

Die Rolle der ekto-5'-Nukleotidase (CD73) und des Adenosin A2A Rezeptors bei der Immunmodulation

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Michael G. Romio

aus Bayreuth

Mai 2010

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. J. med. Schrader

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Groth

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2010

Meinen
Eltern
und
Geschwistern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 8 -
1.1. Adenosin – ein Mediator mit vielfältiger Funktion	- 8 -
1.2. Die Adenin-Nukleotid-Abbau-Kaskade und purinerge Rezeptoren	- 9 -
1.3. Adenosin-Rezeptoren und ihre Signaltransduktion	- 11 -
1.3.1. G-Proteine in der Adenosin-Signalgebung	- 12 -
1.3.2. Liganden-Affinitäten der Adenosin-Rezeptoren	- 13 -
1.4. Die Rolle der ekto-5'-Nukleotidase (CD73) bei der Regulierung der Adenosin (Ado)-Rezeptor-Signalgebung	- 13 -
1.5. Phänotyp CD73 defizienter Mäuse	- 14 -
1.6. Modulatorische Wirkung von Adenosin auf das Immunsystem	- 16 -
1.6.1. Das Immunsystem – Ein kurzer Überblick	- 16 -
1.6.2. Adenosin und Monozyten/Makrophagen	- 17 -
1.6.3. Adenosin und natürliche Killerzellen (NK-Zellen)	- 18 -
1.6.4. Adenosin und B Zellen	- 19 -
1.6.5. Adenosin und T Zellen	- 20 -
1.7. T Zell Subpopulationen und die CD73	- 21 -
1.7.1. Subtypen von T Zellen und ihre Funktion	- 21 -
1.7.2. Expression der CD73 auf CD4 ⁺ T Zellen	- 22 -
1.7.3. Die Rolle der CD73 auf T Zellen bei der Regulation der Immunantwort	- 23 -
2. Zielsetzung	- 26 -
3. Versuchstiere und Methoden	- 28 -
3.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen	- 28 -
3.2. Immunhistologie	- 28 -
3.3. Aufreinigung muriner Leukozyten	- 29 -
3.3.1. Homogenisation muriner Milzen	- 29 -
3.3.2. MACS (<i>Magnetic Cell Sorting</i>) Separation	- 30 -
3.3.3. Zellzahlbestimmung und Vitalfärbung	- 31 -
3.3.4. Durchflusszytometrie	- 32 -
3.4. Stimulation von murinen Leukozyten	- 33 -
3.4.1. Antikörper induzierte Stimulation	- 33 -
3.4.2. PMA/Ionomycin induzierte Stimulation	- 33 -

3.5. Nachweis von Nukleotiden/Nukleosiden und Nukleotidase-aktivität	- 34 -
3.5.1. Nukleotid/Nukleosid-Nachweis mittels HPLC	- 34 -
3.5.2. ATP Nachweis mittels Luciferin/Luciferase Assay	- 35 -
3.5.2a. Nachweis der ATP Stabilität in RPMI-1640 (+10% FKS)	- 35 -
3.5.2b. Zeit-aufgelöste Messungen von ATP	- 36 -
3.5.2c. ATP Messungen unter Flussbedingungen	- 37 -
3.6. Aktivierung von Transkriptionsfaktoren	- 38 -
3.6.1a. <i>in-vitro</i> Kultivierungsbedingungen von Splenozyten.....	- 38 -
3.6.1b. <i>in-vitro</i> Kultivierungsbedingungen von CD90 ⁺ Zellen	- 38 -
3.6.2a. Vollständige (totale) Proteinextraktion.....	- 39 -
3.6.2b. Nukleare Proteinextraktion	- 39 -
3.6.3. BCA Protein Assay	- 39 -
3.6.4. Radioaktiv Labeln der NF-κB- <i>Binding-Sites</i>	- 40 -
3.6.5. EMSA (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>).....	- 41 -
3.7. Zytokinfreisetzung.....	- 42 -
3.7.1. <i>in-vitro</i> Kultivierungsbedingungen von CD4 ⁺ Zellen	- 42 -
3.7.2. Zytokin ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>).....	- 42 -
3.7.3. Bio-Plex Pro Assay (23 Multi-Plex).....	- 43 -
3.8. CD4⁺ T Zell Proliferations/Suppressions Assay	- 44 -
3.9. Isoliert perfundiertes Herz nach Langendorff.....	- 45 -
3.10. <i>in-vivo</i> Messung des arteriellen Blutdruckes.....	- 46 -
3.11. Das Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) Modell	- 46 -
3.12. Statistische Datenanalyse	- 48 -
4. Ergebnisse	- 50 -
4.1. Physiologische Rolle der CD73 bei der Immunantwort von CD4⁺ T Zellen.....	- 50 -
4.1.1. Nachweis der ekto-5'-NT/CD73 auf T Zellen muriner Milzen	- 50 -
4.1.1a. Immunhistologischer Nachweis der Epitope CD3 und CD73 auf Schnitten einer murinen Milz.....	- 50 -
4.1.1b. Quantitative Analyse der Koexpression der ekto-5'-NT/CD73 und des T Zell spezifischen Epitops CD4 auf murinen Splenozyten.....	- 51 -
4.1.1c. Quantitative Analyse der Koexpression der ekto-5'-NT/CD73 und des T Zell spezifischen Epitops CD4 auf mittels Mikro-Beads angereicherten T Zellen.....	- 53 -
4.1.2. Nachweis von endogenen AMP und Adenosin in den Überständen muriner T Zellen mittels HPLC	- 55 -
4.1.3. Nachweis von endogenen ATP in den Überständen muriner T Zellen mittels Luciferin/Luciferase-Assay	- 57 -
4.1.4. Von der CD73 gebildetes Adenosin moduliert die nukleare Translokation von NF-κB..	- 64 -

4.1.5. Von der CD73 gebildetes Adenosin moduliert die Freisetzung von Zytokinen aus CD4 ⁺ T Zellen	- 65 -
4.1.6. Die CD73 und die Proliferation von CD4 ⁺ T Zellen	- 66 -
4.1.7. Die Hemmung der Adenosin vermittelten IFN- γ Freisetzung erfolgt über die Aktivierung des A2AR.....	- 68 -
4.1.9. A2AR Aktivierung und Zytokinfreisetzung von CD4 ⁺ /CD25 ⁻ Teff Zellen bzw. CD4 ⁺ /CD25 ⁺ Treg Zellen.....	- 69 -
4.2. Hämodynamische und antiinflammatorische Wirkung von phosphorylierten A2AR Agonisten (prodrug)	- 73 -
4.2.1. Koronare Hämodynamik.....	- 74 -
4.2.2. Wirkung von Adenosin und Cyclohexylethylthio(chet)-Adenosin/AMP auf die arterielle Hämodynamik.....	- 79 -
4.2.3. IFN- γ Freisetzung von CD4 ⁺ T Zellen.....	- 81 -
4.2.4. Cyclohexylethylthio(chet)-Adenosin/AMP im Arthritis Modell.....	- 85 -
4.2.4a. Entzündungshemmung <i>in-vivo</i> – visual scoring und ¹⁹ F MRI.....	- 85 -
4.2.4b. Serumzytokinspiegel	- 88 -
5. Diskussion	- 94 -
5.1. Physiologische Rolle der CD73 bei der Immunantwort von T Zellen	- 94 -
5.1.1. Expression der CD73 auf Immunzellen.....	- 94 -
5.1.2. ATP–Freisetzung aus T Zellen	- 95 -
5.1.3. Die ekto-Nukleotid Kaskade auf T Zellen	- 97 -
5.1.4. Die CD73 hemmt die Zytokinfreisetzung über NF- κ B	- 98 -
5.1.5. Treg Zellen hemmen die Teff Proliferation unabhängig von der CD73 Aktivität	- 98 -
5.1.6. Der A2AR und Teff Zytokine.....	- 99 -
5.1.7. Der A2AR auf Treg Zellen	- 100 -
5.1.8. Integrales Gesamtbild der CD73 auf Treg und Teff Zellen	- 100 -
5.2. Hämodynamische und antiinflammatorische Wirkung von phosphorylierten A2AR Agonisten (prodrug)	- 102 -
5.2.1. Phosphorylierte Adenosin-Derivate: A2AR Selektivität und CD73 Substratazeptanz.....	- 102 -
5.2.2. Phosphorylierte A2AR Agonisten und die IFN- γ Freisetzung aus CD4 ⁺ T Zellen.....	- 103 -
5.2.3. Hämodynamische Effekte phosphorylierter A2AR Agonisten	- 105 -
5.2.4. chet-Ado und chet-AMP im Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) Modell	- 106 -
6. Zusammenfassung/Abstract	- 108 -
6.1. Zusammenfassung	- 108 -
6.2. Abstract	- 110 -

7. Abbildungs-/Tabellenverzeichnis	- 112 -
7.1. Abbildungen.....	- 112 -
7.2. Tabellen	- 115 -
8. Abkürzungsverzeichnis	- 116 -
9. Literaturverzeichnis	- 118 -
10. Materialien.....	- 131 -
10.1. Chemikalien.....	- 131 -
10.2. Puffer	- 131 -
10.3. Zellkulturmedien	- 133 -
10.4. Lösungen.....	- 133 -
10.5. Assay Kits und MicroBeads	- 134 -
10.6. Antikörper.....	- 134 -
10.7. weitere Materialien/Substanzen	- 135 -
11. Danksagung.....	- 136 -
12. Erklärung.....	- 137 -

1. Einleitung

1.1. Adenosin – ein Mediator mit vielfältiger Funktion

Adenosin (Ado) ist ein Nukleosid, das aus dem Purin Adenin besteht und über eine β -N₉- glykosidische Bindung an einen Ribosezucker (Ribofuranose) gekoppelt ist (Abb. 1).

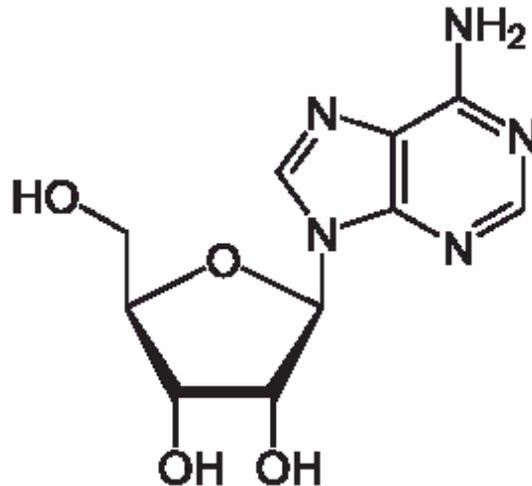


Abbildung 1: molekulare Struktur von Adenosin

Ausgangspunkt für die *de-novo* Synthese der Purin Nukleotide/Nukleoside ist Ribose-5'-Phosphat, das aus dem Pentosephosphatweg stammt. Die Aminosäuren Glycin, Aspartat und Glutamin als auch aktivierte Derivate des Tetrahydrofolats und CO₂ liefern die Kohlenstoff- und Stickstoffatome des eigentlichen Purin-Ringes. Das primäre Produkt, das ein vollständiges Purinringsystem aufweist, ist Inosinmonophosphat (IMP). Dieses IMP dient als Vorstufe für AMP, dessen Adenylat in Gegenwart eines weiteren Aspartats und Fumarat gebildet wird. Dephosphorylierung des 5'-Phosphats von der Ribose-Gruppe führt dann zur Bildung von Ado.

Ado ist ein wichtiger Baustein der Nucleinsäuren DNA und RNA, aber auch Bestandteil von niedermolekularen, energiereichen Verbindungen wie ATP und NADH. Darüberhinaus reguliert Ado eine Vielzahl von physiologischen Funktionen in fast allen Organen des menschlichen Körpers (Klotz 2006).

Am Herzen wurde die Wirkung von Ado als erstes von Drury et al. (1929) beschrieben. Ado hemmt die Erregungsleitung im Säugerherzen (Drury et al. 1929).

Weiterhin wirkt Ado anti-adrenerg auf die Herzfunktion (Olsson et al. 1990). Auch beeinflusst Ado den vaskulären Tonus, da es einen wirksamen Vasodilator darstellt (Berne et al. 1980).

Im zentralen Nervensystem zeigt Ado eine neuroprotektive Wirkungsweise, indem es die neurotoxologischen Effekte freigesetzten Glutamats hemmt (Dunwiddie et al. 2001).

Auf zellulärer Ebene nimmt Ado Einfluss auf das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und die zelluläre Proliferation, was insbesondere bei Krebszellen relevant ist (Merighi et al. 2003).

1.2. Die Adenin-Nukleotid-Abbau-Kaskade und purinerge Rezeptoren

Ursprünglich wurden absterbende Zellen als Quelle für extrazelluläre Nukleotide angesehen. Mittlerweile konnte aber gezeigt werden, dass viele Zellen ATP als Folge physiologischer Reize freisetzen (Bodin and Burnstock et al. 2001, Burnstock et al. 2006). Abbildung 2 gibt einen Überblick über die verschiedenen Purin-Verbindungen und ihre Rezeptoren.

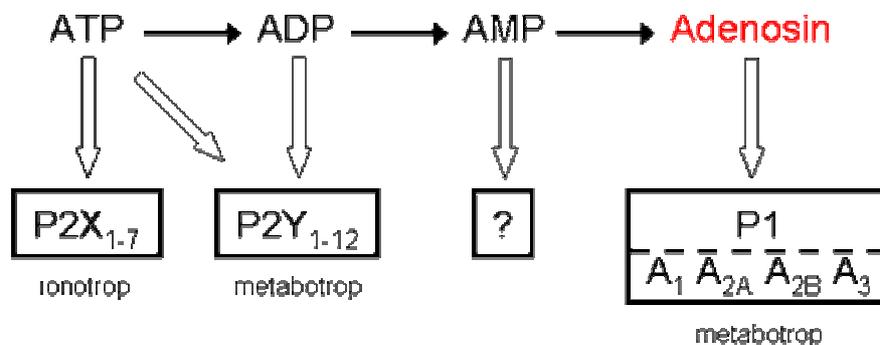


Abbildung 2: Adenin-Purine und ihre Rezeptoren (modifiziert nach Klotz 2007)

Ado bindet an spezifische Purin(P1)-Rezeptoren, die, wie in Kapitel 1.3. näher ausgeführt wird, über verschiedene Signalwege die Zellfunktion beeinflussen.

Auch für ATP und ADP, das sich im extrazellulären Raum befindet, gibt es spezielle Rezeptoren auf der Zellmembran, sogenannte Purin(P2)-Rezeptoren. Diese Rezeptoren binden neben den Adenin-Nukleotiden auch Uridin-Nukleotide. Ionotrope P2X Rezeptoren können bei Aktivierung die Membrandurchlässigkeit für bestimmte

Ionen verändern. Auf T-Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des P2X7 Rezeptor das zytosolische Ca^{2+} erhöht (Schenk et al. 2008). Metabotrope P2Y Rezeptoren dagegen sind G-Protein gekoppelt und entfalten ihre Wirksamkeit ähnlich wie die P1-Ado-Rezeptoren über eine intrazelluläre Signalkette.

Neben der Bindung der Adenin-Nukleotide an die P2-Rezeptoren können diese aber auch im extrazellulären Raum dephosphoryliert und zu Ado abgebaut werden. In einem weiteren Schritt kann das Ado dann zu Inosin umgewandelt werden. Abbildung 3 zeigt eine Zusammenfassung des intra- und extrazellulären Adenin-Purin-Abbaus.

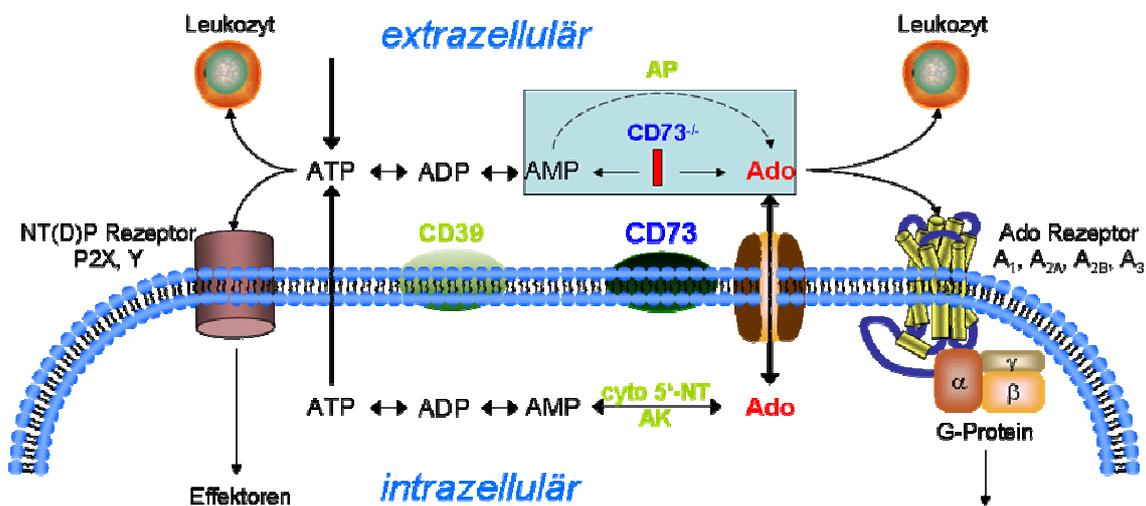


Abbildung 3: Adenin-Purine: Abbau und Rezeptoren

Der erste Schritt dieser Abbaukaskade erfolgt über die Familie der NTPDasen (Apyrasen, CD39). Diese Familie setzt sich aus acht bekannten Subtypen zusammen, die sich anhand ihrer zellulären Lokalisation und ihrer Substrataffinitäten voneinander unterscheiden lassen. Die NTPDasen 1-3 und 8 sind typische Membran assoziierte Nukleotidasen. Dagegen finden sich die NTPDase 4 und 7 ausschließlich im intrazellulären Raum. Sowohl zytosolisch als auch interstitiell im interzellulären Raum sind die NTPDase 5 und 6 anzutreffen. Von den Membran-ständigen Nukleotidasen zeigt die NTPDase 1 für ATP und ADP die gleiche Affinität. Die NTPDasen 2, 3 und 8 bevorzugen mit unterschiedlichen Affinitäten ATP. Somit stellt die NTPDase 1 (ekto-Apyrase) die wichtigste Quelle für AMP dar (Robson et al. 2006).

Für AMP ist derzeit kein Rezeptor bekannt. Inbe et al. (2004) nahm an, dass der Orphan-Rezeptor GPR80/99 als AMP Rezeptor dienen könnte. Diese Annahme wurde aber von Qi et al. (2004) widerlegt. Es konnte gezeigt werden, dass GPR80/99 α -Ketoglutarat bindet, welches im Zitronensäurezyklus gebildet wird.

Da es auch keine Beweise für eine signalgebende Funktion von AMP gibt (Takedachi et al. 2007), ist davon auszugehen, dass das extrazelluläre AMP hauptsächlich über die ekto-5'-Nukleotidase (ekto-5'-NT, CD73) zu Ado umgewandelt wird. Auch kann Ado über die alkalische Phosphatase (AP) aus AMP gebildet werden. Die AP ist aber weitaus unspezifischer als die CD73, da sie auch andere biologisch vorkommende Purin/Pyrimidin-Mono-Phosphate (GMP, UMP, CMP) abbauen kann.

1.3. Adenosin-Rezeptoren und ihre Signaltransduktion

G(uanin-Nukleotid-bindende)-Proteine sind Rezeptor gekoppelte Proteine, die aus drei Untereinheiten bestehen: α , β und γ . Die Signaltransduktion ist Subtyp abhängig (Tab. 1).

Tabelle 1: Untereinheiten von G-Proteinen: Subtypen und Funktion

UE*	Subtyp	Funktion
α	s	stimuliert die Bildung von cAMP aus ATP über eine Aktivierung der Adenylat-Zyklase
	i	hemmt die Bildung von cAMP aus ATP
	q/11	stimuliert die Phospholipase C und fördert so die Bildung von IP ₃ und DAG aus PIP ₂
	12/13	am Rho GTPase Signalweg beteiligt
$\beta\gamma$	--	überwiegend ionotrope Wirkung

* Untereinheit

Man unterscheidet vier verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren (engl.: GPCRs), die spezifisch Ado binden: A₁ (A1R), A_{2A} (A2AR), A_{2B} (A2BR) und A₃ (A3R). Differenziert werden diese Rezeptoren anhand der verschiedenen G-Protein Untereinheiten, und der daraus resultierenden intrazellulären Signalmechanismen. Ein Überblick über die einzelnen Ado-Rezeptoren, ihre G-Protein Untereinheiten und ihre initialen zellulären Effekt sind in Abbildung 4 zusammengefasst. Neben den Rezeptor spezifischen G-Proteinen weisen die Rezeptoren auch unterschiedliche Ligandenaffinitäten zu Ado auf.

1.3.1. G-Proteine in der Adenosin-Signalgebung

Der A1R weist eine α_i Untereinheit auf, die die Bildung von cAMP über eine Hemmung der Adenylat-Zyklase verhindert. Der A1R Aktivierung kommt eine proinflammatorische Rolle zu, da dadurch u.a. die Adhärenz von neutrophilen Granulozyten an das Endothel verstärkt wird (Cronstein et al. 1992). Eine Aktivierung

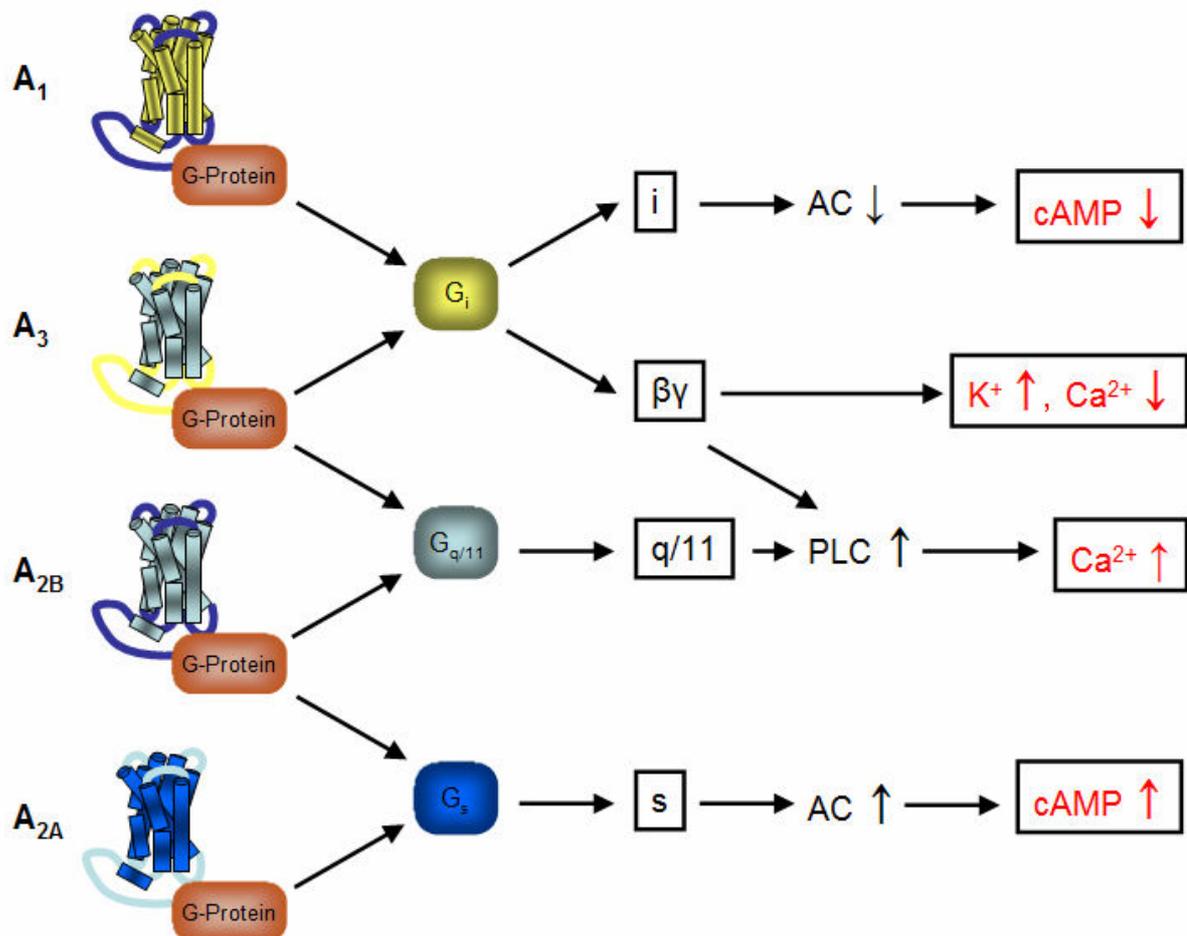


Abbildung 4: Adenosin-Rezeptor Subtypen und ihre Signalwege

des A_{2A}R, der eine α_s Untereinheit besitzt, steigert dagegen die Aktivität der Adenylat-Zyklase und fördert die Bildung von cAMP. Der A_{2B}R kann ebenfalls über eine α_s Untereinheit den intrazellulären cAMP Spiegel steigern. Über diesen Signalweg verhindern die A₂-Rezeptoren u.a. einen oxidativen Burst neutrophiler Granulozyten (Bouma et al. 1997). Es ist aber auch bekannt, dass eine Aktivierung des A_{2B}R genauso wie eine A₃R Aktivierung zu einer Steigerung der Aktivität der Phospholipase C (PLC) führen kann. Die Folge ist ein Anstieg des intrazellulären Ca²⁺ Spiegels. Vermittelt wird dieser Ca²⁺ Anstieg über die $\alpha_{q/11}$ Untereinheit. Wie später in Kapitel 3.4. beschrieben, führt eine Erhöhung der Ca²⁺ Konzentration zur

Aktivierung von Lymphozyten. Somit haben A2BR und A3R ebenfalls ein proinflammatorisches Potential. Für den A3R kommt hinzu, dass er ähnlich wie der A1R negativen Einfluss auf cAMP über eine α_i Untereinheit nehmen kann. Aber auch antiinflammatorische Effekte sind für den A3R bekannt. So reguliert der A3R die Degranulation von neutrophilen (Bouma et al. 1997) und die Migration von eosinophilen Granulozyten (Knight 1997).

1.3.2. Liganden-Affinitäten der Adenosin-Rezeptoren

Neben den unterschiedlichen Signalwegen zeigen die einzelnen Ado-Rezeptoren auch verschiedene Affinitäten zu Ado. Der A1R und der A2AR werden bereits in Konzentrationsbereichen von 10-100nM aktiviert. Dagegen benötigen der A2BR und der A3R μ Molare Ado-Konzentrationen für eine Aktivierung (Fredholm et al. 1994).

Die Konzentrationen an Ado im extrazellulären Raum liegen im Allgemeinen im nMolaren bzw. im unteren μ Molaren Bereich. Im Plasma und der Cerebrospinalflüssigkeit liegt die Ado-Konzentration zwischen 0.4 bis 2.4 μ M (Traut et al. 1994, Lasley et al. 1998). Im normoxischen Myokard und im Skelettmuskel finden sich extrazelluläre Ado-Konzentrationen von 0.4 bis 0.9 μ M (Lasley et al. 1998, MacLean et al. 2001). Unter hypoxischen Bedingungen steigt die interstitielle Ado-Konzentration im Gewebe erheblich an (McLean et al. 1998, Siaghy et al. 2000). Veränderungen des extrazellulären Ado-Gehalts sind u.a. eine Folge veränderter Nucleosid-Transporter Aktivitäten (Baldwin et al. 2004). Diese sind abhängig vom Konzentrationsgradienten des Ado zwischen intra- und extrazellulären Raum, werden aber auch durch veränderte Expression der Nucleosid-Transporter selbst bestimmt. Desweiteren beeinflusst auch der extrazelluläre Abbau von ATP den interstitiellen Ado-Gehalt. Hier kommt der ekto-5'-Nucleotidase (CD73) als letztes Enzym der Abbaukaskade eine besondere Bedeutung zu.

1.4. Die Rolle der ekto-5'-Nucleotidase (CD73) bei der Regulierung der Adenosin(Ado)-Rezeptor-Signalgebung

Die CD73 ist ein Membran-ständiges Protein, das mittels eines Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol(GPI)-Ankers an die Plasmamembran verschiedenster Zellen verankert ist. Es weist ein Molekülgewicht von 70-kDa auf und katalysiert die Dephosphorylierung von 5'-AMP zu Ado (Thompson et al. 1990, Zimmermann 1992, Deussen et al. 1993). Die CD73 ist das letzte Glied beim Abbau extrazellulärer

Nukleotide, an dem auch Membran-ständige CD39/ATP-Diphosphohydrolasen beteiligt sind (Enjyoj et al. 1999).

Extrazelluläres Ado kann über Nukleosid-Transporter ins Zytosol aufgenommen werden und dort über die Ado-Kinase (AK) oder die Ado-Desaminase (ADA) metabolisiert werden (Snyder et al. 1973). Aber auch an der Zelloberfläche kann Ado über die AK und über die ADA metabolisiert werden. Behandlung von Mäusen mit AK Inhibitoren bzw. ADA Inhibitoren erhöht die extrazelluläre Ado-Konzentration und führt in verschiedenen Mausmodellen zu einer verzögerten Entzündungsreaktion (Firestein et al. 1994, Cronstein et al. 1995, Adanin et al. 2002). *In-vitro* konnte gezeigt werden, dass ADA gekoppelte Jurkat Zellen in Gegenwart von exogenen Ado eine geringere P1-Ado-Rezeptor Aktivierung zeigen und eine geringere Bildung von cAMP aufweisen (Hashikawa et al 2004). Desweiteren zeigten Studien mit Nukleosid-Transporter-Inhibitoren eine verminderte LPS induzierte TNF- α Antwort bei Mäusen (Noji et al. 2002). Dass sowohl eine Hemmung der zellulären Aufnahme als auch ein gehemmter Metabolismus des extrazellulären Ado eine anti-inflammatorische Wirkung zur Folge hat, liess vermuten, dass extrazellulär gebildetes Ado seine Wirkung direkt bei diesen Prozessen entfaltet. Um dieser Fragestellung im Detail nachzugehen, wurden von drei verschiedenen Laboren CD73 defiziente transgene Mäuse erzeugt (Thompson et al. 2004, Koszalka et al. 2004, Castrop et al. 2004). Diese Mäuse sollten insbesondere Auskunft geben, welche Rolle die CD73 bei der Produktion des extrazellulären Ado spielt und wie dieses von der CD73 gebildete Ado physiologische Prozesse über die Ado-Rezeptoren moduliert.

1.5. Phänotyp CD73 defizienter Mäuse

Eine CD73 defiziente Maus-Mutante wurde in Düsseldorf am Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie durch eine Deletion des Exon 2 erzeugt (Koszalka et al. 2004). Die Deletion dieses Exons erfolgte mittels des Cre-loxP Systems, was zukünftige Untersuchungen einer Zelltyp-spezifische Deletion der CD73 erlaubt.

Unter normalen Haltungsbedingungen sind CD73 defiziente Mäuse äußerlich unauffällig. Wurfzeiten und Wurfgrößen entsprechen denen von WT Mäusen. Auch Verhalten, Körpergewicht und Herz-Körperindex unterscheidet sich nicht (Buchheiser 2007).

Thompson et al. (2004) zeigten, dass CD73^{-/-} Mäuse eine verminderte vaskuläre Barrierefunktion bereits unter Basalbedingungen aufweisen. Besonders die Lunge, die Leber und das Muskelgewebe zeigten eine erhöhte vaskuläre Durchlässigkeit für Evan's Blue. Unter Hypoxie steigerte sich diese Durchlässigkeit und zeigte sich auch in Geweben des Darms, des Herzens, der Niere und des Gehirns. Da der Promotor des *cd73* Gens eine HIF-1 α *binding site* aufweist, die funktionell aktiv ist (Synnestvedt et al. 2002), kommt es unter Sauerstoffmangel zu einer gesteigerten Expression der CD73 (Ledoux et al. 2003, Kobayaschi 2000). Dies lässt vermuten, dass die CD73 besonders unter Hypoxie/Ischämie eine wichtige protektive Rolle bei der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion von Epithel (Lennon et al. 1998) und Endothel (Eltzschig et al. 2003) spielt.

Hypoxie induziert bekanntlich auch eine verstärkte Migration von polymorphkernigen Leukozyten (PMN: Granulozyten) ins Gewebe (Lunge, Darm, Leber). Eltzschig et al. (2004) konnte an CD39 defizienten Mäusen und nach Behandlung von WT Mäusen mit AOPCP (α , β -Methylen-Ado 5'-diphosphat: ekto-5'-Nukleotidase-Inhibitor) zeigen, dass das bei Hypoxie gebildete Ado an der Regulation des Migrationsverhaltens der Granulozyten beteiligt ist. Das Ado wirkt hier über Ado-Rezeptoren sowohl auf den Leukozyten als auch auf Endothelzellen.

Der Verlust der CD73 auf Endothelzellen führt nach *wire* Injury der *A. carotis* zu einer Erhöhung des nuklearen Anteils des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Zernecke et al. 2006), was eine erhöhte Expression des Adhäsionsmolekül VCAM-1 zur Folge hatte. VCAM-1 begünstigt vor allem die Migration von Monozyten. Dieser Effekt konnte durch ATL-146e, einem A2AR spezifischen Agonisten, nahezu vollständig aufgehoben werden.

Koszalka et al. (2004) fand keine Auffälligkeiten im systolischen Blutdruck, der Ejektionsfraktion und der Herzleistung in den CD73^{-/-} Mäusen. Im isoliert perfundierten Herzen fand sich aber ein erniedrigter Koronarfluss. *In-vivo* zeigten die transgenen Mäuse auch eine ausgeprägtere Plättchen-Aggregation in verschiedenen

Testsystemen. Gleichzeitig war der cAMP Gehalt der Plättchen erniedrigt, was vermuten ließ, dass die Plasma Ado-Konzentration in den CD73 defizienten Mäusen erniedrigt ist. Weitere Versuche zeigten, dass die Leukozyten der CD73^{-/-} Mäuse verstärkt nach Ischämie-Reperfusion an das Endothel adhäreren, was nicht auf Unterschiede im Blutfluss zurückgeführt werden konnte.

Zusammenfassend konnten die oben aufgeführten Studien zeigen, dass dem von der CD73 gebildeten Ado eine wichtige vasoprotektive Rolle über antiinflammatorische, das Immunsystem regulierende Prozesse zukommt.

1.6. Modulatorische Wirkung von Adenosin auf das Immunsystem

Voraussetzung für die Wirkung von Ado auf Immunzellen ist die Expression von Ado-Rezeptoren auf diesen hämatopoetischen Zellen. Je nach Zelltyp und Differenzierungsstadium weisen die Zellen des Immunsystems unterschiedliche Expressionsmuster der verschiedenen Ado-Rezeptoren auf.

1.6.1. Das Immunsystem – Ein kurzer Überblick

Unter dem Immunsystem versteht man das körpereigene Abwehrsystem, das den Organismus höherer Lebewesen vor Gewebsschädigungen durch eingedrungene Mikroorganismen (Krankheitserreger) schützt. Um diese Aufgabe erfüllen zu können, setzt sich das Immunsystem sowohl aus humoralen als auch aus zellulären Komponenten zusammen. Auch spielen ganze Organe (Thymus, Lymphknoten, Milz) eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Integrität des Organismus.

Generell unterteilt man das Immunsystem in zwei funktionelle Einheiten: 1. das angeborene, unspezifische Immunsystem, welches sofort gegen Schadstoffe einsatzbereit ist und 2. das adaptive, spezifische Immunsystem, welches langsamer reagiert und zur Erreichung seiner vollen Abwehrleistung eine vorangegangene Auseinandersetzung mit dem Antigen benötigt. Das adaptive Immunsystem erreicht hierdurch eine spezifische Immunantwort, die durch das angeborene Immunsystem nicht gegeben werden kann. Somit sichert das angeborene Immunsystem eine gewisse Resistenz gegen „unbekannte“ Pathogene, wogegen das adaptive Immunsystem durch sogenannte Gedächtniszellen Immunität gegenüber bereits „bekannte“ Antigene gewährleistet (Tab. 2).

Fusion hemmt (Merrill et al. 1997). Der A3R hemmt die Proliferation von Monozyten (Xaus et al. 1999). Neben der Ado-vermittelten Modulation der Proliferation und Differentiation von Makrophagen nimmt Ado auch Einfluss auf die Sekretion von Zytokinen. Proinflammatorische Zytokine wie IL-12 und TNF- α werden durch Ado herunterreguliert (Hasko et al. 2000, Murphree et al. 2005; Abb. 5) und antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 wurden von Makrophagen in Gegenwart von Ado verstärkt sekretiert (Le Moine et al. 1996).

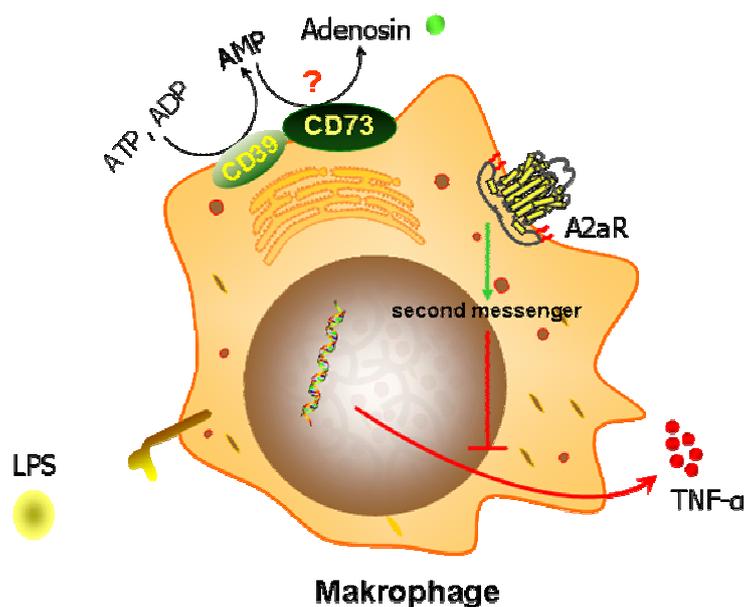


Abbildung 5: Regulation der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine bei Makrophagen

Die Quelle von extrazellulären Ado könnten die Makrophagen selbst sein. Es ist bekannt, dass Makrophagen nach LPS Stimulierung ATP freisetzen (Sperlagh et al. 1998). Da Versuche mit exogenen ATP und Gabe von ADA den modulatorischen Effekt von Ado verhindern (Hasko et al. 2000), ist zu vermuten, dass auch die CD73 an dieser Immunmodulation beteiligt ist.

1.6.3. Adenosin und natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Priebe et al. (1990) zeigte, dass A1R Agonisten die lytische Aktivität von murinen NK-Zellen steigern, wohingegen A2AR Agonisten die Lyse neoplastischer Lymphozyten durch NK-Zellen vermindern. Die gehemmte lytische Aktivität von NK-Zellen nach A2AR Aktivierung ist eine Folge des Anstieges an cAMP in diesen Zellen, da cAMP ein modulatorischer Einfluss bei NK-Zellen zukommt (Goto et al. 1983). Ob eine gesteigerte Aktivität von NK-Zellen bei Behandlung von Mäusen mit

einem A3R spezifischen Agonisten eine direkte Folge einer Rezeptor Aktivierung auf den NK-Zellen ist oder durch einen A3R-induzierten Anstieg an Serum IL-12 ausgelöst wird (Harish et al. 2003), ist bislang noch unklar. Interessanterweise konnte auf murinen NK-Zellen nur eine verschwindend geringe Expression der CD73 nachgewiesen werden (Beldi et al. 2008). Somit müssen *in-vivo* andere Zelltypen an der Bildung von Ado beteiligt sein oder das Ado wird direkt über Nukleosid-Transporter aus den NK-Zellen freigesetzt.

1.6.4. Adenosin und B Zellen

Auf murinen B Zellen scheint der vorherrschende Ado-Rezeptor der A2AR zu sein. Lukashev et al. (2003) wies auf muriner mRNA Ebene keinen A1R, kaum A3R und A2BR, aber verhältnismäßig viel mRNA für den A2AR nach. Gleichzeitig konnte Lukashev zeigen, dass ein Knockout des A2AR keinen kompensatorischen Anstieg der anderen Ado-Rezeptoren bewirkt. Auf humanen B Zellen konnte mittels FACS Analyse kein A2AR nachgewiesen werden (Koshiba et al. 1999). Zu dem ist nichts über die Expression des A1R, A2BR und des A3R auf humanen B-Lymphozyten bekannt.

Dennoch geht man davon aus, dass auf menschlichen B Zellen genauso wie auf tierischen B Zellen Ado über den A2AR wirkt. Ein Anstieg des intrazellulären cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA) und somit wird eine Aktivierung von NF- κ B unterbunden (Minguet et al. 2005). Gleichzeitig führen hohen Konzentrationen an extrazellulären Ado zu einer Beeinträchtigung der Proliferation von B Zellen und der Synthese von Antikörpern durch B Zellen (Seegmiller et al. 1977, Samet et al. 1985). Ado hat somit das Potential die durch B Zellen vermittelte humorale Immunantwort zu regulieren.

Gestützt wird die These der immunsuppressiven Wirkung von Ado auf B Zellen durch Befunde bei ADA defizienten Patienten. Diese weisen nicht nur erhöhte Ado-Konzentrationen im Serum auf, sondern zeigen auch eine schwerwiegende Immundefizienz infolge eingeschränkter Lymphopoese (Minguet et al. 2005). Somit steht eine erhöhte extrazelluläre Ado-Konzentration im wahrscheinlichen Zusammenhang bei der durch ADA Defizienz verursachten schweren kombinierten Immundefizienz (SCID: **se**vere **co**mbined immunodeficiency **dis**order).

1.6.5. Adenosin und T Zellen

T Zellen exprimieren genauso wie B Zellen vorzugsweise den A2AR. Auch ist in murinen T Zellen die mRNA des A2BR und des A3R nachweisbar. Die Expression des A1R ist hingegen sehr gering (Lukashev et al. 2003). Dem A2AR kommt auf T Zellen eine zusätzliche Bedeutung zu, da sich dessen Expressionsrate bei Aktivierung des T Zell Rezeptors (TCR) auf das 10fache erhöht. Auch hemmt der A2AR auf T Zellen die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IFN- γ (Lappas et al. 2005). Neben den negativen Einfluss auf die Zytokinfreisetzung von T Zellen, bewirkt Ado auch eine Verminderung der Proliferationsfähigkeit von T Zellen (Huang et al. 1997).

T Zellen stehen ebenso wie die ADA mit SCID in Zusammenhang, da diese Immunstörung durch defekte oder fehlende T-Lymphozyten gekennzeichnet ist. Hierdurch kommt es zu einer gehemmten zellvermittelten Immunantwort der T Zellen. Da T Zellen die Reifung von B Zellen zu Plasmazellen vermitteln, wird somit auch eine funktionelle humorale Immunantwort gestört. Dementsprechend kann die durch die ADA Defizienz ausgelöste SCID eine Folge einer Anreicherung von extrazellulären Ado sein, das die Apoptose von CD4⁺CD8⁺ Thymozyten fördert (Apasov et al. 1997). Die Konsequenz wäre ein systemischer Zusammenbruch des Immunsystems.

Ado und T Zellen werden auch in Verbindung mit der Progression von Tumoren gebracht, da erhöhte Konzentrationen an Ado in neoplastischen Arealen zu finden sind. Es wird vermutet, dass Ado hier eine adäquate T Zell vermittelte antitumorale Immunantwort verhindert (Blay et al. 1997, Hoskin et al. 1994).

T Zellen spielen somit eine zentrale Rolle bei der Etablierung einer adäquaten Immunantwort. T Zellen können sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort entscheidend beeinflussen. Da Ado auf T Zellen einen modulierenden Einfluss hat, soll im folgenden Abschnitt auf die verschiedenen T Zell Subpopulationen und auf das Enzym, das entscheidend an der Bildung des extrazellulären Ado beteiligt ist, die ekto-5'-NT/CD73, eingegangen werden.

1.7. T Zell Subpopulationen und die CD73

T Zellen reifen im Thymus heran und erfüllen als Bestandteil des adaptiven Immunsystems die unterschiedlichsten Aufgaben bei der Aufrechterhaltung der Immunität. Entsprechend ihres vielfältigen Aufgabenbereichs unterscheidet man verschiedenste Subpopulationen von T Zellen. Kennzeichen aller T Zellen ist die Expression eines T Zell-Rezeptors (TCR), der vom Aufbau einem Antikörper entspricht und über einen invarianten Proteinkomplex (CD3) an die Zellmembran gekoppelt ist. Besetzung dieses Rezeptors führt zur Aktivierung der entsprechenden Zellen und zur Sekretion von Zytokinen/Chemokinen. Moduliert werden kann die Aktivierung der T Zellen durch Adenin-Nukleotide/Nukleoside. ATP wirkt als Kostimulator (Schenk et al. 2008) und Ado hemmt die Freisetzung von Zytokinen (Lappas et al. 2005).

1.7.1. Subtypen von T Zellen und ihre Funktion

Unterscheiden kann man die CD3⁺ T Zellen anhand verschiedenster Korezeptoren und dominierender Transkriptionsfaktoren. Abbildung 6 gibt einen Überblick über die verschiedenen T Zell Subpopulationen und ihre Marker.

Im Wesentlichen unterscheidet man zwei große Gruppen von T Zellen. Die eine Gruppe exprimiert den Korezeptor CD8. Diese Zellen werden auch als zytotoxische T Zellen bezeichnet und erkennen den Antigen präsentierenden MHC I körpereigener Zellen und zerstören diese z.B. bei Virusinfektion. Die zweite Gruppe exprimiert den Korezeptor CD4. CD4 ist ein Marker für T-effektor (Teff) Zellen. Diese Zellen erkennen den MHC II Antigen präsentierender Zellen (APCs: dendritische Zellen, Monozyten/Makrophagen). Je nach Umgebungsbedingungen können sich CD4⁺ Teff Zellen zu T-Helfer Zellen des Typ I (Th1) oder T-Helfer Zellen des Typ II (Th2) entwickeln. Th1 Zellen fördern eher eine unspezifischere Immunantwort, da deren Zytokinprofil verstärkt das angeborene Immunsystem aktiviert. Th2 Zellen dagegen erkennen aktivierte B Zellen und induzieren deren Entwicklung zu Plasmazellen. Dies ist die Voraussetzung für die Sekretion Pathogen-spezifischer Antikörper.

