

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Effekte von 5'Adenosintriphosphat auf humane Monozyten-
abgeleitete dendritische Zellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Florian Then
aus München
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Endres

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. H. Schmetzer
Prof. Dr. G. Enders

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. A. Eigler

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Fragestellung	3
1.2	Physiologie der dendritischen Zellen.....	4
1.3	ATP als Mediatorsubstanz	8
1.3.1	Nomenklatur und Charakterisierung der P2-Rezeptoren	8
1.3.2	Funktionelle Eigenschaften von P2-Rezeptoren	14
1.3.3	P2-Agonisten	14
1.3.4	P2-Antagonisten.....	18
1.4	Nukleotide als Mediatoren im Immunsystem.....	20
1.4.1	Verbreitung von P2-Rezeptoren auf immunkompetenten Zellen.....	20
1.4.2	Wirkung von P2-Agonisten auf dendritische Zellen.....	21
2	Material und Methoden	23
2.1	Isolierung und Kultur Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen	23
2.1.1	Kulturmedium.....	23
2.1.2	Isolierung von Monozyten aus Mononukleären Zellen	23
2.1.3	Kultur Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen	24
2.1.4	Stimulation von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen.....	24
2.2	Durchflusszytometrie.....	25
2.2.1	Antikörper.....	25
2.2.2	Immunphänotypisierung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen 25	
2.2.3	Bestimmung der Zellvitalität	26
2.3	Beurteilung der Endozytosefähigkeit.....	26
2.4	Zytokinnachweis.....	26
2.5	Bestimmung der T-Zell-stimulatorischen Kapazität	27
2.6	Statistik.....	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Generierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen aus mononukleären Zellen.....	28

3.2 Einfluss von ATP auf die Endozytosefähigkeit von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen	29
3.3 Auswirkungen von P2-Agonisten auf die Oberflächenmarker-Expression von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen	32
3.4 Einfluss von ATP auf die IL-12-Synthese von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen	34
3.5 Einfluss von ATP auf die T-Zell-stimulatorische Kapazität von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen.....	37
3.6 Synergistische Effekte von ATP und TNF- α in Bezug auf die Aktivierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen	38
4 Diskussion	43
4.1 Überblick über die Ergebnisse	43
4.2 Methodendiskussion.....	44
4.2.1 Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen als Modell für physiologisch vorkommende dendritische Zellen	44
4.2.2 Aktivierung der dendritischen Zellen durch Nukleotide	45
4.2.3 Bestimmung von IL-12 mittels ELISA.....	46
4.3 Ergebnisinterpretation vor dem Hintergrund aktueller Literatur	47
4.4 ATP als physiologisches endogenes Gefahrensignal.....	48
4.5 Beteiligte Rezeptor-Subtypen.....	49
4.6 Klinische Relevanz	52
5 Zusammenfassung.....	53
Literatur	55
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	69
Danksagung	70
Veröffentlichungen	71
Lebenslauf.....	72

1 Einleitung

1.1 Fragestellung

Dendritische Zellen spielen nach heutigen Erkenntnissen eine zentrale Rolle in der Modulation von Immunantworten (Banchereau *et al.*, 1998). Als effiziente Antigen-präsentierende Zellen (Steinman, 1991) sind sie für die Initiierung der spezifischen Immunantwort entscheidend (Banchereau *et al.*, 1998). Diese Eigenschaft dendritischer Zellen haben sich Tumorimmunologen zunutze gemacht. In ersten klinischen Studien (Nestle *et al.*, 1998, Murphy *et al.*, 1999) profitierten bereits einige Patienten von Therapieversuchen mit Tumorantigen-beladenen dendritischen Zellen.

Andererseits können dendritische Zellen auch das Gegenteil, nämlich eine Toleranz von Effektorzellen gegenüber ihrem Antigen, induzieren (Matzinger *et al.*, 1989, Kronin *et al.*, 1996). Die Rahmenbedingungen, unter denen dendritische Zellen immunogen beziehungsweise tolerogen wirken, sind erst teilweise verstanden und Gegenstand intensiver Forschung. Sie hängen aber wohl entscheidend von der Anwesenheit von Gefahrensignalen wie zum Beispiel Entzündungsmediatoren oder aus geschädigten Zellen freigesetzten Substanzen ab (Gallucci *et al.*, 1999, Thurner *et al.*, 1999).

Für das ubiquitär vorkommende Adeninnukleotid Adenosin-5'-triphosphat (ATP) wurde schon vor Jahren eine Mediatorfunktion im Immunsystem nachgewiesen (Abbracchio *et al.*, 1994, Di Virgilio *et al.*, 1996). Rezeptoren für extrazelluläre Nukleotide – sogenannte P2-Rezeptoren – wurden unter anderem auf humanen und murinen Makrophagen, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, sowie Mastzellen gefunden (Humphreys *et al.*, 1996, Clifford *et al.*, 1997, Rassendren *et al.*, 1997). Dem Nachweis dieses Rezeptortyps auf murinen dendritischen Zellen (Marriott *et al.*, 1999, Mutini *et al.*, 1999) folgte bald auch deren Beschreibung auf humanen dendritischen Zellen (Berchtold *et al.*, 1999).

In der vorliegenden Arbeit werden funktionelle Auswirkungen von extrazellulärem ATP auf humane Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen (MoDC) untersucht. Berücksichtigt wurde hierfür die Morphologie dieser Zellen bezüglich der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, ihre Fähigkeit, T-Zellen zur Proliferation anzuregen, die Zytokinproduktion, sowie die Bereitschaft, extrazelluläre Substanzen durch Endozytose aufzunehmen.

Des Weiteren wurde untersucht, inwiefern die beobachteten Effekte tatsächlich P2-Rezeptor-vermittelt sind. Hierfür wurden Substanzen eingesetzt, die P2-Rezeptoren blockieren.

Schließlich wurden neben ATP verschiedene chemisch modifizierte ATP-Derivate eingesetzt, deren Wirkprofil bezüglich der verschiedenen Unterklassen von P2-Rezeptoren bekannt ist. So wurde versucht, die an der Aktivierung von dendritischen Zellen beteiligten Rezeptor-Subtypen zu identifizieren.

1.2 Physiologie der dendritischen Zellen

Die nach ihrem Entdecker Paul Langerhans benannten, durch verzweigte Zytoplasmaausläufer charakterisierten Langerhans-Zellen der Epidermis sind bereits seit 1868 bekannt. Durch die Beschreibung morphologisch ähnlicher Zellen in der Milz von Mäusen im Jahre 1973 (Steinman *et al.*, 1973) rückten diese in ihrer Funktion bislang nicht verstandenen Zellen vermehrt in den Blickpunkt der Wissenschaft. Die fortan als "dendritisch" bezeichneten Zellen wurden als potente Stimulatoren der primären Immunantwort identifiziert (Steinman *et al.*, 1978, Inaba *et al.*, 1984, Witmer *et al.*, 1984). Zehn Jahre nach ihrer Entdeckung durch Steinman waren sie bereits in vielen nicht-lymphatischen Geweben sowohl muriner (Hart *et al.*, 1981, Hart *et al.*, 1983) als auch menschlicher Herkunft (Hart *et al.*, 1981, Daar *et al.*, 1983) gefunden worden. Erste Hinweise, dass dendritische Zellen eine wichtige Rolle bei der Transplantatabstoßung spielen (Hart *et al.*, 1981, McKenzie *et al.*, 1984), stammen ebenfalls aus dieser Zeit.

Heute gilt als gesichert, dass dendritische Zellen umschriebene Leukozytenpopulationen darstellen, die vor allem durch ihre Fähigkeit, eine potente T-Zell-Antwort des Immunsystems zu initiieren, gekennzeichnet sind (Steinman, 1991, Hart, 1997). Sicher scheint auch, dass – ausgehend von einer CD34-positiven (CD34+) pluripotenten Stammzelle – verschiedene Differenzierungswege zur Entstehung von dendritischen Zellen führen (Hart, 1997). Zu Unterscheiden ist grundsätzlich eine lymphoide von einer myeloiden Linie. Nur die Abkömmlinge der myeloiden Linie fungieren als professionelle Antigen-präsentierende Zellen, welche in der Lage sind, T-Zell-Proliferation und T-Zell-Aktivierung zu generieren (Steinman, 1991, Schuler *et al.*, 1993, Williams *et al.*, 1994).

Anfangs war die geringe Frequenz dendritischer Zellen im peripheren Blut beziehungsweise die Schwierigkeit, sie aus solidem Gewebe zu isolieren, limitierend für die genauere Typisierung. Inzwischen ist es möglich, die Zellen in großer Zahl zu generieren (Inaba *et al.*, 1992, Romani *et al.*, 1994). Besonders die Möglichkeit, Monozyten des peripheren Blutes mittels der Zytokine Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) und Interleukin (IL)-4 zu dendritischen Zellen auszdifferenzieren (Sallusto *et al.*, 1994), hat ihrer Erforschung Vorschub geleistet. Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen stehen bezüglich ihrer Charakteristika der myeloiden Reihe nahe. Sie sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Dendritische Zellen spielen im Immunsystem eine zentrale Rolle. In peripheren Geweben lokalisiert, besteht ihre Aufgabe darin, Material aus ihrer unmittelbaren Umgebung aufzunehmen, zu prozessieren und als MHC-Peptid-Komplexe zu präsentieren. Bei Anwesenheit bestimmter Gefahrensignale stellt die Zelle die Phagozytose ein und wandert in Lymphknoten ein, um das als abzuwehrendes Antigen identifizierte Material spezifischen T-Zellen zu präsentieren (Steinman, 1991). Funktion und damit auch Morphologie der dendritischen Zellen unterliegen also einem Wandel, der als „Aktivierung“ und „Reifung“ bezeichnet wird.

Für unreife dendritische Zellen konnte bislang kein spezifischer Marker gefunden werden. Die Lineage-spezifischen Marker CD3 (T-Lymphozyten), CD14 (Monozyten und Makrophagen), CD19 (B-Lymphozyten) und CD16 (natürliche Killerzellen) können auf der Oberfläche dendritischer Zellen nicht nachgewiesen werden. Typischerweise exprimiert werden dagegen Mannoserezeptoren (Sallusto *et al.*, 1995) und die Fc γ -Rezeptoren CD32 und CD64 (Fanger *et al.*, 1996) sowie der Marker DEC-205 (Jiang *et al.*, 1995). Auch MHC I- und MHC II-Moleküle werden exprimiert, ebenso die Adhäsionsmoleküle CD11, CD54 und CD58 sowie die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 (Scheeren *et al.*, 1991, Steinman, 1991). Phagozytose (Matsuno *et al.*, 1996) und Endozytose (Albert *et al.*, 1998) dienen der Inkorporierung von umgebendem Material, welches dann prozessiert und im Sinne eines „Cross-priming“ sowohl auf MHC I- wie auch MHC II-Molekülen präsentiert wird. Die Reifung dendritischer Zellen kann durch unterschiedliche Substanzen angestoßen werden: Bakteriell Lipopolysacharid (LPS), Prostaglandin E₂ (PGE₂), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), die Zytokine IL-1 β und IL-6, sowie CD-40 Ligand (Cella *et al.*, 1996) wurden in dieser Funktion beschrieben.

Die aktivierte dendritische Zelle stellt die Antigenaufnahme ein, präsentiert die zuvor prozessierten immunogenen Peptide stabil auf ihren jetzt deutlich hochregulierten MHC-Molekülen (Cella *et al.*, 1997) und tritt in die afferente Lymphe ein, um schließlich einen drainierenden Lymphknoten zu erreichen (Austyn *et al.*, 1990). Die Adhäsionsmoleküle CD11, CD54, und CD58 werden vermehrt exprimiert; ebenso die kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1) CD86 (B7.2) und CD40. Als spezifische „Reifemarker“ lassen sich nun CD83 und CMRF 44 (Zhou *et al.*, 1992, Hock *et al.*, 1994) auf den Zellen nachweisen.

Die dendritische Zelle sezerniert im aktivierten Zustand das Zytokin IL-12, welches die Immunantwort in Richtung T_H1 , das heißt in Richtung einer durch zytotoxische T-Zellen vermittelten Antwort, lenkt (Cella *et al.*, 1996). Die Migration der dendritischen Zellen wird durch die Expression der Chemokinrezeptoren CCR-7 und CXCR-4 reguliert, als chemotaktische Stimuli dienen unter anderem die Chemokine CXCL 12 und CCL19/CCL21 (Robbiani *et al.*, 2000, Idzko *et al.*, 2002, la Sala *et al.*, 2002).

Eine solchermaßen aktivierte dendritische Zelle kann nun im Lymphknoten mit bis zu 3000 naiven T-Zellen in Interaktion treten (Banchereau *et al.*, 1998) und diese aktivieren und zur Proliferation anregen. Abb. 1 skizziert die Expression von Oberflächenmolekülen und die funktionellen Eigenschaften unreifer versus aktivierter, reifer dendritischer Zellen.

1.3 ATP als Mediators substanz

Das Trinukleotid ATP wurde erstmals von Lipmann und Kalckas in seiner Funktion als Träger chemisch gebundener Energie beschrieben (Lipmann, 1941). Während für Adenosin sehr früh eine Wirkung als Transmitter im kardiovaskulären System offenkundig wurde (Drury *et al.*, 1929), konnten ähnliche Phänomene für ATP erstmals 1950 (Green *et al.*, 1950) gezeigt werden. In den folgenden Jahren kumulierten Befunde, die letztlich die Existenz spezifischer ATP-Rezeptoren nahelegten (Burnstock, 1972). Inzwischen konnten die Rezeptoren geklont und auf molekularer Ebene erfaßt werden (Lustig *et al.*, 1993, Webb *et al.*, 1993). Mit Hilfe funktioneller Studien, für die eine Vielzahl chemisch modifizierter ATP-Derivate synthetisiert wurde, sowie Erkenntnissen aus der Molekulargenetik wurde inzwischen eine ganze Familie von ATP-sensitiven Rezeptoren identifiziert, die nach der derzeit gültigen Nomenklatur als P2-Rezeptoren bezeichnet werden.

1.3.1 Nomenklatur und Charakterisierung der P2-Rezeptoren

Historisch wurden anfangs alle Rezeptoren, an denen durch Adenosin oder seine Nukleotide vermittelte Wirkungen beobachtet werden konnten, als Purinozeptoren bezeichnet. Da die unter dieser Bezeichnung zusammengefassten Rezeptoren sich sowohl funktionell als auch strukturell als äußerst heterogene Gruppe von membrangebundenen Oberflächenmolekülen erwiesen, schlug Burnstock 1978 (Burnstock, 1978) eine grundsätzliche Unterteilung in P1-Purinozeptoren, die weitgehend spezifisch für Adenosin sind, und P2-Purinozeptoren, welche auf ATP und verwandte Substanzen ansprechen, vor. Nachdem jedoch von mehreren Autoren gezeigt werden konnte, dass auch Pyrimidinderivate, zum Beispiel Uridinnukleotide, Effekte an diesen Rezeptoren vermitteln können (Communi *et al.*, 1997, Harden *et al.*, 1997) musste diese Nomenklatur im Jahre 1997 revidiert werden (Fredholm *et al.*, 1997). Heute ist die Benennung als P1-Rezeptoren bzw. P2-Rezeptoren üblich.

Adenosin- oder P1-Rezeptoren regulieren über gekoppelte G-Proteine den intrazellulären Spiegel von zyklischem Adenosin-3'5'-monophosphat (cAMP) (Sattin *et al.*, 1970). Je nach Subtyp kann sowohl eine Erhöhung als auch eine Erniedrigung der cAMP-Konzentration beobachtet werden.

Ferner sind Wirkungen auf die Leitfähigkeit für Kaliumionen, Kalziumionen (Ca^{++}), sowie auf die Aktivität von Phospholipase C und Proteinkinase C bekannt (Trussell *et al.*, 1985, Scholz *et al.*, 1991, Gerwins *et al.*, 1992, 1995). Die Effekte sind typischerweise, jedoch nicht immer, durch Methylxanthine blockierbar (Ramkumar *et al.*, 1993). Da die P1-Rezeptoren im eigentlichen Sinne nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind, sind sie hier in stark vereinfachter Form abgehandelt.

Vergleichsweise vielgestaltiger ist die Gruppe der P2-Rezeptoren. Aufgrund divergierender funktioneller Effekte in Studien mit verschiedenen ATP-Analoga postulierte Burnstock zwei grundsätzlich verschiedene P2-Rezeptorfamilien und benannte diese als P2X respektive P2Y (Burnstock, 1978). Letztere wurden als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren identifiziert (O'Connor *et al.*, 1991, Fredholm *et al.*, 1994). Sie weisen zu den ebenfalls G-Protein-gekoppelten P1-Rezeptoren allerdings keine größeren Homologien auf als zu beliebigen anderen Verwandten aus der großen Familie der Rhodopsinähnlichen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Fredholm *et al.*, 1994).

P2Y-Rezeptoren

Aufgrund von Sequenzhomologien auf DNA-Ebene wurden 12 unterschiedliche P2Y-Rezeptoren identifiziert, die Nomenklatur erfolgte nach fortlaufenden Nummern (P2Y₁, P2Y₂, ..., P2Y₁₂). Diese Aufstellung weist allerdings Lücken und Ausnahmen auf: P2Y₅, P2Y₇, P2Y₉ und P2Y₁₀, wurden in funktionellen Studien nicht als Nukleotidrezeptoren bestätigt, weshalb sie aktuell nicht mehr als P2Y-Rezeptoren gewertet werden (Di Virgilio *et al.*, 2001). Der p2y3-Rezeptor konnte bislang aus Säugerzellen nicht geklont werden; die Kleinschreibung verweist konventionsgemäß auf diesen Umstand. Es wird vermutet, dass er homolog zum menschlichen P2Y₆-Rezeptor sein könnte (Ralevic *et al.*, 1998). Gemeinsam ist den verbleibenden sieben in Säugern bekannten P2Y-Rezeptoren (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₈, P2Y₁₁, P2Y₁₂) die typische Struktur der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren: Sieben transmembranöse Domänen durchspannen das Plasmalemm; das carboxyterminale Ende ist auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert. Sie erreichen bei einer Länge von 328 bis 379 Aminosäuren molekulare Massen zwischen 41 und 53 kDa (Lustig *et al.*, 1993, Webb *et al.*, 1993).

Der P2Y₁₂-Rezeptor als funktioneller ADP-Rezeptor auf Thrombozyten ist durch den erfolgreichen Einsatz von P2Y₁₂-Antagonisten zur Gerinnungshemmung inzwischen auch klinisch relevant geworden (Nicholas, 2001, Andre *et al.*, 2003). Kürzlich wurde ein weiterer Vertreter der P2Y-Familie identifiziert, er wird bis zu seiner endgültigen pharmakologischen Charakterisierung als P2Y₍₁₃₎-Rezeptor bezeichnet (Zhang *et al.*, 2002).

Die Signaltransduktion erfolgt über verschiedene Wege: Stimulation von Phospholipase C, Inhibition oder auch Aktivierung von Adenylatcyclase, Aktivierung von Phospholipase D sowie Auswirkungen auf den Phosphoinositol-Stoffwechsel können je nach Rezeptor beobachtet werden, ohne jedoch bis heute in ihren genauen Mechanismen völlig verstanden zu sein (Purkiss *et al.*, 1992, Ralevic *et al.*, 1998, Wilkin *et al.*, 2001).

P2X-Rezeptoren

Die P2X-Rezeptoren hingegen repräsentieren nach dem gegenwärtigen Erkenntnisstand eine Gruppe ligandengesteuerter Kationenkanäle (Abbraccio *et al.*, 1994). Sie wurden zuerst in erregbaren Zellen gefunden (Brake *et al.*, 1994, Valera *et al.*, 1994), bald wurde jedoch eine sehr weite Verbreitung auch in nicht erregbaren Geweben gezeigt (Buell *et al.*, 1996, Soto *et al.*, 1997, Di Virgilio *et al.*, 1998).

P2X-Rezeptoren besitzen zwei transmembranöse hydrophobe Domänen. C-Terminus und N-Terminus liegen auf der zytoplasmatischen Seite. Sie sind aus 379 bis 595 Aminosäuren aufgebaut (Brake *et al.*, 1994, Valera *et al.*, 1994). Mit dieser Struktur ähneln sie anderen Ionenkanälen wie dem Amilorid-sensitiven Natriumkanal oder dem einwärts gleichrichtenden Kaliumkanal (North, 1996). Bislang konnten sieben solcher Peptide geklont werden, woraus sich definitionsgemäß die Nomenklatur P2X₁, P2X₂, ..., bis hin zu P2X₇, ableitet.

Bei diesen handelt es sich jedoch nur um Untereinheiten des jeweiligen funktionellen Rezeptors. Es wird vermutet, dass erst ein Multimer aus mehreren Untereinheiten einen nicht-selektiven Ionenkanal für einwertige und zweiwertige Kationen zu bilden imstande ist. Trimer- und Hexamerbildung konnte für einzelne P2X-Einheiten gezeigt werden (Nicke *et al.*, 1998).

In mindestens einem Fall ist erwiesen, dass auch verschiedene Untereinheiten, nämlich P2X₂ und P2X₃, zusammentreten können, um einen funktionellen Ionenkanal zu bilden (Lewis *et al.*, 1995). Die Signaltransduktion erfolgt durch schnellen Einstrom von Natriumionen und Kalziumionen bei gleichzeitigem Ausstrom von Kaliumionen.

Die resultierende Depolarisierung in Verbindung mit einem erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel aktiviert wahrscheinlich eine Reihe weiterer intrazellulärer Signalkaskaden, wobei hierzu aber bislang nur sehr wenige detaillierte Studien verfügbar sind (Di Virgilio *et al.*, 2001).

