

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Die Wirkung von 5'Adenosintriphosphat (ATP) auf humane  
plasmazytoide dendritische Zellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Moritz Stuplich

aus München

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichtersteller: Prof. Dr. med. Gunther Hartmann

Mitberichtersteller: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Zimmermann  
Prof. Dr. med. Peter Kaudewitz

Mitbetreuung durch: Prof. Dr. med. Stefan Endres  
PD Dr. med. Simon Rothenfuß

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser,  
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2008





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Überblick .....	1
1.2	Dendritische Zellen – Mittler im Immunsystem .....	2
1.2.1	Einteilung unterschiedlicher dendritischer Zelltypen .....	3
1.2.2	Die plasmazytoide dendritische Zelle.....	4
1.3	Extrazelluläre Nukleotide .....	10
1.3.1	Einteilung und Charakterisierung der P2- Rezeptoren.....	11
1.3.2	P2-Agonisten.....	16
1.3.3	Quellen und Abbau extrazellulärer Nukleotide .....	19
1.3.4	P2-Antagonisten.....	19
1.3.5	Extrazelluläre Nukleotide und Immunzellen .....	20
1.3.6	Wirkung von P2-Agonisten auf dendritische Zellen .....	21
1.3.7	Fragestellung der vorliegenden Arbeit .....	22
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
2.1	Chemikalien und Geräte .....	23
2.1.1	Geräte .....	23
2.1.2	Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial .....	23
2.1.3	Reagenziensätze .....	24
2.1.4	Materialien für die Zellkultur .....	24
2.1.5	Zytokine und Wachstumsstimulatoren .....	25
2.1.6	Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien .....	25
2.1.7	Antikörper .....	26
2.1.8	Oligodesoxynukleotide .....	27
2.1.9	Primer für die Amplifikation der P2-Rezeptor kodierenden Gene .....	28
2.1.10	P2-Agonisten.....	28
2.1.11	P2-Antagonisten.....	28
2.2	Zellulär – Immunologische Methoden .....	29
2.2.1	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität .....	29
2.2.2	Isolierung von peripheren Blutlymphozyten .....	29
2.2.3	Isolierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen aus PBMC.....	30
2.2.4	Stimulation von plasmazytoiden dendritischen Zellen.....	30
2.2.5	Zellkulturen.....	31
2.2.6	Bestrahlung und Kultivierung von CD40 Ligand-transfizierten Fibroblasten und der Kontrollzell-Linie .....	31
2.2.7	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	31
2.2.8	Zellmigrations-/Chemotaxis-Assay.....	33
2.2.9	Konzentrationsbestimmung von Zytokinen mittels ELISA.....	34
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	34
2.3.1	Grundlagen der Polymerase-Ketten-Reaktion .....	34
2.3.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus plasmazytoiden dendritischen Zellen	35
2.3.3	Reverse Transkription von Gesamt-RNA in cDNA .....	35
2.3.4	Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR).....	36
2.3.5	Gelelektrophorese .....	37
2.4	Statistische Analyse .....	38

---

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>39</b>
3.1	Nachweis von P2-Rezeptoren auf plasmazytoiden dendritischen Zellen .....	39
3.2	Einfluss von Nukleotiden auf den intrazellulären Kalziumspiegel .....	40
3.3	ATP hat chemotaktische Wirkungen auf plasmazytoide dendritische Zellen .....	43
3.4	ATP erhöht partiell kostimulatorische Moleküle auf plasmazytoiden dendritischen Zellen .....	44
3.5	ATP erhöht die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 auf stimulierten plasmazytoiden dendritischen Zellen .....	48
3.6	Die Sekretion von IFN- $\alpha$ und IL-12 aktivierter plasmazytoider dendritischer Zellen wird durch ATP reduziert .....	49
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>53</b>
4.1	Übersicht über die experimentellen Ergebnisse.....	53
4.2	Ergebnisinterpretation vor dem Hintergrund aktueller Literatur .....	54
4.2.1	Vorkommen von ATP .....	54
4.2.2	Isolierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen.....	54
4.2.3	Chemotaxis plasmazytoider dendritischer Zellen.....	54
4.2.4	Expression von Oberflächenmarkern und Chemokinrezeptoren auf plasmazytoiden dendritischen Zellen .....	56
4.2.5	IL-12-Zytokin-Produktion plasmazytoider dendritischer Zellen .....	58
4.2.6	IFN- $\alpha$ -Zytokin-Produktion plasmazytoider dendritischer Zellen .....	60
4.2.7	ATP: Gefahrensignal und Immunmodulator .....	61
4.2.8	Beteiligte Rezeptortypen .....	65
4.3	Klinische Relevanz der Ergebnisse.....	68
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>73</b>
	Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme .....	92
	Danksagung.....	94
	Veröffentlichungen: .....	95
	Lebenslauf .....	96

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Überblick

Der menschliche Organismus ist der ständigen Bedrohung durch Mikroorganismen ausgesetzt. Zu deren Abwehr steht ihm ein potentes Immunsystem zur Verfügung, das sich aus verschiedenen Mechanismen und Zellen zusammensetzt. Die effektive Unterscheidung von „normalem Selbst“ – also eigenen, endogenen Strukturen – und „gefährlichem Fremd“ – also körperfremden, eindringenden oder „abnormalen“ Strukturen, wozu auch veränderte Zellen wie Tumorzellen gehören, – ist dabei eine wesentliche Voraussetzung, um die Auslösung einer Immunantwort und den Erhalt körpereigener Toleranz zu ermöglichen. Dies ist von essentieller Bedeutung, um bei einer effektiven Immunantwort den Organismus vor einer Zerstörung durch das eigene Immunsystem zu bewahren.

Der Körper bedient sich zur effektiven Immunantwort gegen eindringende Pathogene der konzentrierten Aktion von angeborenem und adaptivem Immunsystem. Schlüsselfunktionen des angeborenen Systems beinhalten zum einen die Fähigkeit, Pathogene und Gewebeschäden rasch zu erkennen, vorhandene Gefahren an Zellen des adaptiven Immunsystems zu melden und eine erste Abwehrlinie zu bilden (Matzinger, 1994). Die charakteristischen Merkmale des adaptiven Immunsystems sind die Fähigkeit zur klonalen Expansion und zum immunologischen Gedächtnis (Janeway, 2001).

Dendritische Zellen sind Antigen-präsentierende Zellen mit der einzigartigen Eigenschaft, primäre effektive und spezifische Immunantworten induzieren zu können (Banchereau, 2000; Banchereau, 1998), indem sie zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem vermitteln.

Dendritische Zellen sind andererseits auch in der Lage, eine tolerogene Antwort, d.h. eine Toleranz von Effektorzellen gegenüber einem Antigen zu induzieren (Steinman, 2003). Welcher Weg – immunogen oder tolerogen gegenüber einem Fremdstoff – weiter beschritten wird, hängt Ergebnissen aktueller Forschung nach entscheidend von bestimmten Gefahrensignalen (*danger signals*) ab, deren Anwesenheit zu einer Aktivierung/Immunantwort beiträgt (Shortman, 2001). Zu diesen *danger signals* gehören zum einen körperfremde/exogene Stimuli wie zum Beispiel Bakterien- und Virenbestandteile, zum anderen aber auch körpereigene/endogene *danger signals* wie beispielsweise Entzündungsmediatoren oder von geschädigten Zellen freigesetzte Substanzen. Diese Substanzen werden über spezielle Rezeptoren erkannt. Diese als *danger model* bezeichnete Hypothese hat die

Vorstellung abgelöst, dass das Immunsystem lediglich zwischen körpereigenen und fremden Mustern unterscheidet (Matzinger, 2002). Zu den endogenen Gefahrensignalen zählt man auch extrazelluläre Nukleotide (Gallucci, 1999).

Effekte von extrazellulären Nukleotiden wurden initial bei der Thrombozyten-Aggregation, bei der Kontraktion von Herz- und glatter Muskulatur, der Zellproliferation und der Neurotransmission beobachtet (Burnstock, 1997). Erste Hinweise, dass das Adeninnukleotid Adenosin-5'-triphosphat (ATP) eine Mediatorfunktion auch im Immunsystem einnimmt, lieferten 1967 Cohn und Mitarbeiter (Cohn, 1967) mit der Beschreibung der Nukleotid-Wirkung auf die Vesikelbildung muriner Makrophagen. Gut zehn Jahre später zeigte eine andere Arbeitsgruppe, dass ATP bei Mastzellen eine Degranulation und Freisetzung von Histamin sowie die Permeabilisierung ihrer Membran bewirkt (Cockroft, 1979; Cockroft, 1979). Es folgten weitere Erkenntnisse über die Effekte extrazellulärer Nukleotide auch auf verschiedenste andere Zellen des Immunsystems (Di Virgilio, 2001). Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkungen von extrazellulärem ATP auf die Funktion einer Untergruppe von dendritischen Zellen, den so genannten plasmazytoiden dendritischen Zellen, und liefert damit einen Beitrag zum Verständnis der Wirkung von ATP als endogenem Gefahrensignal.

## 1.2 Dendritische Zellen – Mittler im Immunsystem

Dendritische Zellen wurden erstmals 1973 von Steinmann und Cohn in der Milz von Mäusen beschrieben und nach ihrer mikroskopischen Morphologie mit zahlreichen astförmigen Zellausläufern (*lat. dendria, -ae* = der Ast) benannt (Steinman, 1973). Hundert Jahre zuvor wurden bereits so genannte Langerhans-Zellen in der Haut entdeckt (Langerhans, 1868), welche aber erst Mitte der 80er Jahre den dendritischen Zellen zugeordnet werden konnten (Schuler, 1985). Anfang der 80er Jahre wurden dendritische Zellen auch in anderen lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben sowohl muriner (Hart, 1981) als auch humaner Herkunft (Daar, 1983) nachgewiesen.

Dendritische Zellen nehmen eine zentrale Rolle im Immunsystem ein. Sie sind entscheidend bei der Abwehr eindringender Pathogene beteiligt, indem sie eine effektive und spezifische Immunantwort induzieren. Dabei stellen sie ein Bindeglied (*link*) zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem her.

Dendritische Zellen sind in nahezu allen peripheren Geweben zu finden. Dort können sie Antigene bzw. extrazelluläre Bestandteile durch Endo- oder Phagozytose aufnehmen, pro-



zessieren und in so genannten MHC-Komplexen auf ihrer Oberfläche präsentieren, weshalb ihre Funktion auch mit der von Wächtern (*engl.* sentinels) verglichen wird. Zum einen sind sie nun in der Lage, mit pro-inflammatorischen und/oder antiviralen Zytokinen eingedrungene Pathogene direkt zu schädigen, Effektorzellen des angeborenen Immunsystems zu aktivieren und andere Immunzellen an den Ort der Infektion zu rekrutieren (Banchereau, 2000). Zum anderen kommt es nun zu Vorgängen, die zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems führen können.

Der Kontakt mit bestimmten Gefahrensignalen veranlasst die dendritischen Zellen, aus dem Gewebe in die entsprechenden Lymphknoten zu wandern, wo sie in den T-Zell-Arealen mit T-Zellen in Interaktion treten. Indem sie den T-Zellen das spezifische Antigen über den MHC-Komplex präsentieren (Signal I) und diese gleichzeitig über kostimulatorische Moleküle aktivieren (Signal II), initiieren sie eine adaptive Immunantwort, an der neben T- auch B-Zellen beteiligt sind. Fehlt bei der Antigenpräsentation (Signal I) jedoch eine adäquate Kostimulation (Signal II) – die dendritische Zelle befindet sich im *steady state* – kann es zu einer Toleranz bzw. Anergie gegenüber diesem Antigen kommen (Chai, 1999; Hawiger, 2001; Lutz, 2002). Das spielt für die Erhaltung der Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen eine wichtige Rolle und kann im gestörten Falle für die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen von Bedeutung sein (Steinman, 2003). Dabei spielen neben Zellkontakt-abhängigen Mechanismen auch Zytokine eine Rolle. Menges und Mitarbeiter zeigten, dass mit TNF- $\alpha$  inkubierte dendritische Zellen trotz eines reifen Phänotyps, d.h. trotz Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle, über eine IL-10-Induktion tolerogen wirken (Menges, 2002). Auf die Rolle der Gefahrensignale und der Kostimulation wird in den anschließenden Kapiteln eingegangen.

### 1.2.1 Einteilung unterschiedlicher dendritischer Zelltypen

Ausgehend von einer CD34-positiven (CD34<sup>+</sup>) Stammzelle führen, so die aktuelle Vorstellung, verschiedene Differenzierungswege zu dendritischen Zellen (Ardavin, 2001). Man kennt im humanen System mittlerweile mindestens vier dendritische Zellpopulationen, die sich alle von CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen ableiten. Zu der Gruppe der so genannten konventionellen bzw. "myeloiden" dendritischen Zellen zählt man (1) CD11c<sup>+</sup> und CD 14<sup>+</sup> myeloide bzw. Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen (MDC bzw. MonoDC), (2) dermale oder interstitielle dendritische Zellen (DDC-IDC) und (3) Langerhans-Zellen (LC). Eine eigene Gruppe mit vermutlich lymphoidem Ursprung bilden dagegen die plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC) (Rossi, 2005).

Im peripheren Blut finden sich die phänotypisch unterscheidbaren CD11c<sup>+</sup> myeloiden DC (MDC) und die CD11c<sup>-</sup> plasmazytoiden DC (PDC) (O'Doherty, 1994). Ihrer leichten Verfügbarkeit wegen werden in vielen Untersuchungen Monozyten-abgeleitete DC (MonoDC) verwendet, die *in vitro* mittels eines Zytokin-Cocktails aus Monozyten generiert werden und als funktionelle Äquivalente und als Modell der myeloiden DC (MDC) des peripheren Blutes gelten (Romani, 1994; Sallusto, 1994).

Obgleich MonoDC nicht der primäre Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind, sich allerdings ein Großteil der diskutierten Literatur mit diesen Zellen beschäftigt, sollte nicht unerwähnt bleiben, dass sich diese von den PDC in vielfacher Hinsicht unterscheiden. Abhängig von der Stimulation weisen diese Populationen unter anderem Unterschiede im Phänotyp, im Profil der Zytokinproduktion, bei der Stimulation von T-Zellen und bei der Migration auf (Jefford, 2003). Einen Überblick über ausgewählte Unterschiede von PDC und MonoDC gibt Tabelle 1.

	<b>PDC</b>	<b>MonoDC</b>
Phänotyp	Lin <sup>-</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD123 <sup>+</sup> , CD11c <sup>-</sup> , CD45RA <sup>+</sup> , BDCA2 <sup>+</sup> , BDCA4 <sup>+</sup> , HLADR <sup>+</sup>	CD11c <sup>+</sup>
Phagozytose	kaum	ausgeprägt
MHC-Prozessierung und -Präsentation	wenig ausgeprägt	ausgeprägt
Isolierung/Gewinnung	aus dem peripheren Blut	von Monozyten des peripheren Blutes <i>in vitro</i> generierte DC
<i>Toll-like</i> -Rezeptoren	TLR7 und TLR9	TLR 1-8
IFN- $\alpha$ Produktion	viel	wenig

**Tabelle 1: Überblick über ausgewählte Unterschiede von PDC und MonoDC**

## 1.2.2 Die plasmazytoide dendritische Zelle

### 1.2.2.1 Historisches

1958 beschrieben K. Lennert und W. Remmele erstmals einen Zelltyp, der in den T-Zell-Arealen humaner Lymphknoten lokalisiert war und der zwar Plasmazellen ähnelte, aber nicht die typischen B- und Plasmazell-Marker trug (Lennert, 1958). Man gab ihnen deshalb den Namen „T-assoziierte Plasmazellen“, der Jahre später mit dem Nachweis der CD4-Expression (bis dahin nur auf T-Zellen bekannt) zu „plasmazytoiden T-Zellen“ geändert wurde. Da diese Zellen zum Teil myelomonozytäre Oberflächenmarker besitzen, nannte

man sie auch „plasmazytoide Monozyten“. 1994 identifizierte eine Arbeitsgruppe neben  $CD11c^+$  eine  $CD11c^-$  Subpopulation  $CD4^+$ -dendritischer Zellen im humanen peripheren Blut (O'Doherty, 1994). Grouard und Mitarbeiter isolierten daraufhin  $CD11c^- CD4^+ CD45RA^+$ -Zellen aus Tonsillengewebe und konnten zeigen, dass diese weitgehend gleiche Charakteristika wie die  $CD11c^-$  Subpopulation des peripheren Blutes besitzen und den „plasmazytoiden T-Zellen“ bzw. „plasmazytoiden Monozyten“ sekundärer Lymphorgane entsprechen (Grouard, 1997). Als ein spezifisches Merkmal dieser Zellen wurde die ausgeprägte Expression des  $CD123$ -Rezeptors (IL3-R) für Interleukin-3 (IL-3), eines – ebenso wie  $CD40$ -Ligand ( $CD40L$ ) – wichtigen Überlebensfaktors für diese Zellen ausgemacht (Olweus, 1997; Rissoan, 1999).

Bei der Untersuchung der Reaktion des Immunsystems auf Virusinfektionen fand man, dass bei viraler Stimulation humanen peripheren Blutes nur eine kleine Zellgruppe für die Hauptproduktion von Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) verantwortlich ist (Trinchieri, 1978). Sekretion von Typ I Interferon (IFN- $\alpha/\beta$ ) stellt eine der Hauptmechanismen antiviraler Aktivität des angeborenen Immunsystems dar (Pestka, 2004). Man bezeichnete diese Zellen als „natürliche Interferon produzierende Zellen“ (IPC). 1999 wiesen mehrere Gruppen nach, dass die plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC) mit den IPC identisch sind (Cella, 1999; Siegal, 1999).

### 1.2.2.2 Phänotyp

Auf der Zelloberfläche exprimierte Antigene werden in der Immunologie als Oberflächenmarker zur Charakterisierung genutzt.

Plasmazytoide dendritische Zellen gesunder Spender sind negativ für die so genannten *lineage*-spezifischen Marker  $CD19$  sowie  $CD21$  (B-Zellen),  $CD3$  (T-Zellen),  $CD16$  sowie  $CD56$  (NK-Zellen),  $CD13$ ,  $CD14$  sowie  $CD33$  (Myeloide Zellen) (McKenna, 2005). Typisch für die PDC ist die ausgeprägte Expression von  $CD123$  (IL3-R), des Rezeptors für Interleukin-3 (IL-3) (siehe oben). Zwei weitere Oberflächenantigene, BDCA-2 und BDCA-4, sind als Marker auf plasmazytoiden dendritischen Zellen im peripheren Blut und Knochenmark beschrieben worden. BDCA-2 ist an der Antigenaufnahme zur T-Zell-Präsentation beteiligt; Antikörper gegen BDCA-2 führen zu einer Inhibition der IFN- $\alpha$ -Produktion dieser Zellen (Dzionek, 2001). BDCA-4 ist identisch mit dem Rezeptor Neuropilin-1 (NP-1) und dem Ko-Rezeptor für den Wachstumsfaktor VEGF-A. Die Bindung eines spezifischen Antikörpers gegen BDCA-4 hat keine Wirkung auf PDC, die genaue Rolle des Rezeptors ist bislang noch ungeklärt (Dzionek, 2002). Weitere exprimierte Marker sind der

Fcγ-Rezeptor FcγRIIa (CD32) für Immunglobuline (Bave, 2003), CD45RA und CD4. Plasmazytoide dendritische Zellen unterscheiden sich phänotypisch von den myeloiden dendritischen Zellen insbesondere durch die fehlende Expression von CD11c, CD11b, CD45RO, ILT1, DC-SIGN, Mannose-Rezeptoren und CD1a (Barchet, 2005).

### 1.2.2.3 Lokalisation und Migration

Humane plasmazytoide dendritische Zellen zirkulieren im Blut (O'Doherty, 1994), kommen aber auch im Lymphgewebe (Lymphknoten, Milz, Tonsillen, Thymus, Knochenmark und *Peyer's patches*) vor (McKenna, 2005). Im Lymphknoten sind diese Zellen vor allem in den T-Zell-Arealen um die hochendothelialen Venolen (HEV), den Eintrittswegen zirkulierender Immunzellen, zu finden (Facchetti, 2003).

Das Vorkommen von PDC in entzündlichen Geweben weist möglicherweise auf eine wichtige Rolle dieses Zelltyps bei Entzündungsreaktionen hin. So wurden vermehrt PDC in der Nasenschleimhaut bei allergischen Reaktionen (Jahnsen, 2000), in der Nasenschleimhaut nach Infekten des oberen Respirationstraktes (Hartmann, 2006), in Hautläsionen, die mit systemischen Lupus erythematoses (SLE), Psoriasis vulgaris und Kontaktdermatitis assoziiert sind (Farkas, 2001; Wollenberg, 2002), in der Umgebung von Tumoren (Hartmann, 2003; Salio, 2003; Zou, 2001), in entzündeten Lymphknoten (Cella, 1999), in epitheloidzelligen Granulomen (De Vos, 1990), in der Synovia bei rheumatoider Arthritis (Cavanagh, 2005) und in entzündlichem Liquor (Pashenkov, 2002) gefunden.