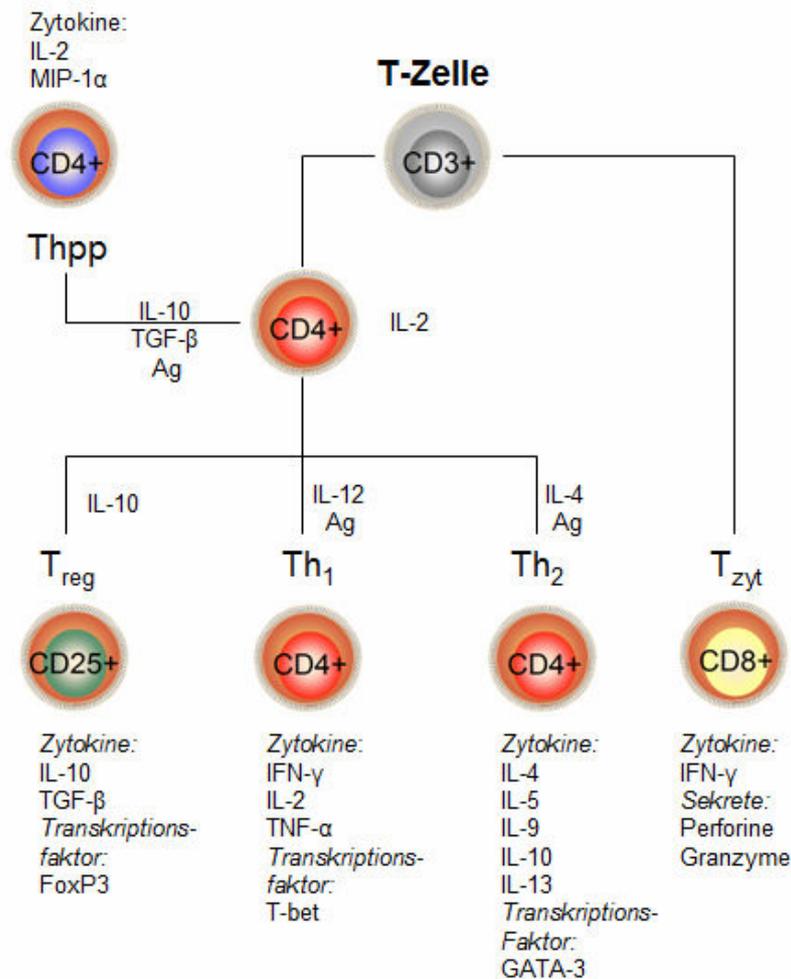


Abbildung 6: T Zellen: Subtypen und Marker

Ein kleiner Teil (10-20%) der CD4⁺ T Zellen können sich zu einer weiteren T Zell Subpopulation entwickeln. Kennzeichen dieser Zellen ist eine verstärkte Expression des Aktivierungsmarkers CD25 und der Besitz von FoxP3 als Transkriptionsfaktor. Dieser Zelltyp reguliert die Immunantwort der Teff Zellen durch die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF-β. Diese Zellen werden daher als regulatorische T(Treg) Zellen bezeichnet. In Gegenwart von IL-10 und TGF-β kommt es auch zur Bildung von Gedächtniszellen. Somit haben die Treg Zellen auch Einfluß auf die Entstehung der spezifischen Immunität.

1.7.2. Expression der CD73 auf CD4⁺ T Zellen

Neben Zytokinen und Chemokinen können aber auch andere Faktoren eine Immunantwort beeinflussen. Große Bedeutung kommt der Bildung von Zell-Zell-Kontakten zu (Borsellino et al. 2007). Bei einer Infektion werden Pathogene von Phagozyten aufgenommen und präsentieren einzelne Peptide mittels des MHCs.

Dieser Komplex wird von T-eff Zellen erkannt. Durch die Bindung dieses Komplexes an den TCR wird in erster Linie der Zell-Zellkontakt aufgebaut und die T-Zelle wird initial aktiviert. Anschließend kann durch extrazelluläres ATP eine Aufrechterhaltung des Stimulationsreizes erfolgen. ATP aktiviert den P2X7-Rezeptor (P2X7R) auf T-Zellen, was einen verstärkten Ca^{2+} -Influx bewirkt und einen aktivierten Status der Zellen aufrechterhält (Schenk et al. 2008). ATP wirkt hier über den P2X7R ähnlich wie die Bildung des CD28/B7-Komplexes, indem es bei T-Zellen eine Anergie („irreversible“ Inaktivierung) dieser verhindert.

Die Konzentration an extrazellulären ATP ist in Bereichen von entzündlichem Gewebe stark erhöht und stellt ein wichtiges proinflammatorisches Signal für T-Zellen dar. Reguliert werden kann dieses Signal über die extrazelluläre Adenin-Purin-Abbau-Kaskade, die im Wesentlichen durch die Ecto-Nukleotidasen CD39 und CD73 charakterisiert ist. Beide Enzyme werden von T-Zellen exprimiert, wobei der Grad der Expression dieser Enzyme von der T-Zell-Subpopulation abhängt. Auch nimmt der akute Status (nicht aktiviert/aktiviert) der T-Zelle Einfluss auf die Expressionsraten der Nukleotidasen. Ring et al. (2010) zeigte, dass nur ein geringer Anteil (10-20%) von $\text{CD4}^+ \text{CD25}^-$ Zellen die CD39 und die CD73 exprimieren. Dagegen exprimierten mehr als 80% der Treg-Zellen beide Ecto-Nukleotidasen. Stimulierung mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörper bewirkte auf den Treg-Zellen, nicht aber bei den $\text{CD4}^+ \text{CD25}^-$ Zellen eine signifikant stärkere Expression der CD73. Deaglio et al. (2007) konnte zeigen, dass $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{FoxP3}^+$ Treg-Zellen im Vergleich zu anderen T-Zell-Subpopulationen im erhöhten Maße die CD39 und die CD73 exprimieren. Dies wurde im selben Jahr von einer italienisch/deutschen Kooperation (Borsellino et al. 2007) bestätigt. Über 50% der $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{FoxP3}^+$ Treg-Zellen wiesen die CD39 und die CD73 auf. Neben Treg-Zellen exprimieren auch CD44^+ T-Gedächtniszellen die CD73 (Kobie et al. 2006). Regulatorischen T-Zellen stellen aber die einzige Population von T-Zellen dar, welche die vollständige Adenin-Purin-Nukleotid-Kaskade mit der CD39 und der CD73 exprimieren.

1.7.3. Die Rolle der CD73 auf T-Zellen bei der Regulation der Immunantwort

Es ist bekannt, dass exogenes Ado oder A2AR-Agonisten die Proliferation von T-Zellen hemmen (Huang et al. 1997, Erdmann et al. 2005). Auch können Ado bzw. A2AR-Agonisten die Freisetzung von Zytokinen wie IL-2, TNF- α oder IFN- γ

vermindern (Erdmann et al. 2005, Lappas et al. 2005). Hierfür werden *in-vitro* μMolare ($25\mu\text{M}$) Konzentrationen an Ado benötigt. Mit A2AR Agonisten lassen sich jedoch bereits Effekte bei Konzentrationen im nMolaren ($20\text{-}50\text{nM}$) zeigen (Lappas et al. 2005, Luthin et al. 1995).

Kobie et al. (2006) postulierte ein Modell zur Ado-vermittelten Regulation der Immunantwort von Th1 Zellen: ATP, das von sterbenden Zellen freigesetzt wird, wird über die CD39 neutrophiler Granulozyten zu 5'-AMP umgesetzt. Dieses 5'-AMP wird dann von der CD73 regulatorischer T Zellen oder T Gedächtniszellen zu Ado abgebaut und kann hemmend auf Teff Zellen einwirken. Sitkovsky et al. (2008) erweiterte dieses Modell (Abb. 7): Treg Zellen, die neben der Expression von Foxp3 und CD25 auch die CD39 und die CD73 exprimieren (Deaglio et al. 2007), wandeln ATP, das von sterbenden Zellen oder von den T Zellen selbst abgegeben wird (Schenk et al. 2008), zu Ado um. Dieses Ado kann dann bei Teff Zellen über den A2AR wirksam werden. Die Folge ist eine Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration. Dies konnte bei Splenozyten mittels Ado und bei T Zellen mit CGS 21680, einem spezifischen A2AR Agonisten, gezeigt werden (Huang et al. 1997). Gleichzeitig wird die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine gehemmt (Lappas et al. 2005) und die Proliferation von T Zellen eingeschränkt (Kobie et al. 2006), was Inflammationsprozesse verzögert.

Wahrscheinlich besteht zwischen der Regulation der Immunantwort durch Ado, welches von Treg Zellen gebildet wird, und dem Wachstum von Tumoren eine kausale Beziehung. Es ist bekannt, dass im Tumorgewebe Ado produziert wird (Ohta et al. 2006). Dieses Ado kann zum einen über eine Hypoxie induzierte Inhibition der AK angereichert worden sein (Decking et al. 1997). Zum anderen kann Ado durch die Aktivität (Synnestvedt et al. 2002) bzw. verstärkte Expression von Ektonukleotidasen auf humanen Melanomzellen (Dzhandzhugazyan et al. 1998) und anderen Zellen, wie Zellen des Gefäßsystems (Eltzschig et al. 2003) gebildet werden, wenn Tumorzellen vermehrt ATP freisetzen (DiVirgilio et al. 2009). Dieses Ado, das auch von Treg Zellen gebildet wird, vermittelt dann über den A2AR seine immunsuppressive Wirkung bei antitumoralen T Zellen. Die Folge ist eine Progression der Karzinomentwicklung.

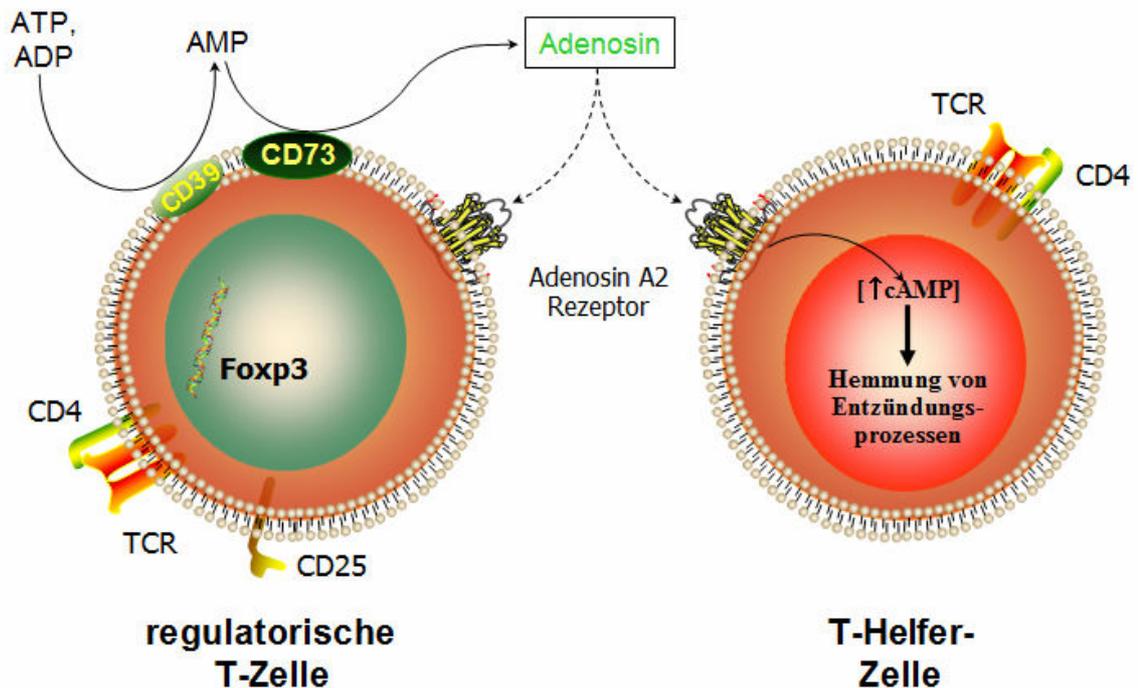


Abbildung 7: Modell zur Regulation der Immunantwort bei T-Effektor-Zellen über den Adenosin A2 Rezeptor und durch von regulatorischen T Zellen gebildeten Adenosins (nach Sitkovsky et al. 2008)

Zusammengefasst zeigen die bisherigen Studien, dass die CD73 auf Subpopulationen von T Zellen exprimiert wird (Kobie et al. 2006) und eine Koexpression der CD39 und CD73 überwiegend auf Treg Zellen zu finden ist (Deaglio et al. 2007, Borsellino et al. 2007). Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 führt zu einer Erhöhung der Expressionsrate der CD73 auf Treg Zellen (Ring et al. 2010). Desweiteren kann *in-vitro* durch Gabe von Ado (Huang et al. 1997) bzw. A2A Agonisten (Luthin 1995, Lappas et al. 2005) die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine gehemmt werden. In Kokultivierungsversuchen konnte gezeigt, dass Treg Zellen die Fähigkeit besitzen, die Proliferation von Teff Zellen zu hemmen. Desweiteren hemmt auch AMP die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine bei Teff Zellen, aber nur in Gegenwart von Treg Zellen. Vermittelt werden diese suppressiven Effekte des Ado über den A2AR (Kobie et al. 2006).

2. Zielsetzung

Die in der Literatur vorliegenden Befunde weisen darauf hin, dass der CD73 und dem A2AR eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort von T Zellen zukommt. Diese Befunde sind aber indirekter Natur und beruhen in wesentlichem auf Ansätzen unter Verwendung von pharmakologischen Dosen von Ado. Deshalb soll im ersten Teil dieser Arbeit anhand von CD73^{-/-} Mäusen die physiologische Rolle der CD73 bei der Immunantwort von CD4⁺ T Zellen *in-vitro* untersucht werden. Im Wesentlichen sollten im ersten Teil folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie ist die quantitative Verteilung CD73 positiver und CD73 negativer CD4⁺ T Zellen in der murinen Milz?
2. Setzen murine T Zellen infolge antigener Stimulation ATP frei?
3. Beeinflusst die CD73 auf T Zellen unter antigenen Stimulationsbedingungen die nukleare Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB?
4. Beeinflusst die CD73 die Freisetzung der Zytokine IL-2 und IFN-γ aus T Zellen?
5. Beeinflusst das von der CD73 gebildete Ado der Treg Zellen die Proliferation von Teff Zellen?
6. Welche Zytokine werden infolge antigener Stimulation von Treg Zellen freigesetzt und wie verändert eine Aktivierung des A2AR das Zytokinprofil von Treg Zellen und Teff Zellen?

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob phosphorylierte A2AR Agonisten als *prodrug* dienen können, um die antiinflammatorische Wirkung des A2AR ortsspezifisch in inflammatorischen Arealen zu nutzen. Wie in Abbildung 8 gezeigt sind diese AMP-Derivate zunächst biologisch unwirksam. Der entsprechende A2AR Agonist (*drug*) wird erst nach der Dephosphorylierung des *prodrugs* durch die CD73 freigesetzt.

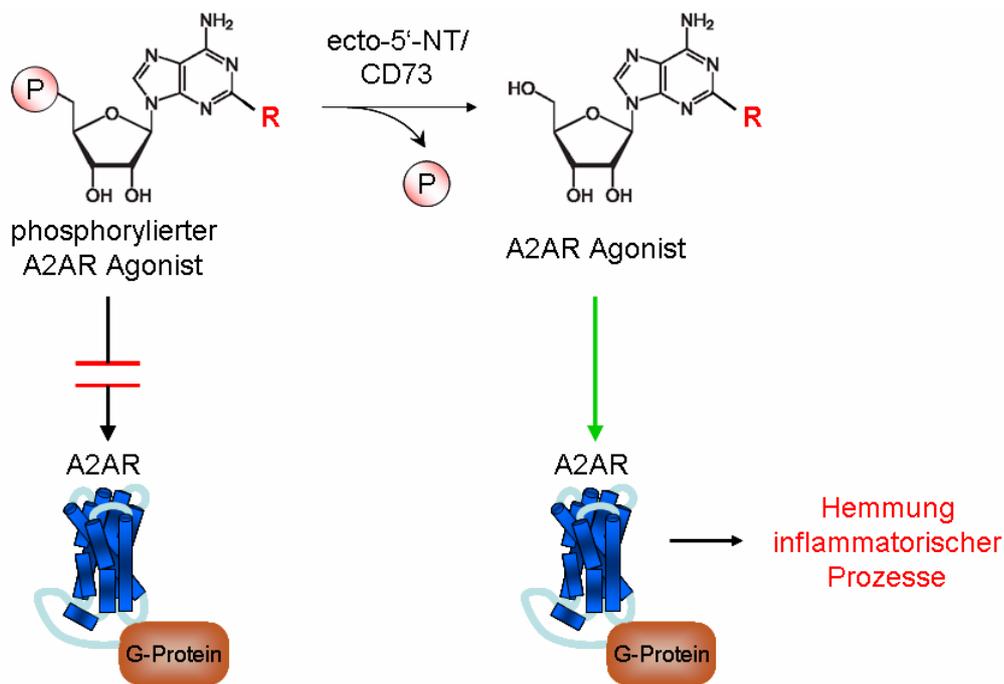


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Aktivierung phosphorylierter A2AR Agonisten (*prodrug*) durch die CD73 zur Freisetzung des entsprechenden wirksamen A2AR Agonisten (*drug*).

Um dieses *prodrug* Konzept zu überprüfen, wurden Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt, die antiinflammatorische Wirkung als auch die vasodilatatorischen Effekte ausgewählter neu synthetisierter phosphorylierter A2AR Agonisten *in-vitro* und *in-vivo* zu analysieren. Folgende Fragestellungen wurden im Einzelnen untersucht:

1. Überprüfung der inhibitorischen Wirkung von Propylthio(pt)-Ado/AMP und Cyclohexylethylthio(chet)-Ado/AMP auf die IFN- γ Freisetzung von CD4⁺ T Zellen *in-vitro*.
2. Überprüfung des Einflusses von pt-Ado/AMP und chet-Ado/AMP auf die koronare Hämodynamik im isoliert perfundierten Herzen.
3. Überprüfung des Einflusses von chet-Ado/AMP auf die arteriellen Hämodynamik *in-vivo*.
4. Überprüfung der antiinflammatorischen Wirkung von chet-Ado/AMP im Kollagen-induzierten Arthritis Modell (CIA).

3. Versuchstiere und Methoden

Allgemeines. Alle verwendeten Chemikalien, Puffer, Medien, Lösungen, Assay Kits, Antikörper und sonstige Substanzen sind mit entsprechendem Vertreiber im Kapitel 10 (Materialien) aufgeführt.

3.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Abstammung und Herkunft. Die Tiere für die Experimente waren transgene Mäuse mit einem ubiquitären *knockout* des *cd73* Gens. Diese Tiere wurden von Koszalka et al. 2004 auf NMRI Hintergrund generiert und bis Mitte 2006 über 10 Generationen auf C57Bl/6 Hintergrund zurückgekreuzt. Die wildtypischen Kontrolltiere entstammten der gleichen Zuchtlinie. Verwendet wurden ausschließlich männliche Tiere im Alter zwischen 8 und 12 Wochen.

Haltungsbedingungen. Die Tiere werden in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in Standardhaltungsräumen in transparenten Makrolonkäfigen zu höchstens 3 Tieren gehalten. Die Käfige besitzen die Maße 21cm x 14cm x 28cm (B x H x T), sind mit einem Metallgitter abgedeckt und mit groben, staubfreien Holzspänen als Einstreu ausgelegt. Einmal wöchentlich findet ein Wechsel der Einstreu statt. Als Nahrungsquellen steht den Tieren standardisiertes Pelletfutter (Ssniff) sowie Wasser *ad libitum* zur Verfügung. In den Haltungsräumen herrscht ein konstanter 12h-Licht-/12h-Dunkelzyklus (Helligkeitsphase von 6:00 Uhr – 18:00 Uhr) und die Raumtemperatur wird ständig bei $21\pm 1^\circ\text{C}$ gehalten. Die relative Luftfeuchtigkeit beträgt in den Haltungsräumen $45\pm 5\%$.

3.2. Immunhistologie

Die Immunhistologie oder auch Immunhistochemie (IHC) bezeichnet eine Methode in der Proteine mittels Antikörper und einem Detektionssystem auf Gewebeschnitten sichtbar gemacht werden können. Mittels der IHC können Membran-ständige, zytosolische aber auch nukleare Proteine nachgewiesen werden. Dementsprechend erfolgt die Beurteilung der IHC immer im morphologischen Kontext. Man unterscheidet in der IHC die direkt Immunfluoreszenz (DIF), bei der der Detektions (Primär)-Antikörper direkt an ein Fluorfluor gekoppelt ist, von der indirekte Immunfluoreszenz (IIF). Bei der IIF wird zur Detektion des Zielproteins ein Fluorfluor

gekoppelter Sekundär-Antikörper verwendet, der spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet ist. In der vorliegenden Arbeit kam die IIF zur Anwendung.

Durchführung. Nach zervikaler Dislokation und nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde den Mäusen die Milz entnommen. Diese wurde anschließend in *Tissue Freezing Medium* eingebettet und auf -40°C vorgekühltem Isopentan eingefroren. Anschließend wurden 5-8 μM dicke Kryoschnitte angefertigt und auf Glasobjektträger (HistoBond[®] Marienfeld) aufgezogen. Nachdem die Schnitte getrocknet waren erfolgte die immunhistologische Färbung.

Nach Fixierung der Schnitte mittels Zamboni-Fixativ wurden die Präparate zweimal je 5-10 Min. in PBS und einmal 5-10 Min. in PBS (+ 0.1% Saponin) gewaschen. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen erfolgte eine Inkubation der Objektträger für 90 Min. in 5% *normal goat serum* (in PBS + 0.1% Saponin). Die Primär-Antikörper CD3 bzw. CD73 wurde nach Herstellerangaben 1:200 in 2% *normal goat serum* in (PBS + 0.1% Saponin) verdünnt und auf die Schnitte aufgetragen. Nach Inkubation der Objektträger über Nacht bei 4°C wurde der überschüssige Antikörper durch 3maliges waschen (je 10 Min. in PBS + 0.1% Saponin) entfernt. Anschließend wurden die Sekundärantikörper in empfohlener Verdünnung auf die Schnitte gegeben. Es folgte eine weitere Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss. Nach erneutem Waschen wurden die Präparate mit DAPI eingedeckt.

Die Präparate wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (BX50, Olympus) unter Verwendung der Fluoreszenzfilter U-NIBA3 (470-495nm), U-MNU2 (360-370nm) und UMNG2 (530-550nm) betrachtet. Aufnahmen der Präparate wurde mit dem Programm AnalySIS B durchgeführt.

3.3. Aufreinigung muriner Leukozyten

3.3.1. Homogenisation muriner Milzen

CD4⁺ T Zellen wurden aus der Milz von naiven Mäusen isoliert. Die Milz ist ein Organ des lymphatischen Systems und setzt sich im Wesentlichen aus zwei Bereichen zusammen: die rote und die weiße Pulpa.

Durchführung. Nach zervikaler Dislokation und nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde den Mäusen die Milz entnommen und in MACS Puffer überführt. Anschließend wurde die Milz mit einem Skalpell zerkleinert und durch ein 70 μm Zellsieb (BD

Falcon™) gedrückt. Nach Lyse der Erythrozyten mit ACK-Lysepuffer (5ml, 3 Min. auf Eis) und anschließendem Waschschrift erfolgte die eigentliche Separation der Zielzellen aus der resultierenden Zellsuspension. Hierfür wurde eine Separations-Technik angewandt, die magnetischen Eisenpartikeln, sog. MicroBeads, verwendet. Diese Technik wird MACS Separation (**MA**gnetic **C**ell **S**orting) genannt.

3.3.2. MACS (**MA**gnetic **C**ell **S**orting) Separation

Das Prinzip der MACS Separation verwendet MicroBeads, die an zellspezifische Antikörper gekoppelt wurden, um zunächst bestimmte Zellen magnetisch zu markieren. Anschließend wird die Zellsuspension auf eine Trennsäule aufgebracht, die in einem magnetischen Feld des *MACS Separator*, einem kommerziell erhältlicher Magneten, platziert wurde. Magnetisch markierte Zellen verbleiben hier an der Säule, wohingegen nicht markierte Zellen durch sie hindurch laufen. Die durchgelaufene Zellfraktion ist somit von den MicroBead markierten Zellen depletiert (negative Selektion). Nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld können die an der Säule magnetisch verbliebenen Zellen als positiv selektierte Fraktion eluiert werden.

Durchführung. In dieser Arbeit kamen für die Isolierung muriner T Zellen sowohl CD4 und CD90 MicroBeads als auch das CD4⁺/CD25⁺ *regulatory T Cell Isolation Kit* zur Anwendung. Mit den CD4 bzw. CD90 MicroBeads wurden die entsprechenden Zielzellen positiv selektiert. Hierfür wurde zunächst die Zellzahl der Milzhomogenate bestimmt. Anschließend wurden die Zellen mit 10µl MikroBeads in 90µl MACS Puffer pro 1×10^7 Zellen markiert und 15 Min. bei 4° C (Kühlschrank) inkubiert. Nach Zentrifugation (300g, 4° C, 10 Min.) erfolgte eine Resuspension der Zellen in 500µl MACS Puffer pro 1×10^8 Zellen. Folgend wurde die Zellsuspension auf die sich im *MACS Separator* (QuadroMACS™, Miltenyi Biotech GmbH) befindliche Trennsäule (LS Columns, Miltenyi Biotech GmbH) aufgetragen. Die Trennsäule wurde vor Auftragung einmal mit 3ml MACS Puffer und nach Auftragung der Zellen dreimal mit 3ml MACS Puffer gespült. Zum einem wurde so die Säule kalibriert, zum anderen wurden die nicht mit MikroBeads markierten Zellen aus der Säule entfernt. Nachdem die Trennsäule aus dem *MACS Separator* entfernt wurde, konnten die eigentlichen Zielzellen (CD4⁺ T Zellen bzw. CD90⁺ T Zellen) mit 5ml MACS Puffer und einem Druckkolben von der Trennsäule eluiert werden. Abschließend wurde noch einmal die Zellzahl bestimmt (Vitalfärbung: s. 3.3.3.) und mit RPMI-1640 (+/- 10% FKS) bzw.

Panserin 413 eingestellt. Bei der Verwendung des *regulatory T Cell Isolation Kit* wurden die Erythrozyten der Milz nicht lysiert. Nach Auszählen der kernhaltigen Zellen im Milzhomogenat mittels Türk'Lösung wurden zunächst Erythrozyten (Ter-119⁺), phagozytierende Zellen (CD11b⁺), NK-Zellen (CD49b⁺) und B Zellen (CD45R⁺) über einen Biotin-Antikörper-Cocktail und Streptavidin-MikroBeads an eine erste Trennsäule (LD Columns, Miltenyi Biotech GmbH) gebunden. Im Durchfluss sind somit die CD4⁺ T Zellen der Milz angereichert. Anschließend werden die CD25⁺ Zellen aus dieser Zellsuspension positiv selektiert. Die CD4⁺/CD25⁺ Treg Zellen müssen von einer zweiten Trennsäule (MS Columns + MiniMACSTM, Miltenyi Biotech GmbH) eluiert werden, wohingegen sich die CD4⁺ T Zellen im Durchfluss befinden.

3.3.3. Zellzahlbestimmung und Vitalfärbung

Die Neubauer-Zählkammer ist eine Glasplatte mit eingeätzten, quadratischen Feldern definierter Größe. Das Volumen eines Eckquadrates beträgt nach Aufbringen des Deckglases 0.1mm^3 (h x A: $0.1\text{mm} \times 1\text{mm}^2$), was $0.1\mu\text{l}$ entspricht. Durch Auszählen der auf den Zählfeldern liegenden Zellen lässt sich deren Anzahl pro Volumenanteil bestimmen. Unter dem Durchlichtmikroskop wurden hierfür jeweils die vier großen Eckquadrate ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Um den Anteil an Lebendzellen zu ermitteln, wurde eine Vitalfärbung mit Trypanblau durchgeführt. Trypanblau ist ein saurer Azo(-N=N-)-Farbstoff, dessen Anion an Proteine bindet und somit einen einseitigen Fluss des Farbstoffs in die Zelle gewährleistet. Der Test nutzt die veränderte Membrandurchlässigkeit abgestorbener Zellen. Lebende Zellen nehmen diesen Farbstoff nicht auf und erscheinen leuchtend hell, tote Zellen dagegen sind durchlässig für Trypanblau und erscheinen dadurch tiefblau.

Durchführung. Zunächst wurde die Zellsuspension geeignet in PBS bzw. einer Trypanblaulösung verdünnt. Im Allgemeinen wurden 1:50 bzw. 1:5 Verdünnungen verwendet. Die verwendete Endkonzentration des Trypanblau bei einer Verdünnung dieses von 1:2 lag bei 0,2% und die Zählung startete nach 5 Min. Einwirkzeit. Hierfür wurden die Zellen in eine Neubauer-Zählkammer (OptikLabor) gegeben und ausgezählt. Bei der Vitalfärbung wurden zuerst die blau gefärbten Zellen, anschließend alle Zellen in den Eckquadraten gezählt. Die Differenz zwischen der Gesamtzellzahl und der Anzahl der blau gefärbten Zellen ergab den Anteil der lebenden Zellen. Die Zellzahl pro ml ergab sich, indem man den ermittelten Mittelwert mit dem Verdünnungsfaktor und dem Wert 1×10^4 multipliziert.

3.3.4. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting) wurde u.a. verwendet, um die Reinheit der isolierten Zellen und die Anwesenheit der CD73 auf diesen zu bestimmen. Eine FACS Analyse ermöglicht das Analysieren und Zählen von Zellen anhand physikalischer und molekularer Eigenschaften. Zellen, die vorher mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Antikörper markiert wurden, werden im Durchflusszytometer an einem Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet, um den Fluoreszenzfarbstoff der Antikörper zur Abgabe von Photonen anzuregen. Die emittierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörper pro Zelle. Zusätzlich werden durch Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Granularität der Zellen gewonnen.

Durchführung. Pro Ansatz wurden 5×10^5 Zellen in ein FACS Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 2ml FACS Puffer erfolgte ein Zentrifugationsschritt (250g, 4° C, 10 Min.). Anschließend wurde der Überstand auf Zellstoff abgekippt, so dass nur noch ca. 50µl Restflüssigkeit im FACS Röhrchen verblieben. Nach Zugabe der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern (5µl) wurden die Proben kurz gevortext und bei 4° C (Kühlschrank) inkubiert. Durch Zugabe von 1ml FACS Puffer wurde die Bindungsreaktion abgestoppt und die Proben wurden nach Zentrifugation (250g, 4° C, 10 Min.) und erneutem Abkippen des Überstandes in 500µl FACS Puffer resuspendiert. Bis zur Analyse mit dem FACS Calibur (BD Bioscience™) wurden die Proben vor Lichteinfall geschützt. Bei Verwendung von Epitop spezifischen Antikörpern, die keinen Fluoreszenzfarbstoff aufwiesen, kam ein Zweitantikörper mit Fluoreszenz zum Einsatz der gegen die große Kette des Epitop spezifischen Antikörper gerichtet war. Hier betrug die Inkubationszeit je Antikörper 30 Min.. Als Negativkontrollen wurden Isotyp markierte Zellen mitgeführt. Ein isotyper Antikörper ist ein Antikörper, der die gleiche große Kette wie der eigentliche Testantikörper aufweist, aber keine Spezifität für das zu detektierende Epitop zeigt. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurden den Proben teilweise vor der Analyse eine Propidium-Iodid (PI) Lösung nach Herstellerangaben oder ToPro3 (10µM, 1:100) zugegeben. Propidium-Iodid als auch ToPro3 sind Fluoreszenzfarbstoffen, die in tote oder absterbende Zellen eindringen können und in deren DNA interkalieren.

3.4. Stimulation von murinen Leukozyten

3.4.1 Antikörper induzierte Stimulation

Die murinen T Zellen wurden zum einem mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper stimuliert. Der anti-CD3 Antikörper war gegen die ϵ -Untereinheit des T Zellrezeptors gerichtet, was zu einer Aktivierung dieses führt. Anti-CD28 wurde als Kostimulator verwendet, um die T Zellantwort zu verstärken (Greenwald et al. 2005) und als „Analoga“ zu B7-Molekülen auf APCs eine Anergie (irreversible Inaktivierung) der T Zellen verhindert. Beide Antikörper aktivieren die Phospholipase C γ (PLC γ), was eine Freisetzung von Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP3) zur Folge hat. DAG wiederum stimuliert die Proteinkinase C θ (PKC θ), die zur Aktivierung von NF- κ B beiträgt. IP3 erhöht über Ca $^{2+}$ Kanäle des sarkoplasmatischen Retikulums die Konzentration des zytosolischen Ca $^{2+}$. Ca $^{2+}$ fördert wesentlich die Aktivierung von NFAT. Sowohl NF- κ B als auch NFAT tragen zur Freisetzung von Zytokinen aus T Zellen bei. Die generell verwendete Konzentration für anti-CD3 lag bei 0.4 μ g/ml. Die generelle Verwendung von anti-CD28 lag bei 2.5 μ g/ml. Die entsprechenden Zellkulturplatten (96 Well, 24 Well, 6 Well, TPP®) wurden jeweils am Vorabend mit den Antikörpern beschichtet und bei 4° C (Kühlschrank) gelagert. Die Kopplung der Stimulationsantikörper an die Zellkulturplatten ist für die Aktivierung der Zellen von entscheidender Bedeutung, da die Kombination von Antikörper und einer größeren Oberfläche den T Zellen die Gegenwart einer Antigen präsentierenden Zelle simuliert. Ähnliche Verhältnisse ergeben sich auch durch die Verwendung von *beads* (1 *bead*/Zelle), an die die Stimulationsantikörper anti-CD3 und anti-CD28 gekoppelt wurden. Die *bead* basierende Stimulation ermöglicht bereits eine Aktivierung der Zellen in Lösung, wohingegen sich die Zellen im Fall der mit Antikörper beschichteten Zellkulturplatten erst am Boden absetzen müssen.

3.4.2. PMA/Ionomycin induzierte Stimulation

PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetat) ist ein Phorbolster, der strukturelle Ähnlichkeit zu DAG aufweist und in T Zellen ähnlich wie DAG zu einer Aktivierung der PKC θ beiträgt. Ionomycin ist eine Ca $^{2+}$ -Ionophore, die wie IP3 die zytosolische Konzentration an Ca $^{2+}$ beeinflusst. Das PMA wurde mit einer Konzentration von 0.2 μ g/ml und das Ionomycin mit einer Konzentration von 1 μ M (~0.75 μ g/ml) eingesetzt.

3.5. Nachweis von Nukleotiden/Nukleosiden und Nukleotidaseaktivität

3.5.1. Nukleotid/Nukleosid-Nachweis mittels HPLC

Die **High-Pressure-Liquid-Chromatography** (HPLC) ist eine chromatographische Technik zur Auftrennung von Stoffgemischen. Hierzu wird eine mobile (flüssige) Phase, die die zu detektierenden Substanzen enthält, durch hohen Druck über eine stationäre Phase geführt. Die stationäre Phase dient zur Auftrennung des Substanzgemisches. Hierbei macht man sich die unterschiedlichen chemischen und physikochemischen Eigenschaften (Löslichkeit, Azidität bzw. Basizität, Molekulargewicht) der aufzutrennenden Substanzen zu nutze. Bei der hier angewandten reversen Phasen-Chromatography kommt eine unpolare stationäre Phase zum Einsatz von der zuerst polare Substanzen, anschließend unpolare Substanzen eluiert werden. Die Eluierung erfolgte durch einen Gradienten im Lösungsmittel. Ein Photometer dient als Detektor für die Eluate.

Durchführung. Die Überstände (~200µl) von CD4⁺ T Zellen, die mittels Antikörper beschichteter Zellkulturplatten für 18 Stunden stimuliert wurden, wurden zunächst auf Eis einer Säurefällung unterzogen. Hierfür wurden die Proben zunächst mit 75µl Perchlorsäure (1M) versetzt, wodurch der pH Wert der Proben auf 1 eingestellt wurde. Nach Zentrifugation (10 Min., 4000rpm, 4° C) wurde der Überstand in ein neues Eppendorff-Gefäß überführt und der pH Wert der Proben wurde mit 22,5µl K₃PO₄ auf 7 zurückgeführt. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 Min., 4000rpm, 4° C) wurden die Überstände erneut in ein neues Eppendorff-Gefäß überführt. Die Säurefällung dient der Beseitigung von Proteinen, die in den Überständen vorhanden sein und die Trennsäule verstopfen können. Für den Nachweis von Inosin, Ado und AMP mit der HPLC (WatersTM) wurden 150µl des Probenmaterials in die *Inlays* der HPLC *Vials* gegeben. Das Injektionsvolumen betrug 100µl. Als stationäre Phase diente eine Novapak C18 Silikasäule, mobile Phasen waren ein Ammoniumacetat Puffer (Eluat A) und 70%iges Methanol (Eluat B). Die Flußbedingungen für beide Eluenten sind in Tabelle 3 gezeigt. Die Detektion der nachzuweisenden Substanzen erfolgte mittels eines UV-VIS Detektors bei einer konstanten Wellenlänge von 254nm.

Tabelle 3: HPLC Flußbedingungen der Eluate A/B zum Nachweis von Adenosin, Inosin und AMP

Zeit	Flußrate [ml/min.]	Eluat A [%]	Eluat B [%]
0	1	95	5
9	1	65	35
10	1	0	100
20	1	0	100
25	1	95	5
30	1	95	5

3.5.2. ATP Nachweis mittels Luciferin/Luciferase Assay

Zur Bestimmung des ATP Gehaltes in zellulären Überständen wurde die Enzymaktivität der Luciferase verwendet. Luciferasen sind Enzyme, die Luciferin in Gegenwart von Sauerstoff in energiereiche, instabile Peroxide (Dioxetane) verwandelt (Abb. 9). Beim Zerfall dieser Peroxide kommt es zur Biolumineszenz. Die Luciferase des Leuchtkäfers (*firefly*) benötigt zur Bildung von Peroxid ATP. Da die Luciferase hochspezifisch ist, lassen sich minimale Menge an ATP quantitativ nachweisen.

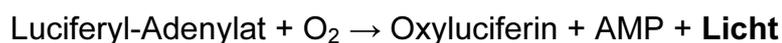


Abbildung 9: Reaktionen von Luciferin in Gegenwart von ATP und O₂

3.5.2a. Nachweis der ATP Stabilität in RPMI-1640 (+10% FKS)

Der Nachweis eines möglichen Abbaus von ATP in mit FKS angereichertem RPMI-1640 erfolgte über die Ermittlung der Stabilität von ATP im Zellkulturmedium. Hierfür wurde das verwendete Medium bzw. FKS mit einer bestimmten Konzentration an ATP versetzt. Anschließend wurde der Gehalt an ATP in den zu untersuchenden Lösungsmitteln über die Zeit ermittelt.

Durchführung. RPMI-1640, das 10% FKS beinhaltete, wurde mit verschiedenen Konzentrationen an ATP (200nM bis 200pM) versetzt. Gleichzeitig wurde ARL 67156

[100µM], ein unspezifischer Nukleotidase-Inhibitor, hinzugegeben. Je Konzentrationsansatz wurden 100µl des Luciferin/Luciferase Assay Mix (1:25 in entsprechenden Assay Dilution Buffer) in ein Reaktionsgefäß vorgelegt. Nach 3 Minuten Inkubation bei RT erfolgte eine Messung der Eigenbiolumineszenz des Luciferin/Luciferase Assay Mix mit einem Bioluminometer (Biolumat LB 9500T, Berthold). Anschließend wurden je 100µl Probe in die Reaktionsgefäße gegeben und die ATP bedingten Lichtemissionen wurden über einen Zeitraum von 10 Sekunden integriert. Das restliche Probenmaterial wurde für 45 Minuten bei RT belassen. Anschließend erfolgte eine erneute Messung der Proben in einem frisch angesetzten Luciferin/Luciferase Assay Mix.

Desweiteren wurde RPMI-1640 und FKS (10%) separat mit 200nM ATP versetzt. Als Kontrolle diente PBS mit 200nM ATP. Wie vorangehend beschrieben wurden auch hier die initiale Biolumineszenz gemessen. Nach Ablauf von 1 Stunden erfolgte eine weitere Messung. Die Proben wurden während dieser Stunde bei RT belassen.

3.5.2b. Zeit-aufgelöste Messungen von ATP

Für die in dieser Arbeit aufgeführten Zeit-aufgelösten ATP Messungen wurde der Luciferin/Luciferase Assay Mix 1:2 in RPMI-1640 verdünnt. Die Reaktionsansätze hatten ein Volumen von 50µl. Die ATP-bedingten Lichtemissionen wurden mit einem multifunktionalen Mikroplatten-Reader (FLUORstar OPTIMA, BMG LABTECH), der auch Zeit-aufgelöste Messungen erlaubte, dokumentiert.

Durchführung. Um die Empfindlichkeit des Luciferin/Lucifase Assay unter den in dieser Arbeit angewendeten Bedingungen zu überprüfen, wurden zunächst Standardkurven erstellt. Hierfür wurde RPMI-1640 mit 10pmol, 8pmol, 4pmol, 2pmol und 0.2pmol ATP versetzt. Anschließend wurden jeweils 25µl in ein Well einer 96-Loch Zellkulturplatte (TPP®) gegeben. Nach Zugabe von jeweils 25µl des Luciferin/Luciferase Assay Mix (1:2, s. oben) erfolgte eine kontinuierliche Messung der Lichtemission über 30 Minuten bei 37° C.

Um die Reaktivität des Luciferin/Luciferase Assay während/nach verschiedenen Inkubationsbedingungen zu überprüfen, wurde der Luciferin/Luciferase Assay in Reaktionsansätzen von 50µl (s.oben) in Gegenwart von 0pmol, 0.2pmol und 2pmol bei 37° C vorinkubiert. Anschließend wurden jedem Ansatz 2pmol (2µl) ATP hinzugegeben und die initialen Lichtemissionen wurden mit dem voran aufgeführten

Mirkoplaten-Reader bestimmt. Als Referenz dienten 25µl RPMI-1640 + 2pmol ATP in 25µl frisch angesetztem Luciferin/Luciferase Assay Mix (1:2).

Für die Messung von ATP in den Überständen zellulärer Ansätze bzw. für die Messung der ATP Freisetzung aus stimulierten T Zellen wurden zunächst CD4⁺ T Zellen wie in Kap. 3.3. beschrieben isoliert und mit RPMI-1640 wurde die Zellzahl auf 16×10^6 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden 25µl in ein Well einer 96-Loch Zellkulturplatte (TPP®) vorgelegt. Je nach Stimulierung (s. Kap. 3.4.) waren die Wells jeweils vorher mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörper beschichtet worden oder PMA/Ionomycin wurde den Zellen in Lösung zugegeben. Nach Inkubationen (37° C, 5% CO₂) von 0, 0.5, 1, 1.5, 2, ... und 5 Stunden wurde den zellulären Ansätzen jeweils 25µl des Luciferin/Luciferase Assay Mix (1:2) zugegeben. Der Nachweis ATP-bedingter Lichtemissionen erfolgte folgend für 30 Min. bei 37° C im Mikroplatten-Reader (FLUORstar OPTIMA, BMG LABTECH).

3.5.2c. ATP Messungen unter Flussbedingungen

Da der Luciferin/Luciferase Assay über die Zeit kein konstantes Lichtsignal liefert und um die Möglichkeit des zellulären ATP Abbaus zu vermindern, wurden in weiteren Untersuchungen zur ATP Freisetzung aus T Zellen Durchfluskkammern (μ -slides I^{0.2} Luer, *uncoated*, ibidi; Abb. 10) verwendet. Diese erlauben unter Einsatz eines Pumpensystems Untersuchungen an Zellen unter konstanten Flussbedingungen.



Abbildung 10: μ -slide Luer Durchfluskkammer; von www.ibidi.com

Durchführung. Um eine Adhärenz der T Zellen zu begünstigen, wurden die Flusskammern am Vorabend mit CD4 Antikörper beschichtet. Hierfür wurden 100µl einer 2.5µg/ml CD4 Antikörperlösung in die Flusskammern geben. Anschließend wurden die Kammern über Nacht bei 4° C gelagert. Nach Isolation von CD4⁺ T Zellen wie in Kap. 3.3. beschrieben, wurde die CD4⁺ Antikörperlösung aus der Flusskammer entfernt und 100µl einer CD4⁺ Zellsuspension (4×10^6 Zellen/ml) wurde hineingegeben. Eine Inkubation (37° C, 5% CO₂) von 4 Stunden ermöglichte

es den Zellen in der Kammer zu adhären. In einem offenen Flusssystem wurde über einen Schlauch einseitig eine *Infors* Pumpe (Precidor, Infors AG) installiert, über die die Flusskammer mit Flussraten von zunächst 10 μ l/s (15 Min.) anschließend 5 μ l/s mit RPMI-1640 perfundiert wurde. Am offenen Ende des Flusssystems hinter der Flusskammer wurden ununterbrochen jeweils über einem Zeitraum von 5 Min. Aliquots des perfundierten Mediums aufgefangen. Diese Aliquots wurden sofort mit dem Luciferin/Luciferase Assay auf den Gehalt von ATP im Bioluminometer (Biolumat LB 9500T, Berthold) überprüft. Nachdem konstant geringe ATP Mengen nachzuweisen waren, wurde über eine weitere *Infors* Pumpe (Precidor, Infors AG) seitenständig dem RPMI-1640 PMA/Ionomycin als Stimulus zugefügt. Weiter wurden Aliquots des perfundierten Mediums gesammelt und auf ihren Gehalt an ATP mit dem Luciferin/Luciferase Assay überprüft.

3.6. Aktivierung von Transkriptionsfaktoren

3.6.1a. *in-vitro* Kultivierungsbedingungen von Splenozyten

Zur Bestimmung der DNA Bindungsaktivität von NF- κ B in murinen Splenozyten wurden zunächst wie unter 3.3.1. ein Homogenat aus Milzzellen hergestellt. Jedoch wurde bereits nach dem Waschschrift, der auf die Lyse der Erythrozyten im Homogenat erfolgte, die Zellzahl auf 2.5 x 10⁶ Zellen pro ml RPMI-1610 eingestellt. Anschließend wurden je 2 x 10⁶ Zellen in ein mit Antikörper (Konz.: s. 3.4.1 (400 μ l)) beschichtetes Well einer 24-Well-Zellkulturplatte vorgelegt. Nach Inkubationszeiten von 15 Min., 30 Min., 60. Min. und 120 Min. bei 37° C und 5%iger CO₂-Atmosphäre wurden die Zellen mittels einer 1000 μ l Pipette von der Zellkulturplatte abgenommen und in ein 2ml Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend erfolgte eine vollständige Extraktion der Proteine (s. Kap. 3.6.2a.).

3.6.1b. *in-vitro* Kultivierungsbedingungen von CD90⁺ Zellen

Zur Bestimmung der DNA Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren in murine CD90⁺ T Zellen wurden die Zellen zunächst wie unter 3.3. beschrieben isoliert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde diese auf 4 x 10⁶ lebende Zellen pro ml Panserin 413 eingestellt. Anschließend wurden je 8 x 10⁶ Zellen in ein mit Antikörper (Konz.: s. 3.4.1. (2ml)) beschichtetes Well einer 6-Well-Zellkulturplatte vorgelegt. Nach einer Stimulationszeit von 16 Stunden bei 37° C und 5%iger CO₂-Atmosphäre wurden die Zellen mittels einer 1000 μ l Pipette und einmaligem nachspülen mit 1ml Panserin 413

von der Platte gelöst und in ein 15ml Falcon überführt. Anschließend erfolgte eine Extraktion der nuklearen Proteine (s. Kap. 3.6.2b.).

