Aus dem Institut für Molekulare Kardiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Schrader

Die Rolle der Ekto-5'-Nukleotidase CD73 bei der von regulatorischen T-Zellen vermittelten Immunantwort

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Benjamin Manfred Gerhard Reinbeck

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Schrader
Korreferent: Prof. Dr. med. Roland Meisel

Meiner

Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Romio, M., Reinbeck, B., Bongardt, S., Huls, S., Burghoff, S. and Schrader, J., Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and Teff cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 2011. 301(2): p. C530-9.

Inhalt

Inhalt ..... **I**

Abkürzungsverzeichnis ..... **IV**

1 Einleitung **1**

1.1 Ein Überblick über das Immunsystem **1**

1.2 Immuntoleranz **3**

1.2.1 Zentrale Toleranz 4

1.2.2 Periphere Toleranz 4

1.3 Regulatorische T-Zellen **5**

1.3.1 Subpopulationen 6

1.3.2 Mechanismen der Immunmodulation 7

1.3.2.1 Suppression durch inhibitorische Zytokine 7

1.3.2.2 Suppression durch Zytolyse 9

1.3.2.3 Suppression durch Modulation Dendritischer Zellen 9

1.3.2.4 Suppression über metabolische Signalwege 9

1.4 Botenstoffe, Rezeptoren, Enzyme und Transporter des Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Signalweges **11**

1.4.1 Purin-Nukleotid-Rezeptoren (P2-Rezeptoren) 12

1.4.2 Adenosin-Rezeptoren (P1-Rezeptoren) und ihre Signalwege 13

1.4.3 Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase CD39 14

1.4.4 Ekto-5'-Nukleotidase CD73 15

1.4.5 Alkalische Phosphatase 15

1.4.6 Adenosin Desaminase 15

1.4.7 Zytosolische 5'-Nukleotidase, Adenosin-Kinase 16

1.4.8 Nukleosid-Transporter 16

2 Zielsetzung **18**

3 Versuchstiere und Methoden **19**

3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen **19**

3.2 Methoden **19**

3.2.1 Splenozytenisolierung 19

3.2.2 $CD4^+CD25^+$ T-Zell Isolierung 20

3.2.3 $CD4^+$ T-Zell Isolierung 22
3.2.4 RNA Isolierung....22
3.2.5 Reverse Transkription....22
3.2.6 Real-Time Polymerasekettenreaktion (rt-PCR) 23
3.2.7 Agarose Gelelektrophorese....24
3.2.8 Durchflusszytometrie (FACS) 24
3.2.9 Antigene Stimulierung von T-Lymphozyten 27
3.2.10 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)....28
3.2.11 Statistische Datenanalyse 29

4 Ergebnisse 30
4.1 Analyse der $CD4^+CD25^+$ Treg Zellen 30
4.1.1 Durchflusszytometrische Analyse der isolierten regulatorischen T-Zellen 30
4.1.2 Lichtmikroskopische Bestimmung des Anteils lebender Zellen 32
4.2 Genexpression von Purin-Rezeptoren und Enzymen des Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Signalweges durch $CD4^+CD25^+$ WT-Treg und $CD73^{-/-}$-Treg Zellen 32
4.2.1 Überprüfung der Amplifikate mittels Agarose Gelelektrophorese....33
4.2.2 Quantifizierung der Genexpression in murinen Treg aus WT- und $CD73^{-/-}$-Tieren...34
4.2.3 Einfluss von Substrat (AMP) in den Pufferlösungen auf die Genexpression....36
4.3 Antigene Stimulierung der $CD4^+CD25^+$ Treg Zellen....38
4.3.1 Quantifizierung der Genexpression in murinen WT-Treg und $CD73^{-/-}$-Treg 38
4.3.2 FACS-Analyse der Proteinexpression von CD39, CD73 und P2X7 in Treg 41
4.3.3 Sekretion antiinflammatorischer Zytokine in murinen WT-Treg und $CD73^{-/-}$-Treg....43

5 Diskussion....45
5.1 Magnetisch separierte Treg exprimieren CD73 45
5.2 Quantifizierung der Expression der Adenin-Nukleosid/Nukleotid Ektokaskade mit beteiligten Enzymen, Rezeptoren und Transportproteinen 46
5.2.1 CD73 als Taktgeber bei der Bereitstellung extrazellulären Adenosins über die CD39/CD73 Ektokaskade auf murinen wildtypischen Treg 46
5.2.2 Aktivierte Treg supprimieren die Genexpression des Nukleotid-Rezeptors P2X7....47
5.2.3 Alterationen in der Genexpression von Adenosinrezeptoren auf ruhenden und aktivierten Treg 49
5.2.4 Adenosin Transport über die Zellmembran ruhender und aktivierter Treg 50

5.2.5 Genexpression der Proteine des Adenin-Nukleosid/Nukleotid Signalweges durch CD73$^{-/-}$ Treg 50
5.2.6 Zusammenhängendes Gesamtbild der Erkenntnisse aus der quantitativen Genanalyse muriner Treg 51
5.3 Zytokinsekretion aktivierter muriner WT- und CD73$^{-/-}$-Treg 53

6 Zusammenfassung 54

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis 55
7.1 Abbildungsverzeichnis 55
7.2 Tabellenverzeichnis 57

8 Literaturverzeichnis 58

9 Materialien 76
9.1 Chemikalien 76
9.2 Molekularbiologische Produkte 76
9.3 Antikörper 78
9.4 Zellkulturmedien 78
9.5 Gebrauchslösungen 78
9.6 Geräte und Gebrauchswaren 79
9.7 Software 80

10 Danksagung 81

11 Erklärung 82

Abkürzungsverzeichnis

A_1R	Adenosinrezeptor 1
$A_{2a}R$	Adenosinrezeptor 2a
$A_{2b}R$	Adenosinrezeptor 2b
A_3R	Adenosinrezeptor 3
ADA	Adenosindesaminase
ADK	Adenosinkinase
ADP	Adenosindiphosphat
AlPho	alkalische Phosphatase
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
BZR	B-Zell-Rezeptor
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	*Cluster of Differentiation*
cDNA	kopierte Desoxyribonukleinsäure
CNT	konzentrativer Nukleosidtransporter
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Antigen-4
Cy5NT	zytosolische 5'Nukleotidase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
Ekto-5'-NT	Ekto-5'-Nukleotidase CD73
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorbtionstest
ENT	äquilibrativer Nukleosidtransporter
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FAK	Fokale adhäsions-Kinase
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	*Forkhead box* Protein 3
IFN	Interferon
IκB	Inhibitor des NFκB
IL	Interleukin
KO	*knockout*
MACS	magnetische Zellsortierung

MAPK, p38	Mitogen-aktivierte Protein Kinase, p38
MHC	*major histocompatibility complex*
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
n. d.	nicht detektierbar
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid / Nikotinsäureadeninnukleotid
NFAT	nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen
NFκB	nuklearer Faktor '*kappa-light-chain-enhancer*' aktivierter B-Zellen
NTPDase	Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase
P2X7	Nukleotid-Rezeptor P2X7
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
mRNA	*messenger* Ribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
TZR	T-Zell-Rezeptor
TGF-β	transformierender Wachstumsfaktor beta
Teff	Effektor T-Lymphozyten
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Treg	regulatorische T-Lymphozyten
UV	ultraviolet
VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsions-Molekül-1
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Ein Überblick über das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Organismus vor Infektionen. Unter Infektionen versteht man das Eindringen und die Vermehrung von Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten in den Körper. Neben der Abwehr exogener Pathogene ist das Immunsystem auch in der Lage entartete Körperzellen zu eliminieren. Das Immunsystem der Mammalia lässt sich in ein angeborenes, unspezifisches sowie ein adaptives, spezifisches System einteilen, die an vielen Stellen miteinander kommunizieren [1].

Die angeborene Immunabwehr ist schneller einsatzbereit und insofern unspezifisch, da mit universellen Abwehrmechanismen eindringende Pathogene sofort bekämpft werden können. Das adaptive Immunsystem hingegen benötigt zunächst einen Antigenkontakt um spezifische Abwehrmechanismen gegen dieses Antigen zu aktivieren. Der Vorteil dieser Antigenspezifität liegt in einer höheren Effektivität der Immunabwehr. Beide Systeme bestehen aus zellulären und humoralen Komponenten (Tabelle 1).

Das angeborene Immunsystem stellt nach der physischen und chemischen Barriere von Haut und Schleimhäuten die erste Abwehrlinie des Körpers dar. Basis sind invariante Rezeptoren, die häufige Merkmale von Pathogenen erkennen. Zu den zellulären Bestandteilen gehören die phagozytierenden Monozyten (differenzierte Form: Makrophagen), Granulozyten und Dendritischen Zellen. Des Weiteren gehören Mastzellen und natürliche Killer (NK)-Zellen zur angeborenen Immunität. Mastzellen spielen eine Rolle bei der Parasitenabwehr, NK-Zellen können abnorme körpereigene Zellen, wie Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen zerstören.

Humorale Bestandteile sind Zytokine, Chemokine und das Komplementsystem. Als Zytokine bezeichnet man von Zellen sezernierte Proteine, die benachbarte Zellen über entsprechende Rezeptoren in ihrem Verhalten beeinflussen. Chemokine sind Moleküle, die Immunzellen aus dem Blutstrom in infiziertes Gewebe locken. Das Komplementsystem besteht aus einer Kaskade von Plasmaproteinen, die durch bakterielle Oberflächen aktiviert wird und zur Lyse des Mikroorganismus oder dessen Opsonisierung (Markierung für Phagozyten) führt.

Die zellulären Bestandteile des adaptiven Immunsystems sind die antigenspezifischen Lymphozyten. Das Immunsystem muss in der Lage sein, eine spezifische Antwort auf jedes in den Organismus eindringende Pathogen geben zu können. Lymphozyten machen dies durch spezifische Antigen-erkennende Rezeptoren möglich. Jeder heranreifende Lymphozyt trägt einen einzigartigen Rezeptortyp, so dass in ihrer Gesamtheit ein großes Repertoire an

Tabelle 1: Komponenten des Immunsystems

	angeborenes Immunsystem	adaptives Immunsystem
zelluläre Bestandteile	Monozyten Granulozyten Dendritische Zellen NK-Zellen	B-Lymphozyten T-Lymphozyten
humorale Bestandteile	Zytokine Chemokine Komplement	Immunglobuline

unterschiedlichen Antigenrezeptoren zur Verfügung steht (siehe Kapitel 1.2). Lymphozyten, die noch nicht von einem Antigen aktiviert wurden, bezeichnet man als naive Lymphozyten. Nach dem Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen differenzieren sie zu funktionsfähigen Effektor-Lymphozyten. Es existieren zwei Typen: B-Lymphozyten (B-Zellen) und T-Lymphozyten (T-Zellen).

B-Zellen reifen im Knochenmark und differenzieren nach dem Kontakt zwischen einem passenden Antigen und ihrem B-Zell-Rezeptor (BZR) zu Plasmazellen. Sie sezernieren daraufhin Antikörper, die auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet werden. Sie stellen die lösliche Form des BZR dar und richten sich gegen das Antigen, welches die B-Zelle aktiviert hat. Sie können das Pathogen so für Phagozyten opsonisieren oder seine pathogene Wirkung blockieren. Außerdem sind sie in der Lage, das Komplementsystem und NK-Zellen zu aktivieren.

Die im Thymus geprägten T-Lymphozyten besitzen einen T-Zell-Rezeptor (TZR), der Antigene erkennt, die ihm durch andere Zellen präsentiert werden. Das geschieht über MHC- (*major histocompatibility complex*) Moleküle an der Zelloberfläche, die sich grundsätzlich in zwei Molekül-Typen unterscheiden lassen. MHC-Klasse 1 Moleküle werden von nahezu allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert und sind mit zytosolischen Peptidfragmenten beladen, die von der Zelle selbst, oder aber von einem intrazellulären Erreger (z. B. einem Virus) stammen. MHC-Klasse 2 Moleküle befinden sich auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APZ). Hierzu zählen Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen, die auf diesem Wege Fragmente phagozytierter Peptide präsentieren.

Beim ersten Kontakt zwischen TZR und passendem Antigen-MHC Komplex wird die naive T-Zelle aktiviert und zur Proliferation und Differenzierung zur reifen und funktionsfähigen T-Zelle angeregt (siehe auch Kapitel 3.2.9 Antigene Stimulierung von T-Lymphozyten). Folgende T-Zell-Subtypen lassen sich unterscheiden:

Zytotoxische T-Zellen (T-Killer-Zellen) können Zellen zerstören, die von Viren oder anderen intrazellulären Pathogenen infiziert wurden und daher für Antikörper nicht erreichbar sind. Peptidfragmente dieser Pathogene werden in MHC-Klasse 1 Molekülen an der

Zelloberfläche präsentiert und dort vom TZR der T-Killer-Zellen erkannt. CD8 dient hierbei als Korezeptor und ist ein Charakteristikum dieser Zellart.
Die Aufgabe der T-Helfer-Zellen besteht vor allem darin, den Antigen-aktivierten B-Zellen einen notwendigen zweiten Stimulus für ihre Differenzierung und Antikörper-Produktion zu liefern. Sie interagieren hierbei mit MHC-Klasse 2 Molekülen der B-Zellen. Im Gegensatz zu zytotoxischen T-Zellen tragen sie CD4 Moleküle mit Korezeptor-Funktion.
Zytotoxische- und Helfer-T-Zellen werden im Folgenden als Effektor-T-Zellen (Teff) bezeichnet.
Eine dritte Gruppe von T-Zellen bilden die regulatorischen T-Lymphozyten (Treg). Ihre Aufgabe ist es die Immunantwort so zu modulieren, dass sie effektiv bleibt, aber gleichzeitig den Wirtsorganismus nicht übermäßig schädigt. Sie stehen im Fokus dieser Arbeit und sollen im Weiteren näher betrachtet werden. Zum besseren Verständnis ihrer Rolle soll jedoch zunächst ein Einblick in die Immuntoleranz gegeben werden, an der Treg maßgeblich beteiligt sind.

1.2 Immuntoleranz

Aus dem Überblick über die Abwehrmechanismen wird bereits klar, dass das Immunsystem äußerst effizient gegen potentiell schädigende Organismen und entartete körpereigene Zellen vorgehen kann. Ein hoch diverses TZR-Repertoire von circa 25 x 10^6 verschiedenen Typen (Clonotypen) erlaubt dem Organismus auf nahezu sämtliche Pathogene eine passende T-Zell Antwort geben zu können [2]. Dies birgt allerdings auch die Gefahr, dass körpereigene Strukturen ohne pathologischen Wert (Autoantigene) in das Visier der Immunabwehr geraten. Auch ist es nicht sinnvoll gegen jedes harmlose, in den Körper eindringende Antigen gleich mit einer starken Abwehrreaktion zu antworten. Um das Gleichgewicht zwischen effizienter Immunabwehr und dem Schutz körpereigenem Gewebes zu wahren, stehen dem Organismus verschiedene Möglichkeiten der immunologischen Toleranz zur Verfügung (Tabelle 2).

Tabelle 2: Mechanismen der Immuntoleranz

zentrale Toleranz	periphere Toleranz
negative Selektion (Thymus)	Ignoranz Anergie *activation induced cell death* regulatorische T-Zellen

1.2.1 Zentrale Toleranz

Die zentrale Form der Immuntoleranz wird im Thymus als zentralem Organ generiert. Zunächst wird hier sichergestellt, dass eine T-Zelle mit ihrem TZR überhaupt durch MHC-Moleküle präsentierte Eigenpeptide erkennt und bindet. Das ist unabdingbare Voraussetzung für die T-Zell-Antwort. T-Zellen, die diese Anforderung erfüllen, bestehen diesen als „positive Selektion“ bezeichneten Auswahlprozess. Die übrigen unterliegen dem programmierten Zelltod, der Apoptose [3-5].
Ist die Affinität der Bindung zwischen TZR und MHC-Molekülen jedoch zu stark, besteht die Gefahr, dass diese T-Zellen körpereigene Strukturen im Sinne einer Autoimmunreaktion attackieren. Auch solche Zellen werden daher im Thymus apoptotisch. Dieser Prozess ermöglicht ein gewisses Maß an Selbsttoleranz und wird „negative Selektion“ genannt. Ein Großteil der neu gebildeten T-Zellen unterliegen dieser Elimination [6-8].
Allerdings entgehen einige T-Zellen der negativen Selektion. Zum einen können nicht alle möglichen Autoantigene im Thymus präsentiert werden [9], zum anderen werden vermutlich schwach autoreaktive T-Zellen positiv selektioniert, um das T-Zell Repertoire zu vergrößern [10, 11]. Daher muss es weitere Mechanismen der Immuntoleranz geben.

1.2.2 Periphere Toleranz

Um den Thymus verlassende, autoreaktive T-Zellen daran zu hindern gegen körpereigene Strukturen vorzugehen, gibt es verschiedene Mechanismen, die an unterschiedlichen Stellen des Immunsystems ansetzen. Sie werden zur „peripheren Toleranz“ zusammengefasst. Die wichtigsten unter ihnen sind Ignoranz, Anergie, AICD (*activation induced cell death*, d.h. aktivierte Apoptose) und die Suppression einer Immunantwort durch regulatorische T-Zellen.

Werden Autoantigene entweder an immunprivilegierten Stellen (schwer für T-Zellen erreichbare Gewebe wie Auge, Hoden und Plazenta) oder in zu geringer Anzahl präsentiert, reicht dies gewöhnlich für eine T-Zell-Aktivierung nicht aus. Dieses Phänomen wird als Ignoranz bezeichnet [12, 13].

Um eine vollständige T-Zell-Antwort zu erreichen, ist neben dem TZR-Signal ein weiteres Signal notwendig. Es wird von Korezeptoren vermittelt und beeinflusst die intrazelluläre Signaltransduktion [14]. APZ übermitteln mit ihren Oberflächenmolekülen der B7-Familie (CD80, CD86) diese kostimulatorischen Signale an die T-Zelle (siehe auch Kapitel 1.3.2.3). Binden diese an den inhibitorischen Korezeptor CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4*) eines T-Lymphozyten, verfällt er in einen Zustand der funktionellen Inaktivität, der sogenannten Anergie [15, 16].

AICD stellt den aggressivsten Mechanismus der peripheren Toleranz dar. T-Zellen bekommen von APZ den Befehl zum programmierten Zelltod. Ausschlaggebend hierfür ist die Interaktion von Fas (CD95) auf Seiten der T-Zelle mit dem Liganden FasL (CD95L) der APZ. Durch diesen Zell-Zell-Kontakt wird innerhalb des T-Lymphozyten eine Kaskade von proteinspaltenden Caspasen und DNA-spaltenden Nukleasen aktiviert, die schlussendlich zum Untergang der Zelle führt [17, 18].

1.3 Regulatorische T-Zellen

Schon im Jahre 1969 konnte durch die Experimente von Nishizuka et al. gezeigt werden, dass im Thymus auch immunsuppressive Zellen geprägt werden. Mäuse, denen innerhalb der ersten drei Lebenstage operativ der Thymus entfernt wurde, entwickelten autoimmune Krankheiten. Diese traten jedoch nicht auf, wenn innerhalb der ersten zwei Lebenswochen Splenozyten oder Thymozyten gesunder adulter Vergleichstiere transferiert wurden [19]. In den folgenden Jahren entwickelte sich ein großes Interesse an diesen Suppressor-Zellen und in zahlreichen Publikationen wurde versucht, die verantwortliche Zell-Population zu identifizieren. Den Durchbruch schaffte 1995 die Arbeitsgruppe um Sakaguchi. Sie isolierte eine Subpopulation von $CD4^+$ T-Zellen, die gleichzeitig den Zellmarker CD25, die α-Kette des hochaffinen IL-2 Rezeptors, tragen [20]. Diese Zellen wurden fortan $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen (Treg) genannt. T-Zell-Rezeptoren mit hoher Affinität zu im Thymus präsentierten Selbstpeptid-MHC Molekülen begünstigen offenbar ihre Entwicklung aus unreifen T-Zellen [21, 22].

Mit wachsender Kenntnis über Treg zeigte sich jedoch, dass die alleinige Identifikation über die Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 problematisch ist. Circa 4% der im Blut zirkulierenden $CD4^+$ T-Zellen koexprimieren CD25 auf hohem Niveau ($CD4^+CD25^{high}$). Die meisten dieser Zellen haben regulatorische Funktion. Allerdings kann CD25 auch von frisch aktivierten $CD4^+$ Effektor-T-Zellen exprimiert werden [23]. Da in der Literatur die Grenze zwischen $CD4^+CD25^{high}$ und $CD4^+CD25^{low}$ nicht eindeutig definiert wird, hat sich ein weiterer Zellmarker als Identifikationsmerkmal für regulatorische T-Zellen durchgesetzt. Der intrazelluläre Transkriptionsfaktor FoxP3 (*Forkhead box* Protein 3) ist von zentraler Bedeutung für die Differenzierung und Aufrechterhaltung der Funktion von Treg [24, 25]. FoxP3 kontrolliert die Transkription multipler Gene und dient heutzutage als Goldstandard für die Definition von Treg. Mutationen im FoxP3-Gen führen beim Menschen zu einem als IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*) bezeichneten schweren Immundefekt [26]. Zwar ist die Zahl an $CD4^+CD25^+$ Treg bei diesen Patienten vergleichbar mit der gesunder Vergleichspersonen, jedoch ist die immunsuppressive

Funktion der Zellen stark eingeschränkt [27]. Der Nachweis des intranukleären Proteins FoxP3 setzt allerdings eine Fixation und Permeabilisation der Zelle voraus, was eine Funktionsanalyse an lebenden Zellen unmöglich macht.

Eine Reihe von Experimenten zeigte, dass $CD4^+CD25^+$ Treg für die Ausbildung von Immuntoleranz und Immunhomöostase von entscheidender Bedeutung sind:

So entwickelten thymektomierte Mäuse, die mit $CD4^+CD25^-$ T-Zellen gesunder Vergleichstiere substituiert wurden, eine Vielzahl verschiedener Autoimmunerkrankungen, wie Thyreoditis, Gastritis, Insulitis, Glomerulonephritis und Arthritis. Der Transfer von $CD4^+CD25^+$ Treg konnte dosisabhängig diese Erkrankungen unterbinden [20]. Ein Mangel an Treg führt aber nicht nur zu Autoimmunität, sondern bewirkt auch eine pathologische Immunantwort auf Fremdantigene. Aus einer Treg-Depletion resultierten bei Mäusen inflammatorische Darmerkrankungen, welche vermutlich auf eine verstärkte Immunreaktion gegen die Bakterien der Darmflora zurückzuführen sind [28]. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass der Transfer von $CD4^+CD25^+$ Treg die Entstehung asthmatischer Atemwegserkrankungen vermindert und vor Langzeitfolgen wie dem *airway remodelling* schützen konnte [29, 30]. Auch bei der Entstehung von Gefäßerkrankungen scheinen Treg eine wichtige protektive Funktion zu haben. Ein Mangel bewirkt bei Mäusen mit einem proarteriosklerotischen Genotyp ($ApoE^{-/-}$) eine verstärkte Bildung arteriosklerotischer Läsionen [31].

Aber nicht immer scheint die Aktivität von Treg für den Organismus von Vorteil. So können diese Zellen zu einer spezifischen Immuntoleranz gegenüber Tumoren führen. Sie begünstigen dadurch das Tumorwachstum, indem sie die Immunantwort anderer T-Zellen supprimieren. Darüber hinaus sind Tumorzellen offenbar auch in der Lage, Treg zu rekrutieren, um so der Immunantwort zu entgehen [32, 33].

1.3.1 Subpopulationen

Im Thymus gereifte $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ regulatorische T-Zellen werden als natürlich vorkommende Treg bezeichnet. Ihre regulatorische Funktion ist stabil und sie zeigen eine konstante Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 [34, 35]. Es gibt darüber hinaus auch eine Treg Population mit denselben Zellmarkern, die in der Peripherie während inflammatorischer Prozesse aus $CD4^+FoxP3^-$ Effektor-T-Zellen induziert werden kann und ein ähnliches Zytokin-Muster aufweist. Voraussetzung ist eine TZR-Stimulation der Teff sowie die Anwesenheit des Zytokins TGF-β [23]. Solche Zellen werden adaptive Treg genannt und unterscheiden sich von den natürlich vorkommenden Treg durch eine Methylierung im FoxP3 Genlokus sowie durch das Fehlen des Transkriptionsfaktors ‚Helios'

[36, 37]. Ein regulatorischer Phänotyp von peripher induzierten adaptiven Treg konnte bislang allerdings nur in vivo an Mäusen belegt werden [38].

Es sind weitere T-Zell Subpopulationen bekannt, deren immunsuppressive Fähigkeiten experimentell nachgewiesen wurden. Sie werden daher ebenfalls unter dem Oberbegriff „regulatorische T-Zellen“ subsumiert:

Typ-1-regulatorische T-Zellen (T_R1) werden in der Peripherie induziert und supprimieren die T-Zell Proliferation über die Produktion von IL-10 und TGF-β [39]. Sie besitzen keine spezifischen Zellmarker, können aber über ihr Zytokin-Muster identifiziert werden [23].

Eine weitere Zellart sind T_3-Helfer Zellen (T_H3), die sich ebenfalls in der Peripherie entwickeln und TGF-β sezernieren. Sie spielen unter anderem eine Rolle bei der oralen Toleranz gegenüber Antigenen aus der Nahrung [40].

Verschiedene aktuelle Publikationen belegen, dass sich regulatorische T-Zellen nicht in einem terminalen Differenzierungsgrad befinden. In besonderen Situationen, wie z. B. Leukopenie und Inflammation können sie sich *in vivo* zu Effektorzellen differenzieren [41-44].

Im Thymus geprägte natürlich vorkommende $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg gelten aber als die wichtigste Zellart der peripheren Toleranz. Ihre Suppressionsmechanismen sollen in dieser Arbeit näher analysiert werden.

1.3.2 Mechanismen der Immunmodulation

Es sind verschiedene Mechanismen bekannt, mit denen regulatorische T-Zellen suppressiv auf das Immunsystem einwirken. Vignali et al. fasst sie in vier übergeordnete Gruppen zusammen (Abbildung 1): Suppression durch inhibitorische Zytokine, Suppression durch Zytolyse, Suppression über metabolische Signalwege und Suppression durch Modulation von Reifung und Funktion Dendritischer Zellen [35].

1.3.2.1 Suppression durch inhibitorische Zytokine

Auf die inhibitorische Wirkung der Zytokine IL-10 und TGF-β wurde bereits als Mechanismus peripher-induzierter Treg eingegangen. Auch wurde erwähnt, dass TGF-β ein wichtiges Kostimulanz für die Induktion adaptiver Treg ist. Die Bindung an den heterodimeren TGF-β Rezeptor (TGF-βRI und RII) induziert eine Kaskade von Proteinphosphorylierungen, die über den Smad-Signalweg zu einer Translokation von Transkriptionsfaktoren in den Zellkern führt [45]. Ob TGF-β auch an der durch natürlich vorkommende Treg vermittelten Suppression eine Rolle spielt, ist kontrovers diskutiert worden. Es gibt Publikationen, die TGF-β als wichtiges Zytokin bei der Immunmodulation durch Treg darstellen [45, 46]. Auch als an der Zelloberfläche gebundenes Zytokin spielt es bei der Suppression von Teff durch Treg

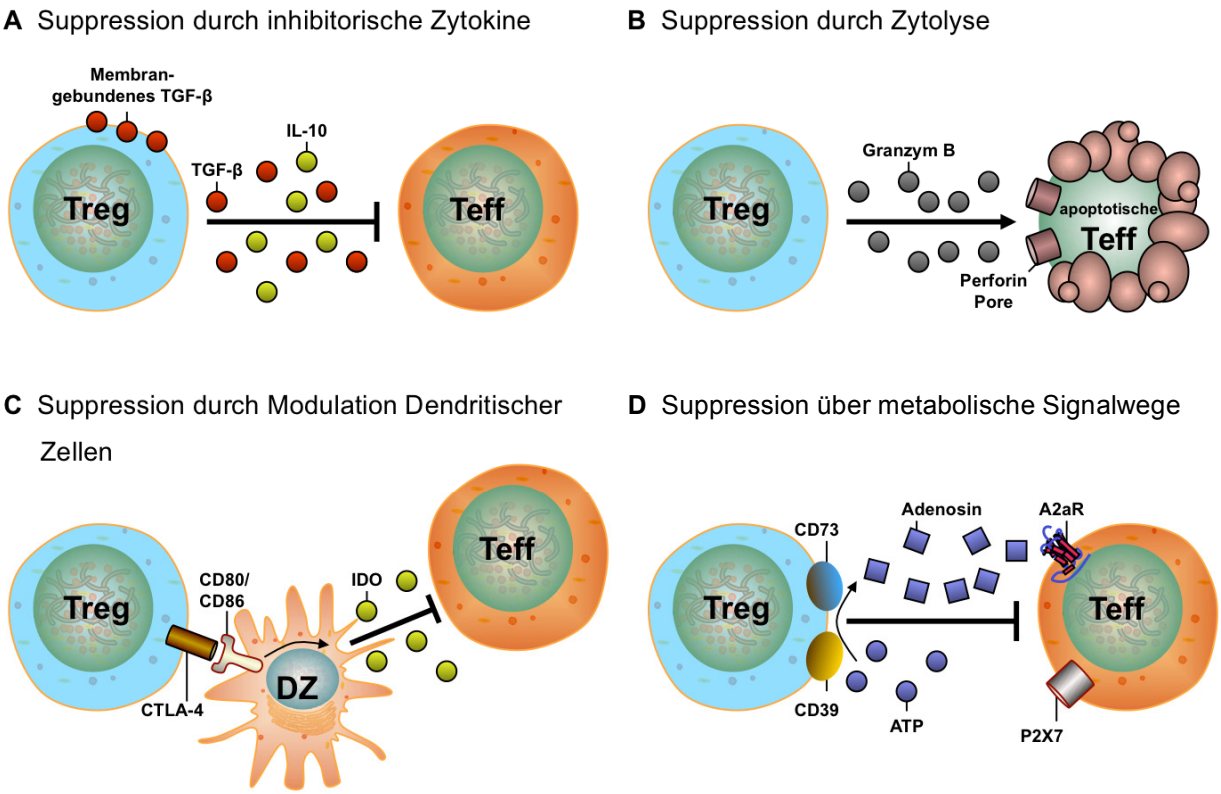

Abbildung 1: Immunmodulatorische Mechanismen regulatorischer T-Zellen (modifiziert nach Vignali et al. 2008)

eine Rolle [47, 48]. Allerdings konnte durch eine Blockierung des TGF-β / TGF-β-Rezeptor Signalweges auch gezeigt werden, dass dieses Zytokin nicht essentiell für die Entwicklung und Funktion natürlich vorkommender Treg ist [49]. Auch wenn die Datenlage über das Zusammenspiel von TGF-β und Treg noch widersprüchlich ist, spricht eine Mehrzahl der neueren Publikationen für eine Rolle dieses Zytokins bei der Immunsuppression durch natürlich vorkommende Treg.