Wie gelangen PDC in die Lymphknoten oder an Entzündungsorte? Eine wichtige Rolle bei der Lokalisation und Migration von Immunzellen spielen Chemokine und Chemokinrezeptoren.

Im unreifen Zustand wandern PDC *in vitro* – trotz Expression etlicher anderer Chemokinrezeptoren – nur auf das Chemokin CXCL12 (stromal-derived factor-1α [SDF-1α]) hin, den Liganden des Chemokinrezeptors CXCR4 (Penna, 2001). Migration zu einem CXCL12-Gradienten hin kann durch CXCR3-Liganden verstärkt werden (Krug, 2002). Sowohl CXCR4- als auch CXCR3-Liganden werden in den hochendothelialen Venolen (HEV) exprimiert und führen zum Eintritt der PDC in die Lymphknoten (Krug, 2004; Penna, 2001). Im Gegensatz zu anderen dendritischen Zellen treten PDC über diese hochendothelialen Venolen (HEV) über den Blutweg in die Lymphknoten ein. Die durch CXCR3-Liganden verstärkte Migration auf CXCL12 (stromal-derived factor-1α [SDF-1α]) spielt möglicherweise auch eine Rolle bei der Rekrutierung von PDC in Entzündungsgebiete

oder in Tumore (Vanbervliet, 2003). Überdies exprimieren die PDC im unreifen Zustand die so genannten inflammatorischen Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3, deren Expression nach Aktivierung stark abnimmt (Penna, 2001).

Durch mikrobielle Stimuli oder CD40-Ligierung (einer positiven Rückkopplung durch T-Zellen entsprechend, deren CD40-Ligand von APC erkannt wird) gereift, sind PDC hingegen in der Lage, durch Hochregulation des funktionellen CCR7-Rezeptors auf die Chemokine CCL19/ELC (*macrophage inflammatory protein-3 $\beta$*  [MIP-3 $\beta$ ]) und CCL21/SLC (6CKine) hin zu wandern (Cella, 1999; Krug, 2002; Penna, 2001; Schnurr, 2003). Dies befähigt die PDC *in vivo* wahrscheinlich zum Einwandern in die Lymphknoten über Lymphgefäße und dort in die T-Zell-Areale ("*lymph node homing*"), wo die genannten Chemokine exprimiert werden. Daneben spielt vermutlich auch das auf PDC exprimierte L-Selektin (CD62L), welches mit dem auf HEV exprimierten Liganden *peripheral lymph node adressin* (PNAd) bindet, die Interaktion von endothelialem *vascular-cell-adhesion molecule-1* (VCAM-1) und dessen – von PDC exprimierten – Liganden *very late antigen* (VLA)-5, sowie die Interaktion von dermal-endothelialem E-selectin und dessen ebenso auf PDC exprimiertem Liganden CLA eine Rolle (McKenna, 2005; Zou, 2001).

Abhängig von der Art des aktivierenden Stimulus produzieren PDC selbst Chemokine, wie zum Beispiel CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL5 (RANTES), CXCL8 (IL-8) und CXCL10 (IP-10) (Megjugorac, 2004; Vissers, 2001). Das Chemokin CXCL10 lockt CXCR3 tragende T<sub>H</sub>1-Zellen, CCL4 hingegen NK-Zellen an. Dadurch beeinflussen PDC auch das so genannte *leucocyte homing* anderer Immunzellen in Richtung ihrer unmittelbaren Umgebung.

#### 1.2.2.4 Erkennung von Pathogenen und Aktivierung

Die Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems durch Pathogene hängt von der Erkennung von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) ab. Dies sind konservierte Strukturen von Bakterien, Pilzen und Viren, die im Wirtsorganismus nicht vorkommen. Zu diesen zählt das Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer Bakterien, Mannane in Hefezellen sowie Lipoproteine und Peptidoglykane. Über spezielle, so genannte *pattern-recognition*-Rezeptoren (PRR) können diese PAMP vom Immunsystem erkannt werden. Zu diesen PRR gehören unter anderem die von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimierten, so genannten *Toll-like*-Rezeptoren (TLR), deren Agonisten hauptsächlich mikrobiellen Ursprungs sind und von denen bis dato elf verschiedene Vertreter bekannt sind (Iwasaki, 2004).

Plasmazytoide dendritische Zellen unterscheiden sich im Profil der TLR-Expression von dem der MDC. MDC exprimieren TLR1-8 (wahrscheinlich jedoch kein TLR7) und können dadurch zum Beispiel virale doppelsträngige RNA (dsRNA) (Alexopoulou, 2001) oder bakterielles Lipopolysaccharid (Hoshino, 1999) erkennen, wozu PDC nicht in der Lage sind, da sie nur TLR7 und 9 exprimieren (Hornung, 2002). TLR7 dient wahrscheinlich der Erkennung von RNA-Viren (Diebold, 2004; Heil, 2004; Lund, 2004).

Erste Beobachtungen von Tokunaga, dass DNA-Fractionen von Mykobakterien eine starke immunstimulierende Wirkung auf Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) haben (Tokunaga, 1984), wurden von Krieg gut zehn Jahre später erweitert, als er den aktivierenden Effekt bakterieller DNA auf das Vorhandensein sequenzspezifischer CpG-Motive zurückführte und erste, solche CpG-Motive enthaltende, synthetische Oligonukleotide (CpG-ODN) entwickelte (Krieg, 1995).

CpG-Motive sind unmethylierte Cytidin-Guanosin-Dinukleotide mit bestimmten flankierenden Basensequenzen (p steht für Phosphodiester oder Phosphothioat), wie sie bei Bakterien und Viren, hingegen kaum bei Wirbeltieren vorkommen (Krieg, 2002; Krieg, 2002; Rothenfusser, 2002). CpG-Motive werden über den *Toll-like*-Rezeptor TLR9 erkannt, der ausschließlich von PDC und B-Zellen exprimiert wird (Hemmi, 2000) (Bauer, 2001).

Ausgehend von der Fähigkeit, die Sekretion von Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) in PDC zu initiieren, werden nunmehr zwei Arten synthetischer CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN) unterschieden, die CpG-A und CpG-B genannt werden (Krieg, 2002; Krieg, 2002). CpG-A, dessen Prototyp ODN 2216 ist, wirkt primär auf die PDC als Zielzelle, wo es große Mengen an IFN Typ I induziert (Kadowaki, 2001; Krug, 2001). Vergleichbar hohe Mengen werden nur durch virale Stimulation erreicht. CpG-B (Prototyp ODN 2006) induziert weitaus weniger IFN- $\alpha$ - und IFN- $\beta$ -Produktion in PDC (Krug, 2001), aktiviert und reift diese Zellen hingegen potent aus und führt zu einer starken Aktivierung von B-Zellen, die im Gegensatz dazu kaum auf CpG-A reagieren (Hartmann, 2000; Hartmann, 2000; Krieg, 1995). Ferner werden zur Einteilung in die CpG-Klassen strukturelle Eigenschaften herangezogen, die CpG-Motiv, ODN-Rückgrat und Vorhandensein von Poly-G-Motiven berücksichtigen.

CpG ODN und CD40L induzieren synergistisch die Produktion großer Mengen an IL-12 in PDC (Krug, 2001) und nehmen somit Einfluss auf die Art der Immunantwort (dazu später mehr). CD40L ist ein Mitglied der TNF-Familie und spielt eine wichtige Rolle für die Effektorfunktion der CD4 T-Zellen. CD40L wird auf T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen exprimiert und liefert

nach Bindung an den CD40-Rezeptor Aktivierungssignale für Antigen-präsentierende Zellen.

Immunstimulatorische CpG-ODN haben durch TLR9-vermittelte Wirkungen auf PDC (Hartmann, 1999; Rothenfusser, 2002) und B-Zellen (Hartmann, 2000) zusätzliche, indirekte Effekte auf andere Immunzellen (Rothenfusser, 2003) und finden bereits therapeutischen Einsatz bei der Behandlung von Tumoren und Asthma und bei Vakzinierungen (Klinman, 2004). Einen Überblick über die Charakteristika der CpG-ODN-Klasseneinteilung zeigt Tabelle 2.

	<b>CpG-A</b>	<b>CpG-B</b>
Prototyp	ODN-2216	ODN-2006
Primäre Zielzelle	PDC	B-Zelle
strukturelle Charakteristika	<ul style="list-style-type: none"> <li>• chimäres Phosphatdiester-/Phosphothioat-Rückgrat</li> <li>• Poly-G-Enden</li> <li>• zentrales Palindrom mit CG-Dinukleotid</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vollständiges Phosphothioat-Rückgrat</li> <li>• enthält GTCGTT Motiv</li> </ul>
funktionelle Charakteristika	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induktion großer Mengen IFN Typ I in PDC</li> <li>• geringe Aktivierung von B-Zellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• starke Aktivierung von B-Zellen</li> <li>• geringe Induktion von IFN Typ I in PDC</li> </ul>

**Tabelle 2: Überblick über die Charakteristika der CpG-Klassen (nach V. Hornung)**

Stimulation der PDC mit Pathogenen, TLR-Liganden (so zum Beispiel CpG ODN) und/oder CD40-Ligierung führt zur Aktivierung und Reifung, was sich in der Hochregulation des MHC-Komplex II und der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 niederschlägt (Asselin-Paturel, 2001; Cella, 2000; Grouard, 1997). Außerdem kommt es zu den oben beschriebenen Veränderungen der Chemokinrezeptor-Expression, der Chemokin- und Zytokinproduktion (siehe Tabelle 3). Das besondere Charakteristikum der PDC ist dabei die hohe, TLR7/9 vermittelte Produktion von IFN- $\alpha$  auf virale Infektion oder Stimulation mit CpG-ODN hin (Colonna, 2004).

Unreife DC	Reife DC
wenig MHC auf der Zelloberfläche	viel MHC auf der Zelloberfläche
wenig kostimulatorische Moleküle (CD80, CD86)	viel kostimulatorische Moleküle (CD80, CD86)
inflammatorische Chemokinrezeptoren (CCR5)	lymphoide Chemokinrezeptoren (CCR7)
kaum Reifemarker (CD83)	viel Reifemarker (CD83)
geringe Zytokinproduktion (IL12, IFN- $\alpha$ )	viel Zytokinproduktion (IL12, IFN- $\alpha$ )

**Tabelle 3: Vereinfachte Übersicht über die unterschiedlichen Merkmale unreifer und reifer DC.**

### 1.2.2.5 Die PDC als Verbindungsglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem

Durch die Sekretion von Zytokinen und durch direkte Zellkontakte beeinflussen PDC die Regulation und Aktivierung von Effektorzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems (Marschner, 2005). So verstärken Typ I Interferone unter anderem die Zytotoxizität von NK-Zellen (Krug, 2004) und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Dalod, 2003), inhibieren die Virus-Replikation in infizierten Zellen (Isaacs, 1957), dienen als autokrine Überlebens- und Reifungsfaktoren für dendritische Zellen (Kadowaki, 2000), erhalten aktivierte T-Zellen am Leben (Marrack, 1999) und fördern die Antikörperproduktion (Le Bon, 2001) und Plasmazell-Entwicklung von B-Zellen (Jego, 2003).

Über die Sekretion von IL-12, aber auch von Typ I Interferonen (Kadowaki, 2000) nehmen PDC Einfluss auf die Polarisierung naiver CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu IFN- $\gamma$ -produzierenden T<sub>H</sub>1-Zellen (Guernonprez, 2002), was der Elimination intrazellulärer Pathogene dient. Aber auch T<sub>H</sub>2-Antworten können abhängig von Stimulationsart und -dosis von PDC induziert werden (Boonstra, 2003; Liu, 2001), wodurch Antigen-spezifische B-Zellen zur Antikörper-Produktion angeregt werden. Obgleich in geringerem Ausmaß als MDC sind PDC in der Lage, endo- (Krug, 2003) und exogene (Fonteneau, 2003) Antigene zu präsentieren und T-Zellen zu expandieren, was die Bezeichnung dieser Zellen als Antigen-präsentierende Zellen rechtfertigt.

## 1.3 Extrazelluläre Nukleotide

ATP wurde 1929 von dem deutschen Chemiker Karl Lohmann entdeckt. Gut zehn Jahre später wurde dieses Trinukleotid von dem späteren Nobelpreisträger Fritz Lipmann als eine Energie speichernde Substanz innerhalb der Zelle beschrieben und ist auch als solche



vornehmlich bekannt (Lipmann, 1941). Für Adenosin und Adenosin-5'-monophosphat (AMP) wurde früh eine Wirkung als Transmitter/Botenstoff im kardiovaskulären System beschrieben (Drury, 1929), in den Jahren darauf folgten Studien über vergleichbare Effekte von ATP (Green, 1950). Erkenntnisse aus dem Bereich der Signaltransduktion legten die Existenz spezieller Rezeptoren für diese Substanzgruppe nahe (Burnstock, 1972; Sattin, 1970).

### **1.3.1 Einteilung und Charakterisierung der P2- Rezeptoren**

Unterschiedliche Wirkungen von ATP bzw. Adenosin gaben schon 1934 erste indirekte Hinweise auf verschiedenartige Rezeptoren (Gillespie, 1934), die nunmehr „Purinozeptoren“ genannt wurden. Eine erste Unterteilung dieser Rezeptoren in P1-Purinozeptoren, an denen hauptsächlich Adenosin als natürlicher Ligand auftritt, und P2-Purinozeptoren, welche durch ATP und Adenosin-5'-diphosphat (ADP) aktiviert werden, erfolgte 1978 (Burnstock, 1978).

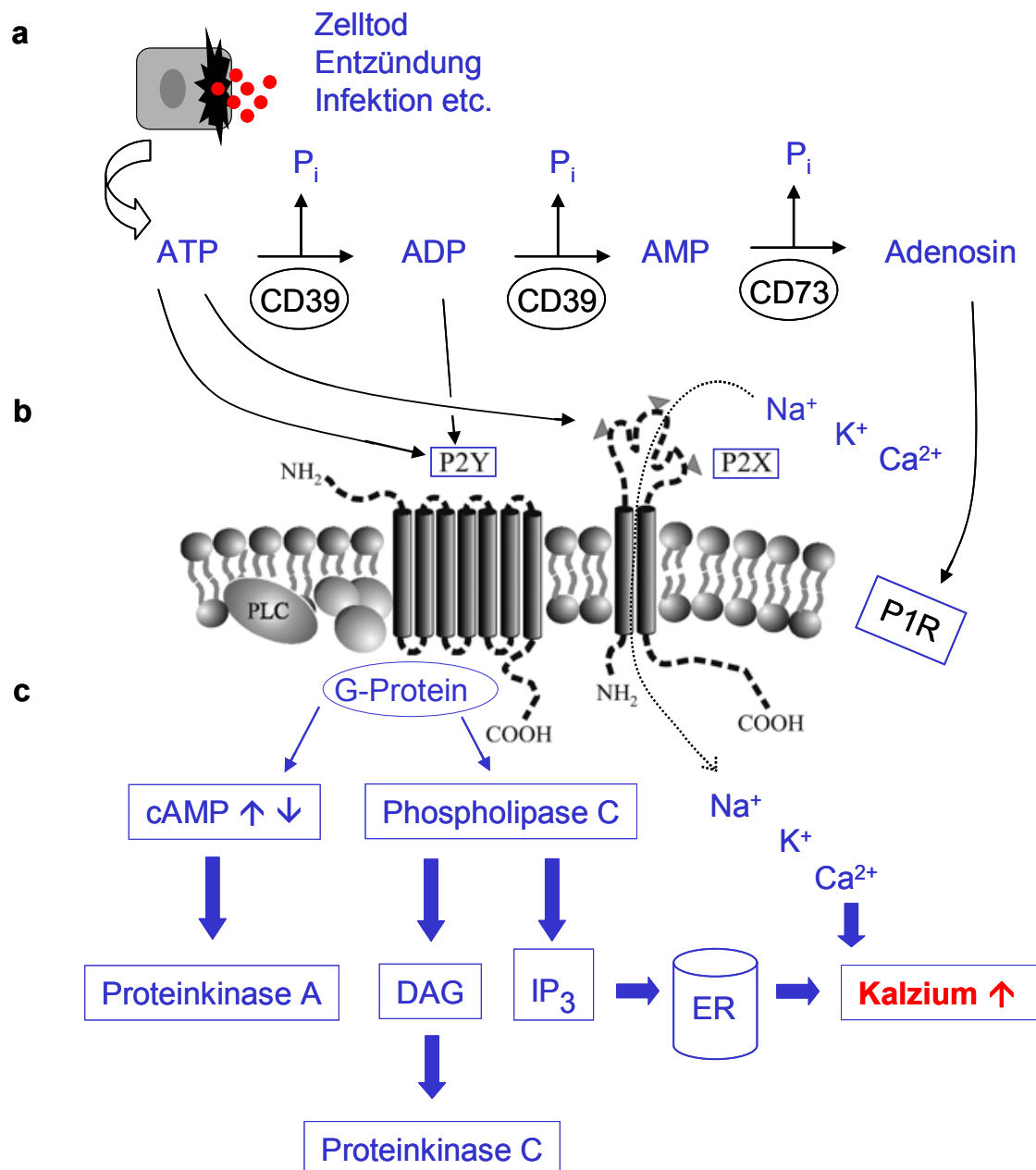
Um der Erkenntnis gerecht zu werden, dass auch Pyrimidine wie UTP ihre Wirkung über diese Rezeptoren vermitteln (Communi, 1997; Harden, 1997), folgte man der Empfehlung, die „P1/P2-Purinozeptoren“ durch die Terminologie der P1-Rezeptoren (P1R) bzw. der P2-Rezeptoren (P2R) zu ersetzen (Fredholm, 1997; Humphrey, 1998).

Hier sei nur kurz auf Adenosin/P1-Rezeptoren eingegangen. Diese werden weiter in A1-, A2a-, A2b-, A3-Rezeptoren unterteilt. A1- und A3-Rezeptoren sind an Gi-, G0- und Gq-Proteine gekoppelt und vermitteln eine Hemmung der Adenylatzyklase und eine Aktivierung der Phospholipase C (Freissmuth, 1991; Panther, 2001). A2a- und A2b-Rezeptoren interagieren mit Gs-Proteinen, welche die Adenylatzyklase aktivieren und somit zur Generierung des second messengers cAMP führen (Ralevic, 1998; Wolberg, 1975). Adenosin beeinflusst die Expression von Oberflächenmolekülen, die Zytokin- und Chemokinproduktion, Chemotaxis, T-Zell-stimulatorische Kapazität und die T-Zell-Polarisierung dendritischer Zellen (Panther, 2003; Schnurr, 2004).

Die Charakterisierung und Differenzierung der P2-Rezeptoren basierte anfangs auf pharmakologisch-funktionellen Kriterien und auf der unterschiedlichen Verteilung im Gewebe. Erst später verhalfen Erkenntnisse der Signaltransduktions-Mechanismen und letztendlich die Klonierung zu einer einheitlichen Klassifizierung (Ralevic, 1998). Leider erschwert bislang das Fehlen hochselektiver Agonisten und Antagonisten Untersuchungen an P2-Rezeptoren. Ein weiteres Problem bei der Verwendung von bestimmten Agonisten er-

wächst daraus, dass auch durch Abbauprodukte (z.B. ADP, AMP, Adenosin) der eingesetzten Stoffe (z.B. ATP) mit zum Teil anderem Wirkungsprofil oder einem anderen Rezeptormuster (z.B. auch P1R) die Diskriminierung der einzelnen Effekte und deren Zuordnung erschwert werden (Hunsucker, 2005) (siehe auch Abb.1).

P2-Rezeptoren werden, basierend auf Unterschieden in den nachgeschalteten Signaltransduktions-Mechanismen und der molekularen Struktur, in zwei große Gruppen eingeteilt. Die aus Liganden-gesteuerten Ionenkanälen bestehenden (Benham, 1987) Rezeptoren werden als P2X-, die G-Protein-gekoppelten (Dubyak, 1991) als P2Y-Rezeptoren bezeichnet (Abbracchio, 1994; Fredholm, 1994).