3.6.2a. Vollständige (totale) Proteinextraktion

Hierfür wurden die Zellen zunächst bei 16.1×10^3g , $4^\circ C$ und für 2 Min. zentrifugiert und anschließend in 1ml PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (16.1×10^3g , $4^\circ C$, 2 Min.) wurde der Überstand verworfen und die Extraktion der Proteine erfolgte durch Zugabe von 50 μ l TotEx (**Total Extraction**) Puffer und 10 Min. Inkubation auf Eis. Letztendlich wurden zelluläre Bestandteile der Proben, bevor die Proteinkonzentration bestimmt und die Extrakte (Überstände) bei $-80^\circ C$ verwahrt wurden, für 30 Min. bei $4^\circ C$ und 16.1×10^3g abzentrifugiert.

3.6.2b. Nukleare Proteinextraktion

Hierfür wurden die Zellen zunächst bei 300g und $4^\circ C$ für 10 Min. zentrifugiert und anschließend in 1ml PBS resuspendiert. Nachdem die Zellen erneut zentrifugiert wurden (400g, $4^\circ C$, 5 Min.), wurden diese für 10 Min. auf Eis in 50 μ l *swelling* Puffer belassen. Die eigentliche Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 3.5 μ l des Detergenz NP40 (10%ig). Hierfür wurden die Zellen nach gutem Mischen eine weitere Minute auf Eis belassen und folgend bei 16.1×10^3g bei $4^\circ C$ für 1 Min. abzentrifugiert. Der Überstand (zytoplasmatische Fraktion) wurde verworfen, und das Pellet wurde im *swelling* Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 30 μ l Nuklear-Extraktions-Puffer resuspendiert und die nukleare Extraktion erfolgte bei $4^\circ C$ (Kühlraum) unter ständiger Rotation (1400rpm) im Thermomixer (Eppendorf AG). Abschließend wurde das Pellet noch einmal bei $4^\circ C$ für 10 Min. abzentrifugiert. Bevor der Überstand, die nukleare Fraktion, bei $-80^\circ C$ aufbewahrt wurde, erfolgte eine Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Protein Assay.

3.6.3. BCA Protein Assay

Die Methode der BCA (**BicinChoninic Acid**) Protein Bestimmung macht sich zunächst die Eigenschaften von Peptidbindungen zu nutze, in Anwesenheit von zweiwertigen Cu^{2+} Ionen im alkalischen Milieu Komplexe zu bilden. Bei dieser Biuret-Reaktion kommt es bereits zu einem Farbumschlag nach blau und das zweiwertige Cu^{2+} wird zu einwertigem Cu^{1+} reduziert. Diese Kupferionen dienen dann als Reaktionspartner für zwei BCA Moleküle. Bei der Bildung der $BCA-Cu^{1+}$ Komplexe kommt es zu einem

erneuten Farbumschlag nach lila. Diese zweite BCA-Kupfer Reaktion macht den Protein Assay um das 100fache sensitiver als die Biuret-Reaktion alleine.

Durchführung. Die BCA Proteinbestimmung wurde als Mikro-Assay durchgeführt. Hierfür wurde eine Bicinchoninsäure-Lösung (Lösung A) und ein Kupfersulfat-Lösung (Lösung B) 50:1 vermischt und je 200µl dieser Mischung wurden in ein Well einer 96 Well Platte vorgelegt. Anschließend wurden je 1µl der Totalextrakte und je 10µl der Nuklearextrakte hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 30 bzw. 90 Min. bei 37° C erfolgte die Messung der optischen Dichte der einzelnen Farbreaktionen bei 570nm in einem Mikroplatten-Reader (SpectroCount™, Packard). Als Standard wurde jeweils eine BSA Verdünnungsreihe angesetzt.

3.6.4. Radioaktiv Labeln der NF-κB-Binding-Sites

Das radioaktive Labeln des jeweiligen doppelsträngigen DNA-Oligonukleotid (dsOligo) dient zur autoradiografischen Visualisierung der „geschiftet“ Banden des EMSAs. Um die entsprechenden DNA-Oligonukleotide am 5'-OH Ende radioaktiv zu markieren wurde eine T4 Polynukleotid Kinase (T4 PNK) verwendet. Dieses Enzym katalysiert u.a. den Transfer des gamma-Phosphates eines ATP Moleküls an die 5'-OH Gruppe einzel- und doppelsträngiger DNA und RNA (*forward reaction*). In der Gegenwart von ADP besitzt die T4 PNK auch 5'-Phosphatase Aktivität und katalysiert den Austausch von endständigen 5'-Phosphatgruppen (*exchange reaction*). Das Enzym ist also auch eine 3'-Phosphatase. Zum Labeln der DNA-Binding-Sites wurde in dieser Arbeit ausschließlich die *forward reaction* der T4 PNK ausgenutzt.

Durchführung. Zunächst wurden 7pmol NF-κB dsOligo, 5µl γ -³²P-ATP (γ ATP), 1.5µl T4 PNK und 2µl 10xPNK Puffer in ein 1.5ml Eppendorf Gefäß vorgelegt. Anschließend wurde der ganze Mix auf 20µl mit Millipore Wasser aufgefüllt und bei 37° C für 60 Min. inkubiert. Vor dem Abtrennen des überschüssigen, nicht inkorporierten γ ATP über eine G-50-Sephadex Mikrosäule (GE Healthcare), wurde der Mix mit Millipore Wasser auf ein Volumen von 50µl aufgefüllt. Die Abtrennung der überschüssigen Radioaktivität erfolgte durch Zentrifugation der G-50 Mikrosäule bei 735g für 2 Min. Vor Verwendung der Mikrosäule wurde dessen Granulat durch vortexen zunächst resuspendiert und folgend die Flüssigkeit bei 735g für 1 Minute abzentrifugiert. Um die spezifische Aktivität der gelabelten dsOligos zu bestimmen wurden 2µl der Sonden in 98µl STE Puffer überführt und zwei daraus resultierende

50µl Aliquots wurden im beta-Counter (WALLAC 1409, WALLAC) vermessen. Die verwendete spezifische Aktivität lag bei $2-3 \times 10^5$ cpm/µl.

3.6.5. EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

Der EMSA ist auch unter den Bezeichnungen Bandshift, Gelshift und Gel Retardations Assay bekannt. Er macht sich die Interaktion von DNA und DNA bindenden Proteinen und deren Laufverhalten in einem nicht denaturierenden Gel zu nutze. Freie DNA weist in einem solchen Gel eine höhere elektrophoretische Mobilität als proteingebundene DNA auf. Die proteingebundene DNA wird dann gegenüber der freien DNA als „geshiftet“ bezeichnet. Als Supershifts werden Ansätze bezeichnet zu denen zusätzlich noch für das zu detektierende Protein ein Antikörper zugegeben wird. Dieser DNA-Protein-Antikörper-Komplex zeigt eine noch geringere elektrophoretische Mobilität und dient als Spezifitätsnachweis. Die Detektion der Proben erfolgt üblicherweise mittels Autoradiographie.

Durchführung. Zunächst erfolgte eine Inkubation der nuklearen Proteinextrakte (5µg) für 10 Min. auf Eis mit 1.5 µl poly dl-dC (1µg/µl). Hierbei wurde das Volumen aller Proben mittels des Nuklear- Extraktions (NE)-Puffer auf 13µl normiert. Das poly dl-dC verhindert nicht spezifische Bindungen von Proteinen an die DNA-Bindungsstelle. Nach Zugabe des Ficoll Bindungspuffer und der 32 p markierten DNA-*binding site* (Endvolumen: je 20µl) schloss sich eine Inkubation für 30 Min. bei Raumtemperatur an. Für Supershifts wurden die Proben mit entsprechenden Antikörpern (1µg/ml) versetzt und für weitere 30 Min. auf Eis belassen. Anschließend erfolgte die Auftrennung der DNA-Protein-Gemische bei 200V (2197 Power Supply, LKB Bromma) in einem vertikalen 3%igem Acrylamid-Gel und mit 0.5% TBE Laufpuffer. Nachdem das Gel auf Whatmann-Papier übertragen und 45 Min. bei 80° C getrocknet wurde (Gel Slab Dryer, Bio-Rad), wurde es für mind. 5h mit einem Doppelemulsionsfilm (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) bei -80° C gelagert. Der Film wurde anschließend entwickelt, indem er in einer Dunkelkammer für je 1 Min. in eine Entwicklerlösung, Fixativ (AGFA) und Wasser getaucht wurde. Zur quantitativen Auswertung wurden die im Gel befindlichen Radioaktivbanden ausgeschnitten und in einem beta-Counter (Wallac 1409, Wallac) vermessen.

3.7. Zytokinfreisetzung

3.7.1. *in-vitro* Kultivierungsbedingungen von CD4⁺ Zellen

Zur Bestimmung der freigesetzten Zytokine in den Überständen von stimulierten T Zellen wurden zunächst murine T Zellen mit CD4⁺ MicroBeads wie unter 3.1. beschrieben isoliert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und auf 2×10^6 Zellen pro ml Panserin 413 eingestellt. Für die Stimulation wurden je 4×10^5 lebende Zellen in ein mit Antikörper (Konz.: s. 3.4.1. (100µl)) beschichtetes Well einer 96 Well-Zellkulturplatte (TPP®) vorgelegt. Je einem Ansatz wurde 50µM AMP [1µl] zugegeben. Nach einer Stimulationszeit von 18 Stunden bei 37° C und 5%iger CO₂-Atmosphäre wurden die Überstände abgenommen und bei -80° C aufbewahrt. Alle Ansätze wurden als Triplikate angesetzt. Die Messung der freigesetzten Zytokine in den Zellüberständen erfolgte nach geeigneter Verdünnung mittels ELISA.

3.7.2. Zytokin ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Dem in dieser Arbeit durchgeführten ELISA liegt das Prinzip der „Sandwich“-Technik zu Grunde. Kennzeichen des Sandwich-ELISA ist die Bildung eines Antikörper-Antigen-Antikörper Komplexes. Der Zweitantikörper wird dann mit einem Enzym gekoppelt, welches in Gegenwart eines Chromogens eine Farbreaktion erzeugt. Die optische Dichte dieser Farbreaktion lässt Rückschlüsse auf die Quantität des zu detektierenden Antigens zu.

Durchführung. Hierfür wurde die ELISA Platte am Vorabend mit einem dem zu detektierenden Antigen spezifischen Capture-Antikörper „gecoatet“. Am darauf folgenden Tag wurde die Platte für mindestens 1 Stunde mit BSA (Blockpuffer) geblockt, was eine unspezifische Bindung des Antigens an die Oberfläche der ELISA Platte (R&D Systems®) verhindert. Anschließend wurden die Überstände aufgetragen und nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe des biotinylierten Detektion-Antikörpers (Antigen spezifischer Zweitantikörper). Nach weiteren zwei Stunden wurden die Wells für 20 Minuten mit einer Streptavidin gekoppelten Meerrettich-Peroxidase beschickt. Das Biotin-Streptavidin System sichert eine Kopplung der Peroxidase mit dem Detektion-Antikörper. In einem Zeitraum von weiteren 20 Minuten erfolgte in Anwesenheit eines Chromogens (Substratlösung), das von der Peroxidase spezifisch umgesetzt wird, eine Farbreaktion, die durch eine Stopplösung (Säure) abgestoppt wurde.

Anschließend wurde die optische Dichte jedes Wells, einschließlich zweier Standardkurven mit einem Mikroplatten-Reader (SpectroCount™, Packard) bei einer Wellenlänge von 450nm bestimmt. Die ELISAs wurden sowohl für IL-2 als auch für IFN- γ durchgeführt.

3.7.3. Bio-Plex Pro Assay (23 Multi-Plex)

Der Bio-Plex Zytokin Assay ist ein *bead* basierender Assay, der es erlaubt gleichzeitig mehrere Zytokine innerhalb einer Probe zu detektieren. Hierbei können bis zu 100 farbkodierte *bead* Zusammenstellungen genutzt werden, wobei jeder farbkodierte *bead* mit einem spezifischen Reaktanten gekoppelt werden kann. Das eigentliche Testprinzip ähnelt dem Sandwich-ELISA wie unter 3.4.2 beschrieben. Hierfür werden Antikörper, die gegen die zu detektierende Zytokine gerichtet sind, an die entsprechenden *beads* gekoppelt. Diese Antikörper gekoppelten *beads* stellen den Capture-Komplex dar. Zur Detektion dienen weitere Antikörper, die biotinyliert sind und andere Epitope der Zytokine erkennen. Diese Zweit-Antikörper werden über Streptavidin-PE kenntlich gemacht. Die Quantifizierung erfolgt am Bio-Plex Suspensions Assay System. Dieses System ist Fluß basierend und ähnelt im wesentlichen einer FACS Analyse. Innerhalb einer zwei-dimensionalen Auftragung werden die einzelnen Zytokine anhand ihrer farbkodierten *beads* getrennt und anhand der PE Intensität in Relation zu einer Standardkurve quantifiziert.

Durchführung. Da beim Bio-Plex Pro Assay keine Kopplung der Zytokine über Antikörper an die 96 Well Platte erfolgt, werden spezielle Filterplatten (Bio-Rad) verwendet. Diese erlauben es über Vakuum-Filtration, die Platte zu waschen und überschüssige Reaktanten (Detektions-Antikörper, Streptavidin-PE) aus den Überständen von den größeren farbkodierten *beads* abzutrennen. Zunächst wurden die Wells der Filterplatte mit 100 μ l Assay-Puffer angefeuchtet. Darauf wurden je 50 μ l *bead* Suspension in diese Wells gegeben. Nachdem je 50 μ l der Standardverdünnungsreihe als auch je 50 μ l/50 μ l der Proben (Zellkulturüberstände unverdünnt/ Serumproben 1:2 in Serumdiluent) in die Wells gegeben wurden, wurde die Filterplatte kurz kräftig geschüttelt (30 Sek., 1100rpm) und es erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten bei RT und 300rpm. Anschließend wurden je 25 μ l Detektion-Antikörper in die Wells gegeben. Die Assay-Platte wurde erneut kräftig geschüttelt (30 Sek., 1100rpm) und für 30 Minuten bei RT und 300rpm inkubiert. Zuletzt erfolgte die Zugabe von je 50 μ l Streptavidin-PE pro Well und nach kurzem

kräftigem Schütteln (30 Sek., 1100rpm) wurde die Filterplatte für weitere 10 Minuten bei 300rpm inkubiert. Die Daten-Akquirierung erfolgte über das Bio-Plex Suspensions Assay System (Bio-Rad).

3.8. CD4⁺ T Zell Proliferations/Suppressions Assay

Experimente zur Überprüfung der Proliferation von Lymphozyten trugen viel zum Verständnis der Immunregulation bei. Die traditionellen *in-vitro* Proliferations-Assays erfolgen über die zelluläre Inkooperation von Tritium markierten Thymidin oder indirekt über die Bestimmung der Gesamtzellzahl. Seit 1994 (Lyons and Parish et al. 1994) wurde aber in vielen Laboren der Gebrauch von Carboxyfluoreszin-(Diazetat)-Succinimidyl-Ester (CF(DA)SE) zur Routine, um Zellproliferation nachzuweisen. CF(DA)SE ist zunächst nicht fluoreszierend, aber durch seine Azetat-Gruppen höchst permeabel für Zellmembranen. Innerhalb der Zelle werden die Azetat-Gruppen aber schnell durch Esterasen abgespalten. Dies führt zur Bildung von CFSE, das stark fluoresziert und gleichzeitig eine verminderte Zellmembranpermeabilität aufweist. Letztlich bleibt das CFSE stabil in der Zelle, nachdem es kovalente Bindungen mit bestimmten Aminogruppen gebildet hat. Diese fluoreszierenden Konjugate sind auch noch nach Monaten in der Zelle stabil nachweisbar, lediglich bei Zellteilung wird der Farbstoff auf beide Tochterzellen aufgeteilt. Dies macht es möglich die Proliferation von Lymphozyten mittels Flußzytometrie zu beobachten.

Durchführung. Nach der Isolierung der CD4⁺/CD25⁺ Treg und CD4⁺/CD25⁻ Teff Zellen wie im Kapitel 3.2.1. beschrieben, wurden die Treg Zellen sofort in RPMI-1610 resuspendiert (1×10^6 Zellen/ml). Die Teff Zellen wurden in 1ml PBS (+ 5% FKS) resuspendiert. Durch Zugabe von 1ml CF(DA)SE (6 μ M) und einer Inkubation bei Raumtemperatur (5 Minuten) unter Lichtausschluß erfolgte die Färbung der Zellen. Anschließend wurde die Färbereaktion mittels PBS (+ 5% FKS) gestoppt und die Zellen wurden zweimal gewaschen. Die Zellzahl der Teff Zellen wurde auf 3×10^6 Zellen/ml RPMI-1610 eingestellt. Nach Vereinigung von Treg Zellen und Teff Zellen im Verhältnis 1:1 (v/v) erfolgte die Zugabe des Proliferationsstimulus in Form von anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten *beads* (1 *bead*/Zelle). Die Zellsuspension wurde hierbei 1:2 verdünnt. Anschließend wurden je 200 μ l (2×10^5 Zellen) in die Wells einer 96 U-Well Zellkulturplatte (TPP®) überführt. Nach Inkubationszeiten von 1 bis 4 Tagen (37° C, 5% CO₂) erfolgte die Proliferationsanalyse mittels Flußzytometrie (FACS Calibur, BD Bioscience™). Hierbei wurden tote Zellen über den *light scatter*

und die Färbung mit ToPro-3 aus der Auswertung ausgeschlossen. Als Proliferationskontrollen dienten CD4⁺/CD25⁻ Treg Zellen (2 x 10⁵ Zellen/Well), die nicht mit Treg Zellen vereint wurden.

3.9. Isoliert perfundiertes Herz nach Langendorff

Das isoliert perfundierte Herz ermöglicht es die Tätigkeit eines Herzens *ex-vivo* zu untersuchen. Die Methodik des perfundierten Herzens wurde bereits vor über hundert Jahren von Oskar Langendorff weiterentwickelt und dient auch heute noch für physiologische, pharmakologische und klinische *ex-vivo* Studien am Herzen. Hierfür wird das Herz dem Tier entnommen und an einer Kanüle am Aortenstumpf aufgehängt. Über die kanülierte Aorta wird das Herz durch eine Sauerstoff- und Nährstoff-reiche Lösung auf retrograde Weise perfundiert. Der Druck der durch die Perfusionslösung im Aortenstumpf erzeugt wird, führt zu einem Verschluss der Aortenklappen. Somit ist die Flüssigkeit gezwungen ins Ostium und die Koronargefäße auszuweichen. Der linke Ventrikel schlägt nun zwar leer, aber durch konstante Versorgung mit Nähr- und Sauerstoff noch über einen längeren Zeitraum. Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Veränderungen der koronaren Flußrate durch AMP- bzw. Ado Derivate, die der Perfusionslösung zugeführt wurden, zu testen.

Durchführung. Nachdem das Versuchstier mit Pentobarbital (80mg/kg Körpergewicht) narkotisiert wurde, wurde das Herz entnommen und in Krebs-Henseleit-Puffer überführt. Nach Entfernen von Lungen- und Fettgewebe wurde der Aortenstumpf kanüliert. Die Präparation und die Kanülierung der Mäuseherzen wurden von Frau cand. med. Leuyven durchgeführt. Zur Perfusion wurde modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer verwendet. Dieser wurde mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) oxygeniert und auf 37° C temperiert. Der Perfusionsdruck wurde mittels einer Wassersäule bei 80mm Hg konstant gehalten. Zur Messung des Koronarflusses wurde eine *Transonic IN-* Flußsonde (Transonic Systems Inc.) eingesetzt. Zur Erstellung von Dosis-Wirkungskurven wurden dem Perfusat über eine *Infors* Pumpe verschiedene Konzentrationen (1nM bis 1µM) an Ado, AMP, A2A Agonisten und phosphorylierte A2A Agonisten Vorstufen seitenständig zugeführt. Über die Regulierung der Vorschubgeschwindigkeit der *Infors* Pumpen wurde die Infusionsrate der verwendeten Substanzen an die Veränderungen des koronaren Flusses angepasst.

3.10. in-vivo Messung des arteriellen Blutdruckes

Die kardiovaskuläre Aktivität von Ado und selektiven A2AR Agonisten sind gut charakterisiert (Kassel et al. 1983, Webb et al. 1990, Webb et al. 1991). Dementsprechend werden seit längeren selektive A2AR Agonisten als potentielle therapeutische Substanzen bei der Behandlung von arterieller Hypertonie diskutiert (Webb et al. 1993). Die kombinierte Anwendung von Katheter und elektronischem Druckaufnehmer ermöglicht die Überprüfung der Wirksamkeit von Ado-Derivaten im kardiovaskulären System unter *in-vivo* Bedingungen.

Durchführung. Die Mäuse wurde mit 3% Isofluran narkotisiert, in dem diese über eine eigens hergestellte Beatmungsmaske und Beatmungsgerät beatmet wurden (MiniVent Typ 845, Hugo Sachs Elektronik). Auf einer auf 37° C temperierten Wärmeplatte wurden *V. jugularis* und *A. carotis* rechtsseitig freipräpariert. Zunächst wurde die Jugularvene katheterisiert. Über diesen Katheter erfolgte die Infusion von Ado, Cyclohexylethylthio(chet)-Ado und chet-AMP seitenständig über eine Infors Pumpe (Precidor, Infors AG). Die Infusionsraten wurden für jeweils 10µM Stocklösung so gewählt, das zwischen 0.05nmol/min und 17nmol/min infundiert wurden. Auch die Karotis wurde katheterisiert. Dieser Katheter wurde an einen Druckaufnehmer angeschlossen (Transducer, Gould). Die operativen Eingriffe wurden von Dr. med. Ding, Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Auswertung der Wirkung der Ado-Derivate auf arteriellen Blutdruck und Herzfrequenz erfolgte Software-gestützt mit LabChart 6.0 (ADInstruments).

3.11. Das Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) Modell

Die CIA ist ein gut charakterisiertes experimentelles Tiermodell, das der rheumatischen Arthritis beim Menschen sehr nahe kommt. In der frühen Phase der CIA kommt es zu einer Reduktion der Proteoglykane der extrazellulären Matrix und das Absterben von Chondrozyten führt zu einem vollständigen Verlust der Gelenkknorpel im späten Verlauf der Arthritis (van Lent et al. 1998). Die Induktion der CIA erfolgt durch die Behandlung Arthritis-sensitiver Mäuse mit Typ II Kollagen. Diese Immunisierung löst eine Autoimmunreaktion aus, an der T- und B Zellen beteiligt sind.

Arthritis-Induktion. Durch subkutane Injektion einer 100µl Typ II Rinderkollagen/Complete Freund's Adjuvant Emulsion (1µg/1µl) in die Schwanzbasis

männlicher, 10-12 Wochen alter DBA/1J Mäuse (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) erfolgte die Immunisierung der Tiere. Nach 21 Tagen wurde die Autoimmunreaktion gestärkt, indem den Mäusen 100µl Typ II Kollagen (1µg/1µl) intraperitoneal injiziert wurde (*booster* Injektion). Etwa ab Tag 28 sind erste Anzeichen der Arthritisprogression anhand von Schwellungen an den Pfoten zu erkennen.

Behandlung und makroskopisches scoring. Unmittelbar nach *booster* Injektion wurden den Mäusen osmotische Pumpen (1007D, Alzet) unter Narkose (3% Isofluran über Beatmungsmaske) implantiert, die die kontinuierliche Gabe des phosphorylierten A2AR Agonisten Cyclohexylethylthio (chet)-AMP und des A2AR Agonisten chet-Ado (jeweils 0.5mg/100µl in 50% DMSO gelöst) sicherstellten. Der Kontrollgruppe wurde 50% DMSO infundiert. Die osmotischen Pumpen wurden den Mäusen rückenständig subkutan eingesetzt und durch Katheterisierung der *V. jugularis* erfolgte die Abgabe der Substanzen (0.5µl/h) intravenös. Die operativen Eingriffe wurden von Dr. med. Ding, Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Universität Düsseldorf durchgeführt. Ab Tag 1 nach der *booster* Injektion wurde das Ausmaß der Arthritis (Schwellungsgrad) anhand einer Skala von 0 bis 2 (Tab. 4) pro Pfote täglich semiquantitativ bewertet.

Tabelle 4: Skala zur makroskopischen Quantifizierung der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA)

0.00	keine Anzeichen einer Schwellung
0.25	1 oder 2 Zehen zeigen Schwellungen
0.50	3 oder 4 Zehen zeigen Schwellungen oder das Hand-/Fußgelenk zeigt eine leichte Schwellung
0.75	Hand-/Fußgelenk zeigt leichte bis mäßige Schwellungen
1.00	Hand-/Fußgelenk zeigt eine mäßige Schwellung
1.25	Hand-/Fußgelenk und einzelne Zehen zeigen mäßige Schwellungen
1.50	Hand-/Fußgelenk und einzelne Zehen zeigen mäßige bis starke Schwellungen
1.75	Hand-/Fußgelenk und einzelne Zehen zeigen starke Schwellungen
2.00	Hand-/Fußgelenk und alle Zehen zeigen starke Schwellungen

An Tag 7 nach *booster* Injektion wurden den Tieren bis zu 500µl einer PFC Emulsion intravenös über die Schwanzvene injiziert. Hierfür wurden die Tiere mittels Isofluran (3%) und eigens hergestellter Nasenmaske narkotisiert. An Tag 8 und an Tag 11 wurde das Ausmaß der Arthritis zusätzlich mit Magnetresonanz-Bildgebung (*Imaging*) dokumentiert.

Magnet-Resonanz-Imaging (MRI). Die Datenaufnahme erfolgte mit einem Bruker DRX 9.4-T (Bohrung: 89mm) MR-Spektrometer (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) bei einer Frequenz von 400.13MHz für die ^1H - und bei einer Frequenz von 376.46MHz für ^{19}F -Messungen. Zur Bildakquisition wurde eine *micro-Imaging* Einheit (Mini 0.5) mit einem 57-mm Gradientensystem und einem 30-mm *birdcage* $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Resonator verwendet. Die Datenerfassung für ^1H und ^{19}F wurde unmittelbar nacheinander durchgeführt, damit anschließend das morphologische ^1H und das ^{19}F Bild automatisch übereinander gelegt werden konnten. Für diesen Bildabgleich beider Kerne wurde das ^{19}F Bild Software-gestützt (ParaVision, Bruker) farbkodiert.

Für die Datenaufnahme wurden die Mäuse mit 1.5% Isofluran (Beatmung über Atemmaske) anästhetisiert und ihre Körpertemperatur wurde über den gesamten Zeitraum der Messung bei 37° C gehalten. Die Quantifizierung der CIA erfolgte mittels einer eigens entwickelten Analysesoftware (Dr. rer. nat Jacoby, Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Universität Düsseldorf), mit deren Hilfe sowohl die Flächen der betroffenen Areale als auch die Intensität der ^{19}F -Signale erfasst werden konnten. Die MRI-Datenaufnahme und die anschließende Quantifizierung wurden von Frau cand. med. Galbarz durchgeführt.

3.12. Statistische Datenanalyse

Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit der Statistik- und Graphiksoftware SigmaPlot 11.0 für Windows (Systat. Software, Inc.). Als Signifikanzniveau wurde ein $p \leq 0.05$ festgelegt, als Tendenz wurde ein $p \leq 0.1$ erachtet. p-Werte aus statistischen Analysen, die innerhalb des Niveaus einer Tendenz lagen, wurden wie das Signifikanzniveau selbst in den entsprechenden Graphiken angegeben.

Die physiologischen Daten, die in Paarvergleichen statistisch analysiert werden sollten, wurden zunächst auf Normalverteilung überprüft. Falls nötig wurden Transformationen durchgeführt. Auch wurde darauf geachtet, dass die Daten Varianzhomogenität aufwiesen, um letztendlich parametrisch (t-Test) auf Unterschiede zwischen den Mittelwerten testen zu können. Alle Daten wurden als

Mittelwert mit Standardabweichung (SD) oder Standardfehler (SEM) angegeben. Da die Daten zum arteriellen Blutdruck von den zwei Größen Infusionsrate und Stoffklasse abhängig sind, wurden diese Daten mittels zweifaktorieller ANOVA statistisch analysiert. Als post hoc Test kam hier ein paarweiser Vergleich nach Holm-Sidak zur Anwendung. Die Daten der Wirkung einer Aktivierung des A2AR auf die Zytokinfreisetzung von T Zellen wurden nach Test auf Normalverteilung mit einem *one sample t-test* statistisch analysiert.

4. Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in zwei Abschnitte. Der Abschnitt 4.1. beschäftigt sich im Wesentlichen mit der physiologischen Rolle der CD73 bei der Immunantwort von CD4⁺ T Zellen. Hierfür wurden CD4⁺ T Zellen aus den Milzen wildtypischer und transgener CD73^{-/-} Mäusen aufgereinigt und *in-vitro* entweder mittels PMA/Ionomycin oder anti-CD3/anti-CD28 Antikörper aktiviert. Abschnitt 4.2. fasst Ergebnisse zusammen, die die pharmakologische Wirkung von A2AR Agonisten (*drug*) und deren phosphorylierter Vorstufen (*prodrug*) ebenfalls auf die *in-vitro* Immunantwort von CD4⁺ T Zellen zeigen. Desweiteren wurde deren Wirksamkeit auf den Koronarfluß am Langendorff-Herzen getestet. In *in-vivo* Untersuchungen wurden die Wirkung von chet-Ado/AMP auf den arteriellen Blutdruck und im Kollagen induzierten Arthritis-Modell (CIA) untersucht.

4.1. Physiologische Rolle der CD73 bei der Immunantwort von CD4⁺ T Zellen

Für die physiologischen Untersuchungen an murinen T Zellen wurden die entsprechenden Zellen aus murinen Milzen isoliert. Eine Aufreinigung (Anreicherung) der murinen T Zelle erfolgte über Epitop spezifische MicroBeads wie unter Kap. 3.3.2. beschrieben. Anschließend wurden die Zellen überwiegend antigen stimuliert und Messungen auf Proteinebene bzw. Analysen zur Nukleotid/Nukleosid Bestimmung durchgeführt.

4.1.1. Nachweis der ekto-5'-NT/CD73 auf T Zellen muriner Milzen

Um die Lokalisation der CD73 auf T Zellen muriner Milzen nachzuweisen, wurden Kryoschnitte einer Milz einer WT C57Bl/6 angefertigt und immunhistologisch gefärbt. Desweiteren wurden aus weiteren Milzen Zellsuspensionen angefertigt und mittels FACS quantitativ analysiert.

4.1.1a. Immunhistologischer Nachweis der Epitope CD3 und CD73 auf Schnitten einer murinen Milz

Auf den Kryoschnitten muriner Milzen wurden die Zellkerne der Splenozyten mittels DAPI (blau) gefärbt und die Expression des T Zell spezifischen Epitops CD3 (grün) bzw. der Nukleotidase CD73 (rot) mittels Immunhistochemie gezeigt (Abb. 11). In Abb. 11A zeigt der Kryoschnitte durch eine murine Milz mehrere Bereichen, in denen

Akkumulationen des Epitops CD3 (grün) einzelne Inseln an CD3⁺ Zellen zeigen. Die Expression der ekto-Nukleotidase CD73 (rot) ist über die ganze Fläche des Kryoschnitte verteilt, wobei nur vereinzelt auch eine rote Färbung in den CD3⁺ Inseln zu sehen ist (Abb. 11B, C). Diese vereinzelt Rotfärbung (CD73) kann teilweise mit den grün (CD3) gefärbten Zellen kolokalisiert (Abb. 11D: gelb) werden.

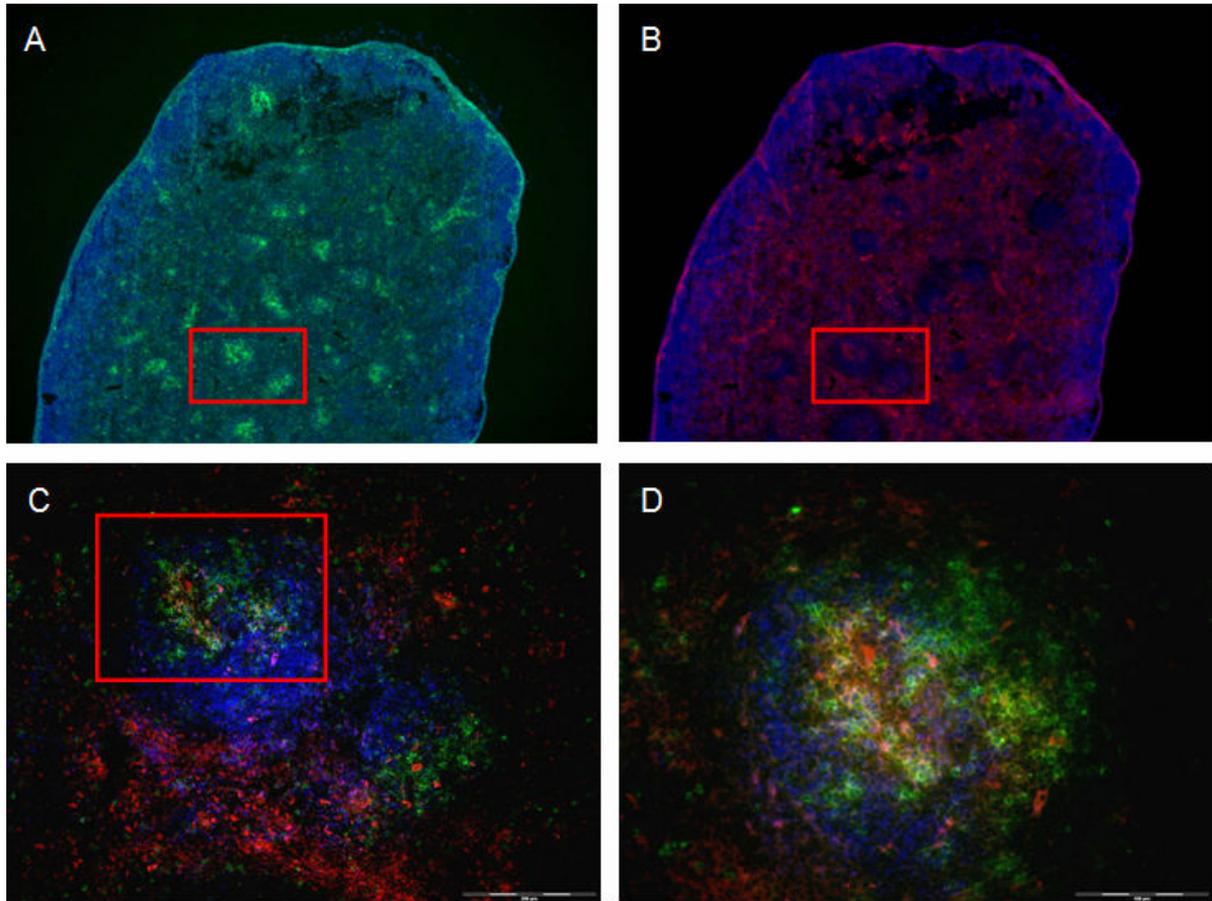


Abbildung 11: Nachweis der Lokalisation der ekto-5'-Nukleotidase CD73 auf T Zellen muriner Milzen. Gefärbt wurden: Zellkerne (blau), CD3 (grün), CD73 (rot) \Rightarrow CD3/CD73 Kolokalisation: gelb. Vergrößerungen: A, B) 4x, C) 20x, D) 40x.

4.1.1b. Quantitative Analyse der Koexpression der ekto-5'-NT/CD73 und des T Zell spezifischen Epitops CD4 auf murinen Splenozyten

Um den prozentualen Anteil an CD4⁺ T Zellen und CD73⁺ Zellen in murinen Milzen zu bestimmen, wurden Zellsuspensionen muriner Milzen mit FITC anti-CD4 und PE anti-CD73 Antikörper markiert und per FACS Analyse ausgewertet. Teilweise erfolgte eine lebend/tot Bestimmung mittels Propidium-Iodid. In Abbildung 12 ist der prozentuale Anteil an CD4⁺ Zellen einer Suspension muriner Splenozyten dargestellt. Die Analyse zeigte, dass nach Lyse der Erythrozyten etwa 15%-25% muriner

Splenozyten positiv für den T Zell Marker CD4 sind. Eine Färbung mit Propidiumiodid wies einen Anteil von etwa 15% als tote Zellen aus (Daten nicht gezeigt).

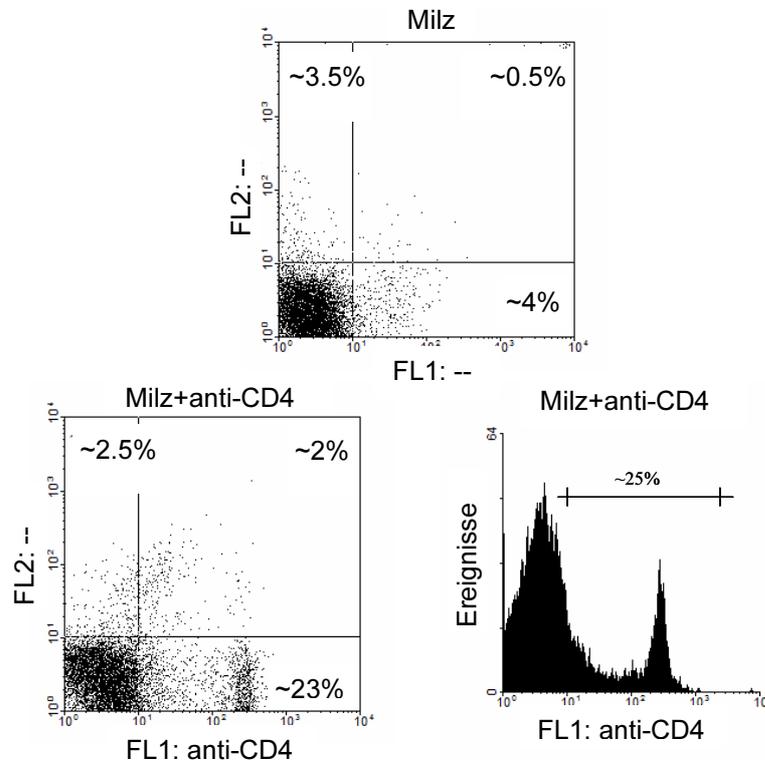


Abbildung 12: Quantitative Analyse des Anteils $CD4^+$ Zellen in murinen Splenozyten

Die quantitative Analyse der Expression der ekto-5'-NT/CD73 und die Koexpression mit dem T Zell spezifischen Epitop CD4 auf murinen Splenozyten ist in Abbildung 13 zu sehen.

Die FACS Analyse zeigte hier etwa 18% $CD4^+$ Zellen und etwa 24% $CD73^+$ Zellen innerhalb einer Suspension muriner Splenozyten. Etwa 6% der $CD4^+$ Splenozyten sind auch CD73 positiv. Somit exprimieren etwa 30% der $CD4^+$ T Zellen auch die ekto-5'-NT/CD73. Die Population der CD73 positiven Zellen lässt sich nicht eindeutig von den CD73 negativen Zellen trennen. Der Übergang zwischen den Zellen, die die CD73 nicht exprimieren, und den Zellen, die die CD73 exprimieren war nahtlos.

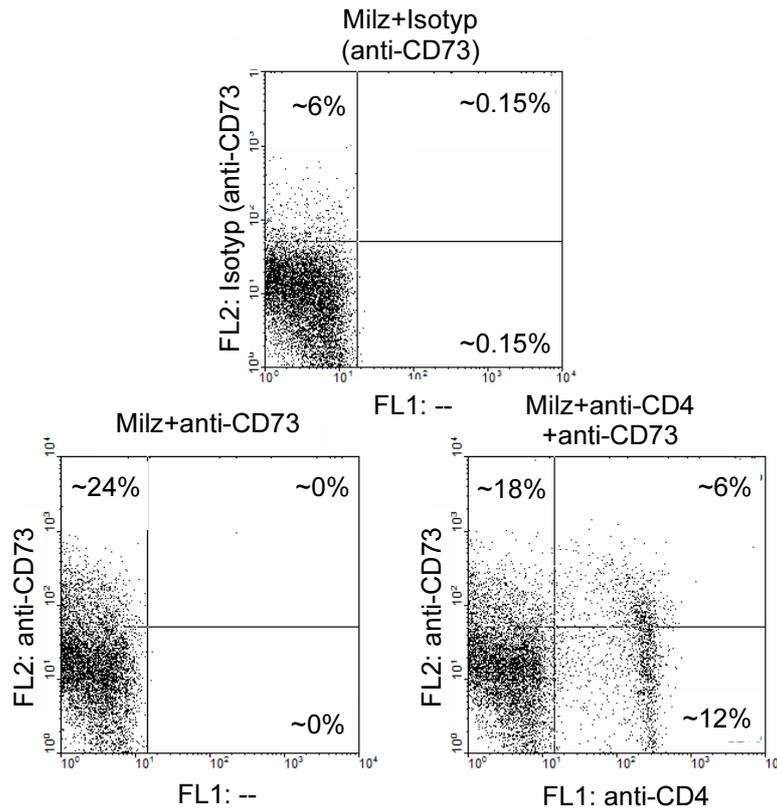


Abbildung 13: Quantitative Analyse der Expression der CD73 auf murinen Splenozyten und auf CD4⁺ Zellen muriner Milzen

4.1.1c. Quantitative Analyse der Koexpression der ekto-5'-NT/CD73 und des T Zell spezifischen Epitops CD4 auf mittels Mikro-Beads angereicherten T Zellen

Die für die *in-vitro* Assays vorgesehenen T Zellen wurden aus murinen Milzen gewonnen und über an magnetische Partikel gekoppelte Antikörper angereichert. In Abbildung 14 ist das Ergebnis einer FACS Analyse gezeigt, die Aufschluss über den Reinheitsgrad der Zellpopulation gibt.

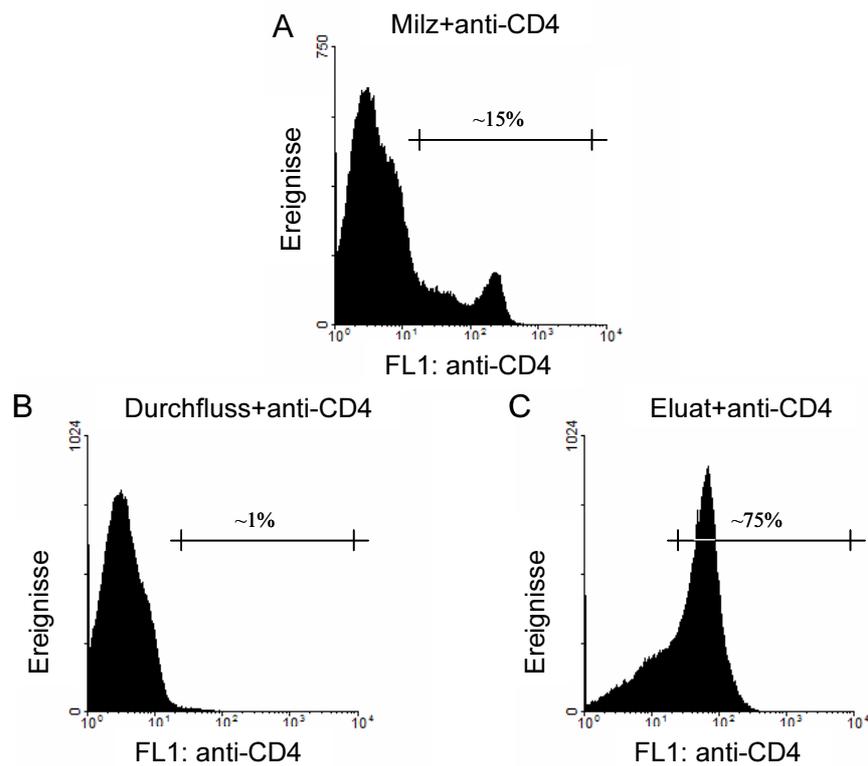


Abbildung 14: Quantitative Analyse des Aufreinigungserfolges muriner T Zellen aus der Milz mittels magnetischer Partikel: A) Prozentualer Anteil $CD4^+$ Zellen in murinen Milzen, B) Prozentualer Anteil $CD4^+$ Zellen im Durchfluss, bzw. C) im Eluat muriner Milzen nach Aufreinigung.

Abbildung 14A) zeigt noch einmal das Verhältnis in einer murinen Milz nach Lyse der Erythrozyten. Hier waren etwa 15% Zellen $CD4$ positiv. In Abbildung 14B) ist der Anteil $CD4^+$ Zellen im Durchfluss nach der Zellaufreinigung zu sehen. Hier zeigten sich nur noch etwa 1% der Zellen als $CD4^+$. Im Eluat der Zellaufreinigung waren dagegen zu 75% $CD4^+$ T Zellen zu finden (Abb. 14C).

Wie in der Zellsuspension der gesamten Milz wurde auch der Anteil der CD73⁺ Zellen in den CD4⁺ angereicherten Zellsuspensionen bestimmt. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, lag hier der Reinheitsgrad an CD4 positiven Zellen bei knapp 75%. Eine Koexpression der CD73 und des CD4-Markers wurde bei 16% der Zellen gefunden. Somit zeigen etwa knapp 24% aller CD4⁺ T Zellen auch ein Expression der CD73 in den Eluaten CD4⁺ angereicherten Zellen. Dieser Wert entspricht in etwa auch dem Wert der in vollständigen Zellsuspensionen von murinen Milzen gefunden wurde (Abb. 13).

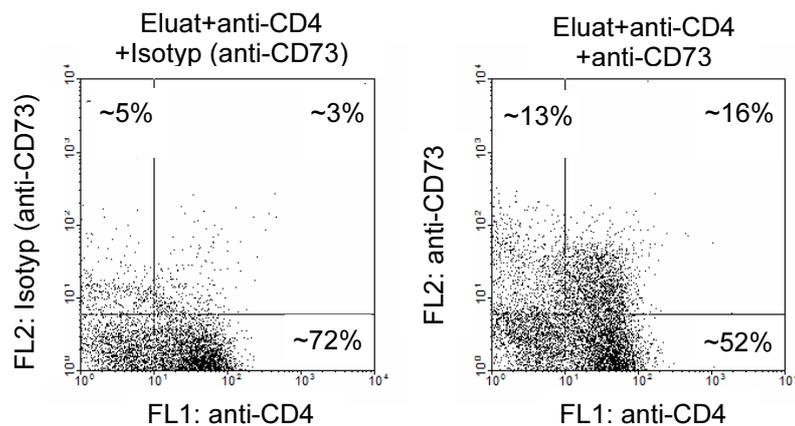


Abbildung 15: Quantitative Analyse der Koexpression der CD73 und des T Zell-Markers CD4 in CD4⁺ Zellen angereicherten Eluaten

4.1.2. Nachweis von endogenen AMP und Adenosin in den Überständen muriner T Zellen mittels HPLC

Um zu überprüfen, ob sich unter *in-vitro* Bedingungen AMP und Ado in den Überständen von CD4⁺ T Zellen nachweisen lassen, wurde nach 18 stündiger Inkubation eine HPLC Analyse durchgeführt (Abb. 16).

