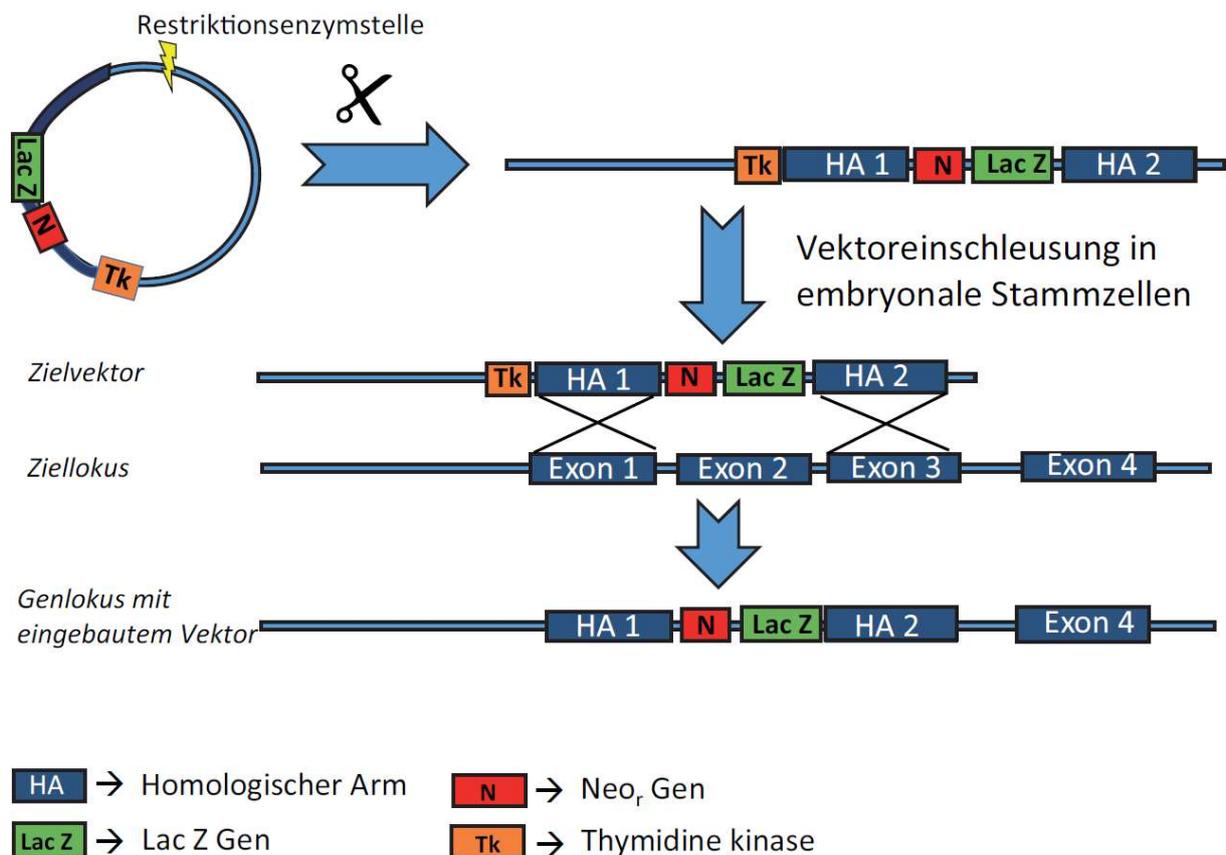
### 1.1.1 Die Generierung von „knockout“ Mäusen

Den entscheidenden Durchbruch zur Zucht von kongenen Mausstämmen gelang den Forschern Mario Capecchi, Martin Evans und Oliver Smithies. Diese drei Wissenschaftler wurden für ihre Arbeit, mit dem Namen „knockout mouse“, im Jahr 2007 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet (BMJ 2007). Zu dieser Zeit galt diese Methode als revolutionär, da vorher „gene silencing“ nur auf pharmakologischem Wege möglich war. Durch die Unsicherheit, dass pharmakologische Wirkstoffe in unspezifische Wechselwirkungen mit anderen biologischen Systemen treffen, galt die Erschaffung der ko-Mäuse als sichere Methode zur phänotypischen Untersuchung von Genen. Die ersten Versuche zur Generierung von ko-Mäusen wurden 1992 getätigt in den Laboren von Susumu Tonegawa und Eric Kandel (Grant, O'Dell *et al.* 1992, Silva, Paylor *et al.* 1992). Diese angeblich sichere Methode erwies sich im Nachhinein als unwahr, da sie ebenfalls auf diverse Probleme gestoßen ist. Im Laufe der Jahre wurden neue Techniken zur Deletion einzelner Genabschnitte entwickelt. In den folgenden zwei Unterkapiteln wird genauer auf die klassischen und die modernen Methode zur Herstellung von ko-Mäusen eingegangen.

### 1.1.1.1 Die klassische Generierung von ko-Mäusen

Die klassische Methode zur Generierung von ko-Mäusen wurde von Smithies (Smithies *et al.* 1985) und Mansour (Mansour *et al.* 1988) erstmals beschrieben und basiert auf der Nutzung der homologen Rekombination. Bei diesem zellulären Prozess werden DNA-Bereiche zwischen zwei Schwesterchromatiden miteinander ausgetauscht. Dies geschieht aber nur dann, wenn die ausgetauschten DNA-Bereiche homolog zueinander sind. In der Natur benutzen Zellen diesen Mechanismus, um beschädigte Genabschnitte auszutauschen. In den Keimzellen wird während der Meiose ebenfalls homologe Rekombination betrieben, um die genetische Vielfalt zu erhöhen. Diese Eigenschaften kann man sich zunutze machen, wenn man ein bestimmtes Gen ausschalten möchte. Hierzu kann man ein künstliches DNA Fragment benutzen, welches dann eine homologe Rekombination mit der genomischen DNA vollziehen kann (Nandi, Roginski *et al.* 1988). Es zeigt sich, dass für die homologe Rekombination lediglich die beiden Außenbereiche beider DNA-Sequenzen homolog sein müssen. Die Rekombination selbst wird mit Hilfe eines Proteinkomplexes vollzogen, dem RAD52 Komplex (Rijkers, Van Den Ouweland *et al.* 1998). Eine genauere Darstellung dieses ganzen Prozesses lässt sich der Abbildung 1.1 entnehmen. Der erste Schritt in der klassischen Generierung von ko-Mäusen ist die Kreation eines homologen DNA-Vektorkonstrukts. Idealerweise erstreckt sich der Homologiebereich des Vektors über drei Exonbereiche des Zielgens, inklusive der zwischen liegenden Introns. Der Vektor selbst besitzt zudem mehrere Bereiche die entscheidend für den Erfolg der Methode sind. Zum einen hat jeder Vektor eine Restriktionsenzymstelle, da die DNA in linearisierter Form eine deutlich bessere Erfolgsrate der homologen Rekombination aufweist (Hasty, Rivera-Perez *et al.* 1992). Zur späteren Detektion des erfolgreichen Transfers nutzt man Selektionsmarkergene, die dafür sorgen, dass die Zielzelle in einem speziellen Selektionsmedium überleben kann. Ein oft genutzter Marker ist das Neomycin Resistenzgen. Des Weiteren kann man ein Blau-Weiß Screening mit Hilfe des LacZ Gens verwenden, um blau gefärbte Zellen zu detektieren. Dazu muss ein Medium mit X-Gal verwendet werden, welches durch das Vorhandensein des LacZ Gens in einen blauen Farbstoff umgewandelt wird. In gut konstruierten Vektoren können auch mehrere positiv Markergene verwendet werden. Diese Selektionsmarker werden von zwei Homologie-Armen (HA) flankiert. Das sind DNA-Sequenzen die identische Kopien von zwei Exon Bereichen im Zielgen darstellen. Für eine erfolgreiche Rekombination ist eine Sequenzidentität von mindestens 2 Kilobasen erforderlich, also 1 Kilobase pro HA. Die HA Sequenzen müssen dabei von Exons stammen, die nicht direkt benachbart sind, sondern ein Exon weiter entfernt liegen. Das dazwischen liegende Exon wird bei der homologen Rekombination von den Selektionsmarker(n) ersetzt (**Abb. 1.1**). Der knockout Effekt beruht auf dem Austausch eines Exons im Zielgen mit dem Selektionsmarker und der damit eingehenden, fehlerhaften Expression des Gens. Der letzte wichtige Bereich des Vektors ist der negative Selektionsmarker. Ein oft benutzter Marker ist das Gen für die Thymidinkinase (TK). Dieser liegt in der Regel vor oder hinter einem der HA. Er wird demnach bei erfolgreicher Insertion nicht mit eingebaut in das Zielgen. Der Zweck dieser Positionierung des Markers ist die Prävention von spontanen, zufälligen

Insertionen des Vektors in anderen Bereichen des Genoms. Bei solch einem Fall würde das intakte TK Gen ebenfalls inseriert werden. Fügt man dem Selektionsmedium Ganciclovir oder Fialuridin (FIAU) hinzu, werden diese Stoffe durch die TK phosphoryliert und inhibieren dann die DNA-Synthese. Somit wird sichergestellt, dass nur embryonale Stammzellen transferiert werden können, die den Vektor an der gewollten Stelle inseriert haben. Die Durchführung dieser ko-Maus Generation geschieht üblicherweise in embryonalen Stammzellen der 129/J Mauslinie. Es hat sich gezeigt hat, dass diese ES eine hohe Erfolgsrate in der Generierung des knockouts besitzen (Simpson, Linder *et al.* 1997). Dies hat zur Folge, dass fast alle verfügbaren embryonale Stammzellen aus der 129/J Maus stammen (Papaioannou and Johnson, 1993).



**Abb. 1.1 Schematische Darstellung zur Generation von knockout Mäuse durch homologe Rekombination.**

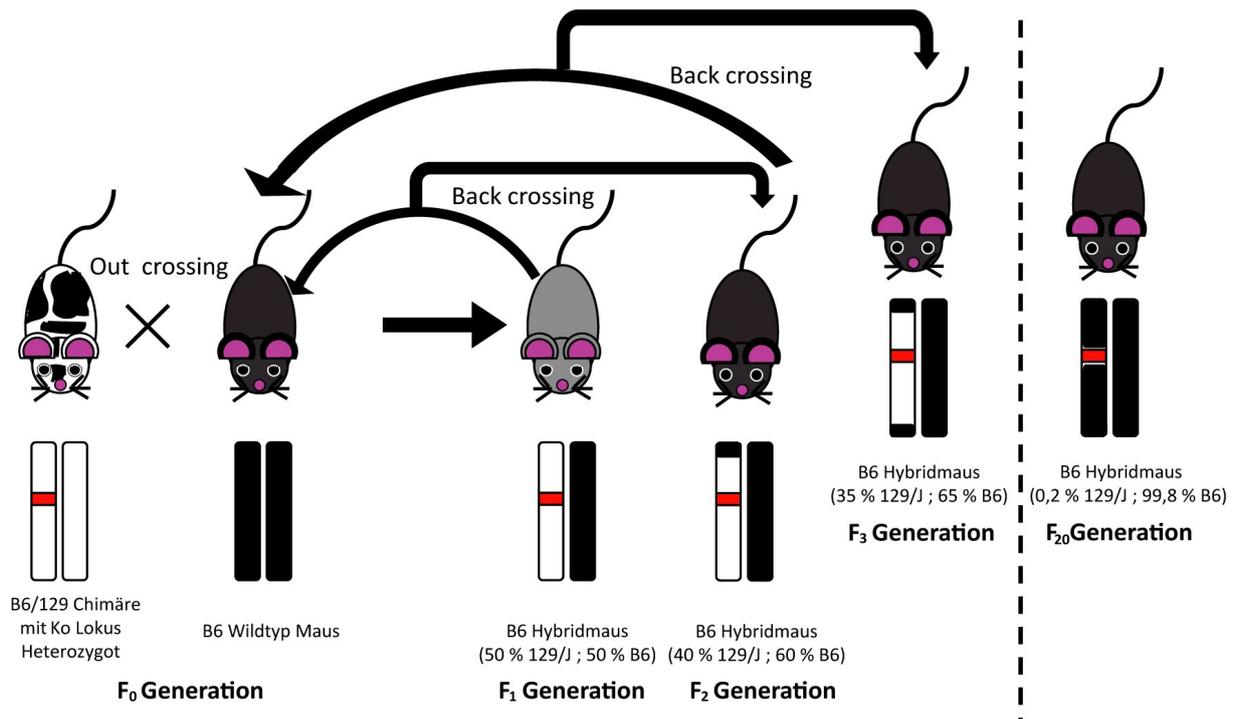
Ein konstruierter Vektor (2x Homologie-Arme, 1x LacZ Gen, 1x Neo<sub>r</sub> Gen, 1x Thymidinkinase Gen) wird zunächst linearisiert und anschließend in die embryonale Stammzelle (ES) eingeschleust. Durch homologe Rekombination wird der Zielvektor in den Genlocus eingebaut, sodass das Exon Nr.2 durch das Vektorkonstrukt ausgetauscht und inaktiviert wird. Die ES befindet sich auf einem Medium mit Neomycin, worauf sie nur überleben können, wenn die homologe Rekombination erfolgreich verläuft (Resistenzgene → Neo<sub>r</sub>). Durch das LacZ Gen kann ebenfalls ein Blau-Weiß Screening zur positiven Selektion verwendet werden. Das Thymidin Kinase Gen kann optional noch zur negativ Selektion eingesetzt werden.

### 1.1.1.2 Moderne Methoden zur Generierung von ko-Mäusen

Die oben beschriebenen Methoden zur Herstellung von ko-Mäusen hat sich über viele Jahre hinweg bewährt, was zur Generierung von mehr als 15.000 (MGI Datenbank) von verschiedenen ko-Mäusen für die meisten Gene geführt hat. Da diese Art der Generierung jedoch zu den in 1.1. beschriebenen passender Mutation führen kann, wäre eine Alternative Methode wünschenswert, die nicht zu kongenen ko-Mäusen führt, sondern mit der die Tiere z.B. einen 100% B6 Hintergrund haben. Gleichzeitig ist die klassische Etablierung einer stabilen ko-Mauslinie relativ teuer und gleichzeitig sehr zeitaufwendig. Zudem ist es mit den klassischen Methoden nicht möglich Mäuse herzustellen in denen mehr als ein Gen ausgeschaltet ist. Einer dieser neueren Ansätze ist die TAL Effektor Methode. Hierbei wird einer embryonalen Zelle genetische Information eingeschleust (DNA oder mRNA), die eine Stell-spezifische DNA Nuklease codiert, welche Strangbrüche in der genomischen DNA verursacht (Bogdanove and Voytas 2011). Ein fehleranfälliger Mechanismus der Zelle, die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ), sorgt anschließend für eine Verknüpfung des Strangbruches. Dieser Prozess verläuft oft sehr ungenau, weshalb es zu Punkt- oder Deletionsmutationen kommen kann. Diese reichen meistens aus, um das Zielgen zu inaktivieren. Oftmals werden für diese Methoden Zinkfinger Nukleasen verwendet (Carbery, Ji *et al.* 2010). Bei der Entwicklung solcher Nukleasen muss darauf geachtet werden, dass die zu schneidende DNA-Sequenz an keiner anderen Stelle im Genom vorkommt, um ungewollte off-target Mutationen zu vermeiden. In der Praxis hat sich zudem gezeigt, dass es mit dieser Methode ebenfalls nicht möglich ist mehrere Gene gleichzeitig auszuschalten. Eine revolutionäre, neue Methode zur Genom Manipulation wurde 2014 veröffentlicht und beschreibt die Verwendung eines von Bakterien benutzen Systems, zur Bekämpfung von viralen Infektionen, dem CRISPR-Cas9 System (Doudna and Charpentier 2014). Dieses System, bestehend aus einem Ribonukleinkomplex, kann dahingehend genutzt werden, dass Sequenz spezifische Doppelstrangbrüche gebildet werden können, was zur Deaktivierung eines Gens führen kann. Diese Methode ist so hochspezifisch, dass damit sogar ein GFP Markergen nachwirkend entfernt werden kann (Shen, Zhang *et al.* 2013). Zudem konnte man mit diesem System zum ersten Mal mehrere Genabschnitte gleichzeitig in humanen Zellkulturen beeinflussen (Cong, Ran *et al.* 2013). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die gezielten Gendeletionen direkt in der gewünschten Mauslinie vorgenommen werden können. Somit kann der Problematik einer passender Mutation umgangen werden.

### 1.1.2 Back crossing in der B6 Maus

Das back crossing ist ein wichtiger Schritt zur Generierung einer stabilen knockout Mauslinie, welche dann für weitere Experimente verwendet werden kann. Zunächst wird in einer embryonalen Stammzelle (ES), ein Gen ausgeschaltet und diese dann in eine Blastozyste transferiert. Üblicherweise hat die embryonale Stammzelle einen 129 Maushintergrund was zu der Entwicklung eines chimären Embryos führt. Dieser wird anschließend in eine Ammenmaus transferiert, welche dafür sorgt, dass die Chimärenmaus ausgetragen wird. Die Verpaarung der chimären Mäuse mit einer B6-WT Maus wird als „outcrossing“ bezeichnet, da beide Mäuse keine Verwandtschaft zueinander aufweisen. Die Generation, die bei dieser Verpaarung herauskommt, wird als „first filial generation“ ( $F_1$ ) bezeichnet. Die  $F_1$  Mäuse sind heterozygot und besitzen ein Chromosom der B6-Maus und eines von der 129/J Maus. Das 129/J Chromosomen ist hierbei Träger der ko-Mutante. Bei der Generierung der nächsten Generation kommt das „back crossing“ zum Einsatz. Um die genetische Varianz so gering wie möglich zu halten, werden die Mäuse der  $F_1$  Generation mit dem B6-WT Elterntier verpaart. Die daraus resultierende  $F_2$  Generation beinhaltet Mäuse die weiterhin Träger der ko-Mutante sind und dessen 129/J Chromosomen stückweise mit B6-DNA substituiert wurde (**Abb. 1.2**). Diese Substituierung der DNA findet schon in der Ausbildung der Gameten, durch das crossing over, statt. Diese Mäuse werden wieder für eine Verpaarung mit der B6- $F_1$  verwendet, um die  $F_3$  Generation zu erschaffen usw. Wichtig bei der Verpaarung für die nächste Generation ist die Auswahl der richtigen Heterozygoten Maus. Diese muss zwingend die ko-Mutante erhalten da durch das crossing over der ko-Lokus ebenfalls substituiert werden kann. Mit jeder weiteren Generation erhöht sich die Homologie der Chromosomen um ca. 19 %. Bei  $F_{10}$  beträgt die Homologie ca. 90 %, bei  $F_{20}$  ca. 99,8 % und bei  $F_{30}$  99,98 % (Agulnik, Bollag *et al.* 1995). Die meisten Mauslinien werden zwischen 10 und 20 Generationen lang rückgekreuzt. Problematisch bei dem back crossing ist das Vorhandensein von 129/J DNA um den ausgeknockten Genlocus. Selbst bei  $F_{10}$  oder  $F_{20}$  Generationen würden immer noch 0,2 % bzw. 0,02 % DNA vom Genom der Ursprungsmaus vorhanden sein. Jedoch können selbst in diesem kleinen Bereich Gene liegen, die sich in ihrer Sequenz oder Expression in 129/J und B6 Mäusen unterschieden und somit als passenger Mutation in der neu generierten ko-Mauslinie vorliegen. Dieses Phänomen wird in der Literatur auch als „hitch-hiking gene issue“ bezeichnet (Gerlai 1996). Es gibt eine Maßeinheit, welche die Wahrscheinlichkeit einer möglichen Rekombination in Prozent angibt. Diese Hilfsmaßeinheit wird als Centimorgan (cM) bezeichnet. Es wird die Wahrscheinlich zur Entkopplung zweier Gene, durch crossing over, in einem Locus beschrieben. Als Beispiel, zwei Gene sind 1 cM voneinander entfernt, wenn eine 1 % Chance besteht, dass diese Gene bei einem crossing over getrennt werden. Je kleiner der cM Wert, desto unwahrscheinlicher ist eine Trennung dieser Gene bei der Generierung der Folgegeneration (Lusis, Yu *et al.* 2007).



**Abb. 1.2 Schematische Darstellung des back crossing Verfahrens.**

Eine transferierte chimäre Maus wird mit einer B6-Wildtyp Maus verpaart (Outcrossing). Die daraus resultierende F<sub>1</sub> Generation ist heterozygot und wird wiederum mit einer B6-Wildtyp Maus verpaart (back crossing). Die nachfolgende F<sub>2</sub> Generation ist weiterhin heterozygot jedoch mit mehr Anteilen an B6-Wildtyp DNA. Nach 20 Generationen ist bis auf ein den Ko-Lokus flankierender Bereich das gesamte Genom der Ko-Maus auf B6-Wildtyp Hintergrund.

### 1.1.3 Beispiele für passenger Mutationen

In der Literatur sind bereits einige Fälle von passenger Mutationen in ko-Mausmodellen beschrieben worden. Diese passenger Mutationen haben zum Teil einen deutlichen Einfluss auf die Phänotypen dieser Mäuse. Ein Beispiel ist die Generierung von transgenen Mäusen deren Zielgen in der Nachbarschaft des DAP12 Gens befindet. Dieses Protein ist wichtig für die Aktivierung von natürlichen Killerzellen. Es haben sich jedoch funktionale Unterschiede von DAP12 im Vergleich von B6 und 129/J Mäusen gezeigt (McVicar, Winkler-Pickett *et al.* 2002). Im Gegensatz zu den B6 NK-Zellen, findet bei 129/J NKs keine Kalziummobilisierung sowie keine Zytokinexpression statt. Es gibt weitere Fälle in der eine alternative Variante eines Proteins in B6 und 129 Mäuse exprimiert wird. Als Beispiele lassen sich unter anderem die DNA Polymerase Iota (McDonald, Frank *et al.* 2003), das Oca2 Protein (Rogers, Boyartchuk *et al.* 2012) und Cdt1 (Coulombe, Gregoire *et al.* 2013) anführen. Im Beispiel mit der DNA Polymerase Iota, zeigt die DNA Synthese in 129/J Mäusen eine erhöhte Fehleranfälligkeit auf, verglichen mit B6 Mäusen. Das Oca2 Protein ist an der Angiogenese beteiligt. Die unterschiedlichen Expressionslevel des Proteins in B6 und 129/J Mäusen zeigen einen direkten Einfluss auf die Geschwindigkeit der vaskulären Endothelzellbildung. Cdt1 ist ein Protein, welches in Zellkern lokalisiert ist und die DNA-Replikation steuert. 129/J Mäuse besitzen eine Mutante dieses Gens, welche dafür sorgt, dass diese Replikation verstärkt wird. Die hier aufgeführten Beispiele könnten potenzielle passenger Mutationen sein. Das Problem der passenger Mutationen wurde lange Zeit ignoriert, bis eine Arbeit im Jahr 2011 die irreführenden Konsequenzen von passenger Mutationen am Beispiel der Casp1ko Maus demonstrierte. Für die Generierung der Casp1ko Maus wurden 129 ES Zellen verwendet und die Linie wurde anschließend auf B6 zurück gekreuzt. Die Tiere dieser Linie zeigten, verglichen mit der B6-WT Maus, eine deutlich höhere Resistenz gegenüber einer letalen Dosis Lipopolysaccharid (LPS) (Kayagaki, Warming *et al.* 2011). Auf den ersten Blick lässt sich die Resistenz mit dem Ausschalten von *Casp1* erklären. Bei genauerer Betrachtung wurde festgestellt, dass die B6-Casp1ko Mäuse eine passenger Mutation in dem benachbarten Caspase 11 Gen (*Casp11*) aufweist. Diese passenger Mutation hatte ein inaktives *Casp11* als Konsequenz, ein Zustand der in 129-Wildtyp Mäusen natürlicherweise vorhanden ist. Durch das Fehlen dieses Gens, erhöht sich die Resistenz gegenüber LPS. Dies wurde nochmal verdeutlicht durch die Untersuchung von ko-Mäusen, die in dem gleichen Locus liegen wie *Casp1* und *Casp11*. Die ko-Mäuse für das *Casp3* Gen (Kenneth, Younger *et al.* 2012) und das *Birc2* Gen zeigen die gleiche LPS Resistenz wie die Casp1ko Mäuse. Anhand dieser Beispiele zeigt sich sehr deutlich der Einfluss von passenger Mutationen auf die Interpretation von Ergebnissen in der biomedizinischen Grundlagenforschung.

## 1.2 Der purinerge Rezeptor P2X7

### 1.2.1 Purinerge Rezeptorfamilien

Es sind drei Hauptfamilien an purinergen Rezeptoren beschrieben: Adenosin Rezeptoren (P1), metabotrope P2Y Rezeptoren (P2YR) und ionotrope P2X Rezeptoren (P2XR). Sowohl die P1 als auch die P2Y Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, P2X Rezeptoren hingegen sind eine Familie von transmembranen Ionenkanälen. Die P1 Rezeptoren benötigen Adenosin als Ligand und können, je nach zellulärem Kontext, pro- oder antiinflammatorische Effekte vermitteln (Fredholm, BB. 2007; Linden, J. 2005; Novitsky *et al.* 2008). Das Liganden Spektrum der P2Y Rezeptoren umfasst Nukleotide Diphosphate (ADP, UDP) sowie Nukleotide Triphosphate (ATP, UTP). Eine der großen Funktionen dieser Rezeptoren ist unter anderem die Chemotaxis von Immunzellen (Barrett, Sesma *et al.* 2013). In Neutrophile z.B konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von A2AR eine Inhibierung der Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 einhergeht (Reutershan *et al.* 2007). Die ionotropen P2X Rezeptoren sind Trimere, membranständige Rezeptoren, wobei einige Homotrimer und einige Heterotrimer sind (Cekic and Linden 2016). Die Aktivierung erfolgt ausschließlich über Adenosintriphosphat (ATP) und sorgt bei Bindung für eine Permeabilität des P2XR für bestimmte Kationen ( $\text{Na}^+$ ;  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$ ). Im immunologischen Kontext sind viele dieser P2XR an proinflammatorischen Prozessen sowie an der T-Zellaktivierung beteiligt. In Makrophagen z.B sorgt die Bindung von freigesetztem ATP an den P2X7 Rezeptor für eine Signalkaskade, welche zur Bildung des Inflammasoms führt (Perregaux and Gabel 1994). Es sind bis heute insgesamt sieben, für Säugetiere, verschiedene P2X Mitglieder bekannt und charakterisiert worden (Coddou, Yan *et al.* 2011). Eine Gesamtübersicht dieser Rezeptorfamilien ist in der folgenden Tabelle ausgeführt.

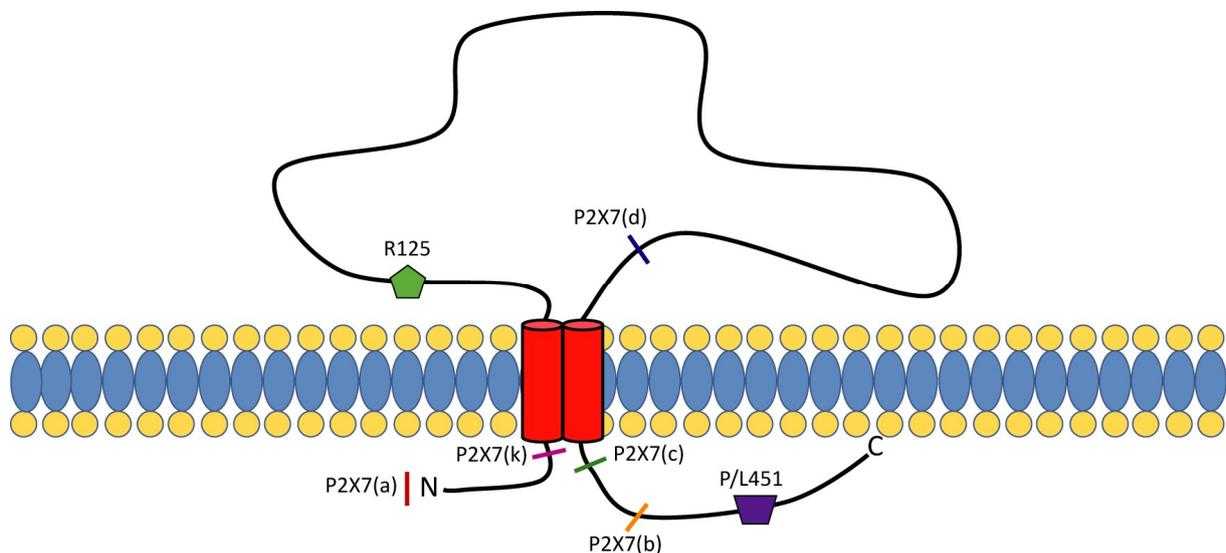
**Tabelle 1.1** Übersicht der purinergen Rezeptoren und dessen Funktionen (Cekic and Linden 2016).

Purinerge Rezeptorfamilie	Rezeptor	Ligand	Immunzellen welche den Rezeptor Expressieren	Rezeptorfunktion
Adenosin Rezeptoren	A1R	Adenosin	Neutrophile, unreife dendritische Zellen	Chemotaxis
	A2AR	Adenosin	Meisten Immunzellen	Antiinflammation
	A2BR	Adenosin	Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen	IL-6, VEGF Produktion, Mastzell degranulation
	A3R	Adenosin	Neutrophile, Mastzellen	Chemotaxis Blockade, Mastzell degranulation
Metabotropische Rezeptoren	P2Y <sub>1</sub> R	ADP	Thrombozyten	Wundverschießung
	P2Y <sub>2</sub> R	ATP	Phagozyten, DC, Monozyten, Lymphozyten	Chemotaxis
	P2Y <sub>4</sub> R	UTP	Hematopoetische Stammzellen, Mikroglia	Pinozytose
	P2Y <sub>6</sub> R	UDP	Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, Lymphozyten	Aktivierung
	P2Y <sub>11</sub> R	ATP	Granulozyten	Aktivierung
	P2Y <sub>12</sub> R	ADP	Thrombozyten	Wundverschießung
	P2Y <sub>13</sub> R	ADP	Monozyten	Aktivierung
	P2Y <sub>14</sub> R	UDP-Glukose	Neutrophile	Chemotaxis
Ionotrope Rezeptoren	P2X <sub>1</sub> R	ATP	T-Zellen, Mastzellen, Thrombozyten	Aktivierung von T-Zellen und Mastzellen
	P2X <sub>2</sub> R	ATP	B-Zellen	IgE Rezeptor shedding
	P2X <sub>3</sub> R	ATP	Mastzellen	Zytokinaustoss
	P2X <sub>4</sub> R	ATP	T-Zellen, Mikroglia, Mastzellen	Aktivierung von T-Zellen und Mastzellen
	P2X <sub>5</sub> R	ATP	T-Zellen	Aktivierung
	P2X <sub>6</sub> R	ATP	T-Zellen	Aktivierung
	P2X <sub>7</sub> R	ATP	T-Zellen, NKT Zellen, Makophagen, DC	Aktivierung von T-Zellen, Mastzellen, NKT, Makrophagen und DC

### 1.2.2 Der murine P2X7 Rezeptor

Der P2X7 Rezeptor wurde im Kontext des Immunsystems eingehend untersucht und beschrieben. Das murine *P2rx7* Gen ist auf dem 5. Chromosom der Maus lokalisiert. Es besteht aus 13 Exons und 12 Introns, welche in der Maus von 48410 Basenpaaren kodiert werden. Zudem sind 4 alternative splice Varianten in der Maus bekannt. Demnach gibt es insgesamt 5 verschiedene mRNAs, die mit Hilfe von unterschiedlichen Buchstaben voneinander unterschieden werden (*P2xr7-a, k, b, c, d*) (Benzaquen, Heeke *et al.* 2019). *P2rx7-a* Isoform repräsentiert die Referenzisoform. *P2xr7-b* und *c* zeichnen sich durch die Deletion des 13. Exons aus was zu einem verkürzten Protein und somit zu einer verminderten Rezeptoraktivität führt (Sluyter 2017). Das exprimierte P2X7(d) Protein zeichnet sich durch eine massive Verkürzung der Polypeptidkette aus. Dieser fehlen sowohl der intrazelluläre C-Terminus als auch eine Transmembranregion. In der Literatur ist wurde eine Funktion von P2X7(d) beschreiben, indem es mit anderen Isoformen ein Heterotrimer bilden und somit die Rezeptorfunktion stark vermindern kann (Kido, Kawahara *et al.* 2014). Die letzte

Isoform (*P2xr7-k*) entsteht durch ein alternatives splicing von Exon 1, was einen Einfluss auf den N-Terminus des Proteins und dessen erste Transmembranregion hat (Schwarz, Drouot *et al.* 2012). Diese P2X7 Isoform ist vor allem in murinen T-Zellen als Homotrimer zu finden. P2X7(k) ist zudem ATP gegenüber sensibler als P2X7(a) (Schwarz, Drouot *et al.* 2012). Die Monomere des P2X7 Rezeptors in der P2X7(a) Variante besteht aus 595 Aminosäuren, die der P2X7(k) Variante aus 553 Aminosäuren. Die P2X7 Untereinheiten zeichnen sich durch einen kurzen, intrazellulären N-Terminus und durch einen vergleichsweise langen intrazellulären C-Terminus aus (North, RA. 2002). Dieser enthält die Position 451, welche durch den nicht synonymen „single nucleotide“ Polymorphismus (SNP) rs48804829 (Adriouch *et al.* 2002) durch ein Prolin (451P) oder ein Leucin (451L) besetzt wird. Dieser SNP führt dazu, dass sich beispielsweise Mausstämme wie die B6 Maus und die 129 Maus in ihrer P2X7 Aminosäuresequenz unterscheiden. Zudem wurde in der Literatur beschrieben, dass die 451P Variante sensibler auf ATP reagiert als die 451L Variante (Adriouch *et al.* 2002). Extrazellulär weisen die P2X7 Untereinheiten eine lange Schleife auf, die die zwei Transmembranregionen miteinander verbindet (Abb. 1.3). Eine funktionell relevante Position in der extrazellulären Schleife ist das Arginin an Position 125 (R125). Diese kann in Gegenwart des Ektoenzym ADP-Ribosyltransferase C2 (ARTC2.2) und dessen Substrat Nicotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) ADP-ribosyliert werden. Sowohl auf die ADP-Ribosylierung von R125 als auch den SNP der zu den 451P/L Varianten führt wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.



**Abb. 1.3 Der Aufbau des murinen P2X7 Rezeptors.**

Darstellung des P2X7 Rezeptors in der Maus und mit funktionell relevanten Bereichen. Das grüne Fünfeck zeigt das Arginin an der Position 125, welches Akzeptor für die ARTC2.2 vermittelte ADP-Ribosylierung ist. Das violette Trapez stellt die rs48804829 SNP bedingte Punktmutation an der 451. Aminosäurestelle dar. Die einzelnen Farbstriche symbolisieren die Längen der einzelnen P2X7 Isoformen. Der dargestellte Rezeptor repräsentiert dabei der P2X7(a) Form.

### 1.2.3 P2X7 Aktivierung und dessen Auswirkung

Einer der am besten beschriebenen Mechanismen der P2X7 Aktivierung ist die Formierung des NLRP3 Inflammasom Komplexes in Zellen des angeborenen Immunsystems. Zunächst wurde die Beobachtung gemacht, dass die Stimulierung dieser Zellen mit ATP zu einer Ausschüttung von IL-1 $\beta$  führt (Perregaux and Gabel 1994). Einige Jahre später wurde der gesamte Signalweg entschlüsselt und beschrieben (Ferrari *et al.* 1997). Für die Expression und Freisetzung von IL-1 $\beta$  sind zwei Signale notwendig. Das erste wird durch die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren erreicht, was zu einer Bildung der inaktiven Pro-IL-1 $\beta$  Form führt. Das zweite Signal kann durch die P2X7 Aktivierung und dem dadurch entstehenden Kalium Einstrom in die Zelle vermittelt werden (Perregaux and Gabel 1998). Dadurch wird die Bildung des NLRP3 Inflammasoms gefördert, wodurch die zum Komplex gehörige Caspase-1 das vorher gebildete, inaktive pro-IL-1 $\beta$ , zu einem aktiven Zytokin prozessieren kann. In einer weiteren Studie wird die Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS) als ein weiterer Effekt der P2X7 Rezeptoraktivität in Makrophagen beschrieben (Lenertz, Gavala *et al.* 2009). Die Bildung der Sauerstoffradikale selbst geschieht durch den NADPH Oxidase Komplex, welcher jedoch durch das P2X7 Signal assembliert wird (Parvathenani *et al.* 2003). Des Weiteren wurde die Abspaltung von Oberflächenproteinen (shedding) mit der P2X7 Rezeptoraktivität in Verbindung gebracht. Dieses shedding wird hauptsächlich mit Hilfe zweier Metalloproteasen vollzogen, ADAM10 und ADAM17 (Garbers, Janner *et al.* 2011). Ein weiterer Effekt der P2X7 Rezeptor Aktivierung ist die Produktion von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in Makrophagen. Das PGE<sub>2</sub> hat Einfluss auf Entzündungsreaktionen, Fieber und Schmerzen im verletzten Gewebe (Barbera-Cremades, Baroja-Mazo *et al.* 2012). Zudem können Transkriptionsfaktoren durch P2X7 signaling aktiviert und in den Zellkern translokalisiert werden. Diese sind in der Regel NF-kB p65 Proteine, die zur Inflammation beitragen. Dies konnte in Mikroglia, Monozyten und auch in T-Zellen beobachtet werden (Yip, Woehrle *et al.* 2009). Ein für diese Dissertation wichtiger Effekt ist die Indizierung des Zelltods. Dieser wird bei zu langer Öffnung des Kanals eingeleitet (Zanovello, Bronte *et al.* 1990).

#### 1.2.3.1 ATP abhängige Aktivierung von P2X7

Durch die Aktivierung des P2X7 Rezeptors mit Hilfe von ATP, folgt die Permeabilität der Plasmamembran für K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup> Ionen (Surprenant, Rassendren *et al.* 1996). Für gewöhnlich liegt die ATP Konzentration, im extrazellulären Bereich, im nanomolaren Bereich. Unter Stressbedingungen kann es jedoch zur Freisetzung von ATP z.B. durch unkontrollierte Zellyse kommen. ATP wirkt über den P2X7 Rezeptoren somit als „damage associated molecular pattern“ (DAMP) Molekül, also als Ligand, welcher bei Schaden freigesetzt wird. ATP wirkt somit, wie auch bereits oben für die Freisetzung von IL-1 $\beta$  beschrieben, über P2X7 pro-inflammatorisch. Zudem ist zu erwähnen, dass der P2X7 Rezeptor, im Vergleich zu anderen P2X Rezeptoren, eine 10-fach höhere Konzentration von ATP benötigt, um aktiviert zu werden (Yan *et al.*

2010). Die Präsenz von extrazellulärem ATP im extrazellulären Raum wird durch Ektonukleotidasen wie z.B. CD39 (*Entpd1*) reguliert, was letztlich die P2X7 Aktivität kontrolliert (Yegutkin 2008). Es wurde auch untersucht, ob ATP Derivate den P2X7 Rezeptor binden und aktivieren können. Es hat sich gezeigt, dass das Derivat BzATP ein höheres Bindungspotenzial aufweist als ATP selbst. Die gleiche Studie hat zudem gezeigt, dass sogar ADP in der Lage ist an den Rezeptor zu binden, wenn auch mit einer sehr geringen Affinität (Surprenant, Rassendren *et al.* 1996).