**Abb. 1: Schematischer Überblick über den Weg des ATP.** (a) ATP wird – durch verschiedene Stimuli verursacht – aus Zellen freigesetzt und zum Teil von EctoATP/ADPase CD39 und 5'-Ecto-Nukleotidase CD73 über ADP und AMP zu Adenosin abgebaut. (b) ATP bindet extrazellulär an P2Y- und P2X-Rezeptoren, Adenosin nur an P1-Rezeptoren, die auf den Zielzellen exprimiert werden. (c) Über eine G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion bei P2Y-Rezeptoren bzw. über integrierte Ionenkanäle bei P2X-Rezeptoren kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration (aus intrazellulären Speichern sowie aus dem Extrazellulärraum) und zu einer Aktivierung diverser Enzym-gekoppelter Signalwege (DAG, Diacylglycerin;  $IP_3$ , Inositoltriphosphat; ER, Endoplasmatisches Retikulum;  $P_i$ , Phosphatgruppe). Abbildung modifiziert nach Williams (Williams, 2000)

### 1.3.1.1 P2X-Rezeptoren

P2X-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Kationenkanäle mit nahezu gleicher, schneller Permeabilität für  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen und einer signifikanten Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Evans, 1996). Sie werden besonders dicht in erregbaren Geweben (glatte Muskulatur, Neuronen und Neuroglia) exprimiert, sind aber auch in anderen Geweben wie Epithelien, Endothel, Knochen, Muskulatur und hämatopoetischen Zellen sehr weit verbreitet (North, 2002). Bisher sind sieben P2X-Untereinheiten bekannt und kloniert worden (Ralevic, 1998), deren Proteine zu 26 bis 47 % identisch sind (Khakh, 2001) und mit der Bezeichnung  $\text{P2X}_1$ ,  $\text{P2X}_2$ , ...,  $\text{P2X}_7$  benannt wurden. Jede dieser geklonten Untereinheiten besteht aus 379 bis 595 Aminosäuren und besitzt zwei hydrophobe transmembranöse Domänen, welche durch einen großen extrazellulären Abschnitt miteinander verbunden sind (siehe Abb.1). Amino- und Carboxyterminus liegen beide auf der zytoplasmatischen Seite der Membran (Brake, 1994; Valera, 1994).

Tertiärstruktur und Membrantopologie dieser Rezeptoren ähnelt denen anderer Ionenkanäle wie zum Beispiel der des epithelialen Amilorid-sensitiven  $\text{Na}^+$ -Kanals (ENaC) und des inward rectifying  $\text{K}^+$ -Kanals (North, 1996). Eine Untereinheit kann alleine keinen Ionenkanal für mono- und bivalente Kationen bilden, so dass man davon ausgeht, dass sich Multimere aus den einzelnen Untereinheiten bilden. Durch Ko-Immunopräzipitation-Assays mit markierten P2-Rezeptor-Untereinheiten auf HEK293-Zellen konnte festgestellt werden, welche Rezeptoren miteinander Heteromere bilden (Torres, 1998; Torres, 1999). Dabei treten nicht nur gleiche, sondern auch verschiedene Untereinheiten wie zum Beispiel  $\text{P2X}_2$  und  $\text{P2X}_3$  zusammen, um einen funktionellen Kationenkanal zu bilden (Lewis, 1995; Torres, 1999).

Die Signaltransduktion erfolgt durch schnellen  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bei gleichzeitigem  $\text{K}^+$ -Ausstrom. Dies führt zu einer Depolarisation der Plasmamembran und einer Zunahme der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration, die zur Ausbildung einer Reihe weiterer Signalkaskaden führt (Di Virgilio, 2001). Wichtig zu bemerken ist, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen dabei aus dem extrazellulären Raum stammen und auf Grund der veränderten Membranpermeabilität in die Zelle gelangen. In Folge einer Aktivierung von P2Y-Rezeptoren wird das  $\text{Ca}^{2+}$  hingegen aus intrazellulären Depots freigesetzt.

P2X-Rezeptoren lassen sich in drei Gruppen einteilen (MacKenzie, 1999). Zu Gruppe 1 gehören Rezeptoren wie  $\text{P2X}_1$  und  $\text{P2X}_3$  mit hoher Affinität für ATP sowie für das ATP-Analogon  $\alpha, \beta$ -methylen-Adenosin-5'-triphosphat ( $\alpha\beta\text{meATP}$ ) und mit rascher (1a) bzw. geringer (1b) Aktivierung und Desensitisation. Gruppe 2 beinhaltet  $\alpha\beta\text{meATP}$ -insensitive Re-

zeptoren wie P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub> und P2X<sub>6</sub> mit langsamerer Desensitisation. Die Aktivierung von Rezeptoren der Gruppe 3 kann zur Bildung unselektiver Ionenporen und einer Permeabilisierung der Zellmembran führen, wodurch in Lymphozyten Moleküle mit einer durchschnittlichen molekularen Masse von 200 bis 300 Dalton (Da) permeieren können (Ralevic, 1998). Diese Gruppe, vertreten durch den am besten untersuchten P2-Rezeptor P2X<sub>7</sub>, wird charakteristischerweise durch das synthetische Nukleotid 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-Adenosin-5'-triphosphat (BZ-ATP) stärker als durch ATP aktiviert. Als weiteres Merkmal führt eine Reduzierung der Konzentration extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>- oder Mg<sup>2+</sup>-Ionen zu einer verstärkten Wirkung der Agonisten an diesem Rezeptor (Virginio, 1997). Nach Stimulation des P2X<sub>7</sub>-Rezeptors bilden sich Membranporen, durch die Moleküle bis zu einer Masse von 900 Da (bei Lymphozyten auf 200 bis 300 Da beschränkt) nicht-selektiv permeieren können (Di Virgilio, 1995)(Ralevic, 1998).

### 1.3.1.2 P2Y-Rezeptoren

Funktionelle P2Y-Rezeptoren sind aus Säugerzellen kloniert und mit P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub> und P2Y<sub>14</sub> bezeichnet worden (Burnstock, 1997; Communi, 2001; Hollopeter, 2001; Ralevic, 1998; Takasaki, 2001; Zhang, 2001). Vor einigen Jahren wurde ein weiterer Rezeptor, SP174, auf humanen und murinen Geweben identifiziert, charakterisiert und der Nomenklatur folgend P2Y<sub>13</sub> genannt (Zhang, 2002). Der lange Zeit als P2YADP oder P2Y2T bezeichnete und für die ADP-vermittelte Plättchenaggregation verantwortliche Rezeptor konnte 2001 geklont und als P2Y<sub>12</sub> in die Nomenklatur aufgenommen werden (s. oben).

P2Y-Rezeptoren besitzen sieben transmembranäre Domänen mit insgesamt 328 bis 379 Aminosäuren (Di Virgilio, 2001) und einer molekularen Masse von 41 bis 53 kDa, wobei der N-Terminus extrazellulär, der C-Terminus zytoplasmatisch gelegen ist (Lustig, 1993; Webb, 1993) (siehe Abb.1).

Alle P2Y-Rezeptoren gehören der Familie der G-Protein-gekoppelten Proteine an, unterscheiden sich aber untereinander teilweise in der weiteren Signaltransduktion (Abbraccio, 2006). Die Rezeptoren P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> und P2Y<sub>6</sub> sind an die Aktivierung von Phospholipase C (PLC) gekoppelt (Ralevic, 1998). Der P2Y<sub>11</sub>-Rezeptor ist als einziger an die Aktivierung von sowohl PLC als auch Adenylatzyklase gebunden (Communi, 1997). Die Rezeptoren P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> und P2Y<sub>14</sub> sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, deren Aktivierung zu einer Inhibition der Adenylatzyklase führt (Chambers, 2000; Communi, 2001; Hollopeter, 2001; Zhang, 2002). Die (an der Membraninnenseite lokalisierte) Adenylatzyklase bildet

cAMP als *second messenger*, welches die Proteinkinase A (PKA) aktivieren kann. Die ebenfalls G-Protein aktivierte PLC spaltet das in der Plasmamembran enthaltene Phosphatidylinositoldiphosphat in Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerin (DAG). DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), während  $IP_3$   $Ca^{2+}$  aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) freisetzt, welches dann für verschiedene Prozesse verantwortlich ist (siehe Abb. 1). Durch die Beteiligung dieses G-Protein-gekoppelten *second-messenger* Systems ist die *response time*, also die Antwort auf eine Stimulation hin, länger als bei den als Ionenkanal vorliegenden P2X-Rezeptoren.

Auch in den Liganden unterscheiden sich die zwei P2-Gruppen. Während an P2X-Rezeptoren ATP und ADP die einzigen bekannten physiologischen Liganden sind, gibt es bei P2Y-Rezeptoren eine größere Divergenz: An  $P2Y_1$ ,  $P2Y_{12}$ ,  $P2Y_{13}$  ist ADP der bevorzugte Ligand; an  $P2Y_2$  sind ATP und UTP gleichermaßen aktiv; an  $P2Y_4$  ist UTP, an  $P2Y_6$  UDP der bevorzugte, an  $P2Y_{14}$  UDP-Glukose der ausschließliche Ligand, und als einziger P2Y-Rezeptor ist  $P2Y_{11}$  für ATP selektiv (Chambers, 2000; Communi, 2001; Communi, 2000; Hollopeter, 2001).

Obgleich noch in begrenztem Umfang, sind in den letzten Jahren ein paar wenige anti-P2X-Rezeptor Antikörper hergestellt worden (Di Virgilio, 2001). Für P2Y-Rezeptoren sind – soweit bekannt – lediglich Antikörper für humane  $P2Y_1$ - (Jantzen, 1999; Moran-Jimenez, 2000) und  $P2Y_2$ -Rezeptoren (Ray, 2002) beschrieben.

### 1.3.2 P2-Agonisten

An P2-Rezeptoren binden die physiologisch vorkommenden Liganden ATP, ADP, UTP, UDP und die Adenin-Dinukleotide/Diadenosin-Polyphosphate. Darüber hinaus werden in der Forschung chemisch modifizierte Derivate verwendet, die sich in der Regel durch eine höhere Abbau-Stabilität auszeichnen. Ausgewählte Strukturformeln sind in Abb. 2 dargestellt.

#### Adenosin-5'-triphosphat (ATP)

ATP besteht aus der Stickstoff-haltigen Base Adenin, dem Zucker Ribose und drei linear aneinander gereihten Phosphatresten und kann in bianionischer ( $ATP^{2-}$ ) oder tetraanionischer Form ( $ATP^{4-}$ ) vorliegen. In physiologischen Lösungen wird die freie Säure ( $ATP^{4-}$ ) an Magnesium ( $Mg^{2+}$ ), Kalzium ( $Ca^{2+}$ ) oder Wasserstoffionen ( $H^+$ ) komplex gebunden. Nur eine kleine Menge (1-10 %) liegt in der tetraanionischen, möglicherweise rezept-

toraffinen, Form vor (Di Virgilio, 2001). ATP ist ein natürlicherweise vorkommender Agonist an allen P2-Rezeptoren (Ralevic, 1998).

### **Uridin-5'-triphosphat (UTP)**

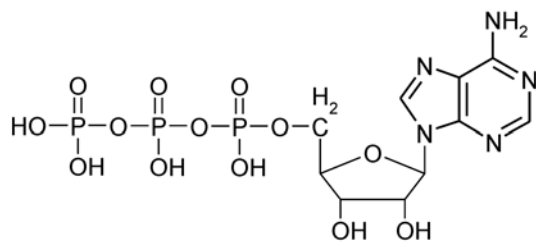
UTP besitzt die Base Uridin, gleicht ansonsten dem Aufbau von ATP. Die extrazelluläre Konzentration von UTP (gemessen in Zellkultur-Medium von  $\sim 3 \times 10^5$  Gewebezellen) ist unter Normalbedingungen mit 1-5 nM ungefähr ein Drittel niedriger als die von ATP (Lazarowski, 2001). Als relativ spezifisch für UTP und Uridin-5'-diphosphat (UDP) gelten die Rezeptoren P2Y<sub>4</sub> und P2Y<sub>6</sub> (Chang, 1995; Charlton, 1996; Communi, 1996). An P2Y<sub>2</sub> sind ATP und UTP gleichermaßen wirksam (Lustig, 1993).

### **Adenin-Dinukleotide**

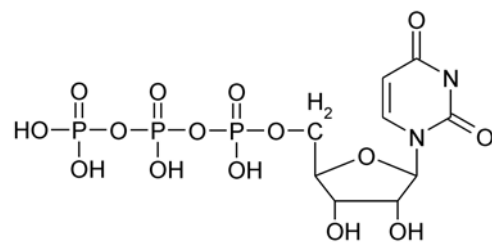
Adenin-Dinukleotide wirken als physiologische Agonisten an P2-Rezeptoren. Bekannte Dinukleotide sind P1,P4-Diadenosin-tetraphosphat (AP4A), P1,P5-Diadenosin-pentaphosphat (AP5A), und P1,P6-Diadenosin-hexaphosphat (AP6A). Diadenosinpolyphosphate sind vornehmlich Liganden an P2X<sub>1</sub>-Rezeptoren (Ralevic, 1998).

### **Chemisch modifizierte P2-Agonisten**

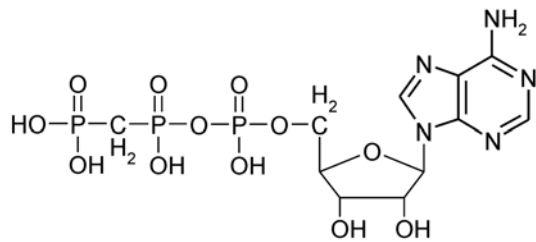
Es existiert eine Vielzahl solcher synthetischer Nukleotid-Derivate, die in der Regel eine verlängerte physiologische Halbwertszeit besitzen. In der vorliegenden Arbeit fanden  $\beta,\gamma$ -methylen-Adenosin-5'-triphosphat ( $\beta\gamma$ mATP) und 2-methylthio-Adenosin-5'-triphosphat (2MeSATP) Verwendung.  $\beta\gamma$ mATP hat in  $\beta,\gamma$ -Stellung eine Methylengruppe, wodurch ein Abbau durch ATP-degradierende Nukleotidasen erschwert ist; an P2Y-Rezeptoren soll es allgemein inaktiv sein. Durch  $\beta\gamma$ mATP ausgelöste Effekte sprechen für die Beteiligung von P2X<sub>1</sub>- und P2X<sub>3</sub>-Rezeptoren (Ralevic, 1998). 2MeSATP hat wohl durch die SH<sub>3</sub>C-Gruppe eine länger dauernde Wirkung, eine Spezifität für einen bestimmten Rezeptor ist nicht eindeutig belegt. An P2X<sub>2</sub>- (Brake, 1994) und an P2Y<sub>2</sub>- (Burnstock, 2000) Rezeptoren soll 2MeSATP stärker als ATP sein.



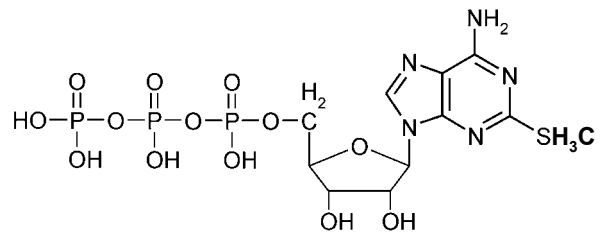
ATP



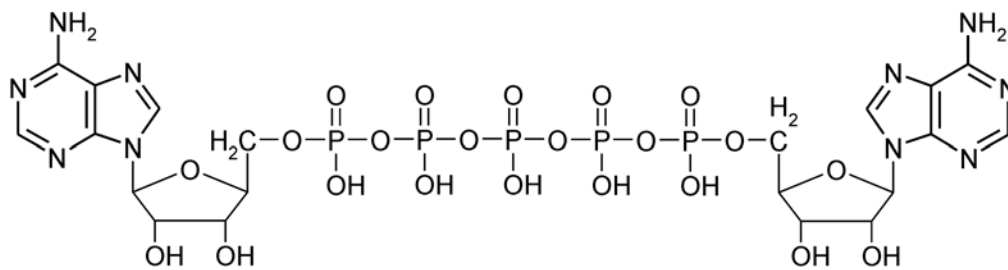
UTP



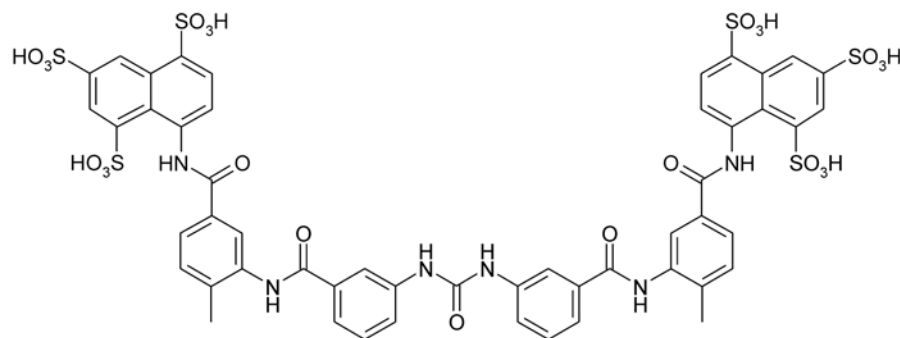
bg ATP



2MeSATP



AP5A



Suramin

**Abb. 2: Strukturformeln ausgewählter Nukleotide, Nukleotidanaloga und Nukleotid-antagonisten.**



### 1.3.3 Quellen und Abbau extrazellulärer Nukleotide

Unter physiologischen Bedingungen besteht ein deutlicher Gradient von intrazellulärer und extrazellulärer Nukleotid-Konzentration. ATP liegt im Zytosol von Säugerzellen in einem Konzentrationsbereich von 5-10 mM vor, extrazellulär im nanomolaren Bereich (Ia Sala, 2003). Höhere Konzentrationen werden in sekretorischen Vesikeln von Neuronen gefunden, ebenso in bestimmten Granula des Nebennierenmarkes, der Thrombozyten und der Pankreas- $\beta$ -Zellen (Novak, 2003). Es wurden verschiedene Auslöser der Nukleotid-Freisetzung vorgeschlagen, doch noch ist es unklar, welche davon physiologische Bedeutung haben: Endotoxin-Stimulation (Ferrari, 1997), bakterielle Infektion (Crane, 2005; Ferrari, 1997), Scherstress und Dehnung (Grierson, 1995; Mitchell, 1998; Pedersen, 1999), Hypoxie (Bodin, 1995), Entzündung (Bodin, 1998), Zellschaden, Zelluntergang und osmotischer Stress (Dubyak, 1991).

Extrazelluläre Nukleotide werden rasch durch eine Vielzahl unterschiedlicher Ecto-Nukleotidasen, Ecto-Apyrasen und unspezifischer Phosphatasen abgebaut und besitzen somit eine kurze Halbwertszeit (Marteau, 2004). Die Verteilung dieser Enzyme im Gewebe und auf Zellen ist unterschiedlich. CD39 Ecto-Nukleotidasen werden unter anderem auf PDC und Endothelzellen exprimiert, lösliche Formen finden sich im Serum (Hunsucker, 2005). Ein und dasselbe Nukleotid kann durch verschiedene Enzym-Spezies hydrolysiert werden (Zimmermann, 2000). ATP wird über ADP und AMP letztlich zu Adenosin abgebaut. Dabei ist zu beachten, dass die jeweiligen Abbauprodukte an P2- respektive P1-Rezeptoren mit zum Teil gegensätzlichen Wirkungen selbst aktiv sind (Burnstock, 2000; Marteau, 2004). Die Aktivität der Nukleotid-abbauenden Enzyme hängt ferner von der Konzentration bivalenter Kationen (z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) und dem pH-Wert ab (Zimmermann, 2000).

In Entzündungsgebieten wird die Aktivität von Nukleotidasen herunterreguliert, so dass es dort zu einer Akkumulation von extrazellulären Nukleotiden kommen kann (Robson, 1997). Dass Nukleotidasen und ATP eine wichtige Rolle im Immunsystem spielen, zeigte eine Studie mit CD39-defizienten Mäusen, deren dendritische Zellen eine eingeschränkte Funktion und veränderte zelluläre Immunantworten aufwiesen (Mizumoto, 2002).

### 1.3.4 P2-Antagonisten

In der vorliegenden Arbeit wurden die P2-Rezeptor-Antagonisten Suramin und Pyridoxal-5'-phosphat-6-azophenyl 2',4'-disulfonsäure (PPADS) eingesetzt. Obgleich Suramin relativ

unspezifisch neben diesen Rezeptoren bei gleicher Konzentration auch noch Glutamat-,  $\gamma$ -Amino-Buttersäure (GABA)-, 5-Hydroxytryptamin (5-HT)- und nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren blockiert und inhibierend auf einige Wachstumsfaktoren und Ecto-Nukleotidasen wirkt, ist Suramin derzeit noch ein sehr gebräuchliches Mittel, um ATP-Wirkungen zu inhibieren. PPADS interagiert zwar auch mit Ecto-Nukleotidasen, weist aber eine hohe Spezifität für einige P2-Rezeptoren (P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>5</sub> und P2Y<sub>1</sub>) auf (Lambrecht, 2000; Ralevic, 1998).