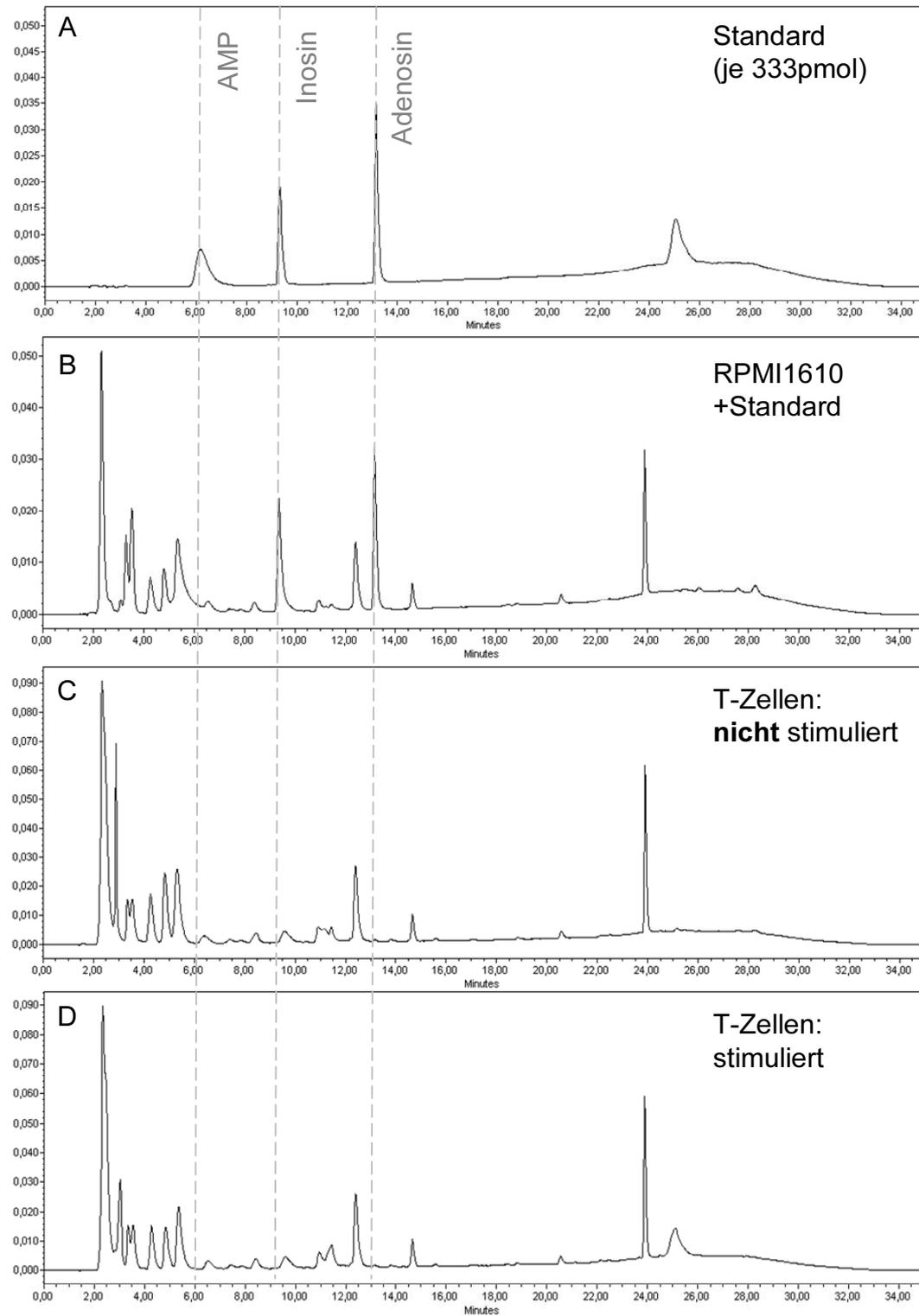


Abbildung 16: Nachweis von AMP, Ado und Inosin in den Überständen von murinen T Zellen \pm antigener Stimulation mittels HPLC. Chromatogramme A) des Standards in *aqua dest.* B) des Standards in RPMI 1610 C) des Überstandes nicht stimulierter Zellen D) des Überstandes stimulierter Zellen

Der Stimulationserfolg wurde mittels ELISA und der Messung von IFN- γ in Aliquots der Überstände nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Verglichen wurden Ansätze, die keinem Stimulus ausgesetzt waren, und Ansätze, die in Gegenwart von anti-CD3/anti-CD28 stimuliert wurden. Wie die in Abbildung 16A wiedergegebenen Daten zeigen, lagen die Retentionszeiten für AMP bei 6.25 Minuten, für Inosin bei 9.5 Minuten und für Ado bei 13.0 Minuten. Ado und Inosin ließen sich in RPMI 1640 + 10% FKS (RPMI 1610) eindeutig nachweisen. Nicht hingegen AMP, das wahrscheinlich durch Phosphatasen im FKS abgebaut wurde.

4.1.3. Nachweis von endogenen ATP in den Überständen muriner T Zellen mittels Luciferin/Luciferase-Assay

Da die aus CD4⁺ T Zellen freigesetzten Nukleotidmengen möglicherweise unterhalb der Empfindlichkeit der HPLC liegen, wurde als nächstes versucht, ATP unter Verwendung des Luciferin/Luciferase-Assay-Systems empfindlicher nachzuweisen.

Zunächst wurde überprüft, ob ATP im Zellkulturmedium für murine Leukozyten über die Zeit konstant nachweisbar ist. Hierfür wurde RPMI 1610 mit verschiedene Konzentrationen an ATP (200nM–200pM) versetzt. Zusätzlich wurde zu allen Ansätzen der unspezifische Nukleotidase-Inhibitor ARL 67156 [100 μ M] hinzugegeben. In Abbildung 17 ist zu sehen, dass sich unmittelbar nach Zugabe des ATP in das Zellkulturmedium Konzentrationen von 200nM bis 2nM gut nachweisen ließen. Bei einer zweiten Messung derselben Proben nach 45 Minuten war in allen Ansätzen kein ATP mehr nachweisbar.

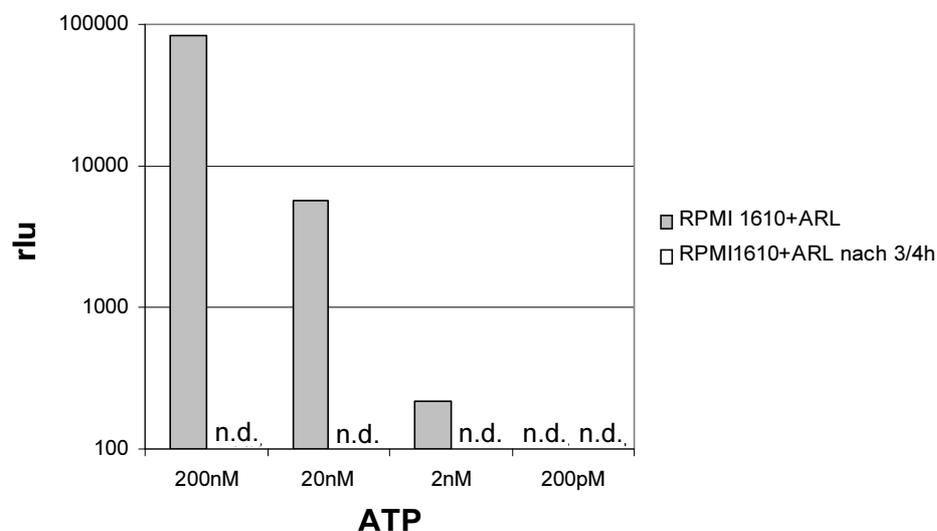


Abbildung 17: Nachweis des ATP Abbaus in mit FKS (10%) versetztem RPMI 1640 (RPMI 1610). rlu: relative light units. n.d.: not detectable.

Da sich das gängige Zellkulturmedium für murine Leukozyten aus RPMI 1640 und FKS zusammensetzt, wurde in weiteren Ansätzen überprüft, ob der in Abbildung 17 beobachtete ATP Abbau einer dieser beiden Medien zugeordnet werden kann. Hierfür wurden PBS, RPMI 1640 und 10%iges FKS mit 200nM ATP versetzt. ATP Messungen erfolgten unmittelbar nach Zugabe bzw. nach 1 Stunde (Inkubation bei RT). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 18 zusammengefasst. PBS und RPMI 1640 zeigten bei beiden Messungen keine Unterschiede der ATP bedingten Lichtemission. Auch nach einer Stunde war das ATP in PBS und RPMI 1640 unverändert nachweisbar. Dagegen konnte im FKS (10%) nach 1 Stunde kein ATP mehr nachgewiesen werden.

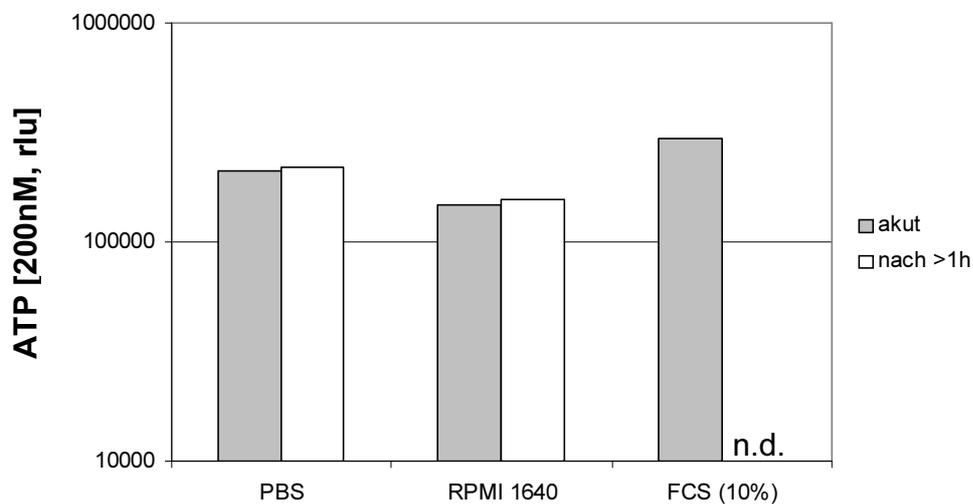


Abbildung 18: Nachweis des ATP-Abbaus durch FKS (10%). rlu: relative light units.
n.d.: not detectable

Aufgrund dieser Befunde wurde in allen weiteren Versuchen auf die Verwendung von FKS verzichtet.

Um zeitaufgelöste *real-time* Messungen einer möglichen ATP Freisetzung aus CD4⁺ T Zellen durchführen zu können, wurden zunächst folgende Eigenschaften des ATP (Luciferin/Luciferase) Assays bestimmt:

1. Nachweisgrenzen bei unterschiedlichen Assay-Mix Verdünnungen
2. Kinetiken der Lichtemission
3. Reaktivität bei unterschiedlichen Prä-Inkubationsbedingungen

Die Verwendung des Luciferin/Luciferase Assays bei einer 1:25 Verdünnung erlaubte den Nachweis bis zu 2pmol ATP/50µl. In zellulären Ansätzen waren mit dieser Verdünnung auch tatsächlich geringe pmole Mengen an ATP nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Um diese Beobachtung mit besserer Auflösung dokumentieren zu können und um eine mögliche ATP Freisetzung aus T Zellen infolge antigener Stimulierung nachzuweisen, wurde in weiteren Untersuchungen mit einer geringeren Luciferin/Luciferase Assay Verdünnung gearbeitet. Im Folgenden sind die Ergebnisse der um das 10fachen empfindlicheren 1:2 Verdünnung aufgeführt.

Abbildung 19 zeigt, dass sich mit einer 1:2 Verdünnung des Luciferin/Luciferase Assays Stoffmengen zwischen 10pmol und 0.2pmol ATP in 50µl Ansätzen gut nachweisen ließen. Zwischen den gemessenen ATP Konzentrationen und der gemessenen Lichtemission bestand zu Beginn der Messung ein linearer Zusammenhang (Abb. 19A). Das Lichtsignal des 0.2pmol ATP Ansatzes war zu Beginn der Messung (2102rlu: relativ light units) deutlich höher als das Hintergrundsignal (1040rlu). Über einen Zeitraum von 30 Minuten nahm die Empfindlichkeit des Luciferase/Luciferin Assay stark ab. Aber auch nach etwa 30 Minuten lag die nachweisbare Lichtemission des ATP Ansatzes (258rlu) noch deutlich über dem Niveau der Hintergrundmessung (82rlu; Abb 19B).

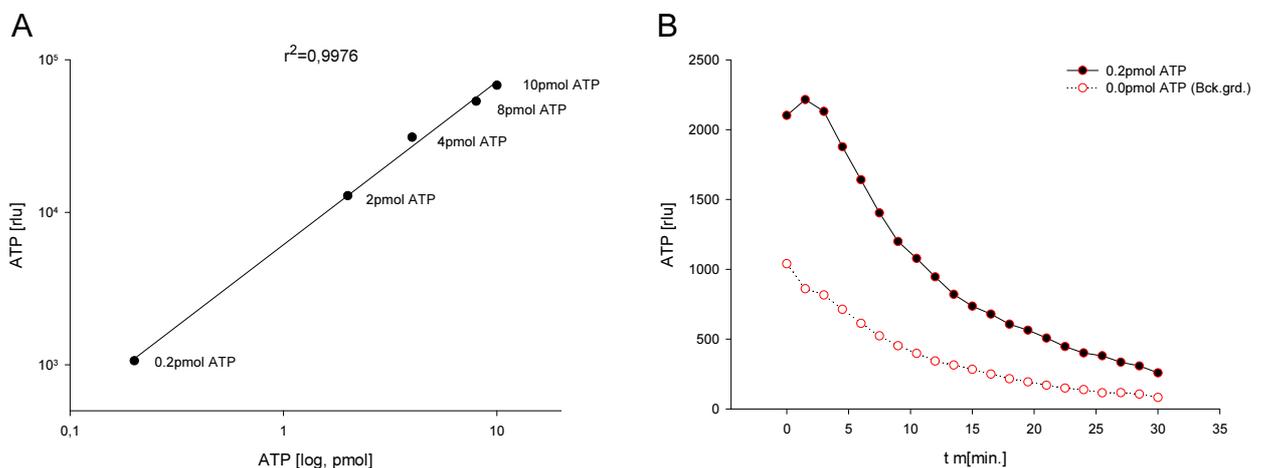


Abbildung 19: Nachweis exogener ATPs in 50µl Ansätzen und einer Verdünnung des ATP Assay Mix von 1:2 A) Korrelation zwischen ATP Menge und Lichtentwicklung zu Beginn des Assays (t=0). B) Kinetik der Lichtentwicklung von 0.2pmol und 0pmol ATP (Bck.grd.) in RPMI 1640. rlu: relativ light units.

Abbildung 20 zeigt die relative Reaktivität des Luciferin/Luciferase Assay infolge der Zugabe von 2pmol ATP nach verschiedenen Präinkubationsbedingungen (30 Min. + 0pmol ATP; 30 Min. + 0.2pmol ATP; 30 Min. + 2pmol ATP).

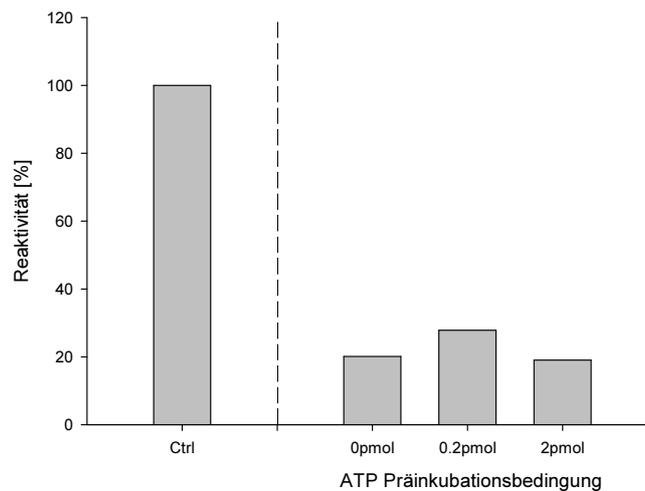


Abbildung 20: Reaktivität des Luciferin/Luciferase Assay auf 2pmol ATP nach 30 Min. Präinkubation in Gegenwart von 0pmol, 0.2pmol und 2pmol ATP.

Wie man sieht, bewirkt eine Präinkubation des Luciferin/Luciferase Assay eine Abnahme seiner Reaktivität von bis zu 80%. ATP in den Ansätzen während der Präinkubation beeinflusste die Reaktivität nicht.

Zusammengefasst zeigen die vorangegangenen Untersuchungen, dass mit dem Luciferin/Luciferase Assay kontinuierliche ATP Messungen bis zu 30 Minuten möglich sind. Die Lichtemission geringer ATP Mengen lag nach 30 Minuten Inkubation noch deutlich über dem Hintergrund und die Reaktivität sollte ausreichen, wenn die Zellen auch bereits unter Basalbedingungen ATP freisetzen, um geringe Mengen an ATP nachweisen zu können.

Um die ATP Freisetzung aus aktivierten T Zellen zu messen, wurden $CD4^+$ T Zellen in einem mit anti-CD3/anti-CD28 beschichteten Well inkubiert. Da kaum etwas über die Adhärenzdauer bzw. die Kinetik der ATP Freisetzung unter antigenen Bedingungen von T Zellen bekannt ist, wurden mehrere Ansätze verschiedene Zeiten präinkubiert. Die eigentliche Messung im Mikroplatten-Bioluminometer über 30 Minuten erfolgte unmittelbar nach Zugabe des Luciferin/Luciferase Assay. Abbildung 21 zeigt exemplarisch 3 Messungen einer Messreihe, die über 5 Stunden Adhärenzzeit abdeckte. Als technische Kontrolle diente jeweils ein Ansatz mit exogen zugegebenen ATP [2pmol].

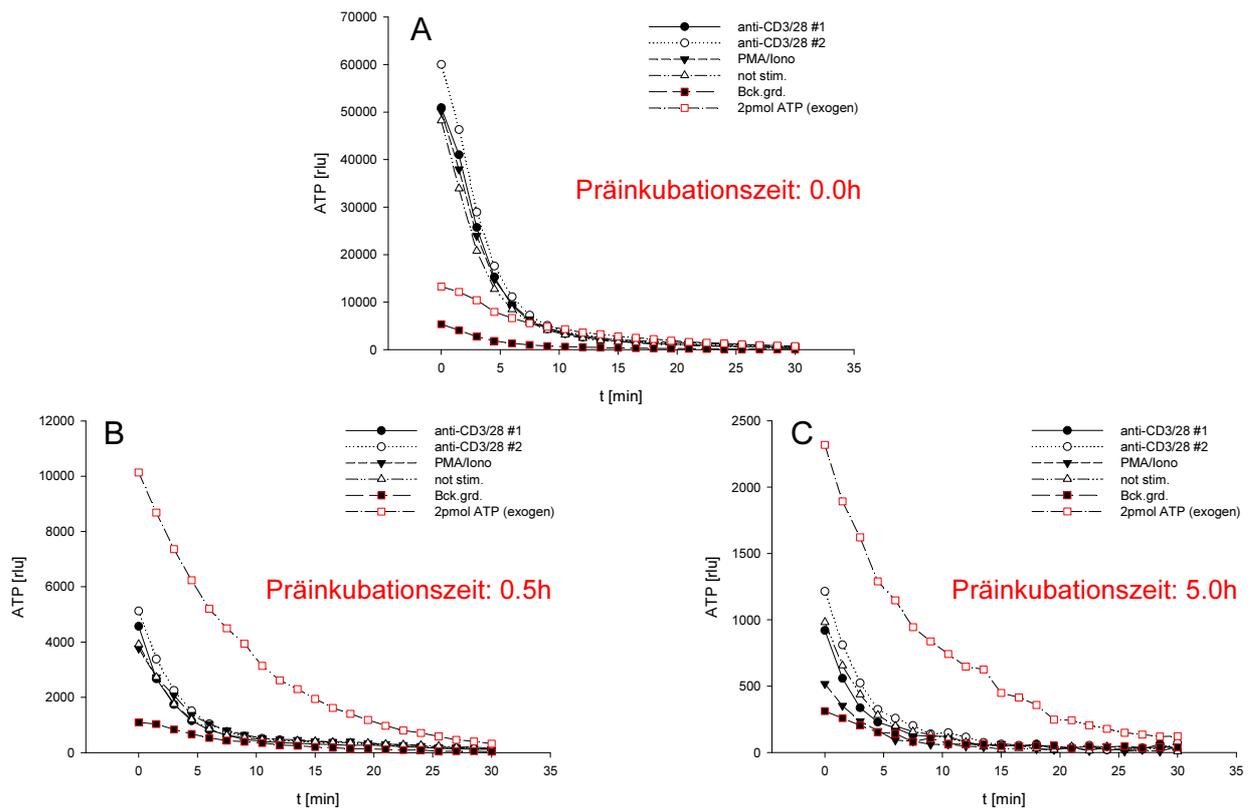


Abbildung 21: Nachweis endogenen ATPs in den Überständen unbehandelter und antigen behandelter $CD4^+$ Zellen: A) unmittelbar nach Isolierung, B) nach 0.5h bzw. C) nach 5h Präinkubation bei $37^\circ C$. schwarz: zelluläre Ansätze; rot: technische Kontrollen. rlu: relative light units.

Man sieht, dass unmittelbar nach der $CD4^+$ T Zellisolierung (Präinkubationszeit: $t=0$) zu Beginn der ATP Messung bis zu 10pmol (300nM) ATP nachweisbar waren (Abb. 21A). Der weitere Verlauf der Messung zeigt einen kontinuierlichen Abfall der Lichtentwicklung. Präinkubationen der Zellen von 0.5 Stunden (Abb. 21B) bis 5 Stunden (Abb. 21C) zeigten ähnliches Verhalten. Zu Beginn der Messung waren jeweils aber nur bis zu 1pmol ATP nachweisbar. Die unterschiedliche Behandlung der Zellen (stimuliert/nicht stimuliert) hatten in allen Ansätzen keinen Einfluss auf die ATP Messung.

Zwar konnte somit in den vorangegangenen Versuchen keine Stimulations-bedingte ATP Freisetzung gezeigt werden, es war aber ATP in den Ansätzen nachweisbar, das auch innerhalb eines kurzen Zeitraumes abgebaut wurde (Abb. 22). Vergleicht man die Kinetik der ATP bedingten Lichtemission der zellulären Ansätze mit der Kinetik von ATP Standardkonzentrationen (Abb. 22A), so verläuft die Steigung der Kurvenverläufe zu Beginn der Messung wesentlich steiler. Dies deutet auf einen

schnellen Abbau des ATPs in den zellulären Ansätzen hin. In Abbildung 22B ist gezeigt, dass in den zellulären Ansätzen unmittelbar nach Isolation der T Zellen bis zu 300nM ATP nachweisbaren waren. Nach 10 Minuten war der ATP Gehalt mit etwa 20nM um fast 95% reduziert.

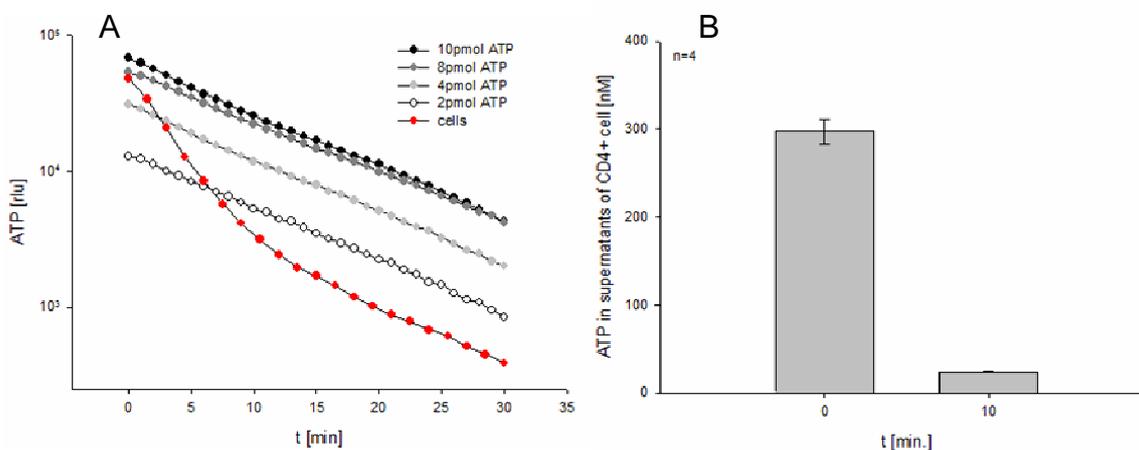


Abbildung 22: A) Kinetik der Lichtentwicklung des ATP Assay Mix in Gegenwart exogenen ATPs (grau Abstufungen) und in zellulären Überständen (rot). B) Quantifizierung der Menge an ATP in den Überständen von CD4⁺ T Zellen zu Beginn des Assay (t=0) und nach 10 Minuten. Mittelwert \pm SEM. rlu: relative light units.

Dass bei den vorangegangenen Messungen keine Stimulations-bedingte ATP Freisetzung gemessen werden konnte, kann sowohl technisch als auch biologisch begründet sein. Technisch bedeutet, dass die Empfindlichkeit des Luciferin/Luciferase Assay über die Zeit zu schnell abnimmt. Biologisch bedeutet, dass die Zellen ATP sehr schnell abbauen.

Um die biologischen und technischen Einflüsse auf die Messung der ATP Freisetzung weiter zu minimieren, wurde in einer letzten Versuchsserie eine Flusskammer verwendet. Da der ATP Nachweis direkt in Aliquots des mit den Zellen in Kontakt gewesenen Mediums erfolgt, spielte der Assay bedingte Empfindlichkeitsverlust keine Rolle. Der kontinuierliche Fluss über die Zellen stellt zusätzlich den schnellen Abtransport des freigesetzten ATP von der zellulären Oberfläche sicher, so dass ein biologischer Abbau reduziert wird. Da sich T Zellen nicht in Lösung mittels anti-CD3/anti-CD28 Antikörper stimulieren lassen, wurden diese pharmakologisch mit PMA/Ionomycin, das dem Zellkulturmedium zu einem bestimmten Zeitpunkt seitenständig zugegeben wurde, aktiviert.

Abbildung 23 zeigt, dass die sich in der Flußkammer befindlichen Zellen bei Flußgeschwindigkeiten von 10 μ l/s und 5 μ l/s über die Zeit konstante, geringe Mengen

an ATP freisetzen. Bei Zugabe von PMA/Ionomycin, was u.a. eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} zur Folge hat (Chatila et al. 1989), stieg der Gehalt an ATP im Durchfluss innerhalb von 10 Minuten auf das 10fache an, was jedoch transient war.

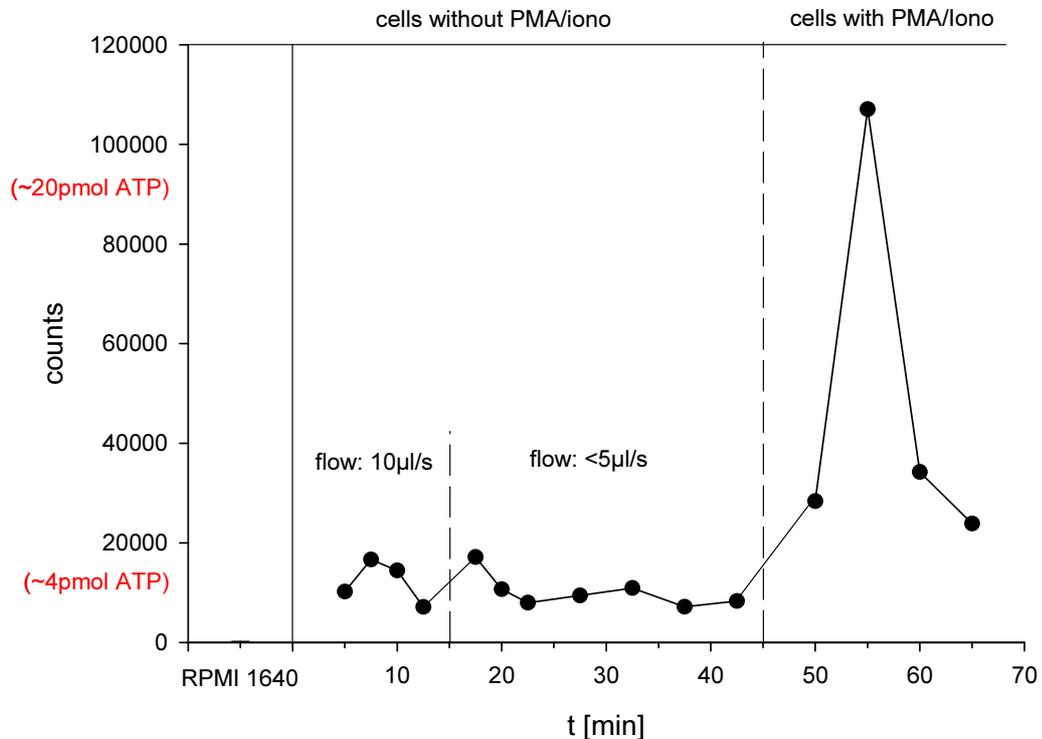


Abbildung 23: Nachweis der ATP-Freisetzung muriner T Zellen über die Zeit unter konstantem Fluss \pm PMA/Ionomycin Behandlung.

Verfolgt man die Lokalisation der adhärennten Zellen unter Flußbedingungen im Mikroskop, so sieht man, dass sich die Zellen über die Zeit in Flussrichtung bewegen (Abb. 24).

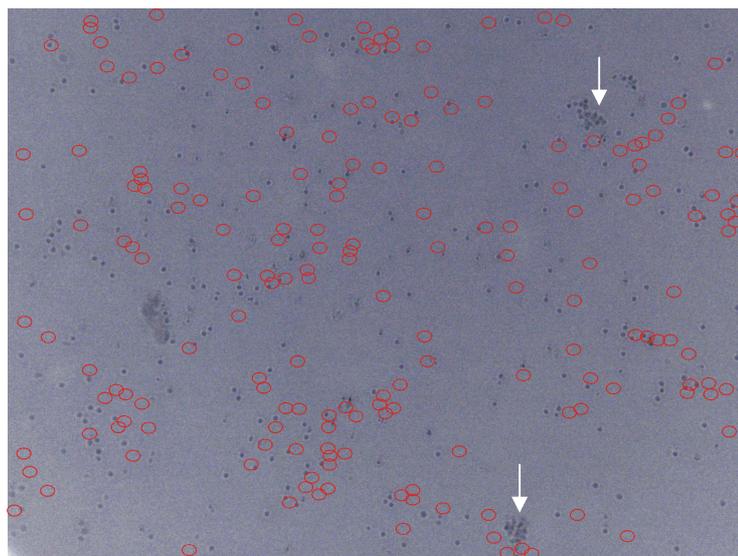


Abbildung 24: Lokalisation muriner T Zellen unter Flussbedingungen vor (grau) und nach (rot) Anlegen eines laminaren Strom über 60 Minuten. Zellcluster vor Assay-Beginn (Pfeile)

Sowohl „geclusterter“ Zellen (Pfeile) als auch einzeln liegende Zellen wurden dabei aus der Kammer gespült. Die meisten Zellen bewegten sich aber in Flussrichtung. Diese waren rechts von ihrer ursprünglichen Position zu finden. Nur wenige Zellen konnte ihre initiale Position halten.

4.1.4. Von der CD73 gebildetes Adenosin moduliert die nukleare Translokation von NF- κ B

In einer ersten Serie funktioneller Experimente wurde untersucht, ob Ado, das von der CD73 auf T Zellen gebildet wurde, die nukleare Translokation von NF- κ B nach antigener Stimulation verändert. Hierfür wurden Splenozyten und aufgereinigte CD90⁺ T Zellen mittels anti-CD3/anti-CD28 stimuliert. Die Identifizierung nuklearen NF- κ Bs erfolgte anhand von EMSAs. Wie in Abbildung 25A zu sehen, bewirkte die Stimulierung von Splenozyten aus wildtypischen Tieren einen zeitabhängigen

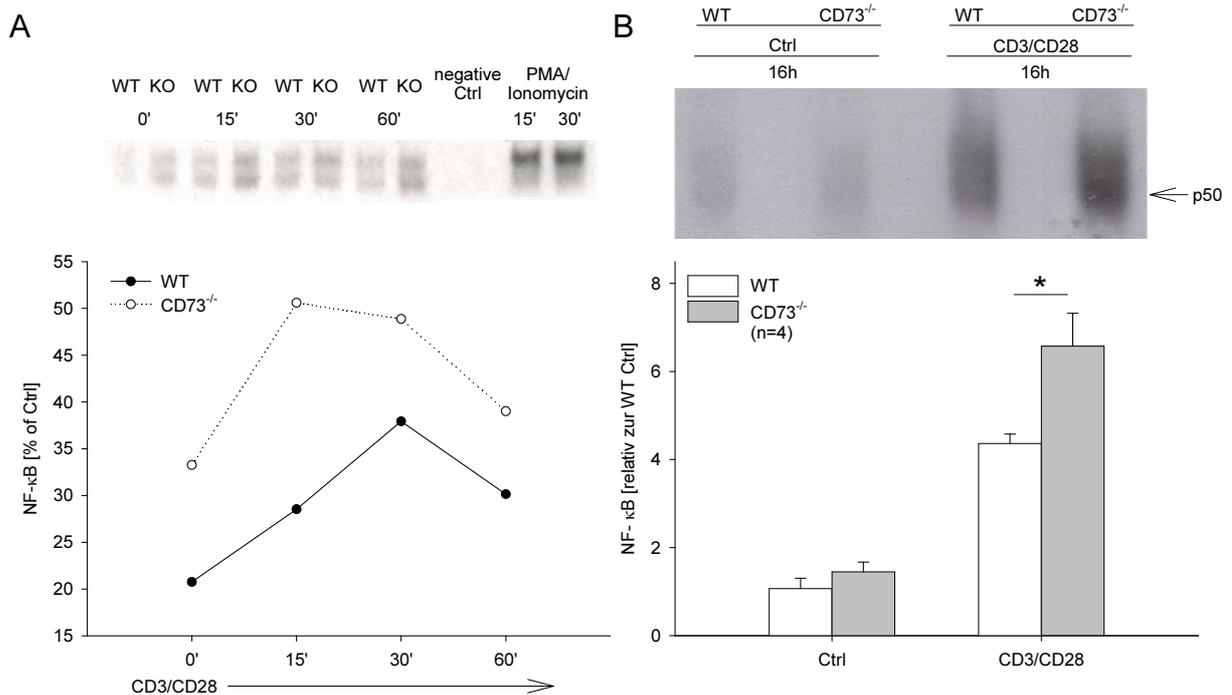


Abbildung 25: Gesteigerte nukleare Translokation von NF- κ B in CD73 defizienten T Zellen. A) Splenozyten aus WT (schwarze Punkte) und CD73^{-/-} Mäusen (weiße Punkte) wurden mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörper 60 Minuten stimuliert. B) Aufgereinigte CD90⁺ T Zellen wurden mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörper 16 Stunden stimuliert. Total- bzw. nukleare Proteinextrakte wurden angefertigt und deren Bindung an ³²P markierten NF- κ B Sonden wurden mittels EMSA gemessen. Mittelwert + SEM. * $p \leq 0.05$.

Anstieg der nuklearen Translokation von NF- κ B. In Splenozyten von CD73^{-/-} Mäusen zeigte sich dieser Effekt jedoch in stärkerem Ausmaß. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei der Verwendung aufgereinigter CD90⁺ T Zellen. Abbildung 25B zeigt

einen signifikanten Anstieg (+30%) der TCR vermittelten nuklearen Translokation von NF- κ B bei CD90⁺ T Zellen aus CD73^{-/-} Mäusen (WT: 4.36 ± 0.21 , CD73^{-/-}: 6.58 ± 0.75 ; n=4; p=0.029).

Der in Abbildung 26 gezeigte Supershift belegt, dass die Banden, die mittels EMSA gezeigt werden konnte, spezifisch für die NF- κ B Untereinheit p50 waren. Für die NF- κ B Untereinheit p65 konnte kein Nachweis erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

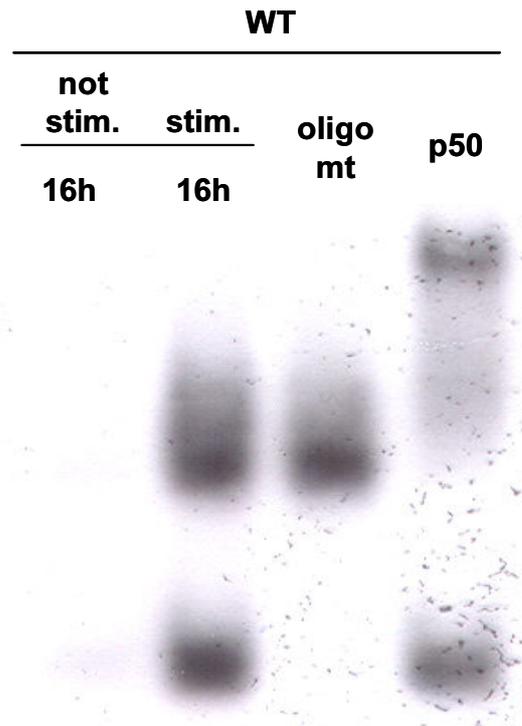


Abbildung 26: Spezifitätsnachweis der NF- κ B Bindungsaktivität

4.1.5. Von der CD73 gebildetes Adenosin moduliert die Freisetzung von Zytokinen aus CD4⁺ T Zellen

Da die NF- κ B Untereinheit p50 an der Expression von IL-2 (Sica et al. 1992) und IFN- γ (Sica et al. 1997) beteiligt ist, wurde untersucht, ob die CD73 auf CD4⁺ T Zellen auch die Freisetzung dieser beiden proinflammatorischen Zytokine beeinflusst. Hierzu wurden CD4⁺ Zellen aus der Milz von wildtypischen Mäusen und CD73 defizienten Mäusen 18 Stunden mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörper stimuliert. Wie in Abbildung 27 dargestellt, zeigte sich eine signifikant höher Menge (+39%) an freigesetzten IFN- γ aus aktivierten CD73^{-/-} CD4⁺ T Zellen verglichen mit der wildtypischen Kontrolle (WT: $2.3\text{ng/ml} \pm 0.290$, CD73^{-/-}: $3.2\text{ng/ml} \pm 0.292$; n=8;

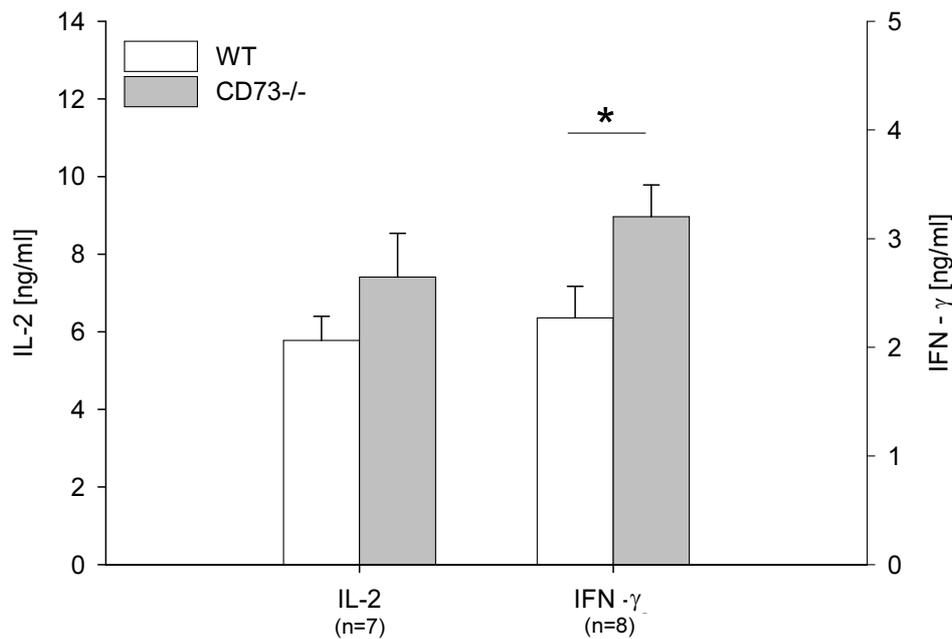


Abbildung 27: Gesteigerte Freisetzung von IL-2 und IFN- γ bei CD4⁺ T Zellen aus CD73^{-/-} Mäusen. CD4⁺ T Zellen wurden 18h mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörper stimuliert. Der Nachweis auf IL-2 und IFN- γ erfolgte mittels ELISAs. Mittelwert + SEM. * $p \leq 0.05$.

$p=0.032$). Ähnliche Verhältnisse zeigten sich auch für IL-2. Das freigesetzte IL-2 zeigte sich tendentiell bei den stimulierten transgenen Zellen (+27%) erhöht, erreichte jedoch nicht Signifikanzniveau (WT: 5.8ng/ml \pm 0.625, CD73^{-/-}: 7.4ng/ml \pm 1.126; n=7).

4.1.6. Die CD73 und die Proliferation von CD4⁺ T Zellen

Um zu untersuchen, ob Ado, das von der CD73 auf CD4⁺ T Zellen gebildet wird, die zelluläre Proliferation beeinflusst, wurden Proliferations/Suppressions Assays anhand von CFSE markierten CD4⁺/CD25⁻ Teff Zellen und CD4⁺/CD25⁺ Treg Zellen durchgeführt. Wie in repräsentativen Experimenten gezeigt (Abb. 28A), hemmen wildtypische Treg Zellen erheblich die TCR vermittelte Proliferation von Teff Zellen bei Kokultivierung. Jedoch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu Experimenten, die mit Teff Zellen und Treg Zellen aus CD73^{-/-} Mäusen durchgeführt wurden (Abb. 28B).

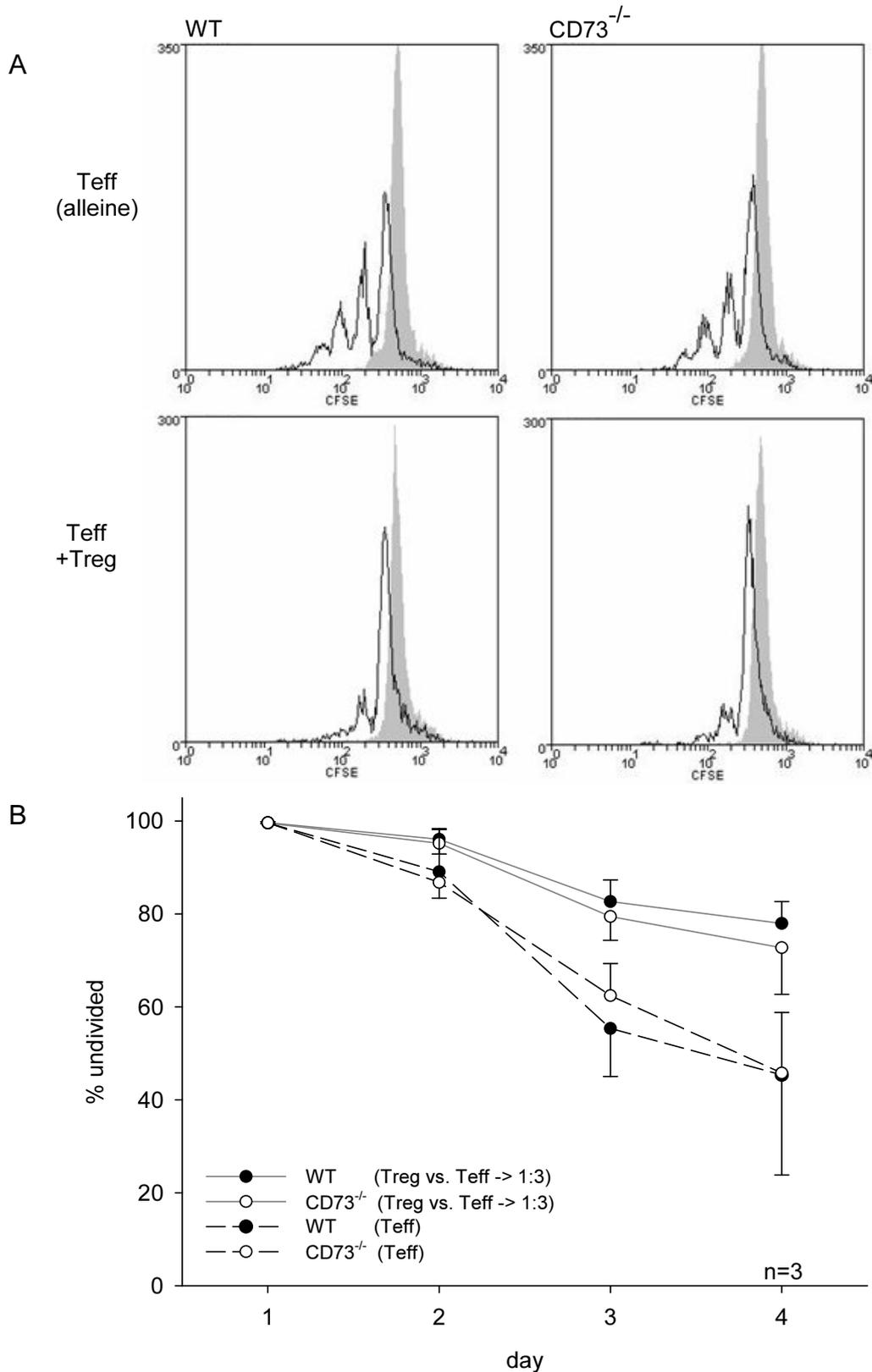


Abbildung 28: Proliferation anti-CD3/anti-CD28 aktivierter Teff Zellen kokultiviert mit Treg Zellen aus WT und CD73^{-/-} Mäusen. A) Repräsentative CFSE Histogramme der Proliferation von WT (links) und CD73^{-/-} Teff Zellen (rechts) nach 3 Tagen. proliferierende Zellen: schwarze Linie; nicht proliferierende Zelle: graue Fläche. B) Zeitverlauf der Proliferation CFSE markierter Teff kokultiviert mit Treg Zellen (gestrichelte Linie) oder alleine (durchgezogene Linie). WT Zellen: schwarze Punkte. CD73^{-/-} Zellen: weiße Punkte. Mittelwert \pm SD.