#### 1.2.3.2 NAD<sup>+</sup> vermittelte Aktivierung von P2X7

In murinen Zellen ist ein weiterer, alternativer Weg zur Aktivierung von P2X7 beschrieben worden. Dies ist ein ATP unabhängiger Aktivierungsmechanismus, der NAD<sup>+</sup> als Substrat verwendet. NAD<sup>+</sup> wirkt dabei als Substrat für das Ektoenzym ARTC2.2, welches an das Arginin an Position 125 (R125) der Polypeptidkette eine ADP-Ribose Gruppe knüpft (Adriouch, Ohlrogge *et al.* 2001). Diese posttranslationale Modifikation sorgt für die Präsenz eines kovalenten Liganden, was die dauerhafte Aktivierung und der damit verbundenen permanenten Öffnung des Ionenkanals zur Folge hat. Dieser Mechanismus ist vor allem bei murinen T-Zellen beschrieben (Bortel *et al.* 1999), da diese sowohl ARTC2.2 als auch P2X7 exprimieren können. Zudem wurde beschrieben, dass vornehmlich P2X7(k) durch ADP-Ribosylierung aktiviert werden kann, nicht jedoch P2X7(a) (Schwarz *et al.* 2012). Letzteres wird auf Zellen des angeborenen Immunsystems wie z.B. auf Makrophagen und Mikroglia exprimiert. Auch Makrophagen zeigen unter bestimmten Bedingungen ADP-Ribosyltransferase Aktivität, welche durch ARTC2.1 vermittelt wird (Koch-Nolte, Duffy *et al.* 1999). Erst kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass ARTC2.1 P2X7 auf Mikroglia zwar ADP-ribosylieren kann, dies jedoch weder zum Ca<sup>2+</sup> Einstrom noch zur Poren Bildung führt (Rissiek *et al.* 2020). Verglichen mit der direkten ATP-vermittelten P2X7 Aktivierung, benötigt die NAD<sup>+</sup>/ARTC2.2 vermittelte Aktivierung von P2X7 eine geringere Konzentration an NAD<sup>+</sup> um die Aktivierung von P2X7 zu ermöglichen (Rissiek, Haag *et al.* 2015). Genau wie für extrazelluläres ATP, gib es auch für extrazelluläres NAD<sup>+</sup> abbauende Enzyme, u.a. auch auf der Zelloberfläche von T-Zellen, welche für eine Regulierung der NAD<sup>+</sup> Konzentration im extrazellulären Raum sorgen. Ein solches Ektoenzym ist CD38, welches NAD<sup>+</sup> zu ADP-Ribose und zu zyklischer ADP-Ribose katalysieren kann (Krebs, Adriouch *et al.* 2005). In Bezug auf die ARTC2.2. vermittelte ADP-Ribosylierung von P2X7 ist noch zu erwähnen, dass diese Katalysationsreaktion auch bei 4°C stattfindet. Der P2X7 Rezeptor bleibt bei dieser Temperatur jedoch auch in ADP-ribosylierter Form geschlossen und öffnet sich erst langsam ab 24 °C (Scheuplein, Schwarz *et al.* 2009).

#### 1.2.3.3 Freisetzung von NAD<sup>+</sup> und ADP-Ribosylierung von P2X7 während der Zellpräparation

Wie bei dem Kapitel 1.2.3 bereits beschrieben wurde, kann eine dauerhafte Öffnung des P2X7 Ionenkanals zum Tod der Zelle führen. Bei der ATP vermittelten Aktivierung

besteht die Möglichkeit, dass der ATP Ligand vom P2X7 Rezeptor ab dissoziieren kann. Die NAD<sup>+</sup> abhängige Aktivierung des P2X7 Rezeptors durch ARTC2.2 vermittelte ADP-Ribosylierung hingegen, sorgt für eine kovalente Bindung der ADP-Ribose, was zu einer permanenten Aktivierung von P2X7 führt und somit den Ionenkanal dauerhaft öffnet. Dieser Effekt wird als „NAD<sup>+</sup> induced cell death“ bezeichnet (NICD) (Seman *et al.* 2003). Zellen, die viel P2X7 und ARTC2.2 exprimieren sind somit besonders anfällig für NICD (Koch-Nolte, Duffy *et al.* 1999; Di Virgillo *et al.* 2001). NAD<sup>+</sup> wird u.a. von beschädigten oder unkontrolliert sterbenden Zellen freigesetzt. So kommt es beispielsweise im Rahmen der Zellpräparation aus der Milz zur Freisetzung von NAD<sup>+</sup>, was ausreicht, um auf bestimmten T-Zellpopulationen P2X7 zu ADP-Ribosylieren. Dies geschieht auch, wenn die Zellpräparation durchweg bei 4°C durchgeführt wird. Solange die Zellen bei 4°C bleiben kommt es auch zu keiner P2X7 Aktivierung, da P2X7 durch ADP-Ribosylierung erst ab ca. 30°C aktiviert werden kann (Scheuplein *et al.* 2009). Werden die Zellen in funktionellen Experimenten weiter untersucht, welche eine Inkubation bei 37°C beinhalten, so kommt es zur P2X7 Aktivierung und schließlich zur Induktion des NICD. Bislang identifizierte Zellpopulationen mit hoher ARTC2.2/P2X7 co-Expression sind Tregs, NKTs, Tfh, und Trm (Hubert *et al.* 2010; Rissiek *et al.* 2014/2015, Georgiev *et al.* 2018).

Im Jahr 2007 wurden Einzeldomänen Antikörper aus Lama Schwerekettenantikörpern hergestellt, welche gezielt an ARTC2.2 binden und deren katalytische Aktivität blockieren kann (Koch-Nolte, Reyelt *et al.* 2007). Der ARTC2.2 inhibierende Nanobody s+16a wird zur Verhinderung des präparations bedingten NICD eingesetzt, indem dieser ca. 1h vor der Organentnahme in die Maus gespritzt wird. Dort bindet er an ARTC2.2 und verhindert somit die ADP-Ribosylierung von P2X7 und anderen Zelloberflächenproteinen während der Zellpräparation (Rissiek *et al.* 2014)

### 1.3 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein körpereigenes System aus Zellen und Proteinen zur Bekämpfung von Pathogenen, die die Unversehrtheit des Wirtes bedrohen. Jedes höhere Wirbeltier besitzt ein Immunsystem zum Schutz vor Infektionen und deren Folgen. Auch einzellige Lebewesen (Yatim and Lakkis 2015) und Pflanzen (Han 2019) besitzen einen Abwehrsystem. Die simpelste Schutzfunktion besteht in der Bildung von Barrieren wie Häuten und Schleimhäuten, welche zunächst von dem Pathogen überwunden werden müssen. Dies kann u.a. im Rahmen von Verletzungen geschehen. Das Eindringen von Pathogenen induziert dann die Aktivierung des zelluläre Immunsystems. Dieses setzt sich aus zwei Unterkategorien zusammen, den Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems. Auf beide Systeme wird im Folgenden genauer eingegangen. Zudem wird die Rolle des P2X7 Rezeptors in jedem der unten aufgelisteten Zelltypen beschrieben.

### 1.3.1 Das angeborene Immunsystem

Die Zellen dieses Systems bilden den grundlegenden zellulären Abwehrmechanismus im Körper, für den Fall, dass es Pathogenen gelingt Barrieren wie etwa Schleimhäute zu überwinden. Im Laufe der Evolution hat sich dieses System in Wirbeltieren zu einem komplexen und effektiven Mechanismus zur schnellen Eliminierung von Pathogenen entwickelt. Da die angeborene Immunität auch in älteren Lebensformen, wie z.B. in Reptilien und Amphibien, gefunden wurde (Zimmerman, Vogel *et al.* 2010) kann man davon ausgehen, dass dieser grundlegende Mechanismus bereits früh in der Evolutionsgeschichte vorhanden war. Gelingt es einem Pathogen ins Gewebe einzudringen und sich dort zu vermehren, wird dieser in der Regel sofort von Fresszellen, den Phagozyten, erkannt. Zu dieser Kategorie von Zellen zählt man unter anderem Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Die Erkennung des Pathogens erfolgt über Rezeptoren auf den Phagozyten, die bestimmte Oberflächenstrukturen des Pathogenes detektieren können (Takeuchi and Akira 2010), sogenannte „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs). Nach der Erkennung über die PAMPs wird das Pathogen von dem Phagozyten phagozytiert. Durch die Aufnahme kommt es zu einer Akkumulation von akuten Phaseproteinen (Petersen, Nielsen *et al.* 2004) und zur Bildung von Komplementproteinen (Dunkelberger and Song 2010). Diese beiden Proteinklassen gehören zum humoralen Abwehrmechanismus des angeborenen Immunsystems und sorgen für eine Opsonisierung und Zerstörung der Erreger. Auf diese Weise werden die meisten Pathogene bereits unschädlich gemacht bevor sie größeren Schaden anrichten. In den folgenden Unterkapiteln wird genauer auf jene Zellen des angeborenen Immunsystems eingegangen, die eine Relevanz für die Fragestellung und Ergebnisse dieser Dissertation darstellen.

#### 1.3.1.1 Makrophagen

Makrophagen zeichnen sich dadurch aus, dass sie Pathogene durch Phagozytose beseitigen können. In Prinzip gibt es zwei Arten von Makrophagen, die welche ihren Ursprung im Knochenmark haben und jene welche Geweberesident existieren. Erstere entstehen aus Monozyten, die sich ausschließlich in der Peripherie befinden, nachdem sie im Knochenmark gebildet wurden. Bei Kontakt mit einem Erreger und dem anschließenden Eindringen in das infizierte Gewebe, erfolgt die Ausdifferenzierung zur Makrophagen Fresszelle. Da diese nur sehr kurzlebig sind, müssen aus dem Knochenmark ständig neue Monozyten nachgebildet werden (Janeway *et al.* 2002). Die zweite Gruppe der Makrophagen beschreibt jene, welche Gewebsresident vorliegen. Man findet sie in fast jeder Gewebsart, weswegen sie sich phänotypisch voneinander unterscheiden. Aufgrund dieser Unterschiede besitzt jede Art von Gewebsresidente Makrophage eine eigene Bezeichnung. Im Gehirn werden diese z.B. als Mikroglia bezeichnet, während man sie in der Leber als Kupfer-Sternzellen bezeichnet (Davies *et al.* 2014). Diese Makrophagen haben zudem einen Ursprung, der bereits in der Keimblattentwicklung festgelegt wird (Schulz *et al.* 2012). Im Gewebe residieren diese dann so lange bis sie einen potenziellen Erreger erkennen, der durch

die erste Hautbarriere eingedrungen ist. Dies geschieht mit Hilfe von den so genannten scavenger Rezeptoren, die gewisse Oberflächenstrukturen wie LDL von Pathogenen erkennen können, welche bei den körpereigenen Zellen durch Sialsäure verdeckt sind (Janeway *et al.* 2002). Neben der Phagozytose produzieren Makrophagen zudem proinflammatorische Zytokine. Dies geschieht, wenn beispielsweise über Toll-Like Rezeptoren eine Aktivierung der Makrophagen stattfindet. Diese Rezeptoren erkennen sich wiederholende Strukturen, also PAMPs, auf der Zelloberfläche von Mikroorganismen. Ein prominentes Beispiel hierfür ist z.B der Toll-Like Rezeptor 4 (TLR4), welcher das PAMP Lipopolysaccharid (LPS) erkennen kann, das nur auf gramnegativen Bakterien vorkommt (Sauer, Hackel *et al.* 2014). Eine aktivierte Makrophage sezerniert eine Reihe von Zytokinen, die eine lokale Entzündungsreaktion fördern und bei der Aktivierung und Rekrutierung des adaptiven Immunsystems beteiligt sind. Die fünf wichtigsten Zytokine hierbei sind IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und IL-12. IL-1 $\beta$  z.B ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches nach der Bindung am IL-1 Rezeptors in der Zielzelle, weitere Entzündungsmechanismen in Gang setzt. Dies geschieht durch intrazelluläre Signalkaskaden, die von Proteinfamilien wie z.B MyD88, IRAK, Nk-kB und MAPK ausgehen (Palomo *et al.* 2015). Gleichzeitig ist es ein Zytokin, welches für die Fieberindizierung sowie der lokalen Gewebszerstörung und dem damit eingehenden, erleichterten Zugang von Effektorzellen verantwortlich ist (Janeway *et al.* 2002). Der Tumor Nekrose Faktor-Alpha (TNF- $\alpha$ ) sorgt für eine erhöhte Permeabilität des Endothels, wodurch Effektorproteine sowie weitere Immunzellen aus der Peripherie in den Entzündungsherd gelangen. IL-6 lockt CD3+ T-Lymphozyten zum Entzündungsherd und wirkt dabei als Übergangszytokin von angeborener- und adaptiver Immunantwort. Gleichzeitig verstärkt IL-6 den Stimulus zur Ausdifferenzierung von Monozyten hin zu Makrophagen (Janeway *et al.* 2002). Interleukin 12 ist für seine Wirkung, naive T-Zelle hin zu Th<sub>1</sub> Subtypen auszudifferenzieren, beschrieben worden (Janeway *et al.* 2002). Das Chemokin IL-8 wirkt als Lockstoff für neutrophile Granulozyten, wodurch diese zur Entzündung beitragen (Janeway *et al.* 2002). Außerdem zählen Makrophagen zu den Antigen präsentierenden Zellen (APC), da sie in der Lage sind, Peptidstrukturen von phagozytierten Mikroorganismen auf ihrer Zelloberfläche zu zeigen. Diese Peptide werden mit Hilfe des „Major histocompatibility complex 2“ (MHC-II) Proteins präsentiert. Die Makrophagen Subpopulation ist somit die Gruppe von Immunzellen, die als erstes an der Beseitigung des Erregers beteiligt ist. Die Rolle von P2X7 in Makrophagen wurde bereits in Abschnitt 1.2.3 beschrieben.

### 1.3.1.2 Dendritische Zellen

Genau wie die Makrophagen, zählen die dendritischen Zellen (DC) zu den APCs. Sie stammen auch von denselben Vorläuferzellen im Knochenmark ab und wandern zunächst in unreifer Form durch die Peripherie im Körper. Im Laufe ihrer Lebensspanne dringen die DC dann ins Gewebe ein und verweilen dort, wie die Makrophagen auch, solange bis sie in Kontakt mit einem Fremdorganismus kommen. Durch scavenger Rezeptoren können die potenziellen Erreger aufgenommen,

prozessiert und mit Hilfe von MHC-II präsentiert werden. Zusätzlich können DC auch Makropinozytose betreiben, ein rezeptorunabhängiger Mechanismus bei dem extrazelluläres Material aufgenommen wird welches dann ebenfalls prozessiert und präsentiert werden kann (Sallusto, Cella *et al.* 1995). In diesem extrazellulären Material können unter anderem auch Viruspartikel enthalten sein. Anders als in den Makrophagen dient das phagozytieren eines Erregers durch DCs nicht in erster Linie dazu den Infektionsherd zu bekämpfen. Durch die Aufnahme eines Erregers aktiviert sich die DC, was dazu führt, dass sie in den nächstgelegenen Lymphknoten wandert. In diesem treffen die DCs auf naive T-Lymphozyten und können diese aktivieren, sofern sie den passenden T-Zellrezeptor auf ihrer Oberfläche tragen (Steinman and Witmer 1978). Zusätzlich sezernieren aktivierte DC ebenfalls Zytokine, die die weitere Immunreaktion fördern und die zur T Zell Polarisation beitragen (Janeway *et al.* 2002). Aufgrund ihrer Fähigkeiten T-Zellen zu aktivieren als auch die Entzündungsreaktion zu unterstützen, gelten dendritische Zellen als Mediatoren zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Die Rolle von P2X7 in diesen Zellen wurde in einem Zusammenhang der CD39 Internalisierung aufgezeigt (Zhao, Qiao *et al.* 2019). Nach Aktivierung von Toll-like Rezeptoren, kommt es zu einer Akkumulierung von ATP im extrazellulären Raum, welches die DC P2X7 Rezeptoren aktiviert. Der down stream Effekt dieses Signals sorgt für eine Aufnahme von CD39, einem Ektoenzym das antiinflammatorisch wirkt, indem es ATP in ADP und AMP umwandelt (Yegutkin, GG. 2008). Gleichzeitig beeinflusst das P2X7 signaling die DC Migration (Saez, Vargas *et al.* 2017).

### 1.3.1.3 Mastzellen

Eine besondere Art von Zellen des angeborenen Immunsystems bilden die Mastzellen. Diese Population von Immunzellen differenziert sich erst im Zielgewebe aus und befindet sich somit im Blut noch in einem Vorläufer Zellstadium. Mastzellen findet man überwiegend in Gewebe, welches stark durchblutet ist. Hierzu zählen z.B der respiratorische Trakt, der gastrointestinal Trakt und bestimmte Hautareale. Charakteristisch für die Mastzellen ist deren relative Größe gegenüber anderen Immunzellen und die große Menge an Granula im Zytoplasma, welche eine spezielle Zusammensetzung aus chemischen Mediatoren beinhalten. Die Sezernierung dieser Mediatoren sorgt beispielsweise für eine höhere Durchlässigkeit der Blutgefäße. Die Granula werden klassischer Weise freigesetzt, wenn auf der Mastzelloberfläche gebundenes IgE über die Bindung von Antigen quervernetzt wird. Des Weiteren können PAMPs die Degranulation von Mastzellen auslösen (Supajatura, Ushio *et al.* 2002). Mastzellen exprimieren P2X7 und die Bindung von ATP bildet einen starken Degranulationsreiz. Durch die Degranulation gelangen bestimmte Proteinmarker wie Lamp-1 (CD107a) oder auch P2X4 an die Zelloberfläche (Wareham, K. *et al.* 2009). Des Weiteren scheint eine P2X7 Aktivierung die Aufnahme von Makromolekülen zu begünstigen (Nurkhametova, Kudryavtsev *et al.* 2019).

#### 1.3.1.4 Mikroglia

Mikroglia sind eine Immunzellpopulation, die lediglich im Parenchym des Gehirns und des Rückenmarks des Zentralnervensystems (ZNS) zu finden sind. Das Gehirn wird von einer Blut-Hirn-Schranke umgeben, wodurch so gut wie keine anderen Immunzellen, unter normalen Bedingungen, aus der Peripherie in dieses Organ einwandern können. Mikroglia bilden sich bereits beim Embryo, indem Vorläuferzellen aus dem Neuroepithelium in das Parenchym einwandern (Ginhoux, Greter *et al.* 2010). 10 bis 15 % der Gliazellen im ZNS bestehen aus Mikroglia. Da die Mikroglia im ständigen Kontakt mit den anderen Zellen des ZNS stehen, können sie sehr schnell Signale an diese übermitteln, wenn durch Erstkontakt mit einem Erreger, die Mikroglia Zelle eine aktivierte, proinflammatorische Form annimmt. Zudem sorgen sie für ein extrazelluläres Milieu in dem Neurone, von Mausembryos und neugeborenen Mäusen, länger am Leben bleiben (Ueno, Fujita *et al.* 2013). Gleichzeitig sorgen sie für ein „sauberes“ Umfeld, indem Partikel und Komponente von lysierten Nachbarzellen durch Phagozytose aufgenommen werden. Anders als bei Makrophagen, löst eine solche Phagozytose keine Entzündungsreaktion im Gewebe aus (Hristova, Cuthill *et al.* 2010). Um ein bestimmtes, homöostatisches Gleichgewicht im Gehirn zu erhalten, können Mikroglia entweder einen proinflammatorischen oder einen antiinflammatorischen Phänotypen annehmen. Dieses Gleichgewicht muss jederzeit funktionieren, da eine zu starke Entzündungsreaktion im Gehirn mehr Schaden anrichten kann als der Erreger selbst (Banati, RB. *et al.* 1993). P2X7 wird in hohem Maß auf Mikroglia Zellen exprimiert. Einige Experimente haben gezeigt, dass LPS für eine höhere bzw. eine verringerte P2X7 Expression sorgen kann. Dies hängt davon ab, ob der Phänotyp der Mikroglia pro- oder antiinflammatorisch ist (Bianco, Ceruti *et al.* 2006). Zudem wurde in den Embryonen von Ratten gezeigt, dass P2X7 signaling zu einer höheren Proliferationsrate der Mikroglia führt (Rigato, Swinnen *et al.* 2012).

#### 1.3.2 Das adaptive Immunsystem

Dringt ein Pathogen in den Körper ein, genügen in den meisten Fällen die Mechanismen der angeborenen Immunantwort aus, um den Erreger zu beseitigen. Die adaptive Immunantwort wird dann aktiv, wenn der Infektionsherd nicht mehr allein von dem angeborenen Immunsystem bekämpft werden kann. Hierbei wirkt das adaptive Immunsystem als unterstützendes Element, welches erst ab ca. einer Woche nach Infektionsbeginn seine volle Aktivität entfalten kann. Der Aktivierungsprozess beginnt bei geweberesidenten dendritischen Zellen, die im Infektionsherd ein Pathogen phagozytieren und deren Antigene anschließend auf ihrer Zelloberfläche, im Kontext von MHC, präsentieren. Die aktivierte DC wandert über das lymphatische System in den nächsten Lymphknoten ein, wo sie die Antigene den dortigen T-Lymphozyten (T-Zellen) präsentiert. So kommt es im Rahmen der adaptiven T-Zellantwort zur Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen, beide Zellpopulation wurden in dieser Arbeit umfangreich untersucht und werden in den folgenden Unterkapiteln genauer beschrieben

Neben der T-Zellantwort ist die B-Zellimmunantwort ein weiterer, elementarer Bestandteil des adaptiven Immunsystems. Hierbei werden von B-Zellen nach Antigenkontakt antigenspezifische Immunglobuline (Ig) gebildet, die Fremdan-tigen, z.B. ganze Pathogenen oder Toxine, im extrazellulären Raum opsonisieren und sie somit unschädlich machen. Da in dieser Dissertation überwiegend mit T-Zellen gearbeitet wurde, befassen sich die folgenden Kapitel hauptsächlich mit der T-Zellvermittelten, adaptiven Immunantwort.

#### 1.3.2.1 CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen

CD4 ist ein co-Rezeptor des T-Zellrezeptors und lässt sich bei bestimmten T-Zell-Subpopulationen wiederfinden. CD4<sup>+</sup> T-Zellen lassen sich zusätzlich noch in T-Helferzellen und in regulatorische T-Zellen (Treg) unterscheiden. Die T-Helferzellen selbst lassen sich ebenfalls in weitere Subtypen unterteilen, auf die jedoch nicht alle im Einzelnen eingegangen wird. Th<sub>1</sub>-Helferzellen sind eine wichtige Untergruppe zur Beseitigung von intrazellulären Erregern (Romagnani 1994). Diese werden von Makrophagen phagozytiert und verweilen dort, da sie die Fusion des Phagosoms mit dem Lysosom verhindern. Durch das erhaltene Signal der Th<sub>1</sub>-Zelle wird diese Blockade umgangen und die Bildung des Phagolysosoms wieder ermöglicht. Gleichzeitig werden von den Th<sub>1</sub>-Zellen Zytokine freigesetzt, die weitere Makrophagen an den Infektionsherd locken. Für die Differenzierung zur Th<sub>1</sub> Zelle, ist die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet entscheidend (Janeway *et al.* 2002). Die nächste große Gruppe an T-Helferzellen ist die Th<sub>2</sub> Zelle. Diese sind an der humoralen Immunantwort beteiligt, indem sie naive B-Zellen aktivieren und somit zur Sezernierung von Antikörpern beitragen (Janeway *et al.* 2002). Dies tun sie, indem der T-Zellrezeptor (TZR) ein Antigen im Kontext von MHC-II auf der B-Zelloberfläche erkennt, welches vorher von der B-Zelle mit ihrem B-Zellrezeptor erkannt, internalisiert und prozessiert wurde. Eine weitere Untergruppe von T-Helferzellen ist die Th<sub>17</sub> Population. Diese erhielt ihren Namen, da diese Zellen in der Lage sind das Zytokin Interleukin 17 zu produzieren. Deren Hauptaufgabe besteht in der Beseitigung von extrazellulären Bakterien und Pilzen (Pelletier, Maggi *et al.* 2010). Weitere T-Helferzellgruppen sind Th<sub>9</sub>, Th<sub>22</sub> und folliculäre T-Helferzellen (Tfh).

#### 1.3.2.2 CD4<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen

Die regulatorischen T-Zellen (kurz Treg) sind eine Gruppe von CD4<sup>+</sup> Immunzellen, die antiinflammatorische Eigenschaften aufweisen. Sie bilden sich, genau wie die anderen T-Zellen, im Thymus aus. Diese Zellen sind Teil eines peripheren Toleranzsystems, das dafür sorgt, dass keine Immunreaktion gegen körpereigene und gegen harmlose Antigene ausgelöst werden kann (Sakaguchi, Yamaguchi *et al.* 2008). Die Unterdrückung proinflammatorischer Immunreaktionen wird dadurch erreicht, dass die Treg einen Cocktail aus entzündungshemmenden Zytokinen ausschütten, die eine Aktivierung von anderen T-Zellen bzw. von B-Zellen verhindert. Gleichzeitig besitzen sie die Fähigkeit Effektor T-Zellen direkt zu lysieren indem sie eine hohe Menge an

Granzym B sezernieren (Gondek, Lu *et al.* 2005). Treg können ebenfalls einen indirekten Einfluss auf die T-Zellvermehrung ausüben. Hierzu können sie durch Hochregulierung von CD25 das umliegende IL-2 in sich aufnehmen (de la Rosa, Rutz *et al.* 2004). Da IL-2 für die Proliferation von Effektor T-Zellen eine entscheidende Rolle spielt, kann durch Entzug dieses Zytokins eine Verstärkung der Immunreaktion vorgebeugt werden. Die Treg Differenzierung wird durch den Transkriptionsfaktor „forkhead box P3“ (FoxP3) bestimmt (Foteno *et al.* 2003).

### 1.3.2.3 CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen

Diese Subpopulation an T-Zellen wird auch als zytotoxische T-Zellen (CTL) bezeichnet. Während ihrer Reifung im Thymus exprimieren sie den Co-Rezeptor CD8, der mit dem MHC-I Protein in Wechselwirkung treten kann. Anders als MHC-II, welches nur von Antigen präsentierenden Zellen exprimiert wird und nur von CD4<sup>+</sup> Zellen erkannt werden kann, wird MHC-I von jeder im Körper befindlichen Zelle (die einen Zellkern besitzt), gebildet. In MHC-I werden Peptidfragmente von intrazellulären Proteinen auf der Plasmamembran der Zelle präsentiert. Die CTL überprüfen alle körpereigenen Zellen, indem sie bei Kontakt mit Fremdartigen aktiviert werden. Durch die klonale Selektion im Thymus im Rahmen der zentralen Toleranz, wird sichergestellt, dass keine Aktivierung bei körpereigenem Peptid stattfindet. Im Falle einer Virusinfektion, nutzt das Virus den zellulären Expressionsapparat, um sich zu vermehren. Dabei entstehen körperfremde Viruspartikel in der Zelle, welche ebenfalls als Peptide in MHC-I präsentiert werden. Diese können anschließend von CTL erkannt werden, wodurch die aktivierte CTL eine Apoptose in der infizierten Zielzelle auslösen kann. Neben Virus befallende Zellen, sind CTL auch in der Lage entartete Tumorzellen zu erkennen und diese dann zur Apoptose zu bringen (Albers, Schaefer *et al.* 2009). Die zytotoxische Wirkung beruht auf der Ausschüttung von intrazellulären Granula, deren Inhalt freigesetzt werden und dieser dann auf die Zielzelle einwirken kann. Zu den Granulainhalten zählen unter anderem Perforine und Granzyme (Janeway *et al.* 2002). Ein weiterer Mechanismus zur erzwungenen Apoptose der Zielzelle ist die Interaktion des Fas Liganden (CTL) mit dem Fas Rezeptor (Zielzelle). Diese Interaktion löst eine Apoptose durch den Caspase Kaskade Weg aus (Nagata 1996). Der letzte wichtige Signalweg zur Bekämpfung von infizierten Zellen ist die Ausschüttung von Zytokinen. CTL sezernieren bei Antigenerkennung die Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  (Janeway *et al.* 2002). Durch IFN- $\gamma$  werden andere Zellen in der Nähe dazu angeregt mehr MHC-I zu exprimieren, was die Chance auf eine Entdeckung von infizierten Zellen erhöht. Die TNF Zytokine sorgen für eine zusätzliche Makrophagen Aktivierung.

## 1.4 Fragestellung

*P2rx4* und *P2rx7* sind Nachbargene auf Maus Chromosom 5. Bei der P2X4ko Maus (*P2rx4*<sup>tm1<sup>Rass</sup></sup>) handelt es sich um einen kongenen Maustamm, welcher auf Basis von embryonalen Stammzellen der 129 Mauslinie generiert wurde. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass die P2X4ko Maus immer noch das 129-stämmige *P2rx7* Gen trägt, da ein Austausch mit B6 aufgrund der unmittelbaren Nähe zum *P2rx4* Locus sehr unwahrscheinlich ist. Im Rahmen dieser Arbeit galt es zu überprüfen:

1. Ob es Unterschiede in der P2X7 Expression in verschiedenen Mausstämmen, insbesondere in 129 und B6 Mäusen gibt.
2. Ob das *P2rx7* Gen der 129 Maus als sogenannte passenger Mutation in der P2X4ko Maus existiert.
3. Welchen funktionellen Einfluss eine mögliche *P2rx7* passenger Mutation auf T-Zellen und Zellen des angeborenen Immunsystems aus der P2X4 Maus haben kann.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material.

#### 2.1.1 Laborgeräte.

##### Zentrifugen

- Eppendorf; 5804R
- Eppendorf; 5810R
- Eppendorf; 5430R

##### PCR relevante Geräte

- RT-PCR (*Eppendorf*, Mastercycler gradient)
- PCR (*Eppendorf*, Mastercycler nexus X2)
- Light cycler 96 (*Roche*)
- Gelkammer Derma (*Syngene Gene Genius*, Bio Imagine System)
- Mikrowelle (*AEG*, Micromat)
- NanoDrop 2000 c (*Thermo scientific*)
- UV-Lampenboard IFI (*Kodak*, digital science)

##### Geräte für die Zellkultur

- Sterilbank 1 (*SterilGARD*, the baker Company Class type A/B3)
- Sterilbank 2 (*Heraeus*, LaminAir HB2448)
- Neubauerzählkammer (*Neubauer CC*, Marienfeld Germany)
- Klicker zum Zellzählen (*Infactory*)
- Vakuumpumpe zum Saugen (*KNF Lab*, Labor port)
- Mikroskop (*Zeiss*, Axiovert CFL)
- Inkubator 1 (*Binder*)
- Inkubator 2 (Panasonic)

### Durchflusszytometer

- Celesta (*BD, FACS Celesta*)
- Canto (*BD, FACS Canto II*)
- Aria Illu sorter (*BD, FACSAria, Illu*)
- Fusion sorter (*BD, FACSAria Fusion*)

### Wasserbäder

- Mit integriertem Schüttler (*Grant, GLS400*)
- Ohne Schüttler (*Gesellschaft für Labortechnik GmbH*)

### Pipetten und Pipettierhilfsgeräte

- Eppendorf Pipette 1000 µl (*Eppendorf, Research plus*)
- Eppendorf Pipette 100 µl (*Eppendorf, Research plus*)
- Eppendorf Pipette 10 µl (*Eppendorf, Research plus*)
- Eppendorf Pipette 300 µl Multikanal 8x (*Eppendorf, Research plus*)
- Eppendorf Pipette 300 µl Multikanal 12x (*Eppendorf, Research plus*)
- Pipettboy (*IBS INTEGRA BIOSCIENCE*)

### Sonstiges

- Wärmelampe
- Perfusions Pumpe (*Heidolph, research made easy*)
- Magnetständer (*Invitrogen, DYNAL*)
- Plattenschüttler (*Certomat MT, B. Braun Biotech*)
- Vortexer (*Scientific Industries*)
- Thermometer
- Laborwaage (*METTLER TOLEDO*)

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien.

Falcon Röhrchen (15 mL)

Falcon Röhrchen (50 mL)

Petrischale (5 cm)

Petrischale (10 cm)  
Spritzen (10 mL)  
Spritzen (1 mL)  
Zellsiebe für 50 mL Falcons (70 µm)  
Zellsiebe für 15 mL Falcons (70 µm)  
FACS Röhrchen (5 mL)  
Zellkulturplatte (96 wells, flacher Boden)  
Zellkulturplatte (96 wells, runder Boden)  
Legendplexplatte (96 wells, V-Boden)  
Zellkulturplatte (48 wells)  
Zellkulturplatte (24 wells)  
Zellkulturplatte (12 wells)  
Zellschaber  
Transwell-Membranplatte (96 wells)  
Light cycler Platten für qPCR (96 wells)  
Eppendorf tubes (5 mL)  
Eppendorf tubes (2 mL)  
Eppendorf tubes (1,5 mL)  
Eppendorf tubes (0,5 mL)  
PCR tubes (0,2 mL)  
Sequenzierröhrchen (Eurofins)  
Schutzfolien für light cycler Platten  
Pipettenspitzen (1000 µl)  
Pipettenspitzen (200 µl)  
Pipettenspitzen (10 µl)  
Serologische Pipetten (25 ml)  
Serologische Pipetten (10 ml)  
Serologische Pipetten (5 ml)  
Einmalhandschuhe (M, L)  
Einmallabortücher (Tapir)  
Einmalkopfhauben  
Einmalmundschutz

Einmalkanülen (30 µm)

Einmalkanülen (60 µm)

### 2.1.3 Materialien zum Präparieren von Organen aus Mäusen.

Pinnboard zum Fixieren von Mäusen

Pinzetten (gerade-flach)

Pinzetten (geschwungen-spitz)

Scheren (Diverse Größen; gerade)

Scheren (Groß; geschwungen)

Knochenschere (angewinkelt)

Skalpelle

Metallnadeln (Integrierte Löffelfläche am Griff)

Metallsiebe

Desinfizier Lösemittel

### 2.1.4 Verwendete Chemikalien (Einzeln verwendet).

ddH<sub>2</sub>O

Nuklease freies Wasser

Ethanol (75 %)

Isofluran (Baxter)

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)

Kochsalzlösung (NaCl)

Easycoll (*Biochrome GmbH; L6145*)

RPMI Medium 1640 (*Gibco*)

IMDM medium (*Gibco*)

Trypsin (10x)

Heparin

Adenosin-5'-triphosphat (ATP)

Nicotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>)

Normales Ratenserum (NRS)

Fc-Blocklösung

Propidium Iodid (PI)

Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)

Ionomycin

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

ARTC2.2 blockender Nanobody (s+16a)

„stromal cell-derived factor 1“-Zytokin (SDF-1 $\alpha$ )

Fixierpuffer (eBioscience)

Permeabilisierungspuffer (10x; *eBioscience*)

MOG Peptid (35-55) (Sigma)

„Incomplete Freund's adjuvant“ (IFA)

Pertussis-Toxin (Sigma)

2',3'-O-Trinitrophenyl-adenosin-5'-triphosphat (TNP-ATP) (2464 *TOCRIS*)

Ivermectin (IVM) (*I8898 SIGMA*)

Agarose

Rothi-Färbemittel (*Carl Roth GmbH*)

Oligo nukleotid Primer

Taqman-Sonden (GOI primer)

Maxima probe qPCR master mix (2x)

OVA-Peptid

2.1.5 Medien und Puffer (Ansetzung).

Iscove Modified Dulbecco Media (IMDM)

- Fetales Kalbserum (FCS) 50 ml (10 %)

- Gentamycin 500  $\mu$ l (50  $\mu$ g/ml)

-  $\beta$ -Mercaptoethanol 500  $\mu$ l (0,1 mM)

#### Knochenmarks Makrophagen Medium (BMM-Medium)

- RPMI Medium1640 (1x) 500 ml
- Fetales Kalbserum (FCS) 50 ml (10 %)
- L-Glutamin 5 ml (2 mM)
- $\beta$ -Mercaptoethanol 500  $\mu$ l (0,1 mM)
- Gentamycin 500  $\mu$ l (50  $\mu$ g/ml)
- Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor (M-CSF) (10 ng/ml)

#### Knochenmarks dendritische Zellen Medium (BMDC-Medium)

- RPMI Medium1640 (1x) 500 ml
- Fetales Kalbserum (FCS) 50 ml (10 %)
- L-Glutamin 5 ml (2 mM)
- $\beta$ -Mercaptoethanol 500  $\mu$ l (0,1 mM)
- Gentamycin 500  $\mu$ l (50  $\mu$ g/ml)
- Granulozyten-Monozyten-stimulierender Faktor (GM-CSF) (10 ng/ml)

#### Knochenmark Mastzellen Medium (BMMC-Medium)

- RPMI Medium1640 (1x) 500 ml
- Fetales Kalbserum (FCS) 50 ml (10 %)
- L-Glutamin 5 ml (2 mM)
- Nicht essenzielle Aminosäuren (NEAS) 5 ml (2 mM)
- Natriumpyruvat 5 ml (1 mM)
- $\beta$ -Mercaptoethanol 500  $\mu$ l (0,1 mM)
- Gentamycin 500  $\mu$ l (50  $\mu$ g/ml)
- Interleukin 3 (IL-3) (10 ng/ml)

#### FACS Puffer

- Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) 1000 ml
- Bovines Serumalbumin (BSA) 2 g (2 %)
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 1 ml (0,5 mM)

### Verdaulösung

- DNase 1 (0,1 mg/ml)
- Collagenase (1 mg/ml)

### ACK-Erylysepuffer

- ddH<sub>2</sub>O 1L
- NH<sub>4</sub>Cl 155 mM
- KHCO<sub>3</sub> 10mM
- EDTA 100 mM

Puffer pH wird auf 7,2 gestellt

### TAE-Puffer

- Tris (40 mM)
- Acetat (40 mM)
- EDTA (1 mM)

Puffer pH wird auf 7,4 gestellt

## 2.1.6 Verwendete Kits.

### Phire-Polymerase PCR kit (Thermo scientific)

- Nuklease freies Wasser
- „Phire green reaction“ Puffer (5x)
- Desoxiribose Nukleosidtriphosphate (dNTPs)
- Phire-Polymerase

### Dreamtaq-Polymerase PCR kit (Thermo scientific)

- Nuklease freies Wasser
- „Dreamtaq reaction“ Puffer (10x)
- Desoxiribose Nukleosidtriphosphate (dNTPs)
- Dreamtaq-Polymerase

#### PCR clean-up gel extraction kit (Macherey-Nagel)

- NTI Puffer (Lösepuffer)
- NT3 Puffer (Waschpuffer; Ethanol Zugabe nötig)
- NE Puffer (Zum Eluieren)
- NucleoSpin Gel und PCR Clean-up Säulen

#### Maxima Synthesis kit for RT-PCR (Thermo scientific #K1642)

- Reaktionsmix (5x)
- Maxima Enzymmix

#### RNA isolation protocol mini kit (Quiagen)

- RLT Lysepuffer
- RW1 Waschpuffer
- RPE Waschpuffer (44 ml Ethanol Zugabe nötig!)
- gDNA-Bindesäulen
- RNA-Bindesäulen
- 2 ml Auffanggefäße
- 1,5 ml Auffanggefäße

#### T-Helferzellen Legendplex Zytokin Kit

- Setup Beads 1 (FITC Beads)
- Setup Beads 2 (PE Beads)
- Setup Beads 3 (Raw beads)
- Maus Th Zytokin Detektion-Antikörper
- Mouse Th Zytokin Standard-Cocktail
- LEGENDplex Streptavidin-PE Conjugat
- LEGENDplex Matrix B, Ilyphiolisiert
- LEGENDplex Assay Puffer
- LEGENDplex Waschpuffer, 20X
- LEGENDplex Software (Dongle)

## 2.1.7 Antikörper

**Tabelle 2.1** Datentabelle der verwendeten Antikörper.

<b>Antigen</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Klon</b>	<b>Nutzung</b>	<b>Firma</b>
B220	PerCP-Cy5.5	RA3-6B2	Kompensation	<a href="#">Biolegend</a>
B220	PE	RA3-6B2	Kompensation	<a href="#">Biolegend</a>
CD3	PE	145-2C11	Kompensation	<a href="#">Biolegend</a>
CD3	Bv421	17A2	Kompensation	<a href="#">Biolegend</a>
CD3	FITC	500A2	Kompensation	<a href="#">Biolegend</a>
CD4	AF700	RM 4-5	Kompensation	<a href="#">Biolegend</a>
CD4	Bv605	RM 4-5	Kompensation	<a href="#">Biolegend</a>
CD4	APC	RM 4-5	Kompensation	<a href="#">Biolegend</a>
CD8	PerCP	53-6.7	Kompensation	<a href="#">Biolegend</a>
CD8	FITC	53-6.7	Kompensation	<a href="#">Biolegend</a>
CD4	Bv421	L3T4	FACS-sort	<a href="#">Biolegend</a>
CD8	FITC	53-6.7	FACS-sort	<a href="#">Biolegend</a>
CD11b	FITC	M 1/70	FACS-sort	<a href="#">Biolegend</a>
CD25	PE	PC61	FACS-sort	<a href="#">Biolegend</a>
CD45	Bv421	30-F11	FACS-sort	<a href="#">Biolegend</a>
CD117	PerCP-Cy5.5	2B8	FACS-sort	<a href="#">Biolegend</a>
FCeR1a	PE	MAR-1	FACS-sort	<a href="#">Biolegend</a>
Ly6G	AF700	1A8	FACS-sort	<a href="#">Biolegend</a>
CD4	Bv605	RM 4-5	FACS	<a href="#">Biolegend</a>
CD8	PerCP	53-6.7	FACS	<a href="#">Biolegend</a>
CD8	FITC	53-6.7	FACS	<a href="#">Biolegend</a>
CD11b	FITC	M 1/70	FACS	<a href="#">Biolegend</a>
CD25	PE	PC61	FACS	<a href="#">Biolegend</a>
CD27	PE	LG.3AnO	FACS	<a href="#">BD</a>
CD27	APC	LG.3A10	FACS	<a href="#">Biolegend</a>
CD45	PE-Cy7	30-F11	FACS	<a href="#">eBioscience</a>
F4/80	PE	BM8	FACS	<a href="#">Biolegend</a>
P2X7	AF647	RH23A44	FACS	AG-Nolte
CD3	/	145-2C11	Zellkultur	<a href="#">Biolegend</a>
CD28	/	3751	Zellkultur	<a href="#">Biolegend</a>

## 2.1.8 Mausstämme

*C57BL/6J (B6) Mauslinie:*



Jackson lab homepage [<https://www.jax.org/strain/000664>]

**Tabelle 2.2** Verwendete transgene B6 Linien.

knockout Maus	Linien Bezeichnung	MGI ID	Ursprungsarbeit
B6-P2X4ko	P2rx4 <sup>tm1</sup> Rass	3665297	Sim <i>et al.</i> 2006
B6-P2X7ko	P2rx4 <sup>tm1</sup> Gab	2386080	Solle <i>et al.</i> 2001
B6-Atxn2ko	Atxn2 <sup>tm1.1</sup> Aub	3793867	Lastres-Becker <i>et al.</i> 2008
B6-Sh2b3ko	Sh2b3 <sup>tm1</sup> Rmp	2180088	Takaki <i>et al.</i> 2000
B6-Cux2ko	Cux2 <sup>tm1.1</sup> Nieto	4429541	Cubelos <i>et al.</i> 2008
B6-Hvcn1ko	Hvcn1 <sup>Gt(RRN293)</sup> Byg	3843777	Okochi <i>et al.</i> 2009
B6-Atp2a2ko	Atp2a2 <sup>tm1.1</sup> lemr	4415164	Anderson <i>et al.</i> 2009
B6-Camkk2ko	Camkk2 <sup>tm1</sup> Kpg	2681319	Peters <i>et al.</i> 2003
B6-Kdm2bko	Kdm2b <sup>tm1</sup> Nobu	4950034	Fukuda <i>et al.</i> 2011
B6-Orai1ko	Orai1 <sup>tm1.1</sup> Ygwa	6149978	Choi <i>et al.</i> 2017

*BALB/Cj (BALB/C) Mauslinie:*



Jackson lab homepage [<https://www.jax.org/strain/000651>]

Bei der Balb/c Mauslinie wurden neben den Wildtypen, Balb/c-P2X4ko und Balb/c-P2X7ko Mäuse verwendet. Die beiden Transgenen Mauslinien wurden uns von der Koch-Nolte Forschergruppe zur Verfügung gestellt. Beide Linien wurden durch Rückkreuzung der B6-P2X4ko bzw. B6-P2X7ko Mäuse generiert.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Durchführung der Tierversuche

Alle hier verwendeten Mäuse wurden entweder den Tierhaltungsräumen des Campus Forschung oder direkt aus der Forschungstierhaltung des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf entnommen. Die EAE Experimente wurden in den Tierhaltungsräumen des Campus Forschung durchgeführt. Das Töten und die Organentnahme der Mäuse wurde gemäß des deutschen Tierschutzgesetzes in unseren S1 Laboren durchgeführt. (Anträge G17/3, ORG722 und ORG983).