Der P2X₇ und der P2Z -Rezeptor

Unter den oben beschriebenen P2X-Rezeptoren wartet ein Mitglied, der P2X₇-Subtyp, mit grundlegend anderen funktionellen Eigenschaften auf: Seine Stimulation führt zur Bildung einer Membranpore, durch die Moleküle bis zu einer molekularen Masse von 900 Da nicht-selektiv permeieren können (Di Virgilio, 1995, Collo *et al.*, 1997). Bis heute ist parallel zur P2X₇-Nomenklatur auch noch die ältere Bezeichnung als P2Z anzutreffen, da bislang nicht eindeutig gezeigt werden konnte, dass die Porenbildung einzig auf der Multimerisierung von P2X₇-Untereinheiten beruht.

Strukturell unterscheidet sich der P2X₇-Rezeptor durch eine deutlich längere intrazelluläre carboxyterminale Domäne von den anderen P2X-Familienmitgliedern. Gegenwärtig dominiert in der Literatur die Vorstellung, dass der P2X₇-Rezeptor bei steigender Konzentration seines Agonisten von einem geschlossenen Kanal durch Rekrutierung immer weiterer Untereinheiten zuerst in einen Ionenkanal und schließlich in die erwähnte nichtselektive Pore überführt wird (Di Virgilio, 1995). Dieser Vorgang ist in Abb.2 skizziert.

Der P2X₇-Rezeptor nimmt ferner in der P2-Rezeptorforschung eine Sonderposition ein, da für ihn sowohl spezifische blockierende Antikörper als auch ein spezifischer Antagonist zur Verfügung stehen. Dementsprechend wurde die Expression von P2X₇-Rezeptoren auf Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen bereits früh nachgewiesen (Rassendren *et al.*, 1997, Mutini *et al.*, 1999). Apoptose von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen wird durch diesen Rezeptor vermittelt (Coutinho-Silva *et al.*, 1999), zudem könnte über eine Aktivierung von ICE die Freisetzung von bioaktivem IL-1 β und IL-18 bedingt sein (Mehta *et al.*, 2001).

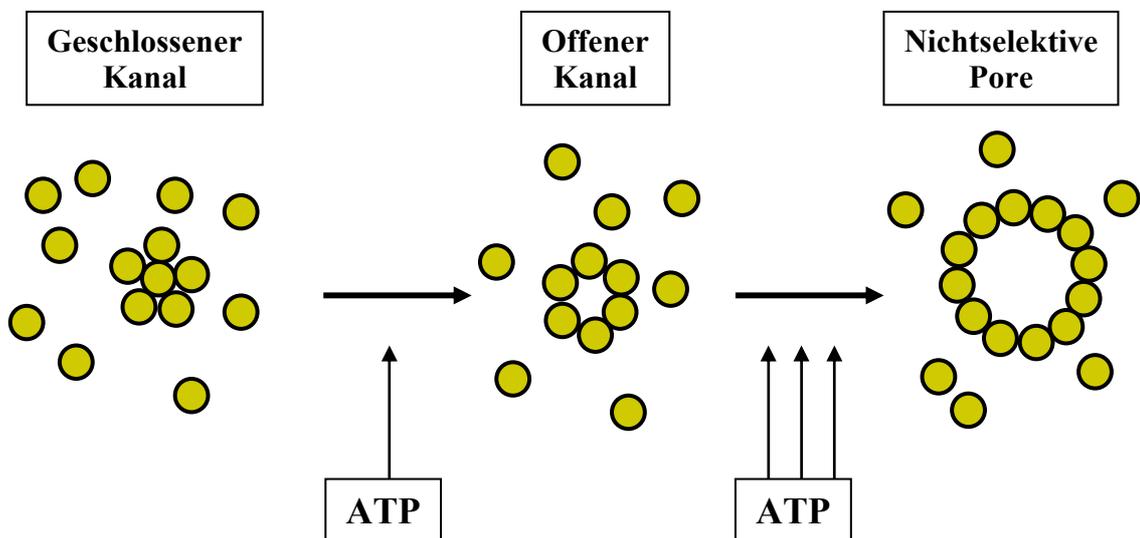


Abb. 2. Vermutlich besteht der P2X₇-Rezeptor aus einer unbekannt Anzahl von P2X₇-Untereinheiten, die dosisabhängig unter Einwirkung von ATP zuerst einen Ionenkanal, dann eine Membranpore bilden (Nach Di Virgilio *et al.* 1996).

Klassifikation und Struktur der P-Rezeptoren:

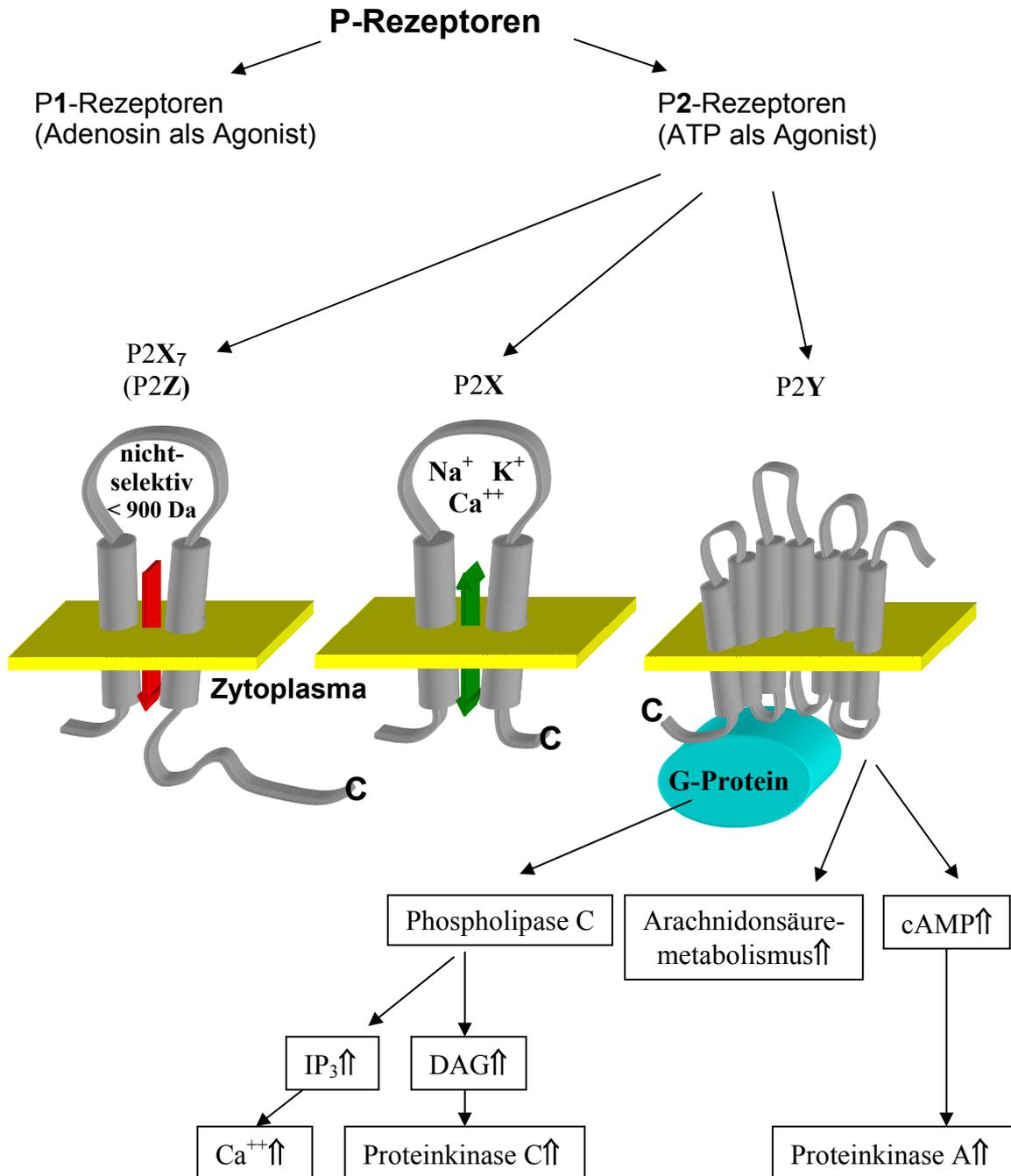


Abb. 3. Schematischer Überblick über die Klassifikation der Purinozeptoren. Molekulare Struktur und funktionelle Eigenschaften der P-Rezeptoren sind dargestellt.

1.3.2 Funktionelle Eigenschaften von P2-Rezeptoren

Bevor die P2-Rezeptoren geklont und in ihrer molekularen Struktur erfasst werden konnten, war ihre Erforschung nur mittels funktioneller Studien möglich. Der am besten bekannte physiologische Agonist ATP hat den Nachteil, von ubiquitär vorkommenden ecto-Nukleotidasen und ecto-Apyrasen rasch abgebaut zu werden. Sowohl die Zwischenprodukte ADP und Adenosin-5'-monophosphat (AMP) als auch das Endprodukt Adenosin sind dabei an verschiedenen P-Rezeptoren wirksam, so dass beobachtete Effekte schwer zu interpretieren sind. Ferner sind prinzipiell Antagonisten als Werkzeuge für jedwede pharmakologische Rezeptorklassifikation vorzuziehen, da nicht auszuschließen ist, dass eine beobachtete agonistische Aktivität nicht durch Interaktion mit dem Rezeptor, sondern mit der sich anschließenden Signaltransduktionskaskade zustande kommt (Kenakin *et al.*, 1992). Grundsätzlich muß betont werden, dass weder die bisher verwendeten Agonisten noch die Antagonisten für P2-Rezeptoren die wünschenswerte Spezifität für ihre Rezeptoren aufweisen.

1.3.3 P2-Agonisten

Neben den natürlichen Liganden ATP, ADP und Uridin-5'-triphosphat (UTP) ist eine Vielzahl von chemisch modifizierten Derivaten verwendet worden, von denen in der vorliegenden Arbeit nur die gebräuchlichsten Erwähnung finden sollen. Die Strukturformeln von ATP, UTP und von einigen Derivaten sind in Abb. 4 wiedergegeben.

Adenosin-5'-triphosphat (ATP)

ATP ist physiologischer Agonist an allen P2-Rezeptoren. Aufgrund seiner geringeren Stabilität gegenüber Ectonukleotidasen und Ektoapyrasen besitzt ATP in biologischen Systemen eine kurze Halbwertszeit. Die Degradierungsprodukte ADP, AMP und Adenosin sind ebenfalls an Rezeptoren aktiv. Gegenwärtig ist unklar, ob die P2-Rezeptoren die dianionische (ATP^{2-}) oder die tetraanionische Form (ATP^{4-}) des Nukleotids erkennen (Cockcroft *et al.*, 1979, 1980), auf alle Fälle spielt jedoch der pH-Wert des Systems eine wesentliche Rolle in funktionellen Studien. Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass in physiologischen Lösungen nur 1% bis 10% des eingesetzten ATP in rezeptorwirksamer Form vorliegt. Der größte Teil ist an divalente Kationen komplex gebunden (Di Virgilio *et al.*, 2001).

Uridin-5´triphosphat

Für die Rezeptor-Subtypen P2Y₄ und P2Y₆ ist UTP eine größere Wirksamkeit als für ATP beschrieben (Chang *et al.*, 1995, Charlton *et al.*, 1996, Communi *et al.*, 1996). An P2Y₂- und P2Y₈-Rezeptoren wirken ATP und UTP gleichermaßen (Lustig *et al.*, 1993, Communi *et al.*, 1999). Auch an P2X₁- und P2X₂-Rezeptoren wirkt UTP agonistisch (Chen *et al.*, 1995, Hashimoto *et al.*, 1995).

Adenin-Dinukleotide

Neben ATP kommen auch Adenin-Dinukleotide als physiologische Agonisten an P2-Rezeptoren in Betracht. Sie wurden bereits 1982 in synaptischen Vesikeln gefunden (Flodgaard *et al.*, 1982). Später untersuchten Pintor *et al.* Ausschüttung, Rezeptorligation und biologische Wirkungen dieser Moleküle (Pintor *et al.*, 1991, Pintor *et al.*, 1991). Bekannte Dinukleotide sind P¹,P⁴-Diadenosin-tetraphosphat (AP₄A), P¹,P⁵-Diadenosin-pentaphosphat (AP₅A), und P¹,P⁶-Diadenosin-hexaphosphat (AP₆A). Die Diadenosinpolyphosphate wirken vor allem an P2X₁-Rezeptoren (Ralevic *et al.*, 1998).

Methylierte Adenosin-5´triphosphat-Derivate

Die Derivate α,β -methylen-Adenosin-5´triphosphat ($\alpha\beta$ meATP) und β,γ -methylen-Adenosin-5´triphosphat ($\beta\gamma$ meATP) verfügen in α,β -Stellung beziehungsweise β,γ -Stellung über je eine Methylengruppe, die das Molekül resistent gegenüber ATP-degradierenden Nukleasen macht. Ferner weist $\alpha\beta$ meATP eine partielle Spezifität auf, da es an P2X₂- und P2X₄-Rezeptoren sowie an P2Y-Rezeptoren als unwirksam beschrieben ist (Fredholm *et al.*, 1994, MacKenzie *et al.*, 1999). Auch eine desensitierende Wirkung an P2X-Rezeptoren bei längerer Applikation ist für $\alpha\beta$ meATP bekannt (Kasakov *et al.*, 1982).

2-methylthio-Adenosin-5´triphosphat

Das Derivat 2-methylthio-Adenosin-5´triphosphat (2MeSATP) galt lange Zeit als nicht-hydrolysierbar. Cusack konnte zwar eine Degradierung durch ecto-Nukleotidasen zeigen (Welford *et al.*, 1987), das Derivat zählt aber nach wie vor zu den langwirksamen Agonisten an P2-Rezeptoren. Eine Spezifität für einzelne Rezeptoren konnte für dieses Derivat bislang nicht überzeugend belegt werden, es wird jedoch eingesetzt, um die Auswirkungen einer starken und anhaltenden Rezeptorstimulation zu beobachten.

Adenosin-5´-O-(3-thio)triphosphat

Die häufige Verwendung des Phosphothioats Adenosin-5´-O-(3-thio)triphosphat (ATP_γS) gründet in einer relativen Spezifität für P2Y-Rezeptoren (Fredholm *et al.*, 1994). Somit eignet sich MeSATP zur Unterscheidung P2X- und P2Y-vermittelter Wirkungen in funktionellen Studien. 2MeSATP gilt als im Vergleich zum physiologischen Liganden ATP stärkerer Agonist an P2Y-Rezeptoren. Es wird in der aktuellen Literatur als Agonist an P2Y-Rezeptoren verwendet (Wilkin *et al.*, 2002).

2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl)- Adenosin-5´triphosphat

2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-Adenosin-5´triphosphat (BzATP) ist ein starker Agonist am P2X₇-Rezeptor und wird aus diesem Grund für Untersuchungen dieses porenbildenden Rezeptors eingesetzt (Humphreys *et al.*, 1996, Rassendren *et al.*, 1997). Durch seine Wirkung am P2X₇-Rezeptor kann dieses Derivat in relativ geringen Konzentrationen die Apoptose dendritischer Zellen herbeiführen (Coutinho-Silva *et al.*, 1999).

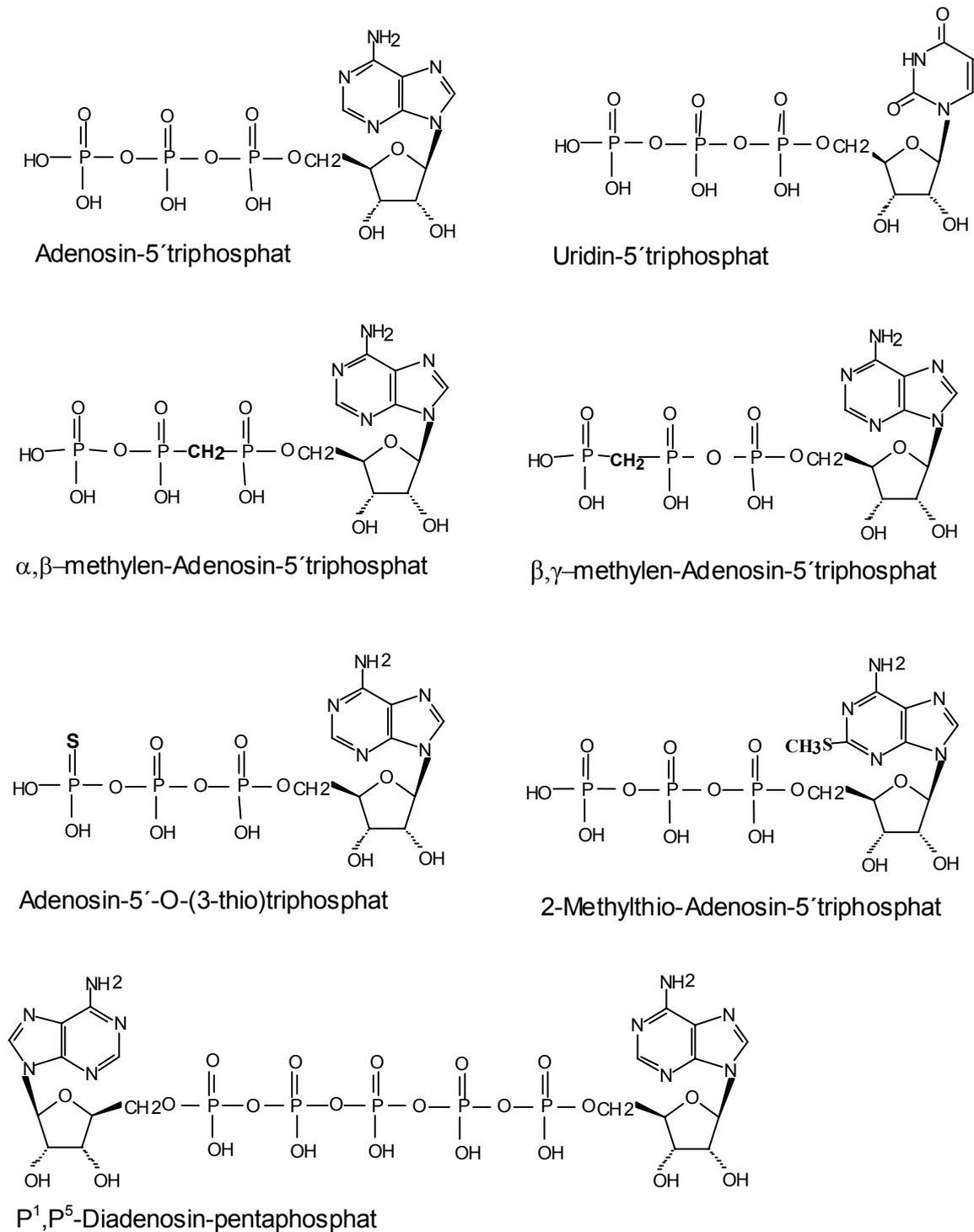


Abb. 4. Strukturformeln von physiologischen und chemisch modifizierten Agonisten an P₂-Rezeptoren. Die methylierten Derivate gelten ebenso wie die schwefelhaltigen Derivate als weitgehend resistent gegenüber einem Abbau durch ecto-5'-Nukleotidasen beziehungsweise ecto-ATPasen. Darüber hinaus besitzen die Agonisten unterschiedliche Affinitäten bezüglich einzelner Rezeptor-Subtypen und können so herangezogen werden, um beobachtete Effekte bestimmten P₂-Rezeptor-Subtypen zuzuordnen.

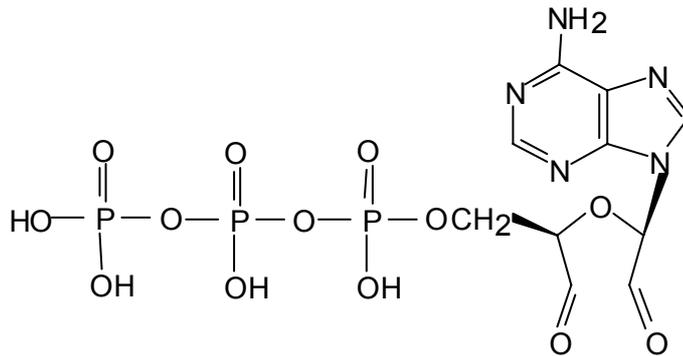
1.3.4 P2-Antagonisten

Der Mangel an spezifischen P2-Antagonisten stellt die Forschung seit jeher vor Probleme. Bislang sind keine Substanzen bekannt, die mit zufriedenstellender Sicherheit nur mit P2-Rezeptoren interagieren. Ebenso ist die Unterscheidung einzelner P2-Rezeptor-Subtypen mittels Antagonisten aufgrund mangelnder Spezifität nicht zuverlässig möglich.

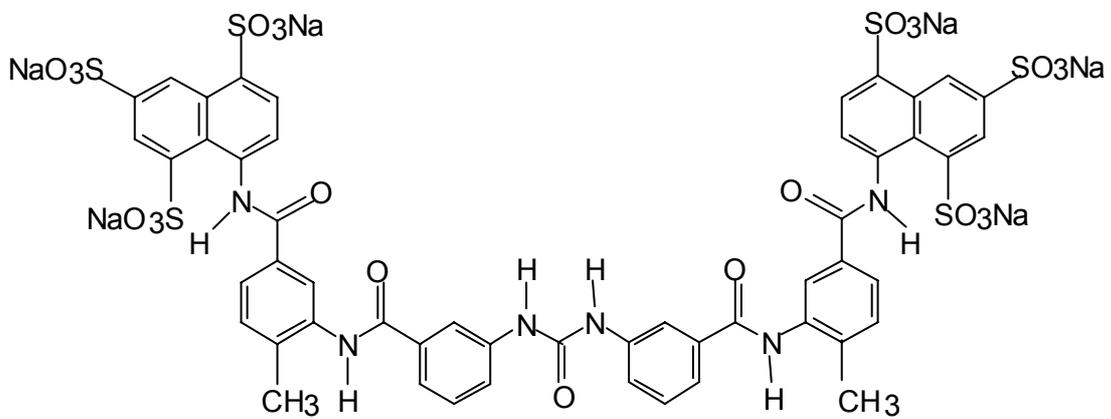
Verbreitet ist die Verwendung von Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure (PPADS), mit welcher sich ATP-vermittelte Effekte blockieren lassen. Die Blockade erfolgt über einen nicht-kompetitiven Mechanismus und kann, abhängig vom Versuchsaufbau, irreversibel sein (Di Virgilio *et al.*, 2001). Vermutet wird, dass PPADS als Träger einer Aldehydgruppe beispielsweise mit unprotonierten Lysin-Residuen nahe der ATP-Bindungsstelle der P2-Rezeptoren reagiert. Der Beweis für diese Hypothese steht noch aus.