4.1.7. Die Hemmung der Adenosin vermittelten IFN- γ Freisetzung erfolgt über die Aktivierung des A2AR.

Um zu untersuchen, welcher der vier Ado-Rezeptoren verantwortlich für die antiinflammatorischen Effekte des Ado bei T Zellen ist, wurde mehrere spezifische Ado-Rezeptor Antagonisten verwenden, um der Ado-induzierten Hemmung der IFN- γ Freisetzung entgegenzuwirken. Wie in Abbildung 29A gezeigt, konnte nur MSX-2, ein spezifischer A2AR Antagonist, die Ado-induzierte Hemmung der IFN- γ Freisetzung aufheben. In ähnlicher Weise wie Ado hemmte auch AMP [50 μ M] stark die Freisetzung von IFN- γ (-89%) und IL-2 (-93%; Abb. 29B). Da kein Rezeptor für AMP bekannt ist, ist dieser Effekt mit großer Wahrscheinlichkeit der extrazellulären

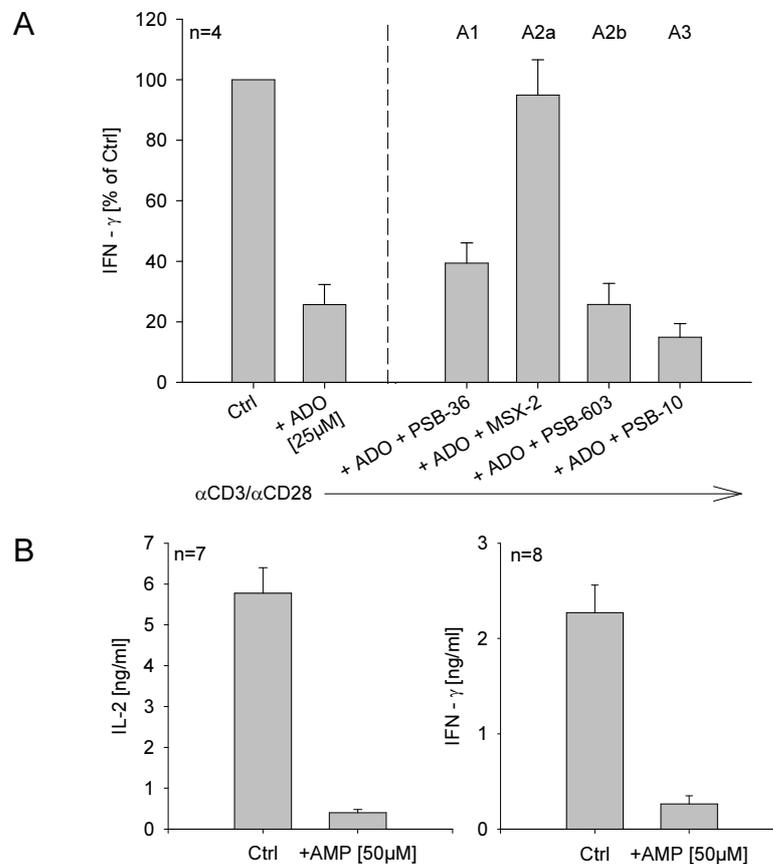


Abbildung 29: Der antiinflammatorische Effekt von Ado wird durch den A2AR vermittelt. CD4⁺ T Zellen wurden für 18 Stunden mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörper stimuliert. A) Die Konzentrationen für den A1R Antagonisten PSB-36, den A2AR Antagonisten MSX-2, den A2BR Antagonisten PSB-603 und den A3R Antagonisten PSB-10 waren entsprechend 7.5nM, 500nM, 37.5nM und 50nM. Die Konzentrationen für jeden Antagonisten lag jeweils 50fach über über ihren entsprechenden K_i . B) AMP [50 μ M] hemmt die IL-2 und IFN- γ Freisetzung. Mittelwert + SEM.

Dephosphorylierung von AMP zu Ado zuzuschreiben. Entsprechend der Literatur (Lappas et al. 2005) hemmte auch CGS 21680, ein spezifischer A2AR Agonist die TCR vermittelte IFN- γ Freisetzung von CD4⁺ T Zellen (Kap. 4.2.3, Abb. 39).

4.1.9. A2AR Aktivierung und Zytokinfreisetzung von CD4⁺/CD25⁻ Teff Zellen bzw. CD4⁺/CD25⁺ Treg Zellen

Um zu untersuchen, welche Zytokine von CD4⁺ T Zellen nach einer Aktivierung des A2AR in veränderten Maße freigesetzt werden, wurden sowohl CD4⁺/CD25⁻ Teff Zellen als auch CD4⁺/CD25⁺ Treg Zellen während antigener Aktivierung (anti-CD3: 0.4 μ g/ml; anti-CD28: 2.5 μ g/ml für 18 Stunden) mit CGS 21680 [1 μ M] stimuliert. Parallel hierzu wurde auch die Zytokinfreisetzung antigen stimulierter Teff und Treg Zellen in Abwesenheit des A2AR Agonisten untersucht. Die Verwendung eines Multiplex Assays erlaubte den Nachweis von IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-17, CCL11/Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , CXCL1/KC, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES und TNF- α .

Wie der Abbildung 30 zu entnehmen, zeigten die Teff Zellen generell eine weitaus stärkere Zytokinfreisetzung verglichen mit den entsprechenden Werten der Treg Zellen. Die einzige Ausnahme stellt IL-10 dar, welches von den Teff Zellen in geringerem Maße freigesetzt wurde. Die höchsten Zytokinkonzentrationen wurden für IL-2, CCL3, CCL4 und IFN- γ bei den Teff Zellen nachgewiesen.

Die Ergebnisse zu den Effekten einer A2AR Aktivierung (CGS 21680) auf CD4⁺/CD25⁻ Teff Zellen sind in Abbildung 31 zusammengefasst. Bei den allgemeinen Th1/Th2 (Teff) Zytokinen (Abb. 31A) zeigte TNF- α mit 71% die stärkste Hemmung. In ähnlichem Ausmaß war auch die Freisetzung der Th1 Zytokine IL-2 (-85%) und IFN- γ (-75%) gehemmt (Abb. 31B). Bei den Th2 Zytokinen hemmte der A2AR nur die Freisetzung von IL-13 (-43%) signifikant und eine Reduktion (-33%) ergab sich bei der IL-4 Freisetzung (Abb. 31C). Abbildung 31D zeigt, dass auch die Freisetzung von IL-1 α (-39%) und IL-1 β (-36%) gehemmt wird. Bei den von den Teff Zellen freigesetzten Chemokinen (Abb. 31E) bewirkte der A2AR Agonist eine signifikante Hemmung von CCL3 (-49%) und CCL4 (-51%). Das einzige Zytokin (Chemokin) das von Teff Zellen nach A2AR Aktivierung verstärkt freigesetzt wurde, war CXCL1 (+183%).

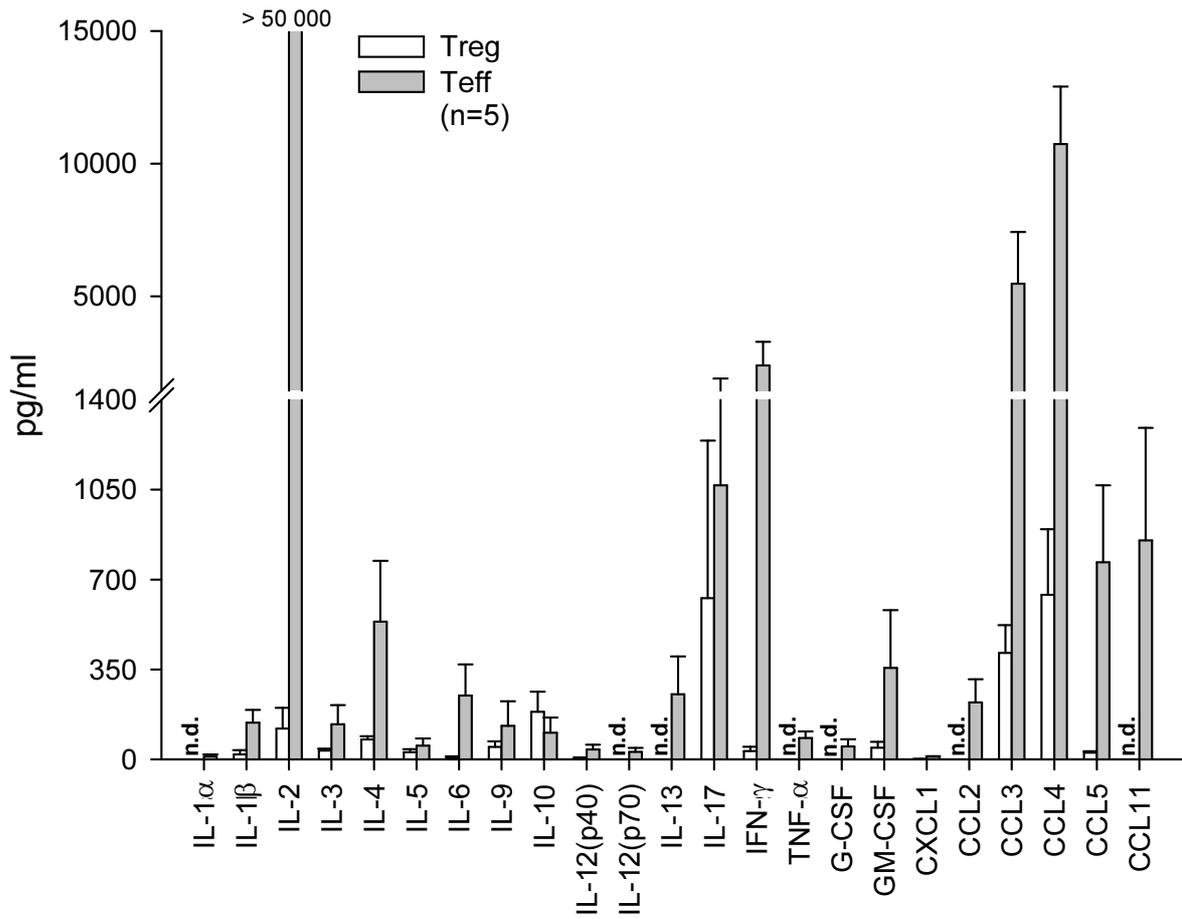


Abbildung 30: Zytokinprofil von Treg Zellen und Teff Zellen. Zytokine, die in den Überständen von Treg Zellen (weiße Balken) und Teff Zellen (graue Balken) nach Stimulierung mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörper mit einem 23 Panel Multi-Plex Assay nachgewiesen werden konnten. Mittelwert + SD. n.d.: not detectable.

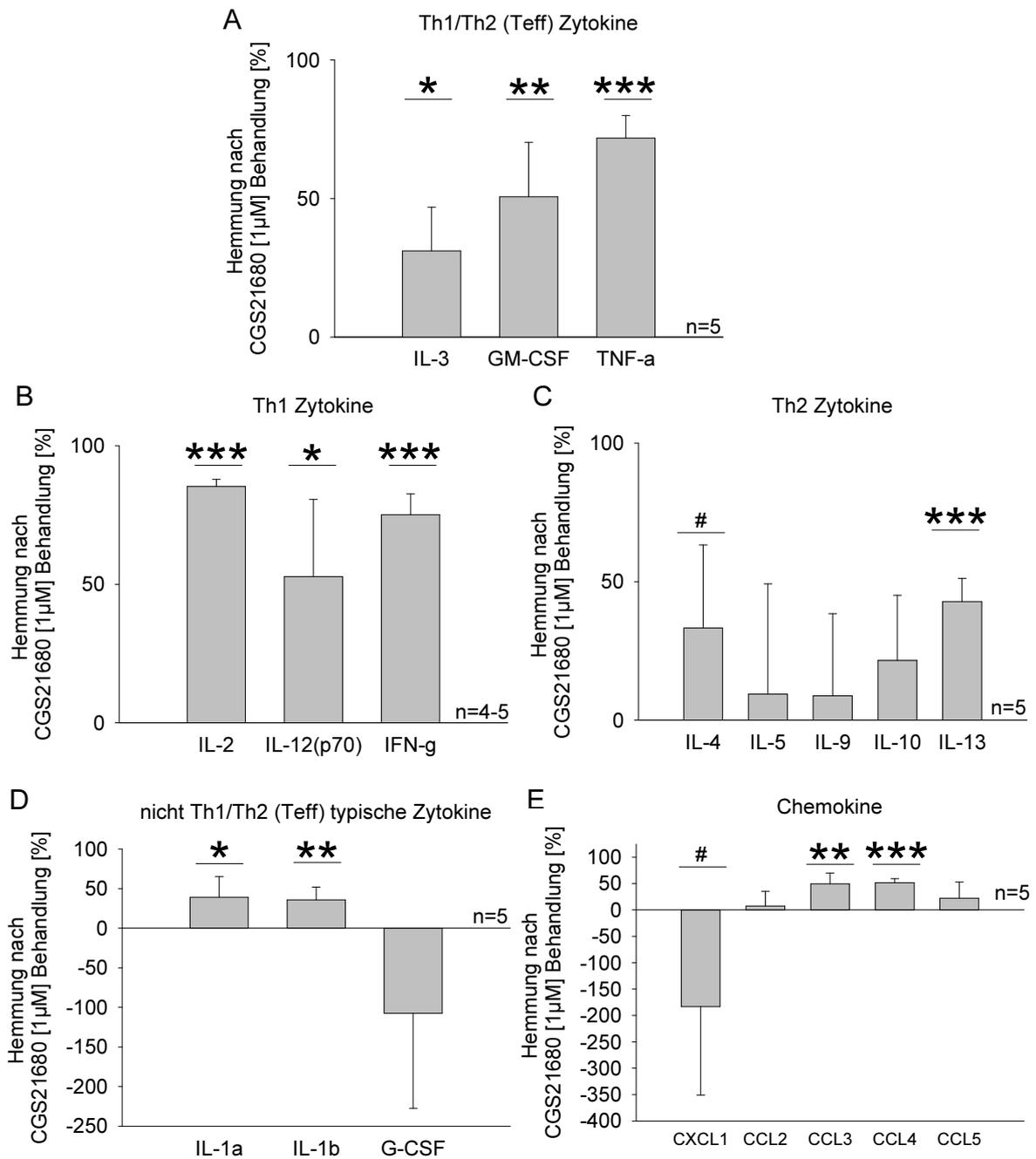


Abbildung 31: Effekt des A2AR Agonisten CGS 21680 auf verschiedene Zytokine von Teff Zellen. CGS 21680 [1µM] beeinflusst die Freisetzung wichtiger A) Th1/Th2 (Teff) Zytokine B) Th1 Zytokine, C) Th2 Zytokine, D) anderer nicht CD4+ T Zell spezifische Zytokine und E) Chemokine in den Überständen aufgereinigter Teff Zellen nach Stimulierung mit Platten gebundenen anti-CD3 and anti-CD28 Antikörper. Mittelwert \pm SD; *one sample t-test*: ***p < 0.001; **p \leq 0.01; *p \leq 0.05; # 0.050 < p < 0.100.

Die Ergebnisse zu der Wirkung einer A2AR Aktivierung (CGS 21680) auf CD4⁺/CD25⁺ Treg Zellen sind in Abbildung 32 zusammengefasst.

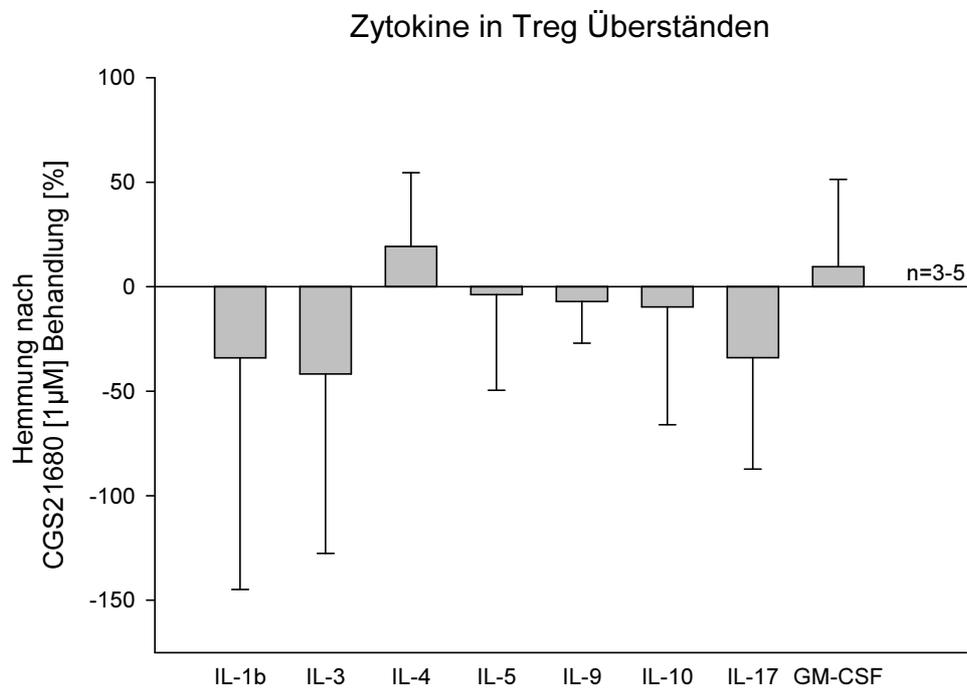


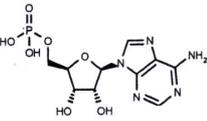
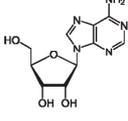
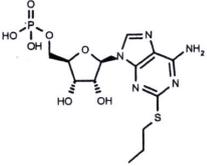
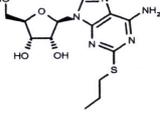
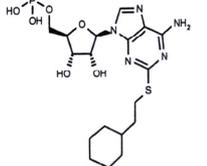
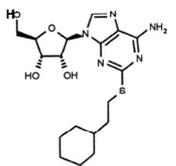
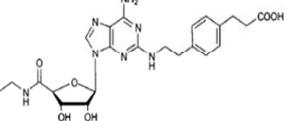
Abbildung 32: Effekt des A2AR Agonisten CGS 21680 [1µM] auf verschiedene Zytokine von Treg Zellen. Mittelwert ± SD.

Wie man sieht waren keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinfreisetzung aus Treg Zellen nach CGS 21680 Behandlung nachzuweisen.

4.2. Hämodynamische und antiinflammatorische Wirkung von phosphorylierten A2AR Agonisten (prodrug)

Um die hämodynamischen Effekte neu synthetisierter A2AR Agonisten und deren phosphorylierter Derivate (Tab. 5) zu bestimmen, wurden Messungen zur koronaren Hämodynamik am isoliert perfundierten Herzen (nach Langendorff) durchgeführt.

Tabelle 5: Dephosphorylierungsrate der in dieser Arbeit verwendeten 5'-Monophosphat-Derivate durch die CD73 im Vergleich zum physiologischen Substrat AMP und A2AR Affinitäten der daraus resultierenden Nucleoside. Die Synthese der Ado-Derivate und der entsprechenden phosphorylierten Verbindungen erfolgte durch El-Tayeb/Müller am pharmazeutischen Institut der Universität Bonn.

Nucleotid	Dephosphorylierung [%]* durch die CD73 (Ratte)	Nucleosid	A _{2a} Ado Rezeptor Affinität [nM ± SEM]
AMP  A	100 ± 1	Adenosin  E	~10 ¹ < K _i < ~10 ²
Propylthio(pt)-AMP  B	47 ± 1	Propylthio(pt)-Adenosin  F	K _i = 1350 ± 390 vs. [³ H] CGS21680
Cyclohexylethylthio(chet)-AMP  C	96 ± 1	Cyclohexylethylthio(chet)-Adenosin  G	K _i = 372 ± 57 vs. [³ H] CGS21680
-- D	--	CGS21680  H	K _i = 13 ± 3.5 vs. [¹²⁵ I] APE

* Die Berechnung der prozentualen Dephosphorylierung der Nucleosid-Monophosphate erfolgte in Relation zur Dephosphorylierung von AMP.

Anhand von Messungen der IFN- γ Freisetzung aus CD4⁺ T Effektor-Zellen sollte zusätzlich der Einfluss der neuen Purinverbindungen auf die Immunreaktion gemessen werden. Als Referenz diente CGS 21680, ein bereits in der Literatur gut charakterisierter spezifischer A2AR Agonist (Webb et al. 1993, Shryock et al. 1998, Lappas et al. 2005).

Tabelle 5 zeigt verschiedene Strukturderivate des Ado und ihre Affinitäten zum A2AR. Außerdem sind die entsprechenden phosphorylierten Verbindungen aufgelistet sowie die Rate der CD73 vermittelten Dephosphorylierung im Vergleich zu AMP (100%).

Das Grundgerüst der A2AR Agonisten liefert in dieser Arbeit das Ado selbst. Modifikationen am C2-Atom der Adenin-Gruppe und/oder am C5-Atom der Ribose-Gruppe sind Kennzeichen höchst wirksamer und selektiver A2AR Agonisten. CGS 21680 (Tab. 5H) weist am C2-Atom des Adenins eine 4-(Carboxyethyl)phenylethylamino-Gruppe auf. Gleichzeitig ist das C5-Atom der Ribofuranose mit einem N-Ethylcarboxyamid substituiert. Der K_i von CGS 21680 zum A2A Rezeptor beträgt 27nM (Lappas et al. 2005). Die Propylthio-Derivate (Tab. 5F/B) sind ein Nukleosid/Nukleotid, dessen Adenin am C2 Atom über eine Schwefel(thio)bindung eine Propyl-Kette aufweist. Propylthio-Ado weist für den A2A Rezeptor einen $K_i=1.35\mu\text{M}$ auf (El-Tayeb et al. 2009). Die Dephosphorylierung des Propylthio-AMP durch die CD73 liegt im Vergleich zum AMP bei $47 \pm 1\%$. Die Cyclohexylethylthio-Derivate (Tab. 5G/C) sind am C2-Atom ihres Adenins über eine Schwefel(thio)bindung und einer Ethylgruppe mit einem Hexylring substituiert. Der K_i von Cyclohexylethylthio-Ado zum A2A Rezeptor beträgt 347nM (El-Tayeb et al. 2009). Die Dephosphorylierung des Cyclohexylethylthio-AMP durch die CD73 liegt im Vergleich zum AMP bei $96 \pm 1\%$.

4.2.1. Koronare Hämodynamik

Um Veränderungen der koronaren Flußrate infolge der Gabe von AMP- bzw. Ado-Derivaten zu messen, wurden isolierte Herzen nach der Methode von Langendorff Druck-konstant perfundiert. Dem Perfusat wurde seitenständig das entsprechende AMP- bzw. Ado-Derivat zugeführt.

Abbildung 33 zeigt exemplarisch die A2AR vermittelte Wirkung auf den koronaren Fluß am Langendorff-Herzen. Nach reaktiver Hyperämie wurden dem Perfusat unterschiedliche Konzentrationen des A2AR Agonisten CGS 21680 zugegeben und die koronaren Flußänderungen gegen die Zeit gemessen. CGS 21680 wirkte bereits bei geringen nMolaren Konzentrationen vasodilatorisch. Dieser Effekt war schnell reversibel. Eine anschließend ausgelöste reaktive Hyperämie zeigte, dass die Herzgefäße nach der CGS Behandlung nicht an Funktionalität verloren haben.

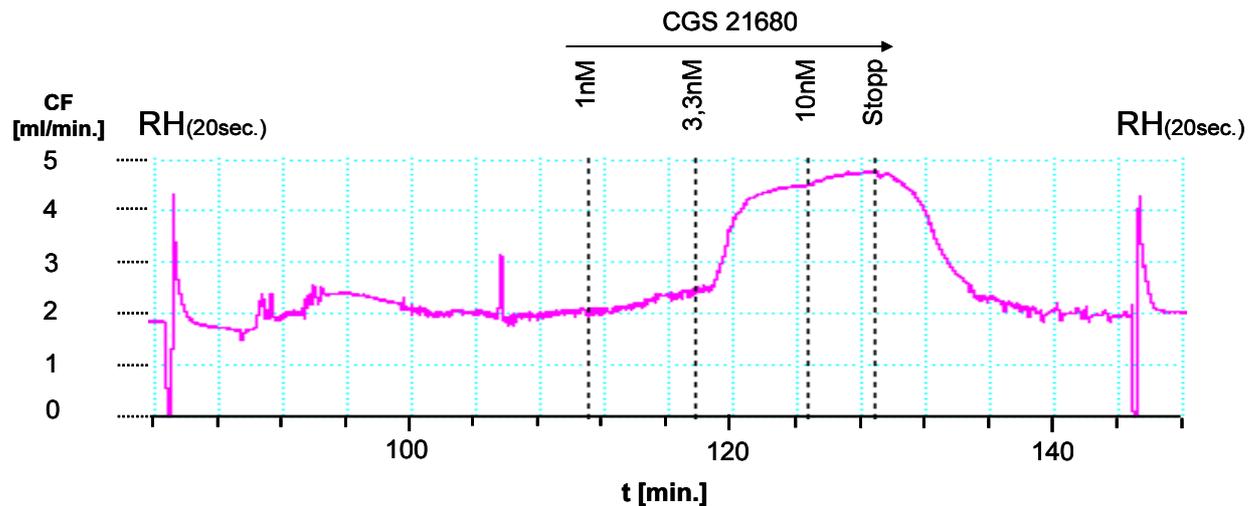


Abbildung 33: Einfluss des A2AR Agonisten CGS 21680 auf den koronaren Fluß am isoliert perfundiertem Herzen der Maus. CF: koronarer Fluß. RH: reaktive Hyperämie.

Abbildung 34 zeigt exemplarisch die Wirkung von Propylthio(pt)-Ado und Propylthio(pt)-AMP auf den koronaren Fluss am isoliert perfundierten Herzen. Im Vergleich zu Ado (maximale Flusserhöhung bei 330nM) zeigt das pt-Ado im nMolaren Bereich noch keine Wirkung auf den koronaren Fluss des Herzens. Erst bei einer Konzentration von 1µM ist eine Erhöhung des koronaren Flusses ersichtlich. Auch bei einer Konzentration von 10µM erreicht die Änderung des koronaren Flusses nicht die maximale Flußerhöhung, die durch 330µM Ado vermittelt wurde. Da eine reaktive Hyperämie nach dem Austesten des pt-Ado eine sehr gute vasodilatorische Reaktivität des Versuchsherzens zeigte, wurde am selben Herzen auch das pt-AMP ausgetestet. Konzentrationen von 1µM und 3,3µM bewirkten keine Vasodilation. Bei 10µM pt-AMP kam es sogar zu einem rapiden Abfall des koronaren Flusses, im Sinne einer Vasokonstriktion.

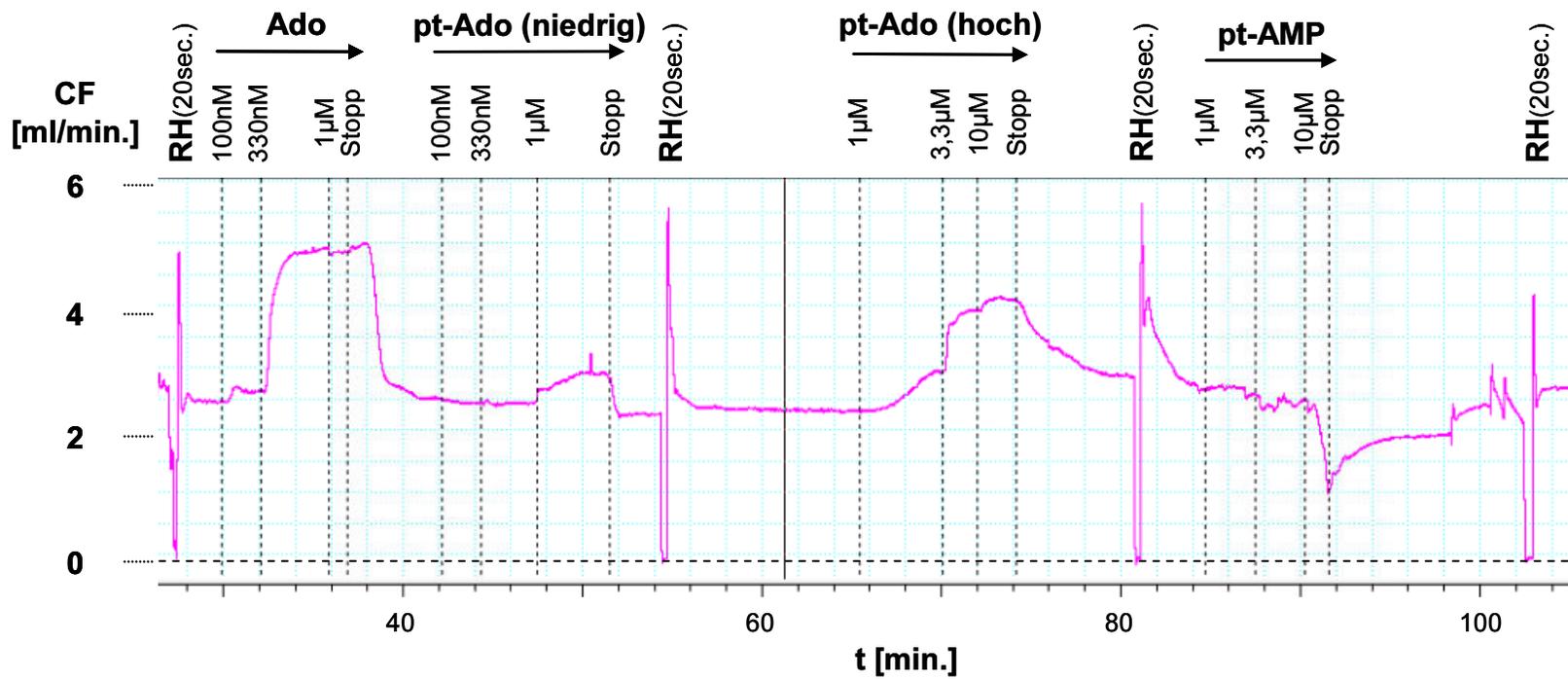


Abbildung 34: Einfluss von Adenosin (Ado), Propylthio(pt)-Ado und Propylthio(pt)-AMP auf den koronaren Fluß am isoliert perfundiertem Herzen der Maus. CF: koronarer Fluß. RH: reaktive Hyperämie.

Die Wirkung von Cyclohexylethylthio(chet)-Ado und chet-AMP auf den koronaren Fluss ist exemplarisch in Abbildung 35 gezeigt.

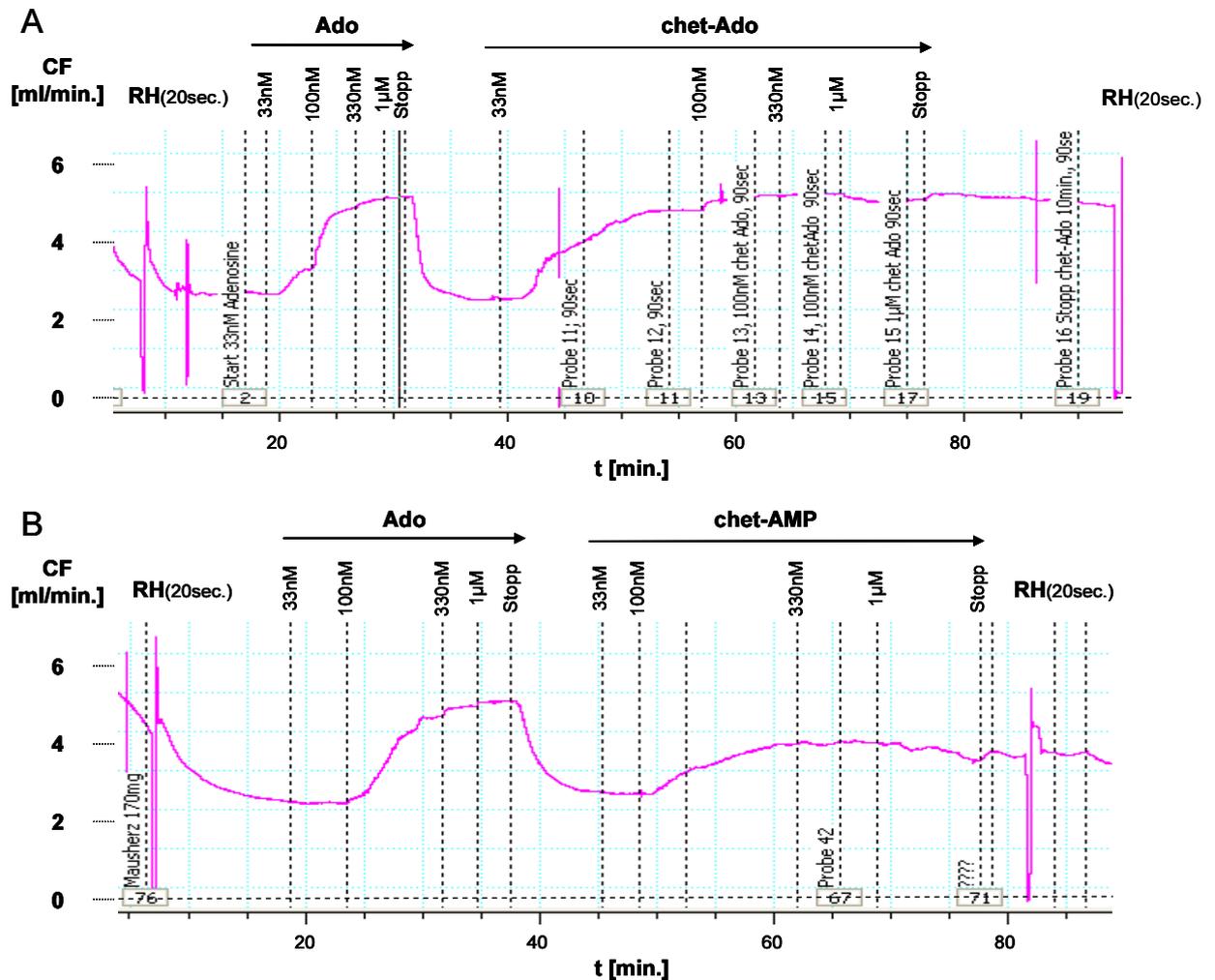


Abbildung 35: Einfluss von Adenosin (Ado) und der Cyclohexylethylthio(chet)-Präparate auf den koronaren Fluss am isoliert perfundierten Langendorff-Herzen der Maus. A) Wirkung von chet-Ado im Vergleich zu Ado B) Wirkung von chet-AMP im Vergleich zu Ado. CF: koronarer Fluß. RH: reaktive Hyperämie.

Da nach Gabe von chet-Ado der Koronarfluß nicht mehr auf Kontrollniveau abfiel, wurde für jedes Purin-Derivat ein neues Herz verwendet. Wie in Abbildung 40A zu sehen ist, bewirkt Ado eine maximale Flußerhöhung bei 100nM. Im Vergleich dazu bewirkte das chet-Ado bereits bei einer Konzentration von 33nM eine nahezu maximale Wirkung (Abb. 35A). Steigerungen der chet-Ado Konzentration auf 100nM, 330nM und 1µM beeinflussten den koronaren Fluß nur noch geringfügig.

Die Wirkung von Cyclohexylethylthio-AMP auf den koronaren Fluss ist in Abbildung 35B gezeigt. Man sieht, dass im Vergleich zu chet-Ado das chet-AMP die Koronarien nur moderat dilatierte. Eine Steigerung der chet-AMP-Konzentration auf 330nM und 1µM führten zu keinen weiteren Anstieg des Koronarflusses.

Abbildung 36 fasst die Quantifizierung dreier unabhängig durchgeführter Versuche zusammen.

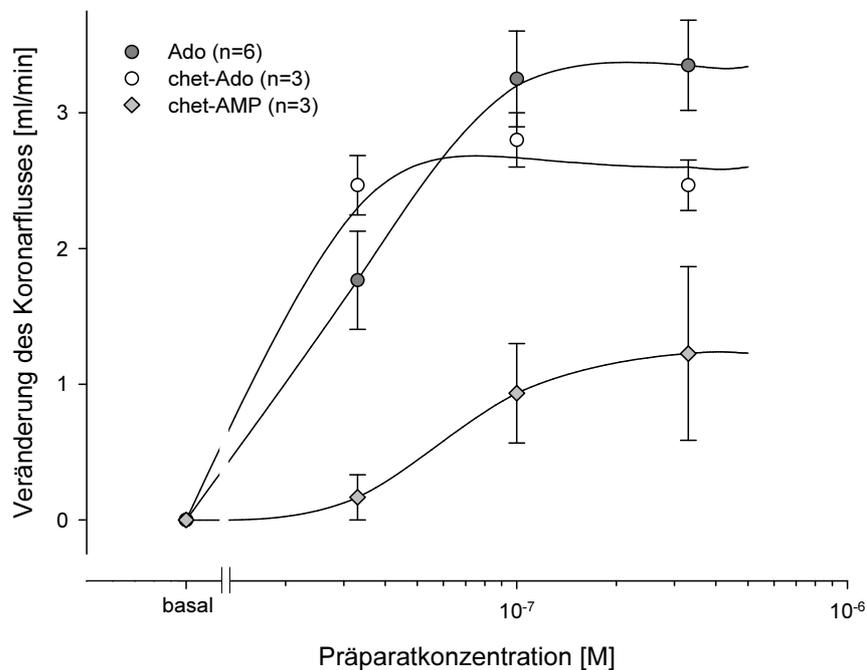


Abbildung 36: Quantifizierung des Einflusses von Adenosin (Ado), Cyclohexyl-ethylthio(chet)-Ado und chet-AMP auf den koronaren Fluss am isoliert perfundierten Herzen der Maus. Mittelwert \pm SEM.

Hieraus geht hervor, dass Ado bei 33nM eine etwa halb maximale Flußerhöhung in den Koronargefäßen bewirkt. Zwischen 100nM und 330nM zeigt Ado maximale Wirkung. Die maximale Wirksamkeit von chet-Ado auf den Koronarfluß ist bereits bei 33nM erreicht und liegt im Mittel aber fast 25% unter der Maximalwirkung von Ado. chet-AMP bewirkt bei gleichen Konzentrationen eine Flußänderung, die letztendlich um mehr als 60% geringer ausfällt als die maximal durch Ado vermittelte Flußänderung.

4.2.2. Wirkung von Adenosin und Cyclohexylethylthio(chet)-Adenosin/AMP auf die arterielle Hämodynamik

Ado beeinflusst nicht nur den koronaren Blutfluss, sondern verursacht auch über eine Aktivierung des A2AR bei intravenöser Verabreichung eine systemische Vasodilatation, was dann zu einer Abnahme des arteriellen Blutdruckes führt. Um den Effekt der Adenin Derivate auf den peripheren Widerstand zu untersuchen, wurden bei narkotisierten Mäusen die *V. jugularis* und *A. carotis* rechtsseitig katheterisiert. Über die Jugularvene erfolgte die Gabe von Ado, chet-Ado bzw. chet-AMP. An der Karotis wurden die Messungen zur arteriellen Blutdruckbestimmung durchgeführt. Abbildung 37 fasst alle erhobenen Daten zur Wirkung von Ado auf den mittleren arteriellen Blutdruck und die Herzfrequenz während intravenöser Infusion zusammen.

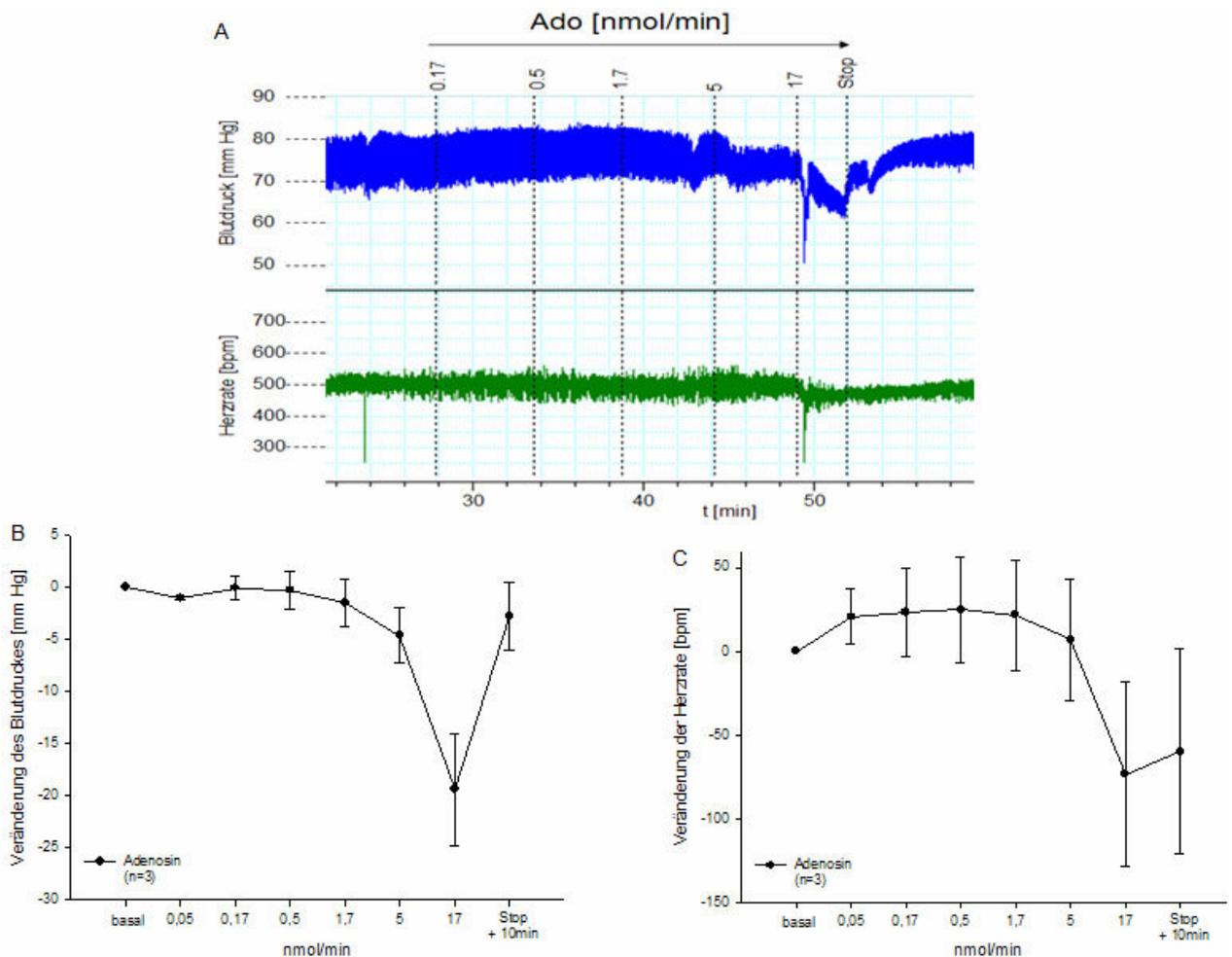


Abbildung 37: Wirkung von Adenosin auf den arteriellen Blutdruck und die Herzfrequenz während intravenöser Infusion. A) Rohdaten der konzentrationabhängigen Veränderung des Blutdruckes und der Herzfrequenz infolge einer Adenosininfusion. Quantifizierung der Veränderung des Blutdruckes B) und der Herzfrequenz C) bei einer intravenösen Adenosininfusion. Mittelwert \pm SEM.

Man sieht, dass Ado bei Infusionsraten zwischen 0.05 - 1.7nmol/min. keine Effekte auf Blutdruck und Herzfrequenz ausübt. Erst im Bereich von 1.7 - 5nmol/min. kommt es zu einer erkennbaren Abnahme des Blutdruckes um ca. 5mm Hg. Parallel dazu nahm auch die Herzfrequenz ab.

Um die Schwellendosis zu bestimmen, bei dem die chet-Derivate den peripheren Widerstand beeinflussen, wurde jeweils chet-Ado und chet-AMP unabhängigen Tieren mit einer Geschwindigkeit von 0.5nmol/min. bzw. 5nmol/min. über einen Zeitraum von 5 Minuten infundiert. Abbildung 38 fasst die Quantifizierung dieser Versuchsreihe (n=6-7) zusammen.

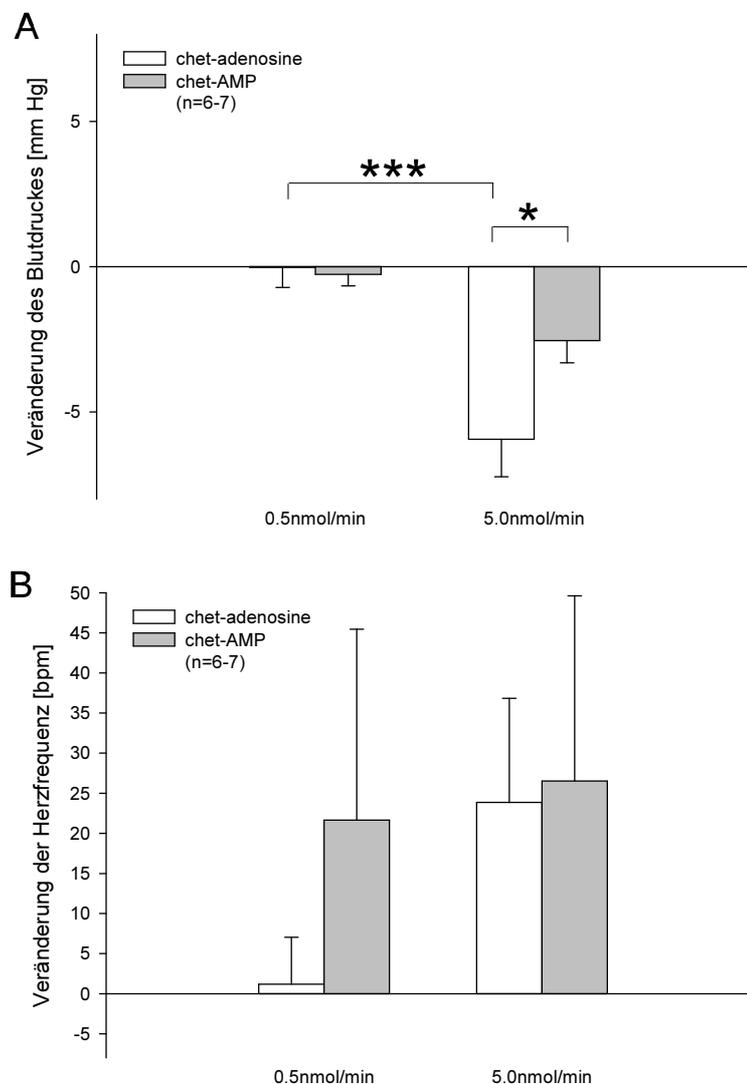


Abbildung 38: Quantifizierung der Wirkung von chet-Ado und chet-AMP auf A) arteriellen Blutdruck und B) Herzfrequenz nach 5 Minuten Infusion. Mittelwert + SEM (paarweiser Vergleich nach Holm-Sidak: * $p < 0,050$; *** $p < 0,001$).

Man sieht, dass bei einer Infusionsrate von 0.5nmol/min. sich keine bzw. nur eine geringfügige Verringerung des Blutdruckes zeigte. Eine Infusionsrate von 5.0nmol/min. hingegen bewirkte bei beiden chet-Derivaten einen erkennbaren Abfall des Blutdruckes. Es zeigten sich Unterschiede zwischen den verwendeten Infusionsraten als auch zwischen den verwendeten Stoffklassen (Abb. 38A; ANOVA: Infusionsrate $F_{1,25} = 20,924$; $p < 0,001$; Stoffklasse $F_{1,25} = 3,099$; $p = 0,092$; Infusionsrate * Stoffklasse $F_{1,25} = 4,123$; $p = 0,055$). Die Wirkung des chet-Ado lag im Mittel bei einer Differenz von 6mm Hg und ist somit mit der Wirkung von Ado vergleichbar. Die Wirkung des chet-AMP auf den Blutdruck fiel deutlich geringer aus. Mit einer mittleren Reduktion von 3mm Hg ist diese im Vergleich zum chet-Ado um 50% geringer.