### 1.3.5 Extrazelluläre Nukleotide und Immunzellen

Erste Hinweise, dass extrazelluläre Nukleotide auch bei der Regulation des Immunsystems eine Rolle spielen, ergaben sich aus Untersuchungen an Makrophagen, bei denen diese Moleküle eine verstärkte Bildung pinozytischer Vesikel verursachten (Cohn, 1967), und an Mastzellen, an welchen ATP eine Degranulation und Freisetzung von Histamin sowie die Permeabilisierung ihrer Membran bewirkt hatte (Cockroft, 1979). Mittlerweile wurden funktionelle P2-Rezeptoren auf T- und B-Lymphozyten (Baricordi, 1996; Koshiba, 1997; Padeh, 1991), Monozyten (Altieri, 1990; Cowen, 1989), Makrophagen (Hagenlocker, 1990), Mastzellen (Bulanova, 2005), eosinophilen (Ferrari, 2005) und neutrophilen Granulozyten beschrieben (Kuhns, 1988; Kuroki, 1989).

Abhängig von Rezeptormuster und Lokalisation der Zellen zeigen Nukleotide mannigfaltige Wirkungen. Bei Makrophagen führt ATP zu einer Freisetzung von IL-1 $\beta$  und IL-18 (Hogquist, 1991; Mehta, 2001), auch die Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-12 sowie die multinukleäre Riesenzellbildung (Fais, 1997) und die Aktivität der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS), einem Schlüsselenzym der bakteriziden Aktivität von Makrophagen, unterliegen einer Regulation durch extrazelluläre Nukleotide (Denlinger, 1996; Hasko, 2000; Hu, 1998; Proctor, 1994; Tonetti, 1994). Bei Monozyten konnte ATP als ein potenter Stimulus für die Aktivierung der Caspase-1 und für die Externalisierung von Caspase-1-Untereinheiten identifiziert werden (Laliberte, 1999). ATP ist, abhängig von der Konzentration, auch als zytotoxischer Faktor für Makrophagen beschrieben worden (Steinberg, 1987).

ATP und UTP führen in neutrophilen Granulozyten zur Bildung von Superoxid-Ionen und zur Exozytose zytoplasmatischer Granula (Balazovich, 1990; Cockcroft, 1989). Auch Adhäsionsmoleküle werden nach Kontakt mit diesen Signalmolekülen hochreguliert (Cowen, 1990; Dichmann, 2000), was beispielsweise die Interaktion von Granulozyten mit Endothelzellen verstärkt (Dawicki, 1995; Rounds, 1999). Daneben wurden für eosinophile Gra-

nulozyten (Burgers, 1993; Saito, 1991) und Ratten-Mastzellen (McCloskey, 1999) chemotaktische Wirkungen von ATP und ADP beschrieben.

Schon 1978 wurde berichtet, dass extrazelluläres ATP die Proliferation von murinen Thymozyten stimuliert (Gregory, 1978). In B-Lymphozyten aus humanen Tonsillen führt ATP zu einer Aktivierung der Phospholipase C (Padeh, 1991), einem der Enzyme purinerger Signaltransduktion. In B-Lymphozyten von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie kann ATP die Konzentration des Signalstoffes cAMP erhöhen (Conigrave, 2001). Es gibt ferner Hinweise auf eine unterschiedliche Expression von Nukleotidrezeptoren verschiedener hämatopoetischer Zellen in Abhängigkeit von deren Differenzierungsstufen und auf einen entsprechenden Einfluss auf deren weitere Differenzierung und Reifung (Sak, 2003).

### 1.3.6 Wirkung von P2-Agonisten auf dendritische Zellen

Wie beschrieben, spielen dendritische Zellen eine Schlüsselrolle bei der Initiierung und Modulation von Immunantworten. Deshalb rückten Faktoren, welche diese Zellen beeinflussen können, in den Fokus immunologischer Forschung. Erkenntnisse über die Wirkung extrazellulärer Nukleotide auf andere Zelltypen und das zunehmend Bestätigung findende Gefahrensignal-Modell (*danger model*) (Ibrahim, 1995; Matzinger, 1994; Matzinger, 2002) förderten dieses Interesse. Das *danger model* besagt, dass das Immunsystem nicht nur durch körperfremde, sondern auch durch Gefahren signalisierende, körpereigene Stoffe (*danger signals*) aktiviert werden kann (dazu Ausführlicheres in der Diskussion, Kapitel 4.2.7).

Seit längerer Zeit ist bekannt, dass epidermale Langerhans-Zellen eine Plasmamembran-gebundene Ecto-ATPase exprimieren, die als histochemischer Marker verwendet worden ist, deren physiologische Rolle aber lange unverstanden blieb (Chaker, 1984). Auch auf anderen dendritischen Zelltypen wurde die Expression der Ecto-ATP/ADPase CD39 und der Ecto-5'-Nukleotidase CD73 (Berchtold, 1999; Girolomoni, 1995) beschrieben. Zusammen mit der Beschreibung, dass CD39-defiziente Mäuse funktionell beeinträchtigte Langerhans-Zellen haben und mit einer exazerbierten, Nukleotid-vermittelten Entzündungsreaktion auf chemische Reizstoffe reagieren (Mizumoto, 2002), spricht dies für einen wichtigen Einfluss extrazellulärer Nukleotide auf dendritische Zellen.

Humane MonoDC exprimieren Messenger-RNA (mRNA) funktioneller P2X- (P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>7</sub>) und P2Y-Rezeptoren (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>5</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>10</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>13</sub>/SP174) (Berchtold, 1999; Idzko, 2002; Liu, 1999; Schnurr, 2003; Zhang, 2002).

Besondere Beachtung fand der P2X<sub>7</sub>-Rezeptor, der eine wichtige Rolle bei der Nukleotid-vermittelten Apoptose von MonoDC spielt (Coutinho-Silva, 1999; Nihei, 2000).

Zahlreiche Studien weisen auf eine Rolle extrazellulärer Nukleotide respektive der P2-Rezeptoren bei der phänotypischen und funktionellen Reifung von MonoDC hin. So werden Antigenaufnahme (Schnurr, 2000), Aktivierung respektive Expression von Oberflächenmolekülen und Zytokinproduktion durch extrazelluläre Nukleotide reguliert (Berchtold, 1999; Ferrari, 2000; Idzko, 2002; la Sala, 2001; la Sala, 2002; Marriott, 1999; Marteau, 2004; Schnurr, 2000; Schnurr, 2005; Wilkin, 2001; Wilkin, 2002). Darüber hinaus stehen auch Migration (Idzko, 2002; la Sala, 2002; Schnurr, 2003), Chemokinsekretion (la Sala, 2002) und T-Zell-Interaktion bzw. Antigenpräsentation (la Sala, 2001; la Sala, 2002; Schnurr, 2000) unter dem Einfluss von P2-Agonisten. Auch haben diese einen chemotaktischen Effekt auf MonoDC, welche ihre Ausläufer zu einem ATP-Gradienten hin ausrichten, was Liu et al. demonstrierten (Liu, 1999) und Idzko et al. mittels Chemotaxis-Assays quantifizierten (Idzko, 2002).

Dem P2X<sub>7</sub>- (Ferrari, 2000; Mutini, 1999; Sluyter, 2002) und dem P2Y<sub>11</sub>-Rezeptor (Schnurr, 2003; Wilkin, 2001) misst man besondere Bedeutung bei diesen Effekten zu.

### 1.3.7 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die oben erwähnten Effekte extrazellulärer Nukleotide sind nur für MonoDC beschrieben. Weitgehend ungeklärt sind bislang die Wirkungen auf PDC, einer Zellart, deren Bedeutung im Immunsystem in den letzten Jahren zunehmend aufgedeckt wird, und deren Eigenschaften sich mitunter signifikant von denen anderer dendritischer Zellen unterscheiden.

Zu Beginn dieser Arbeit gab es keine Berichte darüber, welche P2-Rezeptoren von plasmazytoiden dendritischen Zellen exprimiert werden, ob diese funktionelle Bedeutung haben, und inwieweit ATP auf die Reifung, Aktivierung und das Migrationsverhalten plasmazytoider dendritischer Zellen Einfluss nimmt.

Diese Fragen wurden daher in der vorliegenden Arbeit anhand eines *in vitro*-Modells mit humanen plasmazytoiden dendritischen Zellen bearbeitet.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien und Geräte

#### 2.1.1 Geräte

Begasungsbrutschrank	Fa. Heraeus (Hanau)
Eismaschine	Fa. Ziegra (Isernhagen)
ELISA Reader	Fa. Dynatech (Guernsey, Channel Islands, GB)
FACSCalibur	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg)
Flow Lamin Air 2472 S	Fa. Heraeus (Hanau)
Macrovue 2011 LKB-Transilluminator	Fa. Bromma (Schweden)
MACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Mikroskop	Fa. Zeiss (Jena)
Model 200/2,0 Power Supply	Fa. Bio-Rad (München)
pH-Meter	Fa. WTW (Weilheim)
Polaroid MP-4 Land Camera	Fa. Polaroid (Cambridge, USA)
Scanner Snapscan e50	Fa. AGFA (Mortsel, Belgien)
Thermocycler Modell T3	Fa. Biometra (Göttingen)
Vortexer	Fa. Janke & Kunkel (Staufen)
Waage (LP 6209)	Fa. Sartorius (Göttingen)
Waage (SBC 21)	Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt)
Wasser-Deionisierungsmaschine	Fa. SG Reinstwasser-Systeme (Hamburg)
Wide Mini Sub Cell	Fa. Bio-Rad (München)
Zentrifuge 5417R	Fa. Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Sepatech Omnifuge	Fa. Heraeus (München)

#### 2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Aqua ad injectabile	Fa. Braun (Melsungen)
dNTP	Fa. Promega (Heidelberg)
DMSO	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
DNA Molecular Weight Marker III	Fa. Boehringer (Mannheim)
Polaroid Typ 665 Positive/Negative	
Black & White Instant Pack Film	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
PBR 322 Hae III DIGEST	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)

Geneticin g-418 Sulfat	Fa. GibcoBRL (Paisley, Schottland)
Ortho-mune Lyse-Reagenz	Fa. Ortho-Clinical Diagnostics (Neckars- gmünd)
EDTA (kristallin)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
Heparin-Natrium	Fa. Ratiopharm (Ulm)
HEPES Puffer (1M)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
Brefeldin A	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
Fluo-3, AM	Fa. Molecular Probes (Eugene, USA)
Fura Red, AM	Fa. Molecular Probes (Eugene, USA)
Pluronic F-127 (20 % Lsg. in DMSO)	Fa. Molecular Probes (Eugene, USA)
To-Pro-3 Iodid	Fa. Molecular Probes (Leiden, NL)
FACSFlow	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg)
FACSSafe	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg)
Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypan-Blau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tween 20	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
Taq DNA-Polymerase	Fa. Boehringer (Mannheim)
EDTA (0,02 % Solution)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
NaCl 0,9 %	Fa. Baxter (Lessines, Belgien)

### 2.1.3 Reagenziensätze

B Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
BDCA-4 Dendritic Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
CD45RO Microbeads	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
First-Strand-cDNA Synthesis Kit	Fa. Roche (Mannheim)
Fix N Perm Kit	Fa. An der Grub (Kaumberg, Österreich)
High Pure RNA Isolation Kit	Fa. Roche (Mannheim)
IFN-alpha ELISA	Fa. Bender MedSystems (Wien, Österreich)
IL-12 p40 ELISA Kit	Fa. Bender MedSystems (Wien, Österreich)
Pan T Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

### 2.1.4 Materialien für die Zellkultur

Biocoll Separationsmedium	Fa. Biochrom (Berlin)
Fetales Kälberserum	Fa. GibcoBRL (Paisley, Schottland)

Humanes AB-Serum (HS)	Fa. BioWhittaker (Wakersville MD, USA)
Humanes Serum Albumin	Fa. Grifols (Langen)
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Fa. PAA (Linz, Österreich)
L-Glutamin	Fa. PAA (Linz, Österreich)
Penicillin	Fa. PAA (Linz, Österreich)
Phosphate buffered saline (PBS)	Fa. PAA (Linz, Österreich)
Streptomycin	Fa. PAA (Linz, Österreich)
VLE RPMI 1640 Medium	Fa. Biochrom (Berlin)

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen), Falcon (Heidelberg), Becton Dickinson (Le Pont de Claix, Frankreich), Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, England) und Corning (Corning NY, USA) bezogen.

### 2.1.5 Zytokine und Wachstumsstimulatoren

Brefeldin A	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
Calcium-Ionomycin	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
Interferon-alpha	Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick NJ, USA)
Interleukin 2	Fa. R&D Systems (Wiesbaden)
Interleukin-3	Fa. R&D Systems (Wiesbaden)
PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
TNF-alpha	Fa. R&D Systems (Wiesbaden)

### 2.1.6 Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien

Um unspezifische Stimulation zu vermeiden, wurden nur endotoxinarme Substanzen verwendet. Folgende Medien und Puffer wurden für die Zellkultur eingesetzt:

IMDM-Vollmedium:

IMDM-Medium

8 Vol % Humanes AB-Serum

100 IU/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

2 mM Glutamin

DMEM-Selektionsmedium für CD40L-Zellen:

DMEM-Medium

5 Vol % fetales Kälberserum (FCS)

100 IU/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

2 mM Glutamin

200 µg/ml Geneticin G-418 Sulfat

Kryo-Medium (für CD40L-Zellen):

40 Vol % RPMI Medium

50 Vol % Humanes AB-Serum bzw. fetales Kälberserum

10 Vol % DMSO

RPMI-Vollmedium:

100 IU/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

2 mM Glutamin

10 Vol % fetales Kälberserum (FCS)

10 mM HEPES

VLE RPMI 1640-Medium

MACS-Puffer:

PBS

0,5 Vol % Humanes Serum Albumin

2mM EDTA

pH=7,2

TE-Puffer:

10 mM Tris Chlorid

1 mM EDTA

pH=8,0

Wasser:

Es wurde stets deionisiertes Wasser aus der Hausleitung benutzt.

**2.1.7 Antikörper**

Folgende Antikörper wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Name	Spezifität	Klon	Isotyp	Fluoreszenz (bei FACS-AK)	Herkunft
Anti-CD3	CD3	SK7	Maus IgG <sub>1</sub>	FITC	Fa. BD PharMingen
Anti-CD4	CD4			APC	Fa. BD PharMingen
Anti-CD8	CD8			FITC	Fa. BD PharMingen
Anti-CD19	CD19			APC, PE	Fa. BD PharMingen
Anti-CD45Ra	CD45Ra	L48	Maus IgG <sub>1</sub>	FITC	Fa. BD PharMingen
Anti-HLA-DR	HLA-DR	L243	Maus IgG <sub>2a</sub>	PerCP	Fa. BD PharMingen
Anti-IFN-gamma	IFN-gamma	4SB3	Maus IgG <sub>1</sub>	PE	Fa. BD PharMingen



Anti-Interleukin 4	Interleukin 4	8D4-8	Maus IgG <sub>1</sub>	PE	Fa. BD PharMingen
Anti-CD154	CD154 (CD40L)	TRAP1	Maus IgG <sub>1</sub>	FITC	Fa. BD PharMingen
Anti-CD40	CD40	FC3	Maus IgG <sub>1</sub>	FITC, PE	Fa. BD PharMingen
Anti-CD80	CD80	BB1	Maus IgGM	FITC, PE	Fa. BD PharMingen
Anti-CD83	CD83			PE	Fa. BD PharMingen
Anti-CD86	CD86	2331	Maus IgG <sub>1</sub>	APC, PE	Fa. BD PharMingen
Anti-CCR7	CCR7	3D12	Ratte IgG <sub>2a</sub>		R. Förster, Erlangen-Nürnberg
Anti-CxCR4	CxCR4			PE	Fa. RD Systems (Minneapolis, USA)
Anti-rat IgG <sub>2a</sub>	Ratte IgG <sub>2a</sub>	RG7/1.30	Maus		Fa. BD PharMingen
Streptavidin-APC	Streptavidin	-	-	APC	Fa. BD PharMingen
Anti-CD123	CD123			PE	Fa. BD PharMingen
Anti-lin (CD3,14,16,19,20,56)	CD3,14,16,19,20,56			FITC	Fa. BD PharMingen

### 2.1.8 Oligodesoxynukleotide

Alle immunstimulierenden Oligodesoxynukleotide, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, wurden bezogen von der Fa. Coley Pharmaceutical Group (Wellesley MA, USA). Alle Oligodesoxynukleotide waren Endotoxin getestet (unter 0,03 EU/ml, LAL-Assay, Fa. BioWhittaker [Wakersville MD, USA]) und wurden, falls nicht ausdrücklich anders angegeben, in einer Konzentration von 3 µg/ml eingesetzt. Hier die Sequenzen der verwendeten Oligodesoxynukleotide:

Name	Typ	Nukleotid-Sequenz (5' → 3')	Rückgrat	Länge	Referenz
2006	Typ B Oligo	<b>tcg tcg</b> tt tgt <b>cgt</b> tt tgc <b>gtt</b>	S	24-mer	(Hartmann, 2000)
2216	Typ A Oligo	ggg gga <b>cga tcg tcg</b> ggg g	SOS	19-mer	(Krug, 2001)

### 2.1.9 Primer für die Amplifikation der P2-Rezeptor kodierenden Gene

Die Primer wurden bei Oligofactory PE Biosystems, Deutschland, bestellt. Die Sequenzen der Primer sind wie folgt gewählt worden:

	forward primer (sense) (5' → 3')	reverse primer (antisense) (5' → 3')	Referenz
P2X <sub>1</sub>	CTGTGAAGACGTGTGA-GATCTTTGG	TTGAA-GAGGTGACGGTAGTTGG TCC	(Berchtold, 1999)
P2X <sub>4</sub>	GAGATTCCAGATGCGACC	GACTTGAGGTAAG-TAGTGG	(Berchtold, 1999)
P2X <sub>5</sub>	TCGACTACAAGACCGAGAAG	CTTGACGTCCATCA-CATTG	(Berchtold, 1999)
P2X <sub>7</sub>	AGATCGTGGAGAATGGAGTG	TTCTCGTGGTGTAGTTG TGG	(Ferrari, 2000)
P2Y <sub>1</sub>	TGTGGTGTACCCCCTCAAGT CCC	ATCCGTAACAGCCCA-GAATCAGCA	(Ferrari, 2000)
P2Y <sub>2</sub>	CTCTACTTTGTCACCAC-CAGCGCG	TTCTGCTCCTA-CAGCCGAATGTCC	(Berchtold, 1999)
P2Y <sub>5</sub>	TGGTTAACTGTGATCGGAGG	AGTCACTTCTCCTGACA GACC	(Berchtold, 1999)
P2Y <sub>6</sub>	CGCTTCCTCTTCTATGCCAA CC	CCATCCTGGCGGCGGC ACAGGCGGC	(Berchtold, 1999)
P2Y <sub>10</sub>	CATCAGTCTTCAAAGGTGC	GGACAACTGCTAAT-GATGG	(Berchtold, 1999)
P2Y <sub>11</sub>	CAGCGTCATCTTCATCACC	GCTA-TACGCTCTGTAGGC	(Berchtold, 1999)
P2Y <sub>12</sub>	CTGGGCATT-CATGTTCTTACTC	TGCCAGACTAGAC-CGA ACTCT	(Zhang, 2002)

### 2.1.10 P2-Agonisten

Kurzname	Name	Firma
ATP	Adenosin-5'triphosphat	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
βymATP	β,γ-methylen-Adenosin-5'-triphosphat	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
2MeSATP	2-methylthio-Adenosin-5'-triphosphat	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
AP5A	P1,P5-Diadenosin-pentaphosphat	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
UTP	Uridin 5'-triphosphat	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)

### 2.1.11 P2-Antagonisten

PPADS	Pyridoxal-5'-phosphat-6-azophenyl 2',4'-disulfonsäure	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
Suramin		Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)

## 2.2 Zellulär – Immunologische Methoden

### 2.2.1 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung des Anteils der lebenden Zellen wurde der Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. Hierbei färben sich tote im Gegensatz zu lebenden Zellen blau an. Die Zellzahl wurde nach geeigneter Verdünnung der Zellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ermittelt.