#### 2.2.1.1 EAE Induktion

Für die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis wurden B6-WT und B6-P2X4ko weibliche Mäuse im Alter zwischen 8-9 Wochen verwendet. Insgesamt wurden in 24 Mäusen (12 x B6-WT, 12 x P2X4ko) EAE induziert. Die Durchführung und das Scoring der Mäuse ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

Den Tieren wurde an drei Körperstellen (linkes hinteres Bein, rechtes hinteres Bein und in die Rückenfalte) je 100 µl einer Emulsion aus MOG-Peptid 35-55 (200 µg), in *complete* Freund's Adjuvant (CFA), injiziert. CFA wurde hergestellt aus 10 ml *incomplete* Freund's Adjuvant (IFA) gemischt mit 40 mg *M. tuberculosis H37Ra* (Endkonzentration 4 mg/ml). An Tag 0 sowie an Tag 2 nach der MOG-Immunisierung wurde den Mäusen Pertussis-Toxin (PT) gespritzt (100 µl, 5 µg/ml, i.v). Die Mäuse wurden über einen Gesamtzeitraum von 31 Tagen täglich beobachtet. Jedes Tier wurde täglich gewogen und auf dessen Wohlbefinden untersucht. Der neurologische EAE score wurde auf extra Score-Blättern notiert und bis zum Ende des Experimentes protokolliert. Zusätzlich zum EAE score, musste täglich ein Abbruch score notiert werden. Die Details können der Tabelle 2.3 entnommen werden.

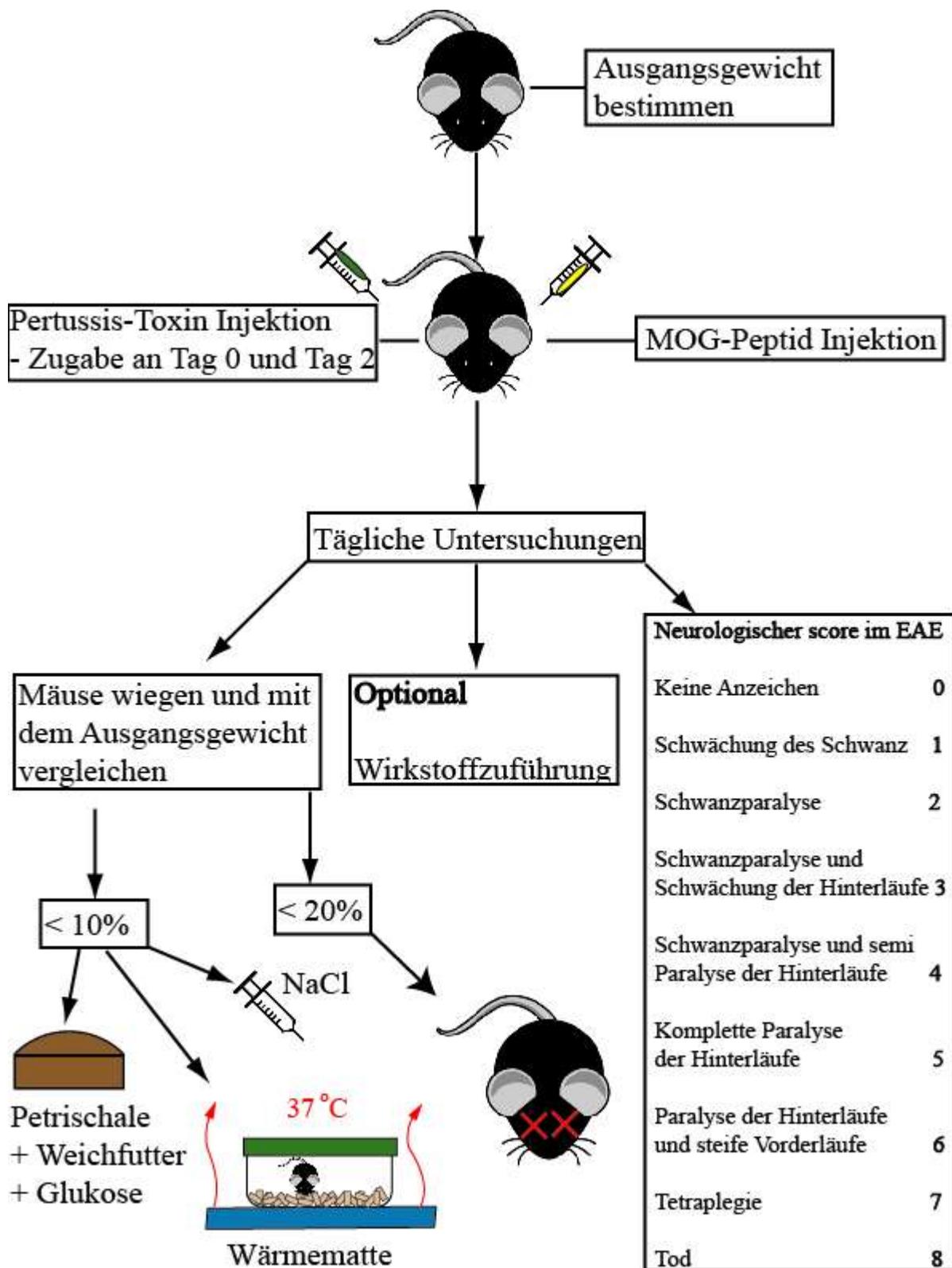


Abb. 2.1 Schematische Darstellung eines EAE Versuches.

**Tabelle 2.3** Abbruch score Kriterien

<b>Report</b>	<b>Score-Wert</b>
Geringe Aktivität; Struppiges Fell	5
Dehydration	10
Starke Apathie	10
Gewichtsverlust > 10%	10
Wankelnder Lauf	10
Gewichtsverlust > 20%	20
Tetraplegie	20
Maus fühlt sich kalt an	20
<b>Massnahmen</b>	<b>Score Gesamtwert</b>
Maus wird genauer beobachtet	< 10
Fütterung mit Weichfutter, NaCl Injektion i.p (1 ml), Wärmematte	10-19
Abbruch	>19

### 2.2.1.2 Injektion des ARTC2.2 blockierenden Nanobody s+16a

Zur in vivo Blockade von ARTC2.2 auf T-Zellen während der Zellpräparation wurde den Mäusen der Nanobody s+16a injiziert (i.p, 50 µg in 100 µl PBS). Die Tiere wurden 1 h nach Injektion getötet, die Organe wurden entnommen und T-Zellen wurden isoliert.

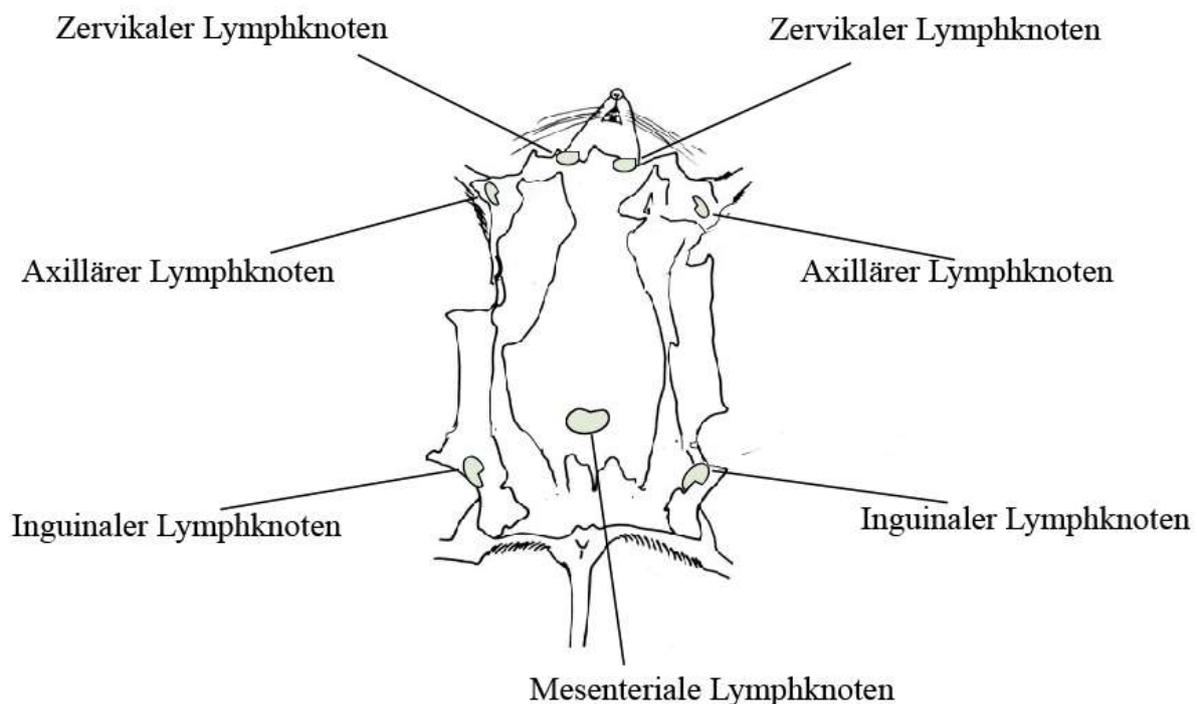
## 2.2.2 Präparation von Lymphozyten aus Mausorganen

### 2.2.2.1 Präparation von Immunzellen aus der Milz

Als erstes wurde die Maus mit Hilfe von Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Der Mauskörper wurde mit Ethanol (70 %) eingesprüht und auf einem Styroporbrett fixiert. Mit Hilfe einer Schere wurde ein Loch in die Bauchdecke samt Peritoneum geschnitten. Als nächstes wurde ein Y-förmiger Schnitt entlang der Hinterläufe und entlang der Brust ausgeführt und die Haut vom Bauch seitlich der Körper fixiert, sodass die Organe des Tieres frei zugänglich waren. Die Milz wurde mit einer stumpfen Pinzette entnommen, von Fettgewebe befreit und anschließend in 5 ml Eis gekühltem FACS Puffer gelagert. Die Milz wurde danach samt Puffer in ein 70 µm Zellsieb überführt, welches sich in einer 10 cm Petrischale befindet. Mit der stumpfen Seite eines Spritzenkolbens, wurde die Milz durch das Zellsieb gerieben, bis eine gleichmäßige Zellsuspension entstanden ist. Wichtig ist eine gekühlte Umgebung bei diesen Arbeitsschritten, weswegen die Petrischale immer auf Eis stehen sollte. Die Suspension wurde in ein 15 ml Falcon überführt und dann für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert (350 x g). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 3 ml ACK Lysepuffer resuspendiert und für 5 Minuten inkubiert. Am Ende der Inkubation musste 5 ml FACS Puffer zu den Splenozyten hinzugefügt werden und anschließend wieder zentrifugiert werden (350 x g, 4°C, 5 Minuten). Das Milzpellet wurde dann in 5 ml FACS Puffer aufgenommen abschließend durch ein 15 ml Zellsieb (70 µm) gefiltert.

### 2.2.2.2 Präparation von Immunzellen aus Lymphknoten

Die Maus wurde auf dieselbe Art und Weise getötet wie oben im Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben. Beim Aufschneiden wurde das Peritoneum von der Bauchdecke gelöst und der Schnitt ausgeweitet bis zum Kopf des Tieres. Die Lymphknoten wurden aus vier verschiedenen Regionen des Körpers entnommen. Die genauere Lokalisation kann der Abbildung 2.2 entnommen werden. Die Bearbeitung erfolgte wie im Milzabschnitt beschrieben, wobei der ACK Lysepuffer Schritt übersprungen werden konnte.



**Abb. 2.2 Die Position der verwendeten Lymphknoten.**

In Hellgrün markiert sind die Lymphknoten, die präpariert wurden.

(<http://www.informatics.jax.org/cookbook/figures/figure50.shtml>, Bild wurde bearbeitet)

### 2.2.2.3 Präparation von Immunzellen aus dem Blut

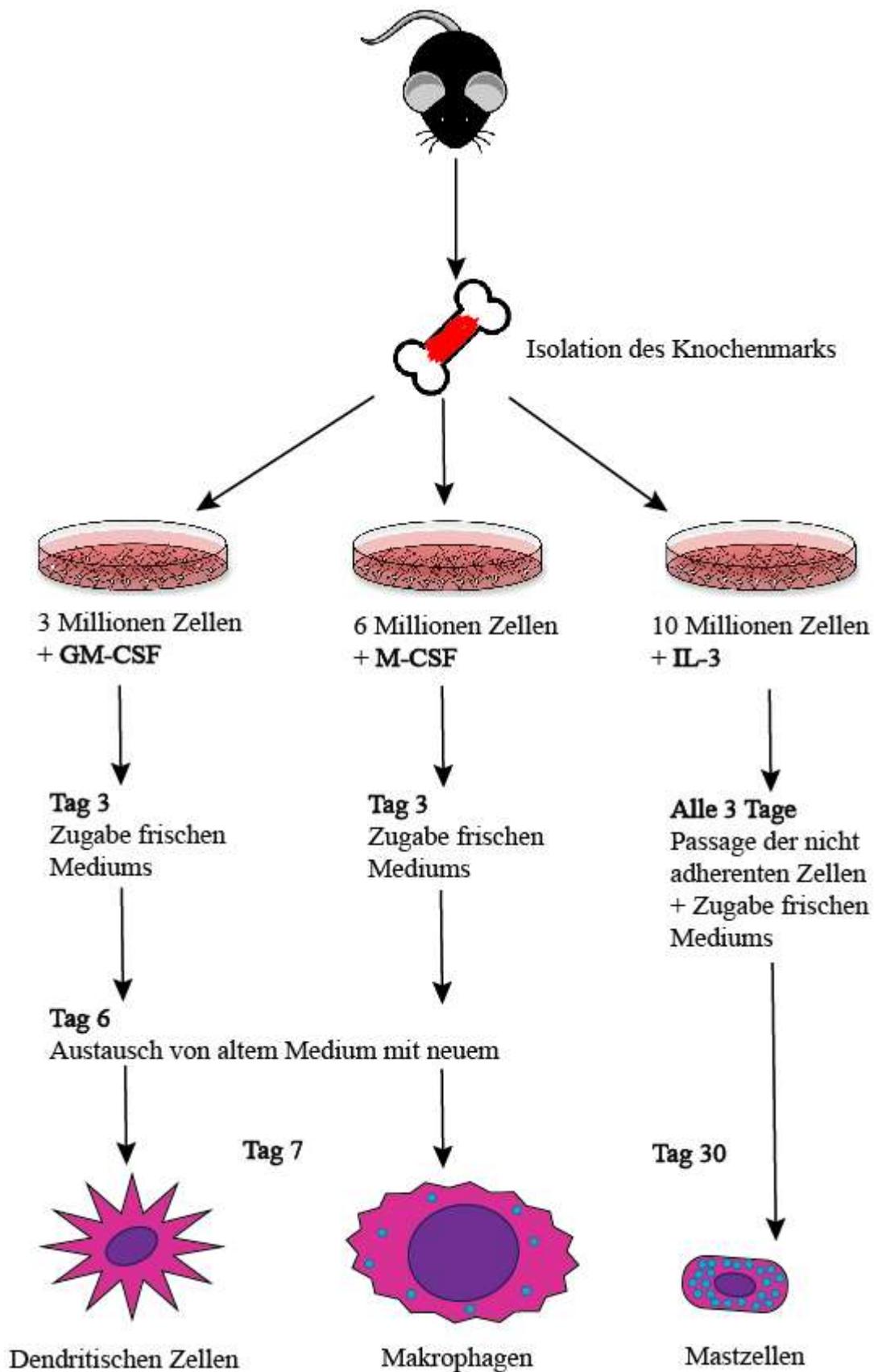
Die Maus wurde mit einer hohen Dosis Isolfuran getötet. Der Brustkorb der Maus wurde anschließend geöffnet und mit einer 1 ml Einmalspritze, mit aufgesetzter Kanüle, wurde vorsichtig aus der rechten Herzkammer Blut entnommen. Das Blut wurde in ein Heparinröhrchen überführt und das Röhrchen wurde anschließen kurz geschüttelt. In einem 15 ml Falcon wurden 10 ml ACK Lysepuffer vorgelegt und 200 µl Blut wurden aus dem Heparinröhrchen in den Lyse Puffer überführt. Das Blut wurde für 5 Minuten inkubiert und die Lyse Reaktion danach gestoppt, indem 5 ml FACS Puffer hinzugefügt wurde. Die Blutzellen wurden danach zentrifugiert (350 x g, 4°C, 5 Minuten) und der Überstand verworfen. Es folgte eine zweite Runde mit dem ACK Lysepuffer wobei das Pellet in 3 ml resuspendiert wurde. Nachdem die Zellen wieder mit FACS Puffer gewaschen und danach zentrifugiert wurden, mussten sie in 3 ml FACS Puffer aufgenommen und durch ein Zellsieb (70 µm) gefiltert werden.

#### 2.2.2.4 Präparation von Makrophagen und Mastzellen aus der peritoneal Lavage

Die Maus wurde getötet wie in Abschnitt 2.2.2.3 beschrieben. Beim Aufschneiden der Bauchdecke musste darauf geachtet werden, dass das Peritoneum nicht beschädigt wird. Nachdem die Bauchdeckenhaut zur Seite gelegt und fixiert wurde, konnte 5 ml Lavagepuffer (PBS + EDTA 2 mM) mit einer 10 ml Spritze aufgezogen und in das Peritoneum gespritzt werden. Der Körper der Maus musste danach leicht geschüttelt werden, um die peritonealen Zellen in Suspension zu bringen. Abschließend wurde die Kanüle am seitlichen Rand des Peritoneums eingeführt und der Lavagepuffer wurde wieder aus dem Peritoneum aspiriert. Die aufgezugene Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon überführt und anschließend zentrifugiert (350 x g, 4°C, 5 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 3 ml FACS Puffer resuspendiert. Zum Schluss wurden die Zellen durch ein Zellsieb (70 µm) gefiltert.

#### 2.2.2.5 Präparation von Immunzellen aus murinem Knochenmark

Für die Knochenmarksisolation wurde die Maus zunächst narkotisiert und dann mittels zervikaler Dislokation getötet. Nachdem der Körper mit Ethanol abgesprüht und auf das Styroporbrett fixiert wurde, musste die Haut an den Hinterläufen mit einer Schere umschnitten und dann abgezogen werden. Anschließend wurde die Beinmuskulatur entfernt, ohne dabei den Knochen zu beschädigen. Der Oberschenkelknochen musste danach aus dem Hüftgelenk gelöst werden. Auch hier musste darauf geachtet werden, dass der Knochen intakt bleibt. Das gelöste Bein wurde kurz in Ethanol gebadet und dann in einem 50 ml Falcon mit PBS (15 ml) transferiert. Die nächsten Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Der Oberschenkelknochen wurde vom Knie getrennt und beiden Enden wurden mit einer Schere abgeschnitten, sodass mit einer Kanüle und einer mit 10 ml PBS gefüllten Spritze das Knochenmark in eine Petrischale gespült werden konnte. Als nächstes musste das gelöste Knochenmark mit einer Pipette in eine Einzelzellsuspension gebracht werden und anschließend durch ein Zellsieb (70 µm) in ein 50 ml Falcon gefiltert werden. Die Suspension wurde danach mit sterilem PBS auf 50 ml verdünnt. 10 µl der Suspension wurde in eine Neubauer Zählkammer überführt und die Zellzahl wurde bestimmt. In Abbildung 2.3 ist dargestellt, wie aus den Knochenmarkszellen Zellen des angeborenen Immunsystems ausdifferenziert werden können.



**Abb. 2.3 Aus primären Knochenmarkzellen lassen sich verschiedene Immunzellen kultivieren.**

Abhängig davon, was für ein Wachstumsfaktor den Progenitorzellen hinzugefügt wird, kann man unterschiedliche Immunzellen kultivieren.

### Makrophagen (BMMs)

6 Millionen Knochenmarkszellen wurden in ein neues 15 ml Falcon überführt und mit PBS gewaschen (Zentrifuge, 350 x g, 4°C, 5 Minuten). Das Pellet wurde in 10 ml BMM Medium resuspendiert, auf einer Petrischale (10 cm) ausgesät und im Inkubator bei 37°C inkubiert. An Tag 3 wurde 5 ml neues BMM Medium hinzugefügt. Am 6. Tag waren die Zellen bereits adhärent, weshalb das gesamte Medium abgesaugt und gegen 10 ml frisches getauscht wurde. Ab Tag 7 waren die Zellen ausdifferenziert und konnten für weitere Versuche genutzt werden. Die Makrophagen ließen sich am besten mit Trypsin (1 x) und/oder mit einem Zellschaber von der Petrischale lösen.

### Dendritische Zellen (BMDCs)

3 Millionen Knochenmarkszellen wurden in ein neues 15 ml Falcon überführt und mit PBS gewaschen (Zentrifuge, 350 x g, 4°C, 5 Minuten). Das Pellet wurde in 10 ml BMDC Medium resuspendiert, auf einer Petrischale (10 cm) ausgesät und im Inkubator bei 37°C inkubiert. Am 3. Tag wurde 10 ml frisches BMDC Medium den Zellen zugefügt. An Tag 6 wurden die Zellen in ein 15 ml Falcon überführt und herunter zentrifugiert (350 x g, 18°C, 5 Minuten). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 10 ml frischen BMDC-Medium gelöst. Ab Tag 7 konnte mit den Zellen weitergearbeitet werden.

### Mastzellen (BMMCs)

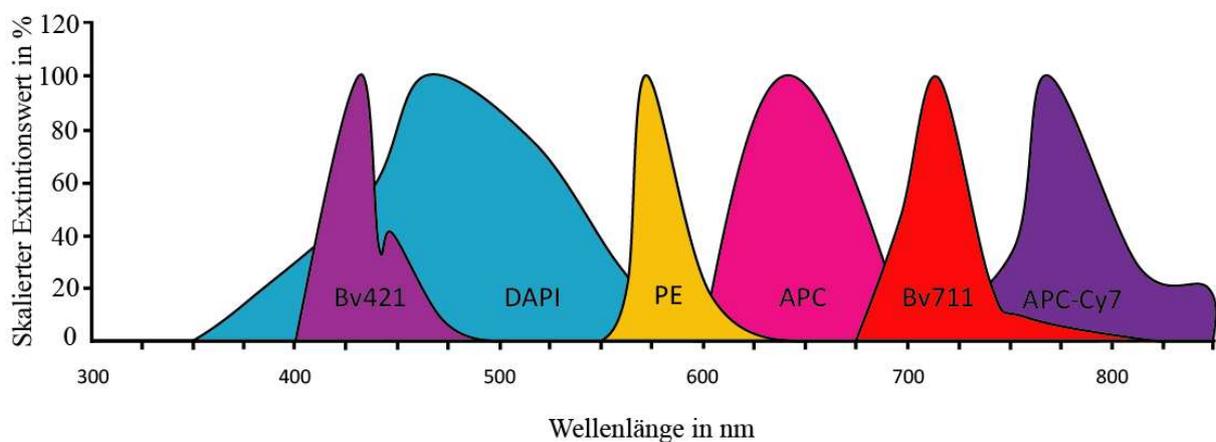
10 Millionen Knochenmarkszellen wurden in ein neues 15 ml Falcon überführt und mit PBS gewaschen (Zentrifuge, 350 x g, 4°C, 5 Minuten). Das Pellet wurde in 10 ml BMMC Medium resuspendiert, auf einer Petrischale (10 cm) ausgesät und im Inkubator bei 37°C inkubiert. Die Ausdifferenzierung der Mastzellen dauerte ca. 1 Monat, wobei die Zellen alle 3 Tage geerntet, in ein 15 ml Falcon überführt und zentrifugiert wurden (350 x g, 18 °C, 5 Minuten). Anschließend wurden die Zellen in frischem 10 ml BMMC Medium resuspendiert und in eine neue Petrischale transferiert.

## 2.2.3 Durchflusszytometrische Methoden.

### 2.2.3.1 Durchflusszytometrie.

Das Durchflusszytometer, oft auch als „FACS“ (**F**luorescence **a**ctivated **c**ell **s**orting) bezeichnet, wurde von Wolfgang Göhde an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster im Jahr 1968 entwickelt (Espacenet-Patente.com). Im Durchflusszytometer wird eine Zellsuspension durch eine Kapillare geführt und am Ende dieser Kapillare über einen Laminarstrom vereinzelt. In diesem Laminarstrom treten die vereinzelt Zellen durch den Strahlengang eines Lasers. Dabei können zum einen Informationen über die Größe und Beschaffenheit der Zellen aufgrund ihres Vorwärtsstreulichts (FSC) und Seitwärtsstreulichts (SSC) gewonnen werden, als auch über z.B. den Zelltyp, wenn Fluorochrom markierte Antikörper verwendet. Durch den Laser werden die Fluorophore angeregt, wodurch sie Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren.

Je mehr unterschiedliche Laser in einem Durchflusszytometer verbaut sind, desto mehr Fluorochromkanäle können benutzt werden. Durch ein System von Filtern und teildurchlässiges Spiegeln lässt sich das Licht so filtern, dass ein Detektor nur eine bestimmte Farbe erkennen kann. So lässt sich ein definiertes Fluoreszenzsignal einem bestimmten Fluorochrom konjugierten Antikörper zuordnen. Je nach Gerät können so bis zu 40 Farben gleichzeitig detektiert werden (Cytekbio.com). Bei der Analyse von mehreren Farben gleichzeitig, kann es zu Problemen kommen, da das Emissionsspektrum von einigen Fluorophoren sich sehr ähneln (**Abb. 2.4**). Dieses Problem kann mit einer mathematischen Kompensation behoben werden.



**Abb. 2.4 Emissionsspektren von in der Durchflusszytometrie eingesetzten Fluorochromen.**

Auf der x-Achse ist das Emissionsspektrum einzelner Fluorophore im Nanometerbereich dargestellt. Es gibt Wellenlängen Bereiche, wo es zu Überlappungen der Emission kommt zwischen mehreren Fluorophoren. Dies kann bei einem FACS Experiment zu falschen Ergebnissen führen, wenn keine entsprechenden Maßnahmen getroffen werden.

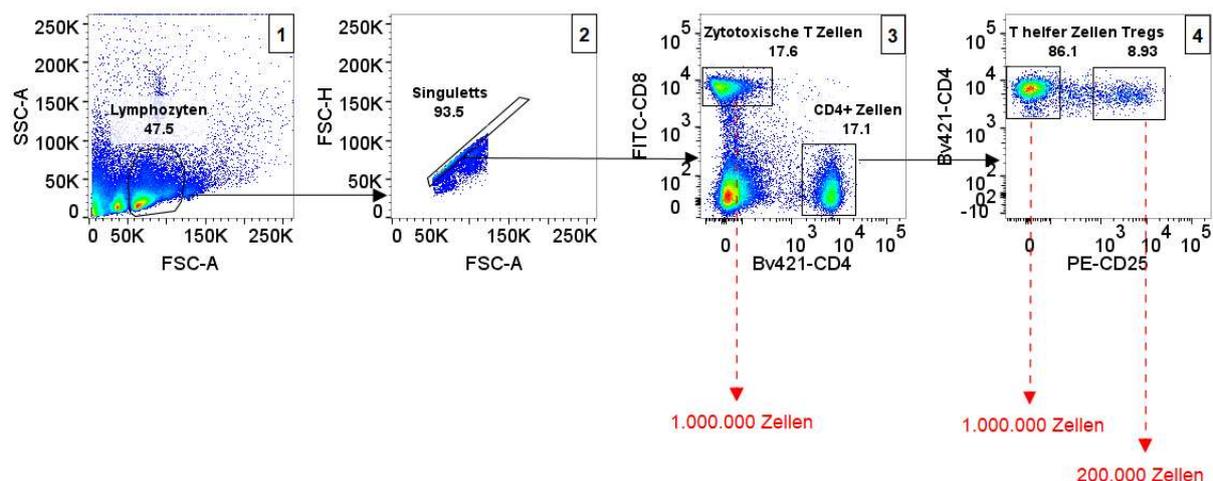
### 2.2.3.2 Zellanfärbungen von extrazellulären Antigenen (EC Färbung)

Zunächst wurden ein Aliquot der aufgereinigten Lymphozyten (Abschnitt 2.2.2) in ein FACS Röhrchen überführt. Für die Experimente wurden je 200 µl Splenozyten einer 5 ml Gesamtlösung, 200 µl Lymphknoten Zellen einer 3 ml Gesamtlösung, oder 200 µl Blutzellen verwendet. Die überführten Zellen wurden mit 3 ml FACS Puffer gewaschen und zentrifugiert (350 x g, 4°C, 5 Minuten). Währenddessen wurde der Antikörper Mastermix angesetzt. Hierfür wurden die Antikörper 1:100 in FACS Puffer verdünnt. Von den zentrifugierten Zellen wurde der Überstand verworfen und die Pellets in 100 µl Mastermix resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut mit 3 ml FACS Puffer gewaschen (350 x g, 4°C, 5 Minuten). Nachdem der Überstand verworfen wurde, konnten die Zellen in 200 µl FACS Puffer resuspendiert und am Durchflusszytometer gemessen werden.

### 2.2.3.3 Durchflusszytometrische Sortierung von Zellpopulationen

Neben der Charakterisierung von Zellen, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch Zellen durchflusszytometrisch sortiert (FACS). Einer der ersten FACS Sorter wurde 1969 von Leonard Herzberg entwickelt (Hulet *et al.* 1969). Ein Sorter besitzt einen speziellen Vibrator, der den Flüssigkeitsstrom in kleine Tröpfchen aufteilt. Im Idealfall sind die Tröpfchen so groß, dass genau eine Zelle pro Tropfen vorhanden ist. Wählt man nun eine Zellpopulation am Computer aus, die man gesortet haben möchte, wird diese elektrisch polarisiert und durch ein elektrisches Feld in ein Auffangbehälter befördert.

Die Vorbereitung der Zellen ist dabei analog zu den EC-Färbungen. Der einzige Unterschied ist hierbei, dass die Zellen in 300-500 µl Antikörper Mastermix resuspendiert wurden anstatt mit nur 100 µl. Eine typische Gatingstrategie zum Sorten von T-Zell kann der Abbildung 2.5 entnommen werden.



**Abb. 2.5 FACS gating Strategie zur Charakterisierung von T-Zellen aus Splenozyten.**

Mit dieser Gatingstrategie lassen sich T-Zellen aus der Milz effektiv charakterisieren. Plot 1 zeigt die gesamte Zellsuspension, wobei die Lymphozyten leicht eingegrenzt werden können. Der 2. Plot wird genutzt, um Singulette Zellen von Dubletten zu unterscheiden. Dublette Zellen können bei einer FCS-H zu FCS-A Auftragung ausgeschlossen werden, indem ein Diagonalgate gebildet wird. Die Singulets werden in Plot 3 anhand ihrer CD4 bzw. CD8 Oberflächenmarker aufgetrennt. Die CD4 positiven Zellen konnten im 4. Plot anhand der CD25 Expression in Th and Treg Zellen unterschieden werden. In Rot markiert ist die Zellanzahl der entsprechenden Population, welche benötigt wurde.

### 2.2.3.4 Messung der CD27 Abspaltung nach P2X7 Aktivierung.

Als indirekter Nachweis der Aktivierung von P2X7 diente auf T-Zellen u.a. die Abspaltung von CD27 nach Inkubation mit ATP oder durch P2X7 ADP-Ribosylierung. Für diesen Versuchsaufbau wurden Splenozyten mit Antikörpern zur T-Zell Charakterisierung sowie mit einem anti-CD27 Antikörper angefärbt. Nach dem

Waschen der Zellen, wurde eine ATP Verdünnungsreihe in RPMI Medium vorbereitet (500  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 125  $\mu$ M, 64  $\mu$ M, 32  $\mu$ M, 16  $\mu$ M, 0  $\mu$ M). Die Zellpellets wurden in 100  $\mu$ l der entsprechenden ATP Konzentrationslösung resuspendiert und für 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen ohne ATP Zugabe für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Am Ende wurden die Zellen gewaschen, zentrifugiert (350 x g, 4°C, 5 Minuten), die Pellets in 200  $\mu$ l FACS Puffer gelöst und durchflusszytometrisch gemessen.

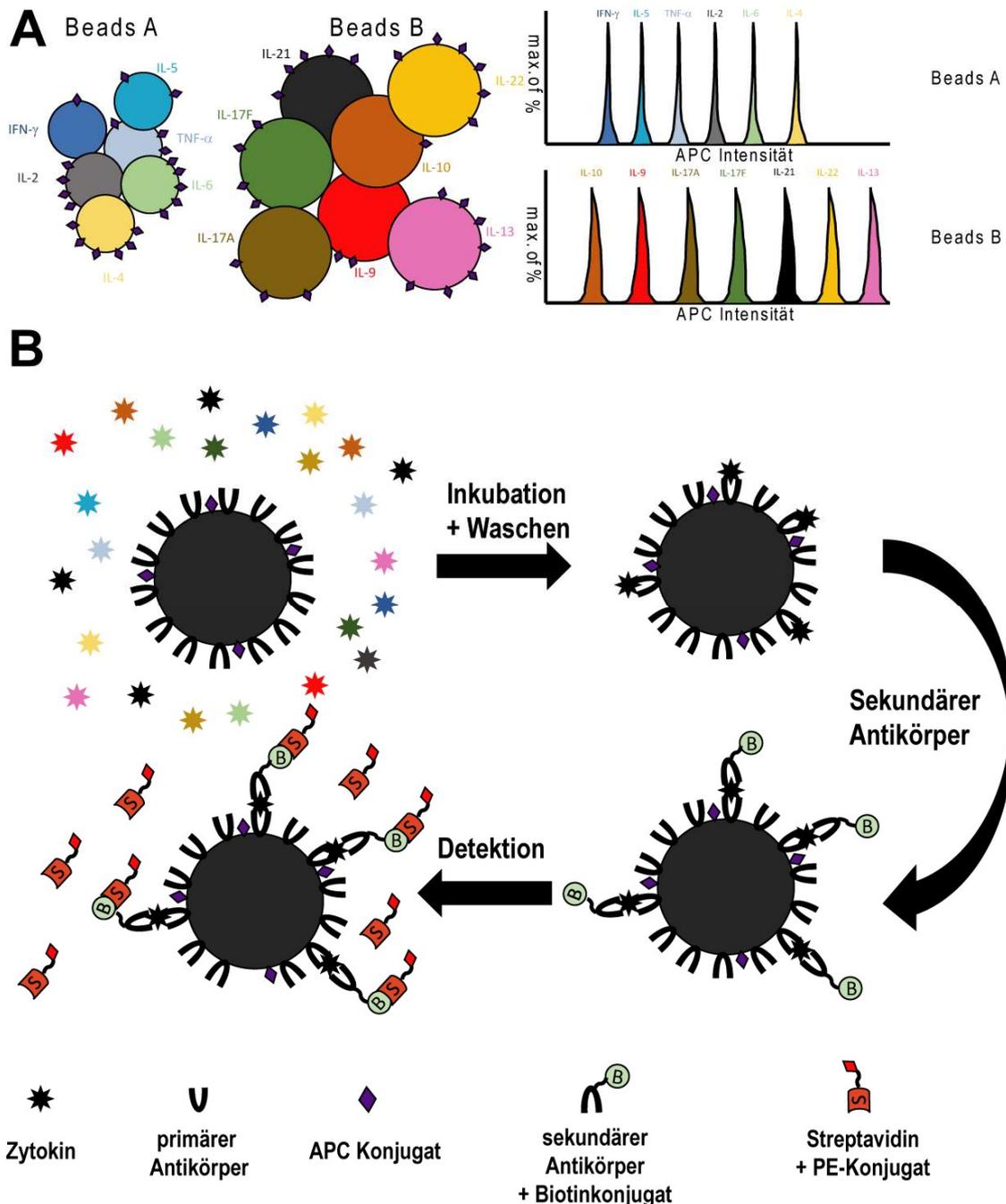
#### 2.2.3.5 Vitalitätsanalysen von T Zellen nach einer 37°C Inkubation

Je 50.000 T Zellen (Th und CTL) von unbehandelt oder mit s+16a behandelt WT und P2X4ko Mäusen wurden in 200  $\mu$ l RPMI Medium in FACS Röhrchen durchflusszytometrisch gesortet. Ein Röhrchen wurde für 2 Stunden auf Eis (4°C) und das andere für 2 Stunden im Inkubator (37°C) inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen (350 x g, 4°C, 5 Minuten) und in 200  $\mu$ l FACS Puffer resuspendiert. Vor der FACS Messung wurde 1  $\mu$ l Propidium Iodid hinzugegeben, um die toten Zellen sichtbar zu machen.