Die Herzfrequenzen zeigten unabhängig von der Infusionsrate und der Stoffklasse im Mittel eine Erhöhung (Abb. 38B). Diese mittlere Erhöhung fiel bei einer Infusionsrate von 0.5nmol/min. für das chet-AMP höher aus als für das chet-Ado. Bei Infusionsraten von 5.0nmol/min. zeigten beide chet-Derivate ähnlich hohe reflektorische Veränderungen.

4.2.3. IFN- γ Freisetzung von CD4⁺ T Zellen

Ado bzw. der A2AR beeinflusst nicht nur die Hämodynamik über vasodilatierende Wirkung, sondern Ado induziert auch die Aktivierung des A2AR auf Lymphozyten und kann darüber die Immunantwort modulieren. Um die Wirkung der chet-Derivate auf die IFN- γ Freisetzung aus T Zellen zu messen, wurden CD4⁺ Zellen aus der Milz von Mäusen isoliert und mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörper stimuliert. Nach Inkubation über 18 Stunden erfolgte der Nachweis von IFN- γ in den Zellüberständen mittels ELISA. Abbildung 39 zeigt eine Dosis-Wirkungskurve für CGS 21680 bei den in dieser Arbeit verwendeten Stimulationsbedingungen (anti-CD3: 0.4 μ g/ml; anti-CD28: 2.5 μ g/ml). Man sieht, dass CGS 21680 die IFN- γ Freisetzung in einem Dosisbereich zwischen 10pM und 1 μ M wirksam hemmt. Die effektive Dosis für eine 50%ige Hemmung (EC_{50}) lag bei 45nM.

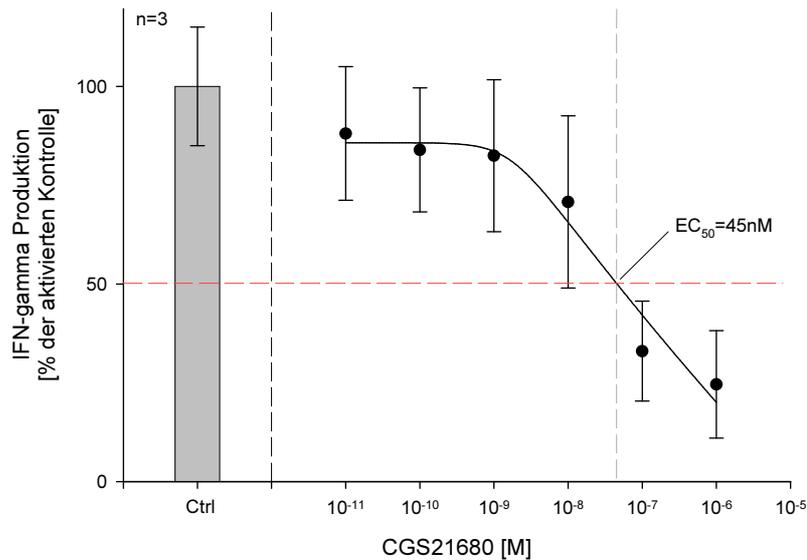


Abbildung 39: Wirkung von CGS 21680 auf die IFN- γ Freisetzung muriner T Zellen stimuliert mit anti-CD3: 0.4 μ g/ml und anti-CD28: 2.5 μ g/ml. Mittelwert \pm SEM.

Der Einfluss von chet-Ado bzw. von chet-AMP auf die IFN- γ Freisetzung von CD4⁺ Zellen ist in Abbildung 40 zusammengefasst. Betrachtet man den Kurvenverlauf für das chet-Ado (rot), so sieht man, dass eine halb maximale Hemmung (EC_{50}) der IFN- γ Freisetzung von CD4⁺ Zellen bei 44nM liegt. Ein inhibitorische Effekt von chet-AMP (schwarz) auf die IFN- γ Freisetzung von CD4⁺ Zellen ist dagegen geringer und der EC_{50} liegt bei 5 μ M. Somit ist die Wirksamkeit des AMP Derivates ca. 100fach schwächer als die des entsprechenden Ado Derivates.

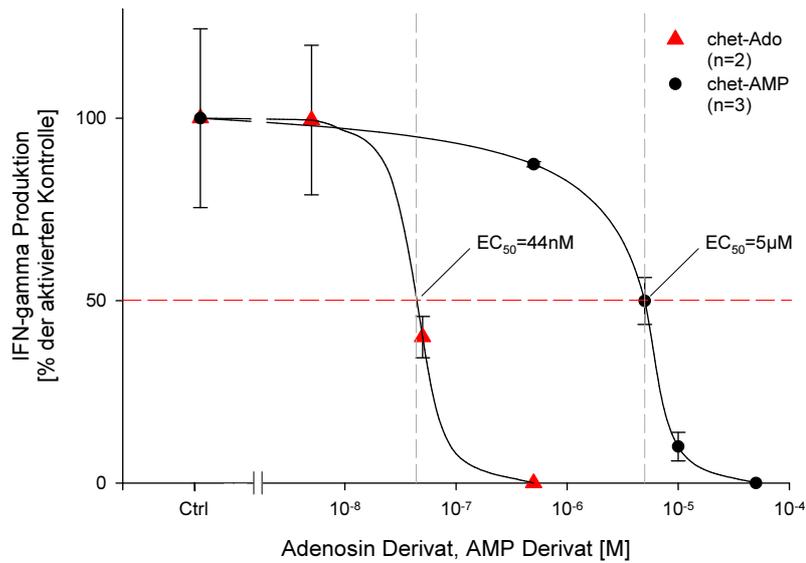


Abbildung 40: Dosis-Wirkungskurven von Cyclohexylethylthio(chet)-Adenosin (rot) bzw. Cyclohexylethylthio(chet)-AMP (schwarz). Gemessen wurde die IFN- γ Freisetzung wildtypischer, antigen stimulierter CD4⁺ Zellen. Mittelwert \pm SD.

Neben wildtypischen CD4⁺ Zellen wurden bei diesem Assay System auch CD4⁺ Zellen aus CD73 defizienten Mäusen untersucht. Getestet wurde die Wirksamkeit von chet-AMP, das die CD73 benötigt, um das wirksame chet-Ado freizusetzen.

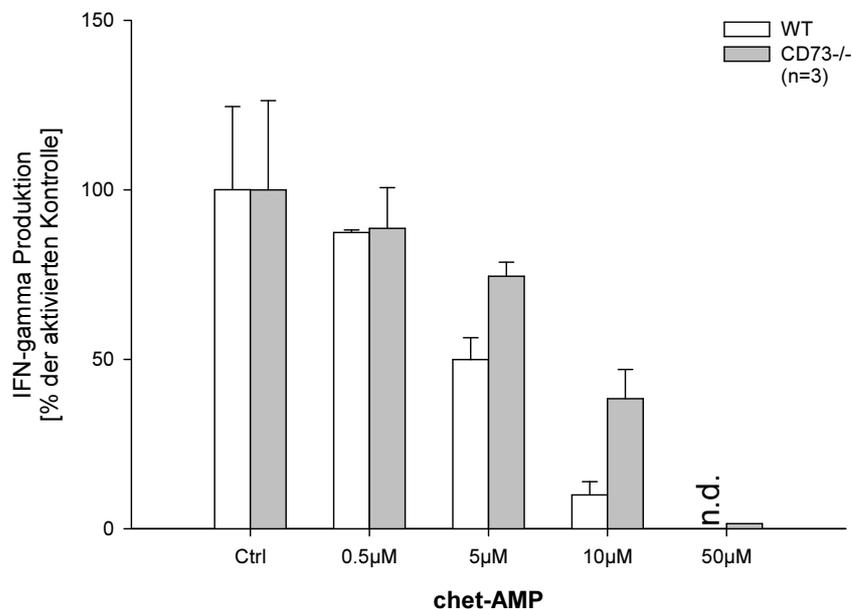


Abbildung 41: Wirkung von Cyclohexylethylthio(chet)-AMP auf die IFN- γ Freisetzung von WT und CD73^{-/-} CD4⁺ Zellen. n.d.: not detectable. Mittelwert + SD.

Wie aus den zusammengefassten Daten in Abbildung 41 zu ersehen ist, ist die Wirksamkeit von chet-AMP auf die IFN- γ Freisetzung aus T Zellen bei CD73 defizienten Mäusen im Dosisbereich von 5 μ M und 10 μ M wesentlich geringer ausgeprägt als bei wildtypischen Mäusen. Bei einer Konzentration von 5 μ M findet sich bei den CD73^{-/-} Zellen eine 4fach erhöhte IFN- γ Bildung im Vergleich zu den wildtypischen Zellen. Dies zeigt, dass die auf T Zellen vorhandene CD73 für den Abbau von chet-AMP verantwortlich ist.

Der Vollständigkeit halber wurde auch der Einfluss des Propylthio(pt)-Ado bzw. des Propylthio(pt)-AMP (s. Tab. 5) auf die IFN- γ Freisetzung von CD4⁺ Zellen überprüft. Diese Daten sind in Abbildung 42 zusammengefasst. In dieser Abbildung ist zu sehen, dass der EC₅₀ für pt-Ado bei ca. 10 μ M liegt (Abb. 42A), während eine Dosis von 10 μ M pt-AMP die IFN- γ Freisetzung um ca. 70% hemmte (Abb. 42B).

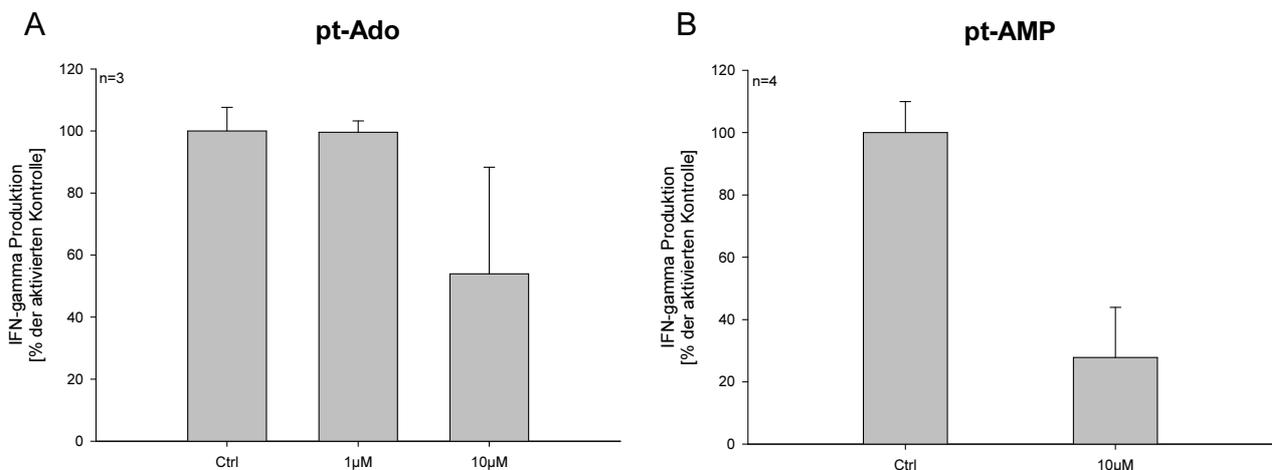


Abbildung 42: Wirkung von Propylthio(pt)-Adenosin A) bzw. Propylthio(pt)-AMP B) auf die IFN- γ Freisetzung von CD4⁺ Zellen. Mittelwert + SD.

4.2.4. Cyclohexylethylthio(chet)-Adenosin/AMP im Arthritis Modell

Da mehrere Veröffentlichungen Th1 CD4⁺ Zellen in Zusammenhang mit der Pathogenese der Kollagen induzierten Arthritis (CIA) bringen (Chiocchia et al. 1993, Doncarli et al. 1999, Marinova-Mutafchieva et al. 1997, Mauri et al. 1996), wurde in einer letzten Versuchsserie das CIA Modell genutzt, um die antiinflammatorische Wirkung von chet-Ado und chet-AMP *in-vivo* zu überprüfen. Die Induktion der CIA erfolgte mittels der Injektion einer CII/Complete Freund's Adjuvant (CFA) Emulsion. Nach 21 Tagen wurde die Immunreaktion durch eine erneute CII Injektion (*boost*) ausgelöst. Gleichzeitig wurden osmotische Pumpen implantiert, die jeweils mit den beiden chet-Derivaten gefüllt wurden. Als Positivkontrollen dienten CIA Mäuse, denen ebenfalls über osmotische Pumpen 50%iges DMSO, das Lösungsmittel beider Purin-Verbindungen, infundiert wurde.

4.2.4a. Entzündungshemmung *in-vivo* – visual scoring und ¹⁹F MRI

Die Entwicklung der CIA wurde über einen Zeitraum von 11 Tagen täglich mittels *visual scoring* (Wertungsliste s. Kap. 3.11.) quantifiziert.

Abbildung 43 fasst die erhobenen Daten zusammen. Man sieht, dass generell in allen drei Versuchsgruppen eine progrediente Zunahme der Anschwellung von Pfoten und Gelenken zu beobachten war. Hierbei wiesen die Tiere der Kontrollgruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg die stärksten Schwellungen auf. Bei den Tieren, die mit dem chet-Ado behandelt wurden, waren wesentlich geringer ausgeprägte Schwellungen nachzuweisen. Die Schwellungen der Tiere, die mit dem chet-AMP behandelt wurden, zeigten dagegen einen intermediären Ausprägungsgrad. Elf Tage nach akuter Arthritis Induktion erreichte der *visual score* bei den Kontrolltieren einen Wert von 4.33 ± 2.29 . Die Tiere der chet-Ado Gruppe wiesen im Vergleich dazu ca. 50% geringere Schwellungen auf. Bei den Tieren der chet-AMP Gruppe war nach 11 Tagen noch ein ca. 35% geringerer Schwellungsgrad nachzuweisen.

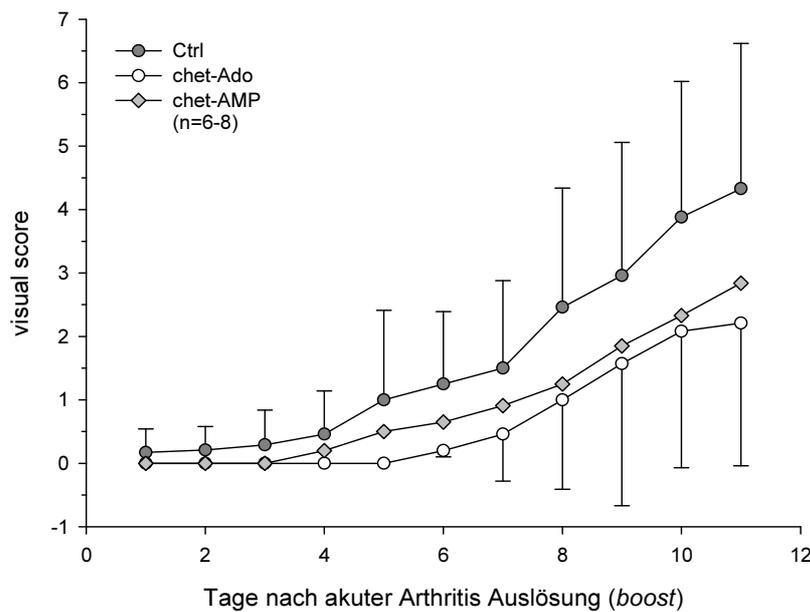


Abbildung 43: Effekt von chet-Ado/AMP auf die Kollagen induzierte Arthritis (CIA) Entwicklung: *visual scoring* der CIA Entwicklung nach akuter Arthritis Induktion (*boost*). Mittelwert \pm SD.

Um das Ausmaß der CIA vermittelten Entzündung genauer zu bestimmen, wurden ^{19}F Magnetresonanzbildgebungs(^{19}F MRI)-Messungen durchgeführt. Die Bildgebung erfolgte am 8. und am 11. Tag nach *boost*. Zur Visualisierung entzündeter Areale wurde den Tieren am Tag vor der ersten MR Messung Perfluorcarbone (PFC) intravenös injiziert. Diese systemische Verabreichung der PFCs bewirkt eine effiziente und selektive Anreicherung des Fluors in den zirkulierenden Zellen des Monozyten/Makrophagen Systems. Diese Methode erlaubt es, die Infiltration immunkompetenter Zellen in entzündeten Arealen unmittelbar zu beobachten (Flögel et al. 2008).

Abbildung 44 zeigt repräsentative MR Bilder einer Maus 11 Tage nach akuter Arthritis Induktion. Dargestellt sind im anatomischen Protonen (^1H) MR Bild (Abb. 44A) die Hinterpfoten einer Maus. Das Perfluorcarbonsignal verteilt sich im ^{19}F MR Bild auf distinkte Bereiche (Abb. 44B). Im *merge* (Abb. 44C) ist das Fluorsignal rot farbkodiert. Man sieht, dass die PFCs lokal auf die Gelenksbereich der Mausextremitäten beschränkt sind.

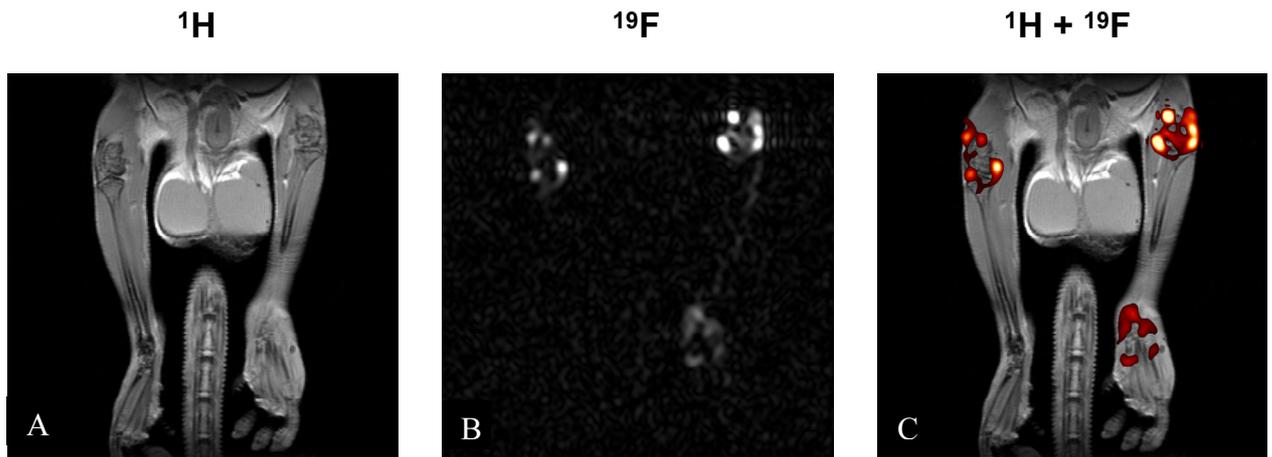


Abbildung 44: Repräsentative MR Bilder zur Darstellung entzündeter Areale in murinen Gelenken nach Kollagen induzierter Arthritis (CIA). A) anatomisches Protonen (^1H) MR Bild. B) Perfluorcarbone (PFCs) im ^{19}F MR Bild. C) Merge: PFCs rot farbkodiert.

Abbildung 45 zeigt die Quantifizierung (Signalintensität in *arbitrary units*: a.u.) der entzündeten Gelenksareale, die sich mittels ^{19}F MR Bildgebung darstellen ließen.

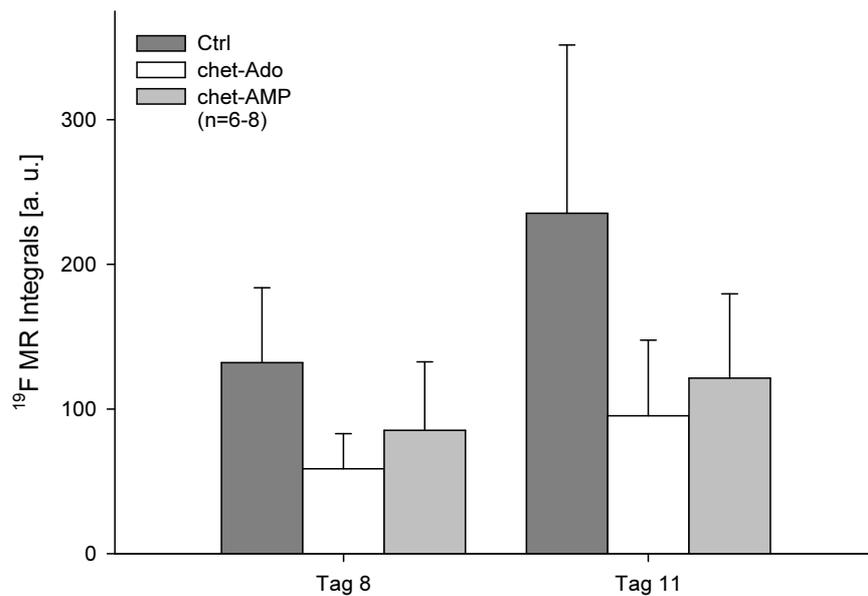


Abbildung 45: Quantifizierung der Infiltration von PFCs in murine Gelenke nach Kollagen induzierter Arthritis (CIA). Signalintensitäten in arbitrary units (a.u.) 8 und 11 Tage nach akuter Arthritis Induktion (*boost*). Mittelwert + SD.

Man sieht, dass am 8 Tag nach akuter Arthritis Induktion die Kontrolltiere Fluorsignalstärken zeigten, die im Mittel bei 132.00 ± 51.79 a.u. lagen. Die Tiere, die mit dem chet-Ado behandelt wurden, wiesen im Vergleich dazu ein um mehr als 50% geringeres Fluorsignal auf. Bei den Tieren, die mit chet-AMP behandelt wurden, zeigte sich ein intermediäres Fluorsignal. Hier war nach 8 Tagen verglichen zur Kontrollgruppe eine ca. 35% geringere Fluorintensität nachzuweisen. Nach 11 Tagen ließ sich generell eine Verstärkung der Signalintensitäten detektieren. Die Verhältnisse zwischen den Behandlungsgruppen veränderten sich aber kaum. Die Tiere der chet-Ado Gruppe wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe ein ca. 60% geringeres Fluorsignal auf. Bei den Tieren der chet-AMP Gruppe war verglichen zur Kontrollgruppe nach 11 Tagen eine ca. 50% geringere Fluorintensität nachzuweisen.

4.2.4b. Serumzytokinspiegel

Am Ende einer Versuchsserie im CIA Modells wurde den Versuchstieren Blut, ca. 1ml über Herzpunktion, entnommen. Im daraus gewonnen Serum wurden anschließend die Konzentrationen 23 verschiedener Zytokine mittels eines Multi-Plex Assays bestimmt. Dieser Multi-Plex ermöglichte den Nachweis von IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , KC, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und TNF- α .

Die Zytokine IL-4 und IL-12(p70) ließen sich im Serum der CIA Mäuse nicht nachweisen. Die Daten aller nachweisbaren Zytokine sind in den Abbildungen 46-48 zusammengefasst.

In Abbildung 46 sind alle Zytokine dargestellt, die im Mittel sowohl bei den Tieren, die mit dem chet-Ado behandelt wurde, als auch bei den Tieren, die mit dem chet-AMP behandelt wurden, größere Unterschiede aufwiesen. Die Zytokine IL-1 β , IL-6, IFN- γ , MCP-1 zeigten sich bei beiden Behandlungsgruppen erniedrigt. Die Veränderungen für IFN- γ und MCP-1 lagen bei der chet-Ado Gruppe im Bereich einer signifikanten Reduktion. Auffallend ist, dass IL-10 in beiden Behandlungsgruppen als einziges Zytokin im Mittel erhöht nachzuweisen war. IL-10 ist aber auch ein Zytokin, dem anti-inflammatorische Funktion zukommt.

In Abbildung 47 sind alle Zytokine dargestellt, die im Mittel nur in einer der beiden Behandlungsgruppen größere Unterschiede zur Kontrollgruppe zeigten. Innerhalb der Versuchsgruppe, die mit chet-Ado behandelt wurde, zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe die Zytokine IL-2, IL-12(p40), Eotaxin, KC (CXCL1), MIP-1 α (CCL3) und MIP-1 β (CCL4) erniedrigt. Die Veränderungen für IL-12(p40) lagen hier im Bereich einer signifikanten Reduktion. Innerhalb der Versuchsgruppe, die mit chet-AMP behandelt wurde, zeigten sich IL-5 und IL-17 verändert. IL-5 ließ sich im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht nachweisen. Im Vergleich zur chet-Ado Gruppe lag diese Veränderung sogar im Bereich eines signifikanten Anstieges. IL-17 war dagegen im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt.

In Abbildung 48 sind alle Zytokine dargestellt, die im Mittel in beiden Behandlungsgruppen kaum Unterschiede zur Kontrollgruppe zeigten. Die Zytokine IL-1 α , IL-3, IL-13, IL-9, TNF- α , G-CSF und RANTES (CCL5) zeigten hier nach Arthritis Induktion unabhängig von der Behandlungsgruppe keine Unterschiede zur Kontrollgruppe.

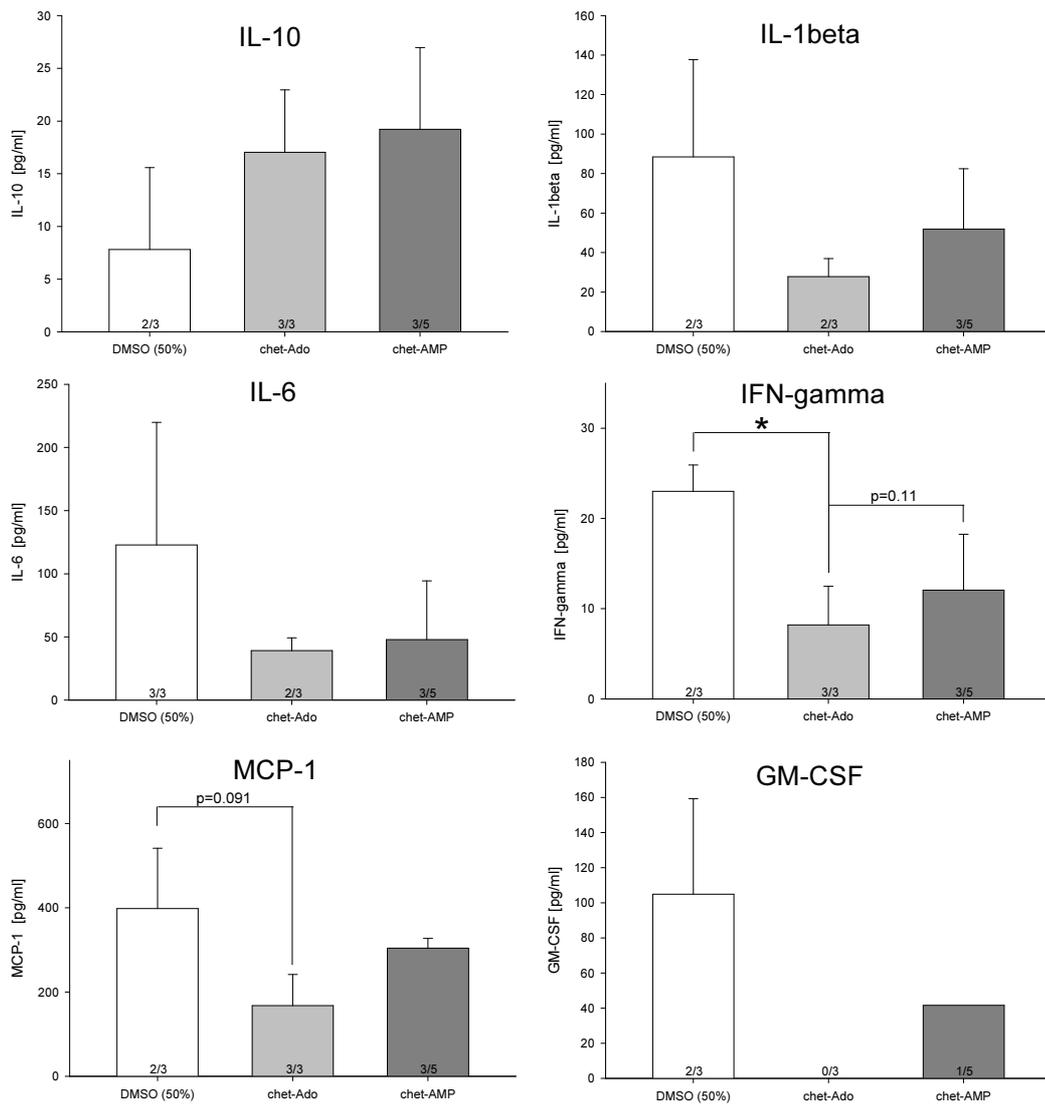


Abbildung 46: Serumzytokinspiegel nach Kollagen induzierter Arthritis (CIA): Einfluß von chet-Ado und chet-AMP. Zytokine, deren Konzentration innerhalb der chet-Ado Gruppe und der chet-AMP Gruppe sich im Mittel \pm Standardabweichung von der mittleren Konzentration der Kontrollgruppe unterschieden. Mittelwert + SD.

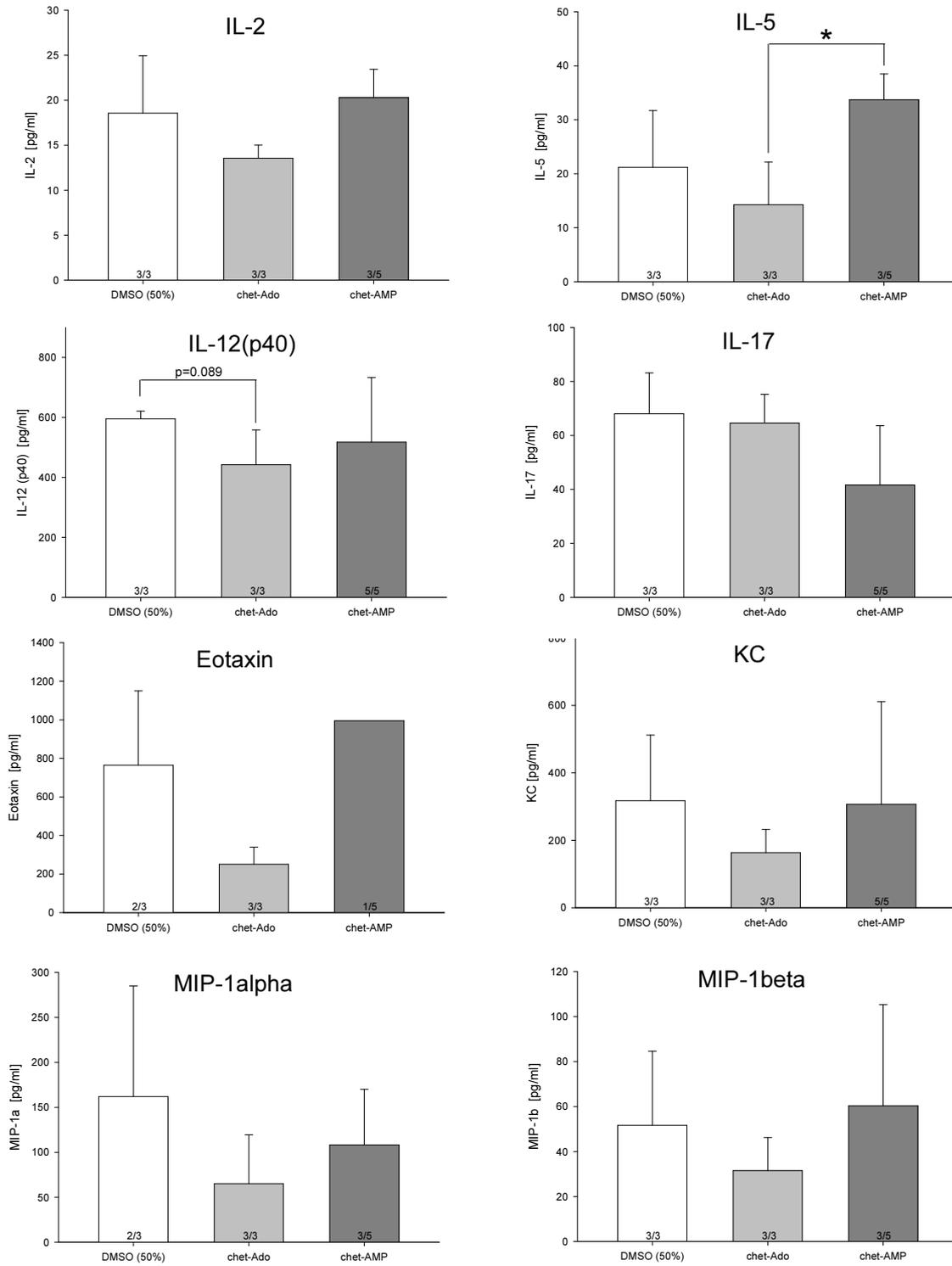


Abbildung 47: Serumzytokinspiegel nach Kollagen induzierter Arthritis (CIA): Einfluß von chet-Ado und chet-AMP. Zytokine, deren Konzentration innerhalb der chet-Ado oder chet-AMP Gruppe im Mittel \pm Standardabweichung von der mittleren Konzentration der Kontrollgruppe unterschieden. Mittelwert + SD.

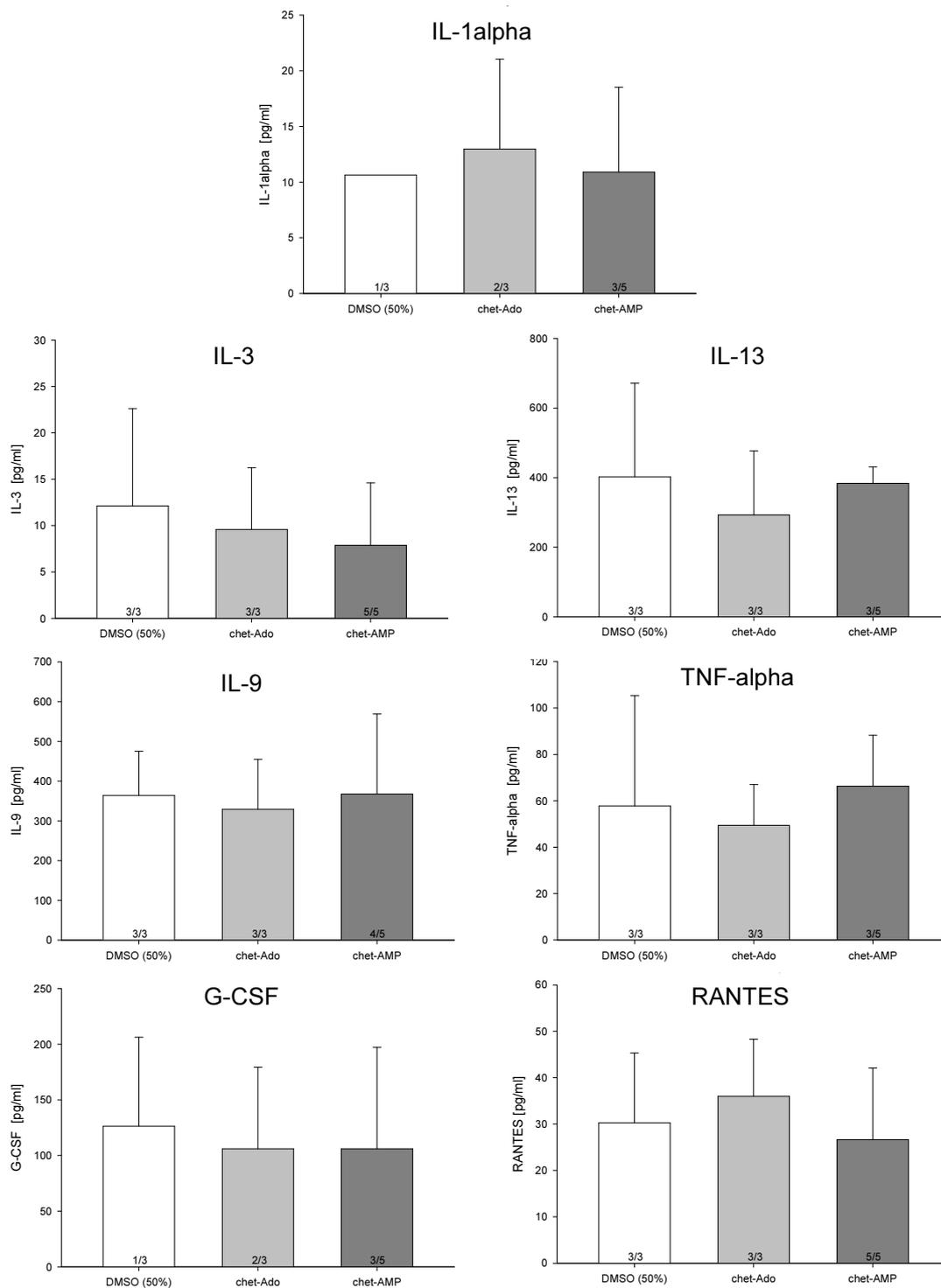


Abbildung 48: Serumzytokinspiegel nach Kollagen induzierter Arthritis (CIA): Einfluß von chet-Ado und chet-AMP. Zytokine, deren Konzentration innerhalb der chet-Ado Gruppe im Mittel \pm Standardabweichung sich nicht von der mittleren Konzentration der Kontrollgruppe unterschieden. Mittelwert + SD.

Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Ausprägungsgrad der CIA und dem Serumzytokinspiegel besteht, wurde die Konzentrationen aller nachgewiesenen Zytokine gegen den jeweiligen *visual score* aufgetragen. Wie in Abbildung 49 dargestellt war eine positive Korrelation zwischen den zu detektierenden Zytokinen im Serum aller CIA Mäuse und dem anhand des *visual scoring* bestimmten Ausprägungsgrad der Kollagen induzierten Arthritis nachzuweisen (pearson correlation: $r = 0,233$; $p = 0.001$; $n=195$). Somit besteht ein positiver Zusammenhang zwischen der Schwere der Arthritis und der im Serum befindlichen Menge an Zytokinen.

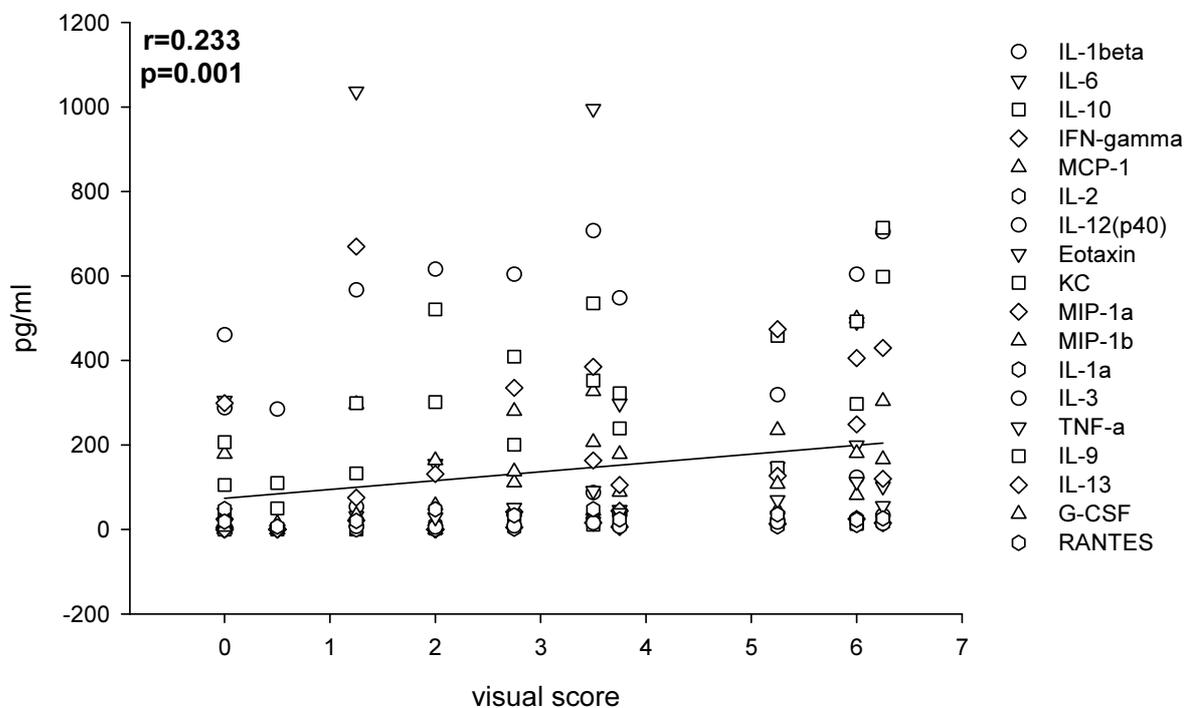


Abbildung 49: Korrelation zwischen dem Serumzytokinspiegel und dem Ausprägungsgrad der Kollagen induzierten Arthritis (CIA) 11 Tag nach akuter Arthritis Induktion (*boost*). *Pearson correlation:* $r = 0.233$; $p = 0.001$; $n = 197$.

5. Diskussion

5.1. Physiologische Rolle der CD73 bei der Immunantwort von T Zellen

Diese Arbeit erweitert das bisherige Wissen über die Aktivität der ekto-Nukleotid-Kaskade auf CD4⁺/CD25⁺ regulatorischen Treg Zellen. Sie gibt Einblick in die wichtige Rolle über das von dieser T Zell Subpopulation durch die CD73 gebildetem Ado und beschreibt A2AR vermittelte Signalmechanismen. Eine wichtige Erkenntnis ist, dass bei stimulierten T Zellen Ado in ausreichenden Mengen durch die CD73 bereitgestellt wird, um verstärkt die nukleare Translokation von NF-κB zu hemmen, was gleichzeitig zu einer verminderten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen führt. Da es bei Treg Zellen zu einer T Zell Rezeptor vermittelten Hemmung der Expression des P2X7 Rezeptor und des CNT2 Nukleosid Transporters kommt (cand. med. Reinbeck, Institut f. Herz- u. Kreislaufphysiologie, Universität Düsseldorf), wirkt dies wahrscheinlich einer ATP induzierten Apoptose der Treg Zellen entgegen. Hierdurch wird sichergestellt, dass in inflammatorischen Arealen hohe perizelluläre Konzentrationen an Ado akkumulieren. Somit scheint die kontinuierliche Bildung von Ado durch die CD73 eine wichtige Rolle bei der Wechselwirkung zwischen der extrazellulären Ado-Bildung und der NF-κB abhängigen Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen zuzukommen.

5.1.1. Expression der CD73 auf Immunzellen

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit *in-vitro* Untersuchungen an murinen CD4⁺ T Zellen der Milz. Die Milz zählt neben den Lymphknoten zu den sekundären lymphoiden Organen. Sie ist das größte lymphatische Organ und setzt sich im Wesentlichen aus einer Kapsel, der roten Pulpa und der weißen Pulpa zusammen. Während die rote Pulpa dem Abbau überalteter Erythrozyten durch Makrophagen dient, stellt die weiße Pulpa wichtige Bereiche der Infektionsabwehr. Durch antigene Induktion kommt es hier zur Ausdifferenzierung und Proliferation pathogen spezifischer T- und B Zellen. Auch ist bekannt, dass auf den Leukozyten der Milz die CD73 exprimiert wird (Thompson et al. 2004). Desweiteren weiß man seit wenigen Jahren, dass nur eine kleine Subpopulation der CD4⁺ T Zellen auch die CD73 exprimiert (Deaglio et al. 2006). Sowohl in immunhistologischen Färbungen als auch anhand von FACS Analysen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nicht

alle T Zellen der Milz die ekto-Nukleotidase CD73 exprimieren. Etwa nur 10-20% der CD4⁺ T Zellen der Milz waren positiv für die CD73. Unabhängig davon, ob die Splenozyten CD4 negativ oder positiv waren, waren die CD73 positiven Zellen nicht als distinkte Populationen von den CD73 negativen Zellen abzutrennen. Dies lässt darauf schließen, dass der Grad der CD73 Expression abhängig vom Differenzierungsstatus der Zellen ist. Vor knapp 25 Jahren beschrieb Thompson et al. (1986) die CD73 bereits als Reifungsmarker für B- und T Zellen. Kobie et al. 2006 haben ähnliche Ergebnisse publiziert. Die CD73 positiven Zellen ließen sich nicht eindeutig von den CD73 negativen Zellen trennen und die CD73 ist nicht auf allen T Zellen muriner Mäuse zu finden. Überwiegend wird sie von Foxp3⁺ Treg Zellen exprimiert. Diese Beobachtung wurde auch von Deaglio et al. 2007 gemacht. Neben der CD39 exprimieren fast ausschließlich CD4⁺/Foxp3⁺ Treg Zellen auch die CD73.