Ein ähnlicher Wirkmechanismus wird für das ATP-Derivat Adenosin-5'-triphosphat-2',3'-dialdehyd (oxyATP) postuliert. OxyATP wurde in vielen Studien zur irreversiblen Blockade des P2X₇-Rezeptors benutzt (Murgia *et al.*, 1993, Wiley *et al.*, 1994, Falzoni *et al.*, 1995). Das Derivat wird in der Literatur vielfach mit dem Attribut „selektiv“ versehen; Daten, die eine fehlende Wirksamkeit an anderen als dem P2X₇-Rezeptor belegen, existieren jedoch derzeit nicht.

Schließlich ist mit dem Trypanosid Suramin (Dunn *et al.*, 1988) eine weitere Substanz in Gebrauch, die bezüglich ihrer Spezifität zu wünschen übrig lässt: Suramin blockiert außer den P2-Rezeptoren auch nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren, Glutamat- und γ -Amino-Buttersäure-Rezeptoren, 5-Hydroxytryptamin-Rezeptoren, und inhibiert schließlich eine Reihe von Wachstumsfaktoren (Fredholm *et al.*, 1994, Ralevic *et al.*, 1998). Dennoch ist Suramin das derzeit gebräuchlichste Werkzeug, um experimentell ATP-vermittelte Wirkungen zu inhibieren. Die Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Antagonisten sind in Abb. 5 wiedergegeben.



Adenosin-5'triphosphat 3',4'dialdehyd



Suramin

Abb. 5. Strukturformeln von Adenosin-5'triphosphat-2',3'dialdehyd (oxyATP) und Suramin. Beide Substanzen wirken antagonistisch an P2-Rezeptoren.

1.4 Nukleotide als Mediatoren im Immunsystem

1.4.1 Verbreitung von P2-Rezeptoren auf immunkompetenten Zellen

Die Entdeckung von Cockcroft und Gomperts, dass ATP an Mastzellen eine Permeabilisierung der Membran bewirkt, war der erste Hinweis, dass Nukleotide als Effektormoleküle im Immunsystem eine Rolle spielen könnten (Cockcroft *et al.*, 1979, 1980). Inzwischen wurden funktionelle P2-Rezeptoren auf einer Reihe anderer immunkompetenter Zellen gefunden, beispielsweise auf B-Lymphozyten und T-Lymphozyten (Padeh *et al.*, 1991, Koshiba *et al.*, 1997), Makrophagen (Hagenlocker *et al.*, 1990), Monozyten (Cowen *et al.*, 1989, Altieri *et al.*, 1990), und neutrophilen Granulozyten (Kuhns *et al.*, 1988, Kuroki *et al.*, 1989).

Entsprechend der weiten Verbreitung verschiedener P2-Rezeptoren sind auch die durch extrazelluläre Nukleotide hervorgerufenen Wirkungen auf Immunzellen sehr vielgestaltig. Beispielsweise wurde bei lymphoiden Zellen sowohl Stimulation als auch Hemmung der Proliferation beobachtet (Gregory *et al.*, 1978, Fishman *et al.*, 1980, Baricordi *et al.*, 1999). Nach der Applikation von gegen T-Zell-Rezeptoren gerichteten Antikörpern konnte in T-Zellen eine erhöhte Produktion von P2Y-messenger-RNA nachgewiesen werden (Koshiba *et al.*, 1997), ein Befund, der eine Rolle dieser Rezeptoren in der Aktivierung von T-Zellen wahrscheinlich macht. Abhängig vom Differenzierungsgrad kann ATP bei lymphoiden Zellen Apoptose induzieren (Chused *et al.*, 1996).

In neutrophilen Granulozyten führen ATP und UTP zur Bildung von Superoxid-Anionen und zur Exozytose zytoplasmatischer Granula (Cockcroft *et al.*, 1989, Balazovich *et al.*, 1990). Auch Adhäsionsmoleküle werden nach Kontakt mit diesen Signalkleotiden hochreguliert (Cowen *et al.*, 1990, Dichmann *et al.*, 2000) mit einer daraus resultierenden verstärkten Interaktion der Granulozyten beispielsweise mit Endothelzellen (Dawicki *et al.*, 1995, Rounds *et al.*, 1999).

Bei Makrophagen wird durch extrazelluläre Nukleotide die Prozessierung und Freisetzung von IL-1 β angestoßen (Hogquist *et al.*, 1991). Die Produktion von Superoxiden wird ebenso erhöht (Schmid-Antomarchi *et al.*, 1997) wie diejenige von TNF- α . (Tonetti *et al.*, 1995). Auch die Aktivität der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthetase sowie die Bildung multinukleärer Riesenzellen unterliegen einer Regulation durch extrazelluläre Nukleotide (Tonetti *et al.*, 1994, Denlinger *et al.*, 1996, Fais *et al.*, 1997, Hu *et al.*, 1998). ATP wirkt über den oben beschriebenen porenbildenden P2X₇-Rezeptor in höheren Konzentrationen ferner zytotoxisch auf Makrophagen (Steinberg *et al.*, 1987).

1.4.2 Wirkung von P2-Agonisten auf dendritische Zellen

Insgesamt zeichnet sich für in den Extrazellulärraum freigesetzte Nukleotide eine Funktionalität als Klasse vornehmlich proinflammatorisch wirksamer Botenstoffe ab, die geeignet sind, Zellen des Immunsystems zu aktivieren. Wie eingangs erwähnt unterliegen die funktionellen Eigenschaften dendritischer Zellen durch aktivierende Stimuli besonders ausgeprägten Veränderungen. Damit liegt es nahe, die Auswirkungen von Nukleotiden auch auf diese zentralen Zellen des Immunsystems zu untersuchen. Da die Forschung an dendritischen Zellen ein verhältnismäßig junges Gebiet ist, liegen dazu jedoch bisher nur wenige Ergebnisse vor.

Erst 1999 wiesen verschiedene Publikationen darauf hin, dass extrazelluläre Nukleotide in Experimenten mit murinen dendritischen Zellen zu erhöhter Zytokinproduktion führen (Marriott *et al.*, 1999). Die Beobachtung, dass ATP bei diesen Zellen apoptoseinduzierend wirken kann (Coutinho-Silva *et al.*, 1999), ist konsistent mit der Beschreibung des P2X₇-Rezeptors auf selbigen Zellen (Mutini *et al.*, 1999). Auch auf humanen dendritischen Zellen konnten in der Folgezeit funktionelle P2-Rezeptoren nachgewiesen werden (Berchtold *et al.*, 1999, Liu *et al.*, 1999). Erste funktionelle Studien weisen auch hier auf eine Rolle in der Zytokinproduktion und der Zellmotilität hin. Die Tatsache, dass dendritische Zellen die Oberflächenmoleküle CD39, eine ecto-ATPase, und CD73, eine ecto-5'-Nukleotidase, exprimieren (Girolomoni *et al.*, 1995, Berchtold *et al.*, 1999), deutet darauf hin, dass die Konzentration von Adeninnukleotiden an der Zelloberfläche der dendritischen Zelle einer strengen Regulation unterliegt.

Ungeklärt ist bislang, welche Auswirkungen extrazelluläre Nukleotide auf humane dendritische Zellen und deren Funktion innerhalb des zellulären Immunsystems haben. Ein eventueller Einfluss auf die Antigenaufnahme wurde ebenso wenig untersucht wie später auftretende Effekte bei der Interaktion von dendritischen Zellen mit den Effektorzellen des Immunsystems, den T-Zellen. Die bisher verfügbaren Daten sprechen für die Hypothese, dass Nukleotide proinflammatorische und aktivierende Wirkungen zeitigen können.

Im Hinblick auf die Verwendung von dendritischen Zellen in der Anti-Tumor-Therapie sind Strategien, dendritische Zellen zu maximaler T-Zell-stimulierender Potenz auszureifen, von großem Interesse. Das Potential der P2-Rezeptor-vermittelten Aktivierung auch in Synergie mit anderen proinflammatorischen Substanzen ist bislang nicht untersucht worden.

Die vorliegende Arbeit widmet sich diesen Fragen mit Hilfe eines *in vitro*-Modells unter Verwendung humaner, Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen.

2 Material und Methoden

2.1 Isolierung und Kultur Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen

2.1.1 Kulturmedium

Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 (Biochrom, Berlin), versetzt mit 50 U/ml Penizillin, (Sigma, München), 2 mM L-Glutamin (Life Technologies, Paisley, U.K.) und 2% (v/v) humanem AB-Serum (BioWhittaker, Walkersville, USA), verwendet. Zur Vermeidung unspezifischer Stimulation wurden ausschließlich endotoxinarme Medien und Substanzen eingesetzt. Auf das hier beschriebene supplementierte Medium wird weiter unten unter der Bezeichnung Kulturmedium Bezug genommen.

2.1.2 Isolierung von Monozyten aus Mononukleären Zellen

Mononukleäre Zellen wurden aus dem peripheren Blut gesunder Probanden über Standard-Dichtezentrifugation (Böyum, 1968) gewonnen. Das unter sterilen Kautelen entnommene Vollblut wurde mit 50 I.E. Natrium-Heparin pro ml Blut (Boehringer, Mannheim) als Antikoagulans versetzt und in vorgefertigte Leukosep-Trennröhrchen (Greiner, Frickenhausen) mit Ficoll-Hypaque-Lösung (spezifische Dichte 1.077 g/ml) überführt und anschließend bei 1000 g und 20°C für 15 min zentrifugiert (Omnifuge 2.0 RS, Heraeus, München). Die Fraktion der mononukleären Zellen wurde abgenommen und in drei Waschschritten mit Phosphat-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) (Boehringer, Mannheim) mittels Zentrifugation (400 g, 4°C, 10 min) von Thrombozyten und Plasmabestandteilen gereinigt.

Die so isolierten Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert und in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen pro ml in 75-cm²-Zellkulturflaschen (Becton Dickinson, New Jersey, USA) überführt und für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Aufgrund der Eigenschaft von Monozyten, auf Plastikflächen anzuhaften, konnten nach dieser Zeit Monozyten durch Entfernen nicht-adhärenter Zellen im Überstand und zweimaliges Spülen der Kulturflaschen mit PBS als adhärenente Zellpopulation isoliert werden. Anschließend wurden die Kulturflaschen wieder mit Medium befüllt und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um ein spontanes Ablösen der initial adhärenenten Monozyten zu ermöglichen.

2.1.3 Kultur Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen

Die so gewonnenen Zellen wurden am nächsten Tag geerntet und Zellzahl sowie Viabilität der Zellen mittels Trypanblau-Färbung unter dem Phasenkontrastmikroskop (Carl Zeiss, Jena) bestimmt. Die Zelldichte wurde auf $0,75 \times 10^6$ Zellen/ml Kulturmedium eingestellt und die Zellsuspension auf Sechslöch-Zellkulturplatten (Becton Dickinson, New Jersey, USA) ausgetragen. Je Vertiefung der Kulturplatten wurden zwei ml der Zellsuspension eingesetzt und anschließend 1000 U/ml rekombinanter humaner GM-CSF (Novartis, Basel, Schweiz) und 500 U/ml IL-4 (Promega, Madison, USA) supplementiert. Unter diesen Bedingungen entwickelten sich die initial adhärenenten Zellen binnen fünf Tagen zu unreifen dendritischen Zellen.

2.1.4 Stimulation von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen

Um die Auswirkungen von extrazellulären Nukleotiden zu untersuchen, wurden die Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen am sechsten Tag der Kultur mit ATP, UTP, $\alpha\beta$ meATP, $\beta\gamma$ meATP, MeSATP, ATP γ S oder AP $_5$ A in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Als Antagonisten fanden oxyATP (100 μ M) beziehungsweise Suramin (30 μ M) Verwendung. Suramin wurde den Zellkulturen beigemischt und für die Dauer der Kultur im Kulturmedium belassen. OxyATP als kovalent bindender irreversibler Antagonist wurde vor der Stimulation mit P2-Agonisten für 1 h zugegeben. Erst nach einem Waschschrift mit Kulturmedium, um überschüssiges oxyATP zu entfernen, erfolgte dann die Stimulation.

Alle Reagenzien wurden von Sigma-Aldrich, Steinheim, bezogen. Um eventuelle synergistische Effekte ausfindig zu machen, wurde bei einem Teil der Experimente TNF- α (R&D Systems, Wiesbaden) in einer Aktivität von 1000 U/ml eingesetzt. Die dendritischen Zellen wurden den jeweiligen Stimuli für 48 h ohne weitere Manipulation ausgesetzt.

Alle genannten Substanzen wurden in Vorversuchen mittels eines kommerziell erhältlichen *Limulus* Amebocyte Lysate Assay (LAL assay, BioWhittaker, Walkersville, USA) auf Endotoxin-Kontamination geprüft. Der Endotoxingehalt betrug bei allen eingesetzten Substanzen weniger als 1 pg/ml.

2.2 Durchflusszytometrie

Alle Messungen wurden mit dem Durchflusszytometer FACS-Calibur, (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes FlowJo, Version 2.7.8.

2.2.1 Antikörper

Alle Antikörper und die entsprechenden Isotypen wurden von PharMingen (San Diego, USA) bezogen. Verwendung fanden sowohl R-Phycoerythrin (PE)- als auch Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierte Produkte. Folgende Klone wurden eingesetzt:

TÜ36 (IgG2b, anti-HLA-DR, PE-konjugiert)
G46-2.6 (IgG1, anti-HLA-ABC, FITC-konjugiert)
BB1 (IgM, anti-CD80, PE-konjugiert)
2331/FUN-1 (IgG1, anti-CD86, PE-konjugiert)
HB15e (IgG1, anti-CD83, FITC-konjugiert)
M5E2 (IgG2a, anti-CD14, FITC-konjugiert)
HA58 (IgG1, anti-CD54, PE-konjugiert).

2.2.2 Immunphänotypisierung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden je 10^5 Zellen in 100 μ l PBS suspendiert und mit 10 μ l eines Fluorochrom-markierten monoklonalen Antikörpers auf Eis und bei Dunkelheit für 20 min inkubiert. Nach einem Waschschrift in PBS wurden die Messungen unverzüglich vorgenommen. Für jeden Ansatz wurden mindestens 7000 Ereignisse im interessierenden Zielbereich gemessen. Dieser wurde durch „Forwardscatter“ und „Sidewardscatter“ Parameter festgelegt, wie sie für vitale dendritische Zellen charakteristisch sind („lifegate“).

2.2.3 Bestimmung der Zellvitalität

Bei allen Versuchen wurde der Anteil abgestorbener Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert. Dazu wurde der Farbstoff Propidium Iodid (PI, Sigma-Aldrich, Steinheim), von dem bekannt ist, dass er passiv durch permeabilisierte Membranen toter Zellen diffundieren kann, während vitale Zellen ihn ausschließen, benutzt. 100 µl Zellsuspension wurden mit 3 µl PI [1mg/ml] versetzt und sofort im Durchflusszytometer analysiert. Tote Zellen erschienen im Lichtkanal 3 als deutlich abgrenzbare PI-positive Population.

2.3 Beurteilung der Endozytosefähigkeit

Um endozytische Aktivität von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen beurteilen zu können, wurden diese mit 0,5 mg/ml FITC-markierten Dextranmolekülen (MW 40 kDa, Sigma, St. Louis, USA) inkubiert.

Als Negativkontrolle wurden Ansätze parallel auf Eis durchgeführt, um eine aktive Aufnahme zu unterbinden. Die Inkubationszeit betrug einheitlich 30 min. Anschließend wurden die Zellen viermal in PBS gewaschen und aufgenommenes FITC-Dextran sofort Durchflusszytometrisch semiquantitativ bestimmt.

Die Aufnahme von FITC-Dextran unter den Versuchsbedingungen wurde auf die Aufnahme von FITC-Dextran unaktivierter Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen bezogen, welche als 100% festgelegt wurde.

2.4 Zytokinnachweis

Die IL-12-Produktion von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen wurde im Überstand der Zellkulturen gemessen. Zur Anwendung kam ein kommerziell erhältlicher Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)- Kit (Endogen, Woburn, USA), welcher sowohl die p40-Untereinheit als auch das bioaktive p70-Heterodimer erkennt. Die Messungen wurden gemäß den Anleitungen des Herstellers und in Doppelbestimmungen ausgeführt. Die Zytokinkonzentrationen wurden über Eichkurven bestimmt.

2.5 Bestimmung der T-Zell-stimulatorischen Kapazität

In einer gemischten Lymphozytenkultur („mixed lymphocyte reaction“, MLR) wurde der Einfluss von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen auf die Proliferation allogener T-Zellen bestimmt. T-Zellen wurden aus den im Laufe der Generierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen anfallenden nichtadhärenten Zellen gewonnen (siehe 2.1.2).

Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen wurden geerntet und in Verhältnissen von 1:20 bis 1:320 mit allogenen nichtadhärenten mononukleären Zellen (MNC) in Triplikaten in 96-Loch Rundbodenplatten (Becton Dickinson, New Jersey, USA) kokultiviert. Pro Ansatz wurden 2×10^5 MNC in 200 μ l Kulturmedium eingesetzt. Am fünften Tag der Kokultur wurde pro Kulturansatz 1 μ Ci [3 H]-Thymidin (Amersham, Freiburg) zugegeben. Nach weiteren 18 h wurden die Zellen mittels eines 96 MicroCell Harvesters (Skatron, Transby, Dänemark) auf Filtermatten gefällt, gewaschen und luftgetrocknet. Nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit wurde die in die Zellen inkorporierte Radioaktivität mit einem 1205 Betaplate Liquid Scintillation Beta Counter (Wallac Oy, Turku, Finnland) quantifiziert. Als Kontrolle dienten Ansätze mononukleärer Zellen ohne Zugabe von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen.

2.6 Statistik

Die Ergebnisse wurden als arithmetische Mittelwerte angegeben. Die Streuung wird als Standardfehler des Mittelwertes (standard error of mean, SEM) dargestellt. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde der zweiseitige Student t-Test für verbundene Stichproben angewendet. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0.05$ angenommen und in Abbildungen mit einem Stern (*) verdeutlicht. Alle statistischen Untersuchungen wurden mit dem Programm Stat-View 512 von Abacus Concepts (Calabasas, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen aus mononukleären Zellen

Das unter 2.1.1 und 2.1.2 beschriebene Prozedere zur Generierung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen entspricht dem in der Literatur beschriebenen (Sallusto *et al.*, 1994) mit leichten Modifikationen. Eine Adhärenzzeit von 1 h erwies sich in Vorversuchen als optimal bezüglich Reinheit und Ausbeute der dadurch gewonnenen CD14+ Monozyten. Die Ausbeute schwankte zwischen 4% und 10% der eingesetzten mononukleären Zellen. Die Reinheit der CD14+ Zellen betrug in durchflusszytometrischen Messungen stets über 60-80%. An Verunreinigungen fanden sich bei Kulturbeginn regelhaft 10-20% CD3+ T-Zellen sowie 5-15% CD19+ B-Lymphozyten und 5-10% CD16+ NK-Zellen.

Im Laufe der Kultur in mit IL-4 und GM-CSF versetztem Medium ließen sich im Phasenkontrastmikroskop typische morphologische Veränderungen beobachten. Schon am ersten Tag bildeten sich zunächst Zellaggregate, die sich vom Boden der Kulturschalen ablösten. Diese waren am vierten Tag wieder aufgelöst, und die Einzelzellen hatten ihre ursprüngliche Monozytenmorphologie verloren. Die Zellen zeigten jetzt eine unregelmäßige Form mit plumpen, lichtmikroskopisch gut erkennbaren Zytoplasmaausläufern. Die am Tag 6 für die Experimente eingesetzten dendritischen Zellen ließen sich im Durchflusszytometer morphologisch aufgrund ihrer Vorwärts- und Seitwärtsstreueigenschaften („Forwardscatter“ und „Sidewardscatter“) als distinkte Population abgrenzen. Durchflusszytometrisch ließ sich die Expression von CD11c, CD40, CD54, CD58, CD80, CD86, MHC I, und HLA-DR nachweisen.

Der Monozytenmarker CD14 war zu diesem Zeitpunkt stark bis vollständig herabreguliert. Die T-Zell-Marker CD4 und CD8, sowie der B-Zell-Marker CD19 wurden nicht exprimiert. Somit ergab sich ein Profil von Oberflächenmarkern, wie es für unreife Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen charakteristisch ist.

3.2 Einfluss von ATP auf die Endozytosefähigkeit von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen

Unreife Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen zeichnen sich durch eine hohe endozytotische Aktivität aus. Um einen eventuellen Einfluss von extrazellulärem ATP auf die Endozytose zu untersuchen, wurden Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen mit 100 μ M ATP inkubiert und FITC-Dextran zu verschiedenen Zeitpunkten für 30 min zugegeben.

Als Positivkontrolle diente ein Ansatz ohne ATP. Als Negativkontrolle diente ein weiterer Ansatz auf Eis, da bei Temperaturen um 4°C keine aktive Endozytose stattfinden kann. Es zeigte sich, dass Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen unmittelbar nach ATP-Exposition die Endozytoserate signifikant erhöhen.