### 2.2.2 Isolierung von peripheren Blutlymphozyten

Zur Isolierung peripherer Blutlymphozyten (später auch PBMC genannt, *Peripheral blood mononuclear cells*) wurde, je nachdem ob *Buffy Coats* oder frisches Spenderblut von gesunden Probanden aus der Kollegenschaft im Labor verwendet wurden, ein jeweils angepasstes Verfahren verwendet, jedoch immer über eine Ficollpräparation aufgetrennt. *Buffy Coats* sind bei der Zentrifugierung von Blutspenden entstehende Abfallprodukte, in denen Leukozyten angereichert sind und der Anteil an Erythrozyten deutlich geringer ist als im Vollblut. Im Falle von *Buffy Coats* wurde das Blut mit einer Perfusorspritze steril aus dem Plastikbeutel entnommen, im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt und in einem 50 ml Polypropylen-Röhrchen über 15 ml Biocoll (=Ficoll) aufgeschichtet, so dass zwei Phasen entstanden. Bei der Verwendung von frischem Spenderblut wurde ebenfalls im gleichen Verhältnis mit PBS verdünnt, allerdings wurden zur Separation Leucosep-Röhrchen verwendet, in die ebenfalls zuvor 15 ml Biocoll bei Raumtemperatur eingebracht worden waren. Anschließend wurde in beiden Fällen 30 min bei 1000 g ohne Bremse zentrifugiert, die Zellen in der Interphase vorsichtig – in möglichst kleinem Volumen, um wenig Biocoll mit aufzunehmen – mit einer Pipette aspiriert. Danach wurden die Zellen dreimal in PBS gewaschen (Zentrifugation 10 min bei 300 g und 4 °C), bevor sie in 5 ml Ortholyse-Reagenz aufgenommen wurden, in dem sie 7 min inkubiert wurden. Nach der erfolgten Lyse der verbliebenen Erythrozyten wurde noch einmal gewaschen und schließlich die Zellzahl bestimmt. Biocoll besitzt aufgrund seiner spezifischen Dichte von 1.077 g/ml die Eigenschaft, in einer Dichte-Zentrifugation mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) an der Phasengrenze zwischen Blutserum und Biocoll anzureichern. Wegen ihrer höheren Dichte sedimentieren Erythrozyten und Granulozyten in bzw. unter die Biocollschicht. Thrombozyten hingegen finden sich wegen ihrer geringeren Dichte in der Serumschicht oberhalb des Biocoll.

### 2.2.3 Isolierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen aus PBMC

Plasmazytoide dendritische Zellen wurden wegen ihrer geringen Frequenz im peripheren Blut aus PBMC aus *Buffy Coats* mit dem BDCA-4 Cell Isolation Kit (nach dem Prinzip des *Magnetic-activated cell sorting* [MACS]) isoliert. PBMC wurden zunächst durch einen 40 µm Nylonfilter von Zellklumpen befreit und dann entsprechend dem Protokoll des Herstellers 15 Minuten mit dem Anti-BDCA-4 Antikörper, der an paramagnetische Mikropartikel (*Microbeads*) mit einem Durchmesser von ca. 50 nm gekoppelt ist, bei 6-12 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde die Zellsuspension in eine in einem Magnetfeld stehende Selektionssäule appliziert. Durch die magnetische Markierung werden die plasmazytoiden dendritischen Zellen in der Matrix der Säule zurückgehalten. Nach mehrmaligem Waschen der Säule mit MACS-Puffer wurde die Selektionssäule aus dem Magnetfeld herausgenommen. Mit Druck wurden dann die positiv selektionierten plasmazytoiden dendritischen Zellen aus der Säule gespült. Nach einem Waschschrift wurde die Selektionsprozedur ohne erneute Inkubation mit Antikörpern mit einer kleineren Säule wiederholt. Die Reinheit der auf diese Weise erhaltenen plasmazytoiden dendritischen Zellen lag zwischen 75 und 90 %.

### 2.2.4 Stimulation von plasmazytoiden dendritischen Zellen

Um die Wirkungen der extrazellulären Nukleotide auf plasmazytoide dendritische Zellen zu untersuchen, wurden diese nach Isolierung ( $5 \times 10^4$  Zellen/200 µl) mit unterschiedlichen Konzentrationen von ATP, UTP, 2MeSATP,  $\beta\gamma$ mATP und AP5A in 96-Well Rundboden-Platten kultiviert. PPADS und Suramin dienten in einigen Ansätzen als P2-Antagonisten. Suramin wurde dabei dem Ansatz mit den isolierten Zellen 30 min vor Zugabe der P2-Agonisten hinzu gegeben. Alle Reagenzien stammten von Sigma-Aldrich (Steinheim). Zur Stimulation wurden des Weiteren die Oligonukleotide CpG ODN 2006 und CpG ODN 2216 (Coley Pharmaceutical Group, Wellesley, USA) verwendet. Die Oligonukleotide waren Endotoxin getestet (unter 0,03 EU/ml, LAL-Assay, BioWhittaker, Wakersville, USA) und wurden früheren Studien folgend in einer Endkonzentration von 3 µg/ml eingesetzt. Auch fand zum Teil TNF- $\alpha$  (R&D Systems, Wiesbaden) in einer Konzentration von 1000 U/ml Verwendung. Um das Überleben der Zellen zu sichern, wurde jeweils 10 ng/ml IL-3 (R&D Systems, Wiesbaden) zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug – soweit nicht anders erwähnt – 48 h.

### 2.2.5 Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden in einem Begasungsbrutschrank (HAREUS, Hanau) bei einer Temperatur von 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und bei einem Anteil von 5 % CO<sub>2</sub> in der Atmosphäre vorgenommen. Als Kulturmedium wurde immer, wenn nicht explizit etwas anderes angemerkt ist, Vollmedium verwendet. Sämtliche Experimente und Manipulationen mit Zellen wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen in einem Laminar-Air-Flow durchgeführt.

### 2.2.6 Bestrahlung und Kultivierung von CD40 Ligand-transfizierten Fibroblasten und der Kontrollzell-Linie

In einigen Versuchen wurden CD40 Ligand-transfizierte Fibroblasten (ATTC 79814, Mykoplasmen-negativ) als Stimulatorzellen sowie die untransfizierte Mutterzelllinie als Kontrolle (BHK: baby hamster kidney) verwendet. Um zu verhindern, dass sich Stimulatorzellen (CD40 Ligand-transfizierte Fibroblasten) im Versuchsansatz in Kultur teilen, wurden diese in 5-10 ml Medium suspendiert und in einer Röntgenbestrahlungsanlage (Institut für Immunologie, München) mit 30 Gray für 30 min bestrahlt. Die bestrahlten CD40L-Zellen wurden den plasmazytoiden dendritischen Zellen in einem Verhältnis von 1:10 hinzugesetzt.

### 2.2.7 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

#### 2.2.7.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Die FACS-Analyse (*Fluorescence-activated cell sorting*) stellt eine Möglichkeit dar, Größe, Granularität und Oberflächenantigene von Zellen darzustellen und zu quantifizieren. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen das zu messende Oberflächenantigen markiert und in einem Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander durch eine Messkammer geführt. Hier wird der Zellstrom in der Trägerflüssigkeit auf das Küvettenzentrum verengt und beschleunigt, so dass die Zellen einzeln in ausreichendem Abstand voneinander am Messpunkt vorbeifließen. Am Messpunkt führen Zelleigenschaften wie Größe, Form, Membranoberfläche und intrazelluläre Granula zu einer Lichtstreuung des einfallenden Laserstrahls, die durch je einen Photodetektor in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) und einen im rechten Winkel dazu liegenden (Seitwärtsstreulicht) registriert und in elektrische Signale umgewandelt wird. Die Intensität

des Vorwärtstreulichts wird im Wesentlichen durch die Zellgröße, die des Seitwärtstreulichts durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Der Laserstrahl regt weiterhin das Chromophor der für die Oberflächenmarkierung verwendeten Antikörper zur Emission von Lichtquanten an, die ebenfalls in Linsen gesammelt werden. Dabei trennen Filter das gesammelte Licht und lenken es – nach Wellenlängenbereichen aufgetrennt – zu verschiedenen Photodetektoren. So können Signale verschiedener Wellenlänge voneinander getrennt aufgenommen und analysiert werden (Mehrfarbenanalyse). Die gemessene Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Zahl der pro Zelle gebundenen Antikörper gegen das untersuchte Oberflächenantigen.

#### **2.2.7.2 Bestimmung von Oberflächen- und intrazellulären Molekülen**

Für die FACS-Analysen wurden  $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$  Zellen in FACS-Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Zellen im rücklaufenden Tropfen resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen im Dunkeln bei 4 °C mit FITC (Fluorescein-Isocyanat), PE (Phycoerythrin), PerCP (Peridin Chlorophyll Protein) oder APC (Allophycocyanin) gekoppelten Antikörpern für 15-30 min inkubiert.

Bei den Färbungen zum Nachweis des CCR7-Rezeptors auf der Zelloberfläche wurden die Zellen im ersten Schritt mit Anti-CCR7-Rattenantikörper inkubiert. Nach je einem Waschschritt erfolgte sodann die Inkubation mit einem biotinylierten Anti-Ratte-Antikörper, anschließend mit einem Farbstoff-gekoppelten Streptavidin.

Bei den intrazellulären CCR7-Rezeptor-Färbungen wurde wie folgt vorgegangen: Nach dem Waschen wurden die Zellen mit dem Fix N Perm-Kit (An der Grub, Kaumberg, Österreich) nach der Anleitung des Herstellers fixiert und permeabilisiert, wodurch eine Anfärbung von intrazellulären Zellbestandteilen ermöglicht wurde. Zunächst wurden die Zellen über 15 min bei Raumtemperatur fixiert und nach einmaligem Waschen mit PBS dann 15 min lang permeabilisiert. Gleichzeitig mit dem Permeabilisationsvorgang erfolgten dann die Inkubation mit dem CCR7-Rattenantikörper und die weiteren soeben beschriebenen Schritte. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen auf einem Durchflusszytometer Modell FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) mit der CellQuest-Software (BD Biosciences, Version 3.2.1) analysiert.

### 2.2.7.3 Intrazelluläre Kalziumionenmessungen

Veränderungen der intrazellulären Kalziumionenkonzentrationen zum Rückschluss auf die Signaltransduktion purinerger Rezeptoren wurden mittels FACS-Messungen untersucht (Novak, 1994). Dazu wurden die plasmazytoiden dendritischen Zellen in Anwesenheit von 10 ng/ml IL3 entweder für 24 h mit CpG ODN 2006 ausgereift oder ohne Reifestimulus inkubiert. Anschließend wurden die plasmazytoiden dendritischen Zellen ( $\leq 5 \times 10^6$  Zellen/ml) 40 min lang bei 37 °C mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Reagenzien Fluo-3 Acetoxymethylester (fluo-3/AM) (4 µg/ml) und Fura Red (Fura Red/AM) (10 µg/ml) zusammen mit dem Detergenz 0,02 % Pluronic F-127 (alle von Molecular Probe, Oregon) inkubiert.

Die Zellen wurden nach 30 min Inkubation im Dunkeln zweimal gewaschen und nach Aufnahme in 37 °C warmes Medium mit dem Durchflusszytometer analysiert. Nach Erhalten einer stabilen Signallinie im FACS nach 10 bis 30 Sekunden wurden die Nukleotide hinzugegeben, und dann unmittelbar die intrazellulären Kalziumionenkonzentrationen über die Zeit (Zeitauflösung 200 ms) mit dem FACS bestimmt. Für die Auswertung wurde das Verhältnis der Fluoreszenz-Intensitäten von Fluo-3 (in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  erhöhte Intensität) und von Fura Red (in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  erniedrigte Intensität) berechnet. Zum Teil wurde lediglich die Kinetik des Farbstoffes Fluo-3 dargestellt. Zur Datenanalyse wurde FloJo Software (Version 3.4, Tree Star, San Carlos, CA) verwendet. Um die unterschiedlichen Spender vergleichen und die Wirkungen der einzelnen Stimuli quantifizieren zu können, wurden die Spitzenwerte (peak values) der Fluo-3/Fura Red Ratio nach Zugabe der Stimuli bestimmt.

### 2.2.8 Zellmigrations-/Chemotaxis-Assay

Mit Hilfe eines Zellmigration-Assays kann man die Wanderung von Zellen auf ein Agens hin sowohl qualitativ als auch quantitativ bestimmen. Hierfür verwendet wurden aus zwei Kammern bestehende *Trans-well*-Platten (5 µm Poren-Größe, 24 Wells, Fa. Corning, U-SA). Die unteren Kammern der Platte wurden mit 500 µl RPMI/2 % HS gefüllt, dann die Nukleotide in den angegebenen Konzentrationen dazugegeben.  $1 \times 10^4$  plasmazytoide dendritische Zellen, die nach Isolation über Nacht mit 10 ng/ml Interleukin-3 inkubiert worden waren, wurden in 100 µl RPMI/2 % HS in die obere Kammer gegeben. Obere und untere Kammer sind durch Poren-Filter voneinander getrennt. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen aus der unteren Kammer geerntet, in Eppendorf-Reaktionsgefäßen auf ein Volumen von 50 µl gebracht und mit dem Durchflusszytometer gezählt.

### 2.2.9 Konzentrationsbestimmung von Zytokinen mittels ELISA

Zur Bestimmung der Zytokin-Konzentrationen von Interferon- $\alpha$  und Interleukin-12 p40 nach 48 h Inkubation wurden ELISA (*enzyme-linked-immunosorbent-assay*)-Kits zum Selbst-Beschichten verwendet (Bender MedSystems, Wien).

Das Testprinzip besteht in der Bindung der im Überstand der Zellkultur gelösten Zytokine an spezifische Antikörper (*coating antibodies*), mit denen die *Wells* der Platte beschichtet sind. Dazu wurden eine Standardreihe mit bekannter Proteinmenge und die zu untersuchenden Proben in festgelegten Verdünnungen aufgetragen. An ein anderes Epitop des an der Platte gebundenen Zytokins bindet nun ein zweiter, biotinylierter Antikörper (*detection antibody*). Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurde die Platte mehrfach mit einem Waschpuffer zum Entfernen nicht gebundener Antikörper und Zytokine gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Proben dann mit Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Streptavidin inkubiert. Die Streptavidin-Moleküle gehen eine feste Bindung mit den Biotin-Molekülen ein. Die Meerrettichperoxidase katalysiert eine quantifizierbare Reaktion, die der Menge des in der Probe vorhandenen Zytokins entspricht, mit einem anschließend zugegebenen Farbstoff. Nach Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure wurde die Messung der durch den umgesetzten Farbstoff hervorgerufenen Absorption (die also proportional zur Proteinkonzentration der Probe ist) direkt im Anschluss in einem ELISA-Reader bei der in der Anleitung empfohlenen Wellenlänge vorgenommen. Die Auswertung erfolgte durch den Vergleich mit einer in Doppelwerten angefertigten Standardkurve mit bekannten Proteinmengen.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Grundlagen der Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ermöglicht es, ein bestimmtes DNA-Segment aus einem Gemisch unterschiedlicher Nukleinsäuren zu vermehren und damit kleinste Mengen einer gegebenen DNA-Sequenz nachzuweisen. Die Reaktion erfolgt mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und eines Paares sequenzspezifischer Oligonukleotidprimer, das zu den Enden der zu amplifizierenden DNA komplementär ist. Die Reaktion besteht aus drei Schritten: Zuerst wird die Matrizen-DNA denaturiert, bei doppelsträngiger DNA werden gegebenenfalls die beiden Stränge aufgeschmolzen (Denaturierung). Danach findet eine spezifische Hybridisierung der Primer an die komplementäre Zielsequenz auf der DNA statt (Anlagerung oder *annealing*). Schließlich geht von den Primern die DNA-



Synthese aus (Elongation). In der darauf folgenden Amplifikationsrunde kann das so synthetisierte DNA-Fragment als neue Matrize für die Primeranlagerung dienen. Auf diese Weise ist in mehreren aufeinander folgenden Zyklen eine exponentielle Anreicherung einer beliebigen DNA-Sequenz, die zwischen den beiden Primern liegt, möglich.

### **2.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus plasmazytoiden dendritischen Zellen**

Um auch Analysen von mRNA bzw. Gesamt-RNA mittels der RT-PCR-Technik durchführen zu können, muss RNA zuerst isoliert und dann in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Zur Isolierung von RNA aus plasmazytoiden dendritischen Zellen wurde der *High Pure RNA Isolation Kit* von Roche, Mannheim, verwendet.

$1,8 \times 10^6$  PDC wurden nach Inkubation mit oder ohne CpG Oligonukleotiden (und jeweils mit 10 ng/ml IL-3) für 24 h bei 37 °C gewaschen und in PBS resuspendiert. Nach Zugabe des speziellen Lyse-/Bindepuffers Ortho-mune (Fa. Ortho-Clinical Diagnostics, Neckarsgmünd), der innerhalb weniger Sekunden die Zellen lysiert und gleichzeitig die RNAsen inaktiviert, wurde die Probe in einem zweiteiligen Auffanggefäß zentrifugiert. Die RNA adsorbierte dabei an das Glasfaserfließ des Filters im oberen Reservoir, während die anderen Zellbestandteile in das untere Reservoir durchliefen und anschließend verworfen wurden. Da am Glasfaserfließ alle Nukleinsäuren spezifisch binden, wurde die Probe danach mittels einer enzymatischen Verdauungsreaktion von kontaminierender DNA befreit, was durch Inkubation mit DNase I für 15 min bei 15-25 °C geschieht. Nach drei Waschschritten mit den mitgelieferten Waschpuffern und anschließendem Zentrifugieren konnte die RNA mit einem Elutionspuffer aus dem Filter eluiert werden.

### **2.3.3 Reverse Transkription von Gesamt-RNA in cDNA**

Zur Amplifikation über PCR wird die RNA revers transkribiert und in einen cDNA-Einzelstrang umgeschrieben. Dazu wurde der *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR* (AMV) der Firma Roche, Mannheim verwendet. Hierfür wurde die RNA mit einem Reaktionsansatz (*Master Mix*) bestehend aus 5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM Deoxynukleotid-Mix, 1,6 µg/Ansatz Oligo-p(dT)<sub>15</sub> Primer, 50 units/Ansatz RNase Inhibitor und  $\geq 20$  units/Ansatz Reverse Transkriptase kurz vor der Reaktion zusammenpipettiert, für 10 min bei 25 °C und anschließend für 60 min bei 42 °C inkubiert. In der ersten Inkubation binden dabei die Pri-

mer an die RNA-Matrize und werden anschließend revers transkribiert, was zur cDNA-Synthese in der zweiten Inkubation führt. Danach wurde die AMV Reverse Transkriptase durch fünfminütiges Erhitzen des Reaktionsgemischs auf 99 °C und anschließendes Abkühlen auf 4 °C für weitere fünf Minuten denaturiert.

#### 2.3.4 Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Der Reaktionsansatz enthielt 1X Reaktions-Puffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM Deoxynukleotid-Mix, jeweils 0,2 µM der Primerpaare, 1,25 units/Ansatz Taq DNA-Polymerase und 2 µl der zuvor synthetisierten cDNA. Um unspezifische Reaktionen zu vermeiden, wurde auf Eis pipettiert und die Taq DNA-Polymerase zuletzt zugegeben. Anschließend wurde die Reaktion auf einem vorgeheizten Thermocycler Modell T3 (Fa. Biometra, Göttingen) gestartet. Um eine unspezifische Anlagerung der Primer an das Genom zu vermindern, wurden so genannte *touchdown* Bedingungen, d.h. ein schrittweises Absenken der Anlagerungstemperatur (*Annealing*-Temperatur) über mehrere Zyklen bis zu einem optimalen, Primer spezifischen Wert gewählt. Durch dieses Verfahren lässt sich die Spezifität der PCR deutlich verbessern.