5.1.2. ATP-Freisetzung aus T Zellen

Damit die CD73 in ausreichenden Mengen Ado bilden kann, um dann immunmodulatorisch auf CD4⁺ Zellen wirken zu können, benötigt die CD73 eine ausreichende AMP Substratkonzentrationen. Dieses AMP als auch ADP und ATP kann im inflammatorischen Gewebe aus nekrotischen/apoptotischen Zellen stammen. ATP kann aber auch infolge physiologischer Prozesse aus Zellen freigesetzt werden. So wird z.B. die *shear* Stress-induzierte ATP Freisetzung aus den verschiedensten Zellen des vaskulären Systems als physiologischer Mechanismus diskutiert (Bodin and Burnstock et al. 2001). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD4⁺ T Zellen nach Behandlung mit Ionomycin ATP verstärkt freisetzen. Ionomycin induziert eine Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺ Konzentration, welches ein wesentlicher Faktor bei der Regulation einer adaptiven Immunantwort ist. Auch wurde in den Überständen von CD4⁺ T Zellen unabhängig davon, ob sie antigen behandelt wurden oder nicht, ATP nachgewiesen. Dieses ATP wird aber sehr schnell von den Zellen dephosphoryliert. Als diese Daten erhoben wurden, konnte auch von Schenk et al. (2008) auf Einzelzellebene gezeigt werden, dass T Zellen infolge antigener Stimulierung mittels anti-CD3 Antikörper ATP freisetzen. Die ATP Freisetzung erfolgte hier bei CD4⁺ T Zellen über Pannexin-1 Kanäle. Gleichzeitig stellt dieses ATP wahrscheinlich ein essentielles autokrines Signal dar,

welches als Kostimulator über P2X Rezeptoren wirkt. Eine Hemmung dieses ATP vermittelten Signalweges führt *in-vitro* zu einer verminderten IL-2 Freisetzung und einer eingeschränkten Proliferation von T Zellen. Eine Hemmung der P2X Rezeptor Signalgebung führte *in-vivo* zu einer wesentlichen geringer T Zell vermittelten Inflammation. Eine verminderte Aktivierung des P2X Rezeptors kann prinzipiell entweder durch eine verminderte Expression dieser Rezeptoren erfolgen oder der Ligand ATP wird durch enzymatischen Abbau metabolisiert. Somit kann auch das aus dem ATP hervorgehende Ado teilweise für die antiinflammatorische Effekte von ATP verantwortlich sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der genetische Verlust der CD73 auf T Zellen die Aktivität von NF- κ B und die Freisetzung von Zytokinen dieser Lymphozyten steigert. Dies unterstreicht die wichtige Rolle der ekto-Nucleotid-Kaskade aus CD39 und CD73, die Kennzeichen für CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ Treg Zellen ist (Deaglio et al. 2007). Indem Treg Zellen kontinuierlich das Gleichgewicht zwischen ATP und Ado über die ekto-Nucleotid-Kaskade kontrollieren, modulieren diese Zellen die Immunantwort von stimulierten T Zellen. Der ATP-Rezeptor P2X7 ist der dominante P2X Rezeptor auf murinen CD4⁺ T Zellen und eine autokrine Stimulierung auf T Zellen ist vermutlich erforderlich für eine effektive T Zell Aktivierung (Yu et al. 2009). Eine P2X7 Aktivierung durch ATP kann aber auch die Bildung großer Membranporen induzieren, was letztendlich zum Zelltod führt (Seman et al. 2003). Da Pannexin-Kanäle in direkter Verbindung mit dem P2X7 Rezeptor stehen (Pelegriin and Surprenant 2006) und eine Aktivierung des P2X7 Rezeptors die Öffnung der Pannexin-Kanäle fördert, besteht vermutlich eine positive Rückkopplung um die ATP Freisetzung zu potenzieren (Schenk et al. 2008). Jedoch ist der Schwellwert für die Aktivierung des P2X7 Rezeptors durch ATP ziemlich hoch (EC50 \approx 0.5mM). Was aber viel wichtiger erscheint, ist dass die Expression des P2X7 Rezeptors in stimulierten Treg Zellen signifikant reduziert wird (cand. med. Reinbeck, Institut f. Herz- u. Kreislaufphysiologie, Universität Düsseldorf). Dies scheint es den Treg Zellen zu ermöglichen, trotz hoher ATP Konzentrationen, wie sie in inflammatorischen Arealen vorliegen, sich dem P2X7 induzierten Zelltod zu entziehen. Dies wiederum gewährleistet eine kontinuierliche Präsenz der ekto-Nucleotid Kaskade, um aus ATP Ado zu bilden. Somit ist an der Induktion einer Anergie von Treg Zellen durch ATP, welches ein wichtiges autokrines kostimulatorisches Signal darstellt (Schenk et al. 2008), mit großer

Wahrscheinlichkeit die aufrechterhaltene Bildung von Ado durch Treg Zellen und eine Aktivierung des A2AR beteiligt (Zarek et al. 2008).

5.1.3. Die ekto-Nukleotid Kaskade auf T Zellen

ATP wird nicht nur aus nekrotischen und apoptotischen Zellen freigesetzt (Elliot et al. 2009), sondern auch von Erythrozyten bei einem niedrigen Sauerstoffpartialdruck (Arciero et al. 2008) und von stimulierten Monozyten (Piccini et al. 2008). Dies sollte in inflammatorischen Arealen, wo sich auch Nukleotid freisetzende Immunzellen in unmittelbarer Nähe zueinander finden, zu hohen extrazellulären ATP Konzentrationen führen. Durch die katalytische Aktivität der ekto-Nukleotid-Kaskade (CD39, CD73) kommt es hier gleichzeitig zu einer verstärkten Bildung von Ado. Neben ATP wird aber auch NAD^+ aus apoptotischen Zellen freigesetzt, was eine ADP Ribosylierung (ART2.2) des cytolytischen P2X7 Purinrezeptor bewirkt und damit das Immunsystem über Gewebsschädigungen informiert (Scheuplein et al. 2009). Die biologische Halbwertszeit des extrazellulären NAD^+ wird durch die Aktivität der CD38 (NAD Gylkohydrolase) und der CD203 (Nukleotid-Pyrophosphatase) bestimmt, die NAD zu Nikotinamid und AMP hydrolysieren (Hong et al. 2009, Schuber and Lund 2004). In ähnlicher Weise wird auch extrazelluläres ATP über Membran gebundene Phosphodiesterasen (PDE) zu ADP und/oder AMP hydrolysiert (Yegutkin et al. 2002, Zimmermann 2000). Zusammengenommen zeigen diese Überlegungen, dass AMP nicht alleine über die CD39 gebildet wird, sondern dass weitere enzymatische Reaktionen an der Bereitstellung von AMP beteiligt sind. Folglich sollte der CD73 weitaus mehr Substrat zur Verfügung stehen als alleine das von der CD39 gebildete AMP. Diese Überlegung impliziert, dass der Substratfluss über die CD73 wahrscheinlich höher ist als der über die CD39. Somit sind die Nukleotid metabolisierenden ekto-Enzyme Teil eines komplexen Netzwerkes, in dem der Substratfluss stark über dazwischen geschaltete enzymatische Aktivitäten bestimmt wird.

Derzeit ist wenig über die Aktivitäten der CD38, CD203 und PDE bei der Bildung von AMP auf T Zellen bekannt. Auch weiß man wenig über die extrazelluläre Konzentration von AMP in der unmittelbaren Nähe dieser Zellen. In dieser Arbeit bewirkten unter *in-vitro* Bedingungen 50 μM AMP eine Hemmung der IL-2 und IFN- γ Freisetzung aus T Zellen von jeweils etwa 90%. In Studien an humane neutrophile Granulozyten konnte gezeigt werden, dass diese Zellen mikromolare

Konzentrationen an extrazellulären AMP freisetzen, die dann eine Chlorid-Freisetzung aus Epithelzellen auslösen können (Madara et al. 1993) und die endotheliale Barrierenfunktion fördern (Lennon et al. 1998). Da es der Literatur zufolge keinen AMP Rezeptor gibt, werden diese Effekte mit großer Wahrscheinlichkeit durch die Umwandlung von AMP zu Ado vermittelt.

5.1.4. Die CD73 hemmt die Zytokinfreisetzung über NF-κB

Es ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor NF-κB eine wichtige Rolle bei der Regulation von Immunantworten und Entzündungsprozessen spielt (Beinke and Ley 2004). Auch ist NF-κB eine wichtige Komponente für die FoxP3 Expression während der Differenzierung von natürlichen Treg Zellen (Long et al. 2009). Diese Arbeit zeigt, dass Ado, welches von der CD73 auf Treg Zellen gebildet wurde, die nukleare Translokation von NF-κB in Teff Zellen hemmt und gleichzeitig die Bildung von IL-2 und IFN-γ reduziert. Veränderungen der Zytokinfreisetzung sind höchstwahrscheinlich eine direkte Folge der verminderten NF-κB Aktivität, da Zytokine wie IL-2, IFN-γ und TNF-α Zielgene von NF-κB sind (Pahl 1999). In der Promotorregion von IL-2 und IFN-γ sind auch spezifische Bindungsstellen für die NF-κB Untereinheit p50 zu finden (Sica et al. 1997, Sica et al. 1992).

Die Situation in T Zellen ist somit ähnlich wie an Endothelzellen. Auch in Endothelzellen bewirkte der genetische Verlust der CD73 einen Anstieg der nuklearen Translokation von NF-κB (Zernecke et al. 2006). Gleichzeitig zeigten diese Zellen eine verstärkte NF-κB abhängige Expression von VCAM-1 (Zernecke et al. 2006). Demzufolge scheint die physiologische Konzentration von Ado ein wichtiger Modulator für NF-κB in Endothelzellen und T Zellen zu sein, indem es als negativer Rückkoppler fungiert.

5.1.5. Treg Zellen hemmen die Teff Proliferation unabhängig von der CD73 Aktivität

Treg Zellen werden als eine Population von CD4⁺ T Zellen definiert, die immunpathologische Erkrankungen und Autoimmunreaktionen hemmen. Treg Zellen definieren sich auch darüber, dass sie *in-vitro* die Proliferation naiver T Zellen hemmen können und auch *in-vivo* die Zellzahl von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen kontrollieren (O’Gara and Vieira 2004). Diese Arbeit bestätigt, dass Treg Zellen unter *in-vitro* Bedingungen die Proliferation von Teff Zellen wirksam hemmen können (Kobie et al. 2006). Zusätzlich konnte Kobie et al. (2006) zeigen, dass Ado in

pharmakologischen Konzentration die Proliferation von Th1 und Th2 Zellen hemmt. Jedoch zeigt die vorliegende Arbeit, dass Ado das physiologisch von der CD73 auf Treg Zellen gebildet wurde, die Proliferation von Teff Zellen nicht beeinflusst. Auch bewirkte eine pharmakologische Hemmung der CD73 auf T Zellen keine Proliferationsförderung (Alam et al. 2009). Somit scheinen zumindest unter *in-vitro* Bedingungen die klassischen, CD73 unabhängige Mechanismen bei der Proliferationssuppression durch Treg Zellen wirksam zu werden. Hierzu zählen Zell-Zell-Kontakt, die Hemmung der IL-2 Produktion, die Freisetzung löslicher inhibitorischer Faktoren wie IL-10 und TGF- β (O’Gara and Vieira 2004).

5.1.6. Der A2AR und Teff Zytokine

Diese Arbeit gibt auch einen ersten umfassenden Überblick über die inhibitorische Wirkung einer A2AR Aktivierung bei der Freisetzung verschiedenster Zytokine aus stimulierten Treg und Teff Zellen. In Übereinstimmung mit der Literatur bewirkt eine A2AR Aktivierung eine starke Hemmung der Freisetzung von IL-2, IFN- γ und TNF- α bei Teff Zellen (Sitkovsky et al. 2004). Zusätzlich zeigt diese Arbeit, dass eine Aktivierung des A2AR wirksam die Freisetzung von IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-13 und GM-CSF hemmt. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist auch die Beobachtung neu, dass aktivierte murine CD4⁺ T Zellen hohe Mengen der Chemokine CCL3 und CCL4 freisetzen. Die freigesetzte Menge dieser beiden Zytokine war vergleichbar mit der des für CD4⁺ Th1-Zell typischen Zytokins IFN- γ . CCL3 und CCL4 gehören zu der Familie der CC Chemokin Familie und wurden ursprünglich als Botenstoffen definiert, die aus stimulierten Makrophagen, freigesetzt werden (Wolpe et al. 1988). CCL3 und CCL4 sind wichtige chemotaktische Faktoren, die die Migration von Monozyten und Makrophagen in Bereiche lokaler Entzündungen bewirken (Maurer and von Stebut 2003). Desweiteren induzieren sie die Synthese und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- α aus Makrophagen (Fahey et al. 1992). CCL4 ist auch chemotaktisch für CD4⁺ T Zellen (Schall et al. 1993, Taub et al. 1993), wohingegen CCL3 chemotaktisch auf natürliche Killerzellen wirkt (Maghazachi et al. 1994). Interessanterweise hemmte eine A2AR Aktivierung die CCL3 und CCL4 Freisetzung um etwa 50%. Folglich beeinflusst Ado über den A2AR auf vielschichtige Weise Reaktionen von Immunzellen, indem es eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen moduliert. Da die Gesamtheit aller Zytokine/Chemokine in einem komplexen Netzwerk gegenseitiger Wechselwirkungen steht, kann aber

nicht gesagt werden, welche Ado-bedingten Modulationen bei der Zytokinfreisetzung direkt über den A2AR erfolgten. Die stärksten Veränderungen mit 80% Hemmung zeigten sich bei den Th1 Zytokinen IL-2 und IFN- γ . Da Th1 Zellen im wesentlichen Einfluss auf das phylogenetische ältere unspezifische Immunsystem nehmen, könnte hier auch ein sehr alter Regulationsmechanismus des Immunsystems vorliegen, der in wesentlichem die angeborene, unspezifische Immunantwort reguliert.

5.1.7. Der A2AR auf Treg Zellen

Es ist bekannt, dass der A2AR auf Teff Zellen exprimiert wird, wohingegen der A1R, der A2BR und der A3R nur geringe Expressionsraten aufweist (Lukashev et al. 2003). Auf Treg Zellen jedoch werden A2AR und A3R im etwa gleichen Ausmaß exprimiert. Nur das Expressionsniveau des A2BR ist wesentlich niedriger. (cand. med. Reinbeck, Institut f. Herz- u. Kreislaufphysiologie, Universität Düsseldorf). Über die Funktion als auch über die Signalmechanismen der Adorezeptoren auf Treg Zellen, insbesondere von A2AR und A3R, ist gegenwärtig nichts bekannt. Diese Arbeit überprüfte den Effekt einer pharmakologischen Aktivierung des A2AR auf die Zytokin-/Chemokinfreisetzung von Treg Zellen. Im Gegensatz zu Teff Zellen zeigten Treg Zellen hierbei keine signifikanten Veränderungen bei der Zytokinfreisetzung. Dies weist darauf hin, dass der A2AR Signalweg unabhängig von der Zytokin-/Chemokinbildung erfolgt.

5.1.8. Integrales Gesamtbild der CD73 auf Treg und Teff Zellen

In Abbildung 50 sind die wesentlichen Befunde der *in-vitro* Untersuchungen dieser Studie zusammengefasst. Daraus wird ersichtlich, dass Ado, welches von der CD73 gebildet wird, über den A2AR die nukleare Translokation von NF- κ B in Teff Zellen hemmt und gleichzeitig eine verminderte Freisetzung verschiedenster Th1 und Th2 Zytokine und Chemokine bewirkt. An welche Effektorsysteme die Aktivierung des A2AR auf Treg Zellen gekoppelt ist, ist bislang noch unklar. Da die CD73 das am stärksten exprimierte Protein der Ado metabolisierenden Enzyme auf Treg Zellen ist, sollte die CD39, trotz geringerer Expression, nicht der limitierende Faktor für die Bildung von Ado aus AMP sein. Andere enzymatische Reaktionen (CD38, CD203, PDE) können nämlich die CD39 bei der Bildung von AMP aus ATP und NAD umgehen. Eine verringerte P2X7 Expression auf Treg Zellen nach antigener Stimulation, könnte es T Zellen ermöglichen, einer ATP-induzierten Apoptose

entgegenzuwirken. Dies würde die Aktivität der Adenin-Nukleotid-Kaskade auf Treg Zellen bewahren und stellt somit ausreichende Ado Konzentrationen in entzündeten Arealen sicher. Während sich antigen aktivierte $CD4^+$ T Zellen autokrin über ATP proinflammatorisch über den P2X7 Rezeptor kostimulieren, kann das Ado über den A2AR eine immunologische Überreaktion verhindern. Dieser regulatorische Mechanismus ist wahrscheinlich dann von besonderer Bedeutung, wenn hohe Konzentrationen an extrazellulären ATP vorliegen. Hohe ATP Konzentrationen erhöhen deutlich den Substratfluss über die ekto-Nukleotid Kaskade, was letztendlich zu einer gesteigerten Bildung des immunsuppressiv wirkenden Ado führt. Diese metabolischen Vorgänge, zusammen mit der Tatsache, dass ATP von Tumorzellen freigesetzt wird (Di Virgilio et al. 2009), könnten erklären, warum eine Hemmung der CD73 mit einem verminderten Tumorwachstum einhergeht (Stagg et al. 2010).

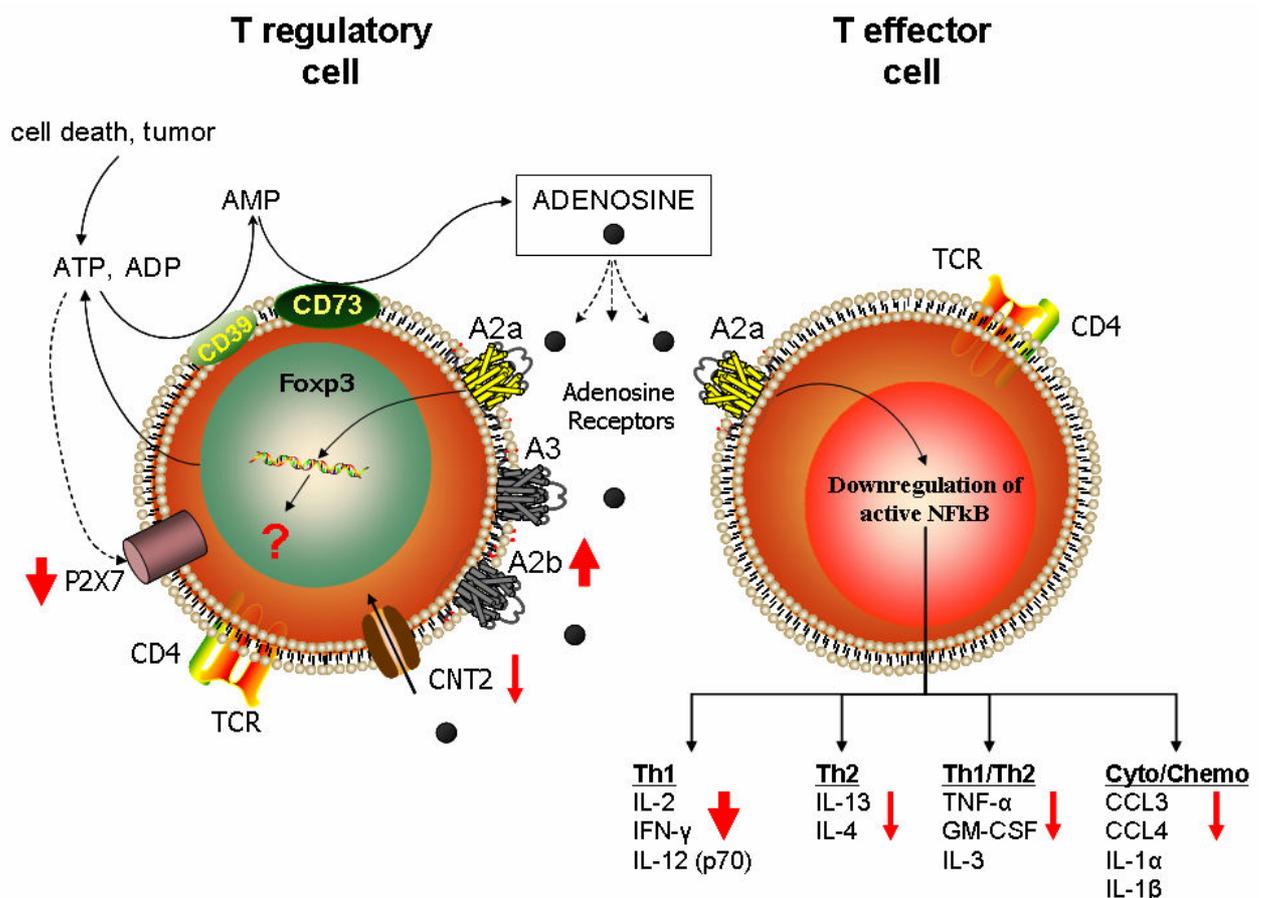


Abbildung 50: Schematischer Überblick über die Rolle des extrazellulären Purin-Stoffwechsels und von extrazellulären Adenosins bei murinen Treg und Teff Zellen

5.2. Hämodynamische und antiinflammatorische Wirkung von phosphorylierten A2AR Agonisten (*prodrug*)

Neben neuen Erkenntnissen über die Rolle der CD73 auf Treg Zellen, liefert diese Arbeit auch erste Belege, daß Nukleotid-5'-Monophosphate in Kombination mit der enzymatischen Aktivität der CD73 als *prodrugs* für den A2AR dienen können. Seit langem ist bekannt, dass A2AR Agonisten eine sehr starke antiinflammatorische und immunsuppressive Wirkung entfalten können (Akkari et al. 2006). Der systemische Einsatz von A2AR Agonisten wird jedoch durch ihre Gefäß dilatierende und Blutdruck senkende Eigenschaft stark eingeschränkt (Cunha et al. 2008, Livingston et al. 2004). Die Verwendung von phosphorylierten A2AR Agonisten als *prodrugs* könnte diesen Nachteil zumindest teilweise aufheben. Da im inflammatorischen Gewebe die CD73 überexprimiert ist (Zernecke et al. 2006), ist in diesen Bereichen auch ein gesteigerter Abbau von Nukleosid-5'-Monophosphaten zu erwarten. Dies sollte zu hohen Konzentrationen des A2AR Agonisten im entzündlich veränderten Gewebe führen. Dies wiederum sollte einen verstärkten antiinflammatorischen Effekt an der gewünschten Stelle induzieren und gleichzeitig unerwünschte, vasodilatorische Nebeneffekte vermindern. Um dieses *prodrug* Konzept zu validieren, wurden von El-Tayeb/Müller am pharmazeutischen Institut der Universität Bonn neue phosphorylierte Ado-Derivate (*prodrugs*) synthetisiert (El-Tayeb et al. 2009). Zusammen mit den entsprechenden neuen A2A Agonisten (*drugs*), wurde die Wirksamkeit dieser Substanzen *in-vitro* bei der IFN- γ Freisetzung von T Zellen überprüft. Auch wurde deren vasodilatorische Aktivität am isoliert perfundierten Herzen und deren Effekte im kardiovaskulären System *in-vivo* überprüft. Im Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) Modell wurden die antiinflammatorischen Wirkung von chet-AMP (*prodrug*) untersucht, da diese Substanz von der CD73, im vergleichbaren Maße wie AMP, dephosphoryliert wird und als resultierendes Ado-Derivat (chet-Ado) nMolare A2AR Affinität zeigt.

5.2.1. Phosphorylierte Adenosin-Derivate: A2AR Selektivität und CD73 Substratazeptanz

Voraussetzungen für die Verwendung phosphorylierter A2AR Agonisten als *prodrugs* sind zum einem eine hohe Selektivität und Affinität zum A2AR, zum anderen muss das *prodrug* aber auch von der CD73 als Substrat akzeptiert werden. In dieser Arbeit kamen zwei AMP Derivate (pt-AMP, chet-AMP) zum Einsatz, die am C2-Atom der

Adenin-Gruppe eine 2-(ar)alkylthio-Substitution aufwies. Diese C2-Substitution ist entscheidend für die A2AR Spezifität des Derivats. Die meisten selektiven A2AR Agonisten, die als Grundstruktur Ado aufweisen sind an der C2-Position der Adenin-Gruppe und/oder an der 5'-Position der Ribose modifiziert (El-Tayeb et al. 2009). Die Länge des Substituenten bestimmt die Rezeptor-Affinität der Substanz. Eine lange Kohlenstoffkette wie eine Hexyl-Gruppe bewirkt eine 3fach höhere Affinität ($K_i = 542 \pm 120 \text{ nM}$) der A2A Agonisten als es eine kurze Propyl-Kohlenstoffkette ($K_i = 1350 \pm 390 \text{ nM}$) vermag. Ein Cyclohexyl-Rest, der direkt über das Schwefel Atom an das Ado gekoppelt wurde, erzeugt ebenfalls nur geringe Rezeptor-Affinität ($K_i = 2480 \pm 655$). Dagegen erhöht sich die A2AR Affinität wieder, wenn zwischen Cyclohexyl-Ring und dem Schwefelatom eine Methyl- ($K_i = 709 \pm 123 \text{ nM}$) oder besser einer Ethylgruppe ($K_i = 372 \pm 57 \text{ nM}$) eingebaut wurde (El-Tayeb et al. 2009). Zwar ist die Substituierung des Ado nötig um Rezeptorselektivität zu erreichen, jedoch kann eine solche aufgrund sterisch ungünstiger Verhältnisse bewirken, dass das modifizierte Ado nicht mehr als Substrat von der CD73 erkannt wird. Bei der Synthese von phosphorylierten Ado-Derivaten, die als *prodrug* erst durch CD73 Aktivität ihre wirksame Struktur erhalten, muss deshalb ein Kompromiss eingegangen werden, um bei relativ hoher Rezeptoraffinität auch eine hohe Substratazeptanz von der CD73 zu gewährleisten. Interessanterweise scheint die CD73 eine lipophile Bindungstasche zu besitzen, da sie das längere und sperrigere chet-AMP besser als Substrat erkennt als das viel kürzere pt-AMP (El-Tayeb et al. 2009). Da das chet-AMP das bessere Substrat für CD73 darstellte und das daraus resultierende chet-Ado auch eine höhere Affinität zum A2AR zeigte, kamen ausschließlich diese Substanzen in den *in-vivo* Experimenten zum Einsatz.

5.2.2. Phosphorylierte A2AR Agonisten und die IFN- γ Freisetzung aus CD4⁺ T Zellen

Sowohl *drug* als auch *prodrug* zeigte eine Dosis-abhängige Hemmung der IFN- γ Freisetzung aus CD4⁺ T Zellen. Die Dosis-Wirkungskurve des phosphorylierten A2AR Agonisten war jedoch um zwei Zehnerpotenzen nach rechts verschoben. Diese Versuche zeigen exemplarisch, dass das *prodrug* Konzeptes von folgenden Faktoren abhängig ist:

Zum einen spielt die Aktivität der CD73 eine wichtige Rolle. Da die CD73 innerhalb der CD4⁺ T Zell Population im Wesentlichen nur von den Treg Zellen exprimiert wird

(Deaglio et al. 2007), stellt somit diese relativ kleine T Zell Subpopulation, mit einem Anteil von 10-20%, unter den in dieser Arbeit verwendeten *in-vitro* Bedingungen den limitierenden Faktoren für die CD73 Aktivität dar. Da *in-vivo* in inflammatorischen Arealen die unterschiedlichste Komposition an Immunzellen und anderen CD73 exprimierenden Zellen zu erwarten ist, sollte hier auf engen Raum ein besseres Verhältnis zwischen CD73 exprimierenden Zellen und Zellen, die CD73 nicht exprimieren vorliegen.

Desweiteren spielt das Verhältnis zwischen Zellzahl und umgebenden Medium eine Rolle bei der Wirksamkeit der phosphorylierten A2AR Agonisten. Dieses Verhältnis beeinflusst bei gegebener CD73 Aktivität den Zeitpunkt, wann eine wirksame Konzentration des Nukleosids erreicht wird. Die in dieser Arbeit verwendeten *in-vitro* Bedingungen spiegeln wahrscheinlich eher die Situation, wie sie im Gefäßsystem vorzufinden ist: dort findet sich die CD73 vorzugsweise am Endothel. Das darüber gebildete Ado bzw. der darüber freigesetzte A2AR Agonist verteilt sich dann aber in einem vergleichsweise großen Blutvolumen und wird dadurch stark verdünnt.

Ein weiterer Punkt der berücksichtigt werden muss, ist, dass neben der CD73 auch die alkalische Phosphatase (AP) AMP bzw. das *prodrug* abbauen kann. Jedoch ist die Affinität der AP zu AMP wesentlich geringer als die der CD73. Bei niedrigen Substratkonzentrationen sollte somit die Aktivität der CD73 überwiegen. Auch im Plasma spielt die AP eine untergeordnete Rolle. Wenig ist über die Expression dieser beiden Enzyme in den verschiedensten Geweben bekannt. Von Treg Zellen wird die AP aber nur im vernachlässigbaren Maße exprimiert (cand. med. Reinbeck, Institut f. Herz- u. Kreislaufphysiologie, Universität Düsseldorf).

Letztendlich kann auch die Membran gebundene *prostatic acid phosphatase* (TM-PAP) AMP abbauen (Zylka et al. 2008). Dieses Enzym wird in der Maus unter anderem stark in lymphatischen Organen wie Thymus und Milz exprimiert (Quintero et al. 2007). Dies könnte mit der inhibitorischen Wirkung bei CD73^{-/-} T Zellen in Zusammenhang stehen, muss aber in künftigen Experimenten noch weiter untersucht werden.

5.2.3. Hämodynamische Effekte phosphorylierter A2AR Agonisten

Über den A1R hemmt Ado die Schrittmacherfrequenz des Sinusknoten, verzögert die Erregungsleitung über den AV-Knoten und hemmt die Freisetzung von Norepinephrin und Renin (Biaggioni 1992). Über A2R Signalwege vermindert Ado den Blutdruck jedoch auch unabhängig von Sympathikus oder Renin vermittelten Mechanismen (Edlund et al. 1990). Diese Arbeit bestätigt, dass Ado sehr starke hypotone Effekte zeigt, die parallel mit einer Brachykardie einhergehen. Dass Ado über den A2AR sehr starke vasodilatorische Effekte an den meisten Gefäßen zeigt, ist seit längerem bekannt. Da Ado aber nicht spezifisch für den A2AR ist, sondern im Herzen auch den A1R aktiviert, wird über diesen Signalweg die Herzfrequenz negativ beeinflusst, was einen Abfall des arteriellen Blutdruckes begünstigt.

In der Klinik wird Ado im Rahmen eines Stresstests als Vasodilator zur Diagnose einer koronaren Herzkrankheit eingesetzt. Dies geht mit unerwünschten Nebeneffekte einher wie z.B. Atemnot, Brustschmerzen und eine Blockade des AV-Knotens ein (Mahmarian and Verani 1994, McGuinness and Talbert 1994, Marwick 1997, Cerqueira 2000). In der Diagnostik werden deshalb heute selektive A2AR Agonisten eingesetzt, um nebenwirkungsärmer eine koronare Herzerkrankungen zu diagnostizieren (Zhao et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit hatten *drug* und *prodrug* wie zu erwarten keine negativen Effekte auf die Herzleistung, was zeigt, dass diese Substanzen im Wesentlichen über den A2AR direkt vasodilatorisch wirken. Jedoch lag die Wirksamkeit des A2AR Agonisten sowohl im isoliert perfundierten Herzen als auch *in-vivo* im Bereich der durch Ado vermittelten vasodilatorischen Effekte. Somit ist chet-Ado *in-vivo*, effektiver bei der A2AR-vermittelten Vasodilatation. Dagegen zeigte in beiden Testsystemen das phosphorylierte *prodrug* eine verminderte vasodilatorische Aktivität. Diese reduzierte hypotone Eigenschaft der phosphorylierten A2AR Agonisten liegt darin begründet, dass diese im Sinne des *prodrug* Konzeptes erst einmal durch die CD73 in den aktiven A2AR Agonisten überführt werden müssen. Da aber, wie bereits diskutiert, im Gefäßsystem ein ungünstiges Verhältnis zwischen CD73 exprimierenden Endothelzellen und dem Blutvolumen vorliegt, sollten bei Gabe des *prodrugs* im Plasma geringere Konzentrationen des dephosphorylierten vasodilatorisch wirksamen A2AR Agonisten zu finden sein.

5.2.4. chet-Ado und chet-AMP im Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) Modell

Die Kollagen-induzierte Arthritis ist ein experimentelles Tiermodell, das in seiner Symptomatik sehr der rheumatischen Arthritis beim Menschen ähnelt (Brand et al. 2003). Sie wird durch die Injektion von Kollagen II (CII) induziert, das eine Autoimmunreaktion auslöst. Somit kommt in diesem Modell der zellulären Immunität eine wichtige Rolle zu. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten aus CIA Mäusen CII spezifische CD4⁺ T Zellen isolieren (Dallman et al. 1985, Holmdahl et al. 1985, Hom et al. 1986, Kakimoto et al. 1988, Brahn et al. 1984), die bei Transfer in gesunde Empfängertieren bereits ohne CII Injektion arthritische Symptome auslösten (Holmdahl et al. 1985, Kakimoto et al. 1988, Brahn et al. 1984). In diesem immunologisch gut charakterisierten Modell bewirkte die Behandlung mit den chet-Derivaten einen bis zu 50% Hemmung der CIA Progression. Parallel zeigten sich auch Unterschiede im Serumzytokinspiegel. Insbesondere das proinflammatorische Zytokin IFN- γ zeigte sich in der mit chet-Ado als auch in der mit chet-AMP behandelten Gruppe als signifikant erniedrigt. Da IFN- γ ursprünglich ausschließlich T Zellen und NK-Zellen zugeordnet wurde (Bach et al. 1997, Young et al. 1996), unterstreicht dieses Ergebnis der vorliegenden Arbeit noch einmal die Bedeutung von T Zellen an der Pathogenese der CIA. Desweiteren bestätigt dieser Befund auch die inhibitorische Wirkung der chet-Substanzen auf die IFN- γ Freisetzung aus T Zellen *in-vitro*. Interessanterweise waren die IL-10 Blutspiegel in der mit *drug* und in der mit *prodrug* behandelten Gruppe erhöht. IL-10 ist ebenfalls ein Zytokin das u.a. T Zellen zugeschrieben wird (Vieira et al. 1991, Yssel et al. 1992). Dieses antiinflammatorische Zytokin hemmt die Synthese muriner Th1 Zellen (Fiorentino et al. 1991) und wurde ursprünglich als Zytokin-Synthese-Inhibitionsfaktor beschrieben (Fiorentino et al. 1989). Eine mögliche therapeutische Bedeutung kommt IL-10 in rheumatischer Arthritis zu. IL-10 hemmt nämlich die Zytokinproduktion und die Proliferation mononukleärer Zellen in der Synovialflüssigkeit und moduliert darüber den Phänotyp synovialer Makrophagen (Isomäki et al. 1996). Somit scheint der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene milderer Verlauf der CIA bei Behandlung der Mäuse mit dem chet-Ado und dem chet-AMP über eine direkte A2AR-vermittelte Veränderung der Zytokinfreisetzung aus Immunzellen zustande zu kommen.

Vasodilatorische Effekte hatten in diesem Modell wahrscheinlich keinen Einfluss. Die Schwelldosis, die einen Abfall des arteriellen Blutdruckes bewirkte, lag 3fach über der Dosis, die im CIA Modell mit den osmotischen Pumpen infundiert wurde.

Zusammengefasst liefert diese Arbeit erste *in-vivo* Belege, dass das *prodrug* Konzept als eine ortsspezifische antiinflammatorische Therapie im murinen Arthritis Modell tragfähig ist.

6. Zusammenfassung/Abstract

6.1. Zusammenfassung

Adenosin ist ein wichtiger Mediator bei der Hemmung inflammatorischer Prozesse. Extrazelluläres Adenosin wird bei Immunzellen über die ekto-5'-Nukleotidase (CD73) gebildet. Bei T Zellen wird das von der CD73 gebildete Adenosin von regulatorischen T (Treg) Zellen bereitgestellt und die Freisetzung von IL-2 und IFN- γ wird bei T-Effektor (Teff = Th1 + Th2) Zellen über den A2A Adenosin Rezeptor (A2AR) gehemmt. Generell zeigt der A2AR auf Leukozyten immuninhibitorische Wirkung und die CD73 wird in inflammatorischen Arealen überexprimiert wird.

Vor diesem Hintergrund untersuchte die vorliegende Arbeit die folgenden zwei Fragen:

1. Hemmt Adenosin, das physiologische von der CD73 auf Treg Zellen gebildet wird, die Immunantwort der Teff Zellen? Welchen Einfluss hat der A2AR auf die Zytokinfreisetzung von Treg und Teff Zellen?
2. Kann ein phosphorylierter A2AR Agonist als *prodrug* dienen, welches durch eine CD73-abhängige Dephosphorylierung den wirksamen A2AR Agonisten (*drug*) ortsspezifisch in inflammatorischen Arealen freisetzt?

Im ersten Teil der Arbeit zeigten Untersuchungen an murinen CD4⁺ aus CD73^{-/-} Mäusen, dass diese nach antigener Stimulation mittels anti-CD3/CD28 eine verstärkte nukleare Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B aufweisen. Parallel zeigten die CD73 defizienten CD4⁺ T Zellen eine gesteigerte Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-2 und IFN- γ . Die Behandlung von CD4⁺ T Zellen mit Adenosin [25 μ M] bewirkte eine A2AR-vermittelte Hemmung der IFN- γ Freisetzung. Auch hemmten AMP [50 μ M] wirkungsvoll die Freisetzung von IL-2 und IFN- γ aus WT T Zellen. ATP das in den Überständen von WT T Zellen zu finden war, wurde rasch abgebaut. In Proliferationsassays, bei denen Treg Zellen und Teff Zellen kokultiviert wurden, zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen WT und CD73^{-/-} T Zellen. Eine pharmakologische Aktivierung des A2AR bei Teff Zellen hemmte die Freisetzung von Th1 und Th2 Zytokine, wobei eine stärkere Hemmung bei den Th1 Zytokinen zu finden war. Im Gegensatz dazu beeinflusste eine Aktivierung des A2AR die Zytokinfreisetzung von Treg Zellen nicht.

Der zweite Teil der Arbeit untersuchte die antiinflammatorische und vasodilatorische Aktivität des neu synthetisierten phosphorylierten A2AR Agonisten Cyclohexylethylthio (chet)-AMP (*prodrug*) und des entsprechenden A2AR Agonisten chet-Adenosin (*drug*). In *in-vitro* Experimenten mit T Zellen erwies sich das *drug* mit nMolarer Affinität zum A2AR ($K_i=372\text{nM}$) als sehr wirksam bei der Hemmung der IFN- γ Freisetzung. Auch das *prodrug*, das mit einer Dephosphorylierungsrate von 96% ein ähnlich gutes Substrat wie AMP für die CD73 darstellt, hemmte *in-vitro* die IFN- γ Freisetzung. Da die Wirksamkeit des *prodrug* von der Aktivität der CD73 abhängt, die durch die Zahl der CD73 exprimierenden Treg Zellen bestimmt ist, war hier die Wirksamkeit des *prodrug* aber erwartungsgemäß geringer als die des *drug*. Am isoliert perfundierten Herzen der Maus zeigte das chet-AMP, im Sinne des *prodrug* Konzeptes, geringere vasodilatorische Aktivität an den Koronararterien. Diese vergleichsweise zu dem *drug* geringere vasodilatorische Aktivität konnte anschließend in *in-vivo* Experimenten anhand arterieller Blutdruckmessungen während Infusion von *drug* und *prodrug* bestätigt werden. In einem *in-vivo* Inflammationsmodell, der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA), zeigten *drug* und *prodrug* eine starke antiinflammatorische Wirkung. Sowohl chet-Adenosin als auch chet-AMP bewirkten eine 50% Hemmung der CIA. Parallel waren proinflammatorische Zytokine im Serum erniedrigt bzw. das antiinflammatorische IL-10 erhöht. Der *in-vivo* hohe antiinflammatorische Wirkungsgrad des *prodrugs* erklärt sich durch die verstärkte Expression der CD73 im entzündlich veränderten Gewebe.

Zusammengefasst zeigt die vorliegende Arbeit, dass das von der CD73 gebildete Adenosin und der A2AR eine wichtige modulatorische Rolle im Immunsystem spielt. Insbesondere bei CD4^+ T Zellen ist der Nukleotid-Substratfluss über die ekt-Nukleotidase-Kaskade, ein bedeutendes Stellglied im Immunsystem. ATP fungiert hierbei als Kostimulator mit gleichzeitig apoptotischer Wirkung, während Adenosin Immunzellen über den A2AR hemmt und letztlich Anergie bei Leukozyten auslösen kann. Dem von der CD73 gebildet Adenosin kommt hierbei im Wechselspiel mit dem A2AR eine wesentliche antiinflammatorische Rolle zu. Darüber hinaus zeigt diese Arbeit auch das klinische Potential von phosphorylierten A2AR Agonisten als *prodrug* bei der Therapie von inflammatorischen Prozessen. Das CIA Modell liefert erste *in-vivo* Belege, dass das *prodrug* Konzept als eine ortsspezifische antiinflammatorische Therapie im murinen Arthritis Modell tragfähig ist.

6.2. Abstract

Adenosine is a potent inhibitor of inflammation. Extracellular adenosine is formed on lymphocytes by the ecto-5'-nucleotidase (CD73). On T cells extracellular adenosine is provided by regulatory T cell (Tregs) and the release of proinflammatory cytokines as IL-2 and IFN- γ by effector T cells (Teff = Th1 +Th2) is inhibited by signaling of the A2A adenosine receptor (A2AR). In general, the A2AR on leukocytes shows immunosuppressive effects. Also CD73 appears to be very important in the immune system, since expression of CD73 is increased in inflammatory areas.

Therefore this study investigated the following questions:

1. Does adenosine, physiologically formed by CD73 on Tregs, inhibit the immune responses of Teff cells? What is the role of A2AR signaling on cytokine release of Tregs and Teff cells?
2. Can phosphorylated A2AR agonists serve as prodrug which after dephosphorylation by CD73 acts as A2A agonist (drug)?

In the first part of this study with murine CD4⁺ T cells evidence is provided, that T cells from CD73^{-/-} mice have increased levels of nuclear translocated transcriptionfactor NF- κ B after antigenic stimulation with anti-CD3/anti-CD28 antibodies. This was paralleled by increased release of the proinflammatory cytokines IL-2 and IFN- γ . Treatment of T cells with adenosine [25 μ M] inhibited IFN- γ release via A2AR. Also AMP [50 μ M] strongly inhibited the release of IFN- γ and IL-2 of WT T cells. ATP found in supernatants of WT T cells was rapidly degraded. Adenosine formed by CD73 on Tregs did not effect in a proliferation assay the suppression of Tregs on Teff cells from both WT and CD73^{-/-} T cells. Pharmacologic activation of A2AR on Teff cells strongly inhibited the release of several Th1 and Th2 cytokines. In contrast, activation of A2AR did not influence cytokine release of Tregs.

The second part of this study investigated antiinflammatory and vasodilatory activities of the newly synthesized phosphorylated A2AR agonist cyclohexylethylthio (chet)-AMP (prodrug) and its respective A2AR agonist chet-adenosine (drug). In in-vitro experiments with T cells the chet-adenosine, which has nM affinity to the A2AR (K_i = 347nM), was very effective in inhibiting IFN- γ release. Also chet-AMP, which is as efficiently dephosphorylated (96%) by CD73 as AMP, inhibited IFN- γ release from T cells. Since the potency of the prodrug depends on CD73 activity, the number of

CD73 expressing Tregs is critical. In support of the prodrug concept, chet-AMP infused to hearts showed only minor vasodilatory activity. This finding was confirmed in in-vivo experiments by measuring arterial blood pressure during infusion of drug and prodrug. In the in-vivo model of collagen-induced arthritis (CIA) application of drug and prodrug by osmotic minipumps showed strong anti-inflammatory action. Chet-Adenosin as well as chet-AMP inhibited CIA by about 50%. This effect was paralleled by decreased serum levels of proinflammatory cytokine IFN- γ and increased serum level of anti-inflammatory cytokine IL-10.

In summary this study shows, that adenosine formed by CD73 and acting on A2AR is an important endogenous regulator in the immune system. Very likely nucleotide substrate flux through the ecto-nucleotide cascade on CD4⁺ T cells is an important control element in the immune system. ATP acts as costimulatory factor with concomitant apoptotic activity through P2X7 receptor, whereas adenosine inhibits immune cells through A2AR activation and finally can elicit leukocyte anergy. Thus, CD73-derived adenosine acting through A2AR plays an important antiinflammatory role. In addition this study also shows the clinical potential of phosphorylated A2AR agonists as prodrugs to treat tissue inflammation. The arthritis model provides first in-vivo evidence to establish the prodrug concept as a novel site specific antiinflammatory therapy.