Zellen, bei denen die ATP-Exposition schon 48 h zurücklag, nahmen dagegen signifikant weniger FITC-Dextran auf als nicht-exponierte Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen, die weiterhin nur in GM-CSF und IL-4 kultiviert worden waren (Abb. 6).

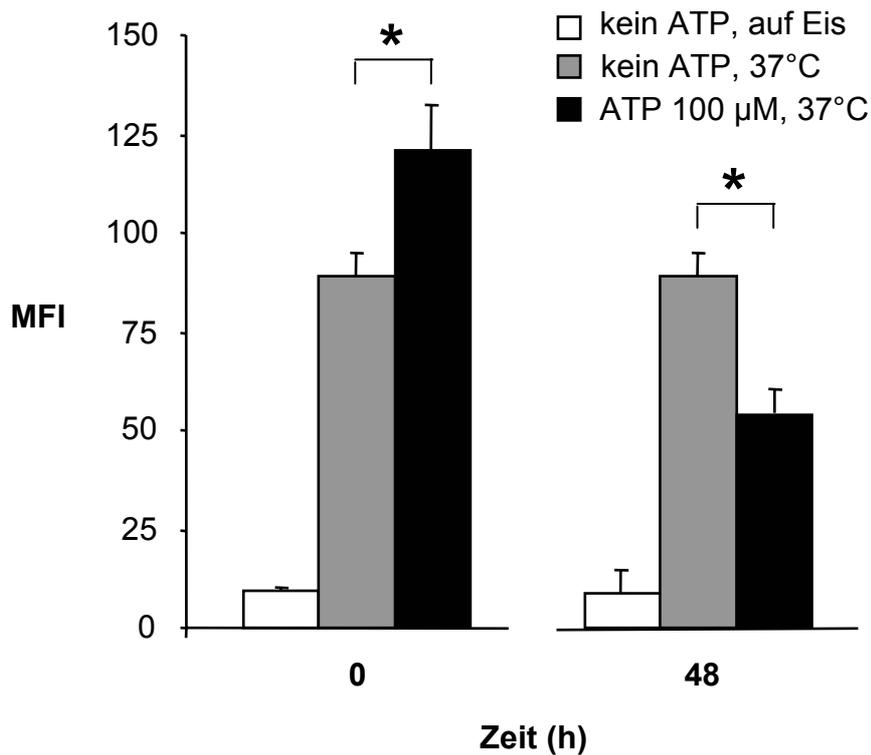


Abb. 6. ATP-Exposition erhöht vorübergehend die endozytotische Aktivität Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen. Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen wurden in Anwesenheit oder in Abwesenheit von 100 µM ATP inkubiert. FITC-Dextran wurde entweder gleichzeitig mit ATP oder erst 48 h später für 30 min zugegeben. Die FITC-Dextran-Aufnahme wurde anschließend Durchflusszytometrisch anhand der mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI) der Zellen bestimmt. Gezeigt sind die Ergebnisse von sechs unabhängigen Experimenten \pm SEM ($p=0.008$ für den Zeitpunkt 0h und $p=0.007$ für den Zeitpunkt 40h).

Als nächstes wurde die Kinetik des ATP-Effektes auf die Endozytosefähigkeit bestimmt. Ferner wurde neben 100 µM auch eine höhere ATP-Konzentration eingesetzt (500 µM). Dabei zeigte sich, dass die Endozytosefähigkeit nach Exposition mit 100 µM ATP schon nach 4 h unter den Ausgangswert zurückfiel. Bei 500 µM ATP kam es zu keinem meßbaren Anstieg, sondern zu einem sofortigen nachhaltigen Abfall dieses funktionellen Parameters (Abb.7). Der Endozytose-erhöhende Effekt von ATP trat also nur vorübergehend (innerhalb der ersten zwei Stunden) und konzentrationsabhängig auf.

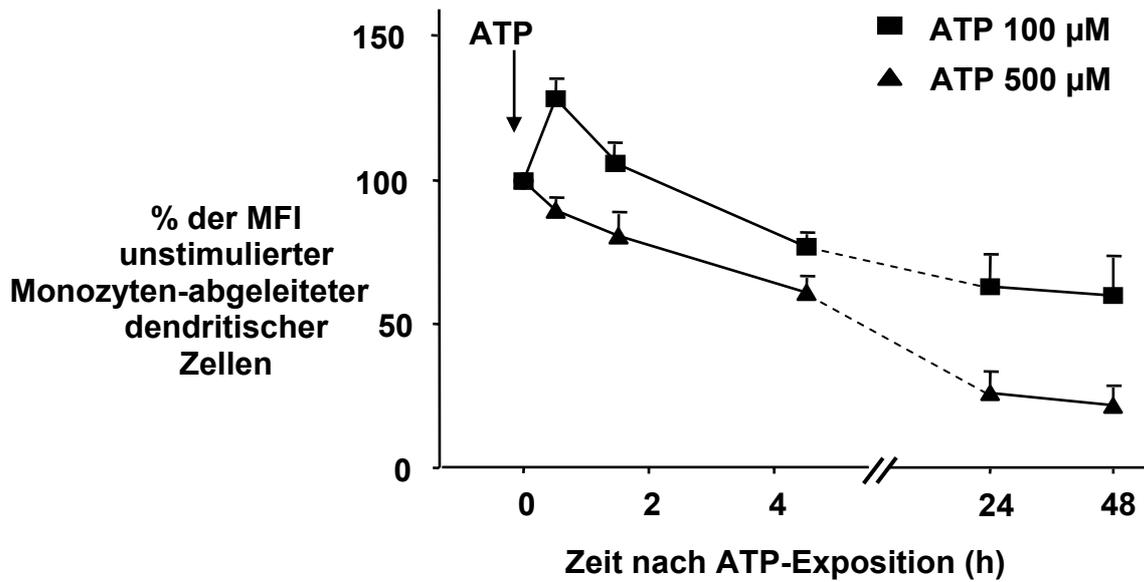


Abb. 7. Unmittelbar nach ATP-Stimulation erhöhen Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen vorübergehend die Endozytoseaktivität. Der Wert der mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI) von unstimulierten Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen wurde als Bezugswert mit 100% festgelegt und alle anderen gemessenen MFI-Werte auf diesen bezogen. Gezeigt sind die Ergebnisse von sechs unabhängigen Experimenten + SEM.

3.3 Auswirkungen von P2-Agonisten auf die Oberflächenmarker-Expression von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen

Um den Einfluss von P2-Agonisten auf die Expression von Oberflächenmolekülen beurteilen zu können, die eine Aktivierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen reflektieren, wurden Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen mit 100 μ M ATP, UTP oder ATP-Derivaten für 48 h inkubiert und anschließend Durchflusszytometrisch in Hinsicht auf die Expression von CD54, CD83, CD86, und MHC II analysiert. UTP zeigte unter diesen Bedingungen keinen Effekt (Daten nicht dargestellt). Da ATP einem raschen Abbau durch ecto-ATP/ADPase (CD39) unterliegen kann, wurden die metabolisch stabilen ATP-Derivate $\beta\gamma$ meATP, $\alpha\beta$ meATP, ATP γ S und AP $_5$ A eingesetzt.

Alle diese Derivate führten ebenfalls zu einer deutlichen Hochregulation von CD54, CD86, und MHC II. Bei einer Subpopulation von $\leq 10\%$ der mit den ATP-Derivaten $\beta\gamma$ meATP, $\alpha\beta$ meATP, ATP γ S aktivierten Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen fand sich eine Expression des Reifemarkers CD83.

ATP hingegen führte nur zu einer deutlichen Hochregulation von CD54, CD86, und zu einer mäßigen Hochregulation von MHC II (Abb.8).

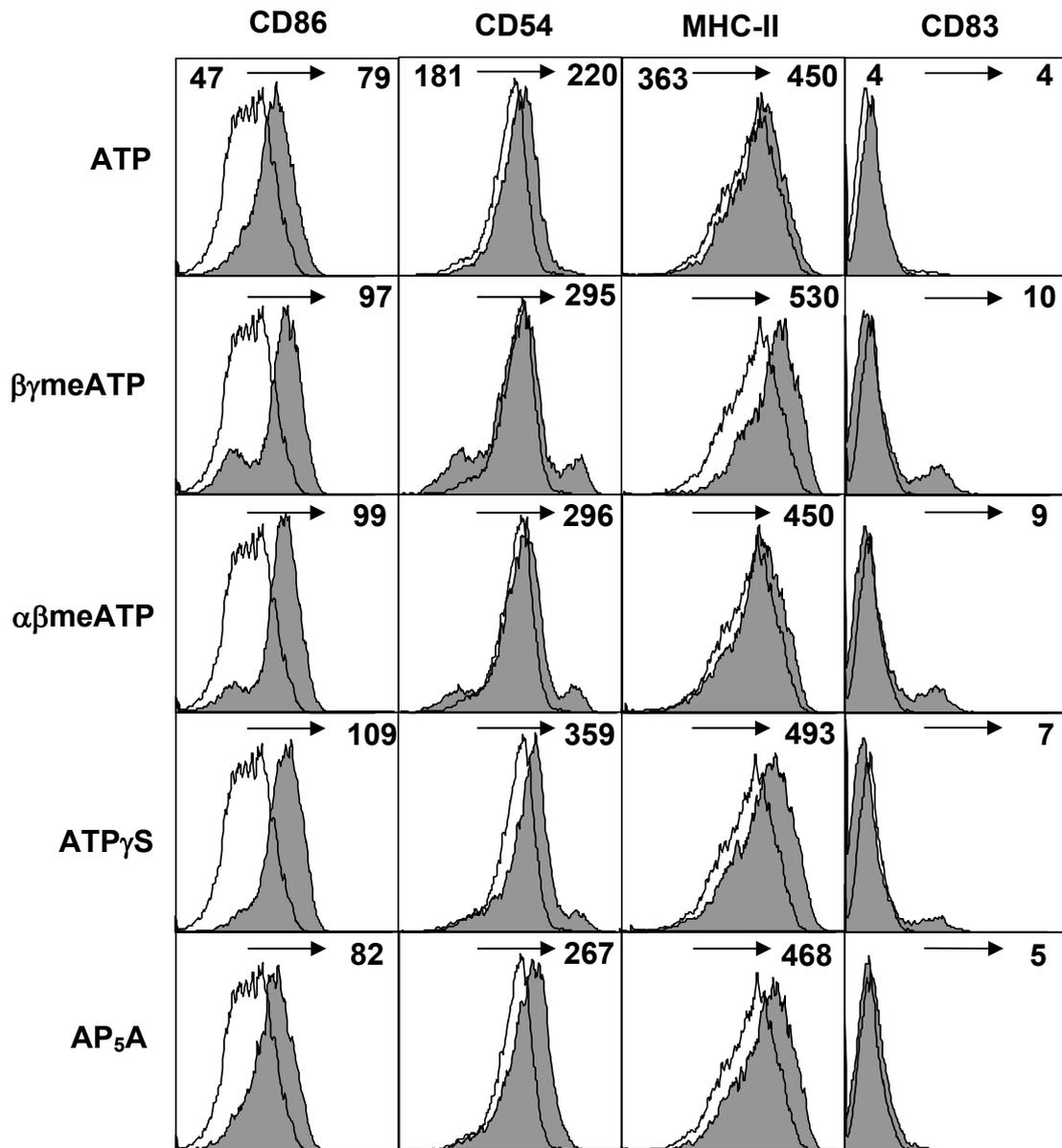


Abb. 8. Effekte von P2-Agonisten auf die Expression der Aktivitätsmarker CD86, CD54, MHC II und CD83. Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen wurden mit ATP (schattierte Integrale) oder ohne ATP (weiße Integrale), beziehungsweise P2-Agonisten (Konzentration je 100 μM) für 48 h inkubiert und anschließend Durchflusszytometrisch analysiert. Die MFI-Werte unstimulierter Zellen sind in den linken oberen Ecken der ersten Reihe angegeben, die der stimulierten Zellen in den rechten oberen Ecken. Dargestellt ist ein repräsentatives von insgesamt vier Experimenten.

	CD86	CD54	MHC II	CD83
unstimuliert	1	1	1	1
ATP	1,47 (+0,17)	1,14 (+0,07)	1,34 (+0,27)	1,17 (+0,12)
$\beta\gamma$ meATP	1,92 (+0,11)	1,41 (+0,15)	1,56 (+0,37)	2,90 (+1,34)
$\alpha\beta$ meATP	1,92 (+0,23)	1,39 (+0,19)	1,50 (+0,58)	2,63 (+0,60)
ATP γ S	1,81 (+0,46)	2,06 (+0,64)	1,20 (+0,18)	1,24 (+0,39)
AP ₅ A	1,26 (+0,35)	1,22 (+0,20)	1,15 (+0,18)	1,14 (+0,10)
UTP	1,01 (+0,07)	1,11 (+0,11)	1,04 (+0,09)	0,98 (+0,40)

Tabelle 2. Gemittelte Werte der mittleren Fluoreszenz-Intensität (+SEM) nach Stimulation von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen mit je 100 μ M ATP oder andern P2-Agonisten für 48 h. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die MFI-Werte der unstimulierten Zellen jedes Versuchs mit 1 festgelegt und alle anderen Werte auf diesen Wert bezogen. Gezeigt sind Daten aus vier unabhängigen Experimenten.

3.4 Einfluss von ATP auf die IL-12-Synthese von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen

Die Fähigkeit zur Produktion des heterodimeren Zytokins IL-12 ist ein wichtiges funktionelles Merkmal von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen, welches die Induktion von T-Helfer 1 (Th1) Immunantworten erlaubt. IL-12 wird bekanntermaßen nach Stimulation mit einer Vielzahl von aktivierenden Substanzen, wie LPS, TNF- α oder PGE₂, sezerniert. Um einen möglichen Einfluss von Nukleotiden auf die Sekretion dieses Zytokins zu untersuchen, wurden Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen von ATP, ATP-Derivaten, oder UTP inkubiert. Anschließend wurde der IL-12-Gehalt in den Überständen mittels ELISA bestimmt, der sowohl IL-12p40 als auch IL-12p70 erfasst. Während UTP keine Wirkung hatte (Daten nicht gezeigt), konnte durch ATP und $\beta\gamma$ meATP sowie $\alpha\beta$ meATP eine Induktion der IL-12 Synthese nachgewiesen werden. Bereits bei einer Konzentration von 100 μ M ATP konnten signifikant erhöhte Gehalte von IL-12 im Überstand gemessen werden ($n=11$, $p=0.006$). Die sezernierte Menge stieg mit der eingesetzten ATP-Konzentration zunächst an (Abb.9). Nach einem Gipfel bei etwa 500 μ M ATP von durchschnittlich 530 pg/ml IL-12 fielen die Werte wieder ab. Konzentrationen über 500 μ M waren mit einer erheblichen Toxizität verbunden, was sich in einem Anteil von PI-positiven Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen von über 30% zeigte.

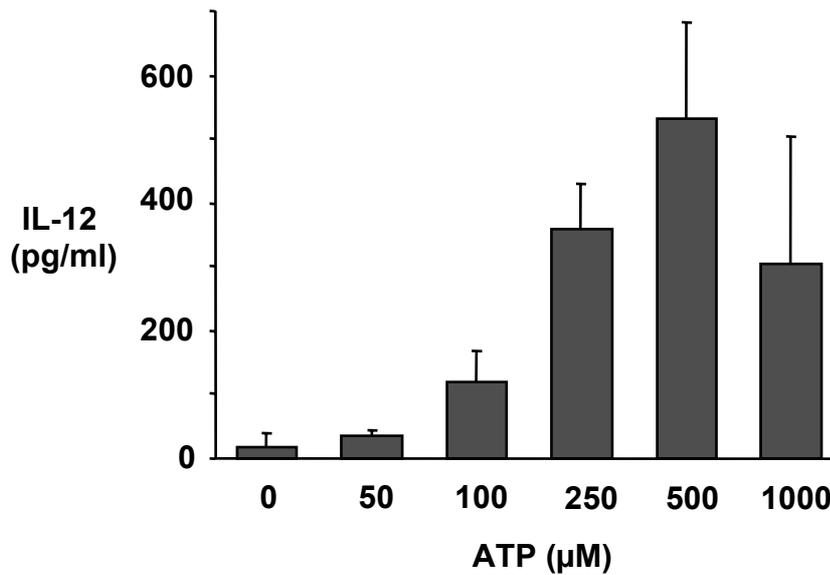


Abb. 9. Exposition von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen mit extrazellulärem ATP induziert dosisabhängig die Produktion von IL-12. Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen wurden für 48 h mit ATP in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Überstände der Zellkulturen wurden mittels ELISA auf ihren Gehalt an IL-12 untersucht. Gezeigt sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten +SEM.

Auch für die IL-12-Sekretion erwiesen sich $\beta\gamma$ meATP, $\alpha\beta$ meATP und ATP γ S als stärkere Stimuli im Vergleich zu nativem ATP, während UTP, MeSATP und AP₅A keine signifikante Wirksamkeit hatten (Daten nicht gezeigt). Um sicherzustellen, dass die beobachteten Effekte tatsächlich rezeptorvermittelt und nicht unspezifischer Natur sind, wurde der P2-Antagonist Suramin eingesetzt. In einer Konzentration von 30 μ M blockierte Suramin sowohl den Effekt von ATP als auch von ATP-Derivaten auf die IL-12-Synthese (Abb.10). Der P2X₇-Antagonist oxyATP hatte keinen signifikanten Effekt auf die ATP-induzierte IL-12-Synthese.

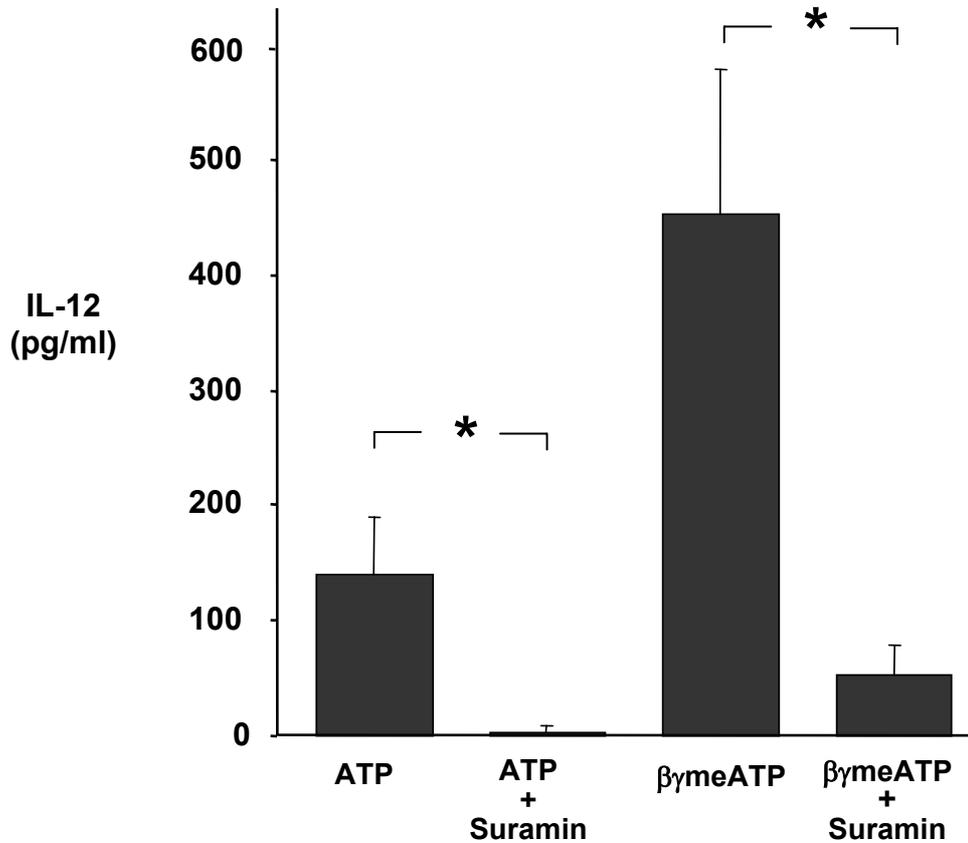


Abb. 10. Die ATP-induzierte IL-12-Produktion wird durch den P2-Rezeptor-Antagonisten Suramin blockiert. Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen wurden für 48 h mit 100 μM ATP oder 100 μM $\beta\gamma\text{meATP}$ in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von 30 μM Suramin inkubiert. Anschließend wurde der IL-12-Gehalt in den Überständen gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten + SEM.

3.5 Einfluss von ATP auf die T-Zell-stimulatorische Kapazität von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen

Dendritische Zellen zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, T-Zellen zu aktivieren und zur Proliferation anzuregen. Mittels MLR (siehe 2.5) wurde der Einfluss von Nukleotiden auf die T-Zell-proliferationsfördernde Wirkung dendritischer Zellen untersucht.