Ebenfalls noch nicht vollständig verstanden ist die Bedeutung des pleyotropen, anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 für die Funktion von Treg. Einige aktuelle Forschungsarbeiten weisen darauf hin, dass von Treg gebildetes IL-10 an der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen beteiligt ist [29, 50, 51]. Die Signaltransduktion erfolgt unter anderem über Tyrosinkinasen des Jak/Stat-Signalweges und die Inhibition von NfκB, eines praktisch ubiquitär vorkommenden Transkriptionsfaktors, dessen Aktivierung als kritisches Signal für die Entstehung von Inflammation gilt [52]. IL-10 kann die Aktivierung und Zytokinproduktion von Mastzellen [53, 54] sowie die Zytokinproduktion und das Überleben von Eosinophilen Granulozyten [55] hemmen. Zudem hat IL-10 multiple suppressive Effekte

auf die Funktion und Reifung Dendritischer Zellen [56], die Expression von MHC-II auf APZ [57] und die Zytokinproduktion von Effektor-T-Zellen [58].

1.3.2.2 Suppression durch Zytolyse

Zytolytische Aktivität ist eine lang bekannte Eigenschaft von natürlichen Killer Zellen und $CD8^+$ zytotoxischen T-Effektorzellen [59]. Noelle und Mitarbeiter konnten erstmals nachweisen, dass Treg offenbar in der Lage sind mit Hilfe von Granzym B Apoptose in Teff zu induzieren [60]. Granzyme sind Serin-Proteasen, die über Perforin-Poren in die Zielzellen gelangen und dort eine Kaskade von Caspasen aktivieren, die zum Zelltod führt. Granzym B defiziente Mäuse zeigten *in vitro* eine reduzierte suppressive Aktivität der Treg [35]. Zwei Jahre später konnte diese Erkenntnis *in vivo* bestätigt werden, indem gezeigt wurde, dass Treg auf diesem Wege NK-Zellen und $CD8^+$ Teff supprimieren und so ein Tumorwachstum begünstigt werden kann [61]. Über denselben Mechanismus können Treg auch die B-Zell Aktivität supprimieren [62].

1.3.2.3 Suppression durch Modulation Dendritischer Zellen

Eine neuere und bislang erst durch wenige Veröffentlichungen untermauerte Theorie folgt der Erkenntnis, dass Treg nicht nur direkt suppressiv auf Teff einwirken, sondern auch indirekt über die Modulation von Reifung und Funktion Dendritischer Zellen (DZ) wirksam sind [63]. Mittels intravitaler Mikroskopie wurde beobachtet, dass Treg über das von ihnen konstitutiv exprimierte Oberflächenmolekül CTLA-4 mit CD80 und CD86 Molekülen Dendritischer Zellen interagieren und so immundämpfende Wirkung erzielen [64, 65]. Diese Interaktion induziert nämlich in den Dendritischen Zellen die Bildung des Botenstoffes Indoleamin 2,3-Dioxygenase (IDO), der wiederum in Teff die Bildung proapoptotisch wirkender Metaboliten aus dem Tryptophan-Stoffwechsel bewirken kann [66, 67]. Treg scheinen darüber hinaus auch in der Lage zu sein, die Expression von CD80 und CD86 auf Dendritischen Zellen herunter zu regulieren und so einen für die T-Zell-Aktivierung wichtigen Kostimulus abzuschwächen [68]. Eine Reihe weiterer Arbeiten stützen ebenfalls die These, dass Treg in der Lage sind, Dendritische Zellen in ihrer Reifung und Funktion zu inhibieren [69-71].

1.3.2.4 Suppression über metabolische Signalwege

Es wurde kürzlich nachgewiesen, dass Treg zwei sequenzielle Ektoenzyme exprimieren, deren Zusammenspiel einen weiteren immunsupprimierenden Mechanismus darstellt [72]. Die ekto-ATP-Diphosphorylase CD39 baut extrazelluläres ATP und ADP zu AMP ab [73]. Fortgesetzt wird dieser Nukleotid-Abbau durch die ekto-5'-Nukleotidase CD73, die AMP zu

Adenosin dephosphoryliert [74]. Deaglio et al. postuliert sogar, dass diese beiden Enzyme spezifische Markerenzyme für FoxP3$^+$ Treg darstellen, da unter den T-Lymphozyten nur Treg sowohl CD39 als auch CD73 koexprimieren und beide zusammen in höherem Maße mit dem Vorhandensein von FoxP3 korrelieren als CD25 [75].

Nukleotide werden an Orten der Inflammation in großen Mengen durch Zelllyse in den Extrazellulärraum abgegeben. Zudem werden sie auf nicht-lytischem Wege von Plättchen [76], Erythrozyten [77], Neutrophilen Granulozyten [78], Monozyten bzw. Makrophagen [79] und T-Zellen [80] freigesetzt. Über die Familie der purinergen P2-Rezeptoren agiert ATP primär als proinflammatorisches Signal für Immunzellen [80-82]. Dem auf T-Zellen exprimierten ligandengesteuerten Kationenkanal P2X7 kommt hierbei eine wichtige Rolle als TZR-verstärkendes Signal zu. Die Bindung von ATP bewirkt einen Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} Spiegels [83, 84] und führt über den FAK- und p38 MAPK-Signalweg sowie einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT zu einer verstärkten Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-2, welches T-Zellen aktiviert und zur Proliferation anregt [85, 86].

Adenosin hingegen moduliert die Zielzellen auf parakrinem Wege über metabotrope G(uanin-Nukleotid-bindendes)-Protein-gekoppelte P1-Rezeptoren [87]. Ein auf T-Lymphozyten hoch exprimierter Subtyp ist der $A_{2a}R$, ein G_S-Protein-gekoppelter Adenosinrezeptor, dessen Signal die Aktivierung, Proliferation und Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IFN-γ, TNF-α und IL-2 inhibiert [88-91]. Es konnte gezeigt werden, dass von Treg mittels CD73 generiertes Adenosin direkt über den $A_{2a}R$ die Teff-Immunantwort supprimieren kann [72, 75, 92]. Über die ekto-Nukleotid/Nukleosid Kaskade CD39/CD73 sind Treg also in der Lage, durch die Metabolisierung von ATP zu Adenosin einen primär proinflammatorischen Signalweg zu unterbrechen und die Immunantwort durch Teff zu supprimieren.

1.4 Botenstoffe, Rezeptoren, Enzyme und Transporter des Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Signalweges

Das Nukleosid Adenosin besteht aus der Purinbase Adenin, die über eine N-glykosidische Bindung an den Zucker D-Ribose gebunden ist (Abbildung 2). Wird der Zucker an der Hydroxylgruppe des C-Atom 5 mit Phosphat verestert, entstehen die Nukleotide AMP (Adenosinmonophosphat), ADP (Adenosindiphosphat) und ATP (Adenosintriphosphat). Durch Hydrolyse der primären Aminogruppe wird Adenosin in Inosin überführt.

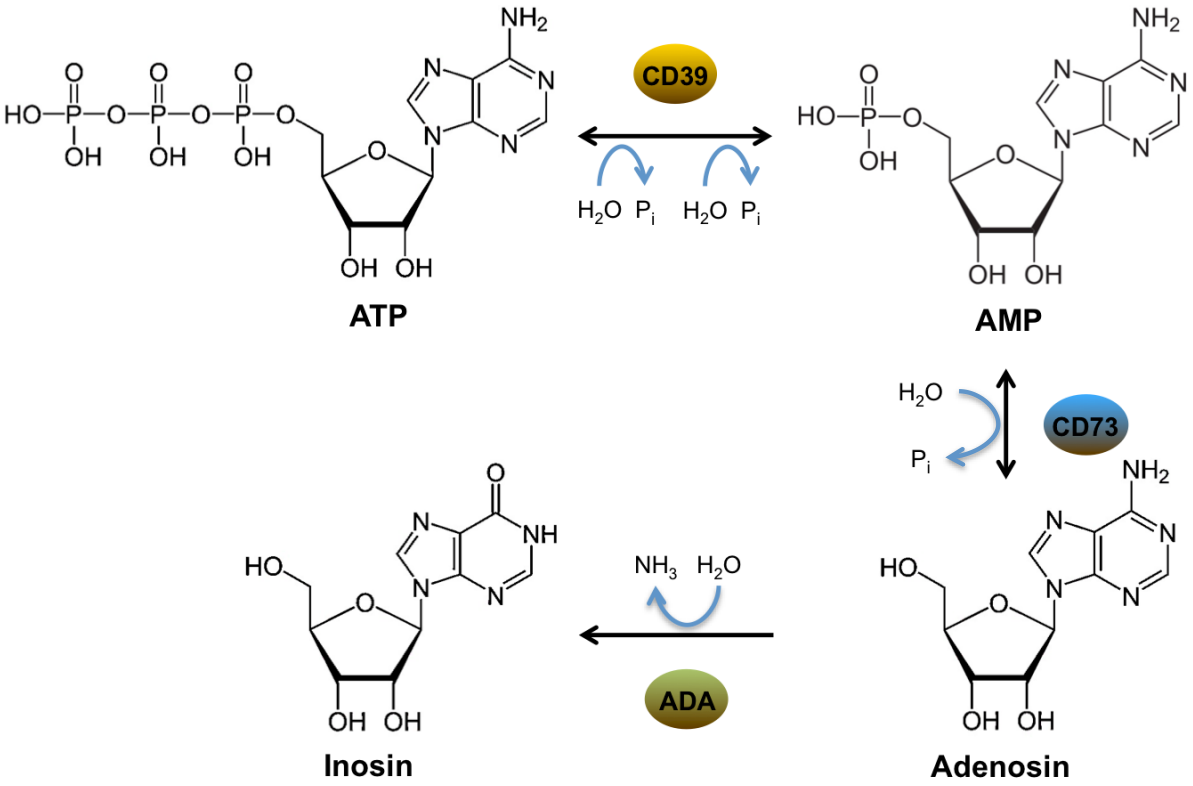

Abbildung 2: Extrazellulärer Abbauweg von ATP zu Inosin

Der Adenin-Nukleotid/Nukleosid Signal- und Stoffwechselweg ist auf Grund der Vielzahl der beteiligten Enzyme, Rezeptoren und Transporter sehr komplex. Wenig ist bislang bekannt über das Zusammenspiel dieser Proteine in und auf regulatorischen T-Zellen. Im Folgenden soll ein Überblick über die untersuchten Proteine gegeben werden (Abbildung 3).

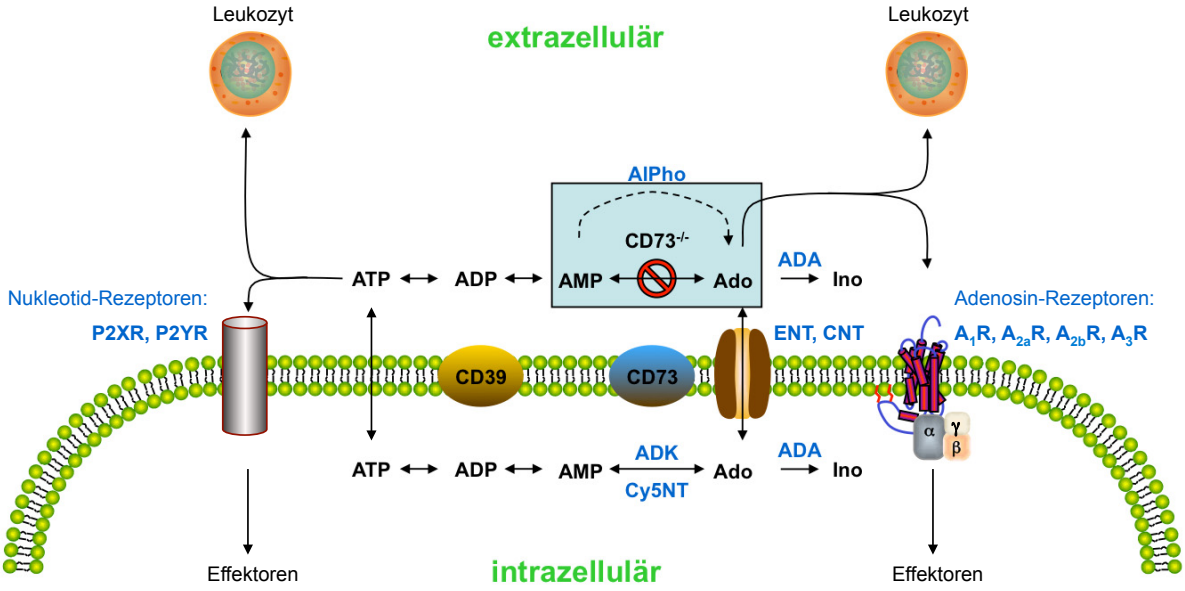

Abbildung 3: Der ekto-Adenin-Nukleotid/Nukleosid Signalweg.

1.4.1 Purin-Nukleotid-Rezeptoren (P2-Rezeptoren)

Intrazelluläres ATP wird hauptsächlich für energieverbrauchende Prozesse, wie den aktiven Transport über Zellmembranen, Zell-Motilität und die Biosynthese verwendet. Extrazelluläres ATP hingegen gilt als potenter Signalgeber. Über purinerge P2-Rezeptoren vermittelt ATP als Botenstoff Signale an die Zelle. Man unterscheidet hierbei zwei Rezeptortypen: bei der Familie der P2X-Rezeptoren handelt es sich um Liganden-aktivierte Ionenkanäle, wohingegen P2Y-Rezeptoren metabotrope, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind [81]. Auf die Teff-stimulierende Wirkung des P2X7-Rezeptors ist bereits in Kapitel 1.3.2 eingegangen worden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die P2X7 vermittelte Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration zu einer Öffnung von Pannexin-Hemikanälen führt und so einen ATP-Efflux aus $CD4^+$ T-Zellen bewirkt [80]. Die parazellular gemessenen Konzentrationen lagen im Bereich von > 60 µM und könnten auf autokrinem Weg wiederum P2X7-Rezeptoren aktivieren und so einen positiven *feedback*-Mechanismus für die T-Zelle darstellen [84]. Höhere ATP-Konzentrationen (> 100 µM) können allerdings über eine P2X7-Aktivierung für die Zelle auch fatale Konsequenzen haben und über eine Ausbildung von Zellmembran-Poren das Absterben der T-Zelle einleiten [93]. $CD4^+CD25^+$ Treg zeigten sich hierbei sensibler gegenüber dem kritischen ATP-Level als $CD4^+CD25^-$ T-Zellen. Diese erhöhte Sensibilität der Treg korrelierte mit einer erhöhten P2X7-Rezeptor-Expression im Vergleich zu Teff.

1.4.2 Adenosin-Rezeptoren (P1-Rezeptoren) und ihre Signalwege

Adenosin als antiinflammatorischer Botenstoff regulatorischer T-Zellen ist anhand der A_{2a}-Rezeptorwirkung in Kapitel 1.3.2 bereits angesprochen worden. Insgesamt sind vier verschiedene Adenosin-Rezeptoren bekannt. Es handelt sich um metabotrope, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die sich untereinander in ihrer Signaltransduktion, bedingt durch unterschiedliche α-Untereinheiten eines heterotrimeren G-Proteins (α-, β- und γ-Untereinheit), unterscheiden (Tabelle 3) [87]. Der A_1-Rezeptor (A_1R) ist mit einem inhibitorischen G-Protein (G_I) assoziiert, welches durch eine Hemmung der Adenylat-Zyklase die Bildung des intrazellulären *second messengers* cAMP vermindert [94]. Darüber hinaus ist der A_1R auch ein Aktivator der Phospholipase C und erhöht über diesen Signalweg die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration [95]. Dass dies eine Zellaktivierung bewirken kann, und somit zusätzlich ein proinflammatorisches Potential birgt, wird später in Kapitel 3.2.9 erläutert. Außerdem kann der A_1R die Öffnungswahrscheinlichkeit verschiedener K^+ Kanäle erhöhen [94]. Die unter anderem am Herzen und in Neuronen exprimierten spannungsabhängigen Ca^{2+} Kanäle (*voltage-depending calcium channels*, VDCC) werden durch diesen Rezeptor inhibiert [96]. Der A_{2a}-Rezeptor hingegen besitzt ein stimulierendes G-Protein (G_S), welches die Adenylatzyklase aktiviert und die cAMP-Konzentration erhöht. In verschiedenen Publikationen konnte gezeigt werden, dass der A_1R und $A_{2a}R$ in ihrer Wirkung als direkte Gegenspieler auf einer Vielzahl von Immunzellen agieren. So inhibiert die Aktivierung des $A_{2a}R$ auf Makrophagen ihre Fusion zu mehrkernigen Riesenzellen, wohingegen der A_1R diese fördert [97]. Auf NK-Zellen steigert letztgenannter die lytische Aktivität, der $A_{2a}R$ dagegen setzt sie herab [98]. Die Rolle neutrophiler Granulozyten bei entzündlichen Gefäßprozessen wird ebenfalls durch beide Rezeptortypen moduliert. Der A_1R fördert nämlich ihre Endothel-Adhäsion, der $A_{2a}R$ inhibiert sie wiederum [99]. Zudem schwächt die Aktivierung des letzteren die Degranulation und den *oxidative burst* der neutrophilen Granulozyten ab [100, 101]. In murinen T- und B-Zellen hingegen konnte kaum bis gar keine mRNA Expression des A_1R nachgewiesen werden, der $A_{2a}R$ wird aber insbesondere auf T-Zellen von allen Adenosin-Rezeptoren am stärksten exprimiert [102]. Auch auf regulatorischen T-Zellen wurde er nachgewiesen. Interessanterweise führt seine Aktivierung zu einer Hochregulation der FoxP3-Expression in Treg [92]. Die Bedeutung des $A_{2a}R$ für die Funktion von Treg konnte an einem Mausmodell gezeigt werden, an dem der Transfer $A_{2a}R^{-/-}$ Treg den Krankheitsverlauf einer Kolitis im Gegensatz zu WT Treg nicht abmildern konnte [103]. Neben der inhibitorischen Wirkung auf Effektor-T-Lymphozyten werden durch den $A_{2a}R$ auch B-Lymphozyten über eine Herunterregulation des NFκB-Signalweges in ihrer Aktivität supprimiert [104].

Tabelle 3: Adenosinrezeptoren und ihre intrazellulären Effekte

Rezeptor	G-Protein	*second messenger* Effekt
A_1	G_I	cAMP ↓ / Ca^{2+} ↑ / K^+ ↑ / VDCC ↓
A_{2a}	G_S	cAMP ↑
A_{2b}	G_S / G_q	cAMP ↑ / Ca^{2+} ↑
A_3	G_I / G_q	cAMP ↓ / Ca^{2+} ↑

Der $A_{2b}R$ ist mit einem G_S-Protein assoziiert, welches diesen Rezeptor ebenfalls zu einem Träger der antiinflammatorischen Adenosinwirkung macht [105]. Daneben kann aber über ein G_q-Protein die Aktivität der Phospholipase C, und somit die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration, gesteigert werden. Durch eine vermehrte Zellaktivierung verleiht dies dem $A_{2b}R$ somit auch ein gewisses proinflammatorisches Potential. Der $A_{2b}R$ unterscheidet sich durch seine niedrige Affinität zu Adenosin (EC_{50} = 24 µM) von den übrigen Adenosin-Rezeptoren (EC_{50} zwischen 0,01 und 1 µM) [106]. Da die physiologischen Adenosin-Konzentrationen unter 1 µM liegen, ist anzunehmen, dass die Adenosin-Signalgebung hier vorwiegend über den A_1R, $A_{2a}R$ und A_3R erfolgt und der $A_{2b}R$ erst unter pathologischen Bedingungen eine Rolle spielt [107].

Als letzter Vertreter der Adenosin-Rezeptoren wurde der A_3R entdeckt. Seine Aktivierung wird allgemein als proinflammatorisches Signal gewertet, da er sowohl mit einem G_I als auch mit einem G_q-Protein assoziiert vorkommen kann. Auf neutrophilen Granulozyten fördert der A_3R die Migration in inflammatorisches Gewebe und die Degranulation [82, 100]. Mastzellen werden durch Adenosin über den A_3R zur Histamin-Ausschüttung angeregt [108, 109]. Allerdings zeigt eine Reihe neuerer Studien an Mäusen mit autoimmuner Arthritis, dass der A_3R-Aktivierung auch ein suppressiver Effekt über die Herunterregulation proinflammatorischer Zytokine zukommen kann [110-112].

Durch die vielfältigen, teils gegensätzlichen Rezeptorwirkungen wird klar, dass Adenosin zwar ein entscheidender Mediator immunsuppressiver Prozesse ist, aber nicht pauschal als antiinflammatorischer Botenstoff bezeichnet werden kann. Vielmehr kommt es auf den Typ und die Expressionsstärke der Rezeptoren an, ob Adenosin einen pro- oder antiinflammatorischen Effekt auf die Zielzelle hat. Darüber hinaus kann ein und derselbe Rezeptortyp auf unterschiedlichen Immunzellen sowohl supprimierend als auch stimulierend auf diese wirken.

1.4.3 Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase CD39

Die Familie der Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen (NTPDasen) baut ATP zu ADP und AMP ab. Derzeit sind acht Subtypen bekannt, von denen vier auf der Zelloberfläche exprimiert werden und deren katalytisches Zentrum extrazellulär gelegen ist [113]. Der

Prototyp dieser auch als Apyrasen bezeichneten Enzyme ist die zunächst als *lymphoid cell activation antigen* identifizierte ekto-NTPDase 1 / CD39 [114]. CD39 hat, im Gegensatz zu den anderen ekto-NTPDasen, ähnliche Affinitäten für ATP und ADP und hydrolysiert beide Nukleotide gleichermaßen zu AMP [113]. Das Enzym findet sich auf allen FoxP3$^+$ Treg, da in diesen Zellen der Transkriptionsfaktor FoxP3 die Expression von CD39 induziert [115]. Diese Erkenntnis stützt die These von Deaglio und Mitarbeitern, dass CD39 zusammen mit CD73 als neue Markerenzyme für Treg angesehen werden können.

1.4.4 Ekto-5'-Nukleotidase CD73

Durch Hydrolyse zu Adenosin vervollständigt die Ekto-5'-Nukleotidase (Ekto-5'-NT / CD73) die Nukleotid-abbauende Ektokaskade. CD73 besteht aus zwei Glykoprotein-Untereinheiten, die nicht-kovalent aneinander gebunden sind [116]. An der N-terminalen Domäne werden Zink und andere zweiwertige Metallionen gebunden, weswegen das Enzym zu der Gruppe der Metallophosphoesterasen gezählt wird. Am C-terminalen Ende ist CD73 mit einem Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol(GPI)-Anker in der Zellmembran verankert [74, 117]. Auf die Bedeutung von CD73 bei der durch CD4$^+$CD25$^+$FoxP3$^+$ Treg-vermittelten Suppression von Effektor-T-Zellen ist bereits in Kapitel 1.3.2 eingegangen worden. Da der A_{2a}R auch auf anderen Immunzellen exprimiert wird und durch seine Aktivierung diese Zellen in ihrer Immunantwort gedämpft werden [87], ist anzunehmen, dass die immunsuppressive Wirkung von Treg durch extrazellulär generiertes Adenosin nicht nur auf Teff beschränkt bleibt.

1.4.5 Alkalische Phosphatase

Das Ektoenzym alkalische Phosphatase (AlPho) katalysiert die Hydrolyse und Transphosphorylierung einer breiten Gruppe von Phosphatverbindungen, zu denen die Adenin-Nukleotide ATP, ADP und AMP aber auch Moleküle wie Pyrophosphat, Glukosephosphat, Pyrodoxalphosphat und anorganische Phosphatverbindungen (PP_i) gehören. Der optimale pH-Wert für die katalytische Reaktion liegt zwischen 8 und 11 [118, 119]. In der Maus sind drei Isoformen bekannt, die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden. Die gewebeunspezifische (*tissue nonspecific*) AlPho ist am weitesten verbreitet und findet sich unter anderem im Knochen, der Leber und den Nieren. Eine Koexpression mit CD73 konnte auf dem Lungenepithel nachgewiesen werden. Beide Enzyme sind an der Hydrolyse von AMP zu Adenosin beteiligt [120].

1.4.6 Adenosin Desaminase

Die Adenosin Desaminase (ADA) konnte neben einer zytosolischen Variante auch als Ektoenzym auf T-Lymphozyten nachgewiesen werden [121, 122]. Das Enzym ist in der Lage die antiinflammatorische Adenosin-Wirkung abzuschwächen, indem es Adenosin in Inosin

überführt und somit als extrazellulären Signalgeber entfernt. Tatsächlich wurde experimentell gezeigt, dass ADA-exprimierende T-Zellen in Anwesenheit von extrazellulärem Adenosin eine geringere P1-Rezeptoraktivierung aufweisen [123]. Ein Defekt im Gen der zytosolischen ADA führt beim Menschen zu einem schweren kombinierten Immundefekt (SCID), da in Lymphozyten das Substrat 2'-Desoxiadenosin nicht mehr zum entsprechenden Inosinnukleotid abgebaut werden kann und akkumuliert. Als potenter allosterischer Inhibitor der Ribonukleotid-Reduktase hemmt es die DNA-Synthese und damit die Proliferation der T-Zellen [121, 124].

1.4.7 Zytosolische 5'-Nukleotidase, Adenosin-Kinase

Am zytosolischen Gleichgewicht zwischen Nukleotiden und Nukleosiden sind unterschiedliche Enzyme beteiligt. Die zytosolische 5'-Nukleotidase (Cyt5NT) katalysiert, wie ihr ektopes Schwesterenzym CD73, die Hydrolyse von Nukleosid-Monophosphaten zu Nukleosiden. Derzeit sind 5 verschiedene Isotypen mit unterschiedlichen, sich teils überlappenden Substratpräferenzen bekannt. Die höchste Affinität zu Purinen, insbesondere zu AMP, zeigt die Cyt5NT-1A [125]. Ihr entgegen arbeitet die Adenosin Kinase (AK), die Adenosin wieder zu AMP phosphoryliert. Dieses Phänomen wird als *salvage pathway* bezeichnet, da anfallendes Adenosin von der Zelle reutilisiert werden kann und nicht dem Abbau durch die ADA unterliegt. Unter physiologischen Bedingungen überwiegt der *salvage pathway* und gemäß dem Konzentrationsgefälle ist der transmembranöse Adenosin-Gradient nach intrazellulär gerichtet [126]. Es konnte gezeigt werden, dass unter Hypoxie, einem starken proinflammatorischen Stimulus, die Adenosin-Bildung in Geweben wie dem Myokard oder dem Gefäßendothel durch eine Hemmung der AK stark ansteigt und sich dies protektiv auf die Zellen auswirkt [127-129]. Ein intrazellulärer Konzentrationsanstieg vermindert den Gradienten und damit die Adenosin-Aufnahme in die Zelle, was zu einer erhöhten extrazellulären Konzentration und verstärkten zellprotektiven P1-Rezeptor-Wirkung führt. Ähnliche Beobachtungen wurden an verschiedenen Mausmodellen gemacht, indem durch eine Hemmung der Adenosin metabolisierenden Enzyme ADA bzw. AK mittels pharmakologischen Inhibitoren die extrazelluläre Adenosin-Konzentration gesteigert und Entzündungsreaktionen verzögert wurden [130-132].