#### 2.2.3.6 PMA/Ionomycin induzierte Zytokinsekretion in T Zellen

Bei diesem Experiment wurden FACS sortierte Th und CTL Zellen mit PMA (20 ng/ml) und Ionomycin (1  $\mu$ g/ml) in RPMI Komplettmedium für 20 Stunden stimuliert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (350 x g, 4°C, 5 Minuten) und der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Die Überstände wurden für die die FACS basierte Zytokinmessungen verwendet. Für den Assay wurde ein spezielles Kit verwendet (Legendplex mouse Th 13-plex), mit dem man die Konzentration von 13 Zytokine gleichzeitig per FACS messen kann. Die Zytokine, welche man mit diesem Panel Messen kann, sind IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Der Standard und die Proben wurden auf einer speziellen 96-Wellplatte vorgelegt, dessen wells trichterförmig verlaufen, sodass alle Komponenten an derselben Stelle am Boden konzentriert werden. Anschließend werden zu den wells die Beads hinzugefügt, die mit den jeweiligen Antikörpern, gegen eines der 13 Zytokine, konjugiert sind. Das Prinzip der Wirkungsweise dieses Assays kann der Abbildung 2.6 entnommen werden. Der Standard wurde 8 mal in 1:4 Schritten verdünnt (von 10.000 pg/ml bis 0 pg/ml) und 12,5  $\mu$ l in Duplikaten aufgetragen. Die gesammelten Überstände wurden ebenfalls in Duplikaten (12,5  $\mu$ l) aufgetragen. Danach wurden je 12,5  $\mu$ l von den Beads sowie von den biotinylierten Detektionsantikörpern hinzugefügt. Die Platte wurde für 2 Stunden mit Alufolie abgedeckt und auf einem Plattenschüttler inkubiert. Danach wurde PE konjugiertes Streptavidin zu den Wells dazu gegeben und die Platte für weitere 30 Minuten auf den Schüttler gestellt. Die Platte wurde anschließend zentrifugiert (350 x g, 18°C, 5 Minuten) und die Überstände der wells mit einer Multikanalpipette vorsichtig entfernt. Die Beads wurden in 200  $\mu$ l Legendplex Waschpuffer (1x) resuspendiert und erneut zentrifugiert (350 x g, 18°C, 5 Minuten). Die beads wurden erneut in 200  $\mu$ l

Waschpuffer gelöst und waren danach bereit für die Analyse. Für die Analyse wurde eine spezielle Software benötigt, die in Form eines USB-Dongles mit dem Kit geliefert wurde.



**Abb. 2.6 Schematische Darstellung zur Wirkungsweise des Legendplex assays.**

**A.** Es existieren 13 verschiedene Beads, die gekoppelt sind mit einem primären Antikörper, die ein bestimmtes Zytokin binden. Die Beads lassen sich anhand zwei Eigenschaften voneinander unterscheiden im FACS. Zum einen gibt es zwei Größen von Beads (6 Kleine und 7 Große). Zum anderen besitzt jede Art von Beads eine unterschiedliche Quantität an APC Konjugat. Anhand dieser beiden Eigenschaften lässt sich jede Art von Beads am Durchflusszytometer bestimmen. **B.** Verfahrensdarstellung des Legendplex Experiments. Anhand eines Beispiels des IL-21 Beads, ist erkennbar, dass mithilfe von sekundären Antikörpern und einer Biotin-Streptavidin Interaktion, ein PE Fluorochrom mit der Menge an gebundenem Zytokin korreliert.

### 2.2.3.7 Durchflusszytometrische Echtzeitanalyse der P2X7 Aktivierung

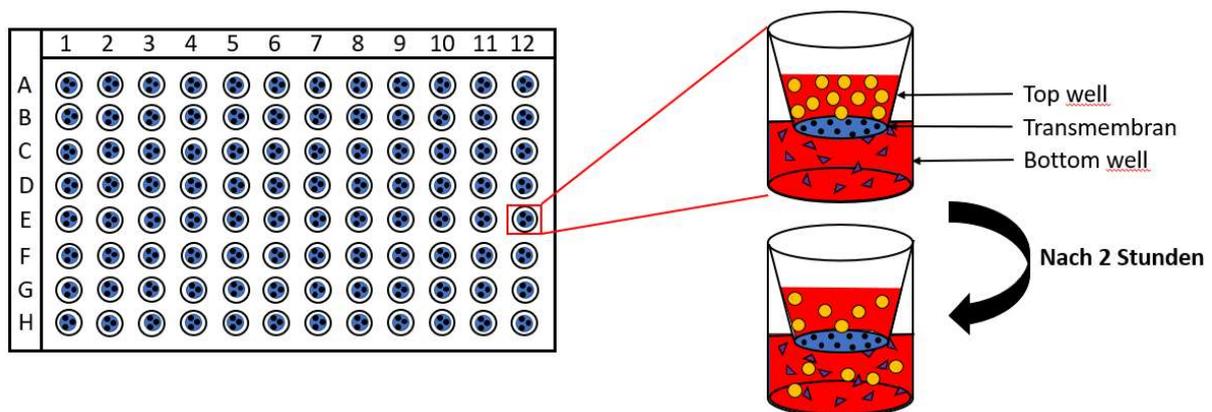
Für einige Experimente wurde die oben beschriebene Abspaltung von CD27 in Echtzeit gemessen. Dabei konnte die P2X7 Aktivität zwischen zwei verschiedenen Proben (WT vs. P2X4ko) zur gleichen Zeit gemessen und verglichen werden. Um die Proben später im FACS voneinander unterscheiden zu können, musste nach der EC-Färbung noch eine weitere Färbung mit dem eFluor<sup>670</sup> Reagenz durchgeführt werden. Hierfür wurden die P2X4ko Proben in 999 µl FACS Puffer resuspendiert und mit 1 µl eFluor<sup>670</sup> (5 µM) versetzt. Die Zellen wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mussten anschließend 3 mal gewaschen und zentrifugiert werden (350 x g, 4°C, 5 Minuten). Beim dritten Waschschrift wurden die Wildtypzellen in das gleich FACS Röhrchen wie die eFluor<sup>670</sup> gefärbten P2X4ko Zellen transferiert, sodass das Endpellet beide Genotypen beinhaltete. Da die Messung 15 Minuten pro Röhrchen dauert, musste das Endvolumen der Zellsuspension mindestens 1 ml (RPMI Medium) betragen. Eine weitere Besonderheit bei der Messung ist der Gebrauch einer Wärmelampe, die die Probe während der gesamten Messung erwärmt. Die Temperatur durfte dabei nie höher als 37°C betragen, weswegen neben dem angelegten Proberöhrchen ein Stativ mit eingeklemmtem Thermometer platziert wurde. Bei der Messung wurde die Temperatur minütlich notiert und beim Erreichen von 37°C musste die Wärmelampe ausgeschaltet werden. Sank die Temperatur wieder, so musste die Lampe wieder eingeschaltet werden usw. Ziel dieser Untersuchung war es, die temperaturabhängige, ADP-Ribosylierung vermittelte Aktivierung von P2X7 zu untersuchen.

Ein ähnliches Prinzip wurde auch bei Zellen des angeborenen Immunsystems angewandt (pMakrophagen, Mikroglia). Da bei diesen Zellen die Abspaltung von CD27 nicht untersucht werden kann, wurde stattdessen die P2X7 vermittelte Porenbildung an der Zelloberfläche und die damit einhergehende DAPI Aufnahme als Indikator für die P2X7 Aktivität untersucht. Da die Messung nur 6 Minuten brauchte, wurden die Zellen in insgesamt 500 µl RPMI Medium resuspendiert und dem Ganzen wurde 1,5 µM DAPI zugesetzt. Nach einer basalen Messung von 2 min wurden ATP (2 mM bei Makrophagen und 1 mM bei Mikroglia) zu der Zellsuspension zugegeben und die Messung wurde für 4 min fortgesetzt. Ähnlich wie bei den T Zellen konnten WT und P2X4ko in einem Röhrchen gemessen werden, da P2X4ko Zellen wieder mit eFluor<sup>670</sup> angefärbt wurden.

Für die BMM wurde die P2X7 Rezeptoraktivität gemessen, indem der Kalziumeinstrom in Echtzeit dargestellt wurde. Hierfür wurden BMM WT und P2X4ko mit Fluo-4 (2 µM) einmal für 20 Minuten auf Eis (4°C) und anschließend für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden danach einmal mit FACS Puffer gewaschen und das Pellet in PBS resuspendiert, das zusätzliches CaCl<sub>2</sub> (0,9 mM) und MgCl<sub>2</sub> (0,49 mM) enthielt. Auch hier wurde zur Unterscheidung der Genotypen, die BMM vorher mit eFluor<sup>670</sup> angefärbt.

### 2.2.3.8 Migrationsanalyse von gesorteten T-Zellen

Für dieses Experiment mussten Th Zellen von WT und P2X4ko Mäusen gesortet werden. Nach der Antikörperfärbung für die Sortierung, wurden die Splenozyten der P2X4ko Maus mit eFluor<sup>670</sup> markiert (Wie in 2.2.3.7 beschrieben). Beim Sortieren wurden die Zellpopulationen von WT und P2X4ko Mäusen dann in gleicher Anzahl in ein Auffangbehälter gesammelt. So wurde gewährleistet, dass später die Gleiche Menge an Zellen für die Migration in der oberen Kammer vorhanden waren. Nachdem die Th Zellen gewaschen und zentrifugiert wurden (350 x g, 4°C, 5 Minuten), musste das Pellet in IMDM Medium resuspendiert werden. In die obere Kammer der Migrationsplatte, wurden insgesamt 200.000 Th Zellen in 100 µl transferiert (100.000 WT und 100.000 P2X4ko Th Zellen). In die untere Kammer wurden 150 µl IMDM Medium mit oder ohne SDF1 $\alpha$  (100 ng/ml) transferiert. Das Prinzip dieses Versuchs ist in Abbildung 2.7 dargestellt. Die beiden Kammern sind durch eine poröse Membran voneinander getrennt, wobei die Poren einen Durchmesser von 5 µm aufweisen. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden (37°C) wurden die Zellen aus beiden Kammern in FACS Röhrchen überführt, gewaschen und am Durchflusszytometer quantifiziert.



**Abb. 2.7 Aufbau einer transwell Migrationsplatte.**

Die Migrationsplatte besteht aus 96 wells, die in zwei Reaktionsbehältern aufgeteilt sind. Die Behälter sind mit einer Membran voneinander getrennt, welche Poren einer definierten Größe besitzt. In die oberen Kammern (top well) werden die Zellen transferiert (gelbe Kugeln) und die unteren Kammern (bottom well) werden mit ein Chemokine wie z.B. SDF1 $\alpha$  (lila Dreiecke) bestückt. Nach 2 Stunden kann bestimmt werden, wie viele Zellen durch die Transmembran in die untere Kammer migriert sind.

### 2.2.3.9 Mastzellen Degranulationsanalyse

Die Mastzellen wurden aus dem Peritoneum mit Hilfe des Lavagepuffers extrahiert. Nachdem diese gewaschen wurden, musste das Zellpellet in RPMI Komplettmedium resuspendiert, aliquotiert und mit unterschiedlichen ATP Konzentrationen versetzt werden (0 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM und 800 µM). Nachdem die Proben für 10 Minuten bei 37°C inkubiert und gewaschen wurden, konnten die Mastzellen gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch bestimmt werden (CD11b<sup>-</sup> Fc $\epsilon$ R1<sup>+</sup>). Die P2X7 Rezeptoraktivität konnte anschließend anhand der Menge an externalisiertem CD107a sichtbar gemacht und bestimmt werden.

## 2.2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.4.1 RNA Isolation

Für die RNA Isolation wurde das RNA Präparation mini Kit von Qiagen benutzt. Hierfür wurden die gewonnenen Zellen zunächst zentrifugiert (350 x g, 4°C, 5 Minuten) und die Pellets in 350 µl RLT Lysepuffer resuspendiert und für 10 Sekunden gevortext. BMMs konnten direkt mit dem RLT Puffer auf der Platte lysiert werden. Das Lysat wurde auf die gDNA Bindsäule transferiert und anschließend wieder zentrifugiert (8000 x g, 18°C, 30 Sekunden). Der Durchfluss wurde mit 350 µl Ethanol (70 %) vermengt und das gesamte Volumen samt Präzipitat in eine RNA Bindsäule pipettiert. Nachdem das Präzipitat zentrifugiert (8000 x g, 18°C, 30 Sekunden) und der Durchfluss verworfen wurde, musste die Säule mit 700 µl RW1 Puffer gewaschen werden (8000 x g, 18°C, 30 Sekunden). Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, konnte der zweite Waschschrift mit 500 µl RPE Puffer vollzogen werden (8000 x g, 18°C, 30 Sekunden). Dieser Schritt wurde danach wiederholt wobei die Zeit des Zentrifugierens erhöht wurde (8000 x g, 18°C, 2 Minuten). Die Säulen wurden auf ein neues, 2 ml Auffanggefäß gesteckt und bei offenem Deckel getrocknet (21.000 x g, 18 °C, 1 Minute). Zum Schluss wurden die Säulen in ein 1,5 ml Eppendorf tube gesteckt und mit 30 µl RNase freies Wasser versetzt. Bei der letzten Zentrifugation (8000 x g, 18 °C, 1 Minute) wurde die gebundene RNA von der Säule eluiert und abschließend bei -80°C gelagert.

### 2.2.4.2 Reverse Transkriptase PCR zur Gewinnung von cDNA

Mit Hilfe der reversen Transkriptase (RT) kann aus einzelsträngiger RNA, komplementäre DNA (cDNA) generiert werden. Mit Hilfe des Maxima Synthese Kits für RT-PCR wurde so aus der im Rahmen dieser Dissertation isolierten RNA Proben, cDNA hergestellt. Zunächst wurden 7 µl RNA Lösung mit 7 µl RNase freiem Wasser verdünnt. Danach wurde der Reaktion noch 4 µl „Reaction mix (5x)“ und 2 µl „Maxima enzyme mix“ beigefügt. Mit einer PCR cycler Maschine (Eppendorf, Mastercycler gradient) wurde ein Programm für cDNA Synthese geschrieben. Die ersten 10 Minuten wurden die Proben auf 25°C inkubiert. Danach wurde die Temperatur auf 50°C erhöht und die Reaktion für 30 weitere Minuten inkubiert. Zum Schluss wurde auf 85°C für 5 Minuten erhitzt, um die Reaktion zu stoppen.

### 2.2.4.3 Genexpressionsanalysen durch quantitative PCR (qPCR)

Die qPCR dient der Analyse der relativen Expressionslevel von mRNAs, welche zwischen Zellpopulationen aus WT und P2X4ko Mäusen verglichen wurden. Zunächst musste die mRNA in cDNA umgewandelt werden (Abschnitt 2.2.4.2), da die hier verwendeten Taqman Sonden eine DNA als Bindungsmatrize benötigen. Eine Taqmansonde ist im Grunde ein Primer, der mit einem Fluorophor gekoppelt ist,

welches durch einen Quencher unterdrückt wird, sodass kein Signal erzeugt werden kann. Beim Auffüllen des Stranges während eines PCR Zyklus, wird der Quencher durch die Polymerase abgespalten wodurch ein Fluoreszenzsignal entstehen kann. Das bedeutet, dass das Signal stärker wird je mehr cDNA Material vorhanden ist, an dem die Sonde binden kann. Ab einer bestimmten Menge an amplifiziertem Material, lässt sich ein steigendes Fluoreszenzsignal beobachten. Für die Auswertung musste der PCR Zyklus berechnet werden, in dem das Signal exponentiell steigt. Mit Hilfe eines stabil exprimierten *house keeping genes* (HKG) als interner Standard wurden die PCR Zyklen des zu untersuchenden Gens und des Standards verglichen. Mithilfe des dCT Wertes, wurde aufgezeigt wie groß die Differenz zwischen den PCR Zyklen zwischen der Probe und dem HKG ist, bei der ein positives Signal detektierbar ist. Anhand von diesem dCT Wert lassen sich Unterschiede zwischen unterschiedlichen Konditionen (z.B WT vs. ko) erkennen und in Relation zueinander setzen. Für die Analyse der *P2rx7* mRNA Expression wurde zunächst ein Mastermix aus 5 µl „Maxima probe qPCR master solution“ sowie 0,5 µl *P2rx7* Taqmansonde (Mm0040582\_m1) pro Reaktionsgefäß angesetzt. Als HKG wurde *Sdha* (Mm01352366\_m1) verwendet, ein Gen, welches für die mitochondriale Atmungskette wichtig ist. Je 5,5 µl des Mastermixes wurde auf eine spezielle qPCR 96-well Platte transferiert und mit 4,5 µl cDNA (1:25 verdünnt) versetzt. Jedes well wurde dabei einzeln mit einer Pipette durchmischt. Für jede Probe wurden Triplikate für *Sdha* und *P2rx7* angesetzt. Nach dem Transfer wurde die Platte mit einer Folie abgedeckt und zentrifugiert (350 x g, 4°C, 5 Minuten). Zum Schluss wurde die Platte in den Light Cycler 96 platziert und das Gerät gestartet.

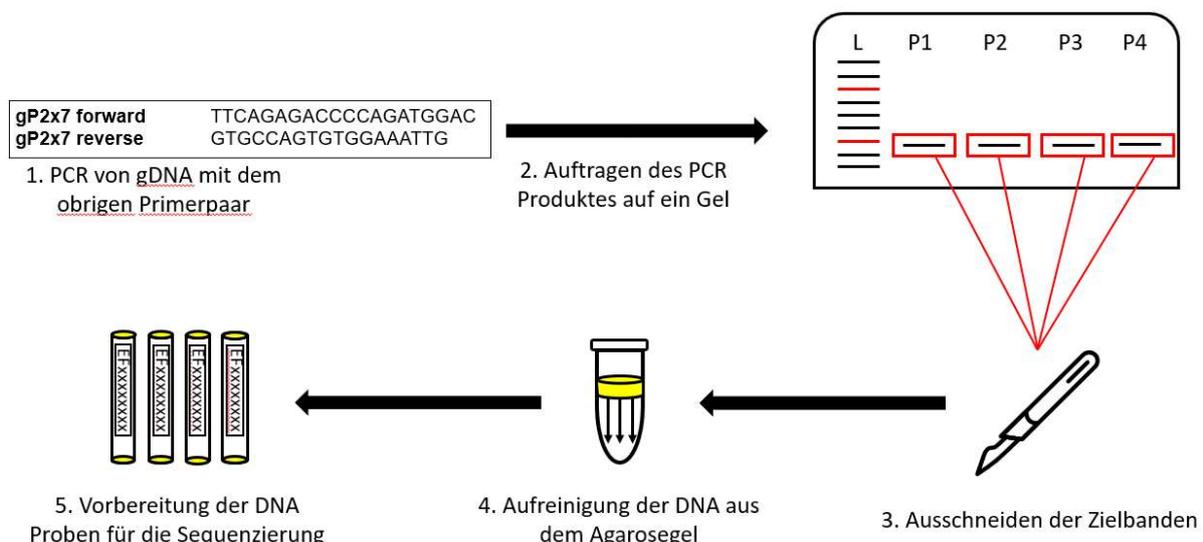
#### 2.2.4.4 Gewinnung von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Als Quelle für genomische DNA (gDNA) wurden Schwanzbiopsien von verschiedenen transgenen Mäusen verwendet. Die Biopsien wurden mit 25 µl Extraktionslösung versetzt und für 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Zum Ende hin wurden die Proben für 2 Minuten auf 92°C erhitzt. Die gDNA befand sich in der Extraktionslösung in gelöster Form und konnte für weitere Experimente verwendet werden.

#### 2.2.4.5 Sequenzierung von amplifizierten *P2rx7* DNA-Fragmenten

Für die Sequenzierung musste zunächst ein Primerpaar entworfen werden, dass in der Lage war, im Rahmen der PCR Reaktion, ein Fragment aus dem *P2rx7* Gen zu amplifizieren. Dieses Fragment sollte den SNP rs48804829 umfassen. Die Zusammensetzung der Primer und die Durchführung des Experimentes kann der Abbildung 2.8 entnommen werden. Als erstes wurde die PCR vorbereitet, indem ein Mastermix erstellt wurde. Für dieses Experiment wurde das Phire Hot Start Polymerase II Kit von Thermo Fisher verwendet. Pro PCR Ansatz (20 µl) wurden 4 µl Reaktionpuffer (5x), 1 µl Primer for., 1 µl Primer rev., 1 µl template DNA (gDNA), 0,4 µl dNTPs, 0,4 µl Phire II Polymerase und das restliche Volumen mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Proben wurden in einem PCR cycler 2 Stunden lang amplifiziert. In dieser Zeit wurde das Agarosegel angesetzt. Hierfür wurden 1,5 g Agarose mit 100 µl TAE Puffer

versetzt und für 3 Minuten in der Mikrowelle erhitzt. Zwischendurch wurde die Lösung nochmals geschwenkt, um die Agarose besser zu lösen. 10 µl Rothi Färbemittel wurde der gelösten Agarose zugesetzt und diese dann anschließend in eine Gelkammer mit eingesetztem Gelkamm gegossen. Nach ca. 20 Minuten wurde der Gelkamm entfernt. 20 µl der PCR Amplifikate sowie 10 µl eines Bandenmarkers (1 kb plus gene ruler) wurden in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese bei 120 Volt gestartet. Nach 45 Minuten konnte das Gel entnommen und in der Geldokumentationskammer analysiert werden. Im nächsten Schritt wurde das Gel auf einem UV-Lampenboard platziert, um die Gelbanden sichtbar zu machen. Die *P2rx7* Amplifikat Bande konnte bei einer Höhe von 288 Basenpaaren detektiert werden. Diese wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein 2 ml Eppi transferiert und danach gewogen. Mit dem „PCR clean-up gel extraction Kit“ wurde als nächstes die DNA aus dem Gel gelöst. Der erste Schritt war die Zugabe von 200 µl NTI Puffer pro 100 mg Gelfragment. Die Gelfragmente wurden bei 50°C für 5-10 Minuten geschüttelt, bis das Gel sich aufgelöst hatte. Das gelöste Gel musste dann auf eine PCR clean up Säule, die auf ein 2 ml Eppi gesteckt wurde, überführt werden. Die Säulen wurden anschließend zentrifugiert (11.000 x g, 4°C, 1 Minute) und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde mit 700 µl NT3 Puffer befüllt und erneut zentrifugiert (11.000 x g, 4°C, 1 Minute). Nachdem der Durchfluss wieder verworfen wurde, musste die Säule getrocknet werden, indem sie ohne Zusätze erneut zentrifugiert wurde (11.000 x g, 4°C, 1 Minute). Um die DNA zu eluieren wurden 20 µl Eluierungspuffer auf die Säule pipettiert und zunächst für 1 Minute bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach erfolgte der letzte Zentrifugationsschritt (11.000 x g, 4°C, 1 Minute) und das *P2rx7* DNA-Fragment befand sich im Durchfluss. Die Konzentration der DNA wurde mittels Nanodrop bestimmt und danach so verdünnt, dass die Konzentration 1 ng/µl betrug. 15 µl der verdünnten DNA mussten in zwei Sequenzierröhrchen pipettiert und mit 2 µl des in der PCR verwendeten Primers versetzt werden (1 x for.; 1 x rev.). Die Proben wurden zu der Firma Eurofins zum Sequenzieren geschickt.



### Abb. 2.8 Ablauf eines Sequenzierungsexperimentes.

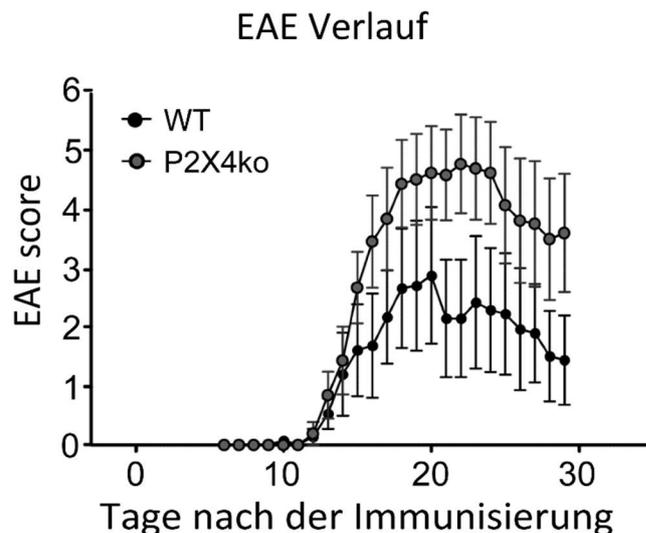
Ein vorab designtes Primer Paar wird genutzt, um eine *P2rx7* Genamplifikat zu erzeugen, welches sich aus einem Agarosegel herausschneiden und aufreinigen lässt. In verdünnter Form kann die DNA in einem speziellen Sequenzierröhrchen verschickt werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchung von P2X4ko Mäusen im EAE Mausmodell

Im Rahmen einer Kooperationsarbeit mit der Gruppe von Prof. Domercq und Prof. Matute (Universität Bilbao, Spanien) wurde am UKE B6-P2X4ko und B6-WT Mäuse im Mausmodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) verglichen. Primäres Ziel der Kooperation war es, den Krankheitsverlauf der EAE in B6-P2X4ko und WT Tiere zu vergleichen. Den Versuchen lag die Hypothese zugrunde, dass P2X4, für die Aktivierung von Mikroglia wichtig ist und P2X4ko Mäuse einen schweren Krankheitsverlauf zeigen.

Es wurden zwei Versuchsgruppen, bestehend aus P2X4ko (P2rx4<sup>tm1Rass</sup>) und WT auf dem C57BL/6 (B6) Hintergrund, bezüglich des Krankheitsverlaufs verglichen. Beide Gruppen zeigten um Versuchstag 12 erste Zeichen von Krankheitssymptomen (**Abb. 3.1**). Ab Tag 15 zeigte sich jedoch, dass die P2X4ko Mäuse verglichen mit der WT Kontrollgruppe einen schwereren Krankheitsverlauf entwickelten. So erreichten die Tiere der P2X4ko Gruppe im Mittel einen stabilen EAE Score von 4-5 wo hingegen die Tiere der WT Kontrollgruppe einen mittleren EAE Score von 2-3 aufwiesen. Bis zum Ende des Experiments an Tag 29 war ein deutlicher Unterschied in den Verlaufskurven beider Gruppen zu erkennen.



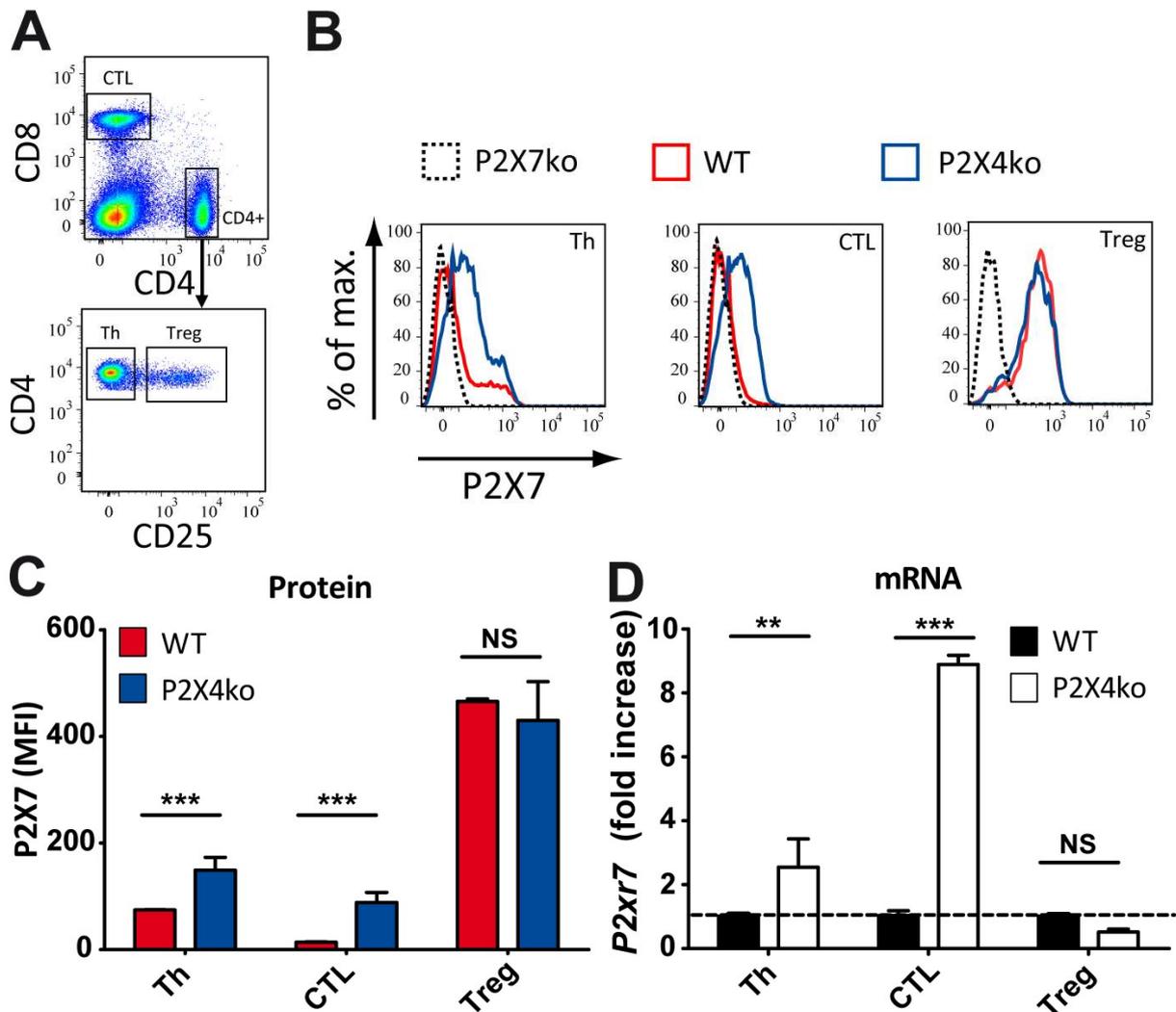
**Abb. 3.1** B6-P2X4ko Mäuse zeigen einen stärkeren EAE Verlauf als B6-WT Mäuse. Für das Experiment wurden B6-WT (n=8) und B6-P2X4ko (n=8) Mäuse verwendet. Die Tiere wurden über einen maximalen Zeitraum von 29 Tagen täglich begutachtet.

## 3.2 Charakterisierung von T-Zellen aus P2X4ko Mäusen.

Die Ergebnisse aus der Kollaboration mit Prof. Domercq und Prof. Matute haben gezeigt, dass P2X4 insbesondere für die Aktivierung von Mikroglia und den damit verbundenen Remyelinisierungsprozess im Verlauf der EAE wichtig ist (Zabala *et al.* 2018). Unabhängig von der Untersuchung der P2X4ko Mäuse im EAE Mausmodell war es unser eigenes Ziel, die T-Zellen aus den P2X4ko Tieren genauer zu untersuchen, da der Verlust von P2X4 z.B. einen Einfluss auf das Migrationsverhalten in T-Zellen haben kann (Ledderose *et al.* 2018).

### 3.2.1 Untersuchung der P2X7 Expression auf T-Zellen aus B6-P2X4ko Mäusen.

P2X7 ist wie P2X4 ein ATP gesteuerter Ionenkanal und wird auf verschiedenen T-Zellpopulationen exprimiert (Rissiek *et al* 2015, Grassi *et al* 2020). Im Rahmen der P2X4ko T-Zell Charakterisierung sollte untersucht werden, ob die genetische Deletion von *P2rx4* einen Einfluss auf die Expression von P2X7 in den T-Zellen hat. Hierfür wurden drei T-Zellsubpopulationen durchflusszytometrisch untersucht: T Helferzellen (Th), zytotoxische T Zellen (CTL) und regulatorische T Zellen (Treg) (**Abb. 3.2 A**). Bei jeder T-Zellsubpopulation wurde die P2X7 Expression mit Hilfe eines anti P2X7 monoklonalen Antikörpers am Durchflusszytometer gemessen (**Abb. 3.2 B**). Als Negativkontrolle wurden T-Zellen von B6-P2X7ko Mäusen verwendet. Bei den B6-WT Th und CTL ist eine geringe P2X7 Expression zu beobachten. B6-WT Tregs hingegen exprimieren deutlich mehr P2X7 als B6-WT CTL und Th. Führt man die gleiche Analyse mit B6-P2X4ko T Zellen durch, so fällt auf, dass B6-P2X4ko CTL und Th deutlich mehr P2X7 exprimieren als entsprechende B6-WT Zellen. B6-P2X4ko Tregs exprimieren jedoch vergleichbare Menge an P2X7 wie B6-WT Tregs. Die P2X7 Expression wurden über die mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) quantifiziert und statistisch ausgewertet, was die zuvor beschriebenen Unterschiede bestätigt und statistisch absichert (**Abb. 3.2 C**). Es stellte sich als nächstes die Frage, ob diese Unterschiede in der Zelloberflächenexpression von P2X7 in Zusammenhang mit einer veränderten *P2rx7* mRNA Expression gebracht werden konnte. Für diese Untersuchung wurde mRNA aus CTL, Th und Tregs von B6-WT und B6-P2X4ko Mäusen isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Menge an *P2rx7* cDNA in Relation zum housekeeping gene *Sdha* bestimmt. Der Vergleich von B6-WT und B6-P2X4ko T-Zellen ergab, dass B6-P2X4ko CTL und Th acht- bzw. dreimal mehr *P2rx7* mRNA exprimieren als entsprechende B6-WT Zellen (**Abb. 3.2 D**). Die Tregs beider Mäuse zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied in der *P2rx7* mRNA Expression. Somit bestätigen die mRNA Untersuchungen die Ergebnisse der FACS Analysen. Beide zeigen, dass CTL und Th aus B6-P2X4ko Mäusen mehr P2X7 auf Protein und mRNA Ebene exprimieren.



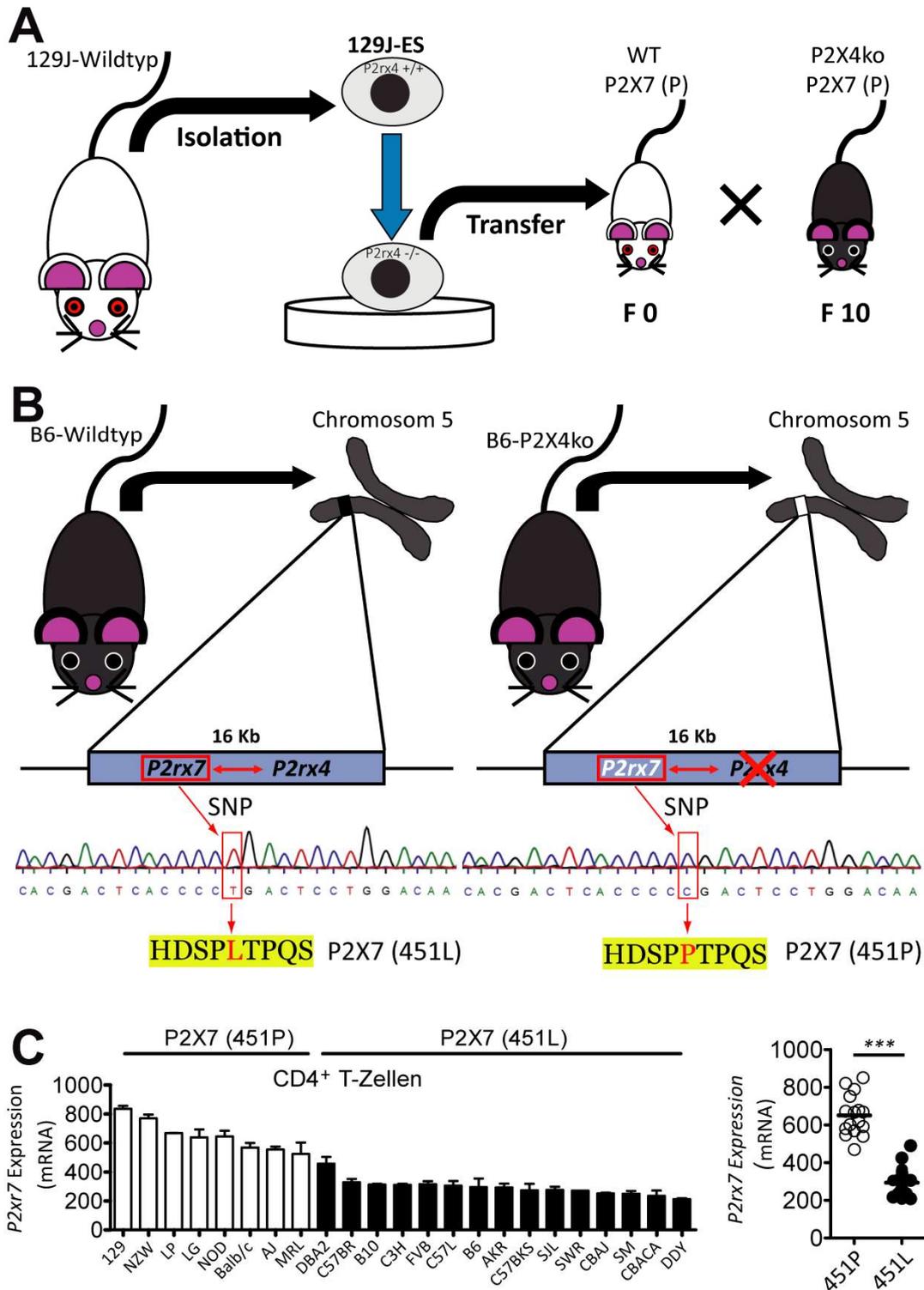
**Abb. 3.2** Th und CTL aus B6-P2X4ko Mäuse exprimieren mehr P2X7 als B6-WT T-Zellen.

(A) Gating Strategie zur Identifikation von CTL (CD8<sup>+</sup>), Th (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) und Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>). (B) Durchflusszytometrische Messung der P2X7 Expression auf Th, CTL und Treg Zellen dargestellt als Histogramme (WT: rot; P2X4ko: blau; P2X7ko: schwarz gestrichelt). (C) Vergleich der P2X7 Expressionsstärke gemessen an der mittleren Fluoreszenzintensität (n = 3 Mäuse pro Genotyp). (D) Vergleich der *P2xr7* Genexpression in T-Zellen zwischen B6-WT und B6-P2X4ko Mäusen (n = 7 Mäuse). Statistik: t-Test p < 0,01 (\*\*); p < 0,001 (\*\*\*) ; NS= Nicht signifikant.