Die Reaktionsbedingungen wurden erst für die jeweiligen Primer mit cDNA von PBMC optimiert und so gewählt, dass die Primer möglichst spezifisch binden konnten. Die Expression des *house-keeping* Gens  $\beta$ -Actin wurde benutzt, um die Menge und Qualität der eingesetzten cDNA zu kontrollieren. Als Negativkontrolle wurde immer ein kompletter Reaktionsatz ohne Template-DNA mitgeführt, um eine Kontamination mit fremder DNA auszuschließen:

Zyklus	Denaturierung		Anlagerung		Elongation	
0	95 °C	5 min	-	-	-	-
1 - 15	94 °C	1 min	65 °C *	1 min	72 °C	1 min
16 - 40	94 °C	1 min	50 °C	1 min	72 °C	1 min
41	-	-	-	-	72 °C	10 min

\* Zyklus 1 – 20: -1 °C pro Zyklus

Für die PCR mit P2X<sub>7</sub>-Rezeptor Primern wurden folgende, abweichende Bedingungen gewählt, um bei höherer Temperatur spezifischere Banden zu erhalten:

Zyklus	Denaturierung		Anlagerung		Elongation	
0	95 °C	5 min	-	-	-	-
1 - 15	94 °C	1 min	69 °C *	1 min	72 °C	1 min
16 - 40	94 °C	1 min	54 °C	1 min	72 °C	1 min
41	-	-	-	-	72 °C	10 min

\* Zyklus 1 – 20: -1 °C pro Zyklus

Für die PCR mit P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor Primern wurden aus demselben Grund folgende Bedingungen gewählt:

Zyklus	Denaturierung		Anlagerung		Elongation	
0	95 °C	5 min	-	-	-	-
1 - 8	94 °C	1 min	78 °C *	1 min	72 °C	1 min
9 - 40	94 °C	1 min	70 °C	1 min	72 °C	1 min
41	-	-	-	-	72 °C	10 min

\* Zyklus 1 – 20: -1 °C pro Zyklus

Die PCR Produkte wurden danach bei 4 °C gekühlt. Um eine Probenkontamination zu vermeiden, wurde stets mit Einmalhandschuhen auf ausgewiesenen, weitgehend sterilen Arbeitsflächen gearbeitet. Probenvorbereitung, die Durchführung der PCR und die Ergebnisanalysen wurden an getrennten Arbeitsplätzen durchgeführt. Alle Arbeitsutensilien waren von den Herstellern als DNase- und RNase-frei ausgezeichnet. Die PCR-Produkte wurden dann gelelektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.3.5 Gelelektrophorese

Für die Herstellung eines 1,5 %igen Elektrophorese-Gels wurden 130 ml TBE-Puffer, versetzt mit 1,95 g Agarose Typ I und 5 µl Ethidiumbromid (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim), in einer Mikrowelle aufgekocht und in eine Gelkammer gegossen. Nach Ende des PCR-Programms wurden 20 µl der Reaktionslösung mit 4 µl Ladepuffer versetzt (30 % Glycerol und 0,25 % Bromphenolblau, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) in die Geltaschen gegeben und elektrophoretisch mit TBE-Laufpuffer aufgetrennt. Zur Größenbestimmung des amplifizierten DNA-Segments dienten der DNA Molecular Weight Marker III (Fa. Roche, Mann-

heim) für Fragmente von 0,12 bis 21,2 kbp und der PBR 322 Hae III DIGEST (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) für Fragmente von 100 bis 600 bp Länge. Zur Überprüfung der eingesetzten cDNA-Menge diente die koamplifizierte  $\beta$ -Actin-cDNA. Nach einer Laufzeit von ca. 70 min bei 100 V wurde das Gel unter UV-Licht mit einem Polaroid-Negativfilm mit Blende und, je nach Signalstärke, 10 bis 20 Sekunden Belichtungszeit fotografiert.

## 2.4 Statistische Analyse

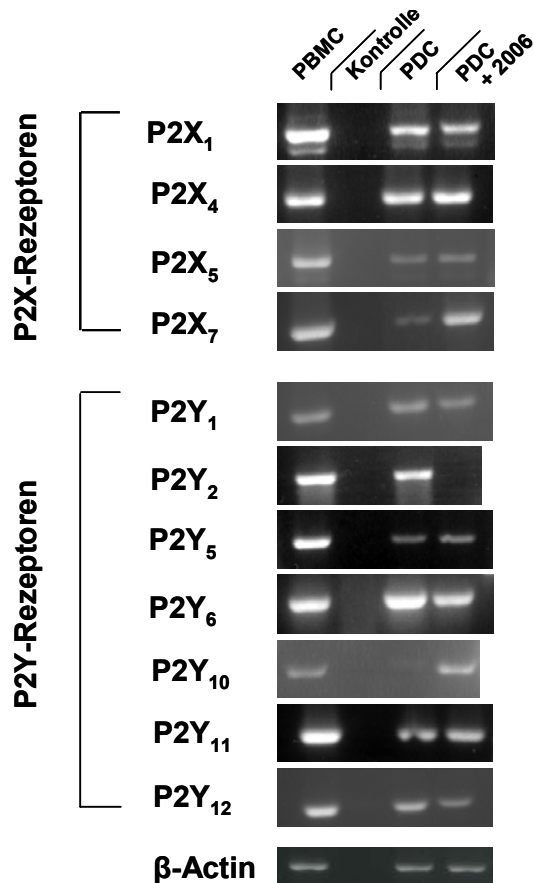
Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM (*Standard error of mean* = Standardfehler des Mittels) angegeben. Falls in einem Versuchsansatz lediglich zwei unabhängige Experimente durchgeführt wurden, so sind die Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  Reichweite dargestellt. Dies ist jedoch explizit in der Beschreibung der Abbildung erwähnt. Bei einigen Experimenten wurde zum Vergleich der Mittelwerte ein zweiseitiger Student-t-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  angenommen und ist durch Markierung mit einem \* angezeigt. Die statistischen Untersuchungen wurden mit dem Programm Stat-View 512 von Abacus Concepts (Calabasas, USA) durchgeführt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Nachweis von P2-Rezeptoren auf plasmazytoiden dendritischen Zellen

Extrazelluläre Nukleotide vermitteln eine Vielzahl biologischer Wirkungen, die daran beteiligten P2-Rezeptoren sind auf unterschiedlichen Zellen des Immunsystems beschrieben worden. Ziel war es, die Expression der P2-Rezeptoren auf plasmazytoiden dendritischen Zellen und ein durch Aktivierung dieser Zellen möglicherweise verändertes Rezeptormuster auf mRNA-Ebene zu untersuchen. Dazu wurde Gesamt-RNA sowohl aus frisch isolierten, als auch aus plasmazytoiden dendritischen Zellen, die zuvor 24 h lang mit dem Oligonukleotid CpG ODN 2006 (3 µg/ml) inkubiert worden waren, gewonnen. CpG ODN 2006 ist ein bekannter potenter Stimulus zu Aktivierung von PDC. Mit Hilfe rezeptorspezifischer Primer für P2X- und P2Y-Rezeptoren wurde sodann in einer semiquantitativen PCR die Anwesenheit von mRNA analysiert. Als Positivkontrolle und Vergleich wurden in den PCR-Ansätzen gleiche Mengen an mRNA aus nicht weiter aufgetrennten PBMC eingesetzt. Anhand des *house-keeping* Gens  $\beta$ -Actin wurde kontrolliert, dass vergleichbare Mengen RNA in den Proben eingesetzt wurden.

Auf unstimulierten plasmazytoiden dendritischen Zellen konnte RNA aller untersuchten P2X-Rezeptoren (P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>7</sub>) und P2Y-Rezeptoren (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>5</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>10</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>) nachgewiesen werden (siehe Abb.3). In den mit CpG ODN 2006 stimulierten Zellen war RNA aller P2-Rezeptoren bis auf die des G-Protein-gekoppelten P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors nachweisbar.



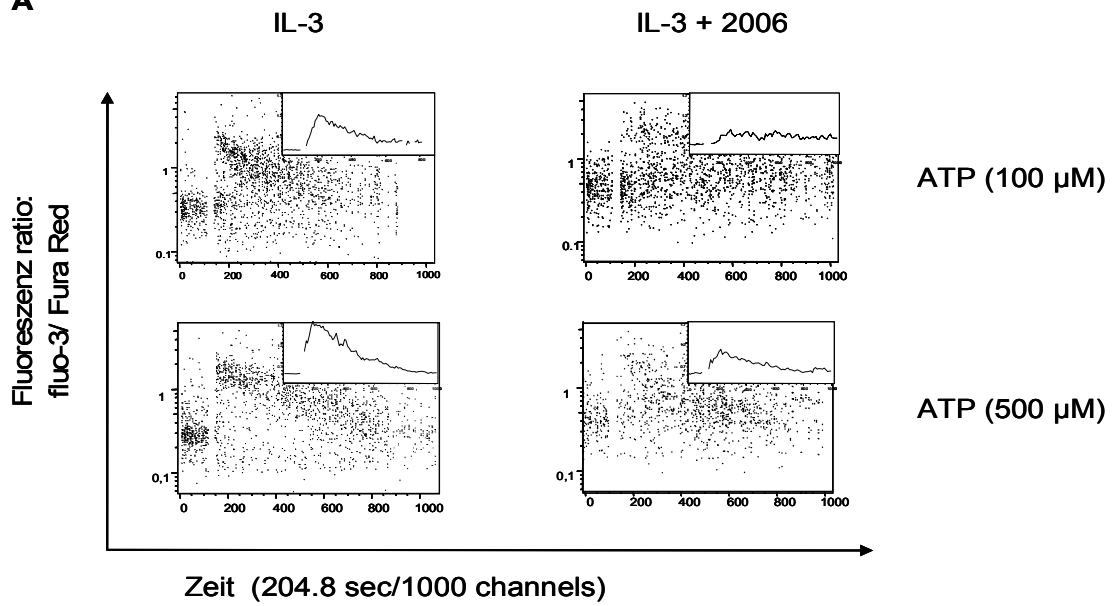
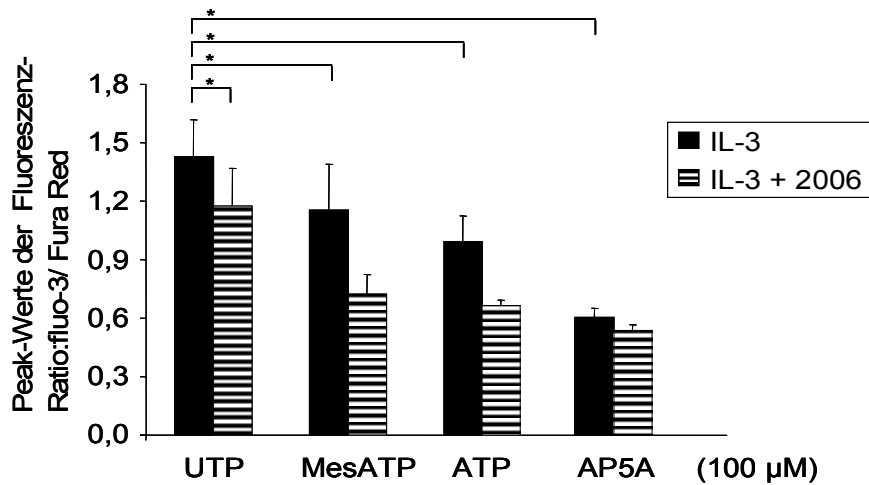
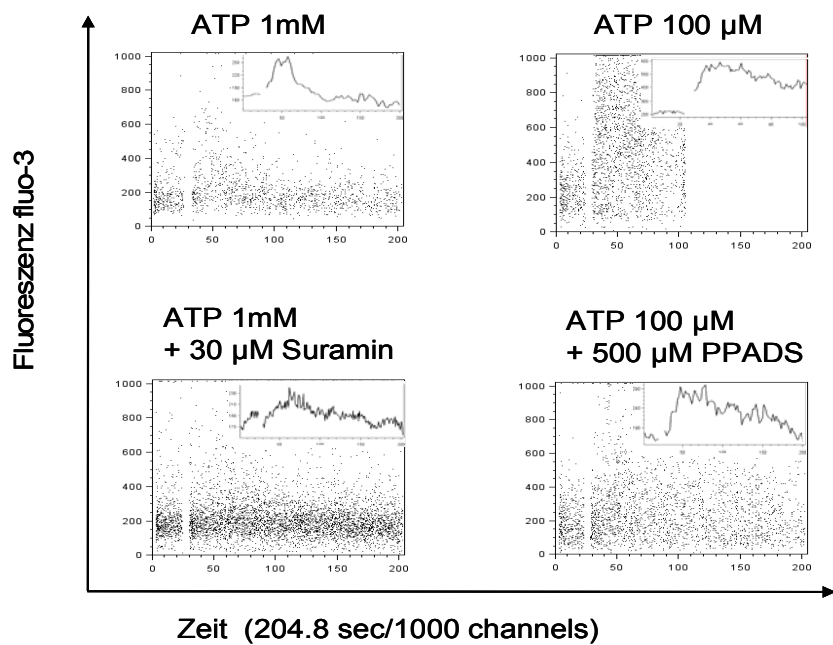
**Abb. 3: P2-Rezeptor-Expression humaner PDC.** Zytoplasmatische RNA wurde aus frisch isolierten PBMC (linke Spalte), unstimulierten PDC und mit über 24 h mit CpG ODN 2006 (3 µg/ml) stimulierten PDC (rechte Spalte) unterschiedlicher Spender gewonnen, mit reverser Transkriptase umgeschrieben und mit Hilfe der jeweiligen Primer (siehe Material und Methoden) die entsprechende cDNA in einer PCR amplifiziert. Als Negativkontrolle wurde jeweils eine PCR-Reaktion ohne cDNA Matrize mitgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden mit einem 1,5 %igen Agarosegel überprüft. (Bei P2Y<sub>10</sub> kann druckbedingt die Bande bei PDC schlecht erkennbar sein.)

### 3.2 Einfluss von Nukleotiden auf den intrazellulären Kalziumspiegel

Binden Nukleotide an P2-Rezeptoren, kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration. Dabei stammen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen entweder aus extrazellulären Speichern (im Falle der P2X-Rezeptoren) oder zusätzlich noch aus intrazellulären Speichern, wie bei den P2Y-Rezeptoren der Fall. Um zu testen, ob der Reifezustand der PDC einen Einfluss hat auf ihre Fähigkeit oder Art auf Nukleotide zu reagieren, wurden die Zellen zuerst unstimuliert oder zusammen mit CpG ODN 2006 24 h lang inkubiert. Anschließend wurden dann die Veränderungen der intrazellulären Kalziumionenkonzentrationen nach Zugabe von P2-Agonisten – wie im Methodenteil beschrieben – mit der Fluoreszenzzytometrie bestimmt. Dabei wurden P2-Agonisten und auch P2-Antagonisten verwendet, die unterschiedliche Rezeptoraffinitäten besitzen. Dies hatte zum Ziel, diejenigen P2-Rezeptoren zu identifizieren, welche für die Aktivierung von PDC durch Nukleotide verantwortlich sind.

In Konzentrationen von 100 µM führten die eingesetzten P2-Agonisten zu einem raschen Anstieg der Kalziumionenkonzentration in den Zellen (siehe Abb.4). UTP verursachte den größten Anstieg, gefolgt von dem modifizierten Derivat 2MeSATP und ATP. AP5A führte

lediglich zu einem minimalen Konzentrationsanstieg intrazellulärer Kalziumionen (siehe Abb.4B). Der Effekt des ATP ließ sich durch Vorinkubation mit den P2-Rezeptor-Antagonisten Suramin (30  $\mu$ M) und PPADS (500  $\mu$ M) reduzieren (siehe Abb. 4C). ATP zeigte dosisabhängige Effekte, da bei höheren Konzentrationen dieses Nukleotids (500  $\mu$ M) ein höherer Anstieg beobachtet werden konnte (siehe Abb. 4A). Bemerkenswerterweise kam es bei den mit CpG ODN 2006 aktivierten Zellen zu einer vergleichsweise geringeren Erhöhung der Kalziumionenkonzentration nach Stimulation mit Nukleotiden, insbesondere bei 2MeSATP, ATP und UTP. Der Unterschied war am deutlichsten bei 2MeSATP, bei ATP war er größer als bei UTP. Kein Effekt war bei AP5A zu beobachten.

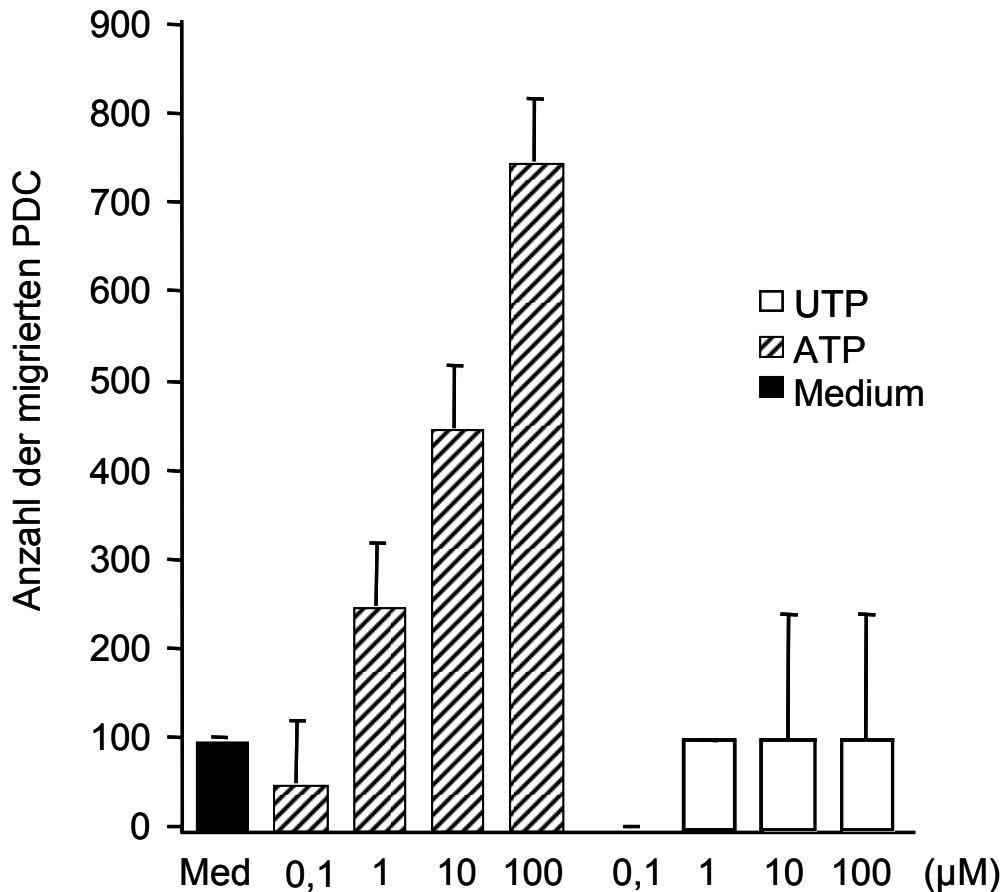
**A****B****C**



**Abb. 4: ATP erhöht die Konzentration intrazellulärer Kalziumionen in plasmazytoiden dendritischen Zellen.** Der Effekt wird durch Vorinkubation mit CpG ODN 2006 reduziert. **A**, PDC wurden für 24 h alleine mit IL-3 (10 ng/ml) oder mit IL-3 und CpG ODN 2006 (3 µg/ml) inkubiert. Sofort nach Stimulation mit ATP (100 µM und 500 µM) wurde die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration mittels Fluoreszenzzytometrie und  $\text{Ca}^{2+}$ -sensiblen Farbstoffen bestimmt. Die Ergebnisse sind als Kinetik der Fluoreszenz-Quotienten der Farbstoffe Fluo-3 und Fura Red gezeigt. Dargestellt ist ein repräsentatives von drei Experimenten. **B**, Intrazelluläre Kalziumionenmessung. Es werden die Unterschiede der intrazellulär gemessenen Spitzenwerte (Peak-Werte) der Fluoreszenz-Quotienten von Fluo-3 und Fura Red unreifer und reifer PDC nach Stimulation mit UTP, 2MeSATP, ATP und AP5A (jeweils 100 µM) dargestellt. Gezeigt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten + SEM. \*  $p < 0,05$  (Student t-test). **C**, Hemmung des ATP (1 mM und 100 µM) vermittelten intrazellulären Kalziumionenkonzentrations-Anstieges durch Vorinkubation mit Suramin 30 µM bzw. 500 µM PPADS jeweils 30 min vor Zugabe von ATP. Darstellung als lineare Kinetik der Fluo3-Fluoreszenz gegen die Zeit (n=1).

### 3.3 ATP hat chemotaktische Wirkungen auf plasmazytoide dendritische Zellen

Einem Gradienten aus speziellen chemotaktisch aktiven Substanzen folgend, wie zum Beispiel den inflammatorischen Chemokinen CCL4 und CCL5, gelangen Antigen-präsentierende Zellen (APC) an Entzündungsorte. Um zu untersuchen, ob Nukleotide chemotaktische Wirkungen auf PDC haben, wurden die – nach Isolation über Nacht ohne Stimuli (lediglich mit IL-3 10 ng/ml) inkubierten – plasmazytoiden dendritischen Zellen in einem Chemotaxis-Assay untersucht. Wie in Abbildung 5 gezeigt, besitzt ATP einen dosis-abhängigen, UTP im Gegensatz dazu keinen chemotaktischen Effekt auf unstimulierte plasmazytoide dendritische Zellen.