1.4.8 Nukleosid-Transporter

Die Phospholipid-Doppelschicht eukaryotischer Zellen ist für hydrophile Nukleoside impermeabel. Ein Stofftransport zwischen extra- und intrazellulärem Kompartiment ist nur mit Hilfe transmembraner Transporter-Proteine möglich. Mammalia besitzen zwei strukturell verschiedene Transporter-Familien, die äquilibrativen (ENT) und die konzentrativen (CNT)

Nukleosid-Transporter. Bei letzteren handelt es sich um sekundär aktive Kationen-Symporter, während die bidirektionalen ENT die erleichterte Diffusion über die Zellmembran ermöglichen. Die am besten untersuchten äquilibrativen Transporter sind ENT1 (K_m für Adenosin ≈ 40 µM) und ENT2 (K_m für Adenosin ≈ 140 µM). Beide sind sowohl für Purin- als auch für Pyrimidin-Nukleoside passierbar und zeigen eine breite Gewebeverteilung [133, 134]. Der konzentrative CNT2 (K_m für Adenosin ≈ 8 µM) wird ebenfalls ubiquitär exprimiert und transportiert bevorzugt Purine zusammen mit Na^+ in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 entlang des nach intrazellulär gerichteten Na^+-Gradienten [134, 135]. Aufgrund ihrer Michaelis-Menten-Kinetik wird die ENT-Familie auch als niedrig-affines und die CNT-Familie als hoch-affines Transportsystem bezeichnet.

2 Zielsetzung

Dass einige der eingangs beschriebenen Enzyme, Rezeptoren und Transporter des Adenin-Nukleotid/Nukleosid Signalweges durch Treg exprimiert werden, konnte bereits gezeigt werden. Allen voran die CD39/CD73-Ektokaskade als zentrale Komponente bei der Adenosin gesteuerten Immunsuppression durch Treg. Allerdings ist bisher noch nicht zusammenhängend untersucht worden, ob und in welchem Verhältnis zueinander die Proteine dieses Stoffwechselweges durch Treg gebildet werden. Da Adenosin nicht nur über diese Ektokaskade generiert werden kann, stellt sich die Frage nach der Bedeutung alternativer Metabolisierungswege. Mit einer Quantifizierung der Genexpression wären Rückschlüsse hierauf möglich. Bei der Auswahl der zu untersuchenden Gene wurde versucht diese zu betrachten, die nach heutigem Wissensstand eine Rolle bei der Immunmodulation durch den Adenin-Nukleotid/Nukleosid Signalwege spielen. Es ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. In welchem Verhältnis zueinander werden die an diesem Stoffwechselweg beteiligten Proteine in regulatorischen T-Zellen exprimiert?

2. Gibt es Unterschiede in ruhenden und aktivierten Treg?

Durch die CD73-*knockout* Maus stand ein Modell zur Verfügung, an dem Treg Zellen untersucht werden konnten, denen der letzte Schritt der CD39/CD73 Ektokaskade fehlt. Da die lebende Zelle kein starres System sondern adaptationsfähig ist, wurde überprüft, wie sich das Fehlen von CD73 auswirkt. Folgende Fragestellungen lagen dem weiteren Vorgehen zugrunde:

3. Wie wirkt sich das Fehlen der Ekto-5'-NT/CD73 auf das Expressionsverhalten anderer an diesem Stoffwechselweg beteiligter Enzyme, Rezeptoren und Transportproteine aus?

4. Unterscheidet sich die Zytokinproduktion aktivierter CD73-defizienter Treg von der wildtypischer Treg?

3 Versuchstiere und Methoden

Eine Auflistung der verwendeten Materialien und Lösungen sind im Abschnitt 9 zu finden.

3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Alle Experimente wurden mit männlichen Mäusen des Stammes C57 BL/6 in einem Alter von 8 bis 12 Wochen durchgeführt. Es handelte sich um transgene Tiere mit einem ubiquitären *knockout* des CD73 Gens, die in Düsseldorf am Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie durch eine Deletion des Exon 2 generiert wurden [136]. Die als Kontrolltiere eingesetzten Wildtypen entstammten der gleichen Zuchtlinie. Gezüchtet wurden die Tiere in der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Standardbedingungen (12-Stunden Licht-/Dunkelzyklus, konstante Raumtemperatur von 21±1 °C, relative Luftfeuchtigkeit von 45±5%, standardisiertes Pelletfutter und Wasser ad libitum) in Käfigen mit maximal 3 Tieren. (Organentnahmenummer: O19/99, gültig seit 1999, Düsseldorf).

3.2 Methoden

3.2.1 Splenozytenisolierung

Die regulatorischen T-Zellen wurden aus murinem Milzgewebe gewonnen. Die Milz gehört zu den sekundär lymphatischen Organen, in denen der Antigenkontakt und die klonale Vermehrung der Lymphozyten stattfindet. Etwa 25% der im Organismus vorkommenden T-Lymphozyten werden in der Milz gespeichert.

Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet. Nach der Eröffnung der Abdominalhöhle wurde die Milz mit Hilfe einer chirurgischen Schere und einer Pinzette zügig entnommen und sofort in ein 15 ml Falcon Röhrchen mit kaltem MACS-Puffer überführt. Alle verwendeten Medien wurden auf Eis gekühlt. Mit einem Skalpell wurde die Milz anschließend von Fettgewebe befreit und in kleine Stücke zerteilt. Mit dem Kolben einer 10 ml Spritze wurden die Milzstücke durch ein 70 µm Zellsieb (BD Bioscience) gedrückt. Es wurde darauf geachtet horizontale Scherkräfte zu vermeiden und damit die Zellintegrität zu bewahren. Die so erhaltene Suspension wurde in ein neues 15 ml Falcon Röhrchen überführt. Zur Abtrennung von Zellfragmenten und verbliebenem Fettgewebe wurde dieses in einer auf 4 °C temperierten Zentrifuge (Universal 320R, Hettich Lab Technology) bei 300 x *g* für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert. Nicht resuspendierbare Klumpen toter Zellen wurden mit einer Pipette entnommen und verworfen. Anschließend wurde das Falcon Röhrchen auf 15 ml mit MACS-Puffer aufgefüllt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt

unter oben angegebenen Bedingungen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml MACS-Puffer resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und eines Lichtmikroskops wurde die Gesamtzellzahl bestimmt.

3.2.2 $CD4^+CD25^+$ T-Zell Isolierung

Für die $CD4^+CD25^+$ T-Zell Isolierung wurde das Prinzip der magnetischen Zellsortierung (magnetic cell sorting, MACS) verwendet. Mit Hilfe von superparamagnetischen Partikeln (MicroBeads), die sich an zellspezifisch gebundene Antikörper heften, wurde eine Zellsortierung im magnetischen Feld vorgenommen. Zur Isolierung der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen wurde gemäß dem Herstellerprotokoll der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) unter Verwendung des $CD4^+CD25^+$ Regulatory T-Cell Isolation Kits gearbeitet. Das magnetische Feld wurde mit Hilfe des QuadroMACS™ Separators (siehe Abbildung 4) sowie des MiniMACS™ Separators erzeugt.

Abbildung 4: QuadroMACS™ Separation Unit befestigt am MACS® MultiStand mit LS Columns; mit freundlicher Genehmigung von Miltenyi Biotec

Die eingesetzten Mengen der Reagenzien wurden entsprechend des Protokolls an die jeweilige Zellzahl der isolierten Splenozyten angepasst. Das Protokoll sah wie folgt aus:

Magnetische Markierung der $CD4^-$ Zellen und Fluoreszenz-Markierung der $CD25^+$ Zellen

Zunächst wurde eine negative Selektion der $CD4^+$ Zellpopulation vorgenommen. Hierzu wurden mittels eines speziellen Biotin-Antikörper Cocktails die $CD4^-$ Zellen über ihre spezifischen Epitope markiert (für Details siehe Herstellerprotokoll). Diese so vormarkierten Zellen konnten durch Anti-Biotin MicroBeads auf Säulen im magnetischen Feld zurückgehalten werden. Der Durchfluss enthielt nun nur noch $CD4^+$ Zellen, die aufgefangen und unter den in Kapitel 3.2.1 angegebenen Bedingungen zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 40 µl MACS-Puffer pro 10^7 Zellen

resuspendiert. Es wurden 10 µl Biotin-Antikörper Cocktail pro 10^7 Zellen hinzugefügt und die Suspension für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 30 µl MACS-Puffer, 20 µl Anti-Biotin MicroBeads und 10 µl CD25-PE Antikörper pro 10^7 Zellen hinzugefügt und gemischt. Es folgte eine weitere Inkubation für 15 Minuten bei 4 °C. Durch das Hinzufügen von 1-2 ml MACS-Puffer pro 10^7 Zellen und anschließender Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen wurden die Zellen gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl MACS-Puffer pro 1,25 x 10^8 Zellen resuspendiert.

Magnetische Separation: Entfernung der $CD4^-$ Zellen

Der QuadroMACS Separator wurde am MACS MultiStand befestigt und eine Trennsäule (LD Column) in die Halterung eingebracht (siehe Abbildung 4). Die Säule wurde mit 2 ml MACS-Puffer vorgespült. Danach wurde die Zellsuspension auf die Säule aufgebracht und der Durchfluss in einem 15 ml Falcon Röhrchen aufgefangen. Es wurde zweimal mit je 1 ml Puffer nachgespült, um auf der Säule verbliebene $CD4^+$ Zellen aufzufangen.

Magnetische Markierung der $CD25^+$ Zellen

Als zweiter Schritt der Aufreinigung von $CD4^+CD25^+$ Lymphozyten erfolgte nun eine positive Selektion der $CD25^+$ Zellen. Die im Folgenden angegebenen Reagenzienmengen gelten für eine initial eingesetzte Menge von 10^7 Zellen. Bei höheren Zellzahlen wurde auch hier eine entsprechend größere Menge eingesetzt. Die Suspension der isolierten $CD4^+$ Zellen wurde wie oben angegeben zentrifugiert und das Zellpellet in 90 µl MACS-Puffer resuspendiert. Der Suspension wurden 10 µl anti-PE MicroBeads zugesetzt, alles wurde sorgfältig gemischt und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 1-2 ml MACS-Puffer hinzugefügt, 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 500 µl Puffer resuspendiert.

Magnetische Separation: Positive Selektion der $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen

Der MiniMACS Separator wurde am MACS MultiStand befestigt und eine Trennsäule (MS Column) in die Halterung eingebracht. Die Säule wurde mit 500 µl Puffer vorgespült. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule aufgebracht. Nachdem die $CD4^+CD25^+$ Zellen an das Säulenmaterial gebunden hatten, wurde dreimal mit je 500 µl Puffer gewaschen. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Inzwischen wurde eine weitere Trennsäule auf dieselbe Art vorbereitet. Die erste Säule wurde zur Elution aus der Halterung entnommen und in die zweite, im MiniMACS Separator befindliche Säule eingesetzt. Es wurde 1 ml Puffer auf die erste Säule pipettiert und sofort mit dem zugehörigen Kolben durch die Säule gedrückt. Dabei wurde das Eluat der ersten Säule direkt auf die zweite Säule

gegeben. Nachdem die Zellsuspension durchgelaufen war, wurde wiederum dreimal mit je 500 µl Puffer gespült. Der Durchfluss wurde auch hier verworfen. Zum Eluieren der Zellen wurde die zweite Trennsäule aus dem Separator entnommen und in ein aufrecht stehendes 15 ml Falcon Röhrchen gestellt. Es wurde 1 ml MACS Puffer auf die Säule gegeben und mit dem Kolben durch die Säule in das Falcon Röhrchen gedrückt. Die Zellsuspension wurde auf Eis gestellt. Es wurde eine 1:1-Verdünnung mit Trypanblau hergestellt. Hierbei werden tote Zellen blau angefärbt, während die intakte Membran lebender Zellen eine Farbstoffanreicherung verhindert. Mittels einer Neubauer-Zählkammer wurde die Lebendzellzahl bestimmt. Aus einer murinen Milz konnten ca. 6 x 10^5 lebende $CD4^+CD25^+$ Zellen isoliert werden.

3.2.3 $CD4^+$ T-Zell Isolierung

Ausgehend von einer Splenozytensuspension (siehe Kapitel 3.2.1) wurden die $CD4^+$ Zellen mit Hilfe des $CD4^+CD25^+$ Regulatory T-Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) nach Anleitung des Herstellers isoliert. Allerdings wurde hier lediglich die negative Selektion der $CD4^+$ Zellen durchgeführt (entsprechend den ersten zwei Arbeitsschritten aus Kapitel 3.2.2). Auf die Markierung mit dem im Kit enthaltenen Ratte-anti-Maus-CD25-PE Antikörper wurde demnach verzichtet.

3.2.4 RNA Isolierung

Zur Isolation von messenger RNA aus regulatorischen T-Zellen wurde der RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Es wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet. Die Reinheit des RNA-Gehaltes wurde mit Hilfe des Spektralphotometers ND-1000 der Firma NanoDrop (Wilmington, USA) bestimmt.

3.2.5 Reverse Transkription

Um eine quantitative Analyse der Zielgenaktivität mit einer rt-Polymerasekettenreaktion (*Realtime PCR*) durchzuführen, musste die isolierte mRNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Dazu wurde der qRT-PCR Kit (Invitrogen) verwendet. Um eine vorzeitige Aktivität der Enzyme zu vermeiden, wurde stets auf Eis gearbeitet. Pro Tier wurden je vier 20 µl-Ansätze hergestellt. Durchschnittlich wurden je Ansatz ca. 40 ng RNA eingesetzt, die Menge variierte jedoch je nach RNA Ausbeute. Allerdings wurde bei direkt miteinander zu vergleichenden Tieren innerhalb eines Experiments jeweils dieselbe RNA-Menge eingesetzt. Die Vergleichbarkeit mit nachfolgenden Experimenten wurde über die errechneten relativen Unterschiede zwischen diesen Tieren gewährleistet. Es wurde nach folgendem Schema gearbeitet:

10	µl	2x RT Reaction Mix
2	µl	RT Enzyme Mix
X	µl	RNA
ad 20	µl	DEPC-treated water

Die Reaktion wurde in einem Thermocycler (Mastercycler) der Firma Eppendorf mit folgendem Programm durchgeführt:

25 °C	10 Minuten
42 °C	50 Minuten
85 °C	5 Minuten
4 °C	Pause

Um die enthaltene RNA zu eliminieren, wurde 1 µl E.coli RNase H zugegeben und wie folgt fortgefahren:

37 °C	20 Minuten
4 °C	Pause

Um Schwankungen innerhalb des Versuchsablaufes zu minimieren, wurden die 4 Ansätze pro Tier gepoolt und umgehend auf Eis gelagert.

3.2.6 Real-Time Polymerasekettenreaktion (rt-PCR)

Die Real-Time-PCR erfolgte nach Livak [137] mit der $\Delta\Delta C_T$ Methode in einem StepOnePlus-Gerät (Applied Biosystems). Verwendet wurde das Superscript III Platinum Two-Step qRT-PCR Kit mit SYBR Green (Invitrogen). Als Matrize wurde die unter Punkt 3.2.5 revers transkribierte cDNA genutzt. Die Primer wurden allesamt bei der Firma Eurofins MWG Operon bestellt und in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt. Als interner Standard diente das *housekeeping*-Gen β-Aktin. Um eine vorzeitige Enzymaktivität zu vermeiden, wurde auf Eis gearbeitet. Die Reaktionsansätze wurden wie folgt zusammengestellt:

10	µl	Supermix
7,2	µl	H_2O
0,4	µl	forward primer
0,4	µl	reverse primer
2	µl	cDNA

Die DNA-Amplifikation erfolgte nach folgendem Schema:

95°C	10 Minuten	
95°C	15 Sekunden	} 40 Zyklen
60°C	1 Minute	
95°C	15 Sekunden	

60°C
95°C } Schmelzkurve
4°C Pause

Die Auswertung erfolgte mit der dem Gerät zugehörigen StepOne™ Software v2.1.

3.2.7 Agarose Gelelektrophorese

Um eine zusätzliche Qualitätskontrolle der unter Punkt 3.2.6 erstellten Amplifikate zu erhalten, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Maniatis [138] in einer DNA Sub Cell™ Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories GmbH). Die Trennung von DNA-Fragmenten wurde in 2%-igen Agarose-Gelen unter Zusatz von 0,2 µg/ml Ethidiumbromid bei 12 V/cm durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Als Standard diente eine 50 bp DNA Leiter (Invitrogen). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Gel Doc Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

3.2.8 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Methode der Durchflusszytometrie (*fluorescent-activated cell sorting*, FACS) ermöglicht die Detektion einzelner Zellen innerhalb einer Suspension. An zellspezifische Epitope binden Antikörper (Primärantikörper), die wiederum von mit Fluorochromen gekoppelten Antikörpern (Sekundärantikörper) gebunden werden (Zellfärbung). Diese fluoreszierenden Farbstoffe absorbieren von Laserstrahlen ausgesandtes Licht in einem bestimmten Wellenlängenbereich (Absorptionsspektrum). Die Elektronen der Fluorochrome werden dadurch auf ein höheres Energieniveau angehoben. Beim Rückfall auf das energetische Grundniveau emittieren sie Photonen einer höheren Wellenlänge (Emissionsspektrum). Je nach verwendetem Fluoreszenzfarbstoff ergeben sich spezifische Emissionsspektren, die von einem Photodetektor innerhalb des Zytometers erfasst werden. Es wurden insgesamt drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet: FITC (λEx = 495 nm, λEm = 519), PE (λEx = 480 und 565 nm, λEm = 578) und APC (λEx = 650 nm; λEm = 660). Zudem wurden entsprechende Kontrollfärbungen mit Isotypantikörpern durchgeführt, um ein unspezifisches Binden der verwendeten Primärantikörper auszuschließen.

Färbung: CD4, CD25, CD73, FoxP3

Zunächst sollte eine Aussage über die Qualität der magnetischen Sortierung der Treg getroffen werden. Zudem sollte der Anteil der CD73 exprimierenden Zellen analysiert werden. Die verwendeten Antikörper ermöglichen eine eindeutige Identifizierung von regulatorischen T-Zellen innerhalb einer gemischten Zellpopulation. Es wurde mit 4

verschieden gefärbten Ansätzen mit jeweils 5 x 10^5 Zellen gearbeitet. Die entsprechenden Volumina der Zellsuspensionen wurden auf 4 FACS-Röhrchen aufgeteilt. Die Ansätze 2-4 wurden bereits während der magnetischen Separation mit anti-CD25-PE markiert (siehe Kapitel 3.2.2). Folgende weitere Färbungen wurden hergestellt:

Ansatz 1	Splenozyten (Kapitel 3.2.1)	CD4-FITC / CD25-PE
Ansatz 2	Treg (Kapitel 3.2.2)	CD4-APC / CD73-FITC
Ansatz 3	Treg (Kapitel 3.2.2)	CD4-FITC / FoxP3-APC
Ansatz 4	Treg (Kapitel 3.2.2)	CD73-FITC / FoxP3-APC

Zu Beginn des Färbeprozesses erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur bei 300 x *g* für 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wie folgt weiterbehandelt:

Ansatz 1	+ 90 µl MACS-Puffer	+ 10 µl Ratte-anti-Maus-CD4-FITC
Ansatz 2	+ 80 µl MACS-Puffer	+ 10 µl Ratte-anti-Maus-CD4-APC
	+ 10 µl Ratte-anti-Maus-CD73-FITC	
Ansatz 3	+ 90 µl MACS-Puffer	+ 10 µl Ratte-anti-Maus-CD4-FITC
Ansatz 4	+ 90 µl MACS-Puffer	+ 10 µl Ratte-anti-Maus-CD73-FITC

Die Zellpellets wurden resuspendiert und 10 Minuten bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden je 2 ml MACS-Puffer hinzugefügt, gemischt und 10 Minuten unter oben angegebenen Bedingungen zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Es wurde wie folgt weitergearbeitet:

Ansatz 1	+ 500 µl MACS-Puffer
Ansatz 2	+ 500 µl MACS-Puffer
Ansatz 3	+ 1 ml Fixations/Permeabilisations-Lösung
Ansatz 4	+ 1 ml Fixations/Permeabilisations-Lösung

Die Pellets wurden resuspendiert und die Ansätze 1 und 2 bis zur FACS-Analyse im Dunkeln auf Eis gelagert. Die Ansätze 3 und 4 wurden für 30 Minuten bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde je 1 ml MACS-Puffer hinzugefügt und gut vermischt. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 300 x *g* wurden die Überstände entfernt und es wurde folgendermaßen weitergearbeitet:

Ansatz 3	+ 900 µl MACS-Puffer	+ 100 µl Permeabilisations-Puffer
Ansatz 4	+ 900 µl MACS-Puffer	+ 100 µl Permeabilisations-Puffer

Beide Ansätze wurden 5 Minuten bei 300 x *g* zentrifugiert und die Überstände verworfen.

Ansatz 3	+ 72 µl MACS-Puffer	+ 8 µl Permeabilisations-Puffer
Ansatz 4	+ 72 µl MACS-Puffer	+ 8 µl Permeabilisations-Puffer

Um ein unspezifisches Binden des intrazellulären Antikörpers Maus-anti-FoxP3 an der Zelloberfläche zu verhindern, wurde beiden Ansätzen je 20 µl FcR Blocking Reagent

hinzugefügt, vermischt und für 5 Minuten bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden je 10 µl Maus-anti-FoxP3 Antikörper hinzupipettiert und für weitere 30 Minuten unter den zuvor angegebenen Bedingungen inkubiert. Um die gefärbten Zellen von überschüssigen Antikörpern reinzuwaschen wurde wie folgt weitergearbeitet:

Ansatz 3 + 900 µl MACS-Puffer + 100 µl Permeabilisations-Puffer

Ansatz 4 + 900 µl MACS-Puffer + 100 µl Permeabilisations-Puffer

Beide Ansätze wurden für 5 Minuten bei 300 x *g* zentrifugiert, die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets in jeweils 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Bis zur FACS-Analyse wurden auch die Ansätze 3 und 4 im Dunkeln auf Eis gelagert.

Färbung: CD25, CD39, CD73, P2X7

Die zweite Zellfärbung diente der Analyse der Proteinexpression des Nukleotid-Rezeptors P2X7 sowie der Ektokaskade CD39/CD73 auf magnetisch separierten Treg. Verwendet wurde die in Kapitel 3.2.3 isolierte $CD4^+$ Zellpopulation, jeweils 5 x 10^5 Zellen pro Ansatz. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur mit 300 x *g* für 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und mit dem Zellpellet wie folgt weitergearbeitet:

Ansatz 1 + 13 µl MACS-Puffer + 5 µl Kaninchen-anti-Maus-CD25
+ 2 µl Ratte-anti-Maus-CD73-PE

Ansatz 2 + 5 µl Kaninchen-anti-Maus-CD25
+ 15 µl Ratte-anti-Maus-CD39

Ansatz 3 + 5 µl Kaninchen-anti-Maus-CD25
+ 15 µl Ratte-anti-Maus-P2X7

Die Zellsuspensionen wurden für 15 Minuten bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden je 500 µl MACS-Puffer hinzugefügt, gemischt und 10 Minuten unter oben angegebenen Bedingungen zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Im folgenden Arbeitsschritt wurden die an der Zelloberfläche gebundenen primären Antikörper mit fluoreszierenden Sekundärantikörpern markiert:

Ansätze 1-3 + 16 µl MACS-Puffer
+ 2 µl Ziege-anti-Kaninchen-FITC
+ 2 µl Ziege-anti-Ratte-PE

Die Zellsuspension wurde für 15 Minuten unter oben genannten Bedingungen inkubiert. Danach wurden 500 µl MACS-Puffer hinzugefügt, vermischt und 5 Minuten bei 300 x *g* zentrifugiert. Die Überstände wurden entfernt und die CD4-Komplexe der Treg mit bereits fluoreszensmarkierten Antikörpern markiert:

Ansätze 1-3 + 18 µl MACS-Puffer + 2 µl Ratte-anti-Maus-CD4-APC

Die Ansätze wurden 20 Minuten bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert und anschließend je 500 µl MACS-Puffer hinzugefügt, vermischt und 5 Minuten wie oben angegeben zentrifugiert. Die Überstände wurden entfernt und die Zellpellets in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Bis zur FACS-Analyse wurden die lichtempfindlichen Ansätze in Dunkelheit und auf Eis gelagert.

3.2.9 Antigene Stimulierung von T-Lymphozyten

Um einen T-Lymphozyt vollständig zu aktivieren benötigt er zwei Signale. Das erste besteht aus dem Kontakt zwischen Antigenrezeptor (TZR) und dem Antigen präsentierenden MHC-Molekül. Das zweite Signal, die sogenannte Kostimulation, kann über eine Reihe von Rezeptoren auf der T-Zell Oberfläche vermittelt werden. Es ist notwendig, um Proliferation und Differenzierung zu induzieren, Anergie und Apoptose zu verhindern, Gedächtniszellen auszubilden und Zell-Zell Kooperation zu ermöglichen [139]. Der T-Zell Rezeptor setzt sich aus einer α- und einer β-Kette zusammen und ist mit je zwei heterodimeren CD3-Molekülen, bestehend aus ε- und δ-Kette sowie ε- und γ-Kette, assoziiert (Abbildung 5). Komplettiert wird der T-Zell Rezeptor Komplex durch ein Homodimer aus ζ-Ketten. Die zytosolseitigen Anteile der Signalketten tragen ITAM (*immunoreceptor tyrosin-based activation motifs*) genannte Regionen, welche nach Phosphorylierung Enzymkaskaden in Gang setzen und so das Rezeptorsignal nach intrazellulär weiterleiten. Die Phospholipase Cγ1 ist ein Enzym einer solchen Signalkette und produziert die *second messenger* DAG (Diacylglycerol) und $InoP_3$ (Inositol 1,4,5-Trisphosphat). DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC) und setzt so weitere Signalwege in Gang. $InoP_3$ setzt Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma frei, welches wiederum über den Calcineurin/Calmodulin Weg zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) führt, der für die Transkription verschiedener Zytokine verantwortlich ist [14].

Einer der am längsten bekannten Korezeptoren für den TCR ist das aus zwei Homodimeren aufgebaute Oberflächenmolekül CD28. Liganden sind unter anderem die von Antigen-präsentierenden Zellen exprimierten B7-Moleküle (CD80/CD86). Über eine Kaskade von Kinasen wird der Transkriptionsfaktor NF-κB aktiviert und vermittelt das für die Zellaktivierung verstärkende zweite Signal. Es konnte gezeigt werden, dass CD28 ein entscheidender Signalgeber für Entwicklung und Aufrechterhaltung der Funktion von $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen ist [140]. Mit Hilfe von anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern ist es möglich, *in vitro* diese Signalwege auszulösen und so eine zuvor isolierte Population von T-Lymphozyten in einen immunaktiven Zustand zu versetzen [141].

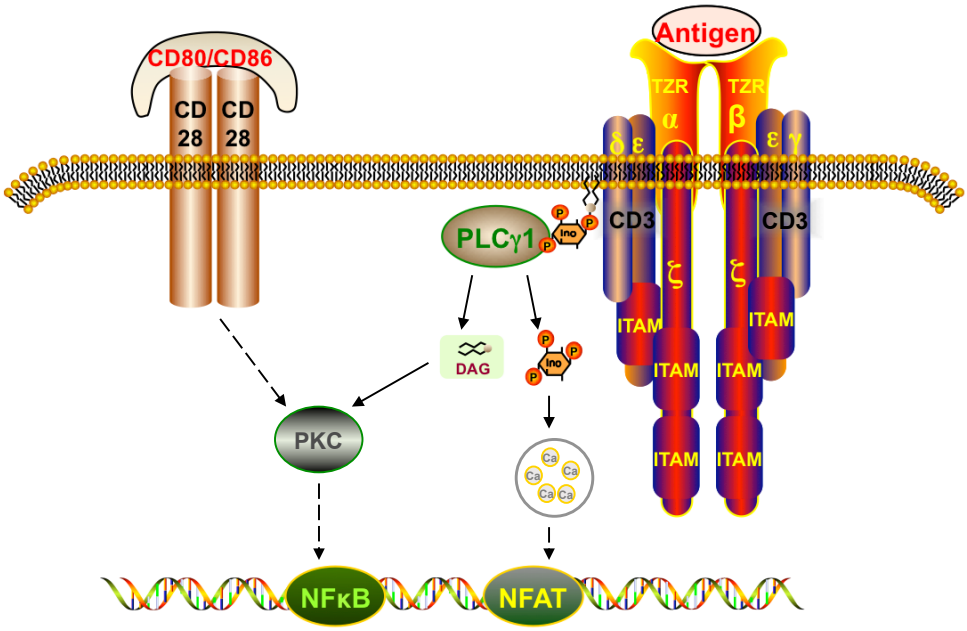

Abbildung 5: Schematische Darstellung des TZR und assoziiertem CD28-Korezeptor mit ihren Signalkaskaden.