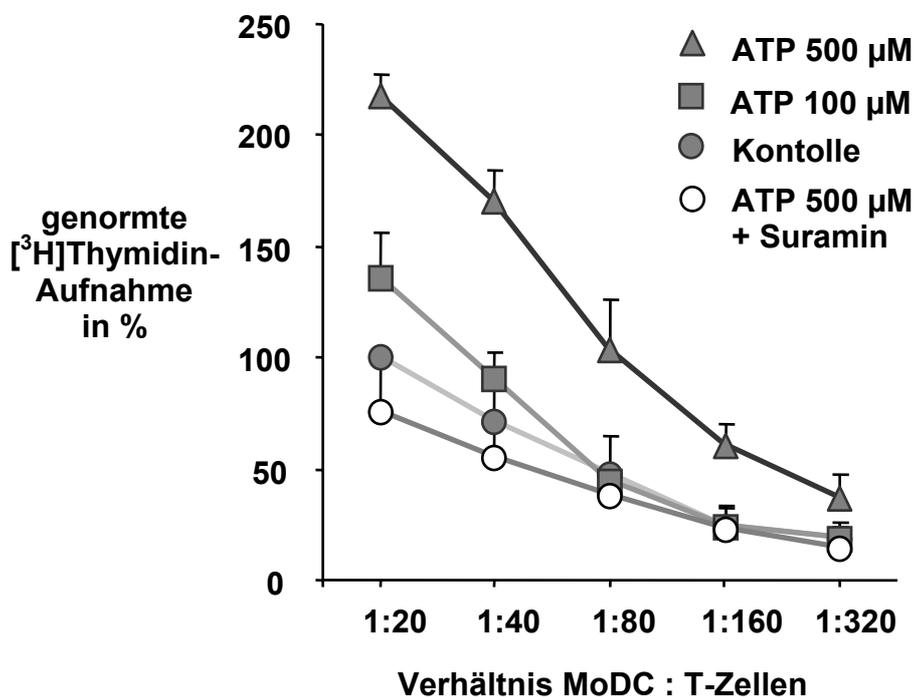


Abb. 11. Aktivierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen (MoDC) mit ATP erhöht dosisabhängig die Kapazität, T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen wurden mit 100 µM bzw. 500 µM ATP in Anwesenheit oder Abwesenheit von 30 µM Suramin inkubiert. Nach 48 h wurden die Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen mit nicht-adhärenenten mononukleären Zellen in den angegebenen Verhältnissen kokultiviert. An Tag 5 wurde den Kokulturen [³H]Thymidin zugegeben. Nach weiteren 18 h wurde die inkorporierte Radioaktivität bestimmt. Als Bezugspunkt wurde die [³H]Thymidin-Aufnahme unstimulierter Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen bei einem Verhältnis von 1:20 gewählt und auf 100% festgelegt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen. Gezeigt sind Mittelwerte (+SEM) von drei unabhängigen Experimenten.

In der MLR wurden die Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen in Verhältnissen von 1:20 bis 1:320 mit allogenen mononukleären Zellen kokultiviert. Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen, die 48 h vor der Kokultur mit 500 μM ATP behandelt worden waren, waren als Stimulatoren der T-Zellproliferation bis zu viermal potenter als unbehandelte Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen (bezogen auf die Zellzahl, die benötigt wird, um eine bestimmte T-Zell-Proliferationsrate zu induzieren). ATP in niedrigerer Konzentration (100 μM) hatte keinen signifikanten Effekt. Der Einfluss von ATP auf die T-Zell-Proliferation ließ sich durch Suramin vollständig antagonisieren (Abb.11).

3.6 Synergistische Effekte von ATP und TNF- α in Bezug auf die Aktivierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen

Die oben beschriebenen Versuche zeigten, dass ATP auf Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen einen aktivierenden Einfluss ausübt. Für das Zytokin TNF- α ist eine solche Wirkung schon längere Zeit bekannt. Sowohl für ATP als auch für TNF- α ist dieser Effekt jedoch nur mäßiggradig ausgeprägt. Im Hinblick auf TNF- α ist bekannt, dass seine Wirkung von durch andere proinflammatorische Stimuli, wie IL-1 β , IL-6, und PGE₂, verstärkt werden kann (Bender *et al.*, 1996, Rieser *et al.*, 1997). Um herauszufinden, ob ATP ähnliche synergistische Effekte mit TNF- α zeigt, wurden in den folgenden Versuchen Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen mit ATP oder ATP-Derivaten und TNF- α inkubiert. Anschließend wurden Oberflächenmarkerexpression, IL-12-Synthese und die Fähigkeit, allogene T-Zellen zu stimulieren, untersucht.

Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen, die nur mit TNF- α stimuliert wurden, produzierten lediglich geringe Mengen an IL-12, vergleichbar mit einer Aktivierung mit 100 μM ATP alleine. Wenn Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen mit 100 μM ATP und TNF- α aktiviert wurden, zeigte sich ein deutlicher synergistischer Effekt. Für 500 μM ATP war dieser Effekt nochmals stärker ausgeprägt (Abb.12).

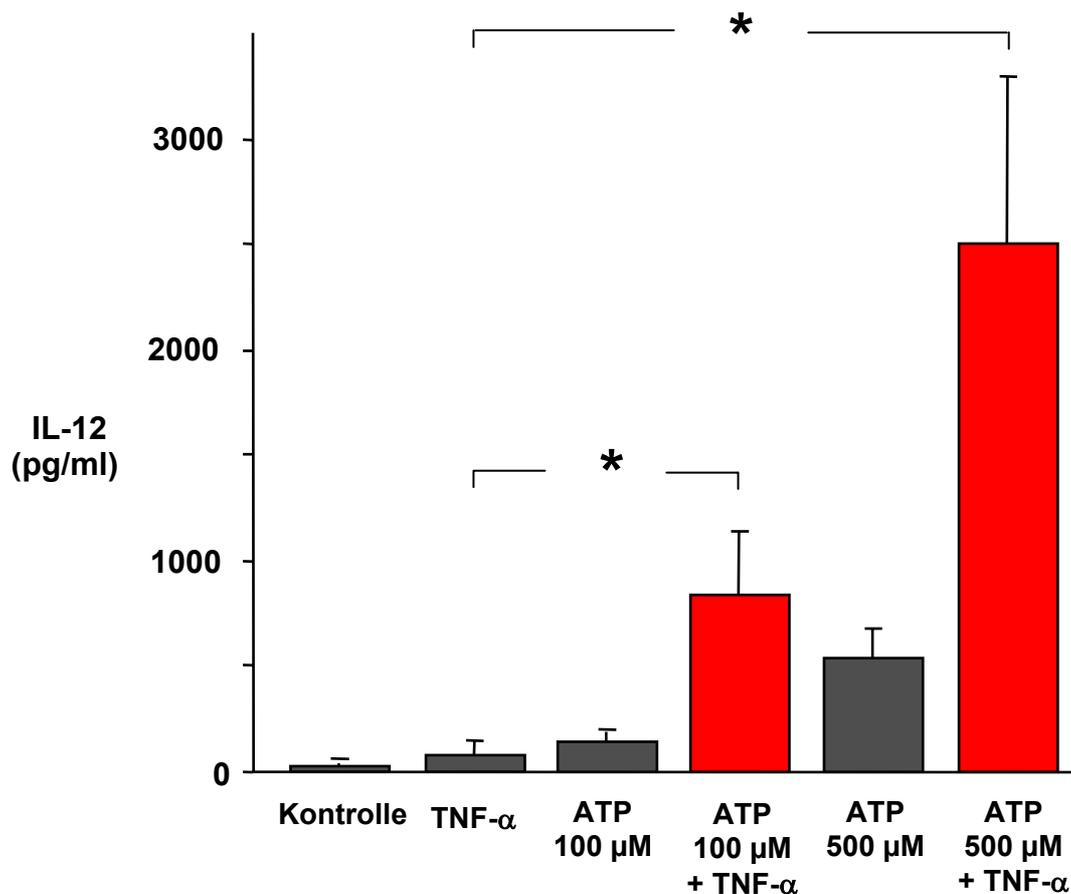


Abb. 12. ATP und TNF- α wirken synergistisch auf die Sekretion von IL-12 durch Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen. Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen wurden mit ATP, TNF- α oder einer Kombination aus beiden in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Nach 48 h wurde die Konzentration von IL-12 im Überstand gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte (+SEM) aus drei unabhängigen Experimenten.

Auch die kombinierte Wirkung von ATP und TNF- α auf die IL-12-Synthese wurde durch Suramin deutlich antagonisiert. Um auszuschließen, dass Suramin einen unspezifisch hemmenden Einfluss auf die Aktivierung dendritischer Zellen hat, wurden diese mit der etablierten Kombination TNF- α und PGE₂ in Anwesenheit oder Abwesenheit von Suramin inkubiert. Bei solchermaßen stimulierten Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen war durch Suramin keine signifikante Inhibition der IL-12-Synthese zu erzielen (Abb.13).

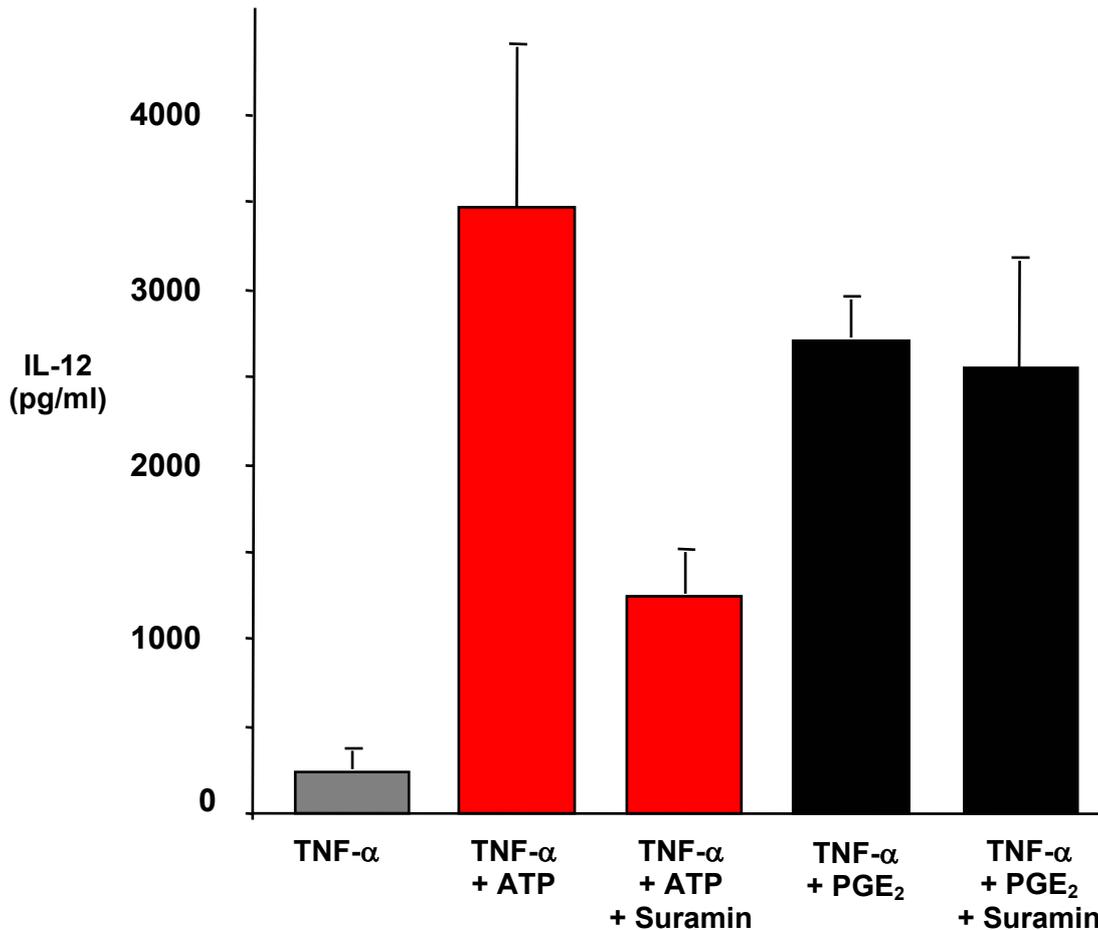


Abb. 13. Der P2R-Antagonist Suramin reduziert den synergistischen Effekt von ATP und TNF- α . Der Effekt von TNF- α in Kombination mit PGE₂ wird dagegen von Suramin nicht beeinflusst. Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen wurden mit 1000 U/ml TNF- α und 500 μ M ATP oder 1 μ M PGE₂ in Anwesenheit oder Abwesenheit von Suramin (30 μ M) inkubiert. Nach 48 h wurde der Gehalt an IL-12 im Zellüberstand gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (+SEM).

Zudem konnte eine synergistische Wirkung von P2-Rezeptoragonisten und TNF- α auf die Ausbildung eines aktivierten Phänotyps von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen beobachtet werden. Das ATP-Derivat $\alpha\beta$ meATP führte in einer Konzentration von 100 μ M zu den oben (Abschnitt 3.3) beschriebenen Veränderungen des Phänotyps von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen sowie zu einer Neuexpression des Reifemarkers CD83 bei einer kleinen Subpopulation (maximal 10%) der Zellen.

Ähnlich wie das ATP-Derivat führte TNF- α in einer Konzentration von 1000 U/ml zu einer Hochregulierung von CD86, CD54, und MHC II, sowie zu einer geringen Zunahme der Expression von CD83 (Abb.14). Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen, die mit einer Kombination aus beiden Stimuli inkubiert wurden, exprimierten nach 48 h zu mehr als 80% CD83. Die Expression von CD86, CD54 und MHCII wurde ebenfalls deutlich hochreguliert (Abb.14).

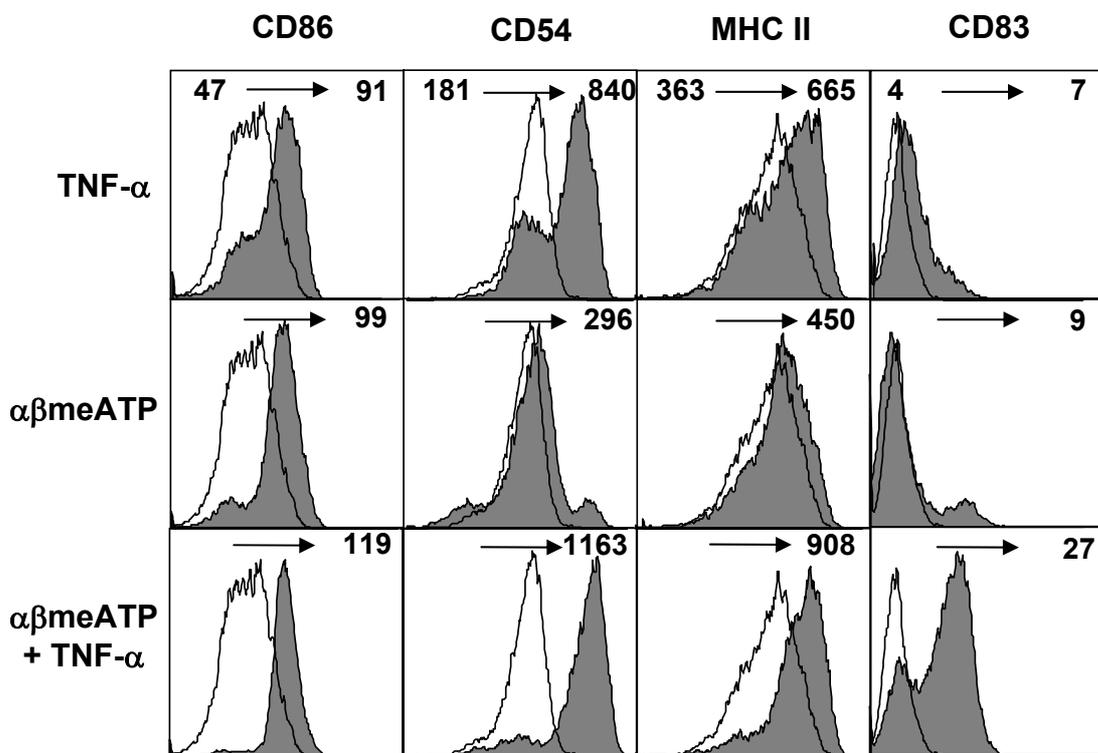


Abb. 14. P2-Rezeptor-Agonisten wirken mit TNF- α synergistisch bei der Aktivierung von dendritischen Zellen. Dendritische Zellen wurden mit 1000 U/ml TNF- α , 100 μM $\alpha\beta\text{meATP}$, oder einer Kombination aus beiden für 48 h inkubiert. Anschließend wurde die Expression von CD86, CD54, MHC II und CD83 Durchflusszytometrisch untersucht. Die MFI-Werte der unstimulierten Zellen sind in den linken Ecken auf den Tafeln der oberen Reihe angegeben. Die MFI-Werte der stimulierten Zellen finden sich jeweils in den rechten oberen Ecken der jeweiligen Tafeln. Gezeigt ist ein repräsentatives von insgesamt drei Experimenten.

Die verstärkte Aktivierung der Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen spiegelte sich in der Beobachtung wider, dass dendritische Zellen, die mit ATP und TNF- α stimuliert wurden, ebenfalls potente Stimulatoren der T-Zell-Proliferation in der MLR waren (Abb.15).

Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen wurden mit 1000 U/ml TNF- α oder 100 μ M ATP oder einer Kombination aus beiden für 48 h inkubiert. Anschließend wurde wie oben beschrieben, die Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung in der MLR untersucht. Es zeigte sich ein ausgeprägter synergistischer Effekt von ATP und TNF- α bezüglich der T-Zell-Proliferation.

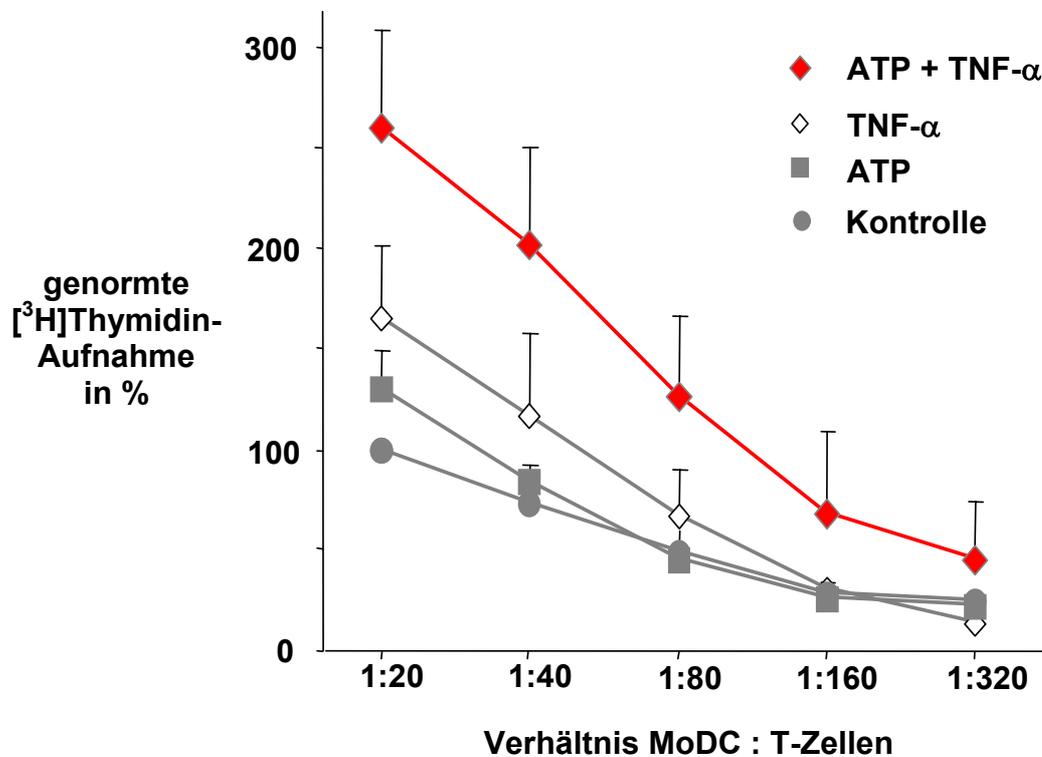


Abb. 15. ATP und TNF- α erhöhen synergistisch die Potenz Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen (MoDC), T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen wurden mit 1000 U/ml TNF- α oder 100 μ M ATP, oder einer Kombination aus beiden für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen mit nicht-adhärenenten mononukleären Zellen in den angegebenen Verhältnissen kokultiviert. Am Tag 5 wurde den Kokulturen [3 H]-Thymidin zugegeben. Nach weiteren 18 h wurde die inkorporierte Radioaktivität bestimmt. Als Bezugspunkt wurde die [3 H]-Thymidin-Aufnahme bei Kokultivierung von unstimulierten Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen mit T-Zellen bei einem Verhältnis von 1:20 gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen. Gezeigt sind Mittelwerte (+SEM) dreier unabhängiger Experimente.

4 Diskussion

4.1 Überblick über die Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass extrazelluläre Nukleotide eine Aktivierung von humanen Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen induzieren können, die sich in einem veränderten Phänotyp und in veränderten funktionellen Eigenschaften der Zellen widerspiegelt.

Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen, die mit ATP stimuliert wurden, erhöhten initial ihre Endozytoserate. Dieser Effekt dauerte ein bis zwei Stunden an und wurde gefolgt von einer anhaltenden Phase stark verminderter endozytotischer Aktivität, wie sie für aktivierte Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen typisch ist. Ferner regulierten Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen in Folge einer Exposition mit extrazellulären Nukleotiden kostimulatorische Moleküle, Adhäsionsmoleküle, und MHC II-Moleküle hoch. Nicht-hydrolysierbare ATP-Derivate induzierten bei einer Subpopulation der Zellen den Reifemarker CD83. Zudem wurde die Synthese von IL-12 dosisabhängig durch ATP induziert. Schließlich steigerte eine Aktivierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen mit ATP deren Fähigkeit, allogene T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Somit wurde erstmals ein Einfluss von ATP auf diese zentrale physiologische Funktion dendritischer Zellen gezeigt.

Alle beobachteten Effekte ließen sich bei gleichzeitiger Inkubation mit TNF- α synergistisch verstärken. P2-Rezeptor-Agonisten und TNF- α zeigten supraadditive Effekte bezüglich der Auswirkung auf die Endozytoserate, den Phänotyp, die IL-12-Produktion und das Vermögen, T-Zellen zur Proliferation anzuregen.