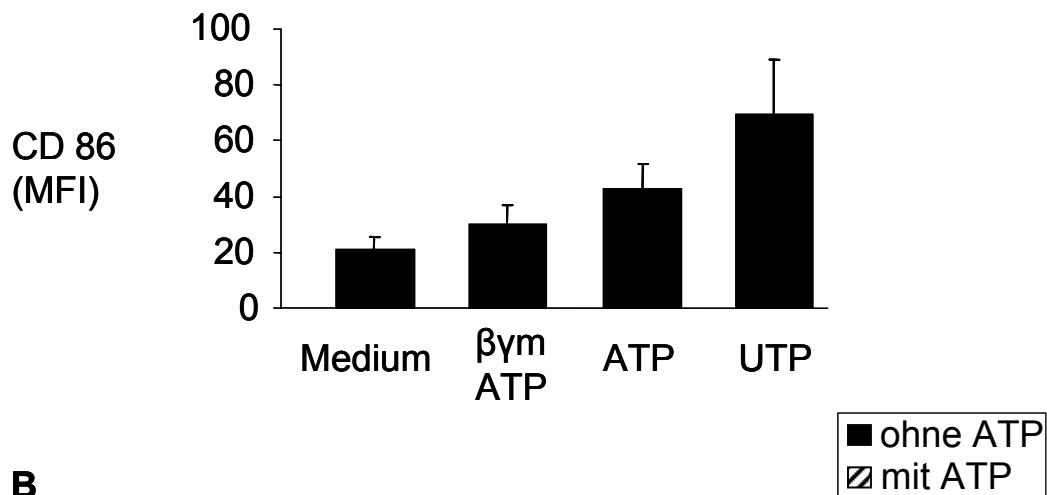
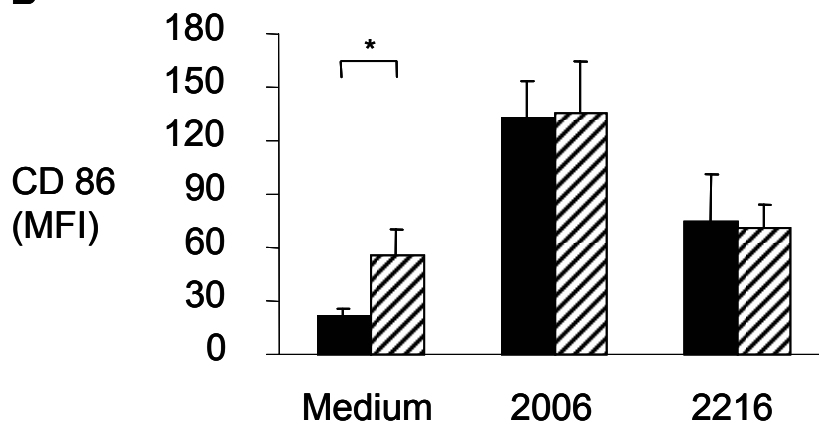
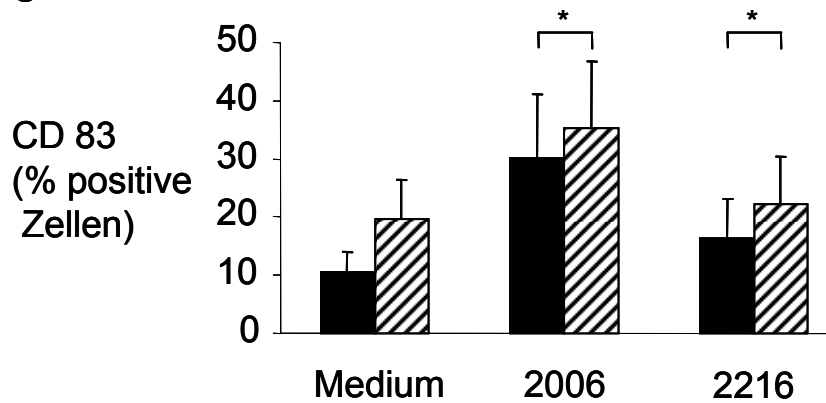
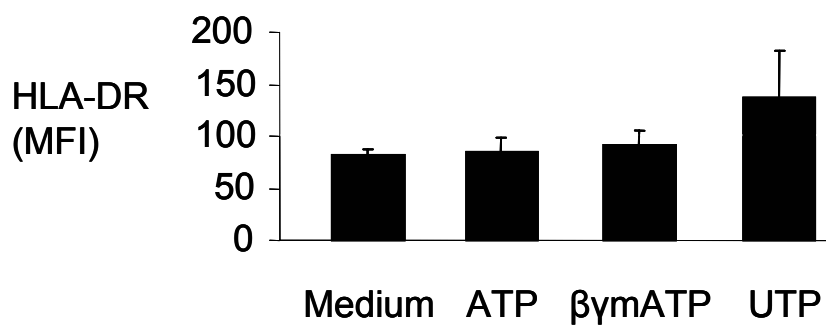
**Abb. 5: ATP übt einen dosisabhängigen chemotaktischen Effekt auf PDC aus.**  $1 \times 10^4$  der lediglich mit IL-3 (10 ng/ml) über Nacht inkubierten PDC wurden in die oberen Kammern, die Nukleotide ATP respektive UTP in den angegebenen Konzentrationen in die durch eine Membran getrennten unteren Kammern einer Chemotaxis-Transwell-Platte gegeben. Nach 2 h bei 37 °C wurden die in die unteren Kammern gewanderten Zellen gezählt. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten + SEM.

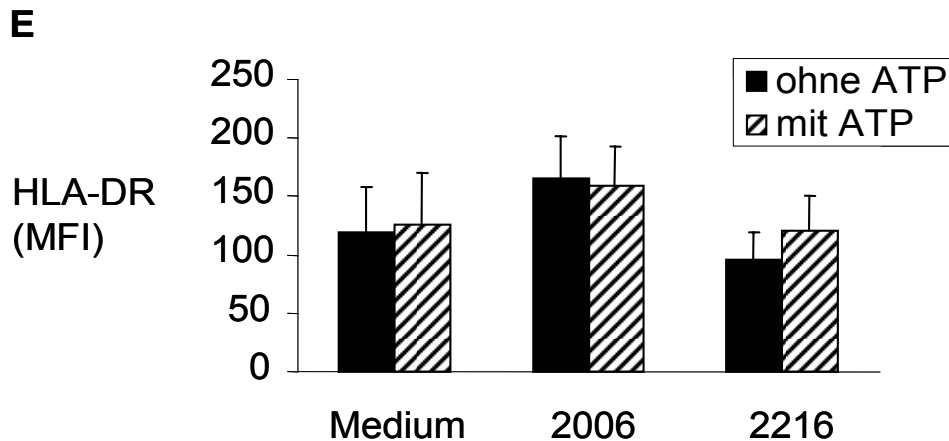
### 3.4 ATP erhöht partiell kostimulatorische Moleküle auf plasmazytoiden dendritischen Zellen

Die Stimulierung über den T-Zellrezeptor reicht alleine nicht aus, um naive T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung anzuregen. Dazu werden zusätzliche kostimulatorische Signale benötigt. Die am besten charakterisierten kostimulatorischen Moleküle auf den Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen sind CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2). Die Expression dieser Moleküle entscheidet, ob es zu einer Immunreaktion oder zur Toleranz kommt. Diese kostimulatorischen Signale stehen unter der Kontrolle von Gefahrensignalisierenden (*danger signal*) Rezeptoren wie z.B. den TLR. Daher wurde untersucht, wie diese kostimulatorischen Moleküle durch P2-Agonisten beeinflusst werden, und inwiefern der Reifezustand der PDC dabei eine Rolle spielt.

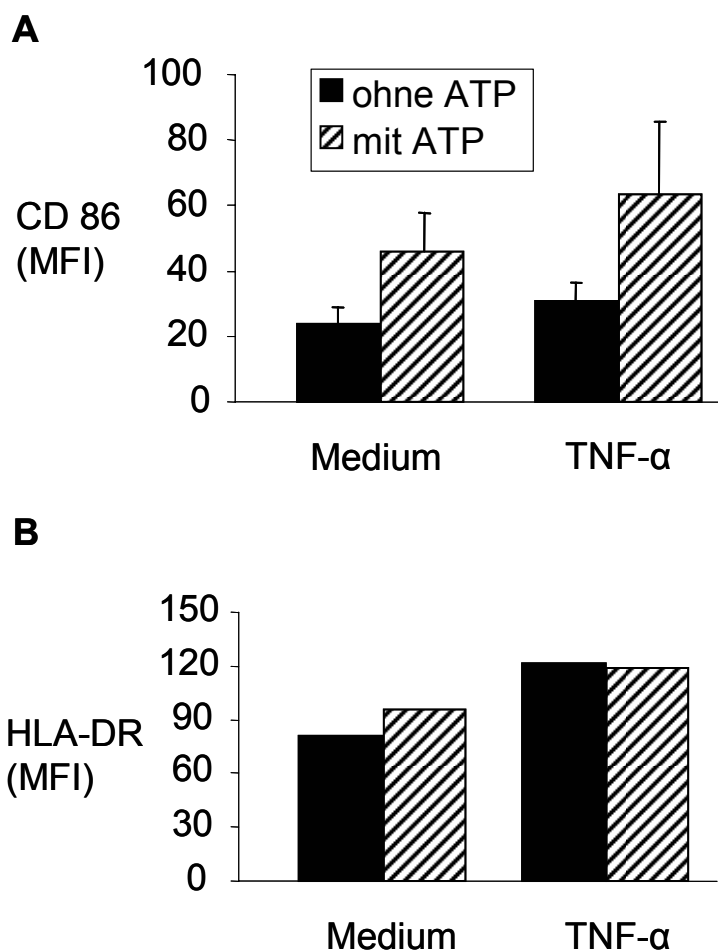
Ferner wurde mit dem Ziel, die auf PDC aktiven P2-Rezeptoren zu identifizieren, der Effekt von ATP mit dem von UTP und  $\beta\gamma$ ATP auf die Expression von CD86 sowie der Reifemarker HLA-DR (MHC II) und CD83 verglichen. UTP und  $\beta\gamma$ ATP unterscheiden sich – wie in der Einleitung beschrieben – von ATP zum Teil in der Affinität zu den verschiedenen P2-Rezeptoren. Die PDC wurden zusammen mit Nukleotiden bzw. zusätzlich mit den Oligonukleotiden CpG ODN 2006/2216 (3  $\mu$ g/ml) inkubiert, anschließend wurde die Expression der Oberflächenmarker fluoreszenzzytometrisch bestimmt.

ATP alleine führte zu einer Hochregulation von CD86 (siehe Abb. 6B). Hinsichtlich einer erhöhten Regulation des kostimulatorischen Moleküls CD 86 zeigte sich UTP am stärksten,  $\beta\gamma$ ATP am schwächsten (siehe Abb. 6A). Der Reifemarker CD83 wurde durch ATP vermehrt exprimiert. Eine Veränderung der HLA-DR Expression (MHC II) durch ATP oder  $\beta\gamma$ ATP alleine ist nicht beobachtet worden; durch UTP wurde HLA-DR hochreguliert (siehe Abb. 6D). Auf CpG ODN 2006 bzw. 2216 aktivierten plasmazytoiden dendritischen Zellen kam es durch ATP – außer zu einer erhöhten CD83-Expression – zu keiner erkennbaren Veränderung. Anders als bei humanen Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen (MonoDC) berichtet, wurde kein Synergismus von TNF- $\alpha$  und ATP hinsichtlich der Expression von CD86 und HLA-DR gefunden; bei CD86 fand sich lediglich ein leicht additiver Effekt (siehe Abb. 7).

**A****B****C****D**



**Abb. 6: ATP beeinflusst die Expression der Aktivitätsmarker CD86, CD83 und HLA-DR auf PDC.** PDC wurden mit ATP,  $\beta$ ymATP, UTP (jeweils 250  $\mu$ M), CpG ODN 2006, CpG ODN 2216 (jeweils 3  $\mu$ g/ml) oder der Kombination aus ATP und CpG ODN 2006/2216 stimuliert. Nach 48 h wurde die Expression von CD86 (n=5) (A-B), CD83 (n=4) (C) und HLA-DR (n=5) (D-E) durchflusszytometrisch bestimmt und als MFI-Werte bzw. als % positive Zellen + SEM dargestellt. \*  $p < 0,05$  (Student t-test).

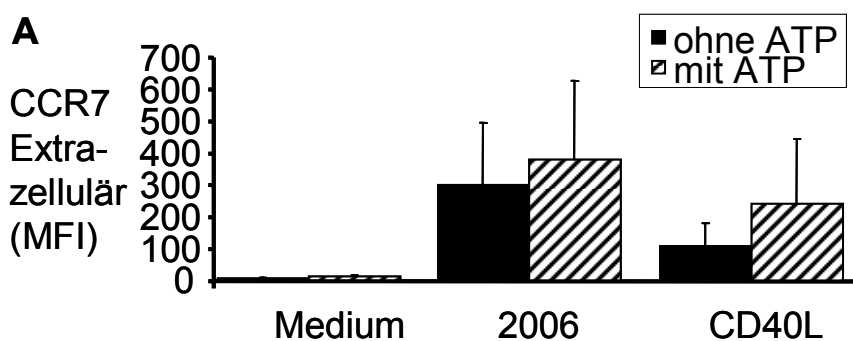


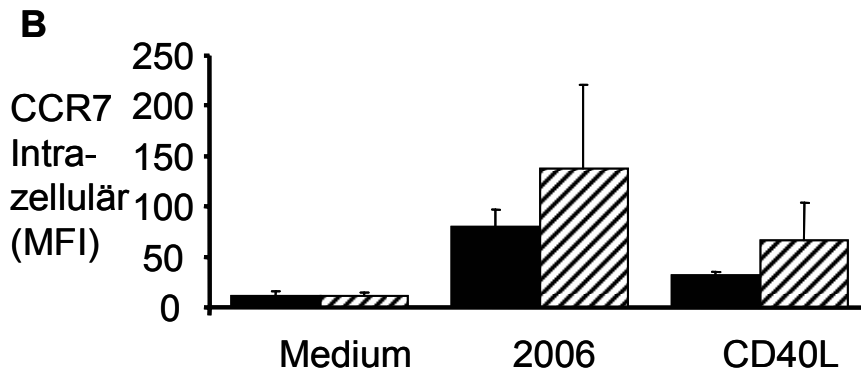
**Abb. 7: ATP zeigt keinen Synergismus von TNF- $\alpha$  und ATP hinsichtlich der Expression von CD86 und HLA-DR.** PDC wurden mit ATP (250  $\mu$ M), TNF- $\alpha$  (1000 U/ml) oder der Kombination aus ATP und TNF- $\alpha$  stimuliert. Nach 48 h wurde die Expression von CD86 (n=3) (A) und HLA-DR (n=3) (B) durchflusszytometrisch bestimmt und als MFI-Werte + SEM dargestellt.

### 3.5 ATP erhöht die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 auf stimulierten plasmazytoiden dendritischen Zellen

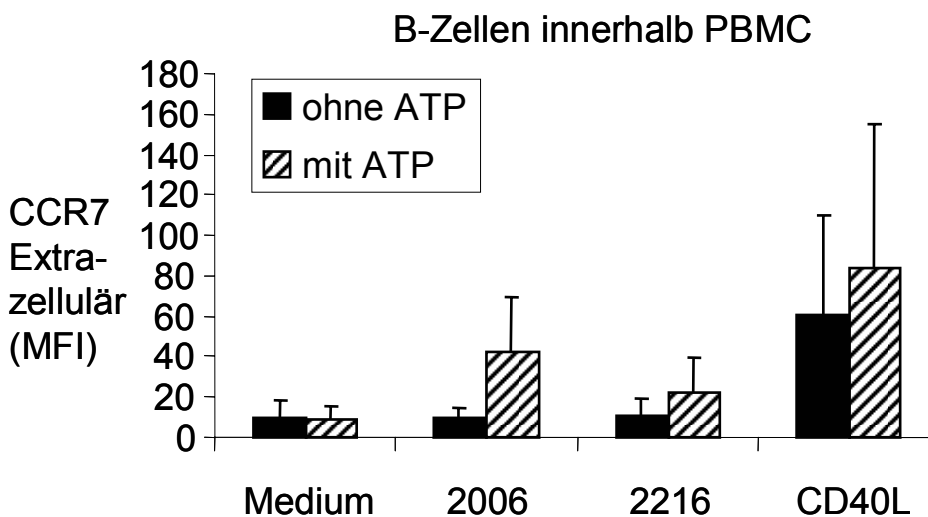
Nach Stimulation in peripheren Geweben regulieren Antigen-präsentierende Zellen, wie die dendritischen Zellen, Rezeptoren für lymphoide Chemokine hoch, um von peripheren Orten, an denen es zur Antigenaufnahme gekommen ist, in die Lymphknoten zu gelangen. Der Chemokinrezeptor CCR7, der die Chemokine CCL19/ELC (*macrophage inflammatory protein-3 $\beta$*  [MIP-3 $\beta$ ]) und CCL21/SLC (6CKine) erkennt, ist für diesen Vorgang essentiell. Er dient somit auch als Aktivierungsmarker für dendritische Zellen. Seine Expression wurde durchflusszytometrisch auf plasmazytoiden dendritischen Zellen untersucht, welche für 24 h mit CpG ODN 2006, CpG ODN 2216 (jeweils 3  $\mu$ g/ml) oder CD40L aktiviert worden waren (siehe Abb. 8). Das Oberflächenprotein CD40L wird von T-Helferzellen exprimiert und kann durch Bindung an den entsprechenden Rezeptor Antigen-präsentierende Zellen aktivieren. CD40L wird hier modellhaft für die Interaktion von T- und Antigen-präsentierenden Zellen verwendet.

Die Experimente zeigten, dass ATP alleine zu keinen Veränderungen der CCR7-Expression führt. Allerdings wurde eine durch die Aktivierung mit CpG ODN 2006, CpG ODN 2216 oder CD40L erhöhte CCR7-Expression auf plasmazytoiden dendritischen Zellen nochmals zusätzlich durch ATP verstärkt. Um zu untersuchen, ob ATP (wie auch für andere Substanzen aus der Literatur bekannt) möglicherweise zu einer Oberflächenexpression bereits synthetisierter, noch intrazellulär lokalisierter CCR7-Rezeptorproteine führt, wurde auch eine intrazelluläre Messung dieser Rezeptorklasse durchgeführt. Dies zeigte ein zur extrazellulären Bestimmung analoges Muster. Interessanterweise verhielt sich die ATP-induzierte CCR7-Rezeptorexpression auf B-Zellen, die innerhalb von mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) in gleicher Weise stimuliert worden waren, entsprechend (siehe Abb. 9).





**Abb. 8: Auf stimulierten PDC führt ATP zu einer zusätzlichen Erhöhung der Expression des Chemokinrezeptors CCR7.** PDC wurden mit ATP (250  $\mu$ M), CpG ODN 2006 (3  $\mu$ g/ml), CD40L (im Verhältnis 1:10) oder einer Kombination von ATP und CpG ODN 2006 bzw. CD40L für 24 h inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch auf die Expression des CCR7-Rezeptors hin sowohl extra- (A) als auch intrazellulär (B) untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte von jeweils drei unabhängigen Experimenten + SEM.



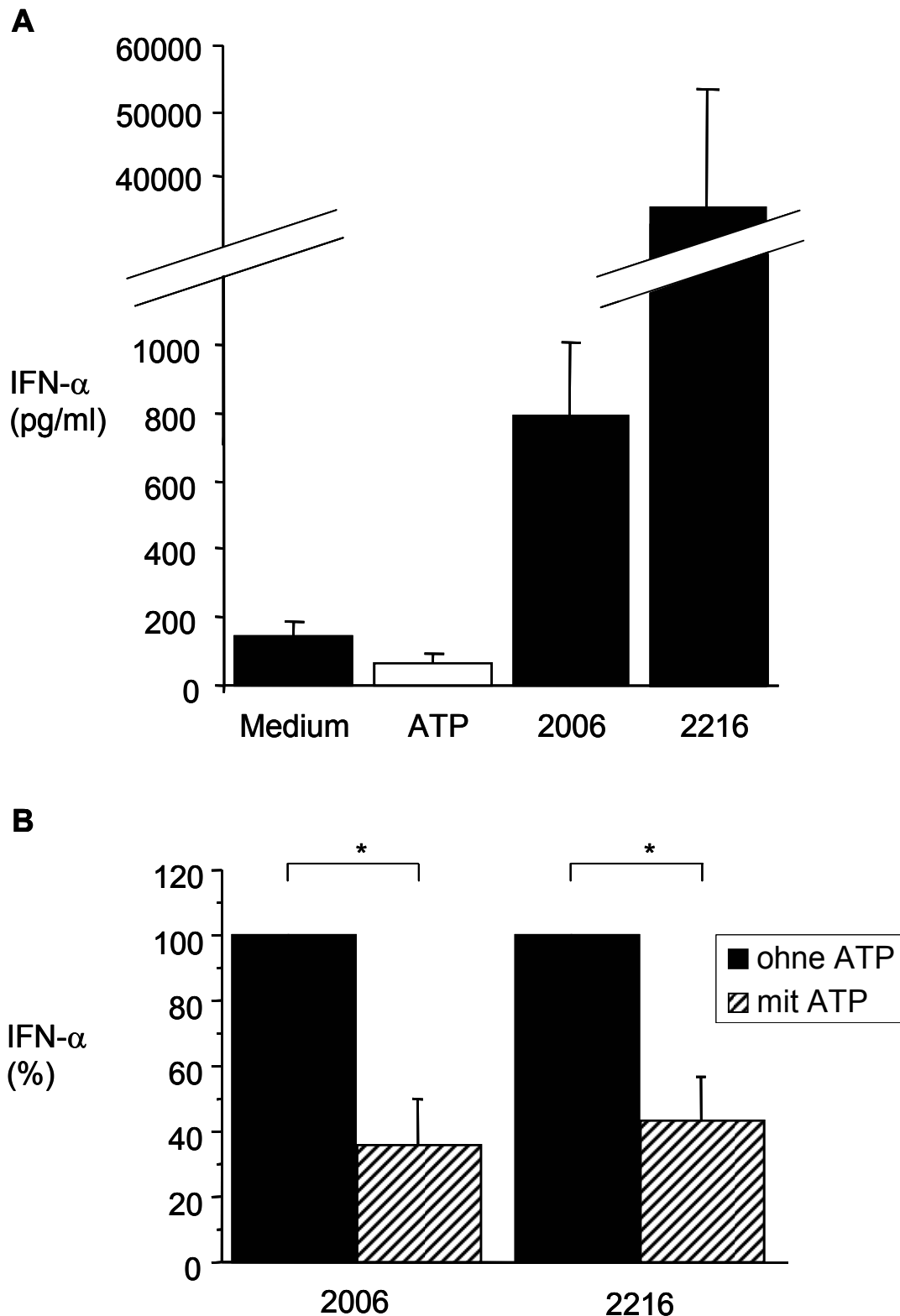
**Abb. 9: Die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 auf stimulierten B-Zellen wird durch ATP verstärkt.** Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) mit ATP (250  $\mu$ M) erhöht die Oberflächenexpression des Chemokinrezeptors CCR7 auf B-Zellen (CD19-positive Zellen) bei simultaner Aktivierung mit CpG ODN 2006, CpG ODN 2216 (jeweils 3  $\mu$ g/ml) oder mit CD40L-transfizierten Zellen (im Verhältnis 1:10). Gezeigt sind die Mittelwerte von jeweils drei unabhängigen Experimenten + SEM.