Die durch magnetische Separation aufgereinigten Treg (Kapitel 3.2.2) wurden nach diesem Prinzip stimuliert:

Beide Antikörper wurden über die Firma BD Bioscience (Heidelberg) bezogen. Sie wurden in Konzentrationen zu 0,4 µg/ml (Anti-CD3) und 2,5 µg/ml (Anti-CD28) gemeinsam mit PBS Puffer verdünnt. Um die Reaktionsgefäße einer 96-well-Platte zu beschichten, wurden je 100 µl dieser Antikörpersuspension aufgetragen und über Nacht bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Die Suspension isolierter $CD4^+CD25^+$-T-Zellen wurde 10 Minuten bei 300 x *g* und 4 °C zentrifugiert (Universal 320R, Hettich Lab Technology) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Panserin-Nährmedium resuspendiert, wobei eine Zellzahl von 2 x 10^6/ml eingestellt wurde. Die Antikörperlösung wurde vorsichtig von der Platte entfernt und je 200 µl der Zellsuspension in die nun mit Antikörpern beschichteten Reaktionsgefäße pipettiert. Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 18 h bei 37 °C und 5% (v/v) CO_2 inkubiert. Anschließend wurden alle Zellen eines Tieres zusammen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) aufgenommen. Für 10 Minuten wurde bei 300 x *g* und 4°C zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Zytokinanalyse (siehe Kapitel 3.2.10) bei -80 °C eingefroren. Das Zellpellet wurde in MACS-Puffer resuspendiert und zügig entsprechend der Fragestellung weiterverarbeitet.

3.2.10 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Angewendet wurde ein ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) der auf der sogenannten „Sandwich“-Technik (ein Komplex aus Antikörper-Antigen-Antikörper) beruht.

Ein an einer Oberfläche haftender Antikörper bindet ein passendes Antigen, welches wiederum von einem zweiten spezifischen Antikörper gebunden wird. Dieser Sekundärantikörper wird dann mit einem Enzym gekoppelt, welches in Gegenwart eines passenden Chromogens eine Farbreaktion erzeugt. Die optische Dichte dieser Reaktion lässt Rückschlüsse auf die Quantität des nachzuweisenden Antigens zu.
Die zu verwendende ELISA Reaktions-Platte (96-*well*, R&D Systems) wurde über Nacht mit einem dem nachzuweisenden Antigen spezifischen Capture-Antikörper beschichtet. Am nächsten Morgen wurde die Platte für 1 Stunde mit Blockpuffer (1% BSA in PBS-Puffer) geblockt, um eine unspezifische Bindung des Antigens an die Oberfläche der Platte zu verhindern. Anschließend wurden die eingefrorenen Überstände der stimulierten T-Zellen (siehe Kapitel 3.2.9) aufgetragen. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe des biotinylierten Detektions-Antikörpers (dem Antigen spezifischen Zweitantikörper). Nach weiteren zwei Stunden wurden die Reaktionsgefäße der ELISA Platte für 20 Minuten mit einer an Streptavidin gekoppelten Meerrettich-Peroxidase beschickt. Über das Biotin-Streptavidin System wird das Enzym mit dem Detektions-Antikörper gekoppelt. Es wurde nun eine Substratlösung (Chromogen) hinzugegeben, welche die Peroxidase in einer Farbreaktion umsetzte. Die Reaktion wurde nach 20 Minuten durch das Hinzufügen einer sauren Stopplösung unterbunden. Entsprechend der Konzentration des zu detektierenden Antigens fiel die Intensität des Farbumschlages unterschiedlich aus. Mit einem Mikroplatten-Reader (SpectroCount, Packard Instruments) wurde die optische Dichte jedes Reaktionsgefäßes, sowie zweier Standardkurven bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Es wurden Versuche sowohl für IL-10 als auch für TGF-β durchgeführt (Mouse IL-10 sowie Mouse TGF-β1 DuoSet ELISA Development Kit, R&D Systems).

3.2.11 Statistische Datenanalyse

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit MS Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, USA), die graphischen Darstellungen mit Sigma-Blot 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath). Bei allen Versuchsreihen wurden zunächst die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen berechnet und die Ergebnisse als Mittelwerte + Standardabweichung dargestellt. Für den Signifikanztest zwischen zwei Versuchsgruppen wurde der zweiseitige ungepaarte Student'sche t-Test angewendet, wobei als Signifikanzniveau ein $p \leq 0{,}05$ festgelegt wurde. Lagen die p-Werte innerhalb dieses Signifikanzniveaus, wurden sie in den entsprechenden Grafiken angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der $CD4^+CD25^+$ Treg Zellen

Regulatorische T-Zellen können anhand ihrer Zellmerkmale (Zellmarker) identifiziert werden, dies ist bereits in Kapitel 1.3 erläutert worden. Hierzu gehören auf der äußeren Zelloberfläche lokalisierte Proteine, aber auch im Zellkern befindliche Transkriptionsfaktoren. Die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehenden, natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen sind durch den intrazellulären Transkriptionsfaktor FoxP3 sowie durch die Oberflächenmarker CD4 und CD25 charakterisiert. Neben diesen strukturellen Markern ist hier ein weiteres Zellprotein von zentralem Interesse, die Ekto-5'-Nukleotidase CD73.

4.1.1 Durchflusszytometrische Analyse der isolierten regulatorischen T-Zellen

Die Isolierung der T-Lymphozyten-Subpopulation erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen *$CD4^+CD25^+$ Regulatory T-Cell Isolation Kit* (siehe Kapitel 3.2.2). Zunächst sollte analysiert werden, wie groß die tatsächliche Fraktion der Zielzellen unter den isolierten Zellen ist. Um Lymphozyten in der FACS-Analyse detektieren zu können, wurden ihre Zellmarker mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert (Zellfärbung, siehe Kapitel 3.2.8). Es wurden folgende Antikörper-Fluorochrom-Kombinationen verwendet: anti-CD4-FITC bzw. anti-CD4-APC, anti-CD25-PE sowie FoxP3-APC. Durch die jeweils erfolgten Kontrollen mit Isotypantikörpern konnte nachgewiesen werden, dass die verwendeten Primärantikörper kein unspezifisches Bindungsverhalten zeigten. Eine repräsentative Auswahl der Isotypkontrollen wird exemplarisch in den folgenden Abbildungen gezeigt. Um den Anteil der CD73-exprimierenden Zellen an der aufgereinigten Treg-Population zu bestimmen, wurde eine anti-CD73-FITC-Zellfärbung vorgenommen. Für die FACS-Analyse wurde das Durchflusszytometer FACSCalibur (BD Bioscience) verwendet.

Als erstes wurde analysiert, wie groß der Anteil an $CD4^+CD25^+$ Treg in der murinen Milz ist. Hierzu wurde die Milz nach der Entnahme homogenisiert und die erhaltene Zellsuspension mit anti-CD4-FITC und anti-CD25-PE angefärbt (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.8). Abbildung 6 zeigt die erfassten Ereignisse (detektierte Zellen) und die Art und Stärke der von ihnen emittierten Fluoreszenz in einem zweidimensionalen Koordinatensystem (Dotplot). Der Abbildung ist zu entnehmen, dass etwa 5% der murinen Splenozyten CD4 und CD25 koexprimieren.

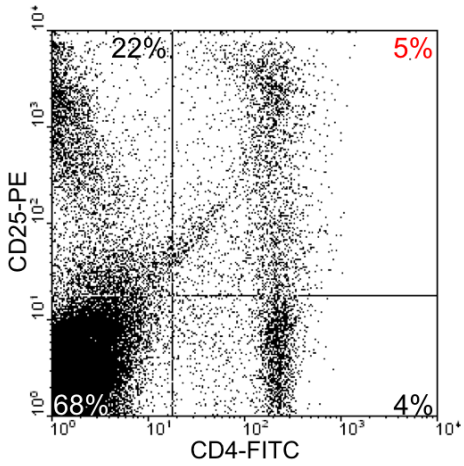

Abbildung 6: Quantitative Analyse der nativen Splenozyten: Färbung mit anti-CD4/anti-CD25.

Abbildung 7 zeigt die Analyse der nach $CD4^+CD25^+$ Treg Isolierung erhaltenen Zellpopulation. 88% dieser Zellen koexprimieren CD4 und CD25 (Abbildung 7A) und etwa 69% sind sowohl für CD4 als auch für FoxP3 positiv (Abbildung 7C).

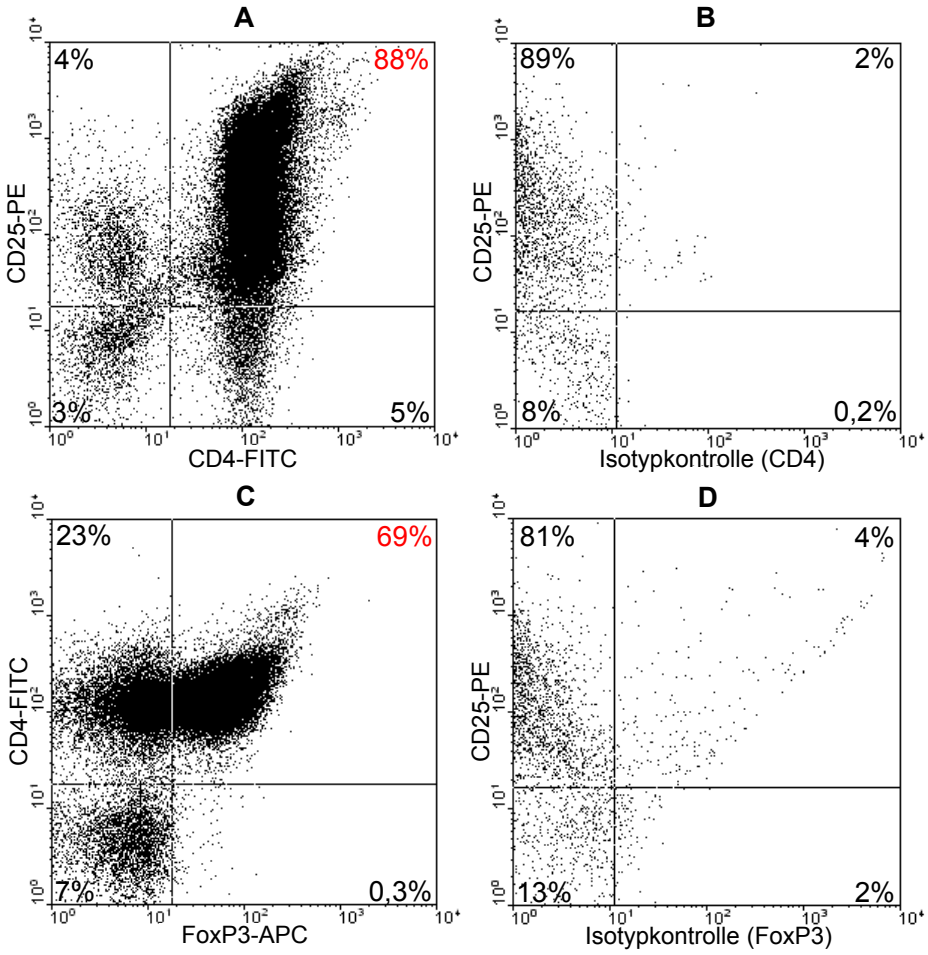

Abbildung 7: Quantitative Analyse der magnetisch separierten Treg: **(A)** Färbung mit anti-CD4/anti-CD25, **(B)** Isotypkontrolle CD4, **(C)** Färbung mit ant-CD4/anti-FoxP3, **(D)** Isotypkontrolle FoxP3.

Um zu zeigen, in welchem Umfang die von den murinen Splenozyten separierte Zellpopulation die Ekto-5'-NT/CD73 exprimiert, wurde eine weitere Zellfärbung vorgenommen, deren durchflusszytometrische Analyse in der Abbildung 8 dargestellt ist. Etwa 88% der magnetisch separierten Zellen tragen sowohl CD4 als auch CD73 (Abbildung 8A). Ungefähr 73% exprimieren FoxP3 zusammen mit CD73 (Abbildung 8B).

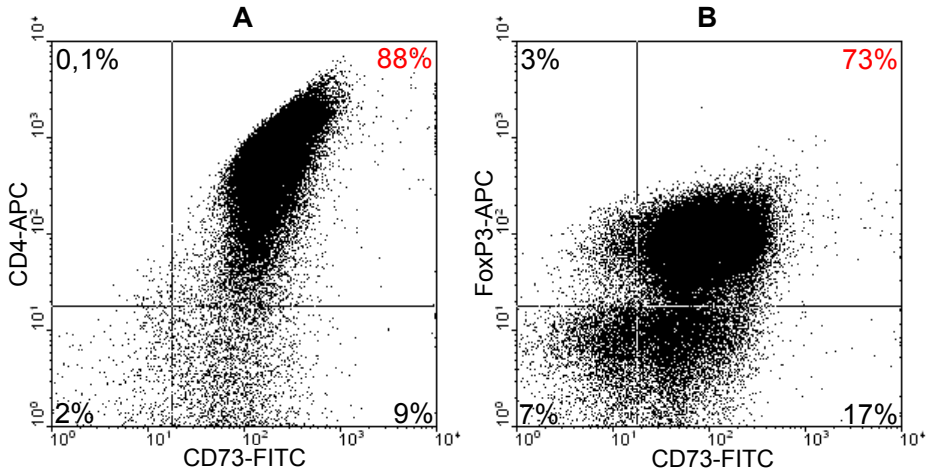

Abbildung 8: Quantitative Analyse der magnetisch separierten Treg: **(A)** Färbung mit anti-CD4/anti-CD73, **(B)** Färbung mit anti-FoxP3/anti-CD73.

4.1.2 Lichtmikroskopische Bestimmung des Anteils lebender Zellen

Neben der Reinheit der isolierten Treg Zellen ist auch der Anteil lebender Zellen für die durchgeführten Untersuchungen von Bedeutung. Die in dieser Arbeit analysierten Zellreaktionen sollten an vitalen Zellen beobachtet werden. Zu diesem Zweck wurde eine Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Lösung und einer Neubauerzählkammer vorgenommen (siehe Kapitel 3.2.2). Im Mittel ergab sich eine fraktionelle Lebendzellzahl von etwa 89 ± 4,5% (n = 16, Daten nicht gezeigt).

4.2 Genexpression von Purin-Rezeptoren und Enzymen des Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Signalweges durch $CD4^+CD25^+$ WT-Treg und $CD73^{-/-}$-Treg Zellen

Einen Überblick über die untersuchten Transkripte gibt die Abbildung 3. Die membranständige Ektokaskade CD39 und CD73 baut ATP zu Adenosin ab. Die alkalische Phosphatase (AlPho) dephosphoryliert ebenfalls extrazelluläres AMP zu Adenosin, die Adenosin-Desaminase hydrolysiert Adenosin zu Inosin. Intrazellulär wird ATP durch die zytosolische 5'Nukleotidase (Cy5NT) dephosphoryliert. Die Adenosinkinase (ADK) hingegen phosphoryliert intrazelluläres Adenosin zu AMP, was als sog. *salvage pathway* bezeichnet

wird. Außerdem gibt es verschiedene transmembranäre Nukleosid-Transporter (CNT, ENT). Des Weiteren wurden die Transkripte aller vier Adenosin-Rezeptoren (A_1R, $A_{2a}R$, $A_{2b}R$, A_3R) gemessen. Der Rezeptor P2X7 ist ein auf T-Zellen prominenter Nukleotid-Rezeptor.

4.2.1 Überprüfung der Amplifikate mittels Agarose Gelelektrophorese

Die Amplifikate der rt-PCR (Kapitel 3.2.6) wurden elektrophoretisch in einem 2%igen Agarose-Gel aufgetrennt und mittels UV-Licht sichtbar gemacht (Kapitel 3.2.7). Eine 50 bp DNA-Leiter diente als Standard und ermöglichte eine Zuordnung der Produktgrößen. Die verwendeten Primer erbrachten allesamt die theoretisch errechnete Länge (Abbildung 9, vgl. Tabelle 4). Es wurde also davon ausgegangen, dass sich die Primer an die entsprechenden Bindungsstellen anlagerten und spezifische Produkte amplifizierten. Wie zu erwarten, lieferte der CD73-*knockout* kein Amplifikat für die Ekto-5'-NT/CD73 (🡻).

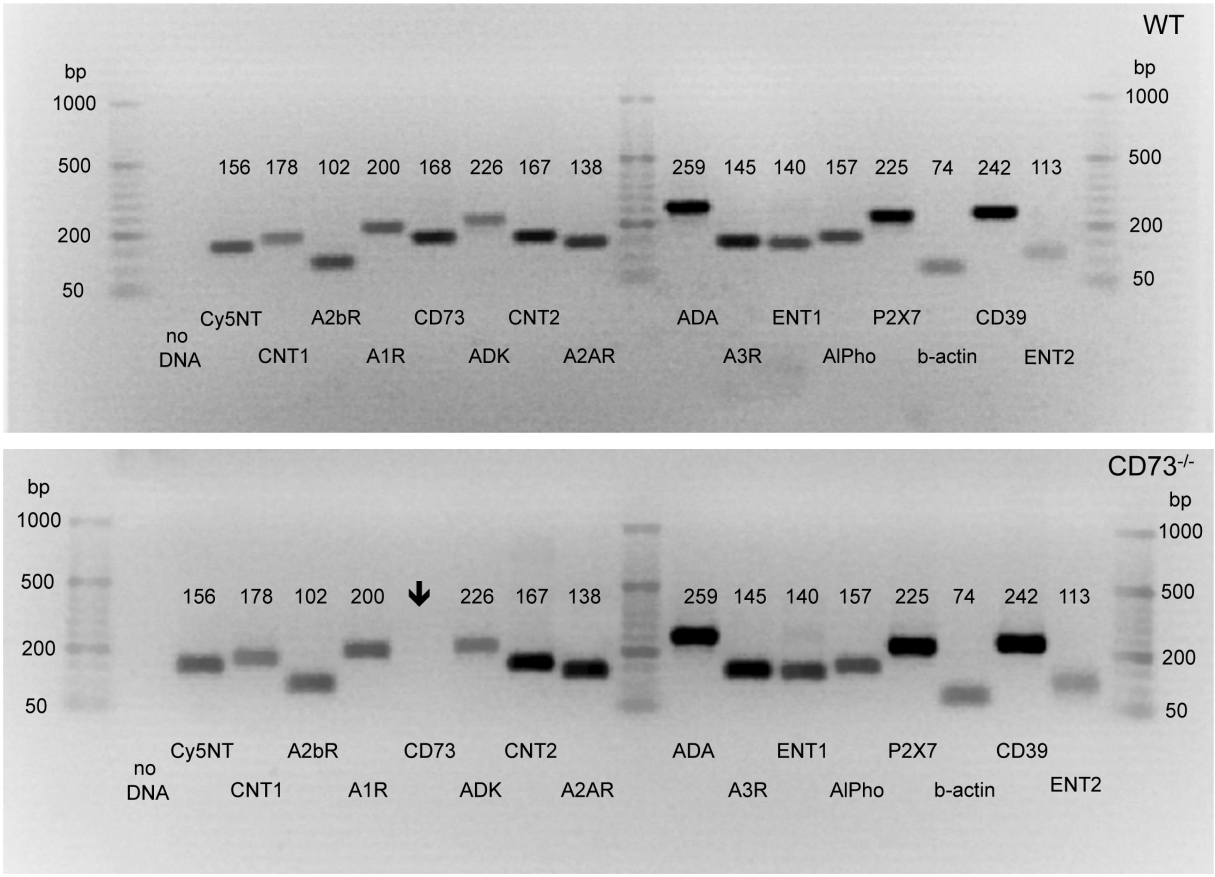

Abbildung 9: Auftrennung spezifischer DNA-Fragmente der am Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Signalweg beteiligten Enzyme, Rezeptoren und Transporter nach der Amplifikation mittels rt-PCR in einem 2%igen Agarosegel. Als Standard diente eine 50-bp-DNA-Leiter. Angegeben sind die theoretisch errechneten Produktlängen in Basenpaaren (bp). Die Analyse erfolgte mit isolierten Treg Zellen aus WT und $CD73^{-/-}$ Mäusen.

4.2.2 Quantifizierung der Genexpression in murinen Treg aus WT- und CD73$^{-/-}$-Tieren

Ein Schritt der Proteinbiosynthese ist die Transkription der als DNA im Zellkern gespeicherten genetischen Information in mRNA. Die Menge der mRNA kann daher ein Anhalt für die Quantität der Biosynthese des zugehörigen Proteins sein. Aus diesem Grund wurde nach der magnetischen Separation aus den regulatorischen T-Zellen die mRNA isoliert (siehe Kapitel 3.2.4). Da für die Quantifizierung mittels rt-PCR DNA als Matritze dient, wurde die isolierte mRNA zuvor in cDNA revers transkribiert (siehe Kapitel 3.2.5). Als interner Standard wurde bei allen Amplifikationen β-Aktin verwendet, da angenommen wurde, dass β-Aktin unter den gewählten Bedingungen unverändert transkribiert wird. Solche Gene werden als Haushaltsgene (*housekeeping genes*) bezeichnet. Sie unterliegen also soweit keiner Regulation. β-Aktin ist ein Strukturprotein, welches unter anderem Bestandteil des Zytoskeletts ist. Um den Einfluss individueller Unterschiede in den basalen Expressionsmustern zu minimieren, wurde die Zyklenzahl, bei der die Floureszenz eines Gens das Grundrauschen (*threshold*) übersteigt, von der des Haushaltsgens abgezogen. Um die relative Expressionsstärke der betrachteten Gene abzuschätzen, wurden sie ins Verhältnis zu der von β-Aktin gesetzt.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die ATP zu Adenosin abbauende Ektokaskade CD39/CD73. Durch die CD73-defiziente Maus stand ein Modell zur Verfügung, dem der letzte Schritt der Generierung von Adenosin fehlt. Wie eingangs erläutert, stehen der Zelle noch andere Wege zur Verfügung Adenosin extrazellulär (AlPho) oder intrazellulär (Cyt5NT, ADK) zu generieren oder zu phosphorylieren (*salvage pathway*). Mit dem Einbeziehen der Adenosin- (A_1, A_{2a}, A_{2b}, A_3) und Nukleotid- (P2X7) Rezeptoren sowie der Kanalproteine (ENT1, ENT2, CNT2) wurde das Spektrum der am Adenin-Nukleotid-Stoffwechsel beteiligten Proteine abgebildet.

Im Folgenden werden die Ergebnisse veranschaulicht. Der Abbildung 10 ist zu entnehmen, dass das für CD73 kodierende Gen im WT bei weitem am stärksten transkribiert wird. Unter den betrachteten Enzymen fällt auf, dass die CD39/CD73 Ektokaskade hier deutlich stärker als die extrazellulär lokalisierte alkalische Phosphatase (AlPho) transkribiert wird. Die intrazellulären Enzyme, zytosolische 5'Nukleotidase (Cyt5NT) und Adenosinkinase (ADK), zeigen ebenfalls eine starke Transkribtion. Unter den Adenosinrezeptoren werden der A_{2a} sowie der A_3 Rezeptor und unter den Nukleosidtransportern der CNT2 sowie der ENT1 Transporter am stärksten transkribiert. Auffällig ist auch die hohe Transkribtionsrate des ATP-Rezeptors P2X7.

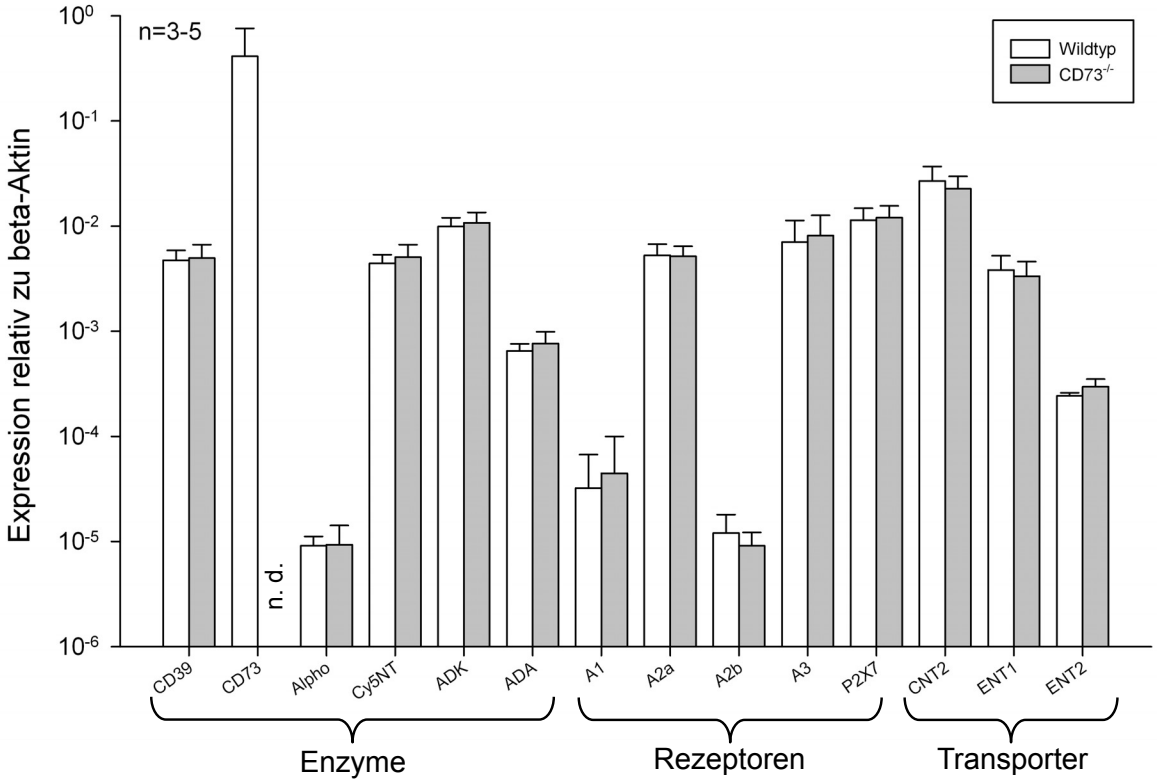

Abbildung 10: Genexpression der am Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Signalweg beteiligten Enzyme, Rezeptoren und Transporter von Treg Zellen isoliert aus WT (weiße Balken) und CD73$^{-/-}$ Mäusen (graue Balken). Die Genexpression ist relativ zu der von β-Aktin dargestellt. Mittelwert + SD.

Außerdem wurde die Transkribtion aller Gene aus CD73$^{-/-}$ Treg mit der von WT Treg verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. Betrachtet man die Expressionsraten, so fällt auf, dass die des CD73$^{-/-}$ sehr eng bei denen des Wildtyps liegen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den basalen Expressionsstärken zwischen Wildtyp und CD73-*knockout* festgestellt werden.

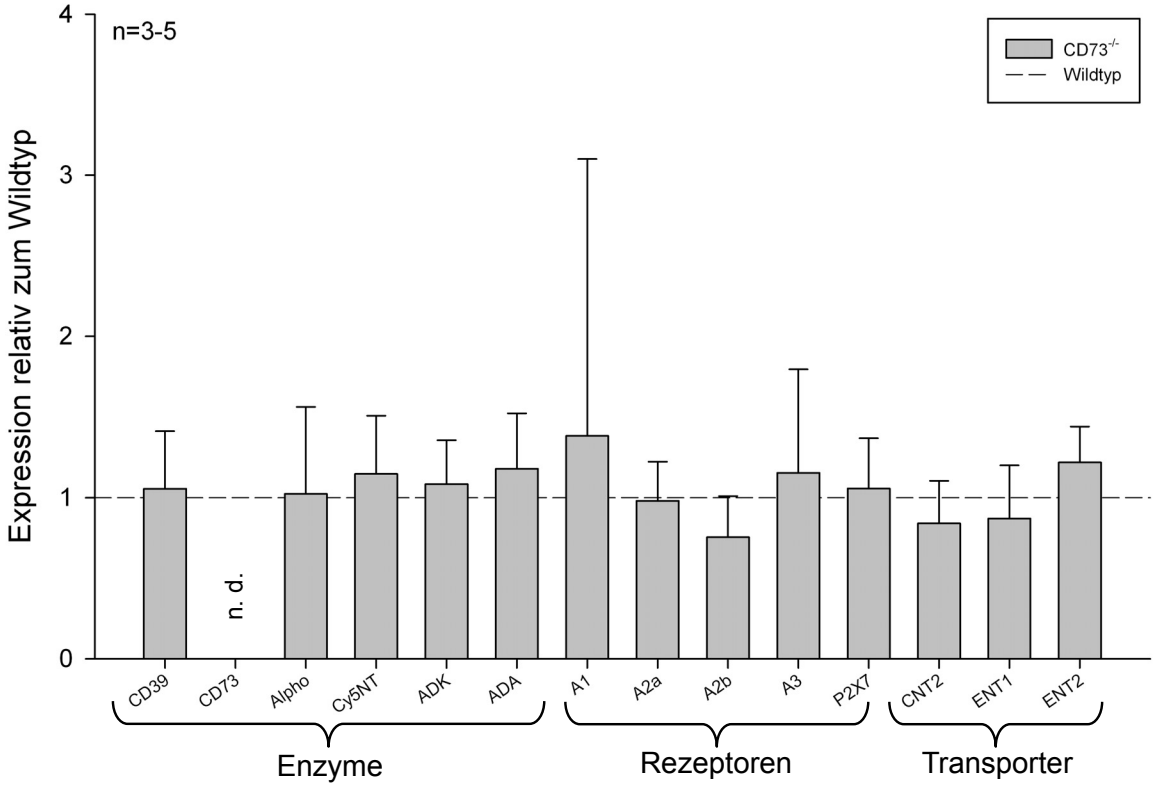

Abbildung 11: Genexpression der am Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Signalweg beteiligten Enzyme, Rezeptoren und Transporter von Treg Zellen isoliert aus CD73$^{-/-}$ Mäusen (graue Balken) in Relation zu der von Treg aus WT Mäusen (gestrichelte Linie). Mittelwert + SD.