Durch Verwendung von Suramin, eines P2-Rezeptor-Antagonisten, konnten die oben beschriebenen Wirkungen von Nukleotiden blockiert werden. Dies legt nahe, dass ATP seine Wirkung über P2-Rezeptoren vermittelt und die Effekte nicht unspezifischer Natur sind (siehe auch 4.2.3).

Insgesamt legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nahe, dass extrazelluläres ATP, welches unter Bedingungen wie Zellstress, Ischämie und Nekrose extrazellulär im Gewebe akkumulieren kann, allein oder im Konzert mit anderen proinflammatorischen Substanzen wie TNF- α eine richtungsweisende Rolle bei der Aktivierung von dendritischen Zellen und somit allgemein bei der Initiierung einer Immunantwort spielen könnte.

4.2 Methodendiskussion

4.2.1 Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen als Modell für physiologisch vorkommende dendritische Zellen

Dendritische Zellen lassen sich aus unterschiedlichen Vorläuferzellen generieren oder auch direkt aus Blut und Geweben isolieren (siehe auch 1.2). Mehrere Gründe sprechen dafür, wie in der vorliegenden Arbeit Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen zum Gegenstand der Experimente zu machen.

Zum einen sind Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen relativ einfach in großen Mengen innerhalb von nur 5 bis 7 Tagen aus Monozyten des peripheren Blutes zu gewinnen. Eine Vorbehandlung der Probanden mit Substanzen wie G-CSF oder flt3-Ligand, um dendritische Zellen im Blut *in vivo* zu expandieren, ist bei diesem Protokoll nicht erforderlich. Alternativ können dendritische Zellen von CD34+ Stammzellen abgeleitet werden. Diese Methode ist aber wesentlich langwieriger und kostspieliger, ohne klare Vorteile gegenüber den Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen zu bieten.

Aus diesen Gründen handelt es sich bei den Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen um die in der Forschung am häufigsten verwendeten und am besten charakterisierten dendritischen Zellen, so dass die eigenen Ergebnisse vor dem Hintergrund einer großen Anzahl von Publikationen interpretiert und auf ihre Plausibilität hin überprüft werden können. Die Protokolle zu Generierung und Kultur der Zellen sind gut etabliert (Romani *et al.*, 1994, Sallusto *et al.*, 1994, Bender *et al.*, 1996, Romani *et al.*, 1996, Thurner *et al.*, 1999) und lassen eine reproduzierbare Gewinnung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes mit einer Ausbeute von 5-10% der Ausgangszellzahl zu. Erforderlich ist die Zugabe von GM-CSF, einem Wachstumsfaktor für alle dendritischen Zellen der myeloiden Abstammungsreihe (Reid *et al.*, 1992) und IL-4, welches die Entwicklung der Monozyten zu Makrophagen unterdrückt (Jansen *et al.*, 1989).

Zudem spricht für den Einsatz von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen ihre zunehmende Verwendung in klinischen Studien. Die ersten dieser Studien (Nestle *et al.*, 1998, Murphy *et al.*, 1999, Thurner *et al.*, 1999) zeigten bei Malignompatienten ein immunologisches, in einigen Fällen auch klinisches Ansprechen auf eine Vakzinierung mit dendritischen Zellen, die auf vielfältige Weise mit Tumorantigenen beladen wurden. Somit ist davon auszugehen, dass neue Erkenntnisse über die Charakteristika dieser Zellen klinische Relevanz besitzen.

An dieser Stelle muß aber auch erwähnt werden, dass eine physiologische Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen *in vivo* bislang nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Eventuell stellt nur eine bestimmte Fraktion der Monozyten dendritische Vorläuferzellen dar (Crawford *et al.*, 1999). Andere Autoren postulieren, dass die Differenzierung von CD16+ Monozyten zu dendritischen Zellen *in vivo* durch transendotheliale Migration induziert werden kann (Randolph *et al.*, 2002).

Die in dieser Arbeit verwendeten Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen zeigten die von anderen Autoren beschriebenen charakteristischen phänotypischen und funktionellen Eigenschaften. Sie wiesen sich durch die typische Morphologie mit multiplen Zytoplasmaausläufern aus und exprimierten Adhäsionsmoleküle (CD11c, CD54, CD58), kostimulatorische Moleküle (CD80, CD86) und antigenpräsentierende Moleküle (MHC I und MHC II). Sie zeigten eine hohe endozytotische Aktivität und die Kapazität, allogene T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Somit entsprachen die Zellen den *in vivo* beschriebenen unreifen gewebeständigen dendritischen Zellen.

4.2.2 Aktivierung der dendritischen Zellen durch Nukleotide

In der vorliegenden Arbeit wurden ATP-Konzentrationen zwischen 50 µM und 1 mM eingesetzt. Da lebende Zellen im Zytosol oder Zellkompartimenten ATP in Konzentrationen von bis zu 10 mM enthalten, ist davon auszugehen, dass die von uns verwendeten Konzentrationen im Bereich einer physiologisch auftretenden ATP-Exposition dendritischer Zellen, beispielsweise bei Gewebsschäden oder entzündlichen Prozessen, liegen.

Die Expression von ecto-ATPase (CD39) und ecto-5'-Nukleotidase (CD73) auf dendritischen Zellen (Berchtold *et al.*, 1999) wäre dementsprechend als physiologischer Schutz gegen anhaltend hohe und schließlich toxische ATP-Konzentrationen zu interpretieren. Die toxische Wirkung wird durch die Aktivierung des porenbildenden P2X₇-Rezeptors durch ATP im millimolaren Bereich vermittelt (Collo *et al.*, 1997, Di Virgilio *et al.*, 1998). Ekto-Nukleotidasen werden jedoch auch von einer Vielzahl von anderen Zellen und Geweben exprimiert.

Die in dieser Arbeit eingesetzten chemisch modifizierten ATP-Derivate wurden entweder mit dem Ziel eingesetzt, die Grenzen einer maximalen P2-Rezeptor-vermittelten Stimulation auszuloten, oder unter dem Aspekt, möglichst Rückschlüsse auf die Relevanz einzelner Rezeptor-Subtypen bezüglich der ATP-induzierten Aktivierung dendritischer Zellen zu ziehen. Alle Derivate wurden 1994 oder früher als Werkzeuge der P2-Rezeptorforschung beschrieben (Fredholm *et al.*, 1994) und gelten als pharmakologisch hinreichend charakterisiert und in der Forschung etabliert.

4.2.3 Bestimmung von IL-12 mittels ELISA

Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte kommerziell verfügbare ELISA-Kit erkennt ein Epitop des IL-12 p40 Monomers. Gemessen wird somit nicht nur das p70 Heterodimer, sondern auch singuläres p40 bzw. p40 Homodimer. Bis vor kurzem galt das p70-Heterodimer als die biologisch aktive Form des IL-12. Neue Untersuchungen haben aber gezeigt, dass die p40-Untereinheit mit verschiedenen anderen Untereinheiten in Verbindung treten kann und mehrere Interleukine mit distinkten Eigenschaften bilden kann. Es zeichnet sich das Bild einer IL-12-Familie ab mit den Untereinheiten p40, p35, p19, und EBI3, die zu IL-12, aber auch zu den kürzlich beschriebenen Zytokinen IL-23 und IL-27 zusammentreten können (Oppmann *et al.*, 2000, van Seventer *et al.*, 2002, Cordoba-Rodriguez *et al.*, 2003).

4.3 Ergebnisinterpretation vor dem Hintergrund aktueller Literatur

Die immunregulatorischen Eigenschaften von extrazellulärem ATP sind schon seit geraumer Zeit bekannt (siehe auch 1.4), jedoch sind die Auswirkungen von Nukleotiden auf Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen erst in jüngster Zeit Gegenstand der Forschung. Erst 1999 veröffentlichte eine Arbeitsgruppe die Entdeckung, dass murine dendritische Zellen P2X₇-Rezeptoren exprimieren. Klone, die diesen Rezeptor nicht aufwiesen, wurden als vergleichsweise schwache Stimulatoren antigenspezifischer T-Helfer-Lymphozyten identifiziert (Mutini *et al.*, 1999). Marriott *et al.* zeigten, dass mit UTP aktivierte murine dendritische Zellen IL-1 β , IL-6, IL-10, und IL-12 sezernieren (Marriott *et al.*, 1999).

Untersuchungen intrazellulärer ATP-induzierter Kalziumströme von humanen Monozyten-abgeleiteten dendritische Zellen ergaben erste Hinweise auf das Vorhandensein funktioneller P2-Rezeptoren auf diesen Zellen (Liu *et al.*, 1999). In dieser Arbeit wurde auch beschrieben, dass die Zellen ihre Dendriten auf einen ATP-Gradienten hin ausrichten, was einen chemotaktischen Effekt von ATP nahelegt. Die Neuexpression von CD83 weist auf eine Reifeinduktion hin.

Die Freisetzung von IL-12 legt nahe, dass die durch ATP-aktivierte Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen induzierte Immunantwort durch eine Induktion von T_H1-Zellen gekennzeichnet und somit zytotoxischer Natur ist. Die Hypothese, dass ATP eine proinflammatorische Substanz sein könnte, wird durch den auf allen Ebenen beobachteten Synergismus mit dem bekannten proinflammatorischen Zytokin TNF- α weiter unterstützt.

Nach neueren Erkenntnissen wird jedoch durch ATP vorrangig die Produktion der IL-12 p40 Untereinheit stimuliert, nicht jedoch bioaktives IL-12 p70. Zudem wurde gezeigt, dass ATP die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 induziert (Ia Sala *et al.*, 2001). Interessanter Weise scheint ATP sogar die durch LPS oder CD40 Ligand induzierte Synthese von TNF- α und IL-12 p70 zu hemmen und die Aktivierung von T_H2-Zellen zu fördern (Ia Sala *et al.*, 2002).

Diesen Untersuchungen zu Folge könnte ATP ebenfalls eine antiinflammatorische Wirkung besitzen, z.B. als negativer Rückkopplungsmechanismus bei stark ausgeprägten inflammatorischen Prozessen.

Eine solche Funktion wird auch dem Adenosinrezeptor A2a zugeschrieben (Ohta *et al.*, 2001, Sitkovsky, 2003). In den oben beschriebenen Studien wurde ATP als P2-Rezeptoragonist eingesetzt, welches rasch degradiert wird. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die beobachteten antiinflammatorischen Wirkungen durch das ATP-Hydrolyseprodukt Adenosin, vermittelt durch den A2a Rezeptor, bedingt wurde. Weitere Untersuchungen, z.B. unter Verwendung von A2a-Rezeptorantagonisten, sind zur Klärung dieser Frage nötig.

4.4 ATP als physiologisches endogenes Gefahrensignal

Bekanntlich erfordert die Initiierung spezifischer Immunreaktionen in der Regel die vorausgehende Aktivierung dendritischer Zellen. Nach dem Modell von Janeway unterscheidet das menschliche Immunsystem dabei primär „selbst“ von „nicht-selbst“ um in den Körper eindringende Mikroorganismen zu bekämpfen (Janeway, 1992). Die auslösenden Signale können dabei bakterielle Produkte wie LPS, nichtmethylierte CpG-DNA-Motive, wie sie im Genom von Bakterien und Viren zu finden sind, oder virale doppelsträngige RNA sein (Hartmann *et al.*, 1999).

In den letzten Jahren hat dieses Konzept eine entscheidende Erweiterung erfahren. Das sogenannte Gefahrenmodell („danger model“) postuliert, dass dendritische Zellen auch von endogenen Mediatoren aktiviert werden, die bei Schädigung oder Stress körpereigener Zellen unmittelbar frei werden (Ibrahim *et al.*, 1995, Matzinger, 1998). Neuere Studien haben gezeigt, dass dendritische Zellen durch nekrotische, mechanisch gestresste oder virusinfizierte Zellen in der Nachbarschaft aktiviert werden, während gesunde oder apoptotische Zellen keine derartigen Effekte haben (Gallucci *et al.*, 1999, Sauter *et al.*, 2000).

Die oben beschriebenen Studien legen die Existenz induzierbarer oder präformierter Moleküle nahe, die von vital bedrohten oder geschädigten Zelle in den Extrazellularraum freigesetzt werden und von Zellen des Immunsystems als Gefahrensignal interpretiert werden. Ein Beispiel sind stress-induzierbare Hitzeschock-Proteine, die eine Aktivierung von dendritischen Zellen bewirken können (Singh-Jasuja *et al.*, 2001, Bethke *et al.*, 2002, Feng *et al.*, 2002).

In der Zusammenschau der Literatur und unserer Ergebnisse scheint plausibel, dass auch das ubiquitär vorkommende Molekül ATP eine solche Rolle als Gefahrensignal innehaben könnte. ATP liegt im Zytosol in Konzentrationen von 5 mM bis 10 mM vor, in präformierten Vesikeln sogar in molaren Konzentrationen. Es entspräche damit einem präformierten Signalstoff, der bei Membran- oder Zellschäden etwa durch Trauma, Entzündung oder unkoordiniertes Tumorwachstum in relevanten Konzentrationen im Interstitium auftreten würde.

Tatsächlich wird ATP von aktivierten T-Zellen (Filippini *et al.*, 1990), Makrophagen (Sperlagh *et al.*, 1998), Mikroglia-Zellen (Ferrari *et al.*, 1997) und einigen Tumorzelllinien (Pedersen *et al.*, 1999) auch aktiv sezerniert. Unter physiologischen Bedingungen wird ATP rasch durch ecto-Nukleotidasen zu Adenosin degradiert. In entzündlich verändertem Gewebe kommt es jedoch zu einer Herunterregulierung von ecto-ATP/ADPase, wodurch in diesen Regionen durchaus ATP akkumulieren kann (Robson *et al.*, 1997). Dies wäre unserer Hypothese entsprechend der Unterhaltung einer Immunreaktion förderlich.

Beim Untergang von Zellen werden ferner Protein-Vorläufer freigesetzt, die als mannosylierte Moleküle Liganden für Mannoserezeptoren darstellen. Somit fügt sich auch die oben beschriebene Hochregulierung der mannoserezeptorvermittelten Endozytose sinnvoll in das Modell. Nach dieser ersten, kurz anhaltenden funktionellen Antwort auf die ATP-Stimulation würden dendritische Zellen demnach in einer zweiten Phase über den Lymphweg in drainierenden Lymphknoten einwandern, um dort mit T-Zellen zu interagieren.

4.5 Beteiligte Rezeptor-Subtypen

Die Vielzahl von verschiedenen P2-Rezeptoren und das Fehlen spezifischer pharmakologischer Werkzeuge, etwa monoklonaler Antikörper gegen Rezeptoren, spezifischer Agonisten und Antagonisten, haben es bisher unmöglich gemacht definitiv nachzuvollziehen, welcher P2-Rezeptor-subtyp die Aktivierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen vermittelt. Es gibt jedoch zahlreiche indirekte Hinweise, die Rückschlüsse zulassen.

Auf RNA-Ebene wurden bisher folgende P2-Rezeptor-subtypen auf Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen nachgewiesen: P2Y₁, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁ und P2Y₍₁₃₎ sowie P2X₁, P2X₄, P2X₅, und P2X₇ (Berchtold *et al.*, 1999, Ferrari *et al.*, 2000, Zhang *et al.*, 2002, Schnurr *et al.*, 2003).

Funktionell wurden durch Patch-clamp-Untersuchungen und Studien zur Signaltransduktion sowohl Ionenkanal-bildende P2X- als auch G-Protein-gekoppelte P2Y-Rezeptoren nachgewiesen (Valera *et al.*, 1994, Liu *et al.*, 1999). In Kalzium-Flussbestimmungen ließ sich eindeutig die Expression von Pertussis-Toxin-sensitiven G-Protein-gekoppelten P2Y-Rezeptoren nachweisen, die über eine Aktivierung von Phospholipase C und IP₃ Kalzium aus intrazellulären Speichern freisetzen (Idzko *et al.*, 2002, Schnurr *et al.*, 2003).

Auch die pharmakologischen Eigenschaften der Rezeptoren lassen Rückschlüsse auf funktionell beteiligte Subtypen zu. In ihrem Ansprechen auf unterschiedliche Agonisten zeigen viele dieser Subtypen ein charakteristisches Profil (Dubyak *et al.*, 1993, Abbracchio *et al.*, 1994, Fredholm *et al.*, 1994).

Beispielsweise kommen von den sieben bekannten P2X-Rezeptoren die Subtypen P2X₂, P2X₄, und P2X₅ nicht als verantwortlich für die von uns beobachteten Effekte in Betracht, da sie nicht auf $\alpha\beta$ meATP ansprechen (MacKenzie *et al.*, 1999). P2X₇, der bei Stimulation mit ATP im millimolaren Bereich nicht-selektive Poren bildet (siehe 1.3.1 sowie Abb. 3), spielt bekanntermaßen bei der Antigenpräsentation und Apoptose von murinen dendritischen Zellen eine Rolle (Coutinho-Silva *et al.*, 1999, Mutini *et al.*, 1999). Eine Beteiligung dieses Rezeptors in unserem Modell ließe aber erwarten, dass beobachtete Effekte durch oxyATP, einen P2X₇-Blocker, inhibierbar sind. Da dies in unseren Experimenten nicht der Fall war, bleiben P2X₁ und P2X₃, als mögliche Mediatoren der oben beschriebenen Phänomene.

Die P2Y-Familie beinhaltet die Purin-selektiven Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₁, die bevorzugt von ATP und ADP aktiviert werden. Daneben existieren reine Pyrimidin-Rezeptoren (P2Y₄, P2Y₆) und solche, die sowohl von Adenin- als auch von Uracilnukleotiden aktiviert werden (P2Y₂, P2Y₈) (Communi *et al.*, 1999). P2Y₁₂ und P2Y₁₃ konnten kürzlich als neuere Mitglieder der P2Y-Rezeptorfamilie identifiziert werden. Sie gelten als ADP-spezifische Rezeptoren (Zhang *et al.*, 2002, Andre *et al.*, 2003). Es ist bekannt, dass, anders als bei murinen dendritischen Zellen, humane monozyten-abgeleitete dendritische Zellen nicht durch UTP aktiviert werden (Marriott *et al.*, 1999).

Was die Potenz unterschiedlicher P2-Agonisten anbelangt, gilt der P2Y₁-Rezeptor als nicht reaktiv gegenüber methylierten ATP-Derivaten, die sich aber in unseren Experimenten als starke Agonisten erwiesen.

Der P2Y₁₁-Rezeptor wurde bislang unter diesem Aspekt nicht untersucht. Jedoch ist für den P2Y₁₁-Rezeptor bekannt, dass ATP_γS stärker, 2MeSATP dagegen schwächer wirksam ist als der physiologische Ligand ATP (Communi *et al.*, 1999). Diese Rangfolge bezüglich der Potenz der schwefelhaltigen ATP-Derivate konnten wir in unseren Experimenten ebenfalls beobachten (siehe auch 3.3). Folglich ist in der Zusammenschau unserer Ergebnisse P2Y₁₁ das am wahrscheinlichsten involvierte Mitglied der P2Y-Familie.

Inzwischen wurde die Rolle des P2Y₁₁-Rezeptors in mehreren Studien genauer untersucht und seine wichtige Rolle bei der Aktivierung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen bestätigt. Wilkin und Mitarbeiter (Wilkin *et al.*, 2001) konnten zeigen, dass der ATP-Effekt auf die Reifeinduktion von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen durch Proteinkinase A vermittelt wird. Dieser Signaltransduktionsweg wird auch vom P2Y₁₁-Rezeptor genutzt. Zudem wurde in diesen Versuchen die Substanz 2-propylthio-β,γ-dichlormethylene-D-Adenosine-5'triphosphat (AR-C67085) mit besonders hoher Affinität zum P2Y₁₁-Rezeptor eingesetzt und zeigte eine stärkere Wirkung auf Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen als alle bisher verwendeten ATP-Derivate.

Eine weitere aktuelle Studie (Schnurr *et al.*, 2003) konnte belegen, dass die Rangfolge von P2-Rezeptoragonisten bezüglich der Aktivierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen gut mit der Rangfolge übereinstimmte, die für den isolierten P2Y₁₁-Rezeptor ermittelt wurde (Communi *et al.*, 1999). Schnurr und Mitarbeiter konnten auch zeigen, dass der P2Y₁₁-Rezeptor nach Aktivierung der Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen herabreguliert wird, was ein weiterer indirekter Hinweis auf eine funktionelle Rolle des Rezeptors ist.

Fasst man die Ergebnisse unserer Arbeit und die neueste Literatur zusammen, so ist es wahrscheinlich, dass der P2Y₁₁-Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen spielt. Eine Beteiligung anderer P2-Rezeptorsubtypen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

4.6 Klinische Relevanz

Eingang in die klinische Forschung könnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit möglicherweise auf dem Gebiet der Tumor-Immuntherapie finden. Einige klinische Studien mit Tumorstoffen auf der Basis von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen zeigten ermutigende, wenn auch bei weitem noch nicht zufriedenstellende Ergebnisse (Nestle *et al.*, 1998, Murphy *et al.*, 1999, Thurner *et al.*, 1999, Pecher *et al.*, 2002, Slingluff *et al.*, 2003, Yamanaka *et al.*, 2003).

Eine zentrale Frage in all diesen Studien ist die optimale Stimulation der Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen, um sie zu möglichst potenten Initiatoren einer Immunantwort zu machen. Der Weg einer P2-Rezeptor-vermittelten Aktivierung wurde bisher nicht besprochen. Möglicherweise könnte eine *ex vivo* Stimulation Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen mit P2-Agonisten allein oder in Kombination mit anderen derzeit verwendeten proinflammatorischen Substanzen hier erweiterte Optionen bieten.

Erste Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe aus einem *in vitro* „cross-priming“-Modell, in dem T-Zell-Aktivität gegen Antigene auf Pankreaskarzinomzellen bestimmt wurde, zeigten interessante Ergebnisse: Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen, die mit ATP, TNF- α und CD40 Ligand aktiviert wurden und mit Fragmenten apoptotischer Tumorzellen beladen waren, induzierten eine starke zytotoxische Reaktion gegen Tumorzellen (Manuskript in Vorbereitung).