3.2.2 B6-P2X4ko Mäuse exprimieren die 451P Variante des P2X7 Rezeptors als passenger Mutation.

Als möglicher Grund für die erhöhte P2X7 Expression in den B6-P2X4ko T-Zellen wurde in Betracht gezogen, dass das *P2rx7* Gen als sogenannte passenger Mutation während des Rückkreuzungsprozesses der B6-P2X4ko Mäuse mitgeführt wurde. Dies ist naheliegend, da einerseits der *P2rx7* knockout in den B6-P2X4ko Mäusen in 129/J embryonalen Stammzellen (ES) durchgeführt wurde und andererseits *P2rx7* ein direktes Nachbargen des inaktivierten *P2rx4* Gens ist. Es ist somit unwahrscheinlich, dass selbst nach der 10. Generation der Rückkreuzung auf B6 das *P2rx7* Gen aus den 129 ES Zellen gegen das aus B6 ausgetauscht wurde (**Abb. 3.3 A**). 129 und B6 Mäuse unterscheiden sich in ihrem *P2rx7* durch einen nicht synonymen „single nucleotide polymorphism“ (SNP), welcher zum Austausch der Aminosäure Prolin an Position 451 (129 Variante) hin zu Leucin (B6 Variante) führt (Adriouch *et al.* 2002). Zur Überprüfung dieser SNP Variante in B6-P2X4ko wurden ein Fragment genomischer DNA, welches rs48804829 flankiert, mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzanalyse der B6-WT Maus zeigt an der SNP Stelle, wie erwartet, ein Thymin, was nach Translation in Proteinsequenz zur Synthese eines Leucins an AS Position 451 von P2X7 führt (**Abb. 3.3 B**). Die gleiche Untersuchung wurde auch bei der B6-P2X4ko Maus durchgeführt. Hierbei sieht man, dass sich an der SNP Stelle, anders als bei der B6-WT Maus, ein Cytosin befinden, was zur Folge hat, dass sich an der 451 AS Stelle ein Prolin befindet. Dies entspricht der SNP Variante der 129 Maus und bestätigt somit, dass B6-P2X4ko Mäuse ein 129-basiertes *P2rx7* Gen als passenger Mutation tragen.

Mit Hilfe von Genom Datenbanken wie z.B. Ensembl (<https://ensemblgenomes.org>) lässt sich bestimmen, welche Mausstämme die P und welche die L Variante von P2X7 exprimieren. Mit Hilfe der Immgen.org Datenbank lassen sich zudem mRNA Sequenzierungsdaten von CD4<sup>+</sup> T-Zellen einsehen, was es einem erlaubt, einen Vergleich der *P2rx7* mRNA Expression von P-Mausstämmen und L-Mausstämmen durchzuführen. Hier wurde deutlich, dass P-Mausstämme wie Balb/c oder 129 höhere *P2rx7* mRNA Expressionlevel aufweisen, als L-Mausstämme wie B6 oder FVB (**Abb. 3.3 C**). Fasst man das Expressionslevel aller P und L Mausstämme zusammen, ist ein hoch signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen zu erkennen (**Abb. 3.3 C**).

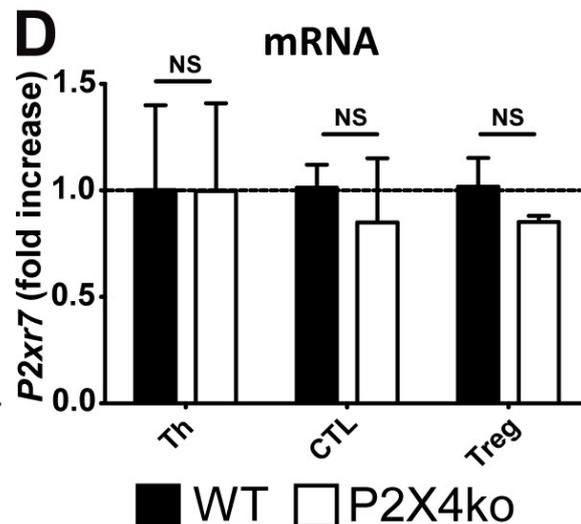
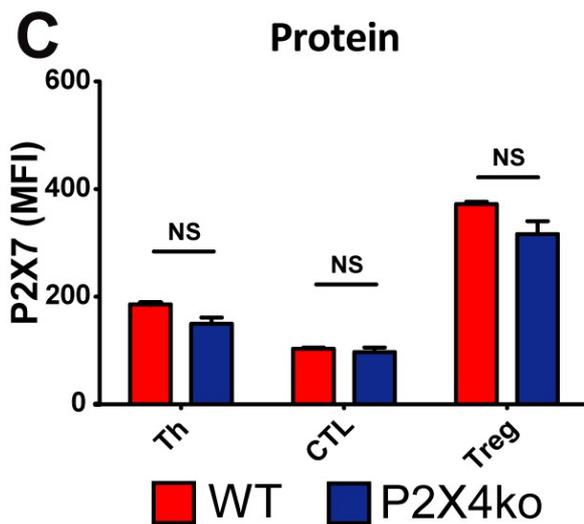
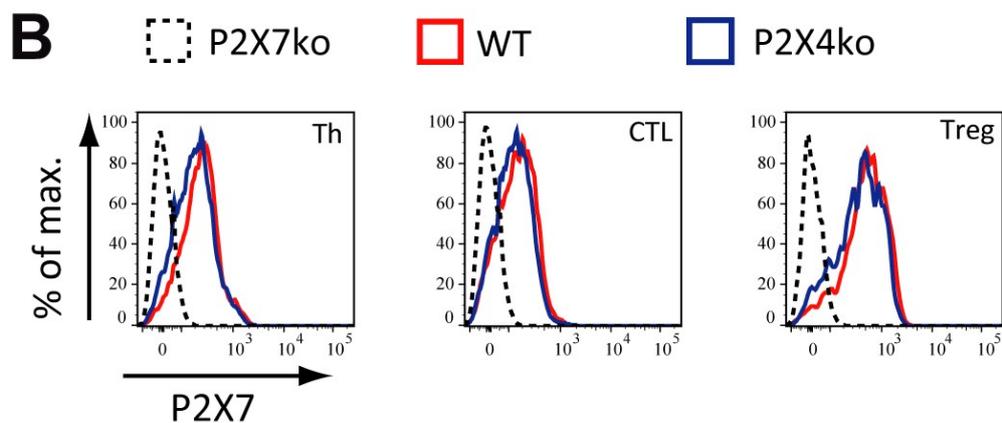
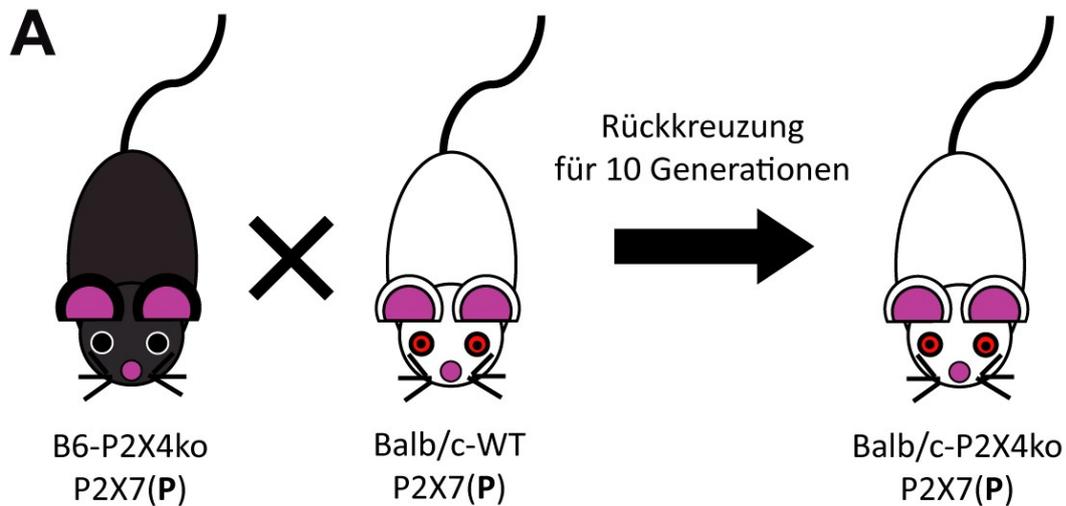


**Abb. 3.3 B6-P2X4ko Mäuse besitzen eine passanger Mutation des *P2rx7* Gens.**

(A) Die B6-P2X4ko Mäuse werden klassisch gezüchtet wodurch ein genetischer Hintergrund der 129/J Mauslinie besteht. Nach 10 Generationen an Rückkreuzung, exprimiert diese Mauslinie weiterhin die 129/J typische P2X7(P) Variante des Rezeptors. (B) B6-Wildtyp Mäuse besitzen eine Thyminbase im ctg Codon des 451-SNP Bereiches im *P2rx7* Gen. Dies führt zur Expression der P2X7(L) Variante. B6-P2X4ko Mäuse hingegen besitzen an derselben Stelle eine Cytosinbase im ccg Codon. Dies führt zur Expression der P2X7(P) Variante. (C) Die Zusammenfassung der mRNA Expressionsstärke von *P2rx7* in verschiedenen Mausstämmen exemplarisch dargestellt in CD4<sup>+</sup> T Zellen. Die Mausstämme lassen sich anhand ihrer P2X7 Variante gruppieren. Gleichzeitig ist ein signifikanter Unterschied der Expressionsstärke erkennbar. Statistik; t-Test  $p < 0,0001$ (\*\*\*).

### 3.2.3 Balb/c-P2X4ko exprimieren die P2X7 451P Variante des P2X7 Rezeptors.

Neben den B6-P2X4ko Mäusen standen uns im Rahmen dieser Arbeit auch Balb/c-P2X4ko Mäuse zur Verfügung, welche durch Rückkreuzung von B6-P2X4ko über 10 Generationen auf den Balb/c Hintergrund gebracht wurden (**Abb. 3.4 A**). Diese Mäuse wurden mir freundlicherweise von Prof. Friedrich Koch-Nolte zur Verfügung gestellt. Die Balb/c Mauslinie trägt die 451(P) Variante des P2X7 Rezeptors, wie bereits in Abschnitt 3.2.2 beschrieben wurde. Somit wird die in den B6-P2X4ko befindliche *P2rx7* passender Mutation im Vergleich von Balb/c-WT und Balb/c-P2X4ko „neutralisiert“ da beide Linien die P(451) Variante von P2X7 exprimieren. Somit sollten sich Balb/c-WT und Balb/c-P2X4ko T-Zellen in ihrer P2X7 Expression nicht unterscheiden. Um dies zu überprüfen, wurde wie auf dem B6 Hintergrund eine P2X7 Expressionsanalyse durchgeführt in T-Zellen von Balb/c-WT, Balb/c-P2X4ko und Balb/c-P2X7ko Mäusen. In der Histogrammdarstellung der Ergebnisse sieht man, dass Balb/c-WT und Balb/c-P2X4ko in allen drei T-Zellsubpopulationen (Th, CTL und Treg) vergleichbare P2X7 Expressionslevel aufweisen (**Abb. 3.4 B**). Bei der statistischen Auswertung der P2X7 MFI konnten diese Beobachtungen bestätigt werden (**Abb. 3.4 C**), da keine signifikanten Unterschiede in der P2X7 Expression in den T-Zellen gemessen werden konnten. Zusätzlich wurden die *P2rx7* mRNA Expressionen von T-Zellen aus Balb/c-WT und Balb/c-P2X4ko Mäusen verglichen. Wie bei der Protein Expression, konnte hier ebenfalls kein signifikanter Unterschied in den T-Zellen festgestellt werden (**Abb. 3.4 D**).

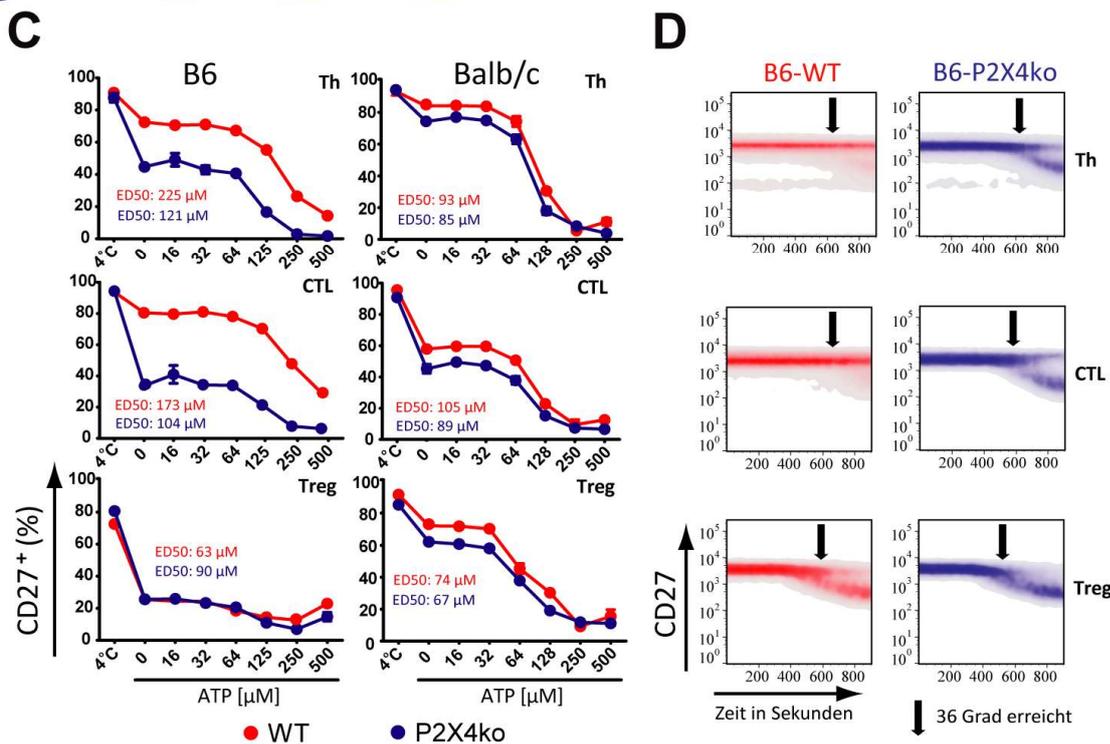
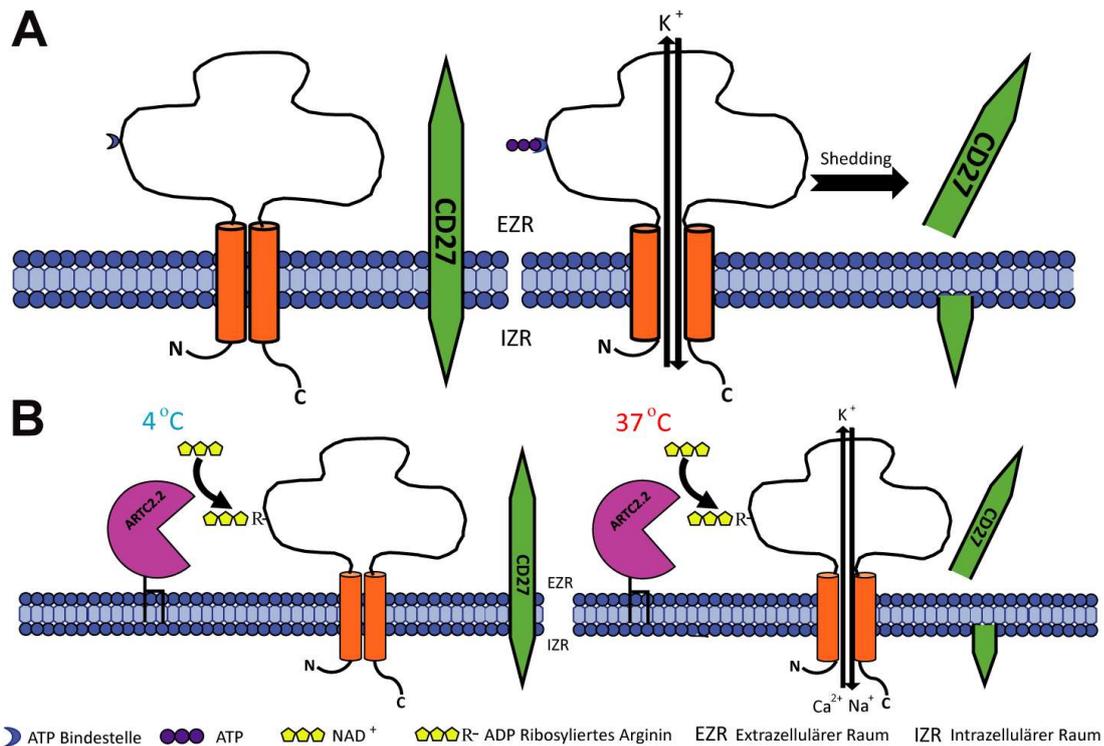


**Abb. 3.4** Balb/c-P2X4ko generierte Mäuse haben den gleichen P2X7 Phänotyp wie die Balb/c Wildtyp Mäuse.

(A) Schematische Darstellung zur Züchtung von Balb/c-P2X4ko Mäusen. (B) Histogramm Plots zur bildlichen Darstellung der P2X7 Expression in Th, CTL und Treg Populationen in Balb/c Mäusen. Die Plots von WT, P2X4ko und P2X7ko sind in einem gemeinsamen Histogramm dargestellt. (C) Graphischer Vergleich der P2X7 Expression in T-Zellen zwischen Balb/c-WT und Balb/c-P2X4ko Mäusen. Die Expressionsstärke ist in der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) dargestellt. Für den Graphen wurden n=3 Mäuse verwendet. (D) Genexpressionsvergleich des *P2xr7* Gens (mRNA) in T Zellen zwischen Balb/c-WT und Balb/c-P2X4ko Mäusen. Für den Graphen wurden n=7 Mäuse aus unabhängigen Experimenten verwendet. Statistik; t-test  $p > 0,05$  (NS= Nicht signifikant).

### 3.2.4 Die *P2rx7* passenger Mutation in den B6-P2X4ko Mäusen resultiert in einer erhöhten Sensitivität von B6-P2X4ko CTL und Th gegenüber ATP und NAD<sup>+</sup>.

In der Einleitung wurde bereits erklärt, dass der P2X7 Rezeptor durch Binding von ATP aktiviert und somit geöffnet wird. Durch den resultierenden Einstrom von Kalziumionen und Natriumionen sowie den Ausstrom von Kaliumionen werden verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, welche z.B. die enzymatische Abspaltung von Zelloberflächenproteinen induzieren. Dieser auch als „ecto-domain shedding“ (kurz shedding) bezeichnete Prozess ist beispielsweise für das CD27 Molekül beschrieben (Moon *et al.* 2006). Sowohl die Bindung von ATP (**Abb. 3.5 A**) als auch die ARTC2.2 vermittelte ADP-Ribosylierung von P2X7 führen zur P2X7 Aktivierung (**Abb. 3.5 B**). Für die ADP-Ribosylierung vermittelte P2X7 ergibt sich jedoch die besondere Situation, dass ARTC2.2 bei 4°C aktiv ist und P2X7 ADP-ribosylieren kann. Die P2X7 Aktivierung findet jedoch erst ab Temperaturen oberhalb von 30°C statt. Dies hat insofern einen entscheidenden Einfluss, als dass NAD<sup>+</sup> bei der Zellpräparation freigesetzt wird, was zur ADP-Ribosylierung von P2X7 auf ARTC2.2./P2X7 co-exprimierenden T-Zellen führt. Werden diese T-Zellen z.B. in funktionellen Untersuchungen dann bei 37°C inkubiert, führt die P2X7 ADP-Ribosylierung zur P2X7 Aktivierung und der damit verbundenen Abspaltung von CD27. Um die ATP und NAD<sup>+</sup> vermittelte P2X7 Aktivierung in WT und P2X4ko T-Zellen auf dem B6 und Balb/c Hintergrund zu vergleichen, wurden die T-Zellen mit Fluorchrom konjugierten anti-CD27 Antikörpern angefärbt und anschließend in einer ATP Dosis Wirkungsanalyse untersucht. Dabei wurde die Abspaltung von CD27 von CTL, Th und Tregs nach 37°C Inkubation untersucht (**Abb. 3.5 C**). Bei den Balb/c Mäusen ist zu erkennen, dass die T-Zellen beider Genotypen in ähnlicher Weise auf aufsteigende ATP Konzentrationen mit CD27 shedding reagieren. Dies lässt sich auch anhand der berechneten Effektivdosis 50 (ED50) beider Kurven erkennen, welche bei ca. 90 µM liegt. Bei den B6-Mäusen zeigten die Tregs von WT und P2X4ko ebenfalls eine vergleichbare ATP Sensitivität. Bei den B6 Th und CTL jedoch unterscheidet sich der Kurvenverlauf des CD27 sheddings deutlich zwischen WT und P2X4ko Mäusen. So liegt die ED50 für B6-WT CTL bei 225 µM, bei B6-P2X4ko CTL hingegen jedoch schon bei 120 µM. Ähnlich sieht man bei B6-WT Th mit einer ED50 von 170 µM eine deutlich geringere ATP Sensitivität als bei B6-P2X4ko Th (100 µM). Anhand der Verläufe der dargestellten Dosis Wirkungsanalysen lassen sich zudem auch Unterschiede in der NAD<sup>+</sup> vermittelten P2X7 Aktivierung erkennen. So zeigen beispielsweise B6-WT und B6-P2X4ko CTL inkubiert bei 4°C und bei 37°C ohne ATP (Wert 0) einen deutlichen Unterschied an CD27<sup>+</sup> Zellen. Ähnliches findet sich bei den Th beider Mausstämme. Dieser Unterschied ist auf die ADP-Ribosylierung von P2X7 während der Zellpräparation zurückzuführen, welcher sich bei der 37°C Inkubation durch die Aktivierung von P2X7 und dem damit verbundenen CD27 shedding äußert. Um den Unterschied von B6-WT und B6-P2X4ko in der NAD<sup>+</sup> vermittelten P2X7 Aktivierung deutlicher zu machen, wurden Echtzeit FACS Analysen durchgeführt, in denen das Vorhandensein von CD27 auf der Zelloberfläche über einen Zeitraum von 15 min gemessen wurde.



**Abb. 3.5 B6-P2X4ko T-Zellen zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber ATP und NAD<sup>+</sup> im Vergleich zu B6-WT T-Zellen.**

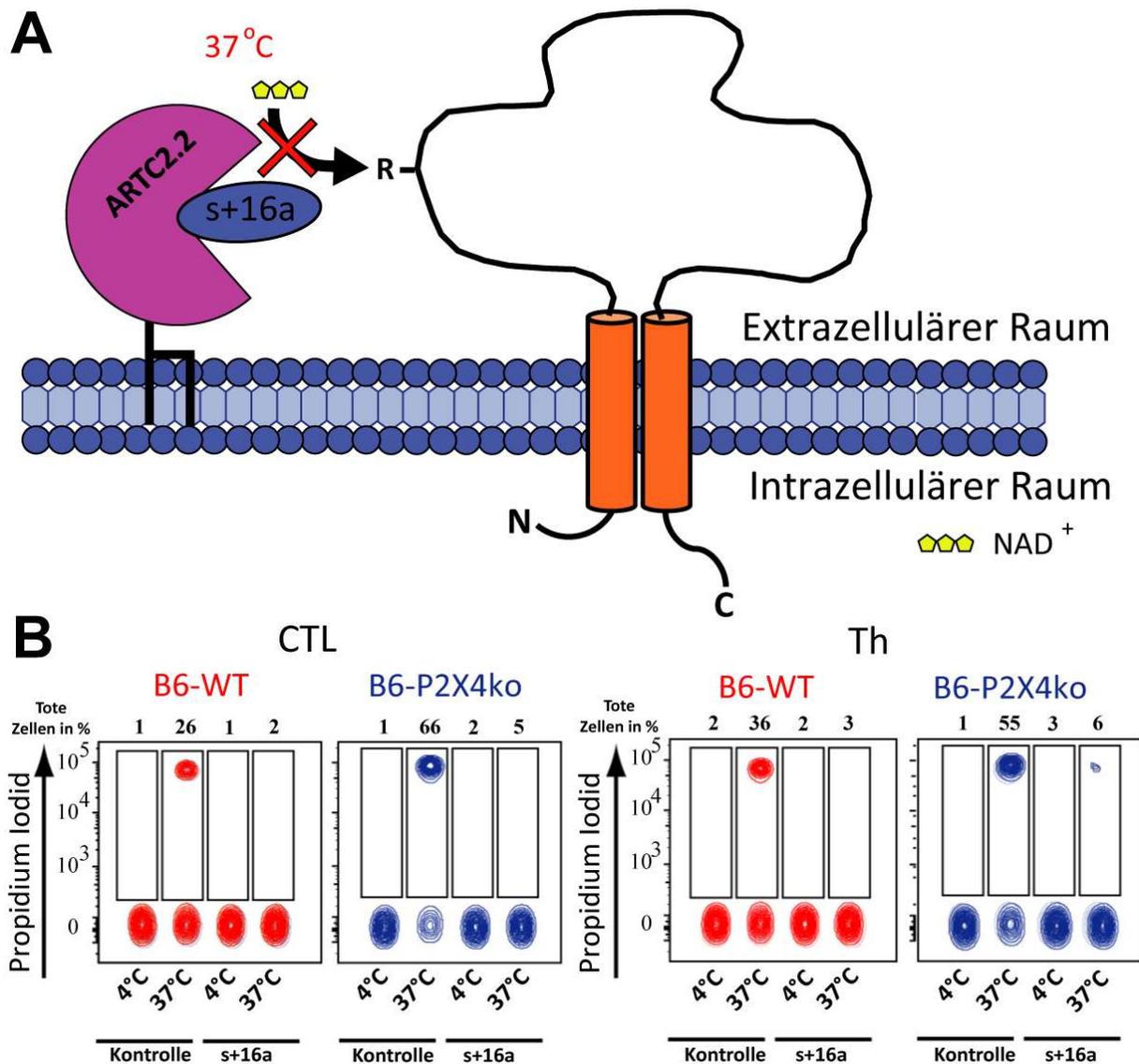
**(A)** Schematische Darstellung der ATP abhängigen P2X7 Aktivierung. **(B)** Schematische Darstellung der NAD<sup>+</sup> vermittelten P2X7 Aktivierung. **(C)** ATP Dosis-Wirkung Untersuchung von T-Zellen aus WT (rot) und P2X4ko (blau) T-Zellen aus B6 und Balb/c Mäusen. Das shedding von CD27 wurde als readout für die Aktivierung von P2X7 verwendet. Der 4°C Wert und der 0  $\mu$ M ATP Wert zeigen die ATP unabhängige, NAD<sup>+</sup> vermittelte P2X7 Aktivierung. Es wurden n=3 Mäuse für jeden Messpunkt verwendet. **(D)** Echtzeitmessung der CD27 Abspaltung, mit der der Einfluss der ADP-Ribosylierung von P2X7 während der Zellpräparation bei T-Zellen aus B6-WT und B6-P2X4ko Mäusen verglichen wurde. Die T-Zellen wurden während der Messung kontinuierlich bis auf 36°C erwärmt.

Gleichzeitig wurde die Temperatur des Messröhrchens mit Hilfe einer IR-Lampe langsam auf 36°C erhöht (**Abb. 3.5 D**). B6-WT und B6-P2X4ko Mäusen wurden im selben Röhrchen analysiert und konnten aufgrund von unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen detektiert werden. Es ist zu erkennen, dass die Th und CTL T-Zellen von B6-P2X4ko Mäusen kurz vor Erreichen der 36°C Marke einen deutlichen Verlust von CD27 von der Zelloberfläche aufweisen. Dieser Effekt lässt sich nicht bei B6-WT Th und CTL T-Zellen beobachten. Wie bereits zuvor beobachtet unterscheiden sich die Tregs aus B6-WT und B6-P2X4ko auch in dieser Untersuchung nicht.

3.2.5 Die *P2rx7* passenger Mutation in den B6-P2X4ko Mäusen resultiert in einer erhöhten Anfälligkeit von B6-P2X4ko CTL und Th gegenüber dem NAD<sup>+</sup> vermittelten Zelltod.

Die NAD<sup>+</sup> vermittelte Aktivierung von P2X7 wird über ARTC2.2 katalysiert, welche kovalent eine ADP-Ribose Gruppe an Arginin 125 des P2X7 Rezeptors anfügt. Werden die ARTC2.2/P2X7 exprimierenden Zellen dann bei 37°C inkubiert, so kommt es zur dauerhaften Aktivierung von P2X7. Dies resultiert in der Induktion des sogenannten NAD<sup>+</sup> vermittelten Zelltods, kurz NICD (Seman *et al.* 2003). Es wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass vor allem Zellen mit hoher ARTC2.2/P2X7 Expression stark auf, bei der Zellpräparation freigesetztes, NAD<sup>+</sup> reagieren. Ein Großteil dieser Zellen sterben bei anschließenden Untersuchungen, die 37°C Inkubationen beinhalten, an NICD (Rissiek *et al.* 2015, 2017). Um diese posttranslationale Modifikation von P2X7 während der Zellpräparation zu verhindern, kann man den Mäusen kurz vor der Präparation den ARTC2.2 blockierenden Nanobody s+16a intravenös spritzen (Koch-Nolte *et al.* 2007) (**Abb. 3.6 A**).

In Abschnitt 3.2.1 wurde gezeigt, dass B6-P2X4ko T-Zellen mehr P2X7 exprimieren als B6-WT T-Zellen. Somit besteht die Möglichkeit, dass B6-P2X4ko T-Zellen anfälliger für NICD sind als B6-WT T-Zellen. Um dies zu untersuchen wurden FACS isolierte Th und CTL aus B6-WT und B6-P2X4ko Mäusen für 2 Stunden auf Eis (4°C) oder im Brutschrank (37°C) inkubiert. Zudem wurden entsprechende Zellen aus s+16a behandelten Tieren isoliert und analog untersucht. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) versetzt und durchflusszytometrisch analysiert. Von NICD betroffene Zellen nehmen das PI auf, welches mit der Zell DNA interkaliert und so tote Zellen aufgrund seiner Fluoreszenz sichtbar macht. Die Ergebnisse dieses Versuches haben gezeigt, dass ca. 65% aller B6-P2X4ko CTLs und gut 50% aller B6-P2X4ko Th binnen zwei Stunden bei 37°C absterben. Dem gegenüber sterben nur 25 % bzw. 35 % entsprechender B6-WT T-Zellen während der 37°C Inkubation. Anhand der T-Zellen aus den s+16a behandelten Mäusen lässt sich sehr gut aufzeigen, welchen Einfluss das bei der Zellpräparation freigesetzte NAD<sup>+</sup> und der daraus resultierende NICD hat. Sowohl CTL und Th aus s+16a behandelten B6-P2X4ko und B6-WT Mäusen zeigen kaum einen Vitalitätsverlust während der 37°C Inkubation (**Abb. 3.6 B**).



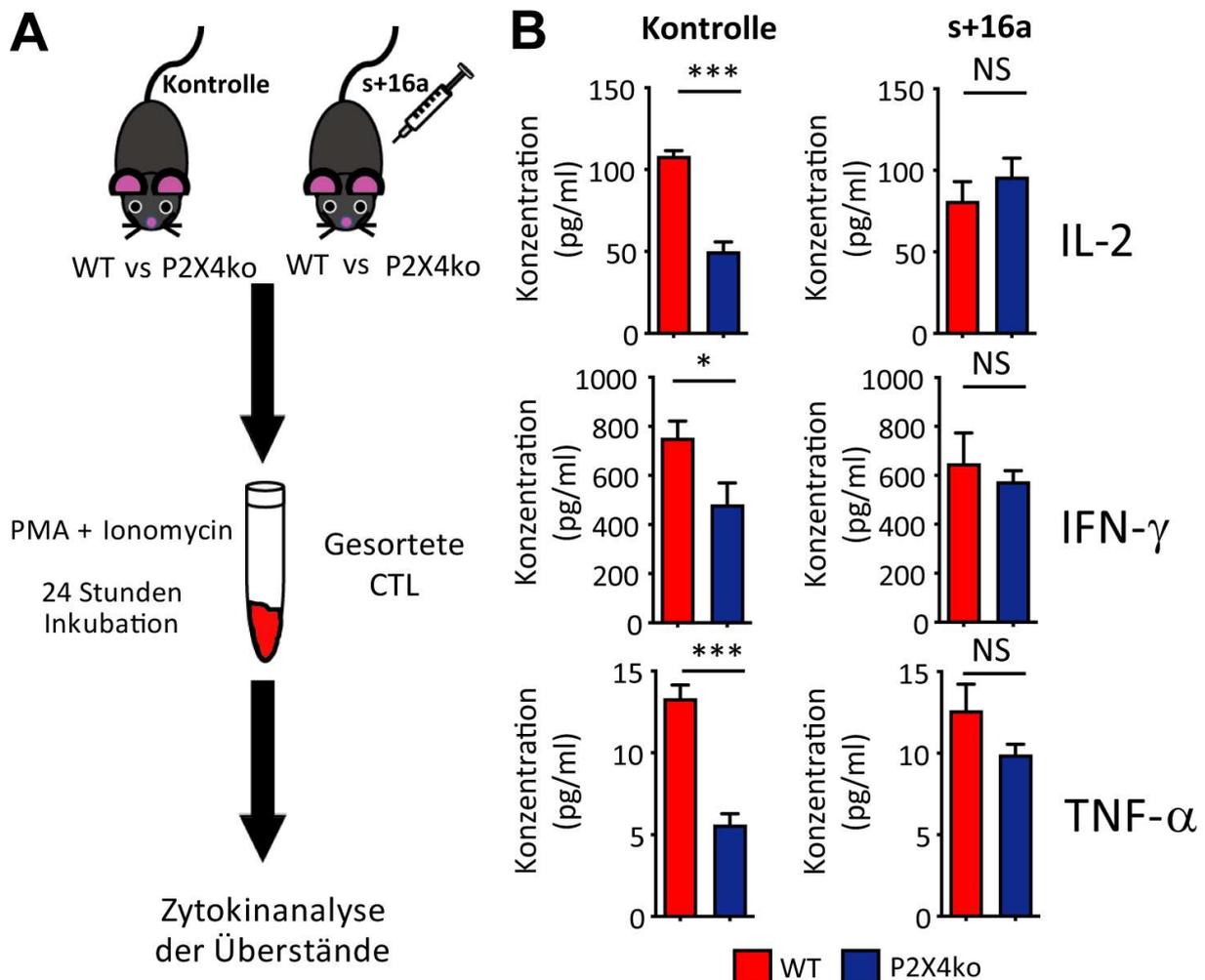
**Abb. 3.6 B6-P2X4ko CTL und Th sind anfälliger für NICD als entsprechende B6-WT T-Zellen.**

(A) Der s+16a Nanobody blockiert das Ektoenzym ARTC2.2, wodurch keine ADP-Ribosylierung von P2X7 stattfinden kann. (B) Vergleich der Vitalität von CTL und Th aus unbehandelten oder s+16a behandelten B6-P2X4ko und B6-WT Mäusen. FACS sortierte Zellen wurden für 2 h bei 4°C oder 37°C inkubiert und die Zellvitalität wurde anschließend durch Propidiumiodid Färbung durchflusszytometrisch untersucht. Anhand der Aufnahme von Propidiumiodid lässt sich die prozentuelle Verteilung der lebenden und toten Zellen bestimmen.

### 3.2.6 Die verstärkte NICD Sensitivität der B6-P2X4ko T-Zellen beeinflusst die Ergebnisse von *in vitro* Zytokinanalysen

Im Folgenden wurde die Auswirkung der erhöhten NICD Sensitivität der B6-P2X4ko CTL in einem funktionellen Assay, welcher eine 37°C Inkubation beinhaltet, untersucht. Hierfür wurde *in vitro* die Ausschüttung von Zytokinen, nach Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin (Iono), bei B6-WT und B6-P2X4ko CTL verglichen. Ein Schema des Versuchs Aufbaus ist in Abbildung 3.7 dargestellt (Abb. 3.7 A). Zunächst wurden B6-WT und B6-P2X4ko Mäuse in zwei

Gruppen unterteilt, eine Gruppe erhielt s+16a (ARTC2.2 Blocker) während die andere Gruppe unbehandelt blieb (Kontrolle). Von allen Mäusen wurden CTL durchflusszytometrisch isoliert und anschließend für 24 Stunden mit PMA/Iono bei 37°C inkubierten. Durch die durchflusszytometrische Isolierung war gewährleistet, dass in jeder Kondition dieselbe Anzahl an CTL verwendet wurde. Nach Abschluss der Stimulation wurden die Überstände entnommen und analysiert. Die ausgewerteten Daten zeigen, dass die CTL der B6-WT Mäuse aus der unbehandelten Kontrollgruppe scheinbar mehr Interleukin-2 (IL-2), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) als entsprechende B6-P2X4ko CTL produzieren (**Abb. 3.7 B**). Betrachtet man jedoch die Ergebnisse der s+16a behandelten Gruppe, so ist kein signifikanter Unterschied in der Ausschüttung von IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  zu erkennen. Somit konnte gezeigt werden, dass funktionelle Experimente wie Zytokinanalysen mit B6-P2X4ko T-Zellen aufgrund der *P2rx7* passender Mutation zu falschen Schlussfolgerungen führen können.