4.2.3 Einfluss von Substrat (AMP) in den Pufferlösungen auf die Genexpression

Die Analyse der Genexpression der Adenin-Nukleosid/Nukleotid Kaskade und ihrer Rezeptoren zeigt, wie unterschiedlich die einzelnen Gene transkribiert werden. In der Zeit nach der Milzentnahme bis zur RNA Isolierung (etwa 5 Stunden) herrschten für die Zellen allerdings *in vitro* Bedingungen. In inflammatorischen oder hypoxischen Geweben steigt die Adenosinkonzentration bis in den millimolaren Bereich an [142, 143]. Die Ekto-5'-NT/CD73 stellt den letzten Schritt in der Adenosingenerierung dar, AMP ist hierbei das Substrat. Um sich den Bedingungen einer akuten Stressreaktion im Gewebe anzunähern, wurden 5 µmol/l AMP zu den Pufferlösungen (MACS-Puffer) hinzugefügt. So sollte die Frage beantwortet werden, ob die Anwesenheit der Adenosin-Vorstufe AMP Einfluss auf die basalen Expressionsmuster hat.

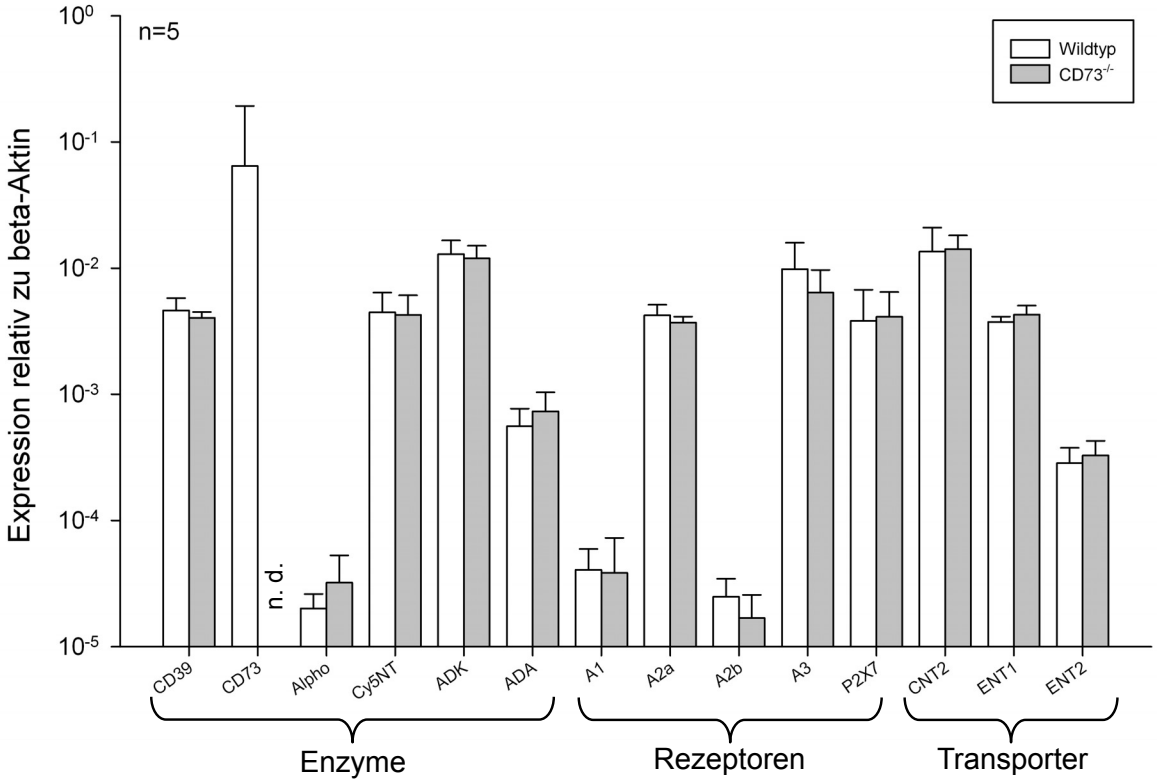

Abbildung 12: Genexpression der am Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Signalweg beteiligten Enzyme, Rezeptoren und Transporter von Treg Zellen isoliert aus WT (weiße Balken) und CD73$^{-/-}$ Mäusen (graue Balken). Die Genexpression ist relativ zu der von β-Aktin dargestellt. Die Versuche wurden in Anwesenheit von 5 µM AMP durchgeführt. Mittelwert + SD.

Die Abbildung 12 zeigt die Genexpression in Relation zum *housekeeping*-Gen β-Aktin. Auch hier zeigen sich deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke der einzelnen Gene. Das Muster ist dem Versuchsaufbau ohne Substrat sehr ähnlich. Das am stärksten exprimierte Gen des WT ist ebenfalls die Ekto-5'-NT/CD73. Die AlPho als weiteres extrazellulär lokalisiertes und AMP dephosphorylierendes Enzym ist dagegen verhältnismäßig schwach exprimiert. Signifikante Abweichungen zu den Treg, denen kein AMP angeboten wurde, konnten nicht nachgewiesen werden.

In Abbildung 13 ist zu erkennen, dass, setzt man die Genexpression des CD73-*knockout* (graue Balken) in Relation zu der des WT (gestrichelte Linie), beide eng beieinander liegen. Signifikante Unterschiede in den Expressionsstärken beider Genotypen konnten nicht nachgewiesen werden.

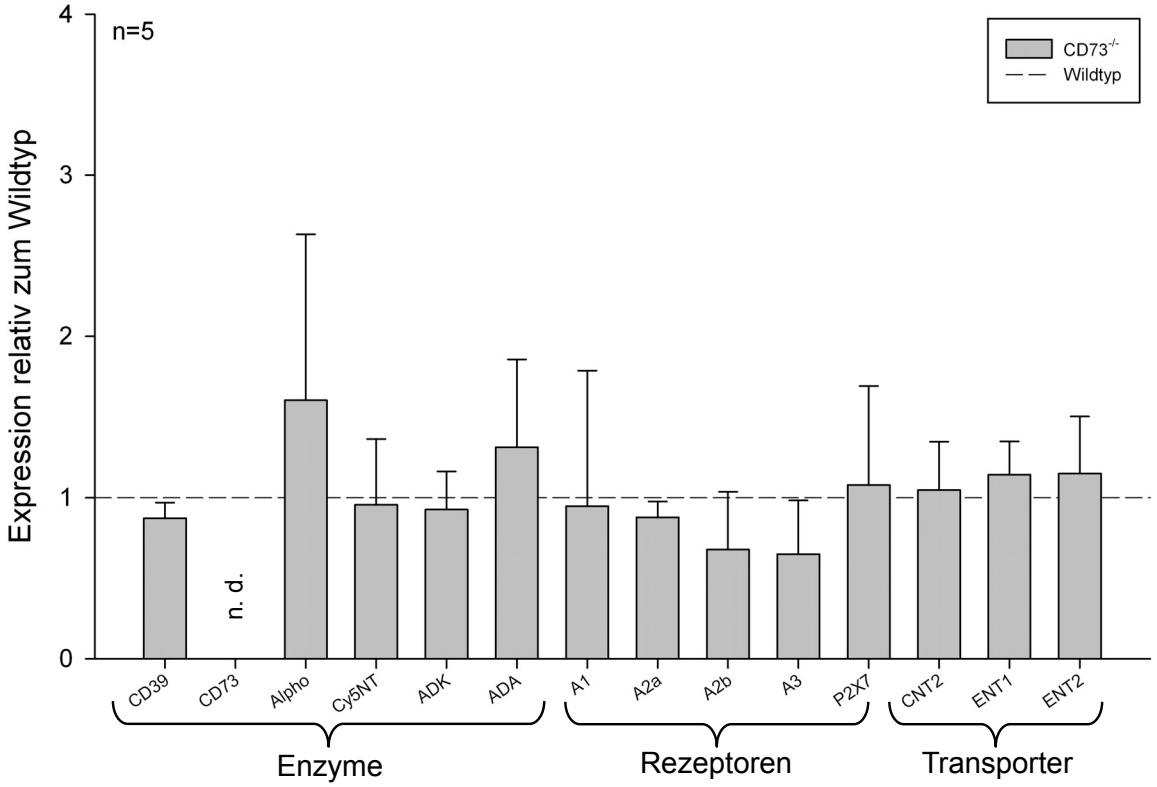

Abbildung 13: Genexpression der am Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Signalweg beteiligten Enzyme, Rezeptoren und Transporter von Treg Zellen isoliert aus CD73$^{-/-}$ Mäusen (graue Balken) in Relation zu der von Treg aus WT Mäusen (gestrichelte Linie). Die Versuche wurden in Anwesenheit von 5 µM AMP durchgeführt. Mittelwert + SD.

4.3 Antigene Stimulierung der CD4^{+}CD25^{+} Treg Zellen

Vorangehend wurde bereits die Genexpression der Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Kaskade von aufgereinigten murinen Treg Zellen mit und ohne Substratangebot untersucht. Dies lieferte ein interessantes Bild über die Quantität der Transkripte dieses Signalweges unter Basalbedingungen. Es ist bekannt, dass eine Zellstimulation mittels anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern T-Zellen aktiviert und sie zur Proliferation, Differenzierung und Zytokinfreisetzung anregt [141]. Weiterhin wurde gezeigt, dass diese Stimuli wichtig für das Überleben und die Zellaktivität von CD4^{+}CD25^{+} Treg sind [140]. Natürlich vorkommende CD4^{+}CD25^{+} T-Zellen befinden sich überwiegend in Anergie. Mit einer Stimulierung durch anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper über einen Zeitraum von 18 Stunden (Kapitel 3.2.9) wurde überprüft, inwieweit die gewonnen Erkenntnisse auch auf aktivierte Treg zutreffen.

4.3.1 Quantifizierung der Genexpression in murinen WT-Treg und CD73$^{-/-}$-Treg

Mit einer rt-PCR wurde die Genexpression der Proteine des Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Signalweges in murinen Treg nach antigener Stimulierung quantifiziert.

So sollte die Frage, ob die basalen Expressionsraten in immunaktiven Treg im Sinne einer Hoch- oder Herunterregulation verändert sind, beantwortet werden.

In den folgenden Abbildungen ist dargestellt, wie sich die Genexpression stimulierter Treg im Vergleich zu unstimulierten Treg verändert. Es fällt auf, dass der basal niedrig transkribierte Adenosinrezeptor A_{2b} signifikant auf das über 20-fache seines Ausgangswertes ansteigt ($p \leq 0{,}01$). Die Expression des ATP-Rezeptor P2X7 nimmt hingegen signifikant um ca. 90% ab ($p \leq 0{,}01$). Unter den Adenosintransportern sinkt die Transkribtionsrate des konzentrativen Nukleosidtransporters CNT2 ebenfalls signifikant ab ($p \leq 0{,}05$), während die mRNA-Menge des äquilibrativen Nukleosidtransporters ENT2 ansteigt. Es findet sich auch eine Zunahme der mRNA-Menge der alkalischen Phosphatase.

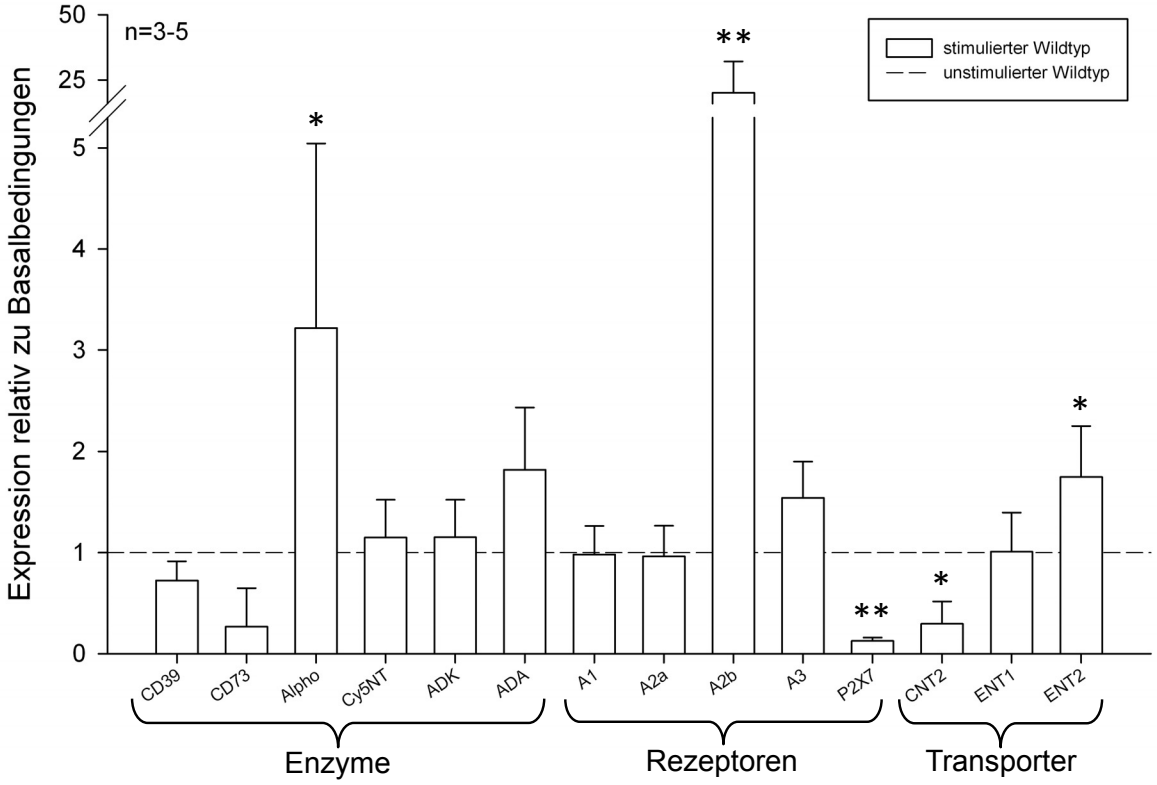

Abbildung 14: Änderung der Genexpression verschiedener Enzyme, Rezeptoren und Transporter der Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Kaskade nach antigener Stimulierung von wildtypischen Treg Zellen in Relation zu Basalbedingungen (gestrichelte Linie). Anti-CD3/-CD28 Stimulierung für 18 h. Mittelwert + SD. ** $p \leq 0{,}01$. * $p \leq 0{,}05$.

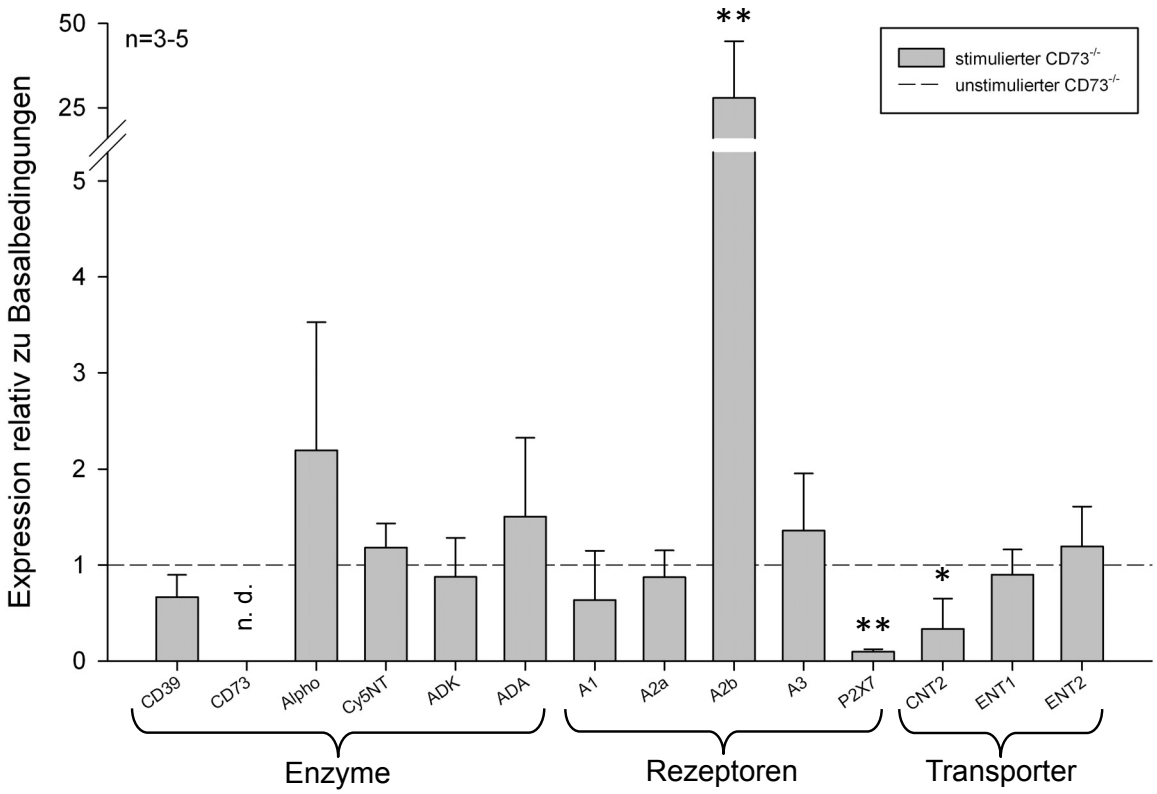

Abbildung 15: Änderung der Genexpression verschiedener Enzyme, Rezeptoren und Transporter der Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Kaskade nach antigener Stimulierung von CD73$^{-/-}$ Treg Zellen in Relation zu Basalbedingungen (gestrichelte Linie). Anti-CD3/-CD28 Stimulierung für 18 h. Mittelwert + SD. ** $p \leq 0{,}01$. * $p \leq 0{,}05$.

Die Transkribtionsraten von Wildtyp und *knockout* Zellen zeigen insgesamt sehr ähnliche Muster. Um zu überprüfen, ob zwischen beiden signifikante Unterschiede bestehen, wurde die Genexpression von Treg aus CD73$^{-/-}$ Mäusen zu der von Treg aus WT Mäusen ins Verhältnis gesetzt. Abbildung 16 fasst die Analyse zusammen. Auch nach antigener Stimulierung über 18 Stunden findet sich kein signifikanter Unterschied in der Genexpression zwischen den *knockout* und den Wildtyp Treg.

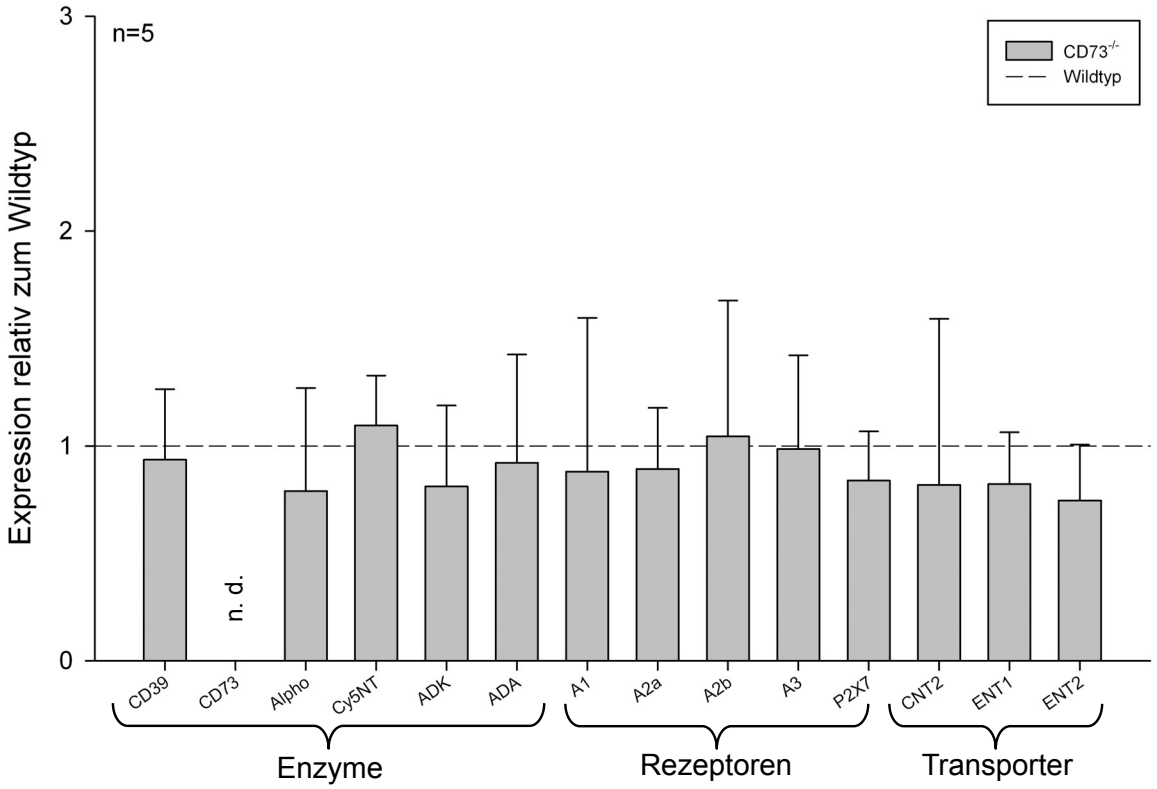

Abbildung 16: Genexpression der Enzyme, Rezeptoren und Transporter der Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Kaskade nach antigener Stimulierung von Treg Zellen isoliert aus $CD73^{-/-}$ Mäusen (graue Balken) in Relation zu der von Treg aus WT Mäusen (gestrichelte Linie). Anti-CD3/-CD28 Stimulation für 18 h. Mittelwert + SD.

4.3.2 FACS-Analyse der Proteinexpression von CD39, CD73 und P2X7 in Treg

Mit Hilfe der FACS-Technik wurde untersucht, ob sich die gefundenen Expressionsunterschiede der Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Kaskade in stimulierten und unstimulierten Treg auch auf der Proteinebene nachweisen lassen. Für eine Analyse der Proteinexpression standen drei verschiedene Antikörper zur Verfügung. Aus WT-Mäusen isolierte $CD4^+$ T-Lymphozyten (Kapitel 3.2.3) wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die zentrale Enzymkaskade des Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Signalweges CD39 und CD73 angefärbt (Kapitel 3.2.8). Auf Grund seiner deutlichen Herunterregulierung in aktivierten Treg, wurde zudem der Nukleotid-Rezeptor P2X7 markiert. Es wurde hier mit einer $CD4^+$-Population gearbeitet, da der zweite Schritt der magnetischen Separation von Treg (positive Selektion der $CD25^+$ Zellen, Kapitel 3.2.2) eine Markierung mit einem aus der Ratte stammenden monoklonalen Antikörper gegen den Maus-CD25 Komplex voraussetzt. Die zur Verfügung stehenden fluoreszierenden Sekundärantikörper gegen die ebenfalls aus der Ratte stammenden Maus-CD39 und Maus-P2X7 Antikörper hätten eine ungewünschte Markierung dieses CD25 Antikörpers bewirkt. Es konnte trotzdem die $CD4^+CD25^+$

Zellpopulation untersucht werden, indem mit einem aus dem Kaninchen stammenden Antikörper der Maus-CD25 Komplex markiert und bei der FACS-Analyse ein sogenanntes *gate* über die $CD4^+CD25^+$ Zellen gelegt wurde. Nur diese Zellen wurden vom Detektor des Durchflusszytometers erfasst und gingen in die weitere Untersuchung ein. Pro Färbung wurden jeweils mindestens 20.000 Ereignisse (Zellen) gezählt. Es wurden zwei unabhängige Experimente mit insgesamt zwei verschiedenen Wildtypen durchgeführt.

In den Abbildungen sind die Ergebnisse der FACS-Analyse zusammengefasst. In den Histogrammen (Abbildung 17) zeigt sich eine Zunahme der vom Durchflusszytometer erfassten Ereignisse (Antikörper-markierte Zellen, *Events*) nach antigener Stimulierung (rote Linie). Dies trifft sowohl auf Zellfärbung mit anti-CD73-PE wie auch auf die mit anti-CD39-PE und anti-P2X7-PE zu. Es fällt auf, dass die murinen Treg Zellen auf die Stimulierung besonders stark mit einer vermehrten Proteinexpression der Ekto-5'-NT/CD73 reagieren. In der Abbildung 18 wird dies noch deutlicher. Hier ist die mittlere Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity*, MFI) der gezählten Zellen abgebildet. CD39 und P2X7 zeigen eine leichte Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität nach Stimulierung mit anti-CD3/anti-CD28. CD73 zeigt sogar eine Zunahme um ca. 70%.

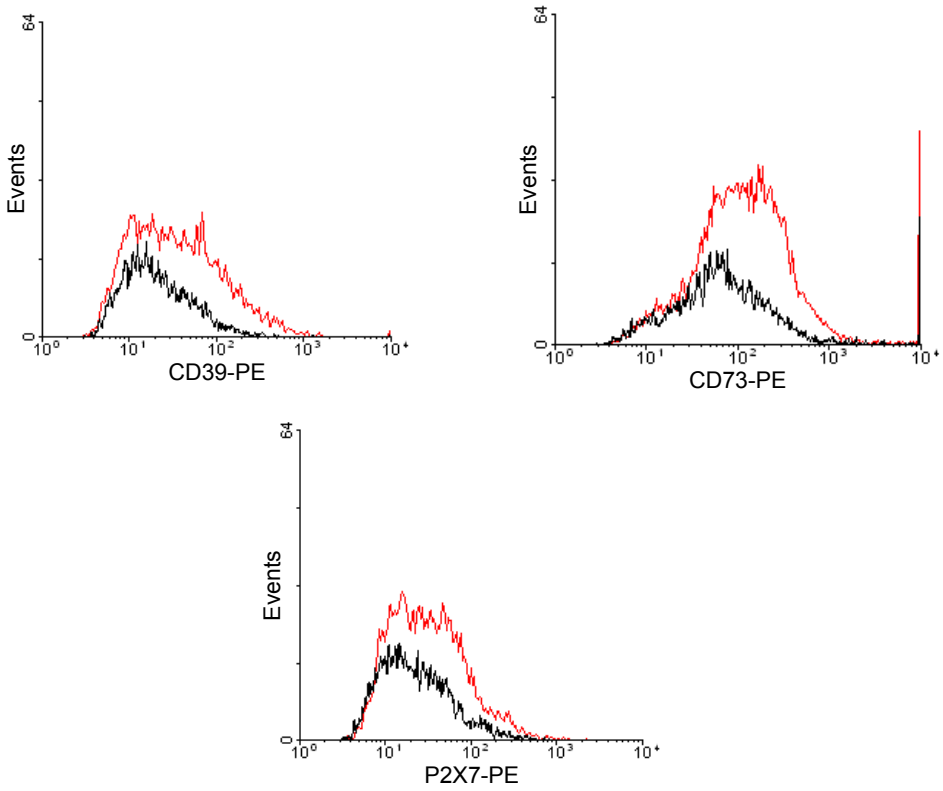

Abbildung 17: Quantitative Analyse der Proteinexpression auf der Zelloberfläche von Treg, isoliert aus WT Mäusen. Repräsentative Histogramme; schwarze Linie: unstimulierte Treg Zellen, rote Linie: Treg Zellen nach 18 h Stimulierung mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern.