Denkbar ist zudem, dass P2-Rezeptor-Agonisten als Adjuvantien für Impfstoffe auch *in vivo* zu einem verbesserten Ansprechen des Immunsystems auf die applizierten Antigene führen könnten.

5 Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die Untersuchung der rezeptorvermittelten Effekte extrazellulärer Nukleotide auf humane Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen. Hintergrund der Arbeit sind die bekannten Effekte von Nukleotiden auf viele Zellen des Immunsystems einerseits und das Wissen um die zentrale Rolle dendritischer Zellen in immunologischen Abläufen andererseits. Daraus ergibt sich ein wissenschaftliches Interesse an möglichen Wirkungen von Nukleotiden auf diese Zellpopulation. Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen sind durch den Einsatz in Vakzinierungsprotokollen in klinischen Studien besonders relevant. Daher ist es wichtig, Einflussfaktoren für die Funktion dieser Zellen möglichst genau zu definieren, weshalb die vorliegende Arbeit ausschließlich diese Zellpopulation zum Gegenstand der Untersuchungen hat.

In dieser experimentellen Arbeit zur Untersuchung von rezeptorvermittelten Effekten von extrazellulären Nukleotiden auf humane Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen wurden sowohl physiologische Agonisten wie ATP, UTP oder AP₅A, als auch chemisch modifizierte ATP-Derivate verwendet. Sie alle sind Agonisten an P2-Rezeptoren, unterscheiden sich jedoch deutlich in ihrer Affinität zu bestimmten Rezeptor-Subtypen sowie in ihrer Stabilität gegenüber ecto-Nukleotidasen.

Die folgenden Befunde wurden erhoben:

Humane Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen erhöhen nach ATP-Stimulation vorübergehend ihre Endozytoserate. Dieser Vorgang ist durch Mannoserezeptoren vermittelt und repräsentiert wahrscheinlich eine erhöhte Fähigkeit zur Antigenaufnahme nach ATP-Exposition.

Bezogen auf den Phänotyp der Zellen führt die Stimulation mit ATP und einigen anderen P2-Rezeptoragonisten zu einer vermehrten Expression von kostimulatorischen Molekülen, Adhäsionsmolekülen, und antigen-präsentierenden Molekülen. Bei Verwendung Hydrolyse-resistenter ATP-Derivate kann eine P2-Rezeptor-vermittelte Neuexpression des Reifmarkers CD83 bei einer Subpopulation der Zellen beobachtet werden.

Ferner induzieren extrazelluläres ATP und ATP-Derivate die Freisetzung von IL-12. Dieser Effekt ist dosisabhängig und erreicht für den physiologischen Liganden ATP ein Maximum bei 500 μM . Mit höheren Konzentrationen lässt sich aufgrund dann einsetzender toxischer Effekte keine weitere Steigerung der IL-12-Sekretion mehr erzielen. Der nichtselektive P2-Rezeptorantagonist Suramin blockiert die IL-12-Freisetzung.

In der Interaktion mit T-Zellen erweisen sich mit ATP aktivierte Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen als potente Stimulatoren der T-Zell-Proliferation. Auch diese Funktion zeigt die oben beschriebene Dosisabhängigkeit und lässt sich mit vielen P2-Rezeptorantagonisten erzielen, mit P2-Rezeptorantagonisten dagegen hemmen.

Schließlich zeigte sich, dass eine Aktivierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen mit $\text{TNF-}\alpha$, bezüglich aller oben beschriebenen Parameter synergistisch mit ATP oder dessen Derivaten wirkt. Gleichzeitige Verwendung von $\text{TNF-}\alpha$ und P2-Rezeptor-Agonisten aktiviert Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen, führt zur Ausbildung eines ausgereiften Phänotyps, starker Erhöhung der IL-12-Sekretion, und macht die Zellen zu potenteren Stimulatoren der T-Zell-Proliferation.

Zusammenfassend erlauben die Ergebnisse den Schluss, dass extrazelluläres ATP rezeptorvermittelt eine aktivierende Wirkung auf humane Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen ausübt. Demnach ist ATP in diesem Kontext als proinflammatorisch wirksame Substanz anzusehen. Eine klinische Relevanz der Ergebnisse könnte sich auf dem Gebiet der Tumormunologie finden, die sich zunehmend Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen als Werkzeug zur Initiierung einer gegen Malignome gerichteten Immunantwort bedient. Die in vielen Protokollen vorgesehene *in vitro*-Stimulation der Zellen wirft die Frage nach optimalen aktivierenden Stimuli auf und macht die Erkenntnisse dieser Arbeit auch für die klinisch-experimentelle Tumorforschung relevant.

Literatur

Abbracchio, M.P. and B. G., (1994).

"Purinceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors?" Pharmacol Ther **64**: 445-75.

Albert, M.L., S.F. Pearce, L.M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R.L. Silverstein and N. Bhardwaj, (1998).

"Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." J Exp Med **188**: 1359-68.

Altieri, D.C., W.L. Wiltse and T.S. Edgington, (1990).

"Signal transduction initiated by extracellular nucleotides regulates the high affinity ligand recognition of the adhesive receptor CD11b/CD18." J Immunol **145**: 662-70.

Andre, P., S.M. Delaney, T. LaRocca, D. Vincent, F. DeGuzman, M. Jurek, B. Koller, D.R. Phillips and P.B. Conley, (2003).

"P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries." J Clin Invest **112**: 398-406.

Austyn, J.M. and C.P. Larsen, (1990).

"Migration patterns of dendritic leukocytes. Implications for transplantation." Transplantation **49**: 1-7.

Balazovich, K.J. and L.A. Boxer, (1990).

"Extracellular adenosine nucleotides stimulate protein kinase C activity and human neutrophil activation." J Immunol **144**: 631-7.

Banchereau, J. and R.M. Steinman, (1998).

"Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**: 245-52.

Baricordi, O.R., L. Melchiorri, E. Adinolfi, S. Falzoni, P. Chiozzi, G. Buell and F. Di Virgilio, (1999).

"Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X(7) ATP receptor." J Biol Chem **274**: 33206-8.

Bender, A., M. Sapp, G. Schuler, R.M. Steinman and N. Bhardwaj, (1996).

"Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood." J Immunol Methods **196**: 121-35.

Berchtold, S., A.L. Ogilvie, C. Bogdan, P. Muhl-Zurbes, A. Ogilvie, G. Schuler and A. Steinkasserer, (1999).

"Human monocyte derived dendritic cells express functional P2X and P2Y receptors as well as ecto-nucleotidases." FEBS Lett **458**: 424-8.

Bethke, K., F. Staib, M. Distler, U. Schmitt, H. Jonuleit, A.H. Enk, P.R. Galle and M. Heike, (2002).

"Different efficiency of heat shock proteins (HSP) to activate human monocytes and dendritic cells: superiority of HSP60." J Immunol **169**: 6141-8.

Böyum, A., (1968).

"Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood." Scand J Clin Lab Invest **77**-89.

-
- Brake, A.J., M.J. Wagenbach and D. Julius, (1994).
"New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor." Nature **371**: 519-23.
- Buell, G., G. Collo and F. Rassendren, (1996).
"P2X receptors: an emerging channel family." Eur J Neurosci **8**: 2221-8.
- Burnstock, G., (1972).
"Purinergetic nerves." Pharmacol Rev **24**: 509-81.
- Burnstock, G., (1978).
"A basis for distinguishing two types of purinergic receptor." Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones; Raven Press **1**: 107-118.
- Cella, M., F. Sallusto and A. Lanzavecchia, (1997).
"Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells." Curr Opin Immunol **9**: 10-6.
- Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia and G. Alber, (1996).
"Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation." J Exp Med **184**: 747-52.
- Chang, K., K. Hanaoka, M. Kumada and Y. Takuwa, (1995).
"Molecular cloning and functional analysis of a novel P2 nucleotide receptor." J Biol Chem **270**: 26152-8.
- Charlton, S.J., C.A. Brown, G.A. Weisman, J.T. Turner, L. Erb and M.R. Boarder, (1996).
"Cloned and transfected P2Y4 receptors: characterization of a suramin and PPADS-insensitive response to UTP." Br J Pharmacol **119**: 1301-3.
- Chen, C.C., A.N. Akopian, L. Sivilotti, D. Colquhoun, G. Burnstock and J.N. Wood, (1995).
"A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons." Nature **377**: 428-31.
- Chused, T.M., S. Apasov and M. Sitkovsky, (1996).
"Murine T lymphocytes modulate activity of an ATP-activated P2Z-type purinoceptor during differentiation." J Immunol **157**: 1371-80.
- Clifford, E.E., K.A. Martin, P. Dalal, R. Thomas and G.R. Dubyak, (1997).
"Stage-specific expression of P2Y receptors, ecto-apyrase, and ecto-5'-nucleotidase in myeloid leucocytes." Am J Physiol **273**: C973-87.
- Cockcroft, S. and B.D. Gomperts, (1979).
"ATP induces nucleotide permeability in rat mast cells." Nature **279**: 541-2.
- Cockcroft, S. and B.D. Gomperts, (1980).
"The ATP4- receptor of rat mast cells." Biochem J **188**: 789-98.
- Cockcroft, S. and J. Stutchfield, (1989).
"ATP stimulates secretion in human neutrophils and HL60 cells via a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein coupled to phospholipase C." FEBS Lett **245**: 25-9.

Collo, G., S. Neidhart, E. Kawashima, M. Kosco-Vilbois, R.A. North and G. Buell, (1997).

"Tissue distribution of the P2X7 receptor." Neuropharmacology **36**: 1277-83.

Communi, D. and J.M. Boeynaems, (1997).

"Receptors responsive to extracellular pyrimidine nucleotides." Trends Pharmacol Sci **18**: 83-6.

Communi, D., M. Parmentier and J.M. Boeynaems, (1996).

"Cloning, functional expression and tissue distribution of the human P2Y6 receptor." Biochem Biophys Res Commun **222**: 303-8.

Communi, D., B. Robaye and J.M. Boeynaems, (1999).

"Pharmacological characterization of the human P2Y11 receptor." Br J Pharmacol **128**: 1199-206.

Cordoba-Rodriguez, R. and D.M. Frucht, (2003).

"IL-23 and IL-27: new members of the growing family of IL-12-related cytokines with important implications for therapeutics." Expert Opin Biol Ther **3**: 715-23.

Coutinho-Silva, R., P.M. Persechini, R.D. Bisaggio, J.L. Perfettini, A.C. Neto, J.M. Kanellopoulos, I. Motta-Ly, A. Dautry-Varsat and D.M. Ojcius, (1999).

"P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells." Am J Physiol **276**: C1139-47.

Cowen, D.S., H.M. Lazarus, S.B. Shurin, S.E. Stoll and G.R. Dubyak, (1989).

"Extracellular adenosine triphosphate activates calcium mobilization in human phagocytic leukocytes and neutrophil/monocyte progenitor cells." J Clin Invest **83**: 1651-60.

Cowen, D.S., M. Sanders and G. Dubyak, (1990).

"P2-purinergic receptors activate a guanine nucleotide-dependent phospholipase C in membranes from HL-60 cells." Biochim Biophys Acta **1053**: 195-203.

Crawford, K., D. Gabuzda, V. Pantazopoulos, J. Xu, C. Clement, E. Reinherz and C.A. Alper, (1999).

"Circulating CD2+ monocytes are dendritic cells." J Immunol **163**: 5920-8.

Daar, A.S., S.V. Fuggle, D.N.J. Hart, R. Dalchau, Z. Abdulaziz, J.W. Fabre, A. Ting and P.J. Morris, (1983).

"Demonstration and phenotypic characterization of HLR-DR positive interstitial dendritic cells widely distributed in human connective tissues." Trans Proc **1**: 311-329.

Dawicki, D.D., J. McGowan-Jordan, S. Bullard, S. Pond and S. Rounds, (1995).

"Extracellular nucleotides stimulate leukocyte adherence to cultured pulmonary artery endothelial cells." Am J Physiol **268**: L666-73.

Denlinger, L.C., P.L. Fiset, K.A. Garis, G. Kwon, A. Vazquez-Torres, A.D. Simon, B. Nguyen, R.A. Proctor, P.J. Bertics and J.A. Corbett, (1996).

"Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by macrophage purinoreceptors and calcium." J Biol Chem **271**: 337-42.

Di Virgilio, F., (1995).

"The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death." Immunol Today **16**: 524-8.

-
- Di Virgilio, F., P. Chiozzi, S. Falzoni, D. Ferrari, J.M. Sanz, V. Venketaraman and O.R. Baricordi, (1998).
"Cytolytic P2X purinoceptors." Cell Death Differ **5**: 191-9.
- Di Virgilio, F., P. Chiozzi, D. Ferrari, S. Falzoni, J.M. Sanz, A. Morelli, M. Torboli, G. Bolognesi and O.R. Baricordi, (2001).
"Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells." Blood **97**: 587-600.
- Di Virgilio, F., D. Ferrari, P. Chiozzi, S. Falzoni, J.M. Sanz, M. Susino, C. Mutini, S. Hanau and O.R. Baricordi, (1996).
"Purinoceptor function in the immune system." Drug Dev Res **39**: 319-29.
- Dichmann, S., M. Idzko, U. Zimpfer, C. Hofmann, D. Ferrari, W. Luttmann, C. Virchow, Jr., F. Di Virgilio and J. Norgauer, (2000).
"Adenosine triphosphate-induced oxygen radical production and CD11b up-regulation: Ca(++) mobilization and actin reorganization in human eosinophils." Blood **95**: 973-8.
- Drury, A.N. and Szent-Györgyi, (1929).
"The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart." J. Physiol. (Lond.) **68**: 213-237.
- Dubyak, G.R. and C. el-Moatassim, (1993).
"Signal transduction via P2-purinoceptors for extracellular ATP and other nucleotides." Am J Physiol **265**: C577-606.
- Dunn, P.M. and A.G. Blakeley, (1988).
"Suramin: a reversible P2-purinoceptor antagonist in the mouse vas deferens." Br J Pharmacol **93**: 243-5.
- Fais, S., V.L. Burgio, M.R. Capobianchi, S. Gessani, F. Pallone and F. Belardelli, (1997).
"The biological relevance of polykaryons in the immune response." Immunol Today **18**: 522-7.
- Falzoni, S., M. Munerati, D. Ferrari, S. Spisani, S. Moretti and F. Di Virgilio, (1995).
"The purinoceptor P2Z receptor of human macrophage cells. Characterization and possible physiological role." J Clin Invest **95**: 1207-16.
- Fanger, N.A., K. Wardwell, L. Shen, T.F. Tedder and P.M. Guyre, (1996).
"Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells." J Immunol **157**: 541-8.
- Feng, H., Y. Zeng, M.W. Graner and E. Katsanis, (2002).
"Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic T cells." Blood **100**: 4108-15.
- Ferrari, D., P. Chiozzi, S. Falzoni, S. Hanau and F. Di Virgilio, (1997).
"Purinoceptor modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin." J Exp Med **185**: 579-82.
- Ferrari, D., A. La Sala, P. Chiozzi, A. Morelli, S. Falzoni, G. Girolomoni, M. Idzko, S. Dichmann, J. Norgauer and F. Di Virgilio, (2000).
"The P2 purinoceptor receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release." Faseb J **14**: 2466-76.

-
- Filippini, A., R.E. Taffs and M.V. Sitkovsky, (1990).
"Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions." Proc Natl Acad Sci U S A **87**: 8267-71.
- Fishman, R.F., A.L. Rubin, A. Novogrodsky and K.H. Stenzel, (1980).
"Selective suppression of blastogenesis induced by different mitogens: effect of noncyclic adenosine-containing compounds." Cell Immunol **54**: 129-39.
- Flodgaard, H. and H. Klenow, (1982).
"Abundant amounts of diadenosine 5',5"-P1,P4-tetraphosphate are present and releasable, but metabolically inactive, in human platelets." Biochem J **208**: 737-42.
- Fredholm, B.B., M.P. Abbracchio, G. Burnstock, J.W. Daly, T.K. Harden, K.A. Jacobson, P. Leff and M. Williams, (1994).
"Nomenclature and classification of purinoceptors." Pharmacol Rev **46**: 143-56.
- Fredholm, B.B., M.P. Abbracchio, G. Burnstock, G.R. Dubyak, T.K. Harden, K.A. Jacobson, U. Schwabe and M. Williams, (1997).
"Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors." Trends Pharmacol Sci **18**: 79-82.
- Gallucci, S., M. Lolkema and P. Matzinger, (1999).
"Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cell." Nat Med **5**: 1249-55.
- Gerwins, P. and B.B. Fredholm, (1992).
"ATP and its metabolite adenosine act synergistically to mobilize intracellular calcium via the formation of inositol 1,4,5-trisphosphate in a smooth muscle cell line." J Biol Chem **267**: 16081-7.
- Gerwins, P. and B.B. Fredholm, (1995).
"Activation of adenosine A1 and bradykinin receptors increases protein kinase C and phospholipase D activity in smooth muscle cells." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **351**: 186-93.
- Girolomoni, G., M.B. Lutz, S. Pastore, C.U. Assmann, A. Cavani and P. Ricciardi-Castagnoli, (1995).
"Establishment of a cell line with features of early dendritic cell." Eur J Immunol **25**: 2163-9.
- Green, H.N. and H.B. Stoner, (1950).
"Biological Actions of the Adenine Nucleotides." H.K.Lewis & Co. Ltd., London **1**: 1-221.
- Gregory, S. and M. Kern, (1978).
"Adenosine and adenine nucleotides are mitogenic for mouse thymocytes." Biochem Biophys Res Commun **83**: 1111-6.
- Hagenlocker, B.E., B.A. Walker and P.A. Ward, (1990).
"Superoxide responses of immune complex-stimulated rat alveolar macrophages. Intracellular calcium and priming." J Immunol **144**: 3898-906.
- Harden, T.K., E.R. Lazarowski and R.C. Boucher, (1997).
"Release, metabolism and interconversion of adenine and uridine nucleotides: implications for G protein-coupled P2 receptor agonist selectivity." Trends Pharmacol Sci **18**: 43-6.

Hart, D.N., (1997).

"Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response." Blood **90**: 3245-87.

Hart, D.N. and J.W. Fabre, (1981).

"Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain." J Exp Med **154**: 347-61.

Hart, D.N. and J.W. Fabre, (1981).

"Localization of MHC antigens in long surviving rat renal allografts: probable implication of passenger leukocytes in graft adaptation." Transplant Proc **13**: 95-9.

Hart, D.N., S.V. Fuggle, K.A. Williams, J.W. Fabre, A. Ting and P.J. Morris, (1981).

"Localization of HLA-ABC and DR antigens in human kidney." Transplantation **31**: 428-33.

Hart, D.N., M.R. Newton, H. Reece-Smith, J.W. Fabre and P.J. Morris, (1983).

"Major histocompatibility complex antigens in the rat pancreas, isolated pancreatic islets, thyroid, and adrenal." Transplantation **36**: 431-5.

Hartmann, G., G.J. Weiner and A.M. Krieg, (1999).

"CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**: 9305-10.

Hashimoto, M. and S. Kokubun, (1995).

"Contribution of P2-purinoceptors to neurogenic contraction of rat urinary bladder smooth muscle." Br J Pharmacol **115**: 636-40.

Hock, B.D., G.C. Starling, P.B. Daniel and D.N. Hart, (1994).

"Characterization of CMRF-44, a novel monoclonal antibody to an activation antigen expressed by the allostimulatory cells within peripheral blood, including dendritic cells." Immunology **83**: 573-81.

Hogquist, K.A., M.A. Nett, E.R. Unanue and D.D. Chaplin, (1991).

"Interleukin 1 is processed and released during apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **88**: 8485-9.

Hu, Y., P.L. Fiset, L.C. Denlinger, A.G. Guadarrama, J.A. Sommer, R.A. Proctor and P.J. Bertics, (1998).

"Purinergetic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages." J Biol Chem **273**: 27170-5.

Humphreys, B.D. and G.R. Dubyak, (1996).

"Induction of the P2z/P2X7 nucleotide receptor and associated phospholipase D activity by lipopolysaccharide and IFN-gamma in the human THP-1 monocytic cell line." J Immunol **157**: 5627-37.

Ibrahim, M.A., B.M. Chain and D.R. Katz, (1995).

"The injured cell: the role of the dendritic cell system as a sentinel receptor pathway." Immunol Today **16**: 181-6.

Idzko, M., S. Dichmann, D. Ferrari, F. Di Virgilio, A. la Sala, G. Girolomoni, E. Panther and J. Norgauer, (2002).

"Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P2y receptors." Blood **100**: 925-32.

Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu and R.M. Steinman, (1992).

"Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor." J Exp Med **176**: 1693-702.

Inaba, K., M.D. Witmer and R.M. Steinman, (1984).

"Clustering of dendritic cells, helper T lymphocytes, and histocompatible B cells during primary antibody responses in vitro." J Exp Med **160**: 858-76.

Janeway, C.A.J., (1992).

"The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self." Immunol Today **13**: 11-6.

Jansen, J.H., G.J. Wientjens, W.E. Fibbe, R. Willemze and H.C. Kluin-Nelemans, (1989).

"Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4." J Exp Med **170**: 577-82.

Jiang, W., W.J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R.M. Steinman and M.C. Nussenzweig, (1995).

"The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing." Nature **375**: 151-5.

Kasakov, L. and G. Burnstock, (1982).

"The use of the slowly degradable analog, alpha, beta-methylene ATP, to produce desensitisation of the P2-purinoceptor: effect on non-adrenergic, non-cholinergic responses of the guinea-pig urinary bladder." Eur J Pharmacol **86**: 291-4.

Kenakin, T.P., R.A. Bond and T.I. Bonner, (1992).