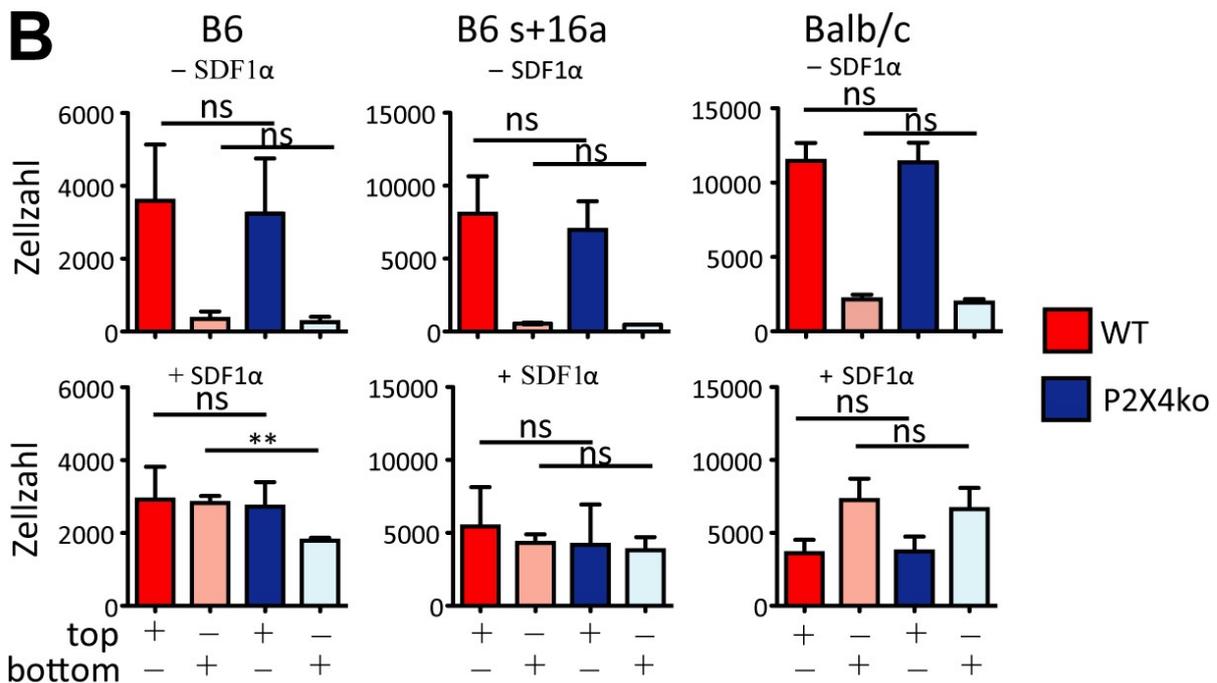
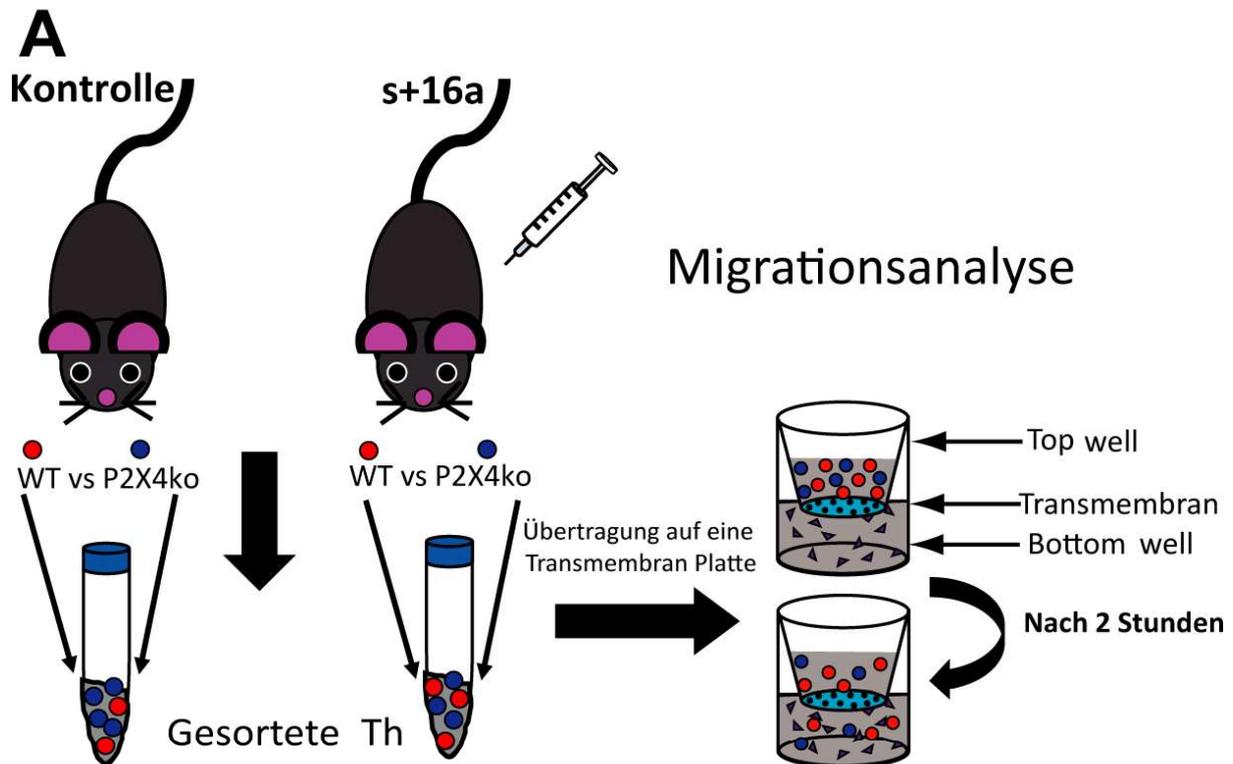


**Abb. 3.7 Die hohe NICD Anfälligkeit der B6-P2X4ko T-Zellen kann zu falschen Ergebnissen führen - in vitro Zytokinproduktion durch CTL.**

(A) Schematischer Versuchsaufbau zur Analyse der in vitro Zytokinproduktion. (B) FACS isolierte CTL aus s+16a behandelten und unbehandelten (Kontrolle) B6-WT und B6-P2X4ko Mäusen wurden mit PMA/Iono für 24 Stunden stimuliert und die Produktion von IL-2, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  wurde mittels Legendplex Assay gemessen. Für die Untersuchung wurden CTLs von n = 3 Mäuse pro Kondition verwendet. Statistik; t-Test p<0,05(\*); p<0,001(\*\*\*); NS= Nicht signifikant.

### 3.2.7 Die verstärkte NICD Sensitivität der B6-P2X4ko T-Zellen beeinflusst die Ergebnisse von *in vitro* Migrationsversuchen

Neben B6-P2X4ko CTLs wurden auch für B6-P2X4ko Th die funktionellen Auswirkungen der *P2rx7* passenger Mutation untersucht. Hierbei wurde der Einfluss der höheren Sensitivität gegenüber bei der Zellpräparation freigesetztem NAD<sup>+</sup> und der daraus resultierenden höheren Anfälligkeit gegenüber NICD in einem *in vitro* T-Zell Migrationsversuch analysiert. Dies ist insofern interessant, als dass in der Literatur ein funktioneller Zusammenhang zwischen P2X4 und der Migration von T-Zellen beschrieben wurde (Ledderose *et al.* 2018). Aufgrund dessen wurde ein *in vitro* transwell Migrationsassay von mir etabliert, in dem die Migration von B6-P2X4ko und B6-WT Th verglichen werden konnte. Der schematische Aufbau des Versuchs ist in **Abb. 3.8 A** dargestellt. Ähnlich wie bei der Untersuchung der Zytokinexpression wurden wieder paarweise B6-P2X4ko Th und B6-WT aus unbehandelten (Kontrolle) und s+16a behandelten Mäusen in ihrem Migrationsverhalten verglichen. Hierbei wurden die B6-WT und B6-P2X4ko Th Zellen durchflusszytometrisch isoliert und in einem 1:1 Verhältnis in die obere Kammer einer transwell Platte gegeben. Als Chemokin in der unteren Kammer diente SDF1 $\alpha$  (CXCL12). Die Migration von WT und P2X4ko Th konnten nach 2 Stunden, bei einer 37°C Inkubation, per FACS quantifiziert werden, da B6-WT Th mittels eFluor Farbstoff markiert waren. Ähnlich wie bei der Zytokinexpressionsanalyse zeigt sich auch im Migrationsversuch ein Unterschied zwischen B6-WT und B6-P2X4ko Th (**Abb. 3.9 B**). Zunächst wurde beobachtet, dass ohne SDF-1 $\alpha$  in der unteren Kammer kaum Zellen dorthin migrieren. In Gegenwart von SDF-1 $\alpha$  konnte jedoch eine deutliche höhere Anzahl an Zellen in der unteren Kammer gezählt werden. Auffällig war, dass in der Kontrollgruppe signifikant weniger B6-P2X4ko Th im Vergleich zu B6-WT in die untere Kammer wanderten. Dies würde die Ergebnisse von Ledderose *et al.*, dass P2X4 wichtig für die Migration von Zellen ist, bestätigen. Vergleicht man jedoch B6-WT und B6-P2X4ko Th aus s+16a behandelten Mäusen, so ist kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Th beider Genotypen in der unteren Kammer festzustellen. Dies deutet darauf hin, dass auch in diesem funktionellen Assay die erhöhte Anfälligkeit der B6-P2X4ko Th gegenüber NICD zu einer Beeinflussung der Ergebnisse führt. Zur Unterstützung dieser Hypothese wurde zusätzlich ein Migrationsversuch mit Balb/c-WT und Balb/c-P2X4ko Th durchgeführt. Wie in 3.2.3 und 3.2.4 beschrieben zeigen Balb/c-WT und Balb/c-P2X4ko Th eine vergleichbare P2X7 Expression und keinen Unterschied in der ATP/NAD<sup>+</sup> Sensitivität. Auch das Ergebnis des Migrationsversuchs zeigte keinerlei signifikante Unterschiede in der SDF-1 $\alpha$  induzierten Migration in die untere Kammer. Die Ergebnisse der Migrationsversuche zeigen somit wieder deutlich, welchen Einfluss die *P2rx7* passenger Mutation in den B6-P2X4ko auf funktionelle T-Zell Versuche haben kann.



**Abb. 3.8 Die hohe NICD Anfälligkeit der B6-P2X4ko T-Zellen kann zu falschen Ergebnissen führen - *in vitro* Migration von Th.**

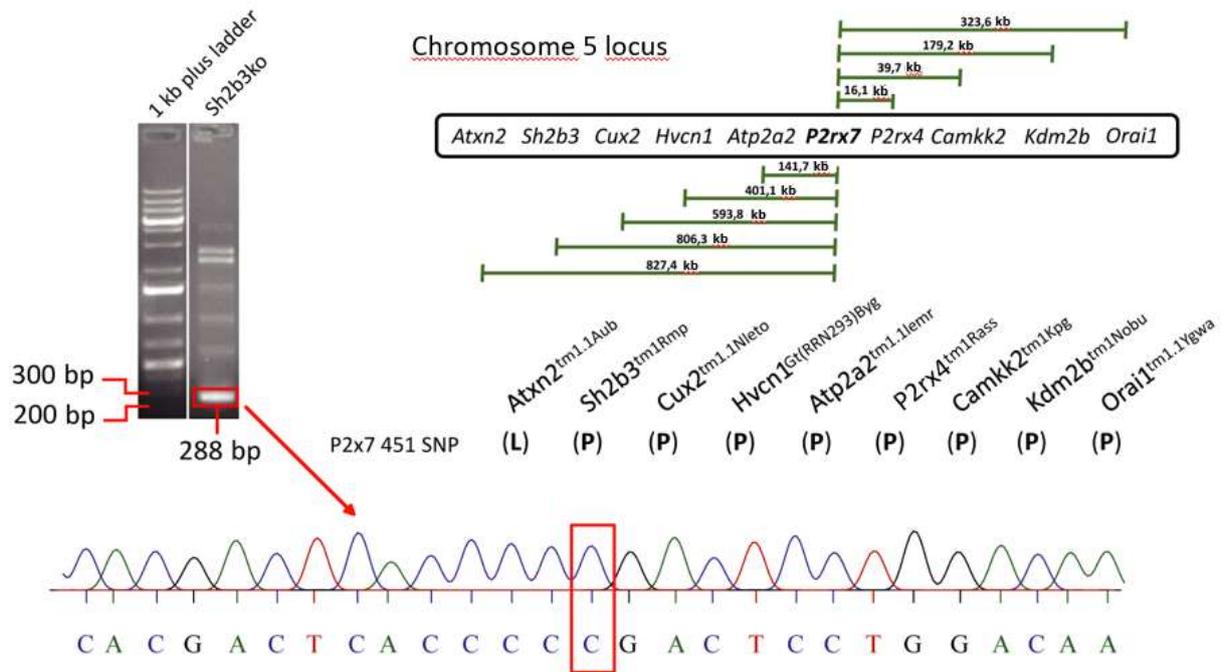
(A) Schematischer Aufbau des Migrationsexperiments. (B) Durchflusszytometrisch quantifizierte Th Zellen von WT (rot) und P2X4ko (blau) in der oberen und unteren Kammer einer transwell Platte. Die Migration der Zellen von der oberen in die untere Kammer wurde durch das Chemokin SDF-1α angeregt. Für die Analyse wurden n = 7-9 Mäuse verwendet. Statistik; t-Test p<0,01(\*\*); NS= Nicht signifikant.

### 3.3 Die *P2rx7* passenger Mutation lässt sich auch in anderen Ko-Mäusen nachweisen

#### 3.3.1 B6-ko Mäuse von Genen, die in derselben Region liegen wie der *P2rx7* Genlocus, können auch Träger der P2X7(P) Variante sein

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass *P2rx4*<sup>tm1Rass</sup> eine *P2rx7* passenger Mutation tragen, was einen Großteil der T-Zellen deutlich anfälliger für NICD macht als entsprechende WT T-Zellen. Diese Unterschiede haben das Potential, experimentelle Ergebnisse zu beeinflussen. In der direkten genetischen Nachbarschaft von *P2rx7* (+/- 2 Megabasen) befinden sich 95 Protein kodierende Gene (Tabelle Anhang 3.1). Eine Suche in der MGI Datenbank ergab, dass für viele dieser Gene kongene knockout Mäuse existieren, welche auf der Basis von 129 embryonalen Stammzellen generiert wurden. Um zu untersuchen, ob ein Teil dieser Mäuse ebenfalls eine *P2rx7* passenger Mutation trägt, wurden uns von verschiedenen Arbeitsgruppen, welche entsprechende Mäuse züchten, genomische DNA-Proben zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden Proben von folgenden B6 Mauslinien auf die *P2rx7* passenger Mutation untersucht: *Atxn2*<sup>tm1.1Aub</sup>, *Sh2b3*<sup>tm1Rmp</sup>, *Cux2*<sup>tm1.1Nieto</sup>, *Atp2a2*<sup>tm1.1Iemr</sup>, *Camkk2*<sup>tm1Kpg</sup>, *Kdm2b*<sup>tm1Nobu</sup>, *Orai1*<sup>tm1.1Ygwa</sup> und *Hvcn1*<sup>Gt(RRN293)Byg</sup>.

Hierfür wurde wie in 3.2.2 beschrieben mittels PCR ein Fragment aus dem *P2rx7* Gen amplifiziert, welches den rs48804829 SNP beinhaltet. Die Größe des PCR Produkts betrug 288 Basenpaaren (bp). Die PCR Produkte der verschiedenen Mauslinien DNA-Proben wurde nach einer Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und sequenziert. Dies ist beispielhaft für die *Sh2b3*<sup>tm1Rmp</sup> in (Abb. 3.9) dargestellt. Ebenso sind die aus den Sequenzierungsergebnisse abgeleitete P2X7 Variante (P oder L) der verschiedenen Mauslinien dargestellt. Hieraus geht hervor, dass 7 der 8 untersuchten Mauslinien eine *P2rx7* passenger Mutation und damit die P Variante von P2X7 tragen. Lediglich bei den B6-*Atxn2*<sup>tm1.1Aub</sup> Mäusen konnte die L Variante von P2X7 nachgewiesen werden. Interessanterweise war *Atxn2* mit einem Abstand von ca. 827 Kilobasen das Gen mit der größten Entfernung zu *P2rx7* im Rahmen dieser Untersuchung.



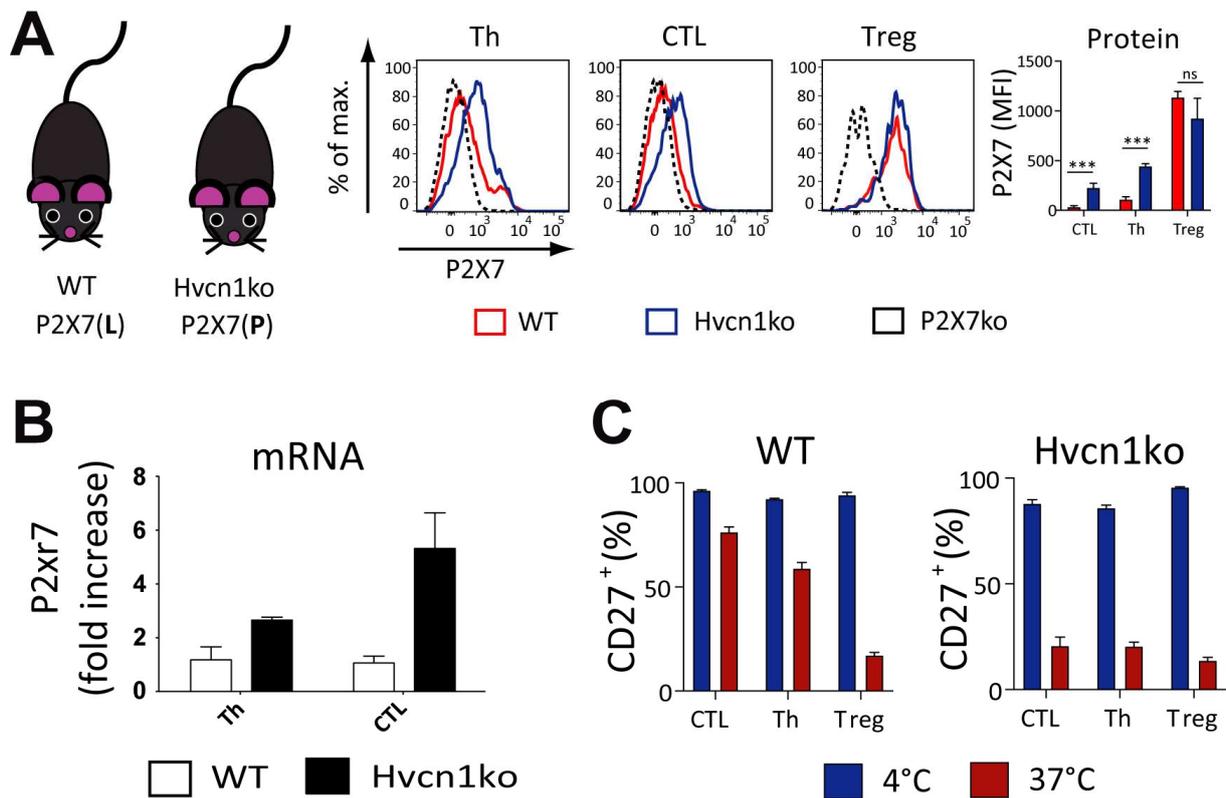
**Abb. 3.9 Nachweis der *P2rx7* passenger Mutation in anderen knockout Mäusen.** Ein 288 bp großes PCR Amplifikat um den rs48804829 SNP wurde aufgereinigt und sequenziert, hier exemplarisch dargestellt an einer Probe der *Sh2b3*<sup>tm1Rmp</sup> Maus. Insgesamt wurden 8 kongene knockout Mauslinien bezüglich ihrer P2X7 Variante (P oder L) untersucht.

### 3.3.2 B6-Hvcn1ko T-Zellen besitzen ein ähnliches P2X7 Expressionsprofil und Rezeptoraktivität, wie die der B6-P2X4ko Mäuse

In 3.3.1 wurde gezeigt, dass *Hvcn1*<sup>Gt(RRN293)Byg</sup> Mäuse ähnlich wie *P2rx4*<sup>tm1Rass</sup> eine *P2rx7* passenger Mutation tragen. Diese Mauslinie wurde am UKE gezüchtet und uns für unsere Untersuchung von Prof. Manuel Friese zur Verfügung gestellt. Ziel war es den Phänotyp, welcher durch die *P2rx7* passenger Mutation in den B6-P2X4ko T-Zellen hervorgerufen wird, in B6-Hvcn1ko zu reproduzieren.

Zunächst wurde eine P2X7 Expressionsanalyse mit T-Zellen aus B6-Hvcn1ko und B6-WT Mäusen durchgeführt. Wie bei den Experimenten mit den B6-P2X4ko Mäusen zuvor, konnte bei den B6-Hvcn1ko Mäusen für Th und CTL eine erhöhte P2X7 Expression im Rahmen einer FACS Untersuchung im Vergleich zu B6-WT T-Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 3.10 A**). Bei den Treg Zellen konnte, wie zuvor bei B6-P2X4ko Mäusen, kein Unterschied in der P2X7 Expression bei B6-Hvcn1ko und B6-WT Mäusen nachgewiesen werden. Die Unterschiede in der P2X7 Expression auf Protein Ebene wurde im nächsten Schritt in *P2rx7* mRNA Untersuchungen bestätigt (**Abb. 3.10 B**). Für die funktionelle Analyse von P2X7 wurde eine CD27 shedding Analyse durchgeführt, ähnlich wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben. Bei diesem Experiment wurde lediglich der Einfluss des bei der Zellpräparation freigesetztem NAD<sup>+</sup> untersucht. Hierfür wurden frisch präparierte T-Zellen (Th, CTL und Treg) entweder auf Eis (4°C) oder im Wasserbad (37°C) für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Expression von CD27 auf der Zelloberfläche gemessen. Die Analyse ergab,

dass alle untersuchten T-Zellpopulationen zum größten Teil (>90%) CD27 auf der Zelloberfläche exprimieren, wenn sie bei 4°C inkubiert werden. Die 37°C Inkubation führte zu einem leichten Verlust von CD27 bei WT CTL (75 % CD27<sup>+</sup>) und Th (55 % CD27<sup>+</sup>). Dieser Verlust von CD27, während der 37°C Inkubation, ist deutlich stärker bei B6-Hvcn1ko CTL (20% CD27<sup>+</sup>) und Th (20% CD27<sup>+</sup>). Die Tregs beider Mauslinien zeigen vergleichbar starkes CD27 shedding (**Abb. 3.10 C**).



**Abb. 3.10 Die *P2rx7* passender Mutation auf T-Zellen in B6-Hvcn1ko Mäusen zeigt eine erhöhte P2X7 Expression sowie eine erhöhte Rezeptoraktivität.**

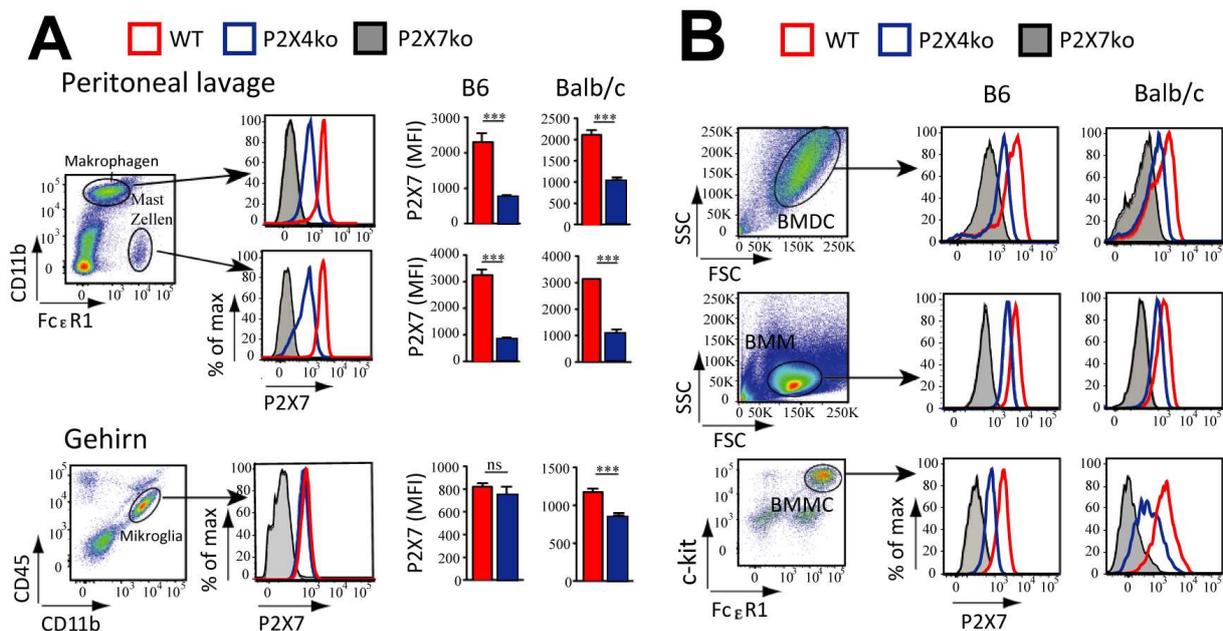
(A) B6-WT und B6-Hvcn1ko Mäuse exprimieren unterschiedliche P2X7 Varianten. Die Expression von P2X7 wurde durchflusszytometrisch untersucht und über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) zwischen B6-WT und B6-Hvcn1ko verglichen. (B) Vergleich der *P2rx7* mRNA Expression in Th und CTL aus B6-WT und B6-Hvcn1ko Mäusen. (C) T-Zellen aus B6-WT und B6-Hvcn1ko Mäusen wurden bei 4°C (blau) und 37°C (rot) inkubiert und die CD27 Expression wurde anschließend auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch analysiert. Für die statistische Auswertung wurden n=3 Mäuse verwendet. Statistik; t-Test p=0,05 (\*); p=0,0001(\*\*\*); NS= Nicht signifikant.

### 3.4 Analyse der *P2rx7* passenger Mutation in Zellen des angeborenen Immunsystems aus P2X4ko Mäusen

#### 3.4.1 Viele Zellen des angeborenen Immunsystems von B6 und Balb/c P2X4ko Mäusen zeigen eine reduziert P2X7 Expression

In Abschnitt 3.2 wurde gezeigt, dass B6-P2X4ko Mäuse eine *P2rx7* passenger Mutation tragen, was zu einer erhöhten *P2rx7* mRNA und P2X7 Protein Expression in zytotoxischen T Zellen (CTL) und helper T Zellen (Th) führt. Neben seiner Rolle im NICD von T-Zellen ist P2X7 vor allem als Aktivator des Inflammasomen Komplex und der Freisetzung von Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in Makrophagen und Mikroglia bekannt. Aufgrund dessen wurden in diesem Abschnitt phänotypische und funktionelle Untersuchungen an Zellen des angeborenen Immunsystems aus P2X4ko Mäusen unternommen. Zunächst wurden Zellen aus dem Peritoneum (Makrophagen und Mastzellen) und dem Gehirn (Mikroglia) untersucht. Peritoneale Makrophagen und Mastzellen ließen sich dabei über die differentielle Expression von CD11b und Fc $\epsilon$ 1 charakterisieren: Makrophagen exprimieren sehr viel CD11b und kein Fc $\epsilon$ 1, Mastzellen hingegen exprimieren kein CD11b aber Fc $\epsilon$ 1. Die P2X7 Expressionsanalyse auf beiden Zelltypen ergab, dass B6-P2X4ko Makrophagen und Mastzellen deutlich weniger P2X7 exprimieren als entsprechende B6-WT Zellen (**Abb. 3.11 A**). Im Gegensatz dazu zeigten B6-P2X4ko und B6-WT Mikroglia aus dem Gehirn keinen Unterschied in ihrer P2X7 Expression. Analog dazu wurden Expressionsanalysen mit Balb/c-P2X4ko und Balb/c-WT Makrophagen, Mastzellen und Mikroglia durchgeführt. Auch hier exprimierten Balb/c-P2X4ko Makrophagen und Mastzellen weniger P2X7 als entsprechende Balb/c WT Zellen. Interessanterweise war die P2X7 Expression auf den Balb/c-P2X4ko Mikroglia ebenfalls signifikant niedriger als bei Balb/c-WT Mikroglia (**Abb. 3.11 A**). Zusätzlich zu den primären Zellen, wurden auch angeborene Immunzellen aus dem Knochenmark ausdifferenziert und analysiert (**Abb. 3.11 B**). So wurden dendritische Zellen (BMDC), Makrophagen (BMM) und Mastzellen (BMMC) auf ihre P2X7 Expression untersucht. Auch hier wurden wieder WT und P2X4ko Zellen aus B6 und aus Balb/c bezüglich ihrer P2X7 Expression verglichen. Im Einklang mit den Ergebnissen der Untersuchung der primären Zellen war auch bei den BMDC, BMM und BMMC aus sowohl B6 als auch Balb/c-P2X4ko Mäusen eine deutlich verringerte P2X7 Expression zu verzeichnen, als bei entsprechenden WT Zellen.

Da die Zellen des angeborenen Immunsystems im Vergleich von B6-P2X4ko und B6-WT, als auch im Vergleich von Balb/c-P2X4ko und Balb/c-WT eine deutlich reduzierte P2X7 Expression in beiden P2X4ko Mäusen zeigte, erscheint es unwahrscheinlich, dass die *P2rx7* Passenger Mutation dafür verantwortlich ist. Somit bleibt die Ursache der niedrigeren P2X7 Expression zu klären.



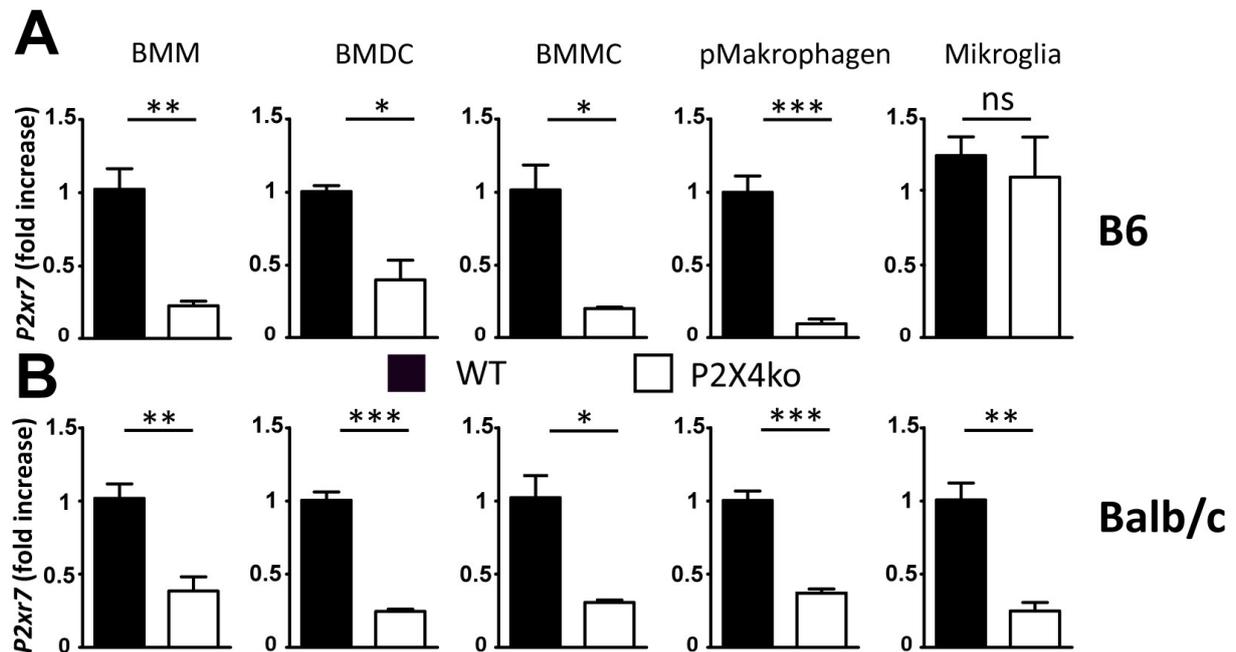
**Abb. 3.11 Zellen des angeborenen Immunsystems aus B6 und Balb/c P2X4ko Mäuse exprimieren weniger P2X7 als entsprechende WT Zellen.**

**(A)** FACS Analyse der P2X7 Expression in peritonealen Makrophagen ( $CD11b^+Fc\epsilon R1^-$ ) und Mastzellen ( $CD11b^+Fc\epsilon R1^+$ ) sowie in Gehirn Mikroglia ( $CD11b^+CD45^{low}$ ). Für die Quantifizierung der P2X7 MFI wurden  $n = 4 - 6$  Mäuse verwendet. **(B)** FACS Analyse der P2X7 Expression auf aus Knochenmark differenzierten dendritische Zellen (BMDC), Makrophagen (BMM) und Mastzellen (BMMC). Statistik: t-Test  $p < 0,001$ (\*\*\*); NS= Nicht signifikant.

### 3.4.2 Die reduzierte P2X7 Expression auf Zellen des angeborenen Immunsystems von P2X4ko ist assoziiert mit einer geringeren *P2rx7* mRNA Expression

Da Zellen des angeborenen Immunsystems von sowohl B6-P2X4ko als auch Balb/c-P2X4ko Mäusen eine niedrigere P2X7 Expression auf Protein Ebene aufwiesen, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob dies auf eine reduzierte *P2rx7* mRNA Expression zurückzuführen ist. Um dies zu überprüfen wurde mRNA aus den Zellen des angeborenen Immunsystems, welche bereits in Abschnitt 3.3.1 verwendet wurden, isoliert und mittels quantitativer PCR untersucht. Dies wurde sowohl für B6-WT und P2X4ko Mäuse (**Abb. 3.12 A**) als auch für Balb/c-WT und P2X4ko Mäuse (**Abb. 3.12 B**) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind kongruent mit denen der P2X7 Expressionsanalyse im FACS: BMM, BMDC, BMMC und peritoneal Makrophagen aus B6-P2X4ko sowie aus Balb/c-P2X4ko Mäusen exprimieren signifikant weniger *P2rx7* mRNA als entsprechende WT Zellen. Ebenso können die Ergebnisse für die Mikroglia bestätigt werden: B6-P2X4ko Mikroglia unterscheiden sich nicht von B6-WT Mikroglia in ihrer *P2rx7* mRNA Expression, Balb/c-P2X4ko Mikroglia zeigen eine signifikant niedrigere *P2rx7* Expression als Balb/c-WT Mikroglia. Die genaue Ursache für die niedrigere *P2rx7* mRNA Expression, wie z.B. ein möglicher Einfluss durch die

Manipulation des benachbarten *P2rx4* Gen Locus im Rahmen der knockout Generierung, bleibt zu klären.



**Abb. 3.12 Zellen des angeborenen Immunsystems aus P2X4ko Mäusen exprimieren weniger *P2rx7* mRNA.**

(A) Quantitative PCR Analyse der *P2rx7* Expression in BMM, BMDC, BMMC, peritonealen Makrophagen und Mikroglia aus B6 Mäusen (n = 4-6). (B) Quantitative PCR Analyse der *P2rx7* Expression in BMM, BMDC, BMMC, peritonealen Makrophagen und Mikroglia aus Balb/c Mäusen (n = 3-4). Statistik; t-Test  $p < 0,05$ (\*);  $p < 0,01$ (\*\*);  $p < 0,001$ (\*\*\*); NS= Nicht signifikant.

### 3.4.3 Zellen des angeborenen Immunsystems aus P2X4ko Mäusen zeigen reduzierte P2X7 abhängige Effektorfunktionen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die P2X7 Expression in vielen Zellen des angeborenen Immunsystems in P2X4ko Mäusen stark reduziert ist, war der nächste logische Schritt zu untersuchen, welche funktionellen Konsequenzen dies hat. So wurden typische P2X7 vermittelte funktionelle Signalwege untersucht. Diese waren für die aus Knochenmark differenzierte Makrophagen (BMM) der ATP Induzierte Einstrom von Kalzium Ionen. Für BMM und Mikroglia wurde zudem die ATP induzierte Bildung einer Membranpore, welche zur Aufnahme von niedermolekularen Fluoreszenzfarbstoffen wie 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) führt, untersucht. Für Mastzellen wurde die ATP/P2X7 vermittelte Degranulation anhand der Externalisierung des Markers CD107a (Lamp1) gemessen.

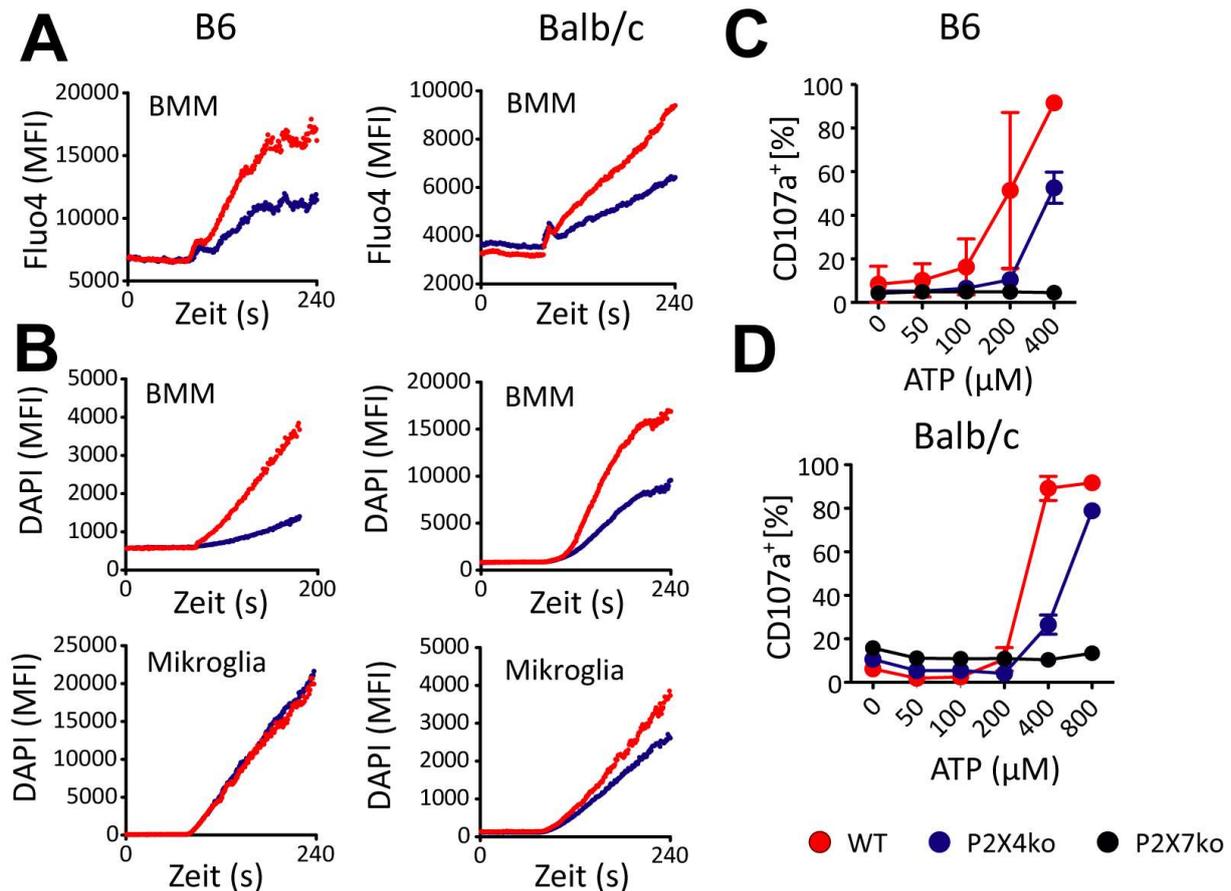
Die Untersuchung des Kalziumeinstroms ergab, dass sowohl B6 als auch Balb/c P2X4ko BMM einen schwächeren Kalzium Einstrom als entsprechende WT BMM zeigten. Dies war an der Erhöhung der Fluoreszenzsignals des Kalzium sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs Fluo4 zu erkennen (**Abb. 3.13 A**). Dabei ist zu erwähnen, dass WT und P2X4ko BMM über eine Markierung mit eFluo Fluoreszenzfarbstoff unterschieden und während der durchflusszytometrischen Messung parallel im

gleichen Reagenzgefäß unter identischen Stimulationsbedingungen gemessen werden konnten.

Ein ähnliches Ergebnis ergab auch der Vergleich von P2X4ko und WT BMM bei der Porenbildung nach ATP Stimulation. Auch hier zeigten P2X4ko BMM aus B6 und Balb/c Mäusen eine deutlich reduzierte Aufnahme des DAPI Farbstoffes (**Abb. 3.13 B**). Der gleiche Versuchsansatz durchgeführt mit Mikroglia ergab eine identische Porenbildung und DAPI Aufnahme bei B6-WT und B6-P2X4ko Mikroglia, Balb/c-P2X4ko Mikroglia zeigten jedoch eine leicht reduzierte DAPI Aufnahme im Vergleich zu Balb/c-WT Mikroglia. Der Versuch bestätigt somit, dass die niedrigere P2X7 Expression in den P2X4ko BMM beider Mauslinien sich funktionell auf die ATP-induzierte Porenbildung auswirkt, zeigt aber andererseits auch, dass B6-WT und B6-P2X4ko Mikroglia mit identischer P2X7 nicht in ihrer ATP vermittelten Porenbildung beeinträchtigt sind.

Abschließend wurden WT und P2X4ko peritoneale Mastzellen aus B6 (**Abb. 3.13 C**) und Balb/c (**Abb. 3.13 D**) hinsichtlich der ATP induzierten Degranulation verglichen. Hierfür wurde eine ATP Dosis Wirkungsanalyse mit Konzentrationen zwischen 50 und 800  $\mu\text{M}$  durchgeführt. In Folge der Degranulation gelangt CD107a an die Mastzelloberfläche und kann somit als Marker für degranulierte Mastzellen in einer durchflusszytometrischen Analyse verwendet werden. Als Negativkontrolle für die ATP Stimulation wurden Mastzellen aus P2X7ko Mäusen verwendet. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen, dass sowohl B6 als auch Balb/c WT Mastzellen bei niedrigeren ATP Konzentration degranulieren, verglichen mit entsprechenden P2X4ko Mastzellen. 50% der B6-WT Mastzellen degranulieren bereits bei 200  $\mu\text{M}$  ATP, wo hingegen B6-P2X4ko erst bei 400  $\mu\text{M}$  ATP eine vergleichbare Degranulationsrate aufweisen. Nahezu alle Balb/c-WT Mastzellen zeigten bei 400  $\mu\text{M}$  ATP die Externalisierung des Degranulationsmarkers CD107a. Im Kontrast dazu zeigten nur ca. 25 % der Balb/c-P2X4ko Mastzellen eine CD107a Externalisierung.