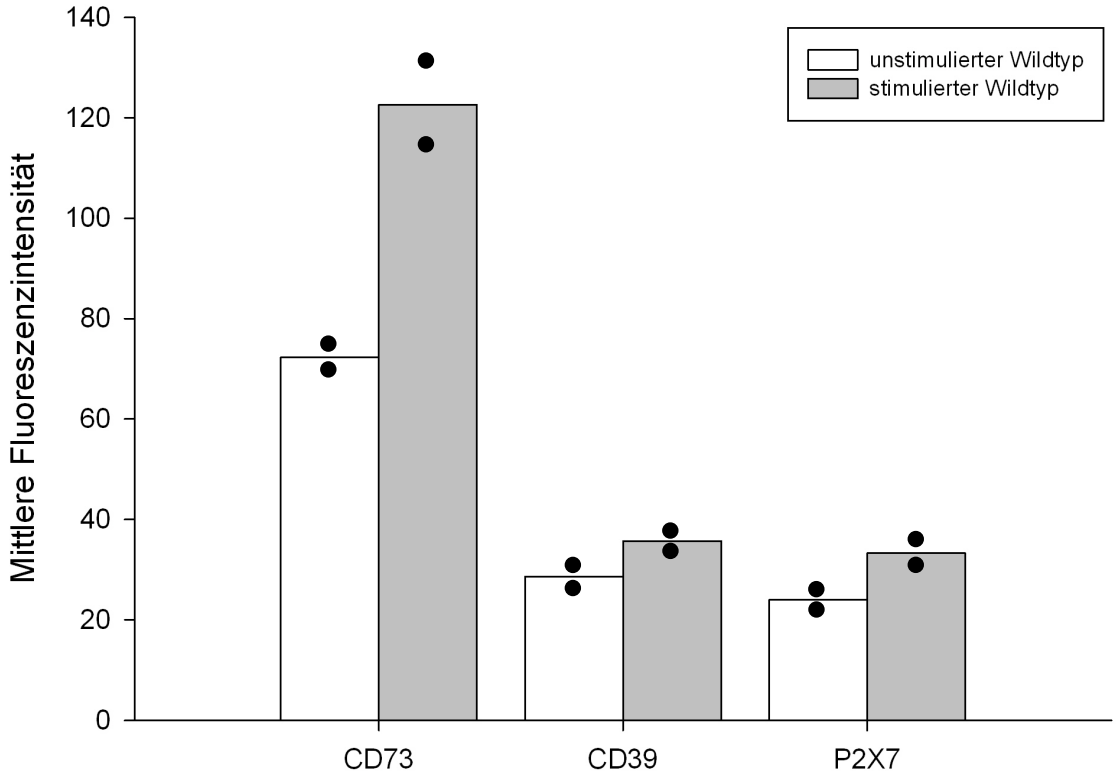

Abbildung 18: Quantitative Analyse der Proteinexpression auf der Zelloberfläche von Treg, isoliert aus WT Mäusen. Mittlere Fluoreszenzintensität; weißer Balkenteil: unstimulierte Treg Zellen, grauer Balkenteil: Treg Zellen nach 18 h Stimulierung mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern. Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten (angezeigt durch schwarze Punkte).

4.3.3 Sekretion antiinflammatorischer Zytokine in murinen WT-Treg und CD73$^{-/-}$-Treg

Ein Mechanismus, mit dem regulatorische T-Lymphozyten dämpfend auf das Immunsystem einwirken, ist die Freisetzung von immunmodulatorischen Zytokinen. Hierzu gehören IL-10 und TGF-β. Sie haben zum einen suppressive Effekte auf Effektorzellen, zum anderen können sie stimulierend auf die Ausbildung weiterer Treg-Subpopulationen Einfluss nehmen [35].

Um zu überprüfen, ob sich die Zytokinproduktion von Treg Zellen isoliert aus CD73$^{-/-}$ Mäusen von denen aus WT Mäusen unterscheidet, wurden die Zellen zunächst 18 Stunden mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern stimuliert. Der Überstand des Zellkulturmediums wurde daraufhin mittels enzymgekoppeltem Immunadsorbtionstest (*Enzyme Linked Immunsorbent Assay*, ELISA, siehe Kapitel 3.2.10) auf den IL-10 und TGF-β Gehalt untersucht.

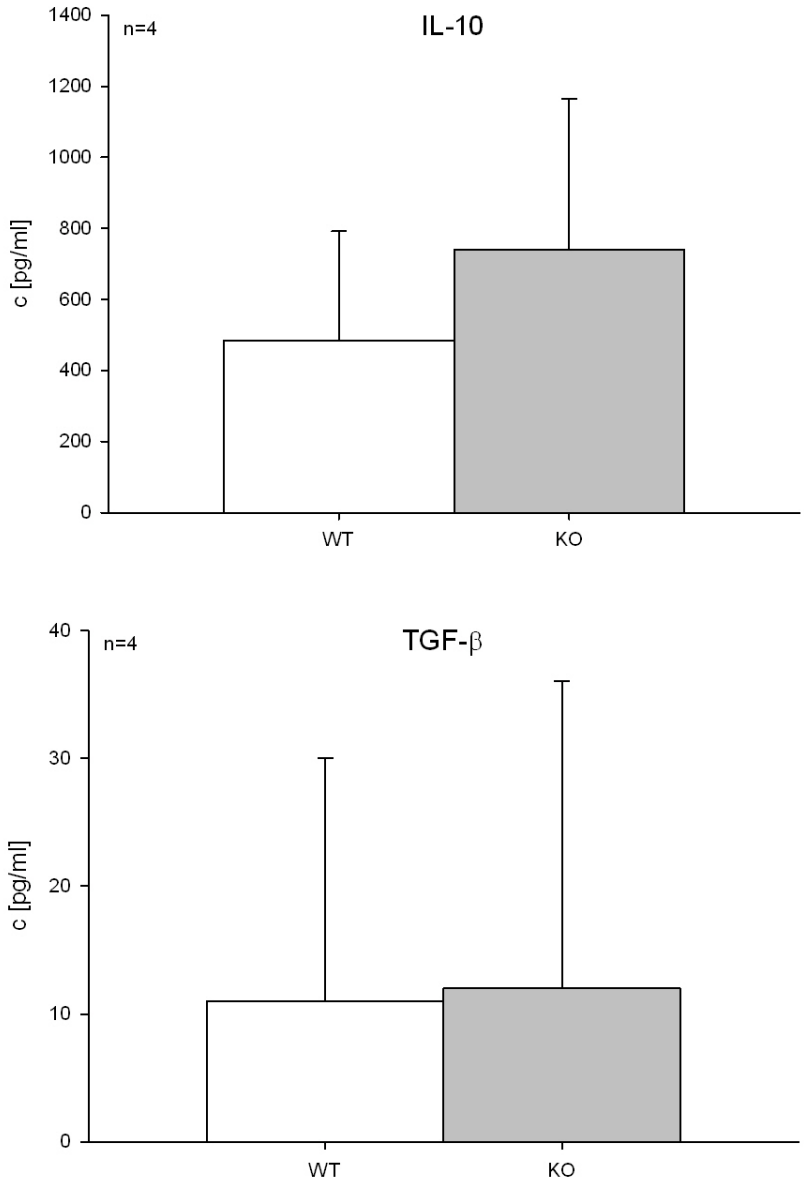

Abbildung 19: Zytokinsekretion (IL-10, TGF-β) durch Treg-Zellen isoliert aus WT (weißer Balken) und CD73$^{-/-}$(grauer Balken) Mäusen nach 18 h Stimulierung mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern. Mittelwert ± SD.

Die Konzentration von IL-10 im Zellüberstand des *knockouts* lag mit durchschnittlich 740 pg/ml über der des Wildtyps mit 485 pg/ml (Abbildung 19). Die Unterschiede sind allerdings nicht signifikant. Die Analyse des TGF-β Gehaltes lieferte von Tier zu Tier sehr variierende Werte mit hohen Standardabweichungen. Auch hier bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und CD73$^{-/-}$-Treg.

5 Diskussion

5.1 Magnetisch separierte Treg exprimieren CD73

In der weißen Pulpa der Milz befindet sich etwa ein Viertel der im Organismus vorkommenden Lymphozyten. Daher eignet sich dieses Organ hervorragend als Entnahmeort für diese Zellen in experimentellen Studien. Der hier gemessene Anteil $CD4^+CD25^+$ Zellen an der Gesamtpopulation muriner Splenozyten lag bei 5% (Abbildung 6). In etwa der selben Größenordnung (ca. 10%) bewegte sich die Anzahl, der von Sakaguchi et al. erstmals aus murinen Lymphknoten isolierten $CD4^+CD25^+$ Lymphozyten [20].

Unter den magnetisch separierten Splenozyten trugen 88% der Zellen die Treg typischen Markermoleküle CD4 und CD25 (Abbildung 7). Dass nur etwa 70% dieser Zellen CD4 und den Transkriptionsfaktor FoxP3 aufwiesen, liegt wahrscheinlich daran, dass CD25 auch von frisch aktivierten $CD4^+$ Teff exprimiert werden kann, diese aber FoxP3-negativ sind [23]. FoxP3 ist für die Abgrenzung natürlich vorkommender Treg vermutlich der schärfere Trennmarker, birgt allerdings den entscheidenden Nachteil, dass seine Anfärbung eine Perforation der Zellmembran und damit das Abtöten der Zellen erforderlich macht.

Thompson et al. zeigten, dass die Ekto-5'-Nukleotidase CD73 von Splenozyten exprimiert wird [144]. Kobie et al. identifizierten unter den CD73 tragenden murinen Splenozyten zwei durch ihre Oberflächenmoleküle voneinander abgrenzbare Subpopulationen: $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg sowie $CD4^+CD25^-FoxP3^-$ T-Lymphozyten (Thpp), die beide über die Generierung extrazellulären Adenosins aus Adenin-Nukleotiden antiinflammatorischen Einfluss auf Teff haben [72]. Auf den Treg korrelierte die CD73 Expression eng mit der von FoxP3. Von den in dieser Arbeit separierten Treg koexprimierten 88% CD4 und CD73 (Abbildung 8), genau der prozentuale Anteil, der auch bei der Analyse der $CD4^+CD25^+$ Zellen gemessen wurde. Eine Kombination von FoxP3 und CD73 zeigten 73% der isolierten Zellen, ebenfalls ein dem $CD4^+FoxP3^+$ Zellen (70%) sehr ähnlicher Wert. Es ist daher anzunehmen, dass nahezu alle der isolierten $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen die Ekto-5'-Nukleotidase CD73 tragen und die übrigen, bei der FACS-Analyse nicht erfassten Zellen, CD73 nicht exprimieren. Diese Schlussfolgerung wird durch die Befunde von Deaglio et al. gestützt, die die Ektokaskade CD73 und CD39 nahezu ausschließlich auf $CD4^+FoxP3^+$ T-Zellen fanden und sie daher als neue Markerenzyme für natürlich vorkommende Treg vorschlugen [75].

5.2 Quantifizierung der Expression der Adenin-Nukleosid/Nukleotid Ektokaskade mit beteiligten Enzymen, Rezeptoren und Transportproteinen

5.2.1 CD73 als Taktgeber bei der Bereitstellung extrazellulären Adenosins über die CD39/CD73 Ektokaskade auf murinen wildtypischen Treg

ATP wird durch nekrotisches Gewebe im Rahmen entzündlicher Prozesse an den Extrazellulärraum abgegeben. Es wird aber auch durch verschiedene im Blut zirkulierende Zellen, darunter Teff, auf nicht-lytischem Wege freigesetzt. Pannexin-Hemikanäle scheinen hierbei eine Rolle zu spielen [80]. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass auf genomischer Ebene die Ekto-5'-Nukleotidase CD73 unter den Adenin-Nukleotid metabolisierenden Enzymen mit Abstand am stärksten exprimiert wird (Abbildung 10). Die gemessene relative mRNA-Menge liegt nahezu zwei Zehnerpotenzen über der der NTPDase CD39. In der FACS-Analyse der Proteinexpression der Ektokaskade zeigte sich ein Anstieg der gemessenen MFI (*mean fluorescence intensity*) von anti-CD73-PE markierten Treg nach 18 h Zellstimulation mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern um 70% (Abbildung 18). Auch die MFI der mit anti-CD39-PE gefärbten Treg stieg nach Zellstimulation um 25% an. Die Zunahme der Proteinexpression von CD73 auf aktivierten Treg ließ sich allerdings nicht auf mRNA-Ebene erfassen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass ein zytosolisch vorhandener CD73-Pool kurzfristig nach einer antigenen Zellstimulation auf der Oberfläche exprimiert werden kann und zunächst keine verstärkte Transkription notwendig macht.

In dieser Arbeit wurden zytosolische mRNA-Mengen sowie die Proteinexpressionen auf der Zelloberfläche bestimmt. Ein Substratfluss ist zudem abhängig von der Aktivität der beteiligten Enzyme. In weitergehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde daher die Enzymaktivität anhand des Substratumsatzes analysiert [145]. Interessanterweise nahm die CD73 Aktivität aktivierter Treg signifikant zu. Es stellte sich außerdem heraus, dass CD39 eine um knapp zwei Zehnerpotenzen höhere Aktivität aufweist als CD73. Allerdings ist CD39 nicht die einzige Quelle für AMP. An Orten vaskulärer Inflammation setzen neutrophile Granulozyten AMP in mikromolaren Konzentrationen frei [146]. Über die endothelial exprimierte CD73 wird dieses AMP zu Adenosin dephosphoryliert und bewahrt durch die A_{2b}-Rezeptorwirkung die Integrität der Endothelbarriere [146, 147]. Zudem gibt es weitere Enzyme, die extrazelluläres AMP generieren können. Die membrangebundene Phosphodiesterase (PDE) ist ebenfalls in der Lage, extrazelluläres ATP zu ADP und AMP zu hydrolysieren [148]. Neben ATP wird aus lytischen Zellen auch NAD^+ (oxidiertes Nikotinamidadenindinukleotid) freigesetzt und über die Ektoenzyme CD38 (NAD-

Glykohydrolase) und CD203 (Nukleotid-Pyrophosphatase) zu Nikotinamid und AMP hydrolysiert [149, 150]. Da diese Enzyme auch auf T-Zellen nachgewiesen wurden [151, 152], ist zu vermuten, dass das Substratangebot an CD73 höher ist, als es CD39 alleine bereitstellen könnte. Demnach wird der Flux durch CD73 nicht allein durch CD39 bestimmt.
Die in manchen Geweben mit CD73 koexprimierte AlPho ist ein alternativer Abbauweg von extrazellulärem AMP. Die gemessene mRNA Menge lag aber fast 10 000 fach unter der von CD73 (Abbildung 10). Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass nach antigener Stimulierung die AMPase-Aktivität von CD73 auf Treg um mehr als 100% zunimmt, wohingegen die der AlPho keine signifikante Änderung zeigt [145].
Es ist anzunehmen, dass auch die AlPho auf Treg einen Anteil an der Generierung extrazellulären Adenosins hat. Die erhobenen Daten legen jedoch nahe, dass CD73, zumindest in aktivierten Treg, der wichtigste Adenosin Lieferant und der entscheidende Baustein in der Adenin-Nukleosid/Nukleotid Ektokaskade ist.

5.2.2 Aktivierte Treg supprimieren die Genexpression des Nukleotid-Rezeptors P2X7

Der P2X7-Rezeptor ist ein auf T-Zellen prominenter Nukleotid-Rezeptor und findet sich auch auf Treg. Unter den hier untersuchten Rezeptoren gehört er neben dem $A_{2a}R$ und dem A_3R zu den am stärksten transkribierten. Eine P2X7-Aktivierung führt zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration. Dies ist ein allgemein zellaktivierendes Signal und bewirkt in T-Zellen einen ATP-Efflux über Pannexin Hemikanäle, welches wiederum autokrin wirken kann [80]. Ein solcher positiver *feedback*-Mechanismus würde die proinflammatorische Stoffwechsellage im Umfeld der aktivierten Treg zusätzlich verschärfen und ihrer immundämpfenden Aufgabe entgegenwirken. Aus diesem Grund, sowie wegen seiner vielseitigen weiteren proinflammatorischen Effekte (siehe Kapitel 1.3.2.4 und 1.4.1), ist es interessant zu sehen, dass nach antigener Zellaktivierung über TZR-assoziierte Signalwege die mRNA-Expression des P2X7-Rezeptors signifikant um 90% des basalen Wertes absinkt (Abbildung 15).
In einer aktuellen Studie zeigten Schenk et al., dass P2X7 auch direkten Einfluss auf die suppressorische Kompetenz von Treg hat [153]. Sie konnten *in vitro* nachweisen, dass ATP über P2X7 die Expression von FoxP3 vermindert und in Anwesenheit von IL-6 eine Umdifferenzierung von Treg hin zu T_H17, einer Subklasse der T-Helferzellen, stattfindet. *In vivo* fand sich bei Mäusen mit entzündlicher Darmerkrankung ein signifikant leichterer Krankheitsverlauf, wenn Treg aus $P2X7^{-/-}$ Mäusen infundiert wurden. Zudem fand sich bei P2X7-defizienten Mäusen ein deutlich höherer Anteil von $FoxP3^+$ Treg in mesenterialen Lymphknoten als bei den wildtypischen Kontrolltieren. Ähnliche Effekte zeigten sich bei der Applikation pharmakologischer P2X-Antagonisten.

Mit der CD39 besitzen Treg ein Enzym, das extrazelluläres ATP zu AMP wirksam abbaut. Nichtsdestotrotz könnte ATP akkumulieren und eine Expansion der Teff zur Folge haben [115, 153]. Es erscheint daher sehr sinnvoll, dass aktivierte Treg die Transkription ihres P2X7-Rezeptorgens herunterregulieren, um in inflammatorischen Geweben ihre immunsupprimierende Aktivität wahren zu können.

Es ist bereits länger bekannt, dass extrazelluläres ATP auch als sogenanntes *danger signal* agieren und zelltypabhängig den Zelltod induzieren kann [154]. Die Arbeitsgruppe Surprenant et al. identifizierte 1996 P2X7 erstmals als einen Rezeptor, der nicht nur Zellkommunikation vermittelt, sondern auch für den Einbau großer zytolytischer Membranporen verantwortlich ist [155]. Allerdings waren für eine Reduktion der T-Lymphozytenzahl *in vitro* millimolare ATP-Konzentrationen notwendig. Die Frage, wie aus natürlichen Quellen so große Mengen ATP freigesetzt werden können, führte zu der Erkenntnis, dass die Induktion des Zelltodes durch P2X7 auch über einen anderen Weg möglich ist. Bei Zelllysen freigesetztes NAD^+ ist das Substrat der ekto-ADP-Ribosyltransferase (ART2), welche die ADP-Ribosylierung von Oberflächenproteinen katalysiert und auf diese alternative Weise auch P2X7 aktiviert [152, 156]. Die effektauslösenden NAD^+ Konzentrationen waren hierbei erheblich geringer als die für ATP. Vermutlich ist bereits die Menge des freigesetzten NAD^+ aus einer lytischen Nachbarzelle ausreichend. Zusätzlich war eine geringe Sensibilisierung des P2X7 für ATP zu beobachten.

Kürzlich konnten Aswad et al. zeigen, dass die Sensitivität verschiedener T-Zell Populationen für den ATP induzierten Zelltod unterschiedlich groß ist und direkt mit der Anzahl der exprimierten P2X7-Rezeptoren korreliert [93]. Interessanterweise zeigten $CD4^+CD25^+$ Treg unter den untersuchten T-Zell Subklassen ($CD4^+CD25^+$, $CD4^+CD25^-$, $CD8^+$) die stärkste P2X7-Expression und reagierten bereits bei 100 µM ATP mit einer deutlichen Zellzahlreduktion, und damit wesentlich früher als Teff. Vor diesem Hintergrund erscheint die massive Herunterregulation der Transkription des P2X7 gerade für Treg als ein eleganter Mechanismus, sich innerhalb des inflammatorischen Gewebes vor den zytotoxischen Substanzen ATP und NAD^+ zu schützen. Welche intrazellulären Signalwege und welche Transkriptionsfaktoren dabei eine Rolle spielen, ist bislang noch ungeklärt.

In einer FACS-Analyse mit monoklonalen P2X7-Antikörpern konnte diese Beobachtung allerdings nicht auf die Protein-Ebene übertragen werden (Abbildung 18). Wahrscheinlich spielen hier weitere Regulationsprozesse, entweder auf mRNA- und/oder auf Protein-Ebene eine Rolle.

5.2.3 Alterationen in der Genexpression von Adenosinrezeptoren auf ruhenden und aktivierten Treg

Es wurde bereits gezeigt, dass Teff den $A_{2a}R$ in hohem Maße exprimieren [102]. Die Expressionsstärke der übrigen Adenosinrezeptoren (A_1R, $A_{2b}R$, A_3R) lag hingegen deutlich darunter, teilweise nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze. Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der mRNA-Mengen in WT- und $CD73^{-/-}$-Treg zeigt, dass neben dem $A_{2a}R$ auch der A_3R ein stark exprimierter Adenosinrezeptor von Treg ist (Abbildung 10). Beide werden in etwa gleichem Maße sowohl von KO- als auch WT-Treg transkribiert, der A_1R und $A_{2b}R$ dagegen wesentlich schwächer.

Es ist bekannt, dass die Aktivierung des $A_{2a}R$ auf Teff die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-2, IFN-γ und TNF-β hemmt [157]. Eine aktuelle Studie unserer Arbeitsgruppe gab einen ersten umfassenden Überblick über die $A_{2a}R$-modulierte Sekretion von Zytokinen und Chemokinen in Teff und Treg [145]. Neben den bereits genannten Zytokinen fand sich eine massive Inhibition der Teff-Sekretion von IL-1α, IL-1β, IL-3, IL-4, IL-13, GM-CSF, CCL3 und CCL4. Da Zytokine und Chemokine untereinander komplexen Wechselwirkung ausgesetzt sind, kann allerdings nicht davon ausgegangen werden, dass alle beobachteten Effekte auch direkt auf die Adenosinwirkung am $A_{2a}R$ zurückzuführen sind.

Die $A_{2a}R$-Aktivierung auf Treg hingegen beeinflusste die Zytokin-/Chemokinfreisetzung nicht signifikant [145]. Aus weiteren Studien ist bekannt, dass die Aktivierung dieses Rezeptors die Zahl der Treg erhöht [92] und aus $A_{2a}R^{-/-}$ Mäusen isolierte Treg nicht im Stande waren, die von pathogenen Teff verursachten Autoimmunkrankheiten in $A_{2a}R^{+/+}$ Mäusen zu kontrollieren, wenn sie in diese transplantiert wurden [103]. Der Signalweg des $A_{2a}R$ scheint also unabhängig von der Zytokin-/Chemokinproduktion die Funktion von Treg zu modulieren. Generell ist über die Funktion und die Signalmechanismen von Adenosinrezeptoren auf Treg sehr wenig bekannt. Das betrifft auch den A_3R, dessen hohe Expression durch Treg nach heutigem Kenntnisstand erstmals in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Eine weitere interessante Beobachtung betrifft die signifikante Zunahme des basal niedrig exprimierten $A_{2b}R$ nach antigener Stimulierung der Treg (Abbildung 15). Zwar erreichte die Expressionsstärke nicht die des $A_{2a}R$, nahm aber doch deutlich auf das über 20fache des Ausgangswertes zu. Auf Grund seiner niedrigen Affinität zu Adenosin im Vergleich zu den übrigen Adenosinrezeptoren spielt er vermutlich unter physiologischen Bedingungen keine Rolle. Seine Hochregulation durch aktivierte Treg könnte aber Ausdruck seiner Bedeutungszunahme bei inflammatorischen Prozessen sein, in deren Rahmen große Nukleotidmengen freigesetzt werden und durch die Nukleotid/Nukleosid-Ektokaskade die perizelluläre Adenosinkonzentration erhöht wird.

5.2.4 Adenosin Transport über die Zellmembran ruhender und aktivierter Treg

Transmembrane Transportproteine ermöglichen einen Austausch hydrophiler Moleküle über die Phospholipidmembran eukaryotischer Zellen. Über im Gewebe breit verteilte Nukleosidtransporter kann Adenosin die Zellmembran überwinden (siehe auch Kapitel 1.4.8). Die hier durchgeführte Genanalyse zeigte, dass auch murine Treg diese Transporter exprimieren (Abbildung 10). Allen voran CNT2, ein Symporter, der Adenosin gekoppelt an den nach intrazellulär gerichteten Na^+-Gradienten vom Extrazellulärraum in das Zellinnere transportiert. Nach antigener Aktivierung nahm die Expression sowohl in WT- als auch in KO-Treg signifikant ab (Abbildung 15). Die Halbwertszeit von freiem Adenosin in humanem Plasma liegt im Sekunden-Bereich und ist somit sehr gering [158]. Diese ohnehin schon kurze extrazelluläre Verweildauer wird durch die zelluläre Adenosinaufnahme noch weiter gesenkt. Eine Verringerung der Transporterdichte würde also zumindest diesen Weg der extrazellulären Adenosinelimination bremsen. Dieser Überlegung entgegen steht das Vorhandensein anderer Nukleosidtransporter des äquilibrativen Typs (ENT). Diese Transporterfamilie ermöglicht Adenosin die erleichterte Diffusion über die Zellmembran entlang eines Konzentrationsgefälles. Untersuchungen am Herzmuskel haben gezeigt, dass unter ausreichender Oxygenierung der Adenosingradient von extrazellulär nach intrazellulär gerichtet ist [126]. Unter hypoxischen Bedingungen steigt die intrazelluläre Adenosin-Konzentration im Muskelgewebe und in Endothelzellen allerdings erheblich an [127-129], so dass es zu einer Flussumkehr über das ENT-System kommen könnte [159]. Hypoxie ist ein wichtiger Trigger für Entzündungsprozesse (s.u.). Es wäre demnach denkbar, dass auch Treg in hypoxisch-inflammatorischem Gewebe eine Adenosin-Freisetzung über ENT zeigen würden. Die signifikante Zunahme der ENT2-Genexpression in aktivierten WT-Treg (Abbildung 15) wäre eine sinnvolle Maßnahme, diesen Adenosin-Efflux zu verstärken.

5.2.5 Genexpression der Proteine des Adenin-Nukleosid/Nukleotid Signalweges durch $CD73^{-/-}$ Treg

Die CD73-defiziente Maus-Mutante besitzt einen veränderten Phänotyp, der sich besonders am Gefäßsystem manifestiert. Bereits unter physiologischen Bedingungen zeigt sich eine verminderte Barrierefunktion des Endothels [144]. Unter Sauerstoffmangel nimmt die verstärkte Gefäßdurchlässigkeit im Vergleich zu den Kontrolltieren weiter zu. Die Tatsache, dass der Promoter des CD73-Gens eine HIF-1 (Hypoxie-induzierter Faktor-1, ein Transkriptionsfaktor, der unter Sauerstoffmangel aktiviert wird und die Transkription zahlreicher Gene reguliert) *binding site* besitzt und es unter Hypoxie zu einer vermehrten CD73-Expression kommt [160, 161], lässt vermuten, dass CD73 eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Endothelfunktion unter Sauerstoffmangel spielt [73]. Mechanische

Gefäßverletzungen führten auf Endothelzellen von CD73$^{-/-}$ Mäusen zu einer verstärkten, NfκB-vermittelten Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1, was die extravasale Migration von Monozyten begünstigt [162]. Die Verwendung A_{2a}R-spezifischer Agonisten konnte diesen Effekt nahezu vollständig aufheben. Zudem zeigte sich in den CD73-defizienten Mäusen eine verstärkte Plättchenaggregation, die mit einer Verringerung des cAMP-Levels in den Thrombozyten einherging [136]. Der Abfall dieses typischen *second messengers* von Adenosin-Rezeptoren macht eine erniedrigte Plasma-Adenosinkonzentration als Ursache für die Effekte wahrscheinlich. Es zeigte sich außerdem eine verstärkte Leukozytenadhäsion an ischämisch vorgeschädigtem Endothel. Zusammenfassend legen diese Befunde nahe, dass CD73-defiziente Mäuse einen proinflammatorischen Phänotyp zeigen, der sich nach bisherigen Erkenntnissen vor allem am Gefäßsystem manifestiert. Es erscheint wahrscheinlich, dass an diesen Prozessen die verminderte Adenosin-Bildung durch den Wegfall der Ekto-5'-Nukleotidase beteiligt ist.

Hieraus erfolgte die Überlegung im Vorfeld dieser wissenschaftlichen Arbeit, ob das Fehlen dieses Taktgeber-Enzyms der CD39/CD73-Ektokaskade eine veränderte Genexpression der übrigen Enzyme, Rezeptoren und Transporter des Adenin-Nukleosid/Nukleotid Stoffwechselweges in murinen Treg bewirkt. Diese Frage muss in Anbetracht der Ergebnisse mit nein beantwortet werden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen KO-Treg und WT-Treg (Abbildung 11). Auch in Anwesenheit von Substrat (AMP, Abbildung 13) oder nach antigener Zellstimulierung (Abbildung 16) zeigten sich keine veränderten Genexpressionsraten. Eine kompensatorische Bedeutungszunahme alternativer Metabolisierungswege für Adenin-Nukleotide scheint demnach, zumindest auf genomischer Ebene, in murinen KO-Treg nicht stattzufinden.

5.2.6 Zusammenhängendes Gesamtbild der Erkenntnisse aus der quantitativen Genanalyse muriner Treg

Abbildung 20 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse der quantitativen Analyse der Genexpression von Enzymen, Rezeptoren und Transportern des Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Signalweges muriner Treg.