7. Abbildungs-/Tabellenverzeichnis

7.1. Abbildungen

Abbildung 1: molekulare Struktur von Adenosin.....	- 8 -
Abbildung 2: Adenin-Purine und ihre Rezeptoren (modifiziert nach Klotz 2007) ..	- 9 -
Abbildung 3: Adenin-Purine: Abbau und Rezeptoren.....	- 10 -
Abbildung 4: Adenosin-Rezeptor Subtypen und ihre Signalwege	- 12 -
Abbildung 5: Regulation der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine bei Makrophagen	- 18 -
Abbildung 6: T Zellen: Subtypen und Marker	- 22 -
Abbildung 7: Modell zur Regulation der Immunantwort bei T-Effektor-Zellen über den Adenosin A2 Rezeptor und durch von regulatorischen T Zellen gebildeten Adenosins (nach Sitkovsky et al. 2008).....	- 25 -
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Aktivierung phosphorylierter A2AR Agonisten (<i>prodrug</i>) durch die CD73 zur Freisetzung des entsprechenden wirksamen A2AR Agonisten (<i>drug</i>).	- 27 -
Abbildung 9: Reaktionen von Luciferin in Gegenwart von ATP und O ₂	- 35 -
Abbildung 10: µ-slide Luer Durflussskammer; von www.ibidi.com	- 37 -
Abbildung 11: Nachweis der Lokalisation der ekto-5'-Nukleotidase CD73 auf T Zellen muriner Milzen.....	- 51 -
Abbildung 12: Quantitative Analyse des Anteils CD4 ⁺ Zellen in murinen Splenozyten.....	- 52 -
Abbildung 13: Quantitative Analyse der Expression der CD73 auf murinen Splenozyten und auf CD4 ⁺ Zellen muriner Milzen.....	- 53 -
Abbildung 14: Quantitative Analyse des Aufreinigungserfolges muriner T Zellen aus der Milz mittels magnetischer Partikel	- 54 -
Abbildung 15: Quantitative Analyse der Koexpression der CD73 und des T Zell-Markers CD4 in CD4 ⁺ Zellen angereicherten Eluaten	- 55 -
Abbildung 16: Nachweis von AMP, Adenosin und Inosin in den Überständen von murinen T Zellen ± antigener Stimulation mittels HPLC.	- 56 -
Abbildung 17: Nachweis des ATP Abbaus in mit FCS (10%) versetztem RPMI 1640 (RPMI 1610).....	- 57 -
Abbildung 18: Nachweis des ATP-Abbaus durch FKS (10%).....	- 58 -

Abbildung 19: Nachweis exogenen ATPs in 50µl Ansätzen und einer Verdünnung des ATP Assay Mix von 1:2.	- 59 -
Abbildung 20: Reaktivität des Luciferin/Luciferase Assay auf 2pmol ATP nach 30 Min. Präinkubation in Gegenwart von 0pmol, 0.2pmol und 2pmol ATP.....	- 60 -
Abbildung 21: Nachweis endogenen ATPs in den Überständen unbehandelter und antigen behandelter CD4 ⁺ Zellen.	- 61 -
Abbildung 22: A) Kinetik der Lichtentwicklung des ATP Assay Mix in Gegenwart exogenen ATPs (grau Abstufungen) und in zellulären Überständen (rot). B) Quantifizierung der Menge an ATP in den Überständen von CD4 ⁺ T Zellen zu Beginn des Assay (t=0) und nach 10 Minuten.....	- 62 -
Abbildung 23: Nachweis der ATP-Freisetzung muriner T Zellen über die Zeit unter konstantem Fluss ± PMA/Ionomycin Behandlung.	- 63 -
Abbildung 24: Lokalisation muriner T Zellen unter Flubedingungen vor (grau) und nach (rot) Anlegen eines laminaren Strom über 60 Minuten. Zellcluster vor Assay-Beginn (Pfeile).....	- 63 -
Abbildung 25: Gesteigerte nukleare Translokation von NF-κB in CD73 defizienten T Zellen. A) Splenozyten und B) Aufgereinigte CD90 ⁺ T Zellen.	- 64 -
Abbildung 26: Spezifitätsnachweis der NF-κB Bindungsaktivität.....	- 65 -
Abbildung 27: Gesteigerte Freisetzung von IL-2 und IFN-γ bei CD4 ⁺ T Zellen aus CD73 ^{-/-} Mäusen..	- 66 -
Abbildung 28: Proliferation anti-CD3/anti-CD28 aktivierter Teff Zellen kokultiviert mit Treg Zellen aus WT und CD73 ^{-/-} Mäusen..	- 67 -
Abbildung 29: Der antiinflammatorische Effekt wird durch den A2AR vermittelt.	- 68 -
Abbildung 30: Zytokinprofil von Treg Zellen und Teff Zellen.....	- 70 -
Abbildung 31: Effekt des A2A Agonisten CGS 21680 auf verschiedene Zytokine von Teff Zellen.	- 71 -
Abbildung 32: Effekt des A2A Agonisten CGS 21680 [1µM] auf verschiedene Zytokine von Treg Zellen.....	- 72 -
Abbildung 33: Einfluss des A2A Ado Rezeptor Agonisten CGS 21680 auf den koronaren Fluß am isoliert perfundiertem Herzen der Maus.	- 75 -
Abbildung 34: Einfluss von Adenosin (Ado), Propylthio(pt)-Ado und Propylthio(pt)-AMP auf den koronaren Fluß am isoliert perfundiertem Herzen der Maus.....	- 76 -

- Abbildung 35:** Einfluss von Adenosin (Ado) und der Cyclohexylethylthio(chet)-Präparate auf den koronaren Fluss am isoliert perfundierten Langendorff-Herzen der Maus. **A)** Wirkung von chet-Ado im Vergleich zu Ado **B)** Wirkung von chet-AMP im Vergleich zu Ado. - 77 -
- Abbildung 36:** Quantifizierung des Einflusses von Adenosin (Ado), Cyclohexylethylthio(chet)-Ado und chet-AMP auf den koronaren Fluss am isoliert perfundierten Herzen der Maus. - 78 -
- Abbildung 37:** Wirkung von Adenosin auf den arteriellen Blutdruck und die Herzfrequenz während intravenöser Infusion. **A)** Rohdaten der konzentrationsabhängigen Veränderung des Blutdruckes und der Herzfrequenz infolge einer Adenosininfusion. Quantifizierung der Veränderung des Blutdruckes **B)** und der Herzfrequenz **C)** bei einer intravenösen Adenosininfusion. - 79 -
- Abbildung 38:** Quantifizierung der Wirkung von chet-Ado und chet-AMP auf **A)** arteriellen Blutdruck und **B)** Herzfrequenz nach 5 Minuten Infusion. - 80 -
- Abbildung 39:** Wirkung von CGS 21680 auf die IFN- γ Freisetzung muriner T Zellen stimuliert mit anti-CD3: 0.4 μ g/ml und anti-CD28: 2.5 μ g/ml. - 82 -
- Abbildung 40:** Dosis-Wirkungskurven von Cyclohexylethylthio-Adenosin (rot) bzw. Cyclohexylethylthio-AMP (schwarz): IFN- γ Freisetzung - 83 -
- Abbildung 41:** Wirkung von Cyclohexylethylthio(chet)-AMP auf die IFN- γ Freisetzung von wt und CD73^{-/-} CD4⁺ Zellen. - 83 -
- Abbildung 42:** Wirkung von Propylthio(pt)-Adenosin **A)** bzw. Propylthio(pt)-AMP **B)** auf die IFN- γ Freisetzung von CD4⁺ Zellen. - 84 -
- Abbildung 43:** Effekt von chet-Ado/AMP auf die Kollagen induzierte Arthritis (CIA) Entwicklung: *visual scoring* der CIA Entwicklung nach akuter Arthritis Induktion (*boost*). - 86 -
- Abbildung 44:** Repräsentative MR Bilder zur Darstellung entzündeter Areale in murinen Gelenken nach Kollagen induzierter Arthritis (CIA). A) anatomisches Protonen (¹H) MR Bild. B) Perfluorcarbone (PFCs) im ¹⁹F MR Bild. C) Merge. - 87 -
- Abbildung 45:** Quantifizierung der Infiltration von PFCs in murine Gelenke nach Kollagen induzierter Arthritis (CIA). Signalintensitäten in arbitrary units (a.u.) 8 und 11 Tage nach akuter Arthritis Induktion (*boost*). - 87 -
- Abbildung 46:** Serumzytokinspiegel nach Kollagen induzierter Arthritis (CIA): Einfluß von chet-Ado und chet-AMP (IL-10, IL-1 β , IL-6, IFN- γ , MCP-1, GM-CSF). - 90 -
-

Abbildung 47: Serumzytokinspiegel nach Kollagen induzierter Arthritis (CIA): Einfluß von chet-Ado und chet-AMP (IL-2, IL-5, IL-12 p40, IL-17, Eotaxin, KC, MIP-1 α , MIP-1 β). - 91 -

Abbildung 48: Serumzytokinspiegel nach Kollagen induzierter Arthritis (CIA): Einfluß von chet-Ado und chet-AMP (IL-1 α , IL-3, IL-9, IL-13, G-CSF, TNF- α , RANTES). - 92 -

Abbildung 49: Abb. 52 Korrelation zwischen dem Serumzytokinspiegel und dem Ausprägungsgrad der Kollagen induzierten Arthritis (CIA) 11 Tag nach akuter Arthritis Induktion (*boost*). - 93 -

Abbildung 50: Schematischer Überblick über die Rolle des extrazellulären Purinstoffwechsels und von extrazellulären Adenosins bei murinen Treg und Teff Zellen. - 101 -

7.2. Tabellen

Tabelle 1: Untereinheiten von G-Proteinen: Subtypen und Funktion..... - 11 -

Tabelle 2: Bestandteile des Immunsystems - 17 -

Tabelle 3: HPLC Flußbedingungen der Eluate A/B zum Nachweis von Adenosin, Inosin und AMP - 35 -

Tabelle 4: Skala zur makroskopischen Quantifizierung der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA)..... - 47 -

Tabelle 5: Dephosphorylierungsrate der in dieser Arbeit verwendeten 5'-Mono-phosphat-Derivate durch die CD73 im Vergleich zum physiologischen Substrat AMP und A2A Ado Rezeptor Affinitäten der daraus resultierenden Nukleoside... - 73 -

8. Abkürzungsverzeichnis

A1R	A ₁ Rezeptor
A2AR	A _{2A} Rezeptor
A2BR	A _{2B} Rezeptor
A3R	A ₃ Rezeptor
ADA	Adenosin-Desaminase
Ado	Adenosin
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AK	Adenosin-Kinase
AOPCP	α , β -Methylen-Adenosin 5'-Diphosphat
AP	alkalische Phosphatase
APC	<i>antigen presenting cell</i>
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BCA	<i>BicinChoninic Acid</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cAMP	<i>cyclic AMP</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CF	<i>coronary flow</i>
CF(DA)SE	Carboxyfluoreszein-(Diazetat)-Succinimidyl-Ester
chet	cyclohexyl-ethyl-thio-
CIA	<i>collagen-induced arthritis</i>
CMP	Cytosin-Monophosphat
DIF	direkte Immunfluoreszenz
EDTA	Ethyl diamintetraessigsäure
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenzfilter
FKS	fötale Kälberserum
GMP	Guanosin-Monophosphat
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
G-Protein	Guanin-Nukleotid-bindendes Protein
HIF	<i>hypoxia-induced factor</i>

HPLC	<i>High-Pressure-Liquid-Chromatography</i>
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IIF	indirekte Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
IMP	Inosinmonophosphat
MACS	<i>Magnetic cell sorting</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NT	Nukleotidase
NTP	Nukleotid-Triphosphat
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PFC	Perfluorcarbon
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
PMN	polymorph-nukleär
pt	propyl-thio
RH	reaktive Hyperämie
rlu	<i>relative light unit</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency disorder</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SEM	<i>standard error of mean</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
Teff Zellen	T-Effektor Zellen
Th Zellen	T-Helfer Zellen
Thpp	<i>Th primed precursor</i> , „Gedächtniszelle“
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Treg Zellen	regulatorische Zellen
UMP	Uridin-Monophosphat
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>

9. Literaturverzeichnis

1. Adanin, S., I.V. Yalovetskiy, B.A. Nardulli, A.D. Sam, 2nd, Z.S. Jonjev, and W.R. Law. 2002. Inhibiting adenosine deaminase modulates the systemic inflammatory response syndrome in endotoxemia and sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R1324-1332.
 2. Akkari, R., J.C. Burbiel, J. Hockemeyer, and C.E. Muller. 2006. Recent progress in the development of adenosine receptor ligands as antiinflammatory drugs. *Curr Top Med Chem* 6:1375-1399.
 3. Alam, M.S., C.C. Kurtz, R.M. Rowlett, B.K. Reuter, E. Wiznerowicz, S. Das, J. Linden, S.E. Crowe, and P.B. Ernst. 2009. CD73 is expressed by human regulatory T helper cells and suppresses proinflammatory cytokine production and Helicobacter felis-induced gastritis in mice. *J Infect Dis* 199:494-504.
 4. Apasov, S.G., M. Koshiba, T.M. Chused, and M.V. Sitkovsky. 1997. Effects of extracellular ATP and adenosine on different thymocyte subsets: possible role of ATP-gated channels and G protein-coupled purinergic receptor. *J Immunol* 158:5095-5105.
 5. Arciero, J.C., B.E. Carlson, and T.W. Secomb. 2008. Theoretical model of metabolic blood flow regulation: roles of ATP release by red blood cells and conducted responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H1562-1571.
 6. Bach, E.A., M. Aguet, and R.D. Schreiber. 1997. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15:563-591.
 7. Baldwin, S.A., P.R. Beal, S.Y. Yao, A.E. King, C.E. Cass, and J.D. Young. 2004. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch* 447:735-743.
 8. Beinke, S., and S.C. Ley. 2004. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J* 382:393-409.
 9. Beldi, G., Y. Wu, Y. Banz, M. Nowak, L. Miller, K. Enjyoji, A. Haschemi, G.G. Yegutkin, D. Candinas, M. Exley, and S.C. Robson. 2008. Natural killer T cell dysfunction in CD39-null mice protects against concanavalin A-induced hepatitis. *Hepatology* 48:841-852.
 10. Berne, R.M. 1980. The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circ Res* 47:807-813.
 11. Biaggioni, I. 1992. Contrasting excitatory and inhibitory effects of adenosine in blood pressure regulation. *Hypertension* 20:457-465.
 12. Blay, J., T.D. White, and D.W. Hoskin. 1997. The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res* 57:2602-2605.
-

13. Bodin, P., and G. Burnstock. 2001. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res* 26:959-969.
 14. Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. Hopner, D. Centonze, G. Bernardi, M.L. Dell'Acqua, P.M. Rossini, L. Battistini, O. Rotzschke, and K. Falk. 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110:1225-1232.
 15. Bouma, M.G., T.M. Jeunhomme, D.L. Boyle, M.A. Dentener, N.N. Voitenok, F.A. van den Wildenberg, and W.A. Buurman. 1997. Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors. *J Immunol* 158:5400-5408.
 16. Brahn, E., and D.E. Trentham. 1984. Effect of antithymocyte serum on collagen arthritis in rats: evidence that T cells are involved in its pathogenesis. *Cell Immunol* 86:421-428.
 17. Brand, D.D., A.H. Kang, and E.F. Rosloniec. 2003. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 25:3-18.
 18. Buchheiser, A. 2007. Molekulare und funktionelle Charakterisierung von ecto-5'-Nukleotidase/CD73 defizienten Mausmutanten zur Klärung der Bedeutung von extrazellulär gebildeten Adenosin bei akuten und chronischen Entzündungsprozessen. Dissertation, Universität Düsseldorf
 19. Buchheiser, A., A. Pexa, B. Emde, Z. Ding, M. Romio, S. Burghoff, C. Viethen, A. Lindecke, K. Köhrer, J.W. Fischer, and J. Schrader. 2010. Multiple roles of CD73-derived adenosine in atherogenesis. *submitted for publication*
 20. Burnstock, G. 2006. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S172-181.
 21. Castrop, H., Y. Huang, S. Hashimoto, D. Mizel, P. Hansen, F. Theilig, S. Bachmann, C. Deng, J. Briggs, and J. Schnermann. 2004. Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice. *J Clin Invest* 114:634-642.
 22. Cerqueira Mde, C. 2000. The role of pharmacologic stress testing for myocardial perfusion imaging. *Rev Port Cardiol* 19 Suppl 1:123-28.
 23. Chatila, T., L. Silverman, R. Miller, and R. Geha. 1989. Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol* 143:1283-1289.
 24. Chiocchia, G., B. Manoury, M.C. Boissier, and C. Fournier. 1993. T cell-targeted immunotherapy in murine collagen-induced arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 11 Suppl 9:S15-17.
-

25. Cronstein, B.N., R.I. Levin, M. Philips, R. Hirschhorn, S.B. Abramson, and G. Weissmann. 1992. Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors. *J Immunol* 148:2201-2206.
 26. Cronstein, B.N., D. Naime, and G. Firestein. 1995. The antiinflammatory effects of an adenosine kinase inhibitor are mediated by adenosine. *Arthritis Rheum* 38:1040-1045.
 27. Cunha, R.A., S. Ferre, J.M. Vaugeois, and J.F. Chen. 2008. Potential therapeutic interest of adenosine A2A receptors in psychiatric disorders. *Curr Pharm Des* 14:1512-1524.
 28. Dallman, M., and C.G. Fathman. 1985. Type II collagen-reactive T cell clones from mice with collagen-induced arthritis. *J Immunol* 135:1113-1118.
 29. Deaglio, S., K.M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V.K. Kuchroo, T.B. Strom, and S.C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204:1257-1265.
 30. Decking, U.K., G. Schlieper, K. Kroll, and J. Schrader. 1997. Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circ Res* 81:154-164.
 31. Deussen, A., B. Bading, M. Kelm, and J. Schrader. 1993. Formation and salvage of adenosine by macrovascular endothelial cells. *Am J Physiol* 264:H692-700.
 32. Di Virgilio, F., D. Ferrari, and E. Adinolfi. 2009. P2X(7): a growth-promoting receptor-implications for cancer. *Purinergic Signal* 5:251-256.
 33. Doncarli, A., G. Chiocchia, L.M. Stasiuk, D. Herbage, M.M. Boutillon, C. Fournier, and O. Abehsira-Amar. 1999. A recurrent valpha17/vbeta10 TCR-expressing T cell clone is involved in the pathogenicity of collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. *Eur J Immunol* 29:3636-3642.
 34. Drury, A.N., and A. Szent-Gyorgyi. 1929. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68:213-237.
 35. Dunwiddie, T.V., and S.A. Masino. 2001. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24:31-55.
 36. Dzhandzhugazyan, K.N., A.F. Kirkin, P. thor Straten, and J. Zeuthen. 1998. Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas. *FEBS Lett* 430:227-230.
 37. Edlund, A., A. Sollevi, and B. Linde. 1990. Haemodynamic and metabolic effects of infused adenosine in man. *Clin Sci (Lond)* 79:131-138.
-

38. El-Tayeb, A., J. Iqbal, A. Behrenswerth, M. Romio, M. Schneider, H. Zimmermann, J. Schrader, and C.E. Muller. 2009. Nucleoside-5'-monophosphates as prodrugs of adenosine A2A receptor agonists activated by ecto-5'-nucleotidase. *J Med Chem* 52:7669-7677.
 39. Elliott, M.R., F.B. Chekeni, P.C. Trampont, E.R. Lazarowski, A. Kadl, S.F. Walk, D. Park, R.I. Woodson, M. Ostankovich, P. Sharma, J.J. Lysiak, T.K. Harden, N. Leitinger, and K.S. Ravichandran. 2009. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461:282-286.
 40. Eltzschig, H.K., T. Eckle, A. Mager, N. Kuper, C. Karcher, T. Weissmuller, K. Boengler, R. Schulz, S.C. Robson, and S.P. Colgan. 2006. ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ Res* 99:1100-1108.
 41. Eltzschig, H.K., J.C. Ibla, G.T. Furuta, M.O. Leonard, K.A. Jacobson, K. Enjyoji, S.C. Robson, and S.P. Colgan. 2003. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *J Exp Med* 198:783-796.
 42. Eltzschig, H.K., L.F. Thompson, J. Karhausen, R.J. Cotta, J.C. Ibla, S.C. Robson, and S.P. Colgan. 2004. Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. *Blood* 104:3986-3992.
 43. Enjyoji, K., J. Sevigny, Y. Lin, P.S. Frenette, P.D. Christie, J.S. Esch, 2nd, M. Imai, J.M. Edelberg, H. Rayburn, M. Lech, D.L. Beeler, E. Csizmadia, D.D. Wagner, S.C. Robson, and R.D. Rosenberg. 1999. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat Med* 5:1010-1017.
 44. Erdmann, A.A., Z.G. Gao, U. Jung, J. Foley, T. Borenstein, K.A. Jacobson, and D.H. Fowler. 2005. Activation of Th1 and Tc1 cell adenosine A2A receptors directly inhibits IL-2 secretion in vitro and IL-2-driven expansion in vivo. *Blood* 105:4707-4714.
 45. Greenwald, R.J., G.J. Freeman, and A.H. Sharpe. 2005. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23:515-548.
 46. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann. 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170:2081-2095.
 47. Fiorentino, D.F., A. Zlotnik, P. Vieira, T.R. Mosmann, M. Howard, K.W. Moore, and A. O'Garra. 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146:3444-3451.
 48. Firestein, G.S., D. Boyle, D.A. Bullough, H.E. Gruber, F.G. Sajjadi, A. Montag, B. Sambol, and K.M. Mullane. 1994. Protective effect of an adenosine kinase inhibitor in septic shock. *J Immunol* 152:5853-5859.
-

49. Flogel, U., Z. Ding, H. Hardung, S. Jander, G. Reichmann, C. Jacoby, R. Schubert, and J. Schrader. 2008. In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging. *Circulation* 118:140-148.
 50. Fredholm, B.B., M.P. Abbracchio, G. Burnstock, J.W. Daly, T.K. Harden, K.A. Jacobson, P. Leff, and M. Williams. 1994. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 46:143-156.
 51. Goto, T., R.B. Herberman, A. Maluish, and D.M. Strong. 1983. Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E-induced suppression of human natural killer cell activity. *J Immunol* 130:1350-1355.
 52. Harish, A., G. Hohana, P. Fishman, O. Arnon, and S. Bar-Yehuda. 2003. A3 adenosine receptor agonist potentiates natural killer cell activity. *Int J Oncol* 23:1245-1249.
 53. Hashikawa, T., S.W. Hooker, J.G. Maj, C.J. Knott-Craig, M. Takedachi, S. Murakami, and L.F. Thompson. 2004. Regulation of adenosine receptor engagement by ecto-adenosine deaminase. *Faseb J* 18:131-133.
 54. Hasko, G., D.G. Kuhel, J.F. Chen, M.A. Schwarzschild, E.A. Deitch, J.G. Mabley, A. Marton, and C. Szabo. 2000. Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *Faseb J* 14:2065-2074.
 55. Hasko, G., D.G. Kuhel, A.L. Salzman, and C. Szabo. 2000. ATP suppression of interleukin-12 and tumour necrosis factor-alpha release from macrophages. *Br J Pharmacol* 129:909-914.
 56. Holmdahl, R., L. Klareskog, K. Rubin, E. Larsson, and H. Wigzell. 1985. T lymphocytes in collagen II-induced arthritis in mice. Characterization of arthritogenic collagen II-specific T-cell lines and clones. *Scand J Immunol* 22:295-306.
 57. Hom, J.T., J.M. Stuart, and J.M. Chiller. 1986. Murine T cells reactive to type II collagen. I. Isolation of lines and clones and characterization of their antigen-induced proliferative responses. *J Immunol* 136:769-775.
 58. Hong, S., A. Brass, M. Seman, F. Haag, F. Koch-Nolte, and G.R. Dubyak. 2009. Basal and inducible expression of the thiol-sensitive ART2.1 ecto-ADP-ribosyltransferase in myeloid and lymphoid leukocytes. *Purinergic Signal* 5:369-383.
 59. Hoskin, D.W., T. Reynolds, and J. Blay. 1994. Adenosine as a possible inhibitor of killer T-cell activation in the microenvironment of solid tumours. *Int J Cancer* 59:854-855.
-

60. Huang, S., S. Apasov, M. Koshiba, and M. Sitkovsky. 1997. Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood* 90:1600-1610.
 61. Inbe, H., S. Watanabe, M. Miyawaki, E. Tanabe, and J.A. Encinas. 2004. Identification and characterization of a cell-surface receptor, P2Y15, for AMP and adenosine. *J Biol Chem* 279:19790-19799.
 62. Isomaki, P., R. Luukkainen, R. Saario, P. Toivanen, and J. Punnonen. 1996. Interleukin-10 functions as an antiinflammatory cytokine in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 39:386-395.
 63. Lyons, A.B., and C.R. Parish. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 171:131-137.
 64. Kakimoto, K., M. Katsuki, T. Hirofuji, H. Iwata, and T. Koga. 1988. Isolation of T cell line capable of protecting mice against collagen-induced arthritis. *J Immunol* 140:78-83.
 65. Kassell, N.F., D.J. Boarini, J.J. Olin, and J.A. Sprowell. 1983. Cerebral and systemic circulatory effects of arterial hypotension induced by adenosine. *J Neurosurg* 58:69-76.
 66. Klotz, K.-N. 2007. Adenosine Receptor Pharmacology. In Adenosine receptors - Therapeutic Aspects for Inflammatory and Immune Disease. G. Haskó, B.N. Cronstein, and C. Szabó, editors. CRC Press Taylor & Francis Group, Oxford OX14 4RN. 1-14.
 67. Knight, D., X. Zheng, C. Rocchini, M. Jacobson, T. Bai, and B. Walker. 1997. Adenosine A3 receptor stimulation inhibits migration of human eosinophils. *J Leukoc Biol* 62:465-468.
 68. Kobayashi, S., H. Zimmermann, and D.E. Millhorn. 2000. Chronic hypoxia enhances adenosine release in rat PC12 cells by altering adenosine metabolism and membrane transport. *J Neurochem* 74:621-632.
 69. Kobie, J.J., P.R. Shah, L. Yang, J.A. Rebhahn, D.J. Fowell, and T.R. Mosmann. 2006. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol* 177:6780-6786.
 70. Koshiba, M., D.L. Rosin, N. Hayashi, J. Linden, and M.V. Sitkovsky. 1999. Patterns of A2A extracellular adenosine receptor expression in different functional subsets of human peripheral T cells. Flow cytometry studies with anti-A2A receptor monoclonal antibodies. *Mol Pharmacol* 55:614-624.
 71. Koszalka, P., B. Ozuyaman, Y. Huo, A. Zerneck, U. Flogel, N. Braun, A. Buchheiser, U.K. Decking, M.L. Smith, J. Sevigny, A. Gear, A.A. Weber, A. Molojavyi, Z. Ding, C. Weber, K. Ley, H. Zimmermann, A. Godecke, and J. Schrader. 2004. Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ Res* 95:814-821.
-

-
72. Lappas, C.M., J.M. Rieger, and J. Linden. 2005. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4+ T cells. *J Immunol* 174:1073-1080.
 73. Lasley, R.D., J.O. Hegge, M.A. Noble, and R.M. Mentzer, Jr. 1998. Comparison of interstitial fluid and coronary venous adenosine levels in in vivo porcine myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 30:1137-1147.
 74. Le Moine, O., P. Stordeur, L. Schandene, A. Marchant, D. de Groote, M. Goldman, and J. Deviere. 1996. Adenosine enhances IL-10 secretion by human monocytes. *J Immunol* 156:4408-4414.
 75. Ledoux, S., I. Runembert, K. Koumanov, J.B. Michel, G. Trugnan, and G. Friedlander. 2003. Hypoxia enhances Ecto-5'-Nucleotidase activity and cell surface expression in endothelial cells: role of membrane lipids. *Circ Res* 92:848-855.
 76. Lennon, P.F., C.T. Taylor, G.L. Stahl, and S.P. Colgan. 1998. Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J Exp Med* 188:1433-1443.
 77. Livingston, M., L.G. Heaney, and M. Ennis. 2004. Adenosine, inflammation and asthma--a review. *Inflamm Res* 53:171-178.
 78. Long, M., S.G. Park, I. Strickland, M.S. Hayden, and S. Ghosh. 2009. Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor. *Immunity* 31:921-931.
 79. Lukashev, D.E., P.T. Smith, C.C. Caldwell, A. Ohta, S.G. Apasov, and M.V. Sitkovsky. 2003. Analysis of A2a receptor-deficient mice reveals no significant compensatory increases in the expression of A2b, A1, and A3 adenosine receptors in lymphoid organs. *Biochem Pharmacol* 65:2081-2090.
 80. Luthin, D.R., R.A. Olsson, R.D. Thompson, D.R. Sawmiller, and J. Linden. 1995. Characterization of two affinity states of adenosine A2a receptors with a new radioligand, 2-[2-(4-amino-3-[125I]iodophenyl)ethylamino]adenosine. *Mol Pharmacol* 47:307-313.
 81. MacLean, D.A., L.I. Sinoway, and U. Leuenberger. 1998. Systemic hypoxia elevates skeletal muscle interstitial adenosine levels in humans. *Circulation* 98:1990-1992.
 82. MacLean, D.A., L.M. Vickery, and L.I. Sinoway. 2001. Elevated interstitial adenosine concentrations do not activate the muscle reflex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H546-553.
 83. Madara, J.L., T.W. Patapoff, B. Gillece-Castro, S.P. Colgan, C.A. Parkos, C. Delp, and R.J. Mrosny. 1993. 5'-adenosine monophosphate is the neutrophil-derived paracrine factor that elicits chloride secretion from T84 intestinal epithelial cell monolayers. *J Clin Invest* 91:2320-2325.
-

-
84. Maghazachi, A.A., A. al-Aoukaty, and T.J. Schall. 1994. C-C chemokines induce the chemotaxis of NK and IL-2-activated NK cells. Role for G proteins. *J Immunol* 153:4969-4977.
 85. Mahmorian, J.J., and M.S. Verani. 1994. Myocardial perfusion imaging during pharmacologic stress testing. *Cardiol Clin* 12:223-245.
 86. Marinova-Mutafchieva, L., R.O. Williams, L.J. Mason, C. Mauri, M. Feldmann, and R.N. Maini. 1997. Dynamics of proinflammatory cytokine expression in the joints of mice with collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol* 107:507-512.
 87. Marwick, T.H. 1997. Adenosine echocardiography in the diagnosis of coronary artery disease. *Eur Heart J* 18 Suppl D:D31-36.
 88. Maurer, M., and E. von Stebut. 2003. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1882-1886.
 89. Mauri, C., R.O. Williams, M. Walmsley, and M. Feldmann. 1996. Relationship between Th1/Th2 cytokine patterns and the arthritogenic response in collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* 26:1511-1518.
 90. McGuinness, M.E., and R.L. Talbert. 1994. Pharmacologic stress testing: experience with dipyridamole, adenosine, and dobutamine. *Am J Hosp Pharm* 51:328-346; quiz 404-325.
 91. Merighi, S., P. Mirandola, K. Varani, S. Gessi, E. Leung, P.G. Baraldi, M.A. Tabrizi, and P.A. Borea. 2003. A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. *Pharmacol Ther* 100:31-48.
 92. Merrill, J.T., C. Shen, D. Schreiber, D. Coffey, O. Zakharenko, R. Fisher, R.G. Lahita, J. Salmon, and B.N. Cronstein. 1997. Adenosine A1 receptor promotion of multinucleated giant cell formation by human monocytes: a mechanism for methotrexate-induced nodulosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 40:1308-1315.
 93. Minguet, S., M. Huber, L. Rosenkranz, W.W. Schamel, M. Reth, and T. Brummer. 2005. Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors. *Eur J Immunol* 35:31-41.
 94. Murphree, L.J., G.W. Sullivan, M.A. Marshall, and J. Linden. 2005. Lipopolysaccharide rapidly modifies adenosine receptor transcripts in murine and human macrophages: role of NF-kappaB in A(2A) adenosine receptor induction. *Biochem J* 391:575-580.
 95. Najar, H.M., S. Ruhl, A.C. Bru-Capdeville, and J.H. Peters. 1990. Adenosine and its derivatives control human monocyte differentiation into highly accessory cells versus macrophages. *J Leukoc Biol* 47:429-439.
-

96. Noji, T., M. Takayama, M. Mizutani, Y. Okamura, H. Takai, A. Karasawa, and H. Kusaka. 2002. KF24345, an adenosine uptake inhibitor, suppresses lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production and leukopenia via endogenous adenosine in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 300:200-205.
 97. O'Garra, A., and P. Vieira. 2004. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 10:801-805.
 98. Ohta, A., E. Gorelik, S.J. Prasad, F. Ronchese, D. Lukashev, M.K. Wong, X. Huang, S. Caldwell, K. Liu, P. Smith, J.F. Chen, E.K. Jackson, S. Apasov, S. Abrams, and M. Sitkovsky. 2006. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13132-13137.
 99. Olsson, R.A., and J.D. Pearson. 1990. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev* 70:761-845.
 100. Pahl, H.L. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18:6853-6866.
 101. Pelegrin, P., and A. Surprenant. 2006. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *Embo J* 25:5071-5082.
 102. Piccini, A., S. Carta, S. Tassi, D. Lasiglie, G. Fossati, and A. Rubartelli. 2008. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8067-8072.
 103. Priebe, T., C.D. Platsoucas, and J.A. Nelson. 1990. Adenosine receptors and modulation of natural killer cell activity by purine nucleosides. *Cancer Res* 50:4328-4331.
 104. Qi, A.D., T.K. Harden, and R.A. Nicholas. 2004. GPR80/99, proposed to be the P2Y(15) receptor activated by adenosine and AMP, is not a P2Y receptor. *Purinergic Signal* 1:67-74.
 105. Quintero, I.B., C.L. Araujo, A.E. Pulkka, R.S. Wirkkala, A.M. Herrala, E.L. Eskelinen, E. Jokitalo, P.A. Hellstrom, H.J. Tuominen, P.P. Hirvikoski, and P.T. Vihko. 2007. Prostatic acid phosphatase is not a prostate specific target. *Cancer Res* 67:6549-6554.
 106. Ring, S., A.H. Enk, and K. Mahnke. ATP activates regulatory T Cells in vivo during contact hypersensitivity reactions. *J Immunol* 184:3408-3416.
 107. Samet, M.K. 1985. Inhibition of antibody production by 2-chloroadenosine. *Life Sci* 37:225-233.
-

108. Schenk, U., A.M. Westendorf, E. Radaelli, A. Casati, M. Ferro, M. Fumagalli, C. Verderio, J. Buer, E. Scanziani, and F. Grassi. 2008. Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal* 1:ra6.
 109. Scheuplein, F., N. Schwarz, S. Adriouch, C. Krebs, P. Bannas, B. Rissiek, M. Seman, F. Haag, and F. Koch-Nolte. 2009. NAD⁺ and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. *J Immunol* 182:2898-2908.
 110. Schuber, F., and F.E. Lund. 2004. Structure and enzymology of ADP-ribosyl cyclases: conserved enzymes that produce multiple calcium mobilizing metabolites. *Curr Mol Med* 4:249-261.
 111. Seegmiller, J.E., T. Watanabe, and M.H. Schreier. 1977. The effect of adenosine on lymphoid cell proliferation and antibody formation. *Ciba Found Symp* 249-276.
 112. Seman, M., S. Adriouch, F. Scheuplein, C. Krebs, D. Freese, G. Glowacki, P. Deterre, F. Haag, and F. Koch-Nolte. 2003. NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* 19:571-582.
 113. Shryock, J.C., S. Snowdy, P.G. Baraldi, B. Cacciari, G. Spalluto, A. Monopoli, E. Ongini, S.P. Baker, and L. Belardinelli. 1998. A2A-adenosine receptor reserve for coronary vasodilation. *Circulation* 98:711-718.
 114. Siaghy, E.M., Y. Devaux, N. Sfaksi, J.P. Carteaux, D. Ungureanu-Longrois, F. Zannad, J.P. Villemot, C. Burlet, and P.M. Mertes. 2000. Consequences of inspired oxygen fraction manipulation on myocardial oxygen pressure, adenosine and lactate concentrations: a combined myocardial microdialysis and sensitive oxygen electrode study in pigs. *J Mol Cell Cardiol* 32:493-504.
 115. Sica, A., L. Dorman, V. Viggiano, M. Cippitelli, P. Ghosh, N. Rice, and H.A. Young. 1997. Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. *J Biol Chem* 272:30412-30420.
 116. Sica, A., T.H. Tan, N. Rice, M. Kretzschmar, P. Ghosh, and H.A. Young. 1992. The c-rel protooncogene product c-Rel but not NF-kappa B binds to the intronic region of the human interferon-gamma gene at a site related to an interferon-stimulable response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1740-1744.
 117. Sitkovsky, M., D. Lukashev, S. Deaglio, K. Dwyer, S.C. Robson, and A. Ohta. 2008. Adenosine A2A receptor antagonists: blockade of adenosinergic effects and T regulatory cells. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S457-464.
 118. Sitkovsky, M.V., D. Lukashev, S. Apasov, H. Kojima, M. Koshiba, C. Caldwell, A. Ohta, and M. Thiel. 2004. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol* 22:657-682.
-

119. Snyder, F.F., and J.F. Henderson. 1973. Alternative pathways of deoxyadenosine and adenosine metabolism. *J Biol Chem* 248:5899-5904.
 120. Sperlagh, B., G. Hasko, Z. Nemeth, and E.S. Vizi. 1998. ATP released by LPS increases nitric oxide production in raw 264.7 macrophage cell line via P2Z/P2X7 receptors. *Neurochem Int* 33:209-215.
 121. Stagg, J., U. Divisekera, N. McLaughlin, J. Sharkey, S. Pommey, D. Denoyer, K.M. Dwyer, and M.J. Smyth. 2010. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1547-1552.
 122. Synnestvedt, K., G.T. Furuta, K.M. Comerford, N. Louis, J. Karhausen, H.K. Eltzschig, K.R. Hansen, L.F. Thompson, and S.P. Colgan. 2002. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest* 110:993-1002.
 123. Takedachi, M., S.P. Colgan, and L.F. Thompson. 2007. The Role of CD73 in the Generation of Extracellular Adenosine for Adenosine Signaling. In *Adenosine receptors - Therapeutic Aspects for Inflammatory and Immune Disease*. G. Haskó, B.N. Cronstein, and C. Szabó, editors. CRC Press Taylor & Francis Group, Oxford OX14 4RN. 39-48.
 124. Thompson, L.F., H.K. Eltzschig, J.C. Ibla, C.J. Van De Wiele, R. Resta, J.C. Morote-Garcia, and S.P. Colgan. 2004. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med* 200:1395-1405.
 125. Thompson, L.F., J.M. Ruedi, R.D. O'Connor, and J.F. Bastian. 1986. Ecto-5'-nucleotidase expression during human B cell development. An explanation for the heterogeneity in B lymphocyte ecto-5'-nucleotidase activity in patients with hypogammaglobulinemia. *J Immunol* 137:2496-2500.
 126. Thompson, L.F., J.M. Ruedi, A. Glass, G. Moldenhauer, P. Moller, M.G. Low, M.R. Klemens, M. Massaia, and A.H. Lucas. 1990. Production and characterization of monoclonal antibodies to the glycosyl phosphatidylinositol-anchored lymphocyte differentiation antigen ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Tissue Antigens* 35:9-19.
 127. Traut, T.W. 1994. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem* 140:1-22.
 128. Van Lent, P.L., A.E. Holthuysen, N. Van Rooijen, L.B. Van De Putte, and W.B. Van Den Berg. 1998. Local removal of phagocytic synovial lining cells by clodronate-liposomes decreases cartilage destruction during collagen type II arthritis. *Ann Rheum Dis* 57:408-413.
 129. Vieira, P., R. de Waal-Malefyt, M.N. Dang, K.E. Johnson, R. Kastelein, D.F. Fiorentino, J.E. deVries, M.G. Roncarolo, T.R. Mosmann, and K.W. Moore. 1991. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1172-1176.
-

130. Webb, R.L., B.W. Barclay, and S.C. Graybill. 1991. Cardiovascular effects of adenosine A2 agonists in the conscious spontaneously hypertensive rat: a comparative study of three structurally distinct ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 259:1203-1212.
 131. Webb, R.L., R.B. McNeal, Jr., B.W. Barclay, and G.D. Yasay. 1990. Hemodynamic effects of adenosine agonists in the conscious spontaneously hypertensive rat. *J Pharmacol Exp Ther* 254:1090-1099.
 132. Webb, R.L., M.A. Sills, J.P. Chovan, J.V. Peppard, and J.E. Francis. 1993. Development of tolerance to the antihypertensive effects of highly selective adenosine A2a agonists upon chronic administration. *J Pharmacol Exp Ther* 267:287-295.
 133. Wolpe, S.D., G. Davatelis, B. Sherry, B. Beutler, D.G. Hesse, H.T. Nguyen, L.L. Moldawer, C.F. Nathan, S.F. Lowry, and A. Cerami. 1988. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med* 167:570-581.
 134. Xaus, J., A.F. Valledor, M. Cardo, L. Marques, J. Beleta, J.M. Palacios, and A. Celada. 1999. Adenosine inhibits macrophage colony-stimulating factor-dependent proliferation of macrophages through the induction of p27kip-1 expression. *J Immunol* 163:4140-4149.
 135. Yegutkin, G.G., T. Henttinen, S.S. Samburski, J. Spychala, and S. Jalkanen. 2002. The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. *Biochem J* 367:121-128.
 136. Young, H.A. 1996. Regulation of interferon-gamma gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 16:563-568.
 137. Yssel, H., R. De Waal Malefyt, M.G. Roncarolo, J.S. Abrams, R. Lahesmaa, H. Spits, and J.E. de Vries. 1992. IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. *J Immunol* 149:2378-2384.
 138. Yu, T., W.G. Junger, C. Yuan, A. Jin, Y. Zhao, X. Zheng, Y. Zeng, and J. Liu. 2009. Shockwaves increase T-cell proliferation and IL-2 expression through ATP release, P2X7 receptors, and FAK activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 298:C457-464.
 139. Zarek, P.E., C.T. Huang, E.R. Lutz, J. Kowalski, M.R. Horton, J. Linden, C.G. Drake, and J.D. Powell. 2008. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* 111:251-259.
 140. Zerneck, A., K. Bidzhekov, B. Ozuyaman, L. Fraemohs, E.A. Liehn, J.M. Luscher-Firzlaff, B. Luscher, J. Schrader, and C. Weber. 2006. CD73/ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation. *Circulation* 113:2120-2127.
-

141. Zhao, G., A. Linke, X. Xu, M. Ochoa, F. Belloni, L. Belardinelli, and T.H. Hintze. 2003. Comparative profile of vasodilation by CVT-3146, a novel A2A receptor agonist, and adenosine in conscious dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 307:182-189.
 142. Zimmermann, H. 1992. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J* 285 (Pt 2):345-365.
 143. Zimmermann, H. 2000. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362:299-309.
 144. Zylka, M.J., N.A. Sowa, B. Taylor-Blake, M.A. Twomey, A. Herrala, V. Voikar, and P. Vihko. 2008. Prostatic acid phosphatase is an ectonucleotidase and suppresses pain by generating adenosine. *Neuron* 60:111-122.
-

10. Materialien

10.1. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen Bezogen:

- Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
- Merck (Darmstadt)
- Sigma-Aldrich®/Fluka (St. Louis, Missouri, USA)

10.2. Puffer

Ammoniumacetat Puffer

38.5M Ammoniumacetat
pH5.0 (Essigsäure)
filtrieren und entgasen

ACK-Lysepuffer

0.15mM NH₄Cl
1mM KHCO₃
0.1mM Na₂-EDTA
pH7.2-7.4

Blockpuffer

PBS (s.u.)
+ 1% BSA (m/v)
+ 0.05% NaN₃ (10%) (v/v)

FACS/MACS Puffer

PBS (s.u.)
+ 0.5% BSA (m/v) (Sigma-Aldrich®)
+ 5mM EDTA
10 Min. ultraschallen

Ficoll Bindungspuffer

20mM HEPES, pH7.5
50mM KCl
2.5mM MgCl₂
1mM DTT
20% Ficoll 400 (m/v)

Krebs-Henseleit Puffer

118mM NaCl
4.7mM KCl
2.5mM CaCl₂
1.2mM MgSO₄
1.2mM KH₂PO₄
25mM NaHCO₃
5.55mM Glukose

Nuklear-Extraktions-Puffer

50mM HEPES, pH7.8
50mM KCl
300mM NaCl
0.1mM EDTA
10% Glycerol (v/v)

phosphat gepufferte Saline (PBS)

237mM NaCl
2.7mM KCl
8.1mM Na₂HPO₄
1.5mM KH₂PO₄
pH7.2

Reagent Diluent

TBS (s.u.)
+ 0.1% BSA (m/v)
+ 0.05% Tween20 (v/v)

STE Puffer

10mM Tris Base
1mM EDTA
100mM NaCl
pH8

swelling Puffer

10mM HEPES, pH7.6
10mM KCl
2mM MgCl₂
0.1 mM EDTA

TBE Puffer

89mM Tris Base
89mM Borat
2mM Na₂-EDTA
pH8.0

TotEx Puffer

20mM HEPES, pH7.5
400mM NaCl
1mM MgCl₂
0.5mM EDTA
0.1mM EGTA
20% Glycerol (v/v)
1% NP40 (10%) (v/v)

kurz vor Gebrauch zugeben:

Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich®)

Tris gepufferte Saline (TBS)

20mM Tris Base
150mM NaCl₂
pH7.3

10.3. Zellkulturmedien

Panserin™ 413 (PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach)

+ 0.2% Growth factors mixture (PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach)

+ 0.1% Gentamycin (v/v) (50mg/ml, Sigma-Aldrich)

RPMI-1640 with L-glutamine and NaHCO₂ (Sigma-Aldrich®)

+ 0.1% Gentamycin (v/v) (50mg/ml, Sigma-Aldrich®)

± 10% FKS (v/v) (Gibco BRL, Life Science)

10.4. Lösungen

Freund's Complete Adjuvant (DIFCO®)

Trypan blue Solution (0.4%) (SigmaAldrich®)

Türk'lösung (Merck GmbH + Co. KG)

ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen™)

Propidium Iodide Solution (Miltenyi Biotech GmbH)

Stop Solution – 2N H₂SO₄ (R&D Systems®)

Substrate Solution – 1:1 mixture of H₂O₂ and Tetramethylbenzidine (R&D Systems®)

ToPro3 Solution 1mM (Invitrogen™)

10.5. Assay Kits und MicroBeads

Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) assay mix + dilution buffer (Sigma-Aldrich®)

BCA Protein Assay Kit (Pierce® Thermo SCIENTIFIC)

Bio-Plex Mouse Cytokine 23-Plex Panel (Bio-Rad Laboratories, Inc.)

CD4⁺/CD25⁺ regulatory T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotech GmbH)

CD90.2 MicroBeads, mouse (Miltenyi Biotech GmbH)

CD4 (L3T4) MicroBeads, mouse (Miltenyi Biotech GmbH)

mouse IFN- γ DuoSet® ELISA Development System (R&D Systems®)

mouse IL-2 DuoSet® ELISA Development System (R&D Systems®)

T Cell Activation/Expansion Kit, mouse (Miltenyi Biotech GmbH)

10.6. Antikörper

Anti-CD3 Rabbit pAb (Calbiochem)

Goat anti rabbit Fluorescein (FITC) conjugated (Jackson ImmunoResearch)

Goat anti rat Rhodamine Red TM-X conjugated (Jackson ImmunoResearch)

FITC-Conjugated Rat Anti-Mouse CD4 (GK1.5)

NF- κ B p50 (NLS): sc-114 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.)

NF- κ B p65 (A): sc-109 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.)

Purified Hamster Anti-Mouse CD3e (145-2C11) (BD Pharmingen™)

Purified Hamster Anti-Mouse CD28 (37.51) (BD Pharmingen™)

Purified Rat Anti-Mouse CD4 (L3T4) (BD Pharmingen™)

Rat Anti-Mouse CD73 (Ty/23) Monoclonal (BD Pharmingen™)

R-PE-Conjugated Rat Anti-Mouse CD73 Monoclonal (BD Pharmingen™)

10.7. weitere Materialien/Substanzen

ATP, gamma [³²P] 5000 Ci/mmol (Hartmann Analytik)

Collagen II, bovine (BD Bioscience™)

Ionomycin calcium salt (Sigma-Aldrich®)

Jung *tissue freezing medium* (Leica Instruments)

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich®)

NF-κB Consensus Oligonucleotide (Promega Corp.)

normal goat serum (Linaris)

poly [d(I-C)] 10A₂₆₀ Units (500μg dsDNA) (Roche Applied Science)

in 500μl *aqua bidest.*

Rotiphorese® Gel30 (37.5:1) (Carl Roth GmbH + Co. KG)

T4 Polynucleotide Kinase (Promega Corp.)

5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CF(DA)SE) (Sigma-Aldrich®)

11. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Schrader für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit innerhalb der Arbeitsgruppe CD73 anfertigen zu dürfen. Danke, dass ich am Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Universität Düsseldorf meine Erfahrungen, was wissenschaftliches Arbeiten in der Praxis bedeutet, insbesondere unter medizinischen Aspekten, erweitern konnte.

Herrn Prof. Dr. Georg Groth möchte ich danken, dass er die Begutachtung meiner Dissertation als Koreferent übernommen hat.

Allen Mitarbeitern unseres Institutes sei gedankt für die vielen offenen und objektiven Diskussionen. Diese waren immer ein wichtiger Wegweiser und Ansporn, um schnell und sicher meine Ziele erreichen zu können. Danke auch, dass immer jemand zu gegen war, um mit mir uneigennützig gemeinsam Problemstellungen des täglichen Laborlebens lösen zu können.

Frau Jutta Ziemann möchte ich für die anfängliche Unterstützung zu Beginn meiner Zeit in Düsseldorf danken. Ohne diese wäre so manche Bestellung wohl nie auf den richtigen Weg gekommen.

Dr. Zhaoping Ding danke ich für die Unterstützung bei den *in-vivo* Experimenten. Ohne sein operatives Geschick hätte so mancher Versuch wesentlich mehr Zeit in Anspruch genommen.

Ellen Leuyven sei gedankt für die Unterstützung bei den Langendorff-Versuchen. Danke, dass Du trotz deines engen Zeitplans immer Zeit für mich gefunden hast.

Claudia Viethen danke ich für ihren moralischen Beistand. Auch wenn wir uns manchmal in die Haare gekommen sind, warst Du doch immer eine wichtige Stütze in frustrierenden Zeiten. Wünsch Dir, dass Du auch bald deine Dir gesteckten Ziele erreichen wirst.

Zuletzt möchte ich noch Markus Pelz danken, der seit fast 25 Jahren meine schulische Laufbahn verfolgt und sich schon einige Leidensgeschichten von mir anhören musste.

Brigitte Nikolay danke ich für ihre Zeit mit mir am Telefon. Gerade in der Endphase dieser Arbeit haben mir unsere Gespräche die nötige Kraft gegeben, um doch noch durchzuhalten.

12. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher noch keinen erfolglosen Promotionsversuch unternommen.

Düsseldorf, 01.04.2010

Michael Romio