In diesem letzten Abschnitt konnte somit gezeigt werden, dass die verminderte P2X7 Expression in Zellen des angeborenen Immunsystems von P2X4ko Mäusen deutliche Auswirkungen auf P2X7 assoziierte Funktion dieser Immunzellen hat. Dies muss in zukünftigen Studien zur Auswirkung des *P2rx4* knockouts in immunologischen Fragestellungen berücksichtigt werden, insbesondere, da P2X4 und P2X7 mit ATP denselben Liganden haben.



**Abb. 3.13 P2X7 assoziierte Funktionen sind verringert in Zellen des angeborenen Immunsystems von P2X4ko Mäusen.**

(A) Messung des P2X7 vermittelten Kalzium Einstroms in der Echtzeit FACS Analyse. Fluo4-beladene P2X4ko und WT BMM aus B6 und Balb/c Mäusen wurden für 90 Sekunden gemessen (baseline), anschließend wurde 1 mM ATP zu der Probe gegeben und die Messung fortgesetzt bis zu einer maximalen Gesamtmesszeit von 4 min. (B) Messung der P2X7 assoziierten Porenbildung anhand der Aufnahme von DAPI. Die BMM und Mikroglia aus WT und P2X4ko Mäusen (B6 und Balb/c) wurden für 90 s in der Gegenwart von DAPI gemessen (baseline), anschließend wurde 1 mM ATP zu der Probe gegeben und die Messung fortgesetzt bis zu einer maximalen Gesamtmesszeit von 4 min. Die Degranulation von P2X4ko und WT Mastzellen aus B6 (C) und Balb/c (D) wurde in einer ATP Dosis-Wirkungsanalyse untersucht. Die Zellen wurden für 10 min ohne oder mit 50-800 μM ATP bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Externalisierung von CD107a durchflusszytometrisch gemessen. WT (rot), P2X4ko (blau) und P2X7ko Mastzellen wurden parallel untersucht. Für die Analyse wurden n=3 Mäuse verwendet. Statistik; t-Test  $p < 0,01$ (\*\*);  $p < 0,001$ (\*\*\*).

# Ergebnisse Anhang

**Tabelle 3.1** Nachbargene in 2 Mb Umgebung des *P2rx7* Lokus

Gene name	Gene start (bp)	Gene end (bp)	distance to P2rx7 (bp)	Gene description	129-based KO mice
Rasal1	120648812	120679597	-1964314	RAS protein activator like 1 (GAP1 like) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1330842]	n.a.
Dtx1	120680202	120711927	-1931984	deltex 1, E3 ubiquitin ligase [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1352744]	Dtx1tm1.1MzI; Dtx1tm1Crey; Dtx1tm1Mjb
Oas2	120730333	120749853	-1894058	2'-5' oligoadenylate synthetase 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2180852]	Oas2Gt(OST112989)Lex ;
Oas3	120753098	120777661	-1866250	2'-5' oligoadenylate synthetase 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2180850]	n.a.
Oas1e	120786226	120795530	-1848381	2'-5' oligoadenylate synthetase 1E [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2180856]	n.a.
Oas1c	120800194	120812514	-1831397	2'-5' oligoadenylate synthetase 1C [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2149633]	n.a.
Oas1b	120812635	120824163	-1819748	2'-5' oligoadenylate synthetase 1B [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97430]	Oas1btm1.1Brin
Oas1f	120847367	120857986	-1785925	2'-5' oligoadenylate synthetase 1F [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2180855]	Oas1fGt(OST425760)Lex
Oas1h	120861421	120873506	-1770405	2'-5' oligoadenylate synthetase 1H [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2180853]	n.a.
Oas1g	120876142	120887613	-1756298	2'-5' oligoadenylate synthetase 1G [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97429]	n.a.
Oas1a	120896256	120907521	-1736390	2'-5' oligoadenylate synthetase 1A [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2180860]	n.a.
Oas1d	120914536	120921652	-1722259	2'-5' oligoadenylate synthetase 1D [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2140770]	Oas1dtm1Zuk
Rph3a	120940499	121010092	-1633819	rabphilin 3A [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:102788]	Rph3atm1Sud
Ptpn11	121130533	121191397	-1452514	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:99511]	Ptpn11tm1.1Rbns; Ptpn11tm1.1Wbm; Ptpn11tm1Bgn; Ptpn11tm1Rbn; Ptpn11tm1Yan;
Rpl6	121204481	121209241	-1434670	ribosomal protein L6 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:108057]	Rpl6Gt(OST1622)Lex; Rpl6Gt(PST17838)Mfgc
Hectd4	121220219	121368577	-1275334	HECT domain E3 ubiquitin protein ligase 4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3647820]	Hectd4Gt(255G8)Cmhd; Hectd4Gt(BC0299)Wtsi; Hectd4Gt(BGA536)Byg
Trafd1	121371725	121385632	-1258279	TRAF type zinc finger domain containing 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1923551]	Trafd1tm1Ayos
Naa25	121397936	121444378	-1199533	N(alpha)-acetyltransferase 25, NatB auxiliary subunit [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2442563]	Naa25Gt(RRK280)Byg; Naa25Gt(AL0004)Wtsi
Erp29	121428590	121452506	-1191405	endoplasmic reticulum protein 29 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1914647]	Erp29tm1Dfer; Erp29Gt(KST171)Byg; Erp29Gt(G014A01)Wrst
Tmem116	121451893	121524183	-1119728	transmembrane protein 116 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1924712]	Tmem116Gt(OST44984)Lex; Tmem116Gt(PST12765)Mfgc
Adam1b	121500098	121503435	-1140476	a disintegrin and metallopeptidase domain 1b [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2429506]	n.a.
Adam1a	121518576	121545482	-1098429	a disintegrin and metallopeptidase domain 1a [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2429504]	Adam1btm1Tba;
Mapkapk5	121525038	121545905	-1098006	MAP kinase-activated protein kinase 5 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1333110]	Mapkapk5tm1Mgl; Mapkapk5tm1Pqs
Aldh2	121566027	121593824	-1050087	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:99600]	Aldh2Gt(OST7285)Lex; Aldh2Gt(D053A10)Wrst;
Acad12	121596775	121618938	-1024973	acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 12 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2443320]	Acad12Gt(OST300106)Lex
Acad10	121621026	121660514	-983397	acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 10 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1919235]	Acad10Gt(OST448289)Lex
Brp	121660563	121687256	-956655	BRCA1 associated protein [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1919649]	n.a.
Atxn2	121711337	121816493	-827418	ataxin 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1277223]	Atxn2tm1.1Geno ; Atxn2tm1Pft ; Atxn2tm2.1Geno

Sh2b3	121815488	121837646	-806265	SH2B adaptor protein 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:893598]	Sh2b3tm1Paw ; Sh2b3tm1Rmp
Pheta1	121848984	121854632	-789279	PH domain containing endocytic trafficking adaptor 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2442708]	n.a
Cux2	121856366	122050102	-593809	cut-like homeobox 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:107321]	Cux2tm1.1Nieto
Myl2	122100951	122113472	-530439	myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97272]	Myl2tm1(cre)Krc ; Myl2tm1(Hand1)Tana ; Myl2tm1.1Chen ; Myl2tm2.1Chen
Ccdc63	122108040	122140823	-503088	coiled-coil domain containing 63 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3607777]	n.a
Ppp1cc	122158278	122175273	-468638	protein phosphatase 1 catalytic subunit gamma [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:104872]	Ppp1cctm1Lex ; Ppp1cctm1Var
Hvcn1	122206804	122242297	-401614	hydrogen voltage-gated channel 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1921346]	Hvcn1Gt(RRN293)Byg
Tctn1	122237848	122264460	-379451	tectonic family member 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3603820]	n.a
Ptpc7	122284365	122324281	-319630	PTC7 protein phosphatase homolog [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2444593]	n.a
Rad9b	122323223	122354233	-289678	RAD9 checkpoint clamp component B [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2385231]	Rad9btm1Lieb
Vps29	122354369	122364984	-278927	VPS29 retromer complex component [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1928344]	Vps29Gt(OST309649)Lex ; Vps29Gt(OST17630)Lex ; Vps29Gt(OST18210)Lex ; Vps29Gt(OST24044)Lex ; Vps29Gt(OST28280)Lex ; Vps29Gt(OST93118)Lex ; Vps29Gt(OST98823)Lex ; Vps29Gt(OST113533)Lex ; Vps29Gt(OST127837)Lex ; Vps29Gt(OST135740)Lex ; Vps29Gt(OST456377)Lex
Fam216a	122364580	122372364	-271547	family with sequence similarity 216, member A [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1916198]	n.a
Gpn3	122371876	122382902	-261009	GPN-loop GTPase 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1289326]	n.a
Arpc3	122391878	122414184	-229727	actin related protein 2/3 complex, subunit 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1928375]	Arpc3tm1Jtak
Anapc7	122421693	122444912	-198999	anaphase promoting complex subunit 7 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1929711]	n.a
Atp2a2	122453513	122502225	-141686	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:88110]	Atp2a2tm1.1Iemr ; Atp2a2tm1Fwuy ; Atp2a2tm1Ges
Ift81	122550204	122614518	-29393	intraflagellar transport 81 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1098597]	n.a
P2rx7	122643911	122691432	0	<b>purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1339957]</b>	P2rx7tm1Lex ; P2rx7tm1Gab
P2rx4	122707544	122729738	16112	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel 4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1338859]	P2rx4tm1Rass ; P2rx4tm1Dgen
Camkk2	122731170	122779409	39738	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2444812]	Camkk2tm1Kpg ; Camkk2tm1Shyy ; Camkk2tm1Tch ; Camkk2tm2.1Kpg ; Camkk2tm2Kpg
Anapc5	122787459	122821339	96027	anaphase-promoting complex subunit 5 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1929722]	n.a
Rnf34	122850048	122871291	158616	ring finger protein 34 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2153340]	n.a
Kdm2b	122870665	122989823	179233	lysine (K)-specific demethylase 2B [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1354737]	Col1a1tm1(CMV/tetO-Kdm2b)Atz ; Kdm2btm1.1Atz ; Kdm2btm1.1Bes ; Kdm2btm1Nobu
Orai1	123015074	123030456	323642	ORAI calcium release-activated calcium modulator 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1925542]	Orai1tm1.1Ygwa
Morn3	123035769	123047016	344337	MORN repeat containing 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1922140]	n.a
Tmem120b	123068415	123117749	376983	transmembrane protein 120B [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3603158]	n.a

Rhof	123103044	123132692	411612	ras homolog family member F (in filopodia) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1345629]	n.a
Setd1b	123142193	123168629	450761	SET domain containing 1B [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2652820]	Setd1btm1.1Afst ; Setd1btm1Afst
Psm9	123169413	123250131	477981	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 9 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1914401]	n.a
Hpd	123171807	123182727	480375	4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96213]	n.a
Wdr66	123252102	123327484	560670	WD repeat domain 66 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1918495]	n.a
Bcl7a	123343834	123374992	652402	B cell CLL/lymphoma 7A [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1924295]	n.a
Mlxip	123394798	123457932	703366	MLX interacting protein [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2141183]	Mlxiptm1.1Lchan ; Mlxiptm1.2Lchan
Rpl31-ps6	123466509	123466886	775077	ribosomal protein L31, pseudogene 6 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3783190]	n.a
Il31	123480157	123489489	788725	interleukin 31 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1923649]	n.a
Lrrc43	123489305	123508205	797873	leucine rich repeat containing 43 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2685907]	n.a
Diablo	123509765	123524176	818333	diablo, IAP-binding mitochondrial protein [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1913843]	Diablotm1Mak
B3gnt4	123510460	123511882	819028	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2680208]	n.a
Vps33a	123528659	123573038	837227	VPS33A CORVET/HOPS core subunit [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1924823]	n.a
Clip1	123577795	123684618	886363	CAP-GLY domain containing linker protein 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1928401]	Clip1tm1.1Gal ; Clip1tm1Gal
Zcchc8	123698294	123721100	1006862	zinc finger, CCHC domain containing 8 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1917900]	n.a
Rsrc2	123728426	123749414	1036994	arginine/serine-rich coiled-coil 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1913489]	n.a
Kntc1	123749716	123821593	1058284	kinetochore associated 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2673709]	Kntc1Gt(OST40060)Lex
Hcar2	123863570	123865499	1172138	hydroxycarboxylic acid receptor 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1933383]	Hcar2tm1Lex; Hcar2tm1Soff
Hcar1	123876736	123880020	1185304	hydrocarboxylic acid receptor 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2441671]	n.a
Denr	123907175	123928835	1215743	density-regulated protein [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1915434]	DenrGt(CSI770)Byg; DenrGt(OST114)Lex
Ccdc62	123930679	123969895	1239247	coiled-coil domain containing 62 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2684996]	n.a
Hip1r	123973628	124005558	1282196	huntingtin interacting protein 1 related [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1352504]	Hip1rtm1Tsr
Vps37b	124004641	124032270	1313209	vacuolar protein sorting 37B [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1916724]	n.a
Abcb9	124061530	124095798	1370098	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 9 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1861729]	Abcb9Gt(231G11)Cmhd
Ogfod2	124112297	124115483	1420865	2-oxoglutarate and iron-dependent oxygenase domain containing 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1913877]	n.a
Arl6ip4	124116089	124118196	1424657	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1929500]	Arl6ip4Gt(OST31151)Lex
Pitpnm2	124118690	124249760	1427258	phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1336192]	Pitpnm2tm1Tili
Pitpnm2os2	124194907	124200346	1503475	phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 2, opposite strand 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3840147]	n.a
Pitpnm2os1	124229725	124237137	1538293	phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 2, opposite strand 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1923177]	n.a
Mphosph9	124250959	124327972	1559527	M-phase phosphoprotein 9 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2443138]	Mphosph9Gt(OST104880)Lex
Cdk2ap1	124345417	124363082	1653985	CDK2 (cyclin-dependent kinase 2)-associated protein 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1202069]	Cdk2ap1tm1Dtw; Cdk2ap1Gt(D133C05)Wrst; Cdk2ap1Gt(OST35764)Lex
Sbno1	124368702	124426001	1677270	strawberry notch 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2384298]	Sbno1Gt(OST114991)Lex
Kmt5a	124439930	124462308	1748498	lysine methyltransferase 5A [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1915206]	Kmt5atm1.1Dare; Kmt5aGt(RRB075)Byg;

					Kmt5aGt(305D01)Cmhd; Kmt5aGt(D060E05)Wrst; Kmt5aGt(OST1973)Lex
Rilpl2	124463265	124478366	1771833	Rab interacting lysosomal protein-like 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1933112]	Rilpl2Gt(OST96650)Lex; Rilpl2Gt(450F7)Cmhd
Snrnp35	124483134	124491124	1791702	small nuclear ribonucleoprotein 35 (U11/U12) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1923417]	Snrnp35Gt(D178F04)Wrst; Snrnp35Gt(OST56118)Lex
Rilpl1	124493080	124531391	1801648	Rab interacting lysosomal protein-like 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1922945]	Rilpl1Gt(209A4)Cmhd; Rilpl1Gt(OST684)Lex
Tmed2	124540695	124550506	1849263	transmembrane p24 trafficking protein 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1929269]	Tmed2Gt(OST78169)Lex
Ddx55	124552864	124569660	1861432	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 55 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1915098]	Ddx55Gt(CSH561)Byg; Ddx55Gt(OST406009)Lex
Eif2b1	124570213	124579131	1878781	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1 (alpha) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2384802]	Eif2b1Gt(OST132125)Lex
Gtf2h3	124579140	124597680	1887708	general transcription factor IIH, polypeptide 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1277143]	Gtf2h3Gt(D144D12)Wrst; Gtf2h3Gt(RRG412)Byg
Tctn2	124598749	124627738	1907317	tectonic family member 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1915228]	Tctn2tm1.1Reit; Tctn2Gt(OST378011)Lex
Atp6v0a2	124628576	124724455	1937144	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal V0 subunit A2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:104855]	n.a

## 4. Diskussion

In dieser Dissertation wurde der Einfluss einer *P2rx7* passenger Mutation in der 2006 publizierten P2X4ko Maus (*P2rx4<sup>tm1Rass</sup>*) (Sim *et al* 2006) auf Experimente mit Immunzellen untersucht. Passenger Mutationen findet man in genetisch modifizierten Mäusen, in denen die zur Generierung eines knockouts verwendeten embryonale Stammzelle einen anderen genetischen Hintergrund haben als der gewünschte Hintergrund, auf denen die erfolgreich generierten knockout Mäuse dann zurück gekreuzt werden. In dieser Arbeit konnte *P2rx7* als ein solches Beispiel im *P2xr7* Gen von B6-*P2rx4<sup>tm1Rass</sup>* Mäusen finden, welche mit Hilfe von 129/J embryonalen Stammzellen generiert wurden. Durch die unmittelbare Nähe des *P2rx7* Gens zum inaktivierten *P2rx4* Gen in B6-P2X4ko Mäusen, ist es sehr wahrscheinlich, dass das 129/J stämmige *P2xr7* Gen selbst nach 15 Generation Rückkreuzung auf den B6 Hintergrund nicht durch das B6 *P2rx7* Gen ersetzt wird. Die Unterscheidung zwischen 129 und B6 stämmigen *P2rx7* Gen ist anhand eines SNPs (rs48804829) im *P2rx7* Gen möglich. Dieser SNP ist nicht synonym und führt in 129 und B6 Mäusen zum Austausch einer Aminosäure an Position 451. B6 Mäuse besitzen ein Leucin an dieser Stelle, während 129/J Mäuse Träger der Prolinvariante an dieser Stelle sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand von RNA Sequenzierungsdaten aus der öffentlich zugänglichen *immgen.org* Datenbank gezeigt werden, dass Mausstämme, die die P Variante von P2X7 exprimieren eine deutlich höhere P2X7 Expression auf CD4<sup>+</sup> T Zellen aufweisen, als Mausstämme, die die L Variante exprimieren. Auch konnte gezeigt werden, dass der P2X7 Rezeptor auf T Helfer Zellen (Th) und zytotoxischen T-Zellen (CTL) von B6-P2X4ko Mäuse in höheren Mengen exprimiert wird als auf entsprechenden T-Zellen aus B6-WT Mäusen. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit auf die 129 stämmige *P2rx7* passenger Mutation in den P2X4ko Mäusen zurückgeführt werden. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die erhöhte P2X7 Expression auf B6-P2X4ko CTL und Th mit einer höheren Sensitivität gegenüber den P2X7 Liganden ATP und NAD<sup>+</sup> einher ging. Eine entsprechende Untersuchung dieser erhöhten Sensitivität konnte für die T-Zellen mit Hilfe von CD27 shedding gezeigt werden. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass aufgrund der *P2xr7* passenger Mutation die T-Zellen von B6-P2X4ko Mäusen anfälliger gegenüber dem NAD<sup>+</sup> vermittelten Zelltod sind (NICD). Dieser Effekt muss berücksichtigt werden, da NAD<sup>+</sup> bei der Präparation von T Zellen aus Mausorganen wie Milz, Leber und Lymphknoten freigesetzt wird (Rissiek *et al* 2015). Durch die unterschiedliche NAD<sup>+</sup> Sensitivität der B6-WT und B6-P2X4ko T-Zellen und der damit einhergehenden unterschiedlichen Vitalität *in vitro* während Funktionsversuchen, besteht der Verdacht, dass die Unterschiede zwischen B6-WT und B6-P2X4ko T-Zellen allein auf die genetische Deletion von *P2rx4* zurückzuführen sind. Somit kann der erhöhte NICD Effekt von P2X4ko T-Zellen zur falschen Interpretation von Ergebnissen beitragen. Gezeigt werden konnte dies anhand des Vergleichs der Zytokinexpression von B6-WT und B6-P2X4ko in CTL sowie der *in vitro* Migration von B6-WT und B6-P2X4ko in Th. Des Weiteren wurden andere knockout Mäuse auf das Vorhandensein der *P2xr7*

passenger Mutation untersucht.  $P2rx4^{tm1Rass}$  eingeschlossen konnten in 8 von 9 untersuchte kongenen Mauslinien, deren knockout sich in der genetischen Nachbarschaft von  $P2rx7$  befindet, als Träger einer  $P2rx7$  passenger Mutation identifiziert werden. Die grundlegenden Erkenntnisse aus den B6-P2X4ko Mäusen zur Auswirkung der  $P2rx7$  passenger Mutation wurden anhand von B6-Hvcn1Ko Mäuse, welche ebenfalls die  $P2rx7$  passenger Mutation tragen, reproduziert. Zum Abschluss dieser Arbeit wurden P2X7 Expressions- und Funktionsversuche an Zellen des angeborenen Immunsystems vorgenommen. Als Ergebnis sah man eine deutliche Reduktion der P2X7 Expression und der Rezeptorsensitivität bei P2X4ko Mäusen. Dies ließ sich nicht durch die  $P2rx7$  passenger Mutation erklären, da die gleichen Zellpopulationen auf dem Balb/c Hintergrund im Vergleich ebenfalls eine deutliche Reduktion der P2X7 Expression im Balb/c-P2X4ko zeigten. Der Grund für die veränderte P2X7 Expression der Zellen des angeborenen Immunsystems könnte somit im targeting des benachbarten  $P2rx4$  Locus liegen, wodurch möglicherweise die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren erschwert werden oder bestimmte Enhancer Elemente verloren gegangen sind.

Die grundlegenden Erkenntnisse aus dieser Dissertation zeigen einmal mehr, welchen Einfluss passenger Mutationen in kongenen Mäusen haben können und wie dies, wenn unbemerkt, zu falschen Annahmen in der Ergebnisinterpretation führen kann. In der Einleitung wurde bereits ein Beispiel des Einflusses einer passenger Mutation in den  $Casp1ko$  Mäusen aufgeführt, denen fälschlicherweise eine LPS Resistenz zugesprochen wurde (Kayagaki, Warming *et al.* 2011). Der wahre Grund dieser Resistenz wurde im Nachhinein einer passenger Mutation im  $Casp11$  Gen zugewiesen. Das  $Casp11$  Gen in den  $Casp1ko$  Mäusen ist funktional inaktiv, was darauf zurückzuführen ist, dass es noch aus 129/J embryonalen Stammzellen stammt, und 129 Mäuse keine funktionell aktive  $Casp11$  exprimieren. Ähnlich wie in dieser Arbeit für die  $P2rx7$  passenger Mutation gezeigt, konnte die  $Casp11$  passenger Mutation noch in weiteren kongenen Mäusen nachgewiesen werden. So zeigen zum Beispiel  $Panx1^{tm1.1.Vshe}$  Mäuse ebenfalls eine deutlich LPS Resistenz, welche letztlich auf die  $Casp11$  passenger Mutation zurückgeführt werden konnte (Dvoriantchikova, Ivanov *et al.* 2012, vanden Berghe 2015).

Passenger Mutationen sind nach wie vor ein aktuelles Problem, was neben unserer Arbeit zur  $P2rx7$  passenger Mutation (Er-Lukowiak *et al.* 2020) auch durch Arbeiten anderer Wissenschaftler wie beispielsweise Uccellini *et al.* 2020 für die B6-SARM1ko Mäusen gezeigt wurde (Uccellini, Bardina *et al.* 2020). SARM1 wird im Gehirn exprimiert und ist vor allem an der Axondegeneration im Gehirn beteiligt (Osterloh, Yang *et al.* 2012). Das Gen wird auch mit diversen anderen Funktionen in Verbindung gebracht wie z.B dem TLR Signaling, Virusinfektionen, Inflammation Aktivierung, Xaf1 und Chemokinexpression. Die verwendeten B6-SARM1ko Mäuse wurden auf dem 129/J Maushintergrund generiert. Uccellini *et al.* haben diese Mäuse genauer

untersucht und dabei festgestellt, dass viele Gene in der unmittelbaren Umgebung des *Sarm1* Locus noch von den ursprünglichen 129/J embryonalen Stammzellen stammen. Weiterhin wurden einige der Experimente zur Bestimmung der SARM1 Funktion mit *Sarm1ko* Mäusen auf einem reinen B6 Hintergrund wiederholt. Es hat sich gezeigt, dass die Axondegeneration immer noch verringert ist in diesen Mäusen. Betrachtet man die Chemokinproduktion sowie die *Xaf1* Expression, ist kein Unterschied mehr zwischen Wildtyp und diesen SARM1Ko Mäusen zu erkennen. Diese Beispiele verdeutlicht erneut die Problematik einer unbemerkten passanger Mutation und deren Einfluss auf die Ergebnisse von Experimenten. Im Fall von den in dieser Arbeit untersuchten B6-*P2X4ko* Mäusen kommt erschwerend hinzu, dass *P2rx4* und *P2rx7* zur gleichen Rezeptoren Familie gehören und zudem mit ATP den gleichen Liganden haben. Ähnliches lässt sich auch über die *Casp1ko* Mäuse sagen, da Caspase 1 und Caspase 11 ebenfalls zur gleichen Familie gehören. Gerade die Konstellation von direkt benachbarten Genen der gleichen Familie, von denen eines in 129 Mäusen inaktiv ist oder differenziell exprimiert wird, birgt ein großes Gefahrenpotential bezüglich der Missinterpretation von experimentellen Ergebnissen.

Eine weitere wichtige Erkenntnis aus dieser Arbeit war, dass eine erhöhte P2X7 Expression in T-Zellen aufgezeigt werden konnte, welche die P2X7(P) Variante exprimieren, verglichen mit T-Zellen die Träger der P2X7(L) Variante sind. Es erscheint unwahrscheinlich, dass dieser Expressionsunterschied einzig und allein durch den SNP rs48804829 bzw. durch den Austausch von Prolin und Leucin zu erklären ist. Anhand von online Datenbanken (Welcome Sanger Institute SNP database) konnten insgesamt 172 SNPs im *P2rx7* Gen detektiert werden, in denen sich die B6 und die 129/J Mauslinie voneinander unterscheiden. Zusätzlich findet sich bei den 129/J Mäusen eine Introndeletion nahe des Exons 12. Dies hat zur Folge, dass ein Gensegment mit einer Länge von 249 Basenpaaren fehlt. Beides, die Menge an unterschiedlichen SNP Varianten sowie die 249 Basenpaardeletion könnten einen Einfluss auf die Expression von *P2rx7* in den T-Zellen haben.

Nach wie vor wird der P2X7(P) Variante im Allgemeinen eine höhere Sensitivität, verglichen zu P2X7(L), zugeschrieben (de Campos, Marques-da-Silva *et al.* 2012). Frühere Arbeiten haben jedoch bereits gezeigt, dass dies allenfalls auf die Bildung der P2X7 assoziierten Pore und der damit verbundenen Aufnahme von Fluoreszenzfarbstoffen wie DAPI zutrifft (Adriouch 2002, Le Stunff *et al.*, 2004; Sorge *et al.* 2012), nicht aber auf den Einstrom von Kalziumionen. Im Rahmen der Veröffentlichung der Ergebnisse dieser Dissertation, konnte aufgezeigt werden, dass diese erhöhte Aktivität von P2X7(P) sehr stark mit erhöhten P2X7 Expression korreliert. Hierzu wurden HEK-Zellkulturen verwendet, welche die mit P2X7(P) oder P2X7(L) transfiziert wurden. Mit Hilfe von durchflusszytometrischen Messungen, konnte eine P2X7 Aktivitätsmessung durchgeführt werden unter Berücksichtigung der Expressionsstärke. Das Ergebnis zeigt deutlich, dass P2X7(L) und P2X7(P) in den HEK Zellen dieselbe Sensitivität

gegenüber ATP besitzen, wenn das Expressionsniveau von beiden Varianten in der Untersuchung angeglichen wurde (Er-Lukowiak *et al.* 2020).

Das Hauptaugenmerk zur Untersuchung des Einflusses der *P2rx7* passenger Mutation lag in dieser Arbeit auf dem NAD<sup>+</sup> induzierenden Zelltod (NICD). Arbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass dieser Signalweg großen Einfluss auf die Vitalität von frisch präparierten Maus T Zellen haben kann (Scheuplein *et al.* 2009). Bei der Präparation von T-Zellen aus Mausorganen wird NAD<sup>+</sup> freigesetzt, was wiederum von dem T-Zell Ektoenzym ARTC2.2. als Substrat verwendet wird, um verschiedenste Zelloberflächenproteine wie u.a. P2X7 an Argininresten zu ADP-ribosylieren (Seman *et al.* 2003). Diese ADP-Ribosylierung findet auch statt, wenn die Zellen auf Eis präpariert werden. Die Aktivierung von P2X7 durch die ADP-Ribosylierung findet jedoch erst ab Temperaturen oberhalb von 30°C statt (Scheuplein *et al.* 2009). Eine hohe co-Expression von ARTC2.2 und P2X7 kann somit zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber dem präparations assoziiertem NICD führen, wenn entsprechende T-Zellen wieder bei 37°C inkubiert werden, zum Beispiel im Rahmen von funktionalen Assays oder *in vivo* im adoptiven Transfer. In der Literatur finden sich diverse murine T-Zelpopulationen, die eine hohe co-Expression von ARTC2.2 und P2X7 besitzen und somit anfällig für NICD sind. Zu diesen Zellen zählen unter anderem regulatorische T-Zellen (Treg), natürliche Killer T-Zellen (NKT), folikuläre T-Helferzellen (Tfh) oder CD4<sup>+</sup> effektor/memory T-Zellen (Tem) (Georgiev, Ravens *et al.* 2018) (Hubert, Rissiek *et al.* 2010) (Proietti, Cornacchione *et al.* 2014) (Rissiek, Danquah *et al.* 2014) (Stark, Wesselink *et al.* 2018). In dieser Dissertation konnte der differentielle Einfluss des NICD Signalweges auf Th und CTL aus B6-P2X4ko und B6-WT Mäusen gezeigt werden. Dieser ist bei T-Zellen der B6-P2X4ko Maus besonders stark ausgeprägt. Diese Beobachtung lässt sich durch die nachgewiesene *P2rx7* passenger Mutation und der daraus resultierenden P2X7 Expressionsdifferenz erklären. Die Th und CTL von B6-P2X4ko exprimieren deutlich mehr P2X7, weshalb die Sensitivität gegenüber NAD<sup>+</sup> auch deutlich höher ist als in den B6-WT. Problematisch ist diese erhöhte Sensitivität bei Experimenten in denen funktionelle Eigenschaften von B6-P2X4ko und B6-WT T-Zellen verglichen werden sollen. Dies wurde z.B in der Zytokinexpression von CTL Zellen verdeutlicht. Die CTL der B6-P2X4ko Mäuse zeigen eine deutlich reduzierte Zytokinsekretion im Vergleich zu B6-WT CTLs, was man ohne Wissen über die *P2rx7* passenger Mutation und die daraus resultierende hohe Empfindlichkeit der B6-P2X4ko CTLs gegenüber NICD zweifelsohne dem inaktiven P2X4 zuschreiben würde. Durch den *in vivo* Einsatz des ARTC2.2 blockierenden Nanobodies s+16a vor der Zellpräparation unter der damit verbundenen Unterbindung des präparations bedingten NICD konnte jedoch gezeigt werden, dass der Unterschied in der Zytokinexpression auf vermehrten Zelltod der B6-P2X4ko CTLs während der Inkubationsphase zurückzuführen ist. Bei den s+16a behandelten P2X4ko und WT Mäusen war kein Unterschied bei der Zytokinexpression der CTLs auszumachen.

Für Th Zellen wurde ebenfalls ein Assay etabliert, der die NICD Problematik im Vergleich von B6-P2X4ko und B6-WT verdeutlicht. Hierfür wurde die Migration von Th aus B6-WT und B6-P2X4ko verglichen mit dem Ergebnis, dass weniger B6-P2X4ko Th migrieren als B6-WT Th. Die Ursache dieses Ergebnis ist wahrscheinlich die Gleiche wie bei der Zytokinmessung. Dadurch dass die Migration bei 37°C stattfindet und 2 Stunden lang andauert, geht ein großer Anteil der P2X4ko Th Zellen in Apoptose. Durch den Einsatz von s+16a wird das Sterben von WT und P2X4ko Th gleichermaßen verhindert. Dies hat zur Konsequenz, dass man eine vergleichbare Anzahl von WT und P2X4ko Th in der unteren Kammer wiederfindet. Der störende Einfluss des NICD in diesem experimentellen Aufbau wird zudem durch ein weiteres Experiment mit WT und P2X4ko Th auf dem Balb/c Hintergrund bestätigt. Th aus Balb/c-WT und Balb/c-P2X4ko Mäusen weisen zwar die vergleichbar hohe P2X7 Expression auf, haben aber aufgrund des Balb/c Hintergrunds eine deutlich geringere ARTC2.2 (Koch-Nolte, Duffy *et al.* 1999). Dies macht beide weniger empfindlich gegenüber dem präparations bedingten NICD. Auch in diesem Versuch sieht man, dass Balb/c-WT und Balb/c-P2X4ko Th gleichermaßen gut migrieren. Diese Erkenntnis über die P2X4ko Th ist insofern von Bedeutung, da die Arbeit von Ledderose *et al.* einen Zusammenhang zwischen dem P2X4 Rezeptor und dem Migrationspotenzial von Th Zellen beschreibt. Die Ergebnisse von Ledderose *et al.* basieren zum aller größten Teil auf dem Einsatz von P2X4 Antagonisten. Eine Vernachlässigung der in dieser Dissertation beschriebenen *P2rx7* passenger Mutation hätte demnach zu dem gleichen Ergebnis geführt, da weniger P2X4ko Th Zellen in der unteren Kammer gezählt wurden. Somit können unsere Versuche die Ergebnisse von Ledderose *et al.* nicht bestätigen, da bei den s+16a behandelten B6-P2X4ko und B6-WT Th kein Unterschied messbar war.

Der in dieser Arbeit gezeigte Einfluss der *P2rx7* passenger Mutation auf den NICD der B6-P2X4ko T-Zellen verleitet zur Spekulation, dass frühe Arbeiten, in denen B6-P2X4ko T-Zellen untersucht wurden, möglicherweise zu falschen Annahmen gekommen sind, da die Problematik der P2X7 ADP-Ribosylierung während der Zellpräparation nicht berücksichtigt wurde. In der Arbeit von Ventre *et al.* 2017 wurden ebenfalls *P2rx4*<sup>tm1Rass</sup> Mäuse auf dem B6 Hintergrund verwendet, um den Einfluss des P2X4 Rezeptors auf die Expression von Granzym B zu untersuchen. Das Ergebnis dieser Studie zeigte eine Verminderung der Granzym B Expression in B6-P2X4ko CTL verglichen mit den B6-WT Mäuse (Ventre, Rozieres *et al.* 2017). Es wäre interessant zu untersuchen, ob dieses Ergebnis unter Einsatz des ARTC2.2 blockierenden Nanobodies s+16a bestätigt werden kann oder ob es, ähnlich wie in den funktionellen Assays in dieser Arbeit, die Konsequenz aus einem erhöhten NICD der P2X4ko CTL ist.

Neben der  $P2rx4^{tm1Rass}$  Maus wurden in dieser Dissertation acht weitere kongene knockout Mäuse, deren ausgeschaltetes Zielgen in der Nähe des  $P2rx7$  Locus liegt, auf die  $P2rx7$  passenger Mutation untersucht. Wie in Tabelle 1 im Anhang dargestellt gibt es 96 proteinkodierende Gene in einem Abstand von  $\pm 2$  Megabasen um das  $P2rx7$  Gen. Für manche dieser Gene existieren 129 basierte kongene knockout Mäuse. Je näher diese Gene am  $P2rx7$  Locus liegen, desto unwahrscheinlicher ist es, dass das 129 basierte  $P2rx7$  Gen im Rahmen der Rückkreuzung auf den B6 Hintergrund, gegen das B6  $P2rx7$  Gen ausgetauscht wird. Es wurden insgesamt 8 von solchen ko-Mäusen analysiert. Tatsächlich konnte bei 7 von 8 ko-Linien die P2X7(P) Variante nachgewiesen werden, was die Präsenz der  $P2rx7$  passenger Mutation bestätigt. Lediglich die  $Atxn2^{tm1.1Aub}$  Maus zeigte nach Gensequenzierung die SNP Variante korrespondieren zur P2X7(L) Variante. Interessanterweise war das  $Atxn2$  Gen jenes, welches, gemessen an allen untersuchten ko-Linien, am weitesten entfernt vom  $P2rx7$  Gen war (827,4 kb). Nichtsdestotrotz befindet sich  $Atxn2$  sehr nah am  $P2rx7$  Locus und die Wahrscheinlichkeit für den Austausch des 129 basierten  $P2rx7$  Gens gegen das  $P2rx7$  B6 Gen ist selbst nach 20 Generation Rückkreuzung sehr gering. Gegeben, dass 1 cM in etwa 2 Megabasen entspricht, beträgt die Wahrscheinlichkeit eines Austausches bei einer Distanz von 827.000 Basenpaaren, theoretisch, nur 7-8 %. Wir wissen leider nicht, wie viele Generationen  $Atxn2^{tm1.1Aub}$  auf den B6 Hintergrund zurück gekreuzt wurden. Das genetische Material stammte jedoch aus dem Labor von Prof. Auburger, welcher diese Linie im Jahr 2008 erstmals publizierte (Lastres-Becker *et al.* 2008) und es ist davon auszugehen, dass diese Linie kontinuierlich auf den B6 Hintergrund zurück gekreuzt wurde, was zum Austausch der 129  $P2rx7$  Variante führte. Im Umkehrschluss könnte man auch darüber spekulieren ob bei den B6 ko-Mäusen, die Träger der P2X7(P) Variante sind, diese passenger Mutation entfernt werden kann, wenn die Anzahl der Rückkreuzungen erhöht wird. Zumindest bei den Zielgenen, die nicht in unmittelbarer Nähe von P2X7 sind, könnte eine Erhöhung der Rückkreuzzyklen dafür sorgen, dass die 129 P2X7 Variante gegen die B6 P2X7 Variante ausgetauscht wird. Abschließend ist noch darauf hinzuweisen, dass gerade Mausstämme, welche schon seit vielen Jahren in der Forschung von verschiedenen Laboren auf der ganzen Welt verwendet werden, sich sowohl über die Zeit gesehen (im Kontext kontinuierlicher Rückkreuzung) als auch in verschiedenen Laboren (unterschiedliche Rückkreuzungsstrategien) unterscheiden können. Dies kann theoretisch dazu führen, dass Mäuse derselben Linie einen bestimmten, passenger Mutation assoziierten, Phänotyp über die Zeit verlieren oder dass Mäuse derselben Linie einen, passenger Mutation assoziierten, Phänotyp in einem Labor aufweisen welcher in einem anderen Labor nicht detektierbar ist. Aufgrund dessen ist es wichtig, sich genau über den genetischen Hintergrund einer neu importierten Mauslinie zu informieren und auf mögliche passenger Mutationen hin zu untersuchen.