Natürlich vorkommende Treg zeichnen sich durch den TZR-assoziierten Korezeptor CD4, sowie CD25, der α-Kette des IL-2-Rezeptors, aus. Zudem tragen sie den Transkriptionsfaktor FoxP3. Treg exprimieren die Ektokaskade aus CD39 und CD73, welche ATP schrittweise zu Adenosin hydrolysiert und neuerdings als Marker für natürlich vorkommende Treg gilt.

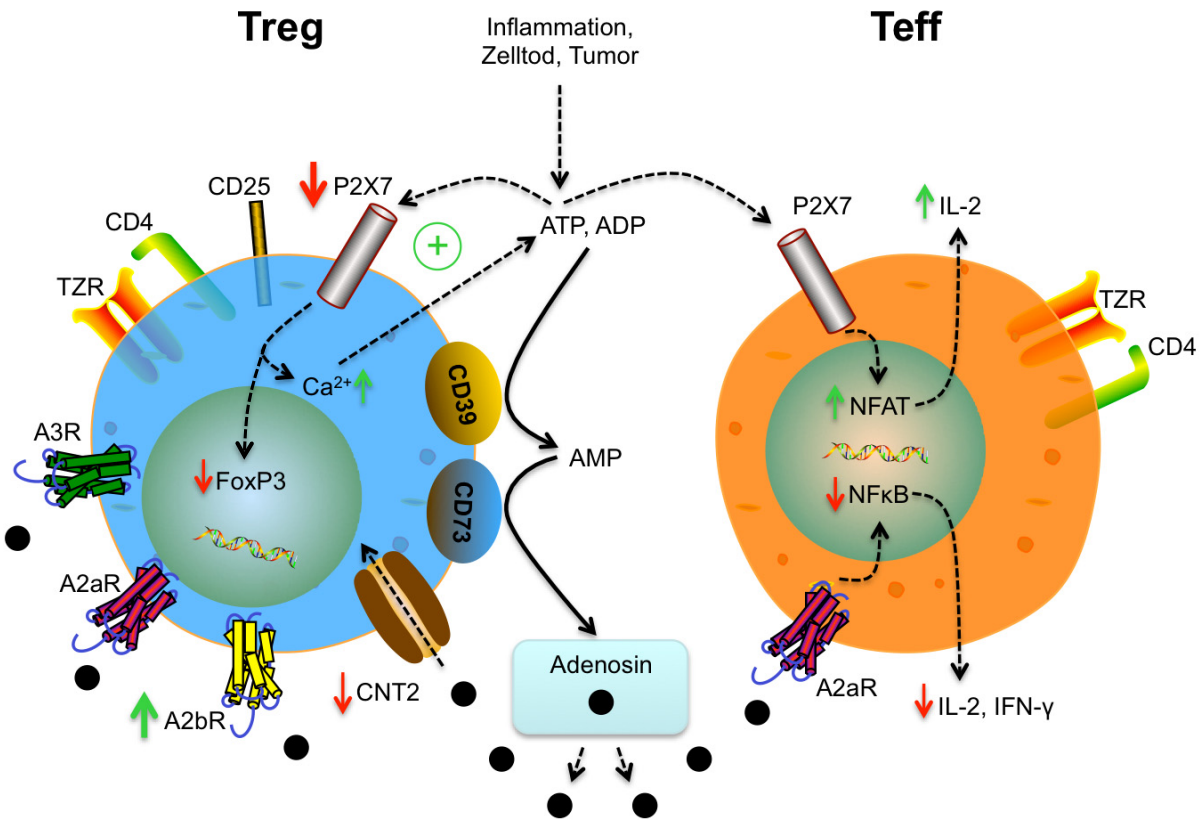

Abbildung 20: Übersicht über die funktionellen Zusammenhänge der wichtigsten Befunde aus der quantitativen Genanalyse muriner Treg

Von den hier untersuchten Genen wird CD73 mit Abstand am stärksten transkribiert. Die von diesem Gen kodierte Ekto-5'-Nukleotidase, CD73, dephosphoryliert AMP und gehört zu den wichtigsten Lieferanten extrazellulären Adenosins durch Treg. Die vorgeschaltete NTPDase CD39 baut ATP und ADP zu AMP ab. Trotz der geringeren Expression ist CD39 vermutlich nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Ektokaskade, da zum einen die enzymatische Aktivität höher als die von CD73 ist und zum anderen weitere Quellen von extrazellulärem AMP zur Verfügung stehen. Das gebildete Adenosin wirkt über Adenosinrezeptoren autokrin auf Treg und parakrin auf Teff. Bereits unter basalen Bedingungen exprimieren Teff und Treg den $A_{2a}R$ auf hohem Niveau. In Teff führte die $A_{2a}R$-Aktivierung zu einer Hemmung der nuklearen Translokation von NfκB und gleichzeitig zu einer reduzierten Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-2 und IFN-γ [145]. Nach antigener Aktivierung der Treg stieg die Expression des basal niedrig transkribierten $A_{2b}R$ deutlich an. Die funktionelle Bedeutung dieses Rezeptors auf regulatorischen T-Zellen ist bislang noch unklar.

Das primäre Substrat der Ektokaskade, ATP, wird bei Zelllysen in großen Mengen frei. Außerdem wird ATP durch verschiedene Zellen auf nicht lytischem Wege freigesetzt und agiert vor allem in inflammatorischen Geweben über Nukleotid-Rezeptoren als

proinflammatorischer Stimmulus. Ein solcher Rezeptor ist der auf Treg und Teff prominent exprimierte Rezeptor P2X7, dessen Aktivierung die Bildung von NFAT fördert und Teff über eine verstärkte Zytokinproduktion zur Proliferation anregt. Zudem stellt die P2X7-Aktivierung auf T-Zellen eine positive *feedback*-Schleife dar, in der es über eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration zu einer weiteren ATP-Ausschüttung kommt, das wieder auto- und parakrin wirken kann. Auf Treg bewirkt P2X7 eine verringerte FoxP3-Expression und eine Umdifferenzierung zu Teff. Bei hohen pathologischen ATP-Konzentrationen stellt P2X7 ein Apoptose auslösendes *danger signal* dar. Je mehr P2X7 von einer Zelle exprimiert wird, desto eher wird sie bei hohen ATP-Konzentrationen apoptotisch. Die hier beobachtete Herunterregulierung der P2X7-Genexpression scheint ein Mechanismus zu sein, mit dem aktivierte Treg an Orten intensiver Entzündung der Apoptose entkommen können.
Die Halbwertszeit von freiem Adenosin im Gewebe ist sehr gering. Eine Hemmung der Genexpression des Adenosintransporters CNT2 könnte den zelleinwärts gerichteten Adenosintransport vermindern und für eine erhöhte parazelluläre Konzentration sorgen. Die an Kardiomyozyten gemachte Beobachtung einer unter Hypoxie stark steigenden intrazellulären Adenosinkonzentration, könnte auch auf Treg zu einer Flussumkehr im äquilibrativen Transportsystem (ENT) nach zellauswärts führen und so zu einer vermehrten parakrinen Wirksamkeit des Adenosins beitragen.

5.3 Zytokinsekretion aktivierter muriner WT- und CD73$^{-/-}$-Treg

Es ist bekannt, dass regulatorische T-Lymphozyten die inhibitorischen Zytokine TGF-β und IL-10 sezernieren [35]. Auch wenn die Datenlage noch widersprüchlich ist, scheinen diese Zytokine einen Anteil an der suppressiven Kompetenz von Treg zu haben (siehe Kapitel 1.3.2.1). Zudem spielt TGF-β eine Rolle bei der Reifung peripher induzierter Treg [23]. Die Quantifizierung der Zytokinsekretion aktivierter Treg sollte die Frage klären, ob CD73-*knockout* Mäuse auf die verminderte extrazelluläre Adenosinproduktion mit einem veränderten Zytokinmuster reagieren. Es fand sich eine geringe Zunahme der IL-10 Sekretion der CD73$^{-/-}$-Treg gegenüber dem Wildtyp. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant. Die tendenzielle Zunahme des IL-10 Gehaltes könnte Ausdruck einer Kompensation der eingeschränkten Adenosinproduktion sein. Bei der TGF-β Produktion zeigten sich keine Unterschiede. Allerdings kommt TGF-β auf Treg auch als membrangebundene Form vor und die Signalwirkung erfolgt teilweise durch direkten Zell-Zell-Kontakt [47, 48]. Da hier mit zentrifugierten Zellüberständen gearbeitet wurde, entging diese gebundene Zytokinfraktion dem Nachweis durch ELISA.

6 Zusammenfassung

Adenosin entsteht im Organismus durch Dephosphorylierung von ATP, einem wichtigen Energieträger der Zelle. Gleichzeitig ist ATP auch ein potenter proinflammatorischer Mediator. Regulatorische T-Zellen (Treg) besitzen eine Ektokaskade aus den Enzymen CD39 und CD73, die schrittweise ATP zu Adenosin abbaut. Über den auf Effektor T-Lymphozyten (Teff), zu denen zytotoxische T-Zellen sowie T-Helfer Zellen zählen, hoch exprimierten A_{2a} Adenosinrezeptor ($A_{2a}R$) bewirkt dieses Adenosin eine Dämpfung der zellulären Immunantwort. Zellaktivierung, Proliferation sowie die Produktion proinflammatorischer Zytokine der Teff werden inhibiert.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob und in welchem Verhältnis zueinander weitere an diesem Adenin-Nukleotid/Nukleosid Signalweg beteiligten Enzyme, Rezeptoren und Transporter durch Treg exprimiert werden und ob es Unterschiede in ruhenden oder aktivierten Treg gibt. Darüber hinaus wurde der Frage nachgegangen, ob sich das Fehlen des Schlüsselenzyms der Kaskade, der Ekto-5'-Nukleotidase CD73, auf das Expressionsverhalten anderer beteiligter Proteine auswirkt und ob CD73-defiziente Treg Unterschiede in der Produktion proinflammatorischer Zytokine zeigen.

Als zelluläre Grundlage dienten Treg isoliert aus einer CD73 defizienten Mausmutante sowie wildtypischer Kontrolltiere. Die wesentlichen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: CD73 ist ein durch Treg hoch exprimiertes Gen. Werden Treg mit CD3 und CD28 Antikörpern stimuliert, nimmt die Proteinexpression von CD73 auf der Zelloberfläche deutlich zu. Die Genexpression des Nukleotid-Rezeptors P2X7 hingegen verringert sich in aktivierten Treg signifikant. P2X7 ist ein proinflammatorisch wirkender Rezeptor, dessen Aktivierung Treg zu Teff umdifferenzieren lässt oder, bei stärkerer Stimulierung, Apoptose induzieren kann. Darüber hinaus wurde eine signifikante Zunahme des basal niedrig exprimierten Adenosinrezeptors $A_{2b}R$ in stimulierten Treg beobachtet, die eine Bedeutungszunahme dieses Rezeptors an Orten inflammatorischer Reaktionen vermuten lässt. Die Abnahme der Genexpression des Adenosintransporters CNT2 könnte den zelleinwärts gerichteten Adenosintransport vermindern und für eine erhöhte parazelluläre Konzentration sorgen. CD73-defizienten Treg zeigen kein verändertes Sekretionsmuster der immunsuppressiv wirkenden Zytokine IL-10 und TGF-β. Das Fehlen von CD73 auf Treg bewirkt keine veränderte Genexpression alternativer Metabolisierungswege.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass eine Treg-Aktivierung eine Veränderung der genomischen Expressionsmuster von Enzymen, Rezeptoren und Transportern des Ekto-Adenin-Nukleotid/Nukleosid Signalweges bewirkt und so möglicherweise zu einer erhöhten Resistenz gegenüber zellschädigende Stimuli an Orten inflammatorischen Geschehens führt.

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Immunmodulatorische Mechanismen regulatorischer T-Zellen (modifiziert nach Vignali et al. 2008) 8

Abbildung 2: Extrazellulärer Abbauweg von ATP zu Inosin 11

Abbildung 3: Der ekto-Adenin-Nukleotid/Nukleosid Signalweg. 12

Abbildung 4: QuadroMACS™ Separation Unit befestigt am MACS® MultiStand mit LS Columns; mit freundlicher Genehmigung von Miltenyi Biotec 20

Abbildung 5: Schematische Darstellung des TZR und assoziiertem CD28-Korezeptor mit ihren Signalkaskaden. 28

Abbildung 6: Quantitative Analyse der nativen Splenozyten: Färbung mit anti-CD4/anti-CD25. 31

Abbildung 7: Quantitative Analyse der magnetisch separierten Treg: (A) Färbung mit anti-CD4/anti-CD25, (B) Isotypkontrolle CD4, (C) Färbung mit ant-CD4/anti-FoxP3, (D) Isotypkontrolle FoxP3. 31

Abbildung 8: Quantitative Analyse der magnetisch separierten Treg: (A) Färbung mit anti-CD4/anti-CD73, (B) Färbung mit anti-FoxP3/anti-CD73. 32

Abbildung 9: Auftrennung spezifischer DNA-Fragmente der am Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Signalweg beteiligten Enzyme, Rezeptoren und Transporter nach der Amplifikation mittels rt-PCR in einem 2%igen Agarosegel. Als Standard diente eine 50-bp-DNA-Leiter. Angegeben sind die theoretisch errechneten Produktlängen in Basenpaaren (bp). Die Analyse erfolgte mit isolierten Treg Zellen aus WT und $CD73^{-/-}$ Mäusen. 33

Abbildung 10: Genexpression der am Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Signalweg beteiligten Enzyme, Rezeptoren und Transporter von Treg Zellen isoliert aus WT (weiße Balken) und $CD73^{-/-}$ Mäusen (graue Balken). Die Genexpression ist relativ zu der von β-Aktin dargestellt. Mittelwert + SD. 35

Abbildung 11: Genexpression der am Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Signalweg beteiligten Enzyme, Rezeptoren und Transporter von Treg Zellen isoliert aus CD73$^{-/-}$ Mäusen (graue Balken) in Relation zu der von Treg aus WT Mäusen (gestrichelte Linie). Mittelwert + SD...36

Abbildung 12: Genexpression der am Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Signalweg beteiligten Enzyme, Rezeptoren und Transporter von Treg Zellen isoliert aus WT (weiße Balken) und CD73$^{-/-}$ Mäusen (graue Balken). Die Genexpression ist relativ zu der von β-Aktin dargestellt. Die Versuche wurden in Anwesenheit von 5 µM AMP durchgeführt. Mittelwert + SD. 37

Abbildung 13: Genexpression der am Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Signalweg beteiligten Enzyme, Rezeptoren und Transporter von Treg Zellen isoliert aus CD73$^{-/-}$ Mäusen (graue Balken) in Relation zu der von Treg aus WT Mäusen (gestrichelte Linie). Die Versuche wurden in Anwesenheit von 5 µM AMP durchgeführt. Mittelwert + SD. 38

Abbildung 14: Änderung der Genexpression verschiedener Enzyme, Rezeptoren und Transporter der Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Kaskade nach antigener Stimulierung von wildtypischen Treg Zellen in Relation zu Basalbedingungen (gestrichelte Linie). Anti-CD3/-CD28 Stimulierung für 18 h. Mittelwert + SD. ** $p \leq 0{,}01$. * $p \leq 0{,}05$.....39

Abbildung 15: Änderung der Genexpression verschiedener Enzyme, Rezeptoren und Transporter der Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Kaskade nach antigener Stimulierung von CD73$^{-/-}$ Treg Zellen in Relation zu Basalbedingungen (gestrichelte Linie). Anti-CD3/-CD28 Stimulierung für 18 h. Mittelwert + SD. ** $p \leq 0{,}01$. * $p \leq 0{,}05$.....40

Abbildung 16: Genexpression der Enzyme, Rezeptoren und Transporter der Ekto-Adenin-Nukleosid/Nukleotid Kaskade nach antigener Stimulierung von Treg Zellen isoliert aus CD73$^{-/-}$ Mäusen (graue Balken) in Relation zu der von Treg aus WT Mäusen (gestrichelte Linie). Anti-CD3/-CD28 Stimulation für 18 h. Mittelwert + SD.....41

Abbildung 17: Quantitative Analyse der Proteinexpression auf der Zelloberfläche von Treg, isoliert aus WT Mäusen. Repräsentative Histogramme; schwarze Linie: unstimulierte Treg Zellen, rote Linie: Treg Zellen nach 18 h Stimulierung mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern. 42

Abbildung 18: Quantitative Analyse der Proteinexpression auf der Zelloberfläche von Treg, isoliert aus WT Mäusen. Mittlere Fluoreszenzintensität; weißer Balkenteil: unstimulierte Treg Zellen, grauer Balkenteil: Treg Zellen nach 18 h Stimulierung mit anti-CD3 und anti-CD28

Antikörpern. Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten (angezeigt durch schwarze Punkte). 43

Abbildung 19: Zytokinsekretion (IL-10, TGF-β) durch Treg-Zellen isoliert aus WT (weißer Balken) und CD73$^{-/-}$(grauer Balken) Mäusen nach 18 h Stimulierung mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern. Mittelwert ± SD. 44

Abbildung 20: Übersicht über die funktionellen Zusammenhänge der wichtigsten Befunde aus der quantitativen Genanalyse muriner Treg 52

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Komponenten des Immunsystems 2

Tabelle 2: Mechanismen der Immuntoleranz 3

Tabelle 3: Adenosinrezeptoren und ihre intrazellulären Effekte 14

Tabelle 4: Verwendete Primer mit Angaben der Produktlängen 77

8 Literaturverzeichnis

1. Janeway, C., Murphy, K.P., Travers, P. and Walport, M.J., *Janeway's immunobiology*. 7. ed2008, New York and London: Garland Science. XXI, 887 S.

2. Arstila, T.P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J. and Kourilsky, P., A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science*, 1999. 286(5441): p. 958-61.

3. Hogquist, K.A., Tomlinson, A.J., Kieper, W.C., McGargill, M.A., Hart, M.C., Naylor, S. and Jameson, S.C., Identification of a naturally occurring ligand for thymic positive selection. *Immunity*, 1997. 6(4): p. 389-99.

4. Huesmann, M., Scott, B., Kisielow, P. and von Boehmer, H., Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice. *Cell*, 1991. 66(3): p. 533-40.

5. Stefanski, H.E., Mayerova, D., Jameson, S.C. and Hogquist, K.A., A low affinity TCR ligand restores positive selection of CD8+ T cells in vivo. *J Immunol*, 2001. 166(11): p. 6602-7.

6. Kappler, J.W., Roehm, N. and Marrack, P., T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*, 1987. 49(2): p. 273-80.

7. Kishimoto, H. and Sprent, J., Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *J Exp Med*, 1997. 185(2): p. 263-71.

8. Stockinger, B., T lymphocyte tolerance: from thymic deletion to peripheral control mechanisms. *Adv Immunol*, 1999. 71: p. 229-65.

9. Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B. and Klein, L., Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol*, 2001. 2(11): p. 1032-9.

10. Bouneaud, C., Kourilsky, P. and Bousso, P., Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity*, 2000. 13(6): p. 829-40.

11. Mason, D., Some quantitative aspects of T-cell repertoire selection: the requirement for regulatory T cells. *Immunol Rev*, 2001. 182: p. 80-8.

12. Kurts, C., Sutherland, R.M., Davey, G., Li, M., Lew, A.M., Blanas, E., Carbone, F.R., Miller, J.F. and Heath, W.R., CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(22): p. 12703-7.

13. Zinkernagel, R.M., Immunology taught by viruses. *Science*, 1996. 271(5246): p. 173-8.

14. Lin, J. and Weiss, A., T cell receptor signalling. *Journal of cell science*, 2001. 114(Pt 2): p. 243-4.

15. Perez, V.L., Van Parijs, L., Biuckians, A., Zheng, X.X., Strom, T.B. and Abbas, A.K., Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity*, 1997. 6(4): p. 411-7.

16. Walunas, T.L. and Bluestone, J.A., CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo. *J Immunol*, 1998. 160(8): p. 3855-60.

17. Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. and Nagata, S., Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, 1993. 75(6): p. 1169-78.

18. Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Nagata, S., Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, 1992. 356(6367): p. 314-7.

19. Nishizuka, Y. and Sakakura, T., Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesia of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*, 1969. 166(906): p. 753-5.

20. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M., Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 1995. 155(3): p. 1151-64.

21. Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L. and von Boehmer, H., Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol*, 2002. 3(8): p. 756-63.

22. Jordan, M.S., Boesteanu, A., Reed, A.J., Petrone, A.L., Holenbeck, A.E., Lerman, M.A., Naji, A. and Caton, A.J., Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol*, 2001. 2(4): p. 301-6.

23. Buckner, J.H., Mechanisms of impaired regulation by CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nature Reviews Immunology*, 2010. 10(12): p. 849-859.

24. Fontenot, J.D., Gavin, M.A. and Rudensky, A.Y., Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2003. 4(4): p. 330-6.

25. Hori, S., Nomura, T. and Sakaguchi, S., Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003. 299(5609): p. 1057-61.

26. Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F. and Ochs, H.D., The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*, 2001. 27(1): p. 20-1.

27. Bacchetta, R., Passerini, L., Gambineri, E., Dai, M., Allan, S.E., Perroni, L., Dagna-Bricarelli, F., Sartirana, C., Matthes-Martin, S., Lawitschka, A., Azzari, C., Ziegler, S.F., Levings, M.K. and Roncarolo, M.G., Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest*, 2006. 116(6): p. 1713-22.

28. Singh, B., Read, S., Asseman, C., Malmstrom, V., Mottet, C., Stephens, L.A., Stepankova, R., Tlaskalova, H. and Powrie, F., Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol Rev*, 2001. 182: p. 190-200.

29. Joetham, A., Takeda, K., Taube, C., Miyahara, N., Matsubara, S., Koya, T., Rha, Y.H., Dakhama, A. and Gelfand, E.W., Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J Immunol*, 2007. 178(3): p. 1433-42.

30. Kearley, J., Robinson, D.S. and Lloyd, C.M., CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2008. 122(3): p. 617-24 e6.

31. Ait-Oufella, H., Salomon, B.L., Potteaux, S., Robertson, A.K., Gourdy, P., Zoll, J., Merval, R., Esposito, B., Cohen, J.L., Fisson, S., Flavell, R.A., Hansson, G.K., Klatzmann, D., Tedgui, A. and Mallat, Z., Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med*, 2006. 12(2): p. 178-80.

32. Kretschmer, K., Apostolou, I., Jaeckel, E., Khazaie, K. and von Boehmer, H., Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. *Immunol Rev*, 2006. 212: p. 163-9.

33. Wang, H.Y. and Wang, R.F., Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol*, 2007. 19(2): p. 217-23.

34. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M. and Hafler, D.A., FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature reviews. Immunology*, 2010. 10(7): p. 490-500.

35. Vignali, D.A., Collison, L.W. and Workman, C.J., How regulatory T cells work. *Nature reviews. Immunology*, 2008. 8(7): p. 523-32.

36. Janson, P.C., Winerdal, M.E., Marits, P., Thorn, M., Ohlsson, R. and Winqvist, O., FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. *PLoS One*, 2008. 3(2): p. e1612.

37. Thornton, A.M., Korty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y. and Shevach, E.M., Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol*, 2010. 184(7): p. 3433-41.

38. Tran, D.Q., Ramsey, H. and Shevach, E.M., Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood*, 2007. 110(8): p. 2983-90.

39. Groux, H., Bigler, M., de Vries, J.E. and Roncarolo, M.G., Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med*, 1996. 184(1): p. 19-29.

40. Weiner, H.L., Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*, 2001. 182: p. 207-14.

41. Duarte, J.H., Zelenay, S., Bergman, M.L., Martins, A.C. and Demengeot, J., Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *Eur J Immunol*, 2009. 39(4): p. 948-55.

42. Komatsu, N., Mariotti-Ferrandiz, M.E., Wang, Y., Malissen, B., Waldmann, H. and Hori, S., Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: A committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. 106(6): p. 1903-1908.

43. Tsuji, M., Komatsu, N., Kawamoto, S., Suzuki, K., Kanagawa, O., Honjo, T., Hori, S. and Fagarasan, S., Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science*, 2009. 323(5920): p. 1488-92.

44. Zhou, L., Chong, M.M. and Littman, D.R., Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*, 2009. 30(5): p. 646-55.

45. Fahlen, L., Read, S., Gorelik, L., Hurst, S.D., Coffman, R.L., Flavell, R.A. and Powrie, F., T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med*, 2005. 201(5): p. 737-46.

46. Li, M.O., Wan, Y.Y. and Flavell, R.A., T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity*, 2007. 26(5): p. 579-91.

47. Green, E.A., Gorelik, L., McGregor, C.M., Tran, E.H. and Flavell, R.A., CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(19): p. 10878-83.

48. Nakamura, K., Kitani, A. and Strober, W., Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *The Journal of experimental medicine*, 2001. 194(5): p. 629-44.

49. Piccirillo, C.A., Letterio, J.J., Thornton, A.M., McHugh, R.S., Mamura, M., Mizuhara, H. and Shevach, E.M., CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med*, 2002. 196(2): p. 237-46.

50. Annacker, O., Asseman, C., Read, S. and Powrie, F., Interleukin-10 in the regulation of T cell-induced colitis. *J Autoimmun*, 2003. 20(4): p. 277-9.

51. Hawrylowicz, C.M. and O'Garra, A., Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nature reviews. Immunology*, 2005. 5(4): p. 271-83.

52. Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L. and O'Garra, A., Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*, 2001. 19: p. 683-765.

53. Arock, M., Zuany-Amorim, C., Singer, M., Benhamou, M. and Pretolani, M., Interleukin-10 inhibits cytokine generation from mast cells. *Eur J Immunol*, 1996. 26(1): p. 166-70.

54. Royer, B., Varadaradjalou, S., Saas, P., Guillosson, J.J., Kantelip, J.P. and Arock, M., Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 2001. 31(5): p. 694-704.

55. Takanaski, S., Nonaka, R., Xing, Z., O'Byrne, P., Dolovich, J. and Jordana, M., Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *J Exp Med*, 1994. 180(2): p. 711-5.

56. Buelens, C., Verhasselt, V., De Groote, D., Thielemans, K., Goldman, M. and Willems, F., Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. *Eur J Immunol*, 1997. 27(3): p. 756-62.

57. de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M.G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H. and de Vries, J.E., Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*, 1991. 174(4): p. 915-24.

58. Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T.R., Howard, M., Moore, K.W. and O'Garra, A., IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol*, 1991. 146(10): p. 3444-51.

59. Lieberman, J., The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature reviews. Immunology*, 2003. 3(5): p. 361-70.

60. Gondek, D.C., Lu, L.F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S. and Noelle, R.J., Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*, 2005. 174(4): p. 1783-6.

61. Cao, X., Cai, S.F., Fehniger, T.A., Song, J., Collins, L.I., Piwnica-Worms, D.R. and Ley, T.J., Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*, 2007. 27(4): p. 635-46.

62. Zhao, D.M., Thornton, A.M., DiPaolo, R.J. and Shevach, E.M., Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*, 2006. 107(10): p. 3925-32.

63. Bluestone, J.A. and Tang, Q., How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol*, 2005. 17(6): p. 638-42.

64. Tadokoro, C.E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A.C., Maraver, A., Lafaille, J.J. and Dustin, M.L., Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med*, 2006. 203(3): p. 505-11.

65. Tang, Q., Adams, J.Y., Tooley, A.J., Bi, M., Fife, B.T., Serra, P., Santamaria, P., Locksley, R.M., Krummel, M.F. and Bluestone, J.A., Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol*, 2006. 7(1): p. 83-92.

66. Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.L. and Puccetti, P., Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2003. 4(12): p. 1206-12.

67. Mellor, A.L. and Munn, D.H., IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature reviews. Immunology*, 2004. 4(10): p. 762-74.

68. Cederbom, L., Hall, H. and Ivars, F., CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol*, 2000. 30(6): p. 1538-43.

69. Houot, R., Perrot, I., Garcia, E., Durand, I. and Lebecque, S., Human CD4+CD25high regulatory T cells modulate myeloid but not plasmacytoid dendritic cells activation. *J Immunol*, 2006. 176(9): p. 5293-8.

70. Lewkowich, I.P., Herman, N.S., Schleifer, K.W., Dance, M.P., Chen, B.L., Dienger, K.M., Sproles, A.A., Shah, J.S., Kohl, J., Belkaid, Y. and Wills-Karp, M., CD4+CD25+

T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med*, 2005. 202(11): p. 1549-61.

71. Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M.D. and Kaveri, S.V., Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol*, 2004. 172(8): p. 4676-80.

72. Kobie, J.J., Shah, P.R., Yang, L., Rebhahn, J.A., Fowell, D.J. and Mosmann, T.R., 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*, 2006. 177(10): p. 6780-6.

73. Eltzschig, H.K., Ibla, J.C., Furuta, G.T., Leonard, M.O., Jacobson, K.A., Enjyoji, K., Robson, S.C. and Colgan, S.P., Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *J Exp Med*, 2003. 198(5): p. 783-96.