"Definition of pharmacological receptors." Pharmacol Rev **44**: 351-62.

Koshiba, M., S. Apasov, V. Sverdlov, P. Chen, L. Erb, J.T. Turner, G.A. Weisman and M.V. Sitkovsky, (1997).

"Transient up-regulation of P2Y2 nucleotide receptor mRNA expression is an immediate early gene response in activated thymocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **94**: 831-6.

Kronin, V., K. Winkel, G. Suss, A. Kelso, W. Heath, J. Kirberg, H. von Boehmer and K. Shortman, (1996).

"A subclass of dendritic cells regulates the response of naive CD8 T cells by limiting their IL-2 production." J Immunol **157**: 3819-27.

Kuhns, D.B., D.G. Wright, J. Nath, S.S. Kaplan and R.E. Basford, (1988).

"ATP induces transient elevations of [Ca²⁺]_i in human neutrophils and primes these cells for enhanced O₂⁻ generation." Lab Invest **58**: 448-53.

Kuroki, M., K. Takeshige and S. Minakami, (1989).

"ATP-induced calcium mobilization in human neutrophils." Biochim Biophys Acta **1012**: 103-6.

-
- la Sala, A., D. Ferrari, S. Corinti, A. Cavani, F. Di Virgilio and G. Girolomoni, (2001).
"Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses." J Immunol **166**: 1611-7.
- la Sala, A., S. Sebastiani, D. Ferrari, F. Di Virgilio, M. Idzko, J. Norgauer and G. Girolomoni, (2002).
"Dendritic cells exposed to extracellular adenosine triphosphate acquire the migratory properties of mature cells and show a reduced capacity to attract type 1 T lymphocytes." Blood **99**: 1715-22.
- Lewis, C., S. Neidhart, C. Holy, R.A. North, G. Buell and A. Surprenant, (1995).
"Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons." Nature **377**: 432-5.
- Lipmann, F., (1941).
"Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy." Adv Enzymol **1**: 99-162.
- Liu, Q.H., H. Bohlen, S. Titzer, O. Christensen, V. Diehl, J. Hescheler and B.K. Fleischmann, (1999).
"Expression and a role of functionally coupled P2Y receptors in human dendritic cells." FEBS Lett **445**: 402-8.
- Lustig, K.D., A.K. Shiau, A.J. Brake and D. Julius, (1993).
"Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**: 5113-7.
- MacKenzie, A.B., A. Surprenant and R.A. North, (1999).
"Functional and molecular diversity of purinergic ion channel receptors." Ann N Y Acad Sci **868**: 716-29.
- Marriott, I., E.W. Inscho and K.L. Bost, (1999).
"Extracellular uridine nucleotides initiate cytokine production by murine dendritic cells." Cell Immunol **195**: 147-56.
- Matsuno, K., T. Ezaki, S. Kudo and Y. Uehara, (1996).
"A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph." J Exp Med **183**: 1865-78.
- Matzinger, P., (1998).
"An innate sense of danger." Semin Immunol **10**: 399-415.
- Matzinger, P. and S. Guerder, (1989).
"Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell?" Nature **338**: 74-6.
- McKenzie, J.L., M.E. Beard and D.N. Hart, (1984).
"The effect of donor pretreatment on interstitial dendritic cell content and rat cardiac allograft survival." Transplantation **38**: 371-6.
- Mehta, V.B., J. Hart and M.D. Wewers, (2001).
"ATP-stimulated release of interleukin (IL)-1beta and IL-18 requires priming by lipopolysaccharide and is independent of caspase-1 cleavage." J Biol Chem **276**: 3820-6.

-
- Murgia, M., S. Hanau, P. Pizzo, M. Ripa and F. Di Virgilio, (1993).
"Oxidized ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor." J Biol Chem **268**: 8199-203.
- Murphy, G.P., B.A. Tjoa, S.J. Simmons, J. Jarisch, V.A. Bowes, H. Ragde, M. Rogers, A. Elgamal, G.M. Kenny, O.E. Cobb, R.C. Ireton, M.J. Troychak, M.L. Salgaller and A.L. Boynton, (1999).
"Infusion of dendritic cells pulsed with HLA-A2-specific prostate-specific membrane antigen peptides: a phase II prostate cancer vaccine trial involving patients with hormone-refractory metastatic disease." Prostate **38**: 73-8.
- Mutini, C., S. Falzoni, D. Ferrari, P. Chiozzi, A. Morelli, O.R. Baricordi, G. Collo, P. Ricciardi-Castagnoli and F. Di Virgilio, (1999).
"Mouse dendritic cells express the P2X7 purinergic receptor: characterization and possible participation in antigen presentation." J Immunol **163**: 1958-65.
- Nestle, F.O., S. Aljagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg and D. Schadendorf, (1998).
"Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells [see comments]." Nat Med **4**: 328-32.
- Nicholas, R.A., (2001).
"Identification of the P2Y(12) receptor: a novel member of the P2Y family of receptors activated by extracellular nucleotides." Mol Pharmacol **60**: 416-20.
- Nicke, A., H.G. Baumert, J. Rettinger, A. Eichele, G. Lambrecht, E. Mutschler and G. Schmalzing, (1998).
"P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels." Embo J **17**: 3016-28.
- North, R.A., (1996).
"Families of ion channels with two hydrophobic segments." Curr Opin Cell Biol **8**: 474-83.
- O'Connor, S.E., I.A. Dainty and P. Leff, (1991).
"Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies." Trends Pharmacol Sci **12**: 137-41.
- Ohta, A. and M. Sitkovsky, (2001).
"Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage." Nature **414**: 916-20.
- Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J.C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J.S. Abrams, K.W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J.F. Bazan and R.A. Kastelein, (2000).
"Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." Immunity **13**: 715-25.
- Padeh, S., A. Cohen and C.M. Roifman, (1991).
"ATP-induced activation of human B lymphocytes via P2-purinoceptors." J Immunol **146**: 1626-32.
- Pecher, G., A. Haring, L. Kaiser and E. Thiel, (2002).
"Mucin gene (MUC1) transfected dendritic cells as vaccine: results of a phase I/II clinical trial." Cancer Immunol Immunother **51**: 669-73.

Pedersen, S., S.F. Pederson, B. Nilius, I.H. Lambert and E.K. Hoffmann, (1999). "Mechanical stress induces release of ATP from Ehrlich ascites tumor cells." Biochim Biophys Acta **1416**: 271-84.

Pintor, J., M. Torres, E. Castro and M.T. Miras-Portugal, (1991). "Characterization of diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) binding sites in cultured chromaffin cells: evidence for a P₂y site." Br J Pharmacol **103**: 1980-4.

Pintor, J., M. Torres and M.T. Miras-Portugal, (1991). "Carbachol induced release of diadenosine polyphosphates--Ap₄A and Ap₅A-- from perfused bovine adrenal medulla and isolated chromaffin cells." Life Sci **48**: 2317-24.

Purkiss, J.R. and M.R. Boarder, (1992). "Stimulation of phosphatidate synthesis in endothelial cells in response to P₂-receptor activation. Evidence for phospholipase C and phospholipase D involvement, phosphatidate and diacylglycerol interconversion and the role of protein kinase C." Biochem J **287**: 31-6.

Ralevic, V. and G. Burnstock, (1998). "Receptors for purines and pyrimidines." Pharmacol Rev **50**: 413-92.

Ramkumar, V., G.L. Stiles, M.A. Beaven and H. Ali, (1993). "The A₃ adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells." J Biol Chem **268**: 16887-90.

Randolph, G.J., G. Sanchez-Schmitz, R.M. Liebman and K. Schakel, (2002). "The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting." J Exp Med **196**: 517-27.

Rassendren, F., G.N. Buell, C. Virginio, G. Collo, R.A. North and A. Surprenant, (1997). "The permeabilizing ATP receptor, P₂X₇. Cloning and expression of a human cDNA." J Biol Chem **272**: 5482-6.

Reid, C.D., A. Stackpoole, A. Meager and J. Tikerpae, (1992). "Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow." J Immunol **149**: 2681-8.

Rieser, C., G. Bock, H. Klocker, G. Bartsch and M. Thurnher, (1997). "Prostaglandin E₂ and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production." J Exp Med **186**: 1603-8.

Robbani, D.F., R.A. Finch, D. Jager, W.A. Muller, A.C. Sartorelli and G.J. Randolph, (2000). "The leukotriene C₄ transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3β, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes." Cell **103**: 757-68.

Robson, S.C., E. Kaczmarek, J.B. Siegel, D. Candinas, K. Koziak, M. Millan, W.W. Hancock and F.H. Bach, (1997). "Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation." J Exp Med **185**: 153-63.

-
- Romani, N., S. Gruner, D. Brang, E. Kampgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P.O. Fritsch, R.M. Steinman and G. Schuler, (1994).
"Proliferating dendritic cell progenitors in human blood." J Exp Med **180**: 83-93.
- Romani, N., D. Reider, M. Heuer, S. Ebner, E. Kampgen, B. Eibl, D. Niederwieser and G. Schuler, (1996).
"Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability." J Immunol Methods **196**: 137-51.
- Rounds, S., L.L. Likar, E.O. Harrington, K.C. Kim, A. Smeglin, K. Heins and N. Parks, (1999).
"Nucleotide-induced PMN adhesion to cultured epithelial cells: possible role of MUC1 mucin." Am J Physiol **277**: L874-80.
- Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli and A. Lanzavecchia, (1995).
"Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." J Exp Med **182**: 389-400.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, (1994).
"Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." J Exp Med **179**: 1109-18.
- Sattin, A. and T.W. Rall, (1970).
"The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3', 5'-phosphate content of guinea pig cerebral cortex slices." Mol Pharmacol **6**: 13-23.
- Sauter, B., M.L. Albert, L. Francisco, M. Larsson, S. Somersan and N. Bhardwaj, (2000).
"Consequences of Cell Death. Exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells." J Exp Med **191**: 423-434.
- Scheeren, R.A., G. Koopman, S. Van der Baan, C.J. Meijer and S.T. Pals, (1991).
"Adhesion receptors involved in clustering of blood dendritic cells and T lymphocytes." Eur J Immunol **21**: 1101-5.
- Schmid-Antomarchi, H., A. Schmid-Alliana, G. Romey, M.A. Ventura, V. Breitmayer, M.A. Millet, H. Husson, B. Moghrabi, M. Lazdunski and B. Rossi, (1997).
"Extracellular ATP and UTP control the generation of reactive oxygen intermediates in human macrophages through the opening of a charybdotoxin-sensitive Ca²⁺-dependent K⁺ channel." J Immunol **159**: 6209-15.
- Schnurr, M., T. Toy, P. Stoitzner, P. Cameron, A. Shin, T. Beecroft, I.D. Davis, J. Cebon and E. Maraskovsky, (2003).
"ATP gradients inhibit the migratory capacity of specific human dendritic cell types: implications for P2Y₁₁ receptor signaling." Blood **102**: 613-20.
- Scholz, K.P. and R.J. Miller, (1991).
"Analysis of adenosine actions on Ca²⁺ currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal pyramidal neurones." J Physiol **435**: 373-93.

Schuler, G., F. Koch, C. Heufler, E. Kampgen, G. Topar and N. Romani, (1993).
"Murine epidermal Langerhans cells as a model to study tissue dendritic cells."
Adv Exp Med Biol **329**: 243-9.

Singh-Jasuja, H., N. Hilf, D. Arnold-Schild and H. Schild, (2001).
"The role of heat shock proteins and their receptors in the activation of the
immune system." Biol Chem **382**: 629-36.

Sitkovsky, M.V., (2003).
"Use of the A(2A) adenosine receptor as a physiological immunosuppressor
and to engineer inflammation in vivo." Biochem Pharmacol **65**: 493-501.

Slingluff, C.L., Jr., G.R. Petroni, G.V. Yamshchikov, D.L. Barnd, S. Eastham, H.
Galavotti, J.W. Patterson, D.H. Deacon, S. Hibbits, D. Teates, P.Y. Neese,
W.W. Grosh, K.A. Chianese-Bullock, E.M. Woodson, C.J. Wiernasz, P. Merrill, J.
Gibson, M. Ross and V.H. Engelhard, (2003).

"Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination
using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage
colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells." J Clin Oncol
21: 4016-26.

Soto, F., M. Garcia-Guzman and W. Stuhmer, (1997).
"Cloned ligand-gated channels activated by extracellular ATP (P2X receptors)."
J Membr Biol **160**: 91-100.

Sperlagh, B., G. Hasko, Z. Nemeth and E.S. Vizi, (1998).
"ATP released by LPS increases nitric oxide production in raw 264.7
macrophage cell line via P2Z/P2X7 receptors." Neurochem Int **33**: 209-15.

Steinberg, T.H., A.S. Newman, J.A. Swanson and S.C. Silverstein, (1987).
"ATP4- permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to
fluorescent dyes." J Biol Chem **262**: 8884-8.

Steinman, R.M., (1991).
"The dendritic cell system and its role in immunogenicity." Annu Rev Immunol **9**:
271-96.

Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, (1973).
"Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice." J. Exp.
Med. **137**: 1142-1162.

Steinman, R.M. and M.D. Witmer, (1978).
"Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte
reaction in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **75**: 5132-6.

Turner, B., I. Haendle, C. Roder, D. Dieckmann, P. Keikavoussi, H. Jonuleit, A.
Bender, C. Maczek, D. Schreiner, P. von den Driesch, E.B. Brocker, R.M.
Steinman, A. Enk, E. Kampgen and G. Schuler, (1999).
"Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic
cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some
metastases in advanced stage IV melanoma." J Exp Med **190**: 1669-78.

Turner, B., C. Röder, D. Dieckmann, M. Heuer, M. Kruse, A. Glaser, P.
Keikavoussi, E. Kämpgen, A. Bender and G. Schuler, (1999).
"Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from
leukapheresis products for clinical application." J Immunol Methods **223**: 1-15.

-
- Timmerman, J.M. and R. Levy, (1999).
"Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy." Annu Rev Med **50**: 507-29.
- Tonetti, M., L. Sturla, T. Bistolfi, U. Benatti and A. De Flora, (1994).
"Extracellular ATP potentiates nitric oxide synthase expression induced by lipopolysaccharide in RAW 264.7 murine macrophages." Biochem Biophys Res Commun **203**: 430-5.
- Tonetti, M., L. Sturla, M. Giovine, U. Benatti and A. De Flora, (1995).
"Extracellular ATP enhances mRNA levels of nitric oxide synthase and TNF-alpha in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 murine macrophages." Biochem Biophys Res Commun **214**: 125-30.
- Trussell, L.O. and M.B. Jackson, (1985).
"Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **82**: 4857-61.
- Valera, S., N. Hussy, R.J. Evans, N. Adami, R.A. North, A. Surprenant and G. Buell, (1994).
"A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP." Nature **371**: 516-9.
- van Seventer, J.M., T. Nagai and G.A. van Seventer, (2002).
"Interferon-beta differentially regulates expression of the IL-12 family members p35, p40, p19 and EB13 in activated human dendritic cells." J Neuroimmunol **133**: 60-71.
- Webb, T.E., J. Simon, B.J. Krishek, A.N. Bateson, T.G. Smart, B.F. King, G. Burnstock and E.A. Barnard, (1993).
"Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor." FEBS Lett **324**: 219-25.
- Welford, L.A., N.J. Cusack and S.M. Hourani, (1987).
"The structure-activity relationships of ectonucleotidases and of excitatory P2-purinoceptors: evidence that dephosphorylation of ATP analogues reduces pharmacological potency." Eur J Pharmacol **141**: 123-30.
- Wiley, J.S., J.R. Chen, M.B. Snook and G.P. Jamieson, (1994).
"The P2Z-purinoceptor of human lymphocytes: actions of nucleotide agonists and irreversible inhibition by oxidized ATP." Br J Pharmacol **112**: 946-50.
- Wilkin, F., X. Duhant, C. Bruyns, N. Suarez-Huerta, J.M. Boeynaems and B. Robaye, (2001).
"The P2Y11 receptor mediates the ATP-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells." J Immunol **166**: 7172-7.
- Wilkin, F., P. Stordeur, M. Goldman, J.M. Boeynaems and B. Robaye, (2002).
"Extracellular adenine nucleotides modulate cytokine production by human monocyte-derived dendritic cells: dual effect on IL-12 and stimulation of IL-10." Eur J Immunol **32**: 2409-17.
- Williams, L.A., W. Egnér and D.N. Hart, (1994).
"Isolation and function of human dendritic cells." Int Rev Cytol **153**: 41-103.
- Witmer, M.D. and R.M. Steinman, (1984).
"The anatomy of peripheral lymphoid organs with emphasis on accessory cells: light-microscopic immunocytochemical studies of mouse spleen, lymph node, and Peyer's patch." Am J Anat **170**: 465-81.

Yamanaka, R., T. Abe, N. Yajima, N. Tsuchiya, J. Homma, T. Kobayashi, M. Narita, M. Takahashi and R. Tanaka, (2003).
"Vaccination of recurrent glioma patients with tumour lysate-pulsed dendritic cells elicits immune responses: results of a clinical phase I/II trial." Br J Cancer **89**: 1172-9.

Zhang, F.L., L. Luo, E. Gustafson, K. Palmer, X. Qiao, X. Fan, S. Yang, T.M. Laz, M. Bayne and F. Monsma, Jr., (2002).
"P2Y₁₃: identification and characterization of a novel G_αphai-coupled ADP receptor from human and mouse." J Pharmacol Exp Ther **301**: 705-13.

Zhou, L.J., R. Schwarting, H.M. Smith and T.F. Tedder, (1992).
"A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily." J Immunol **149**: 735-42.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

$\alpha\beta$ meATP	α,β -Methylen-Adenosin-5'triphosphat
$\beta\gamma$ meATP	β,γ -Methylen-Adenosin-5'triphosphat
2MeSATP	2-Methylthio-Adenosin-5'triphosphat
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosin-5'monophosphat
AP5A	P ¹ ,P ⁵ -Diadenosin-pentaphosphat
ATP	Adenosin-5'triphosphat
ATP γ S	Adenosin-5'-O-(3-thio)triphosphat
BzATP	2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-Adenosin-5'triphosphat
Ca ⁺⁺	Kalziumionen
cAMP	Zyklisches Adenosin-5'monophosphat
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD(x)+	positiv für einen gegebenes Oberflächenmolekül x
Ci	Curie
CO ₂	Kohlendioxid
Da	Dalton
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FITC	Fluorescein-Isocyanat
flt3-Ligand	<i>fms-related tyrosine kinase 3 ligand</i>
g	Einheit der Schwerkraft auf der Erde (9,8 m/s ²)
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
I.E.	Internationale Einheit
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minute
MLR	<i>Mixed lymphocyte reaction</i>
MNC	mononukleäre Zelle
MoDC	Monozyten-abgeleitete dendritische Zelle
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PE	Phycoerithrin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI	Propidiumiodid
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
U	<i>Unit</i>
UTP	Uridin-5'triphosphat
v/v	Volumenprozent

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Stefan Endres bedanke ich mich für die Überlassung des Themas, die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und seine Unterstützung bei vielen Belangen meines Berufsweges auch über die Tätigkeit in der Klinischen Pharmakologie hinaus.

Herrn PD Dr. med. Andreas Eigler danke ich für die kontinuierliche und engagierte Betreuung meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Mein Dank geht ferner an Herrn Dr. med. Maximilian Schnurr, der mich in die experimentellen Techniken eingeführt hat und mir bei allen wissenschaftlichen Fragen eine große Hilfe und ein guter Lehrer war.

Für viele gute Anregungen und fruchtbare Diskussionen möchte ich meinen Mit-Doktoranden Peter Galambos, Veit Hornung und Christoph Scholz ebenso danken wie Herrn Dr. med. Simon Rothenfußler und Frau Dr. med. Britta Siegmund. Allen Mitarbeitern und Doktoranden der Abteilung danke ich für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit in einem hervorragenden Arbeitsklima.

Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen in folgenden Originalarbeiten veröffentlicht:

M. Schnurr, **F. Then**, P. Galambos, C. Scholz, B. Siegmund, S. Endres, A. Eigler.

Extracellular ATP and TNF- α synergize in the activation and maturation of human dendritic cells

J Immunol (2000) 165: 4704-4709

M. Schnurr, P. Galambos, C. Scholz, **F. Then**, M. Dauer, S. Endres, A. Eigler.

Tumor cell lysate-pulsed dendritic cells induce a T cell response against pancreatic carcinoma: an *in vitro* model for the assessment of tumor vaccines

Cancer Res (2001) 61: 6445-6450

Lebenslauf

1975	geboren am 2. September in München
1982-1986	Grundschule in Dachau
1986-1995	Ignaz-Taschner-Gymnasium Dachau
1995	Abitur am Ignaz-Taschner-Gymnasium Dachau (Note 1,2)
1995-1996	Zivildienst im Kreiskrankenhaus Altperlach in München
Herbst 1996	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Herbst 1998	Ärztliche Vorprüfung (Note 2)
Januar 1999	Beginn der Promotion bei Prof. Dr. med. S. Endres, Abteilung für Klinische Pharmakologie, Medizinische Klinik Innenstadt, Klinikum der LMU München
Herbst 1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1)
2000	Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes
2000 – 2001	Studium in Nanjing, VR China als Stipendiat der Alfried Krupp von Bohlen und Halbach – Stiftung
Frühjahr 2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,3)
2003 – 2004	Praktisches Jahr: Tertial Innere Medizin im Brigham and Women's Hospital, Boston, U.S.A. als Stipendiat der München-Harvard Alliance for Medical Education Tertial Chirurgie im Volkskrankenhaus der Provinz Jiangsu, Nanjing, Volksrepublik China Tertial Neurologie im Städtischen Krankenhaus München-Harlaching
April 2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2, Gesamtnote 1,49) und ärztliche Teilapprobation