Eine weitere von uns untersuchte Mauslinie war die *Orai1*<sup>tm1.1Ygwa</sup> Maus. Auch in dieser Maus konnte die *P2rx7* passenger Mutation nachgewiesen werden. Auch *Orai1* ist ein nahes Nachbargen von *P2rx7* und wichtig im Kontext der T-Zell Aktivierung (Nohara, Stanwood *et al.* 2015). Es existieren für *Orai1* verschiedene knockout Mäuse, wobei einige davon einen reinen B6 Hintergrund und andere einen 129/J assoziierten Hintergrund haben. Bei den *Orai1*ko Mäusen mit dem B6 Hintergrund (*Orai1*<sup>tm1Rao</sup>; *Orai1*<sup>tm1Fesk</sup>), wurden Studien veröffentlicht in denen gezeigt werden konnte, dass T-Zellen aus *Orai1*ko Mäuse zu einer geringeren Zytokinausschüttung neigen als B6 WT T-Zellen (Kim, Srikanth *et al.* 2014) (McCarl, Khalil *et al.* 2010). Dadurch dass sowohl der Wildtyp als auch die *Orai1*ko Maus in diesem Beispiel denselben Hintergrund besitzen, wirken die Daten dieser Studie authentisch. Demnach kann eine direkte Verbindung zwischen dem *Orai1* Kanal und der T-Zellfunktion verknüpft werden. Gleichzeitig wurde eine Studie gefunden, in der *Orai1*ko Mäuse verwendet wurden die einen 129/J Hintergrund besitzen (*Orai1*<sup>Gt(XL922)Byg</sup>). Bei dieser Arbeit wurde das Potenzial des Abtötens peptidbeladenen EL-4 Tumorzellen durch CTLs untersucht (Kim, Bae *et al.* 2017). Ein Ergebnis dieser Arbeit war, dass CTL aus *Orai1*ko Mäusen die EL4 Zellen schlechter abtöten konnten als die B6 WT Kontrolle. Es wurde in einer anderen Studie ebenfalls die Zytokinexpression dieser *Orai1*ko Mäuse untersucht mit dem Ergebnis, dass die ko-Mäuse weniger IL-2 und IFN- $\gamma$  produzieren als die Wildtypen (Vig, DeHaven *et al.* 2008). Anders als bei den *Orai1*ko Mäusen mit reinen B6 Hintergrund, sollten die Daten dieser Experimente mit Bedacht betrachtet werden. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass die *Orai1*<sup>Gt(XL922)Byg</sup> Mäuse Träger der *P2rx7* passenger Mutation sind, weshalb die Ergebnisse dieser Studien unter Einsatz des s+16a Nanobodies überprüft werden sollten.

Im letzten Teil dieser Dissertation wurden die Zellen des angeborenen Immunsystems aus *P2rx4*<sup>tm1Rass</sup> Mäusen auf ihrer P2X7 Expression und Rezeptorfunktion untersucht. Da die passenger Mutation auch in diesen Zellen vorhanden ist und in der Einleitung bereits die wichtige Rolle von P2X7 in der Inflammasomen Bildung erklärt wurde, sollte geschaut werden ob die *P2rx7* passenger Mutation einen ähnlichen Einfluss hat wie auf T-Zellen. Überraschenderweise ergaben die Untersuchungen jedoch, dass die P2X7 Expression in den meisten Zellen des angeborenen Immunsystems von B6-P2X4ko Mäusen deutlich reduziert war. Interessanterweise war diese Reduktion auch im Vergleich von Balb/c-P2X4ko und Balb/c-WT sichtbar. Somit erscheint es höchst unwahrscheinlich, dass dieser Unterschied in der P2X7 Expression durch die *P2rx7* passenger Mutation ausgelöst wurde. Der Expressionsunterschied in P2X4ko und WT wirkt sich auch auf die P2X7 Aktivierbarkeit aus, als dass beispielsweise P2X4ko Makrophagen einen schwächeren Kalzium Einstrom nach ATP Stimulation zeigen, verglichen mit den WT Makrophagen.

In früheren Arbeiten wurden bereits ähnliche Beobachtungen mit  $P2rx4^{tm1Rass}$  Mäusen veröffentlicht. So zeigten aus Knochenmark generierten dendritischen Zellen der B6-P2X4ko Maus eine geringere *P2rx7* mRNA Expression (Zech, Wiesler *et al.* 2016). Auch hinsichtlich der Sensitivität gegenüber ATP konnte in einer Arbeit aus 2015 gezeigt werden, dass Makrophagen aus der B6-P2X4ko Maus eine schwächere Porenbildung nach ATP Stimulierung aufweisen, verglichen mit den Wildtypen (Perez-Flores, Levesque *et al.* 2015). Ein weiteres Ergebnis dieser Dissertation wurde bereits vor mehr als einer Dekade beschrieben. Genau wie bei wie bei Abbildung 3.11 dargestellt, wurde bei dieser Arbeit gezeigt, dass Mikroglia der B6-P2X4ko und B6-WT Mäuse das gleiche P2X7 Expressionslevel besitzen (Ulmann and Rassendren 2008). Die Gründe weshalb bei den meisten Zellen des angeborenen Immunsystems der B6-P2X4ko eine geringere P2X7 Expression vorliegt, konnten in dieser Dissertation nicht geklärt werden. Ebenso bleibt unklar, warum manche Zellpopulation wie z.B. peritoneale Mastzellen sehr starke Unterschiede in der P2X7 Expression in P2X4ko und WT Mäusen aufweisen, wohingegen andere Populationen wie Mikroglia sich in ihrer P2X7 Expression in WT und P2X4ko Mäusen nicht unterscheiden.

Eine mögliche Erklärung für die reduzierte P2X7 Expression könnte in der genetischen Manipulation des *P2rx4* Locus zur Herbeiführung des knockouts liegen. Durch die Insertion der Neomycin Kasette in den *P2rx4* Locus könnte es zur Störung der Transkription, der Bindung von Transkriptionsfaktoren oder der allgemeinen Zugänglichkeit des Locus kommen. Tatsächlich finden sich in der Literatur Veröffentlichungen, die dieses Problem beschreiben und ausführen. In einem Beispiel wurden Kongene Mäuse gezüchtet, in denen das Granzym B kodierende Gen *Gzmb* sowie das Beta-Globulin kodierende Gen *B2m* deletiert wurde. Genau wie bei den  $P2rx4^{tm1Rass}$  Mäusen, wurden diese ko-Mäuse mithilfe einer Neomycin Kasette als Selektionsmarker gezüchtet (Pham, MacIvor *et al.* 1996). Es konnte bei dieser Arbeit gezeigt werden, dass Gene in der näheren Umgebung beider Loci geringer exprimiert werden. Gene in größerer Entfernung der knockout Loci waren hingegen nicht in ihrer Expression eingeschränkt. Ein ähnliches Beispiel findet sich in einer anderen Arbeit, wo die Neomycin Kasette in das *Hoxd10* Gen inseriert wurde und so die Expression des Nachbargens *Hoxd9* beeinflusst (Rijli, Dolle *et al.* 1994). Eine weitere Forschergruppe hat mit ihrer Arbeit im Jahr 2005 letztendlich zeigen können, dass die negative Beeinflussung der Expression von Genen nahe der ko Region verhindert werden kann, wenn die Mäuse auf andere Art und Weise gezüchtet werden (Revell, Grossman *et al.* 2005). Diese Arbeit beschäftigte sich ebenfalls mit dem *Gzmb* Gen. Es wurden ko Mäuse dieses Gens untersucht und verglichen mit dem Ergebnis, dass Granzym B knockout Mäuse, die mit Hilfe der Neomycin Kasette gezüchtet wurden, eine Reduzierung der Expression der Nachbargene Granzym C und Granzym F aufweisen. Parallel wurden Granzym B ko Mäuse untersucht, deren knockout mit Hilfe des loxP/Cre Systems erzeugt wurden, mit dem Ergebnis, dass die Expression der Nachbargene unbeeinflusst geblieben ist. In diesem Zusammenhang wäre ein Vergleich von  $P2rx4^{tm1Rass}$  mit anderen P2X4ko Mauslinien interessant. So zeigte eine

Studie mit der  $P2x4^{tm1Ando}$  Mauslinie im Gegensatz zu den in dieser Arbeit untersuchten  $P2rx4^{tm1Rass}$  Mäusen keinen Unterschied in der  $P2rx7$  mRNA Expression aus Knochenmark gezüchteten Mastzellen (BMMC) im WT und im P2X4ko (Yamamoto, Sokabe *et al.* 2006). Interessanterweise wurde für die Generierung der  $P2x4^{tm1Ando}$  Linie eine mit LoxP sites flankierte Neomycin Kasette verwendet, die aber nicht mehr in der finalen P2X4ko Maus existiert, da sie über eine Cre-Rekombinase entfernt wurde (Yamamoto 2006). Dies bietet eine mögliche Erklärung für die unbeeinträchtigte  $P2rx7$  mRNA Expression.

Abschließend ist zu sagen, dass es beim Einsatz von kongenen Mäusen in der biomedizinischen Forschung immer sinnvoll ist, die genetische Nachbarschaft des inaktivierten Gens genauer auf mögliche passenger Mutationen hin zu untersuchen. Am Beispiel der  $P2rx4^{tm1Rass}$  Maus konnte in dieser Arbeit verdeutlicht werden, welchen massiven Einfluss die  $P2rx7$  passenger Mutation haben kann und zu welchen Fehlinterpretationen sie führen kann, wenn man sich ihrer nicht bewusst ist. Da in  $P2rx4^{tm1Rass}$  die Untersuchung der Auswirkungen der  $P2rx7$  passenger Mutation in Zellen des angeborenen Immunsystems aufgrund der per se niedrigeren P2X7 Expression nicht möglich war, erscheint es logisch, einen möglichen Einfluss in anderen Mauslinien, die als  $P2rx7$  passenger Mutationsträger identifiziert wurden, zu untersuchen. Hierfür könnte zum Beispiel wieder die schon für die T-Zell Analysen verwendete B6-Hvcn1ko Linie verwendet werden. Es bleibt abschließend auch noch zu klären, ob in die  $P2rx7$  passenger Mutation neben den T-Zellen auch andere, z.B. nicht-immun Zellpopulationen, welche ebenfalls P2X7 exprimieren, potenziell beeinflusst. So erscheint die Untersuchung von z.B. Astrozyten, Neuronen oder Zellen des Fettgewebes als nächster logischer Schritt auf diesem Weg.

## 5. Zusammenfassung

Passenger Mutation treten in kongenen KO Mäusen auf, da DNA Bereiche rund um den inaktivierten Locus im Rahmen des backcrossings nie vollständig entfernt werden. In kongenen KO Mäusen wurden früher meist embryonale Stammzellen der 129er Mauslinie verwendet, anschließende wurden die KO Mäuse für gewöhnlich auf den B6 Hintergrund zurückgekreuzt. Befinden sich Gene, die unterschiedlich stark in 129 und B6 Mäusen exprimiert werden, in der Nähe des inaktivierten Locus, so ist es (1) unwahrscheinlich, dass sie im backcrossing ausgetauscht werden und (2) können sie als sogenannte passenger Mutationen zu einem zusätzlichen, KO unabhängigen, Phänotyp beitragen. Ein solcher Fall wurde im Rahmen dieser Dissertation für das *P2rx7* Gen in der P2X4ko Maus aufgedeckt. Es konnte gezeigt werden, dass Mausstämme mit der P2X7 (451P) Variante mehr P2X7 auf ihren T-Zellen exprimieren als Mausstämme mit der P2X7 (451L) Variante. Dies hat zur Folge, dass T-Zellen der 129 Maus (451P) mehr P2X7 exprimieren, als T-Zellen der B6 Maus (451L). Beim Vergleich von B6-WT und B6-P2X4ko T-Zellen fiel ebenfalls eine unterschiedliche P2X7 Expression auf, was Anlass zur Annahme gab, dass B6-P2X4ko Mäuse eine *P2rx7* passenger Mutation tragen. Dies wurde durch Sequenzierung letztlich bestätigt. Die *P2rx7* passenger Mutation hat für die T-Zellen der B6-P2X4ko Maus die Konsequenz, dass diese empfindlicher auf bei der Zellpräparation freigesetztes NAD<sup>+</sup> reagieren, was insbesondere bei T-Zellen mit hoher ARTC2.2/P2X7 Expression zum Zelltod führt, sobald diese wieder bei 37°C inkubiert werden. Aufgrund dessen erscheinen P2X4ko T-Zellen in *in vitro* Analysen weniger potent bezüglich Zytokinproduktion und Zellmigration. Wird der Einfluss von bei der Zellpräparation freigesetztem NAD<sup>+</sup> jedoch neutralisiert, so sind WT und P2X4ko T-Zellen gleichermaßen potent. Somit konnte gezeigt werden, welchen Einfluss eine *P2rx7* passenger Mutation haben kann und zu welchen Fehlinterpretationen dies führen kann. Zusätzlich zu den P2X4ko Mäusen konnte die *P2rx7* passenger Mutation noch in 7 weiteren KO Mauslinien nachgewiesen werden.

Neben T Zellen wurden in den P2X4ko Mäusen auch Zellen des angeborenen Immunsystems auf den Einfluss der *P2rx7* passenger Mutation hin untersucht. Hier zeigte sich jedoch, dass weniger der 129er Ursprung des *P2rx7* Gens als mehr die Inaktivierung des *P2rx4* Nachbargens zur einer verminderten P2X7 Expression auf z.B. Makrophagen und Mastzellen führt, was sich auch in einer verminderten Sensitivität gegenüber ATP widerspiegelt.

Abschließend ist somit zu sagen, dass passenger Mutationen, die unbemerkt bleiben, eine Gefahr darstellen und potenziell zu Verfälschung von Forschungsergebnissen führen können.

## Summary

Passenger Mutations are a phenomenon occurring in congenic knockout mice, since DNA regions flanking the targeted gene are unlikely to be replaced during backcrossing. Many congenic knockout strains were developed using 129 embryonic stem cells and then backcrossed onto the B6 background. If genes that are differentially expressed in 129 and B6 mice are located close to the targeted gene, it is (1) unlikely that they will be replaced by a B6 gene upon backcrossing and (2) they can persist as so called passenger mutations introducing a knockout independent phenotype. Such a case has been identified in this dissertation for the *P2rx7* gene in the P2X4ko mouse strain. It could be demonstrated that mouse strains expressing the P2X7 (451P) variant express much higher levels of P2X7 compared to strain expressing the P2X7 (451L) variant. As consequence, T-cells from 129 mice express higher P2X7 level than T-cells from B6 mice. When comparing P2X7 expression on B6-WT and B6-P2X4ko mice it was noticed that both show different P2X7 expression level, raising the concern that B6-P2X4ko mice might carry a *P2rx7* passenger Mutation. This concern was verified by DNA sequencing. The *P2rx7* passenger Mutation makes P2X4ko T-cells much more vulnerable towards NAD<sup>+</sup> released during cell preparation. Latter highly affects the vitality of ARTC2.2/P2X7 co-expressing T-cell populations, as it triggers cell death by P2X7 ADP-ribosylation once cells are brought back to 37°C. Because of the *P2rx7* passenger mutation, P2X4ko T-cells appear less potent in terms of cytokine production and cell migration. If the effect of NAD<sup>+</sup> released during cell preparation is neutralized, this discrepancy between WT and P2X4ko T-cells vanishes. Beyond P2X4ko, a *P2rx7* passenger mutation was identified in 7 other congenic knockout mouse strains.

Additionally to T-cells, cells of the innate immune system were analyzed towards a potential impact of a *P2rx7* passenger mutation. Unexpectedly, many P2X4ko innate cell populations such as macrophages and mast cells showed a much lower P2X7 expression compared to corresponding WT cells. This, however, was not linked to the *P2rx7* passenger mutation, but potentially a consequence of targeting the *P2rx4* neighboring gene. Consequently, P2X4ko macrophages and mast cells were less sensitive towards ATP stimulation.

In summary, the detrimental impact of passenger mutations could be demonstrated in this thesis on the example *P2rx7* in P2X4ko mice. If passenger mutations remain unnoticed, they constitute a potential threat since they can lead to misinterpretation of experimental data.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

ACK Puffer	→ Ammonium-Chlorid-Kalium Puffer
ADP	→ Adenosindiphosphat
APC	→ „antigen presenting cells“
ATP	→ Adenosintriphosphat
ARTC2	→ ADP-Ribosyltransferase2
BMDC	→ „bone marrow dendritic cells“
BMM	→ „bone marrow macrophages“
BMMC	→ „bone marrow mast cells“
BSA	→ „bovine serum albumin“
cDNA	→ „complementary desoxy ribonucleotide acid“
CDR	→ „complementary determining regions“
CM	→ Centimorgan
CTL	→ „cytotoxic T-Lymphocytes“
DAPI	→ 4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	→ „desoxyribonucleotide acid“
dNTPs	→ „desoxiribosenukleosidtriphosphate“
EAE	→ „experimental autoimmune encephalomyelitis“
EDTA	→ Ethylendiamintetraacetat
ES	→ Embryonale Stammzellen
FACS	→ „fluorescence activated cell sorting“
FCS	→ „fetal calf serum“
GM-CSF	→ „granulocyte-Macrophage colony stimulating factor“
KO	→ „knockout“
LN	→ „Lymph nodes“
M-CSF	→ „macrophage colony stimulating factor“
mRNA	→ „messenger ribonucleotide acid“
MHC	→ „major histocompatibility complex“
MOG	→ Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
NAD <sup>+</sup>	→ Nikotinamidadenindinukleotid
P2rx7	→ P2X purinoceptor 7
P2rx4	→ P2X purinoceptor 4
PBS	→ „phosphate buffered saline“
PCR	→ „polymerase chain reaction“
PI	→ Propidiumiodid
qPCR	→ „quantitative polymerase chain reaction“
SDF-1 $\alpha$	→ „stromal cell-derived factor 1“
SNP	→ „single nucleotide polymorphism“
Th	→ T-Helferzellen
Treg	→ Regulatorische T-Zellen
TZR	→ T-Zellrezeptor
WT	→ Wildtyp

## 7. Literaturverzeichnis

Adriouch, S., et al. (2001). "Rapid induction of naive T cell apoptosis by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide: requirement for mono(ADP-ribosyl)transferase 2 and a downstream effector." J Immunol **167**(1): 196-203.

Adriouch, S., et al. (2002). "Cutting edge: a natural P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor". J Immunol. 15;**169**(8):4108-12.

Agulnik, S. I., et al. (1995). "Conservation of the T-box gene family from *Mus musculus* to *Caenorhabditis elegans*." Genomics **25**(1): 214-219.

Albers, A. E., et al. (2009). "Spontaneous apoptosis of tumor-specific tetramer+ CD8+ T lymphocytes in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer." Head Neck **31**(6): 773-781.

Andersson, KB. et al. (2009). "Mice carrying a conditional *Serca2*(flox) allele for the generation of Ca(2+) handling-deficient mouse models". Cell Calcium. (3):219-25.

Banati, R. B. et al. (1993). "Cytotoxicity of microglia". Glia **7**. (1). 111-118.

Barbera-Cremades, M., et al. (2012). "P2X7 receptor-stimulation causes fever via PGE2 and IL-1beta release." FASEB J **26**(7): 2951-2962.

Barrett, M. O., et al. (2013). "A selective high-affinity antagonist of the P2Y14 receptor inhibits UDP-glucose-stimulated chemotaxis of human neutrophils." Mol Pharmacol **84**(1): 41-49.

Benzaquen, J., et al. (2019). "Alternative splicing of P2RX7 pre-messenger RNA in health and diseases: Myth or reality?" Biomed J **42**(3): 141-154.

Bianco, F., et al. (2006). "A role for P2X7 in microglial proliferation." J Neurochem **99**(3): 745-758.

BMJ 2007;335:740

Bogdanove, A. J. and D. F. Voytas (2011). "TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting." Science **333**(6051): 1843-1846.

Bortell, R., et al. (1999). "The RT6 (Art2) family of ADP-ribosyltransferases in rat and mouse". Mol. Cell. Biochem. **193**:61.

Carbery, I. D., et al. (2010). "Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases." Genetics **186**(2): 451-459.

- Cekic, C. and J. Linden (2016). "Purinergic regulation of the immune system." Nat Rev Immunol **16**(3): 177-192.
- Choi, D. et al. (2017). "Laminar flow downregulates Notch activity to promote lymphatic sprouting". J Clin Invest. **127**(4):1225-1240.
- Coddou, C., et al. (2011). "Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels." Pharmacol Rev **63**(3): 641-683.
- Cong, L., et al. (2013). "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems." Science **339**(6121): 819-823.
- Coulombe, P., et al. (2013). "A spontaneous Cdt1 mutation in 129 mouse strains reveals a regulatory domain restraining replication licensing." Nature Communications **4**.
- Cubelos, B. et al. (2008). "Cux-2 controls the proliferation of neuronal intermediate precursors of the cortical subventricular zone". Cereb Cortex. **(8)**:1758-70.
- Davies LC et al. (2014). "Tissue-resident macrophages". Nat Immunol. **10**:986-95.
- de Campos, NE. (2012). "Characterizing the presence and sensitivity of the P2X7 receptor in different compartments of the gut". J Innate Immun. **(5-6)**:529-41.
- de la Rosa, M., et al. (2004). "Interleukin-2 is essential for CD4(+)CD25(+) regulatory T cell function." European Journal of Immunology **34**(9): 2480-2488.
- Di Virgilio, F. et al. (2001). "Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells". Blood. **97**:587–600.
- Doudna, J. A. and E. Charpentier (2014). "Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9." Science **346**(6213): 1258096.
- Dunkelberger, J. R. and W. C. Song (2010). "Complement and its role in innate and adaptive immune responses." Cell Res **20**(1): 34-50.
- Dvorianchikova, G., et al. (2012). Genetic ablation of Pannexin1 protects retinal neurons from ischemic injury. PLoS One **7**, e31991.
- Er-Lukowiak, M., et al. (2020). "A P2rx7 passenger mutation affects the vitality and function of T cells in congenic mice." Science **23**: 101870..
- Ferrari, D., et al. (1997). "Extracellular ATP triggers IL-1b release by activating the purinergic P2X receptor of human macrophages". J. Immunol. **159**: 1451–1458.
- Fontenot JD, et al. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells". Nat Immunol. **4**: 330-336.

- Fredholm BB. (2007). "Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair". Cell Death Differ.; **14**:1315–1323.
- Fukuda, T. et al. 2011. "Fbxl10/Kdm2b deficiency accelerates neural progenitor cell death and leads to exencephaly". Mol Cell Neurosci. **46**(3):614-24.
- Garbers, C., et al. (2011). "Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding." J Biol Chem **286**(17): 14804-14811.
- Gerlai, R. (1996). "Gene-targeting studies of mammalian behavior: Is it the mutation or the background genotype?" Trends in Neurosciences **19**(5): 177-181.
- Georgiev, H. et al., (2018). "Blocking the ART2.2/P2X7-system is essential to avoid a detrimental bias in functional CD4 T cell studies". Eur. J. Immunol. **48**, 1078–1081.
- Ginhoux, F., et al. (2010). "Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages." Science **330**(6005): 841-845.
- Gondek, D. C., et al. (2005). "Cutting edge: Contact-mediated suppression by CD4(+)-CD25(+) regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism." Journal of Immunology **174**(4): 1783-1786.
- Grant, S. G., et al. (1992). "Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice." Science **258**(5090): 1903-1910.
- Grassi F. (2020). "The P2X7 Receptor as Regulator of T Cell Development and Function." Front Immunol. 11:1179.
- Han, G. Z. (2019). "Origin and evolution of the plant immune system." New Phytol **222**(1): 70-83.
- Hasty, P., et al. (1992). "The role and fate of DNA ends for homologous recombination in embryonic stem cells." Mol Cell Biol **12**(6): 2464-2474.
- Hristova, M., et al. (2010). "Activation and deactivation of periventricular white matter phagocytes during postnatal mouse development." Glia **58**(1): 11-28.
- Hubert, S., et al. (2010). "Extracellular NAD<sup>+</sup> shapes the Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway." J. Exp. Med. **207**, 2561–2568.
- Hulett, HR. et al. (1969). Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. Science. **166**(3906):747-9.
- Janeway, C. A, et al. (2002). "Immunologie". **5.** Auflage. Spektrum Akademischer Verlag.

- Kayagaki, N., et al. (2011). "Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11." Nature **479**(7371): 117-121.
- Kenneth, N. S., et al. (2012). "An inactivating caspase 11 passenger mutation originating from the 129 murine strain in mice targeted for c-IAP1." Biochemical Journal **443**: 355-359.
- Kido, Y., et al. (2014). "Regulation of activity of P2X7 receptor by its splice variants in cultured mouse astrocytes." Glia **62**(3): 440-451.
- Kim, K.-D. et al. (2014). "Calcium signaling via Orai1 is essential for induction of the nuclear orphan receptor pathway to drive Th17 differentiation". J. Immunol. **192**, 110–122.
- Kim, K.-D. et al. (2017). "Targeted calcium influx boosts cytotoxic T lymphocyte function in the tumour microenvironment." Nat. Commun. **8**, 15365.
- Koch-Nolte, F., 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., et al. (2007). "Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 in vivo." FASEB J **21**(13): 3490-3498.
- Krebs, C., et al. (2005). "CD38 controls ADP-ribosyltransferase-2-catalyzed ADP-ribosylation of T cell surface proteins." J Immunol **174**(6): 3298-3305.
- Lastres-Becker, I. et al. (2008). "Insulin receptor and lipid metabolism pathology in ataxin-2 knock-out mice." Hum Mol Genet. **17**(10):1465-81.
- Le Stunff, H. et al. (2004). "The Pro-451 to Leu polymorphism within the C-terminal tail of P2X7 receptor impairs cell death but not phospholipase D activation in murine thymocytes". J Biol Chem. **279**(17): 16918-26.
- Ledderose, C., et al. (2018). "Purinergic P2X4 receptors and mitochondrial ATP production regulate T cell migration." J Clin Invest **128**(8): 3583-3594.
- Lenertz, L. Y., et al. (2009). "Cell signaling via the P2X(7) nucleotide receptor: linkage to ROS production, gene transcription, and receptor trafficking." Purinergic Signal **5**(2): 175-187.
- Linden J. 2005. "Adenosine in tissue protection and tissue regeneration". Mol Pharmacol. **67**:1385–1387.
- Lusis, A. J., et al. (2007). "The problem of passenger genes in transgenic mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(10): 2100-2103.

- Mansour, S.L., et al. (1988). "Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes." Nature **336**, 348–352.
- McCarl, C.-A. et al. (2010). "Store-Operated Ca<sup>2+</sup> entry through ORAI1 is critical for T cell-mediated autoimmunity and allograft rejection." J. Immunol. **185**, 5845–5858.
- McDonald, J. P., et al. (2003). "129-derived strains of mice are deficient in DNA polymerase iota and have normal immunoglobulin hypermutation." J Exp Med **198**(4): 635-643.
- McVicar, D. W., et al. (2002). "Aberrant DAP12 signaling in the 129 strain of mice: implications for the analysis of gene-targeted mice." J Immunol **169**(4): 1721-1728.
- Moon, H. et al. (2006). "P2X7 receptor-dependent ATP-induced shedding of CD27 in mouse lymphocytes." Immunol Lett; **102**(1): 98-105.
- Nagata, S. (1996). "Fas-induced apoptosis, and diseases caused by its abnormality." Genes Cells **1**(10): 873-879.
- Nandi, A. K., et al. (1988). "Regulated expression of genes inserted at the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(11): 3845-3849.
- Nohara, L.L. et al. (2015). "Tweeters, woofers and horns: the complex orchestration of calcium currents in T lymphocytes". Front. Immun. **6**, 234.
- North RA. 2002. "Molecular physiology of P2X receptors". Physiol Rev. **82**
- Novitskiy, S. V. et al. 2008. "Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function". Blood **112**, 1822–1831.
- Nurkhametova, D., et al. (2019). "Activation of P2X7 Receptors in Peritoneal and Meningeal Mast Cells Detected by Uptake of Organic Dyes: Possible Purinergic Triggers of Neuroinflammation in Meninges." Front Cell Neurosci **13**: 45.
- Okochi, Y. et al. (2009). "Voltage-gated proton channel is expressed on phagosomes". Biochem Biophys Res Commun. **382**(2):274-9.
- Osterloh, J. M., et al. (2012). "dSarm/Sarm1 Is Required for Activation of an Injury-Induced Axon Death Pathway." Science **337**(6093): 481-484.
- Palomo J, et al. 2015. "The interleukin (IL)-1 cytokine family--Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases". Cytokine. **76**(1):25-37.
- Papadopoulos, V., and Johnson, R. (1993). "Production of chimeras and genetically defined offspring from targeted ES cells" in *Gene Targeting: A Practical Approach*, ed. A. L. Joyner(Oxford:IRL),1–31.

Parvathenani LK, et al. (2003). "P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is upregulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease". J Biol Chem **278**:13309–13317.

Pelletier, M., et al. (2010). "Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells." Blood **115**(2): 335-343.

Perez-Flores, G., et al. (2015). "The P2X7/P2X4 interaction shapes the purinergic response in murine macrophages." Biochemical and Biophysical Research Communications **467**(3): 484-490.

Perregaux, D. and C. A. Gabel (1994). "Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity." J Biol Chem **269**(21): 15195-15203.

Perregaux, D. G. and C. A. Gabel (1998). "Human monocyte stimulus-coupled IL-1beta posttranslational processing: modulation via monovalent cations." Am J Physiol **275**(6): C1538-1547.

Petersen, H. H., et al. (2004). "Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry." Vet Res **35**(2): 163-187.

Peters, M. et al. 2003. "Loss of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase kinase beta affects the formation of some, but not all, types of hippocampus-dependent long-term memory". J Neurosci. (**30**):9752-60.

Pham, C. T. N., et al. (1996). "Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(23): 13090-13095.

Proietti, M. et al. (2014). "ATP-gated ionotropic P2X7 receptor controls follicular T helper cell numbers in Peyer's patches to promote host-microbiota mutualism." Immunity **41**, 789–801.

Reutershan, J. et al. 2007. "Therapeutic anti-inflammatory effects of myeloid cell adenosine receptor A2a stimulation in lipopolysaccharide-induced lung injury". J. Immunol. **179**, 1254–1263.

Revell, P. A., et al. (2005). "Granzyme B and the downstream granzymes C and/or F are important for cytotoxic lymphocyte functions." Journal of Immunology **174**(4): 2124-2131.

Rigato, C., et al. (2012). "Microglia proliferation is controlled by P2X7 receptors in a Pannexin-1-independent manner during early embryonic spinal cord invasion." J Neurosci **32**(34): 11559-11573.

- Rijli, F. M., et al. (1994). "Insertion of a Targeting Construct in a Hoxd-10 Allele Can Influence the Control of Hoxd-9 Expression." Developmental Dynamics **201**(4): 366-377.
- Rijkers, T., et al. (1998). "Targeted inactivation of mouse RAD52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation." Mol Cell Biol **18**(11): 6423-6429.
- Rissiek, B. et al. (2014). "Technical Advance: a new cell preparation strategy that greatly improves the yield of vital and functional Tregs and NKT cells." J. Leukoc. Biol. **95**, 543–549.
- Rissiek, B., et al. (2015). "P2X7 on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions." Front Immunol **6**: 204.
- Rissiek, B. et al. (2017). "Ecto-ADP-ribosyltransferase ARTC2.1 functionally modulates FcγR1 and FcγR2B on murine microglia". Sci Rep. **7**(1):16477.
- Rissiek B, et al. (2020) "Astrocytes and Microglia Are Resistant to NAD<sup>+</sup>-Mediated Cell Death Along the ARTC2/P2X7 Axis". Front Mol Neurosci. **12**:330.
- Rogers, M. S., et al. (2012). "The classical pink-eyed dilution mutation affects angiogenic responsiveness." PLoS One **7**(5): e35237.
- Romagnani, S. (1994). "Lymphokine production by human T cells in disease states." Annu Rev Immunol **12**: 227-257.
- Saez, P. J., et al. (2017). "ATP promotes the fast migration of dendritic cells through the activity of pannexin 1 channels and P2X7 receptors." Sci Signal **10**(506).
- Sakaguchi, S., et al. (2008). "Regulatory T cells and immune tolerance." Cell **133**(5): 775-787.
- Sallusto, F., et al. (1995). "Dendritic Cells Use Macropinocytosis and the Mannose Receptor to Concentrate Macromolecules in the Major Histocompatibility Complex Class-II Compartment - down-Regulation by Cytokines and Bacterial Products." Journal of Experimental Medicine **182**(2): 389-400.
- Sauer, R. S., et al. (2014). "Toll like receptor (TLR)-4 as a regulator of peripheral endogenous opioid-mediated analgesia in inflammation." Mol Pain **10**: 10.
- Scheuplein, F., et al. (2009). "NAD<sup>+</sup> and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells." J Immunol **182**(5): 2898-2908.
- Schulz C, et al. 2012. "A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells". Science. **336**:86–90.

- Schwarz, N., et al. (2012). "Alternative splicing of the N-terminal cytosolic and transmembrane domains of P2X7 controls gating of the ion channel by ADP-ribosylation." PLoS One **7**(7).
- Seman, M. et al. (2003). "NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor". Immunity. **19**:571–582.
- Shen, B., et al. (2013). "Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting." Cell Res **23**(5): 720-723.
- Seman, M. (2003). NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. Immunity **19**, 571–582.
- Silva, A. J., et al. (1992). "Impaired Spatial-Learning in Alpha-Calcium-Calmodulin Kinase-II Mutant Mice." Science **257**(5067): 206-211.
- Sim, J.A. et al. (2006). Altered hippocampal synaptic potentiation in P2X4 knock-out mice. J. Neurosci. **26**, 9006–9009.
- Simpson, E. M., et al. (1997). "Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice." Nature Genetics **16**(1): 19-27.
- Sluyter, R. (2017). "The P2X7 Receptor." Adv Exp Med Biol **1051**: 17-53.
- Smithies, O. et al. (1985). "Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. Nature **317**, 230–234.
- Solle, M. et al., (2001). "Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors". J Biol Chem. **276**(1):125-32.
- Sorge, R.E., et al. (2012). "Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity". Nat Med. **18**(4): 595-9.
- Stark, R. et al. (2018). "TRM maintenance is regulated by tissue damage via P2RX7." Sci. Immunol. **3**, eaau1022.
- Steinman, R. M. and M. D. Witmer (1978). "Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(10): 5132-5136.
- Supajatura, V., et al. (2002). "Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity." J Clin Invest **109**(10): 1351-1359.
- Surprenant, A., et al. (1996). "The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7)." Science **272**(5262): 735-738.
- Takaki, S. et al. 2000. "Control of B cell production by the adaptor protein Ink. Definition Of a conserved family of signal-modulating proteins". Immunity. **(5)**:599-609.

Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." Cell **140**(6): 805-820.

Uccellini MB. et al. (2020). "Passenger Mutations Confound Phenotypes of SARM1-Deficient Mice". Cell Rep. **7**;31(1):

Ueno, M., et al. (2013). "Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development." Nat Neurosci **16**(5): 543-551.

Ulmann, L. and F. Rassendren (2008). "Microglia and purinergic P2X receptors in neuropathic pain: an unexpected excitatory duo." Douleur Et Analgesie **21**(4): 221-226.

Vanden Berghe, T., et al. (2015). "Passenger Mutations Confound Interpretation of All Genetically Modified Congenic Mice." Immunity **43**(1): 200-209.

Venereau, E. et al. (2015). "DAMPs from celldeath to new life" Front Immunol. **6**:422.

Ventre, E., et al. (2017). "Topical ivermectin improves allergic skin inflammation." Allergy **72**, 1212–1221.

Vig, M., et al. (2008). "Defective mast cell effector functions in mice lacking the CRACM1 pore subunit of storeoperated calcium release-activated calcium channels." Nat. Immunol. **9**, 89–96.

Wareham K, et al. (2009). "Functional evidence for the expression of P2X1, P2X4 and P2X7 receptors in human lung mast cells". Br J Pharmacol. **157**(7):1215-24.

Weblink: <https://ensemblgenomes.org>

Weblink: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/005716579/publication/DE1815352A1?q=pn%3DDE1815352>

Weblink: <http://www.informatics.jax.org/strain/summary>

Weblink: <https://cytekbio.com/blogs/news/cytek-biosciences-hits-flow-cytometry--mile-stone-40-color-analysis-from-a-single-sample>

Yamamoto, K., et al. (2006). "Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice." Nature Medicine **12**(1): 133-137.

Yan Z, et al. (2010). "Experimental characterization and mathematical modeling of P2X7 receptor channel gating". J Neurosci **30**:14213–14224.

Yatim, K. M. and F. G. Lakkis (2015). "A brief journey through the immune system." Clin J Am Soc Nephrol **10**(7): 1274-1281.

Yegutkin, G. G. (2008). "Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade." Biochim Biophys Acta **1783**(5): 673-694.

Yip, L., et al. (2009). "Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors." FASEB J **23**(6): 1685-1693.

Zabala, A. et al. (2018). "P2X4 receptor controls microglia activation and favors remyelination in autoimmune encephalitis." EMBO Mol Med. (**8**):e8743.

Zanovello, P. et al. 1990. "Responses of mouse lymphocytes to extracellular ATP. II. Extracellular ATP causes cell type-dependent lysis and DNA fragmentation". J Immunol. **145**(5):1545-50.

Zech, A., et al. (2016). "P2rx4 deficiency in mice alleviates allergen-induced airway inflammation." Oncotarget **7**(49): 80288-80297.

Zhao, R. et al. (2019). "Toll-Like Receptor-Mediated Activation of CD39 Internalization in BMDCs Leads to Extracellular ATP Accumulation and Facilitates P2X7 Receptor Activation". Front Immunol. **10**:2524.

Zimmerman. LM. et al. (2010). "Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective". J Exp Biol. **1**; **213**(5):661-71.

## 8. Danksagung

Ein großer Dank gilt hierbei meinem Doktorvater Tim Magnus, der mir die Möglichkeit gegeben hat mich zunächst als Masterand und danach als Doktorand in seinem Labor zu beweisen. Ich habe mich stets gewertschätzt und als wichtigen Teil der Gruppe gefühlt. Des Weiteren danke ich den Leuten des ERSI Laborteams, die mir in den letzten 7 Jahren ans Herz gewachsen sind und mit denen ich viele besondere und unterhaltsame Momente erleben durfte, sowohl in professioneller als auch privater Hinsicht. Ein Dank gebührt auch meiner Kollegin Sarah Behr, die mich bei meinen ersten Schritten als Doktorand geleitet hat sowie meinen PhD Mitstreitern Duan, Santra und Vanessa, bei denen ich mir stets Rat und Hilfe suchen konnte

Ein besonders großer Dank gilt hierbei meinem Betreuer und Mentor Dr. Björn Rissiek. Er ist der Hauptgrund dafür, dass meine Zeit als Doktorand erfolgreich und lehrreich verlaufen ist. Er hat mir beigebracht, was es bedeutet ein Wissenschaftler zu sein und worauf es in der Forschung alles ankommt. Er hat meine ersten Schritte auf einer Wissenschaftskonferenz begleitet, mir alle Labortechniken beigebracht sowie unser gemeinsames Paper beaufsichtigt. Ich verdanke ihm mehr als ich jemals zurückgeben kann, da er immer an mich geglaubt hat, vor allem in den Phasen wo es sehr schwer für mich war. Ich bin mir sicher er wird in Zukunft ein großartiger Laborleiter und ein noch größerer Wissenschaftler werden. Danke für alles Chef !

Im Laufe meiner Zeit hatte ich es auch mit vielen Kooperationen zu tun, denen ich ebenfalls danken möchte. Zum einen wären da die IFIs, deren Materialien und Geräte ich netterweise mitbenutzen durfte. Speziell Professor Fritz Nolte und Professor Eva Tolosa möchte ich für ihre Expertise und für die Teilnahme am Thesis Komitee danken. Auch dem Labor von Carlos Matute möchte ich für die spannende Zusammenarbeit mit den EAE Mäusen danken.

Auch meine Freunde und Familie waren in dieser Zeit sehr wichtig als emotionale stütze. Besonders meine Frau Jasmin, die wichtigste Stütze in meinem Leben, hat mich immer ermutigt und an mich geglaubt. Die Geburt unserer Tochter Leonie im letzten Jahr ist zudem der Hauptgrund, weswegen ich die Zeit als Doktorand am UKE immer mit etwas positiven in Verbindung bringen werde.

## 9. Eidesstattliche Versicherung

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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....