74. Zimmermann, H., 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *The Biochemical journal*, 1992. 285 (Pt 2): p. 345-65.

75. Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V.K., Strom, T.B. and Robson, S.C., Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine*, 2007. 204(6): p. 1257-65.

76. Gachet, C., Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2006. 46: p. 277-300.

77. Arciero, J.C., Carlson, B.E. and Secomb, T.W., Theoretical model of metabolic blood flow regulation: roles of ATP release by red blood cells and conducted responses. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2008. 295(4): p. H1562-71.

78. Eltzschig, H.K., Eckle, T., Mager, A., Kuper, N., Karcher, C., Weissmuller, T., Boengler, K., Schulz, R., Robson, S.C. and Colgan, S.P., ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ Res*, 2006. 99(10): p. 1100-8.

79. Wong, C.W., Christen, T., Roth, I., Chadjichristos, C.E., Derouette, J.P., Foglia, B.F., Chanson, M., Goodenough, D.A. and Kwak, B.R., Connexin37 protects against atherosclerosis by regulating monocyte adhesion. *Nat Med*, 2006. 12(8): p. 950-4.

80. Schenk, U., Westendorf, A.M., Radaelli, E., Casati, A., Ferro, M., Fumagalli, M., Verderio, C., Buer, J., Scanziani, E. and Grassi, F., Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Science signaling*, 2008. 1(39): p. ra6.

81. Burnstock, G., Purinergic signalling. *Br J Pharmacol*, 2006. 147 Suppl 1: p. S172-81.

82. Chen, Y., Corriden, R., Inoue, Y., Yip, L., Hashiguchi, N., Zinkernagel, A., Nizet, V., Insel, P.A. and Junger, W.G., ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science*, 2006. 314(5806): p. 1792-5.

83. Jarvis, M.F. and Khakh, B.S., ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology*, 2009. 56(1): p. 208-15.

84. Yip, L., Woehrle, T., Corriden, R., Hirsh, M., Chen, Y., Inoue, Y., Ferrari, V., Insel, P.A. and Junger, W.G., Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J*, 2009. 23(6): p. 1685-93.

85. Loomis, W.H., Namiki, S., Ostrom, R.S., Insel, P.A. and Junger, W.G., Hypertonic stress increases T cell interleukin-2 expression through a mechanism that involves ATP release, P2 receptor, and p38 MAPK activation. *J Biol Chem*, 2003. 278(7): p. 4590-6.

86. Yu, T., Junger, W.G., Yuan, C., Jin, A., Zhao, Y., Zheng, X., Zeng, Y. and Liu, J., Shockwaves increase T-cell proliferation and IL-2 expression through ATP release, P2X7 receptors, and FAK activation. *American journal of physiology. Cell physiology*, 2010. 298(3): p. C457-64.

87. Hasko, G., Linden, J., Cronstein, B. and Pacher, P., Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 2008. 7(9): p. 759-70.

88. Erdmann, A.A., Gao, Z.G., Jung, U., Foley, J., Borenstein, T., Jacobson, K.A. and Fowler, D.H., Activation of Th1 and Tc1 cell adenosine A2A receptors directly inhibits

IL-2 secretion in vitro and IL-2-driven expansion in vivo. *Blood*, 2005. 105(12): p. 4707-14.

89. Huang, S., Apasov, S., Koshiba, M. and Sitkovsky, M., Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood*, 1997. 90(4): p. 1600-10.

90. Lappas, C.M., Rieger, J.M. and Linden, J., A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4+ T cells. *J Immunol*, 2005. 174(2): p. 1073-80.

91. Ohta, A. and Sitkovsky, M., Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*, 2001. 414(6866): p. 916-20.

92. Zarek, P.E., Huang, C.T., Lutz, E.R., Kowalski, J., Horton, M.R., Linden, J., Drake, C.G. and Powell, J.D., A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*, 2008. 111(1): p. 251-9.

93. Aswad, F. and Dennert, G., P2X7 receptor expression levels determine lethal effects of a purine based danger signal in T lymphocytes. *Cell Immunol*, 2006. 243(1): p. 58-65.

94. Jacobson, K.A. and Gao, Z.G., Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. 5(3): p. 247-64.

95. Tawfik, H.E., Schnermann, J., Oldenburg, P.J. and Mustafa, S.J., Role of A1 adenosine receptors in regulation of vascular tone. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2005. 288(3): p. H1411-6.

96. Fredholm, B.B., AP, I.J., Jacobson, K.A., Klotz, K.N. and Linden, J., International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*, 2001. 53(4): p. 527-52.

97. Merrill, J.T., Shen, C., Schreibman, D., Coffey, D., Zakharenko, O., Fisher, R., Lahita, R.G., Salmon, J. and Cronstein, B.N., Adenosine A1 receptor promotion of multinucleated giant cell formation by human monocytes: a mechanism for methotrexate-induced nodulosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1997. 40(7): p. 1308-15.

98. Priebe, T., Platsoucas, C.D. and Nelson, J.A., Adenosine receptors and modulation of natural killer cell activity by purine nucleosides. *Cancer Res*, 1990. 50(14): p. 4328-31.

99. Cronstein, B.N., Levin, R.I., Philips, M., Hirschhorn, R., Abramson, S.B. and Weissmann, G., Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors. *J Immunol*, 1992. 148(7): p. 2201-6.

100. Bouma, M.G., Jeunhomme, T.M., Boyle, D.L., Dentener, M.A., Voitenok, N.N., van den Wildenberg, F.A. and Buurman, W.A., Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors. *J Immunol*, 1997. 158(11): p. 5400-8.

101. Revan, S., Montesinos, M.C., Naime, D., Landau, S. and Cronstein, B.N., Adenosine A2 receptor occupancy regulates stimulated neutrophil function via activation of a serine/threonine protein phosphatase. *J Biol Chem*, 1996. 271(29): p. 17114-8.

102. Lukashev, D.E., Smith, P.T., Caldwell, C.C., Ohta, A., Apasov, S.G. and Sitkovsky, M.V., Analysis of A2a receptor-deficient mice reveals no significant compensatory increases in the expression of A2b, A1, and A3 adenosine receptors in lymphoid organs. *Biochemical pharmacology*, 2003. 65(12): p. 2081-90.

103. Naganuma, M., Wiznerowicz, E.B., Lappas, C.M., Linden, J., Worthington, M.T. and Ernst, P.B., Cutting edge: Critical role for A2A adenosine receptors in the T cell-mediated regulation of colitis. *J Immunol*, 2006. 177(5): p. 2765-9.

104. Minguet, S., Huber, M., Rosenkranz, L., Schamel, W.W., Reth, M. and Brummer, T., Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors. *Eur J Immunol*, 2005. 35(1): p. 31-41.

105. Yang, D., Zhang, Y., Nguyen, H.G., Koupenova, M., Chauhan, A.K., Makitalo, M., Jones, M.R., St Hilaire, C., Seldin, D.C., Toselli, P., Lamperti, E., Schreiber, B.M., Gavras, H., Wagner, D.D. and Ravid, K., The A2B adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion. *J Clin Invest*, 2006. 116(7): p. 1913-23.

106. Fredholm, B.B., Irenius, E., Kull, B. and Schulte, G., Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochemical pharmacology*, 2001. 61(4): p. 443-8.

107. Fredholm, B.B., Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ*, 2007. 14(7): p. 1315-23.

108. Salvatore, C.A., Tilley, S.L., Latour, A.M., Fletcher, D.S., Koller, B.H. and Jacobson, M.A., Disruption of the A(3) adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells. *J Biol Chem*, 2000. 275(6): p. 4429-34.

109. Zhong, H., Shlykov, S.G., Molina, J.G., Sanborn, B.M., Jacobson, M.A., Tilley, S.L. and Blackburn, M.R., Activation of murine lung mast cells by the adenosine A3 receptor. *J Immunol*, 2003. 171(1): p. 338-45.

110. Baharav, E., Bar-Yehuda, S., Madi, L., Silberman, D., Rath-Wolfson, L., Halpren, M., Ochaion, A., Weinberger, A. and Fishman, P., Antiinflammatory effect of A3 adenosine receptor agonists in murine autoimmune arthritis models. *J Rheumatol*, 2005. 32(3): p. 469-76.

111. Bar-Yehuda, S., Silverman, M.H., Kerns, W.D., Ochaion, A., Cohen, S. and Fishman, P., The anti-inflammatory effect of A3 adenosine receptor agonists: a novel targeted therapy for rheumatoid arthritis. *Expert opinion on investigational drugs*, 2007. 16(10): p. 1601-13.

112. Silverman, M.H., Strand, V., Markovits, D., Nahir, M., Reitblat, T., Molad, Y., Rosner, I., Rozenbaum, M., Mader, R., Adawi, M., Caspi, D., Tishler, M., Langevitz, P., Rubinow, A., Friedman, J., Green, L., Tanay, A., Ochaion, A., Cohen, S., Kerns, W.D., Cohn, I., Fishman-Furman, S., Farbstein, M., Yehuda, S.B. and Fishman, P., Clinical evidence for utilization of the A3 adenosine receptor as a target to treat rheumatoid arthritis: data from a phase II clinical trial. *J Rheumatol*, 2008. 35(1): p. 41-8.

113. Robson, S.C., Sevigny, J. and Zimmermann, H., The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*, 2006. 2(2): p. 409-30.

114. Maliszewski, C.R., Delespesse, G.J., Schoenborn, M.A., Armitage, R.J., Fanslow, W.C., Nakajima, T., Baker, E., Sutherland, G.R., Poindexter, K., Birks, C. and et al.,

The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J Immunol*, 1994. 153(8): p. 3574-83.

115. Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Hopner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M.L., Rossini, P.M., Battistini, L., Rotzschke, O. and Falk, K., Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 2007. 110(4): p. 1225-32.

116. Martinez-Martinez, A., Munoz-Delgado, E., Campoy, F.J., Flores-Flores, C., Rodriguez-Lopez, J.N., Fini, C. and Vidal, C.J., The ecto-5'-nucleotidase subunits in dimers are not linked by disulfide bridges but by non-covalent bonds. *Biochim Biophys Acta*, 2000. 1478(2): p. 300-8.

117. Strater, N., Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. *Purinergic Signal*, 2006. 2(2): p. 343-50.

118. Millan, J.L., Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal*, 2006. 2(2): p. 335-41.

119. Say, J.C., Ciuffi, K., Furriel, R.P., Ciancaglini, P. and Leone, F.A., Alkaline phosphatase from rat osseous plates: purification and biochemical characterization of a soluble form. *Biochim Biophys Acta*, 1991. 1074(2): p. 256-62.

120. Picher, M., Burch, L.H., Hirsh, A.J., Spychala, J. and Boucher, R.C., Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J Biol Chem*, 2003. 278(15): p. 13468-79.

121. Blackburn, M.R. and Kellems, R.E., Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. *Adv Immunol*, 2005. 86: p. 1-41.

122. Franco, R., Valenzuela, A., Lluis, C. and Blanco, J., Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol Rev*, 1998. 161: p. 27-42.

123. Hashikawa, T., Hooker, S.W., Maj, J.G., Knott-Craig, C.J., Takedachi, M., Murakami, S. and Thompson, L.F., Regulation of adenosine receptor engagement by ecto-adenosine deaminase. *FASEB J*, 2004. 18(1): p. 131-3.

124. Markert, M.L., Hershfield, M.S., Wiginton, D.A., States, J.C., Ward, F.E., Bigner, S.H., Buckley, R.H., Kaufman, R.E. and Hutton, J.J., Identification of a deletion in the adenosine deaminase gene in a child with severe combined immunodeficiency. *J Immunol*, 1987. 138(10): p. 3203-6.

125. Hunsucker, S.A., Mitchell, B.S. and Spychala, J., The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacology & therapeutics*, 2005. 107(1): p. 1-30.

126. Deussen, A., Stappert, M., Schafer, S. and Kelm, M., Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous concentration gradient. *Circulation*, 1999. 99(15): p. 2041-7.

127. Decking, U.K., Schlieper, G., Kroll, K. and Schrader, J., Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circ Res*, 1997. 81(2): p. 154-64.

128. Morote-Garcia, J.C., Rosenberger, P., Kuhlicke, J. and Eltzschig, H.K., HIF-1-dependent repression of adenosine kinase attenuates hypoxia-induced vascular leak. *Blood*, 2008. 111(12): p. 5571-80.

129. Peart, J.N. and Gross, G.J., Cardioprotection following adenosine kinase inhibition in rat hearts. *Basic research in cardiology*, 2005. 100(4): p. 328-36.

130. Adanin, S., Yalovetskiy, I.V., Nardulli, B.A., Sam, A.D., 2nd, Jonjev, Z.S. and Law, W.R., Inhibiting adenosine deaminase modulates the systemic inflammatory response syndrome in endotoxemia and sepsis. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 2002. 282(5): p. R1324-32.

131. Cronstein, B.N., Naime, D. and Firestein, G., The antiinflammatory effects of an adenosine kinase inhibitor are mediated by adenosine. *Arthritis Rheum*, 1995. 38(8): p. 1040-5.

132. Firestein, G.S., Boyle, D., Bullough, D.A., Gruber, H.E., Sajjadi, F.G., Montag, A., Sambol, B. and Mullane, K.M., Protective effect of an adenosine kinase inhibitor in septic shock. *J Immunol*, 1994. 152(12): p. 5853-9.

133. Baldwin, S.A., Beal, P.R., Yao, S.Y., King, A.E., Cass, C.E. and Young, J.D., The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch*, 2004. 447(5): p. 735-43.

134. King, A.E., Ackley, M.A., Cass, C.E., Young, J.D. and Baldwin, S.A., Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends in pharmacological sciences*, 2006. 27(8): p. 416-25.

135. Gray, J.H., Owen, R.P. and Giacomini, K.M., The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch*, 2004. 447(5): p. 728-34.

136. Koszalka, P., Ozuyaman, B., Huo, Y., Zernecke, A., Flogel, U., Braun, N., Buchheiser, A., Decking, U.K., Smith, M.L., Sevigny, J., Gear, A., Weber, A.A., Molojavyi, A., Ding, Z., Weber, C., Ley, K., Zimmermann, H., Godecke, A. and Schrader, J., Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ Res*, 2004. 95(8): p. 814-21.

137. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-8.

138. Maniatis, T., Jeffrey, A. and van deSande, H., Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry*, 1975. 14(17): p. 3787-94.

139. Frauwirth, K.A. and Thompson, C.B., Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *The Journal of clinical investigation*, 2002. 109(3): p. 295-9.

140. Tang, Q., Henriksen, K.J., Boden, E.K., Tooley, A.J., Ye, J., Subudhi, S.K., Zheng, X.X., Strom, T.B. and Bluestone, J.A., Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of immunology*, 2003. 171(7): p. 3348-52.

141. Levine, B.L., Mosca, J.D., Riley, J.L., Carroll, R.G., Vahey, M.T., Jagodzinski, L.L., Wagner, K.F., Mayers, D.L., Burke, D.S., Weislow, O.S., St Louis, D.C. and June, C.H., Antiviral effect and ex vivo CD4+ T cell proliferation in HIV-positive patients as a result of CD28 costimulation. *Science*, 1996. 272(5270): p. 1939-43.

142. MacLean, D.A., Sinoway, L.I. and Leuenberger, U., Systemic hypoxia elevates skeletal muscle interstitial adenosine levels in humans. *Circulation*, 1998. 98(19): p. 1990-2.

143. Siaghy, E.M., Devaux, Y., Sfaksi, N., Carteaux, J.P., Ungureanu-Longrois, D., Zannad, F., Villemot, J.P., Burlet, C. and Mertes, P.M., 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. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2000. 32(3): p. 493-504.

144. Thompson, L.F., Eltzschig, H.K., Ibla, J.C., Van De Wiele, C.J., Resta, R., Morote-Garcia, J.C. and Colgan, S.P., Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med*, 2004. 200(11): p. 1395-405.

145. Romio, M., Reinbeck, B., Bongardt, S., Huls, S., Burghoff, S. and Schrader, J., Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and Teff cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 2011. 301(2): p. C530-9.

146. Lennon, P.F., Taylor, C.T., Stahl, G.L. and Colgan, S.P., Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J Exp Med*, 1998. 188(8): p. 1433-43.

147. Narravula, S., Lennon, P.F., Mueller, B.U. and Colgan, S.P., Regulation of endothelial CD73 by adenosine: paracrine pathway for enhanced endothelial barrier function. *J Immunol*, 2000. 165(9): p. 5262-8.

148. Yegutkin, G.G., Henttinen, T., Samburski, S.S., Spychala, J. and Jalkanen, S., The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. *The Biochemical journal*, 2002. 367(Pt 1): p. 121-8.

149. Hong, S., Brass, A., Seman, M., Haag, F., Koch-Nolte, F. and Dubyak, G.R., Basal and inducible expression of the thiol-sensitive ART2.1 ecto-ADP-ribosyltransferase in myeloid and lymphoid leukocytes. *Purinergic Signal*, 2009. 5(3): p. 369-83.

150. Schuber, F. and Lund, F.E., Structure and enzymology of ADP-ribosyl cyclases: conserved enzymes that produce multiple calcium mobilizing metabolites. *Curr Mol Med*, 2004. 4(3): p. 249-61.

151. Bortell, R., Moss, J., McKenna, R.C., Rigby, M.R., Niedzwiecki, D., Stevens, L.A., Patton, W.A., Mordes, J.P., Greiner, D.L. and Rossini, A.A., Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and its metabolites inhibit T lymphocyte proliferation: role of cell surface NAD glycohydrolase and pyrophosphatase activities. *J Immunol*, 2001. 167(4): p. 2049-59.

152. Kawamura, H., Aswad, F., Minagawa, M., Malone, K., Kaslow, H., Koch-Nolte, F., Schott, W.H., Leiter, E.H. and Dennert, G., P2X7 receptor-dependent and -independent T cell death is induced by nicotinamide adenine dinucleotide. *J Immunol*, 2005. 174(4): p. 1971-9.

153. Schenk, U., Frascoli, M., Proietti, M., Geffers, R., Traggiai, E., Buer, J., Ricordi, C., Westendorf, A.M. and Grassi, F., ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. *Science signaling*, 2011. 4(162): p. ra12.

154. Zanovello, P., Bronte, V., Rosato, A., Pizzo, P. and Di Virgilio, F., Responses of mouse lymphocytes to extracellular ATP. II. Extracellular ATP causes cell type-dependent lysis and DNA fragmentation. *J Immunol*, 1990. 145(5): p. 1545-50.

155. Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R.A. and Buell, G., The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*, 1996. 272(5262): p. 735-8.

156. Seman, M., Adriouch, S., Scheuplein, F., Krebs, C., Freese, D., Glowacki, G., Deterre, P., Haag, F. and Koch-Nolte, F., NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity*, 2003. 19(4): p. 571-82.

157. Sitkovsky, M.V., Use of the A(2A) adenosine receptor as a physiological immunosuppressor and to engineer inflammation in vivo. *Biochemical pharmacology*, 2003. 65(4): p. 493-501.

158. Moser, G.H., Schrader, J. and Deussen, A., Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol*, 1989. 256(4 Pt 1): p. C799-806.

159. Deussen, A., Metabolic flux rates of adenosine in the heart. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 2000. 362(4-5): p. 351-63.

160. Ledoux, S., Runembert, I., Koumanov, K., Michel, J.B., Trugnan, G. and Friedlander, G., Hypoxia enhances Ecto-5'-Nucleotidase activity and cell surface expression in endothelial cells: role of membrane lipids. *Circ Res*, 2003. 92(8): p. 848-55.

161. Synnestvedt, K., Furuta, G.T., Comerford, K.M., Louis, N., Karhausen, J., Eltzschig, H.K., Hansen, K.R., Thompson, L.F. and Colgan, S.P., Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest*, 2002. 110(7): p. 993-1002.

162. Zernecke, A., Bidzhekov, K., Ozuyaman, B., Fraemohs, L., Liehn, E.A., Luscher-Firzlaff, J.M., Luscher, B., Schrader, J. and Weber, C., CD73/ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation. *Circulation*, 2006. 113(17): p. 2120-7.

9 Materialien

9.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Chemikalien im Reinheitsgrad „zur Analyse“ von folgenden Firmen bezogen: Merck KGaA (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen).

9.2 Molekularbiologische Produkte

Standards

50 bp DNA Leiter	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe)

Kits, Sets und Reagenzien

$CD4^+CD25^+$ Regulatory T-Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Superscript III Platinum Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR Green	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe)
FoxP3 Staining Buffer Set	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Mouse IL-10 DuoSet ELISA Development Kit	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
Mouse TGF-β1 DuoSet ELISA Development Kit	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)

Primer

Sämtliche Primer wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) zur Synthese bestellt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Verwendete Primer mit Angaben der Produktlängen

Primer Name		Sequenz (5'-3')	Produktlänge (bp)
A1R	forward primer	CATTGGGCCACAGACCTACT	200
	reverse primer	CAAGGGAGAGAATCCAGCAG	
A2aR	forward primer	GTCCTCACGCAGAGTTCCAT	138
	reverse primer	AATGACAGCACCCAGCAAAT	
A2bR	forward primer	TGCTCACACAGAGCTCCATC	102
	reverse primer	GTGTCCCAGTGACCAAACCT	
A3R	forward primer	ATGGCTATTCTTGGGCCTTT	145
	reverse primer	ATCCAAACTGACCACGGAAC	
ADA	forward primer	GCGTGGTCTATGTGGAAGTG	259
	reverse primer	ATAGCCACCACGGTCTTCTG	
ADK	forward primer	TATGCTGCCGAGAACAACAG	226
	reverse primer	TCTGCCTCTTCGAGTTCACC	
AlPho	forward primer	CGGGACTGGTACTCGGATAA	157
	reverse primer	ATTCCACGTCGGTTCTGTTC	
Beta-Actin	forward primer	AATCCTGTGGCATCCATGAAAC	74
	reverse primer	ATAGAGGTCTTTACGGATGTCAA	
CD39	forward primer	GCCCCAAAACAGCACTATAG	242
	reverse primer	ATCTTTTGGTGCAGGGAGTG	
CD73	forward primer	GAACCCAACGTGCTGTTTTT	168
	reverse primer	GGGATCAATCAGTCCTTCCA	
CNT1	forward primer	TGCAGTTTGTGCTTGGACTC	178
	reverse primer	AAGACGATGATGGGCAAAAC	
CNT2	forward primer	ATTTGTGGCCTACCAGCAAC	167
	reverse primer	CTCCCAGTGTGATTCCTATG	
Cy5NT	forward primer	GGTAAACTTCAACAGCACGG	156
	reverse primer	TCCTTTCAGCACTCCATTTTC	
ENT1	forward primer	GTAAAGGAGAGGAGCCAAAAG	140
	reverse primer	GAAGATGAAGCAGACAGACAG	
ENT2	forward primer	GCCACAGAAGCCAGGAAAAC	113
	reverse primer	TGATGGCAGGAAAGACCGAC	
P2X7	forward primer	CTGTGTGCATTGACTTGCTC	225
	reverse primer	CTTGCAGACTTTTCCCAAGC	

(A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin)

9.3 Antikörper

Primärantikörper :	
Ratte-anti-Maus-CD4-APC	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Ratte-anti-Maus-CD4-FITC	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Ratte-anti-Maus-CD25-PE	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Kaninchen-anti-Maus-CD25	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Maus-anti-FoxP3-APC	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Ratte-anti-Maus-CD73-PE	BD Bioscience (Heidelberg)
Ratte-anti-Maus-CD73-FITC	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
Ratte-anti-Maus-CD39	freundlicherweise überlassen von Hr. Nolte,
Ratte-anti-Maus-P2X7	Universität Hamburg
Hamster-anti-Maus-CD3	BD Bioscience (Heidelberg)
Hamster-anti-Maus-CD28	BD Bioscience (Heidelberg)
Sekundärantikörper:	
Ziege-anti-Kaninchen-FITC	BD Bioscience (Heidelberg)
Ziege-anti-Ratte-PE	BD Bioscience (Heidelberg)
Isotypenantikörper:	
IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM	BD Bioscience (Heidelberg)

9.4 Zellkulturmedien

Panserin-Nährmedium	Panserin 413	(PAN−Biotech, Aidenbach)
	+ 0,2% Wachstumsfaktoren-Mix	(PAN−Biotech, Aidenbach)
	+ 0,1% Gentamycin (v/v)	(Sigma-Aldrich)

9.5 Gebrauchslösungen

PBS-Puffer	2,7	mM	KCl
	1,5	mM	KH_2PO_4
	237	mM	NaCl
	8,1	mM	Na_2HPO_4
	pH 7,5		

MACS-Puffer	PBS-Puffer (s.o.)
	+ 0,5% BSA (m/v)
	+ 5 mM EDTA
	10 Minuten in einem Ultraschallbad entgasen

1x Tris-*acetate*-EDTA	242 g Trishydroxymethylaminomethan
(TEA) Laufpuffer für	57,1 ml Eisessig (Essigsäure 100%)
DNA-Agarosegele	100 ml 0,5 M EDTA, pH 8
	ad 1000 ml H_2O (Millipore)
	Verdünnung 1:50 mit H_2O

9.6 Geräte und Gebrauchswaren

15 ml Conical Tubes Falcon	BD Bioscience (Heidelberg)
70 µm Nylon Cell Strainer	BD Bioscience (Heidelberg)
Zentrifuge Universal 320R	Hettich Lab Technology (Tuttlingen)
LD Columns	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
MS Columns	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
MACS® MultiStand	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
QuadroMACS™ Separator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
MiniMACS™ Separator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Mastercycler	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments (Osterode)
Spectrophotometer ND-1000	NanoDrop products (Wilmington, USA)
StepOnePlus Real-Time PCR	Applied Biosystems (Foster City, Californien, USA)
MicroAmp Fast 8-Tube Strip	Applied Biosystems (Foster City, Californien, USA)
MicroAmp Optical 8-Cap Strip	Applied Biosystems (Foster City, Californien, USA)
Sub Cell™ Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Gel Doc System	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
FACSCalibur	BD Bioscience (Heidelberg)
Reaktionsgefäße 1 - 2 ml	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
ELISA Reaktions-Platte	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
Mikroplatten-Reader SpectroCount	Packard Instruments (Meriden, Connecticut, USA)

9.7 Software

Excel 2003	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
FACS-Auswertung: Cell Quest	BD Bioscience (Heidelberg)
Gelauswertung	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Literaturrecherche	Pubmed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)
Nanodrop V3.5	NanoDrop products (Wilmington, USA)
Nukleotidsequenz der Zielgene	http://www.ncbi.nlm.nih.gov → nucleotide search
Primerdesign	Primer3 v. 0.4.0 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3)
Science Slides 2009	VisiScience Inc. (Chapel Hill, North Carolina, USA)
Sigma-Blot 11.0	Systat Software GmbH (Erkrath)
StepOne™ Software v2.1	Applied Biosystems (Foster City, Californien, USA)

10 Danksagung

Mein Dank gilt allen, deren Unterstützung und Hilfe zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Schrader für die Überlassung des Themas und die Betreuung bei der Planung und Durchführung dieser Arbeit bedanken. Lief es einmal nicht wie erhofft, hatte er stets ein aufmunterndes Wort und eine neue Idee parat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Sandra Burghoff, die mir während der ganzen Zeit immer mit Rat und Tat zu Seite stand. Danke für die vielen guten fachlichen und privaten Gespräche auch über unserer gemeinsame aktive Zeit am Institut hinaus.

Bedanken möchte ich mich bei Sabine Bongardt für die tatkräftige Unterstützung bei vielen Experimenten und ihre stets ansteckend gute Laune.
Zudem bei Michael Romio und Claudia Viethen für die Anleitung bei Versuchen und die Pflege und Verwaltung der Versuchstiere. Bei Prof. Dr. Ulrich Decking und Dr. Ulrich Flögel für die Hilfe bei der statistischen Auswertung und bei Dr. Christoph Jacoby für die Unterstützung der graphischen Aufbereitung.
Außerdem bei allen hier nicht genannten Institutsmitarbeitern für die vielen kleineren und größeren Hilfen und Tipps.

Dass ich die Zeit in dieser Form meinem Studium und der wissenschaftlichen Arbeit widmen konnte, verdanke ich meinen Großeltern, insbesondere meinem Großvater Dr. Gerhard Reinbeck, der den finanziellen Grundstein für meine Ausbildung legte.
Besonders erwähnen möchte ich auch meinen Vater, der schon früh meine Begeisterung für die experimentellen Naturwissenschaften weckte.
Ohne den familiären Rückhalt durch meine Mutter und meine Schwester wäre ich jetzt nicht, wo ich bin. Danke liebe Lena, für die konstruktive Kritik beim Korrekturlesen.

Vielen Dank an all meine Freunde, ganz besonders an meine Freundin Samuela, die mir den nötigen Rückhalt für das Studium und diese Arbeit gegeben haben.

11 Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

05.09.2012, Benjamin Manfred Gerhard Reinbeck