### 3.6 Die Sekretion von IFN- $\alpha$ und IL-12 aktivierter plasmazytoider dendritischer Zellen wird durch ATP reduziert

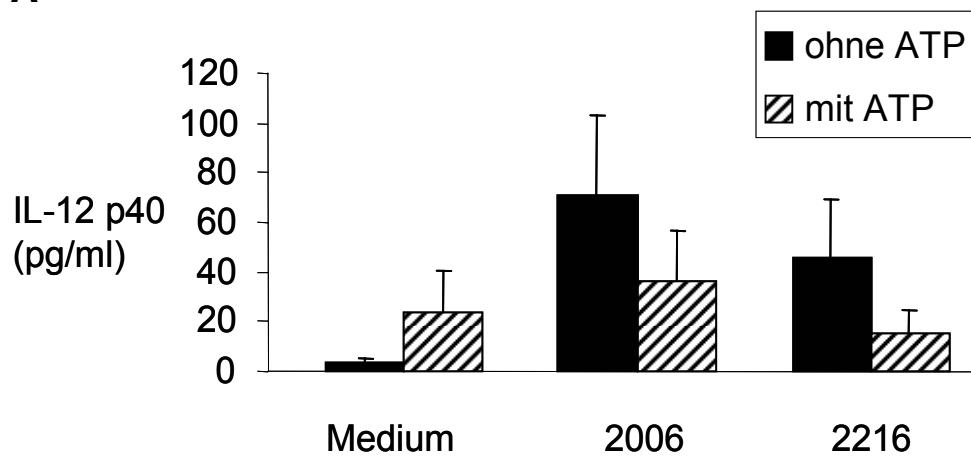
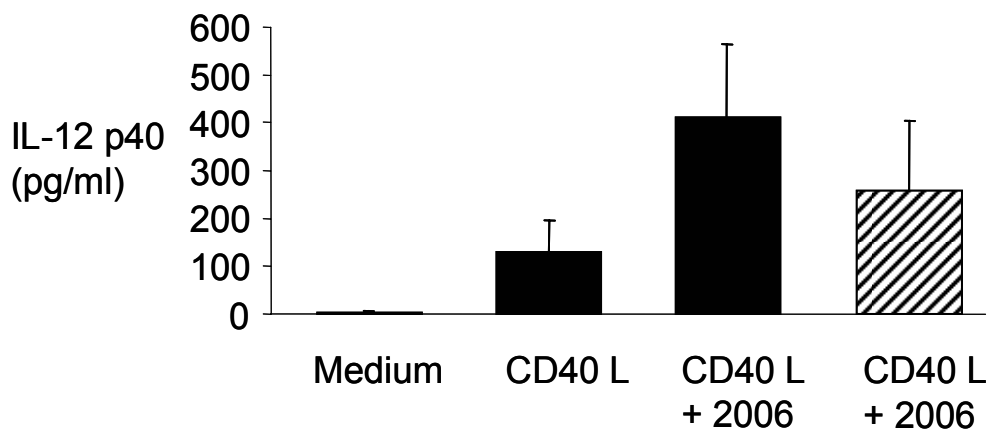
Plasmazytoide dendritische Zellen zeichnen sich durch die Eigenschaft aus, große Mengen an Typ I Interferonen als Reaktion auf *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) oder auf Infektionen hin zu produzieren. Werden diese Zellen mit CD40L und

CpG-ODN aktiviert, sezernieren sie als ein weiteres Merkmal IL-12, welches eine T<sub>H</sub>1-Immunantwort induzieren kann. Demnach untersuchten wir den Einfluss von ATP auf unreife plasmazytoide dendritische Zellen und auf solche, die für 48 h mit CpG 2006, CpG 2216 oder CD40L stimuliert worden waren. Der Gehalt der Zytokine IFN- $\alpha$  und IL-12 p40 wurde im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Die Sekretion sowohl von IFN- $\alpha$  (siehe Abb. 10) als auch von IL-12 p40 (siehe Abb. 11) durch aktivierte (CpG 2006 und CpG 2216) Zellen wurde durch ATP reduziert. CD40L und CpG 2006 hatten zusammen einen leicht additiven Effekt auf die IL12 p40- Produktion von plasmazytoiden dendritischen Zellen, welcher durch ATP reduziert werden konnte. ATP führte zu einer minimalen Reduktion der basalen IFN- $\alpha$ -Produktion, die Sekretion von IL-12 p40 hingegen wurde im Vergleich zur Mediumkontrolle etwas gesteigert.





**Abb. 10: Die IFN- $\alpha$ -Sekretion CpG-ODN aktivierter PDC wird durch ATP reduziert.** PDC wurden mit ATP (250  $\mu$ M), CpG 2006/2216 (3  $\mu$ g/ml) oder der Kombination aus ATP und CpG 2006/2216 inkubiert. Nach 48 h wurde die Konzentration von IFN- $\alpha$  in den Überständen bestimmt (**A**). In Abbildung **B** wurden die Konzentrationswerte der CpG ODN stimulierten PDC auf 100 % normiert und die Inhibition durch ATP als Prozent vom Ausgangswert angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten + SEM.

**A****B**

**Abb. 11: Die IL-12 p40-Sekretion CpG-ODN- bzw. CpG-ODN und CD40L-aktivierter PDC wird durch ATP reduziert.** PDC wurden mit ATP (250  $\mu$ M), CpG 2006/2216 (3  $\mu$ g/ml) (A), CD40L-transfizierten Zellen (im Verhältnis 1:10) oder einer Kombination aus diesen (B) inkubiert. Nach 48 h wurde die Konzentration von IL-12 p40 in den Überständen bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten + SEM.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Übersicht über die experimentellen Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden die Effekte von ATP, UTP und ATP-Derivaten auf humane plasmazytoide dendritische Zellen analysiert. Dazu wurden die Expression von P2-Rezeptoren auf diesen Zellen, deren Funktionalität sowie die Effekte der extrazellulären Nukleotide auf Phänotyp, Chemotaxis und Zytokinproduktion untersucht.

Plasmazytoide dendritische Zellen exprimieren alle bislang bekannten P2-Rezeptoren. Lediglich der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor schien auf aktivierten plasmazytoiden dendritischen Zellen zu fehlen. Die Stimulation mit extrazellulären Nukleotiden induzierte eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration. Reife Zellen wiesen einen niedrigeren Anstieg der Kalziumionenkonzentration nach Stimulation mit ATP auf. Durch die Verwendung von Suramin, eines P2-Rezeptor-Antagonisten, konnte der Effekt des ATP reduziert werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Wirkung von ATP in der Tat über P2-Rezeptoren vermittelt wird, und die beobachteten Effekte nicht unspezifischer Natur sind. Die Stimulierung plasmazytoider dendritischer Zellen mit extrazellulären Nukleotiden führte zu einer partiellen Hochregulation kostimulatorischer Moleküle, Reifemarker und MHC II-Moleküle. Sowohl auf aktivierten plasmazytoiden dendritischen Zellen als auch auf aktivierten B-Zellen innerhalb von mononukleären Zellen des peripheren Blutes kam es durch ATP zu einer erhöhten Expression des Chemokinrezeptors CCR7. ATP übte einen dosisabhängigen chemotaktischen Effekt auf unstimulierte plasmazytoide dendritische Zellen aus. Des Weiteren reduzierte die Inkubation mit ATP die Synthese der Zytokine IL-12 und IFN- $\alpha$  durch aktivierte plasmazytoide dendritische Zellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine wichtige immunmodulierende Rolle der extrazellulären Nukleotide in Gebieten mit Zellschäden oder Entzündung hin: Sie „locken“ plasmazytoide dendritische Zellen an diese Orte, regulieren zum einen deren inflammatorisches Potential herunter, zum anderen deren T-Zell-aktivierende Fähigkeit hoch und fördern deren Migration in die sekundären Lymphknoten.

## **4.2 Ergebnisinterpretation vor dem Hintergrund aktueller Literatur**

### **4.2.1 Vorkommen von ATP**

ATP liegt im Zytosol lebender Zellen in einer Konzentration von 5-10 mM, in manchen Zellkompartimenten bis zu 100 mM vor, im extrazellulären Raum hingegen nur im nanomolaren Bereich. Unter anderem bei Zellmembranschäden und Zelluntergang verschiedener Ursachen kann die extrazelluläre Konzentration in den mikromolaren Bereich ansteigen (Di Virgilio, 2000; la Sala, 2003). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Konzentrationen zwischen 100 und 250  $\mu$ M sind demnach als Modell einer solchen ATP-Exposition zu rechtfertigen und auch in vorhergehenden Untersuchungen in dieser Höhe eingesetzt worden (Hsu, 2001; la Sala, 2002; Schnurr, 2000; Schnurr, 2003).

### **4.2.2 Isolierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen**

Zur Isolierung der PDC ist das BDCA-4-Kit eingesetzt worden. Die Bindung des dabei verwendeten Antikörpers gegen BDCA-4, einem spezifischen Marker auf PDC, hat keine bekannte Beeinflussung dieser Zellen zur Folge (Dzionek, 2002). PDC sind eine zahlenmäßig geringe Population der Blutzellen (weniger 0,1 % der PBMC). Bei der Isolierung dieser Zellen konnten Reinheiten von über 90 % erzielt werden, so dass man davon ausgehen kann, dass die beobachteten Effekte durch direkte Wirkung auf PDC verursacht wurden.

### **4.2.3 Chemotaxis plasmazytoider dendritischer Zellen**

Dendritische Zellen nehmen eine wichtige Rolle bei der Interaktion von angeborenem und erworbenem Immunsystem ein. Sie zirkulieren in unreifer Form im Blut oder finden sich in peripheren Geweben, gelangen in Gebiete von Zellschäden, Entzündung oder Infektion, reifen dort durch verschiedene Stimuli induziert und wandern anschließend in das Lymphgewebe ein. Dort interagieren sie mit Zellen des adaptiven Immunsystems, wodurch eine spezifische Immunantwort induziert werden kann. Dabei ist die Steuerung der Migration und der Lokalisation in Blut und Gewebe sowie die Steuerung der Ko-Lokalisation mit anderen Zellen für die Funktionsfähigkeit dieser Antigen-präsentierenden Zellen von entscheidender Bedeutung.

Der durch Reifung verursachte Wechsel der Expression von inflammatorischen (in das Entzündungsgebiet lockenden) zu lymphoiden (in das Lymphgewebe lockenden) Chemokinrezeptoren ist auf PDC wie auch auf MonoDC beobachtet worden (Dieu, 1998; Salusto, 1998; Sozzani, 1998). Trotz der Expression mehrerer Chemokinrezeptoren (z.B. CCR2, CCR5, CXCR3) wandern unreife PDC allerdings nicht auf deren (zumeist inflammatorische) Liganden, sondern lediglich auf CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ) hin; jedoch ist auch ein Synergismus von SDF und inflammatorischen Chemokinen beschrieben worden (Penna, 2001; Vanbervliet, 2003). Diese Entkopplung von Expression der Chemokinrezeptoren einerseits und Migrationsverhalten andererseits, wie auch bei anderen Immunzellen beobachtet, ist als immunmodulierender Mechanismus zur Limitierung entzündlicher Reaktionen interpretiert worden (D'Amico, 2000; Penna, 2002). Denkbar ist auch, dass es durch bestimmte Stimuli induziert, wieder zu einer Kopplung von (noch) nicht-funktionalen, inflammatorischen Chemokinrezeptoren an eine dann effektive Migration der PDC in entzündliches Gewebe kommen könnte. Wie in der Einleitung erwähnt, wurde in der Literatur das Vorkommen von PDC in Entzündungsgebieten beschrieben (siehe Kapitel 1.2.2.3).

Es stellt sich somit die Frage, durch welche anderen chemotaktisch aktiven Stoffe die PDC noch in die Lage gebracht werden könnten, in entzündliche Gebiete zu gelangen. Die Beobachtung, dass humane Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen (MonoDC) ihre Dendriten und Zellform auf einen Gradienten von ATP hin ausrichten, lieferte erste Hinweise darauf, dass extrazelluläre Nukleotide einen chemotaktischen Effekt auf dendritische Zellen haben könnten (Liu, 1999). La Sala et al. zeigten dann, dass durch Inkubation mit ATP die Expression lymphoider Chemokinrezeptoren wie CXCR4 und CCR7 auf unreifen und reifen MonoDC hochreguliert, die des inflammatorischen Rezeptors CCR5 herunterreguliert wird, was mit einem dazu analogen Migrationsverhalten auf die entsprechenden Liganden korrelierte (la Sala, 2002). ATP selbst hat nur auf unreife, nicht aber auf reife MonoDC eine chemotaktische Wirkung – allerdings schon in 1000-fach niedrigeren Konzentrationen als für einen Reifungs-induzierenden Effekt benötigt werden (Idzko, 2002). MonoDC, einem simultanen Gradienten aus ATP und den Chemokinen CXCL12, CCL19 und CC21 ausgesetzt, erfahren eine dosisabhängige Inhibition der Chemokin-gesteuerten Migration, anders als bei PDC, deren Migration dadurch unbehelligt blieb (Schnurr, 2003). Die Ergebnisse, die anhand von Untersuchungen an MonoDC gewonnen wurden, lassen sich nur begrenzt auf die PDC übertragen.

Trotz des weitgehend ähnlichen Chemokinrezeptor-Musters auf mRNA-Ebene (in einem Vergleich von MDC und PDC) unterscheiden sich PDC und dendritische Zellen myeloiden Ursprungs sowohl im Muster der von ihnen sezernierten Chemokine als auch in ihrem

Migrationsverhalten. PDC produzieren vornehmlich inflammatorische, wandern aber fast ausschließlich auf lymphoide Chemokine hin. Bei der myeloiden Reihe ist dies mit deutlichem Ansprechen auf inflammatorische Chemokine genau umgekehrt (Penna, 2001; Penna, 2002). Darüber hinaus sind MonoDC, CD1a<sup>+</sup> dermale DC und CD1c<sup>+</sup> PBDC, drei Subtypen dendritischer Zellen mit myeloiden Markern, 50-100 Mal sensitiver auf ATP als IL3R<sup>+</sup> PDC, gemessen an der Induktion von intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentrations-Anstiegen (Schnurr, 2003). Des Weiteren bedürfen MonoDC – anders als PDC – noch einer zusätzlichen Stimulation (z.B. durch Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)-enthaltene Stimuli oder auch durch ATP), um ihre volle Migrationsfähigkeit auf die Chemokine CXCL12 und CCL19 hin zu erhalten (la Sala, 2002; Luft, 2002; Scandella, 2002; Schnurr, 2003).

Den hier vorliegenden und ferner in der Literatur beschriebenen Ergebnissen nach wirkt ATP allerdings sowohl auf unreife PDC als auch auf unreife MonoDC dosisabhängig chemotaktisch, UTP hingegen scheint lediglich bei MonoDC eine, wenn auch schwächere Wirkung zu haben (Idzko, 2002).

ATP kann indirekt auch über seine Abbauprodukte Einfluss auf dendritische Zellen – insbesondere auch auf deren Migrationsverhalten – nehmen. So kann Adenosin durch die Enzyme Ecto-Apyrase und 5'-Nukleotidase aus ATP, ADP und AMP entstehen (siehe Kapitel 1.3.3). Adenosin besitzt ein breites „Wirkenspektrum“ auf PDC (Panther, 2003; Panther, 2001). Schnurr et al. zeigten, dass Adenosin bereits im niedrigst-mikromolaren Bereich chemotaktisch auf unreife PDC wirkt (Schnurr, 2004).

#### **4.2.4 Expression von Oberflächenmarkern und Chemokinrezeptoren auf plasmazytoiden dendritischen Zellen**

Aktivierte PDC exprimieren verstärkt MHC-Moleküle der Klasse II (HLA-DR) und kostimulatorische Moleküle, welche zur effektiven Stimulierung von T-Zellen benötigt werden.

In dieser Untersuchung erhöhte ATP die CD86 Expression, allerdings nicht zusätzlich auf bereits aktivierten PDC. Die Expression von HLA-DR/MHCII wurde durch ATP nicht verändert. Bei vorbestehender Aktivierung führte ATP zu einer vermehrten Expression von CD83. Diese hier beschriebene partielle Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen stimmt teilweise mit Beobachtungen bei MonoDC überein. Ein bei MonoDC beobachteter Synergismus von ATP und TNF- $\alpha$  bei der Aktivierung konnte hier für PDC bei nur geringer Wirkung von TNF- $\alpha$  nicht beobachtet werden. UTP scheint anders als bei MonoDC – zumindest CD86 und MHCII betreffend – eine stärker aktivierende Wirkung als ATP auf

PDC zu haben (Berchtold, 1999; la Sala, 2001; la Sala, 2002; Schnurr, 2000; Wilkin, 2002). Dies könnte auf unterschiedlich verantwortliche P2-Rezeptoren auf diesen zwei Zelltypen hinweisen (siehe Kapitel 4.2.8).

Konsistent mit der vorhandenen Literatur ist die Beobachtung, dass ATP zu einer verstärkten Expression des Chemokinrezeptors CCR7 auf reifen PDC führt. PGE<sub>2</sub> und andere cAMP-erhöhende Stoffe, zu denen auch die Nukleotide (P2Y-Rezeptoren) gehören, regulieren unter anderem die Expression der Chemokinrezeptoren (CCR7) und die Chemotaxis von MonoDC (la Sala, 2002; Luft, 2002; Scandella, 2002). Wir spekulierten, dass es über die Aktivierung der P2Y-Rezeptoren durch ATP und der damit verbundenen Erhöhung von cAMP (siehe Kapitel 1.3.1.2) zu einer Externalisierung vorgefertigter, intrazellulär lokalisierter CCR7-Rezeptoren und deren Lokalisierung in die Zellmembran kommen könnte, wie für CXCR3 in T-Zellen vorbeschrieben (Gasser, 2006). Die Ergebnisse der intrazellulären CCR7-Bestimmung, die keine zur Erhöhung der CCR7-Expression an der Zelloberfläche reziproke intrazelluläre Abnahme gezeigt hatten, haben diese Hypothese nicht unterstützt. Es ist trotzdem denkbar, dass intrazellulär soviel CCR7-Rezeptoren „im Überschuss“ produziert werden, und somit möglicherweise eine „reziproke“ Abnahme der Rezeptoren intrazellulär (durch Lokalisation der Rezeptoren an die Zelloberfläche) nicht messbar ist. Der Transport der Rezeptoren an die Zelloberfläche bliebe somit der limitierende Schritt. Welche Mechanismen nun genau dafür verantwortlich sind, dass ATP zwar nicht alleine, aber auf bereits aktivierten PDC diesen Chemokinrezeptor hochreguliert, ist nicht geklärt. Kürzlich wurde gezeigt, dass MonoDC für eine effektive Chemokin-induzierte Migration PGE<sub>2</sub> benötigen, um den Rezeptor CCR7 an seine Signaltransduktions-Wege zu koppeln (Scandella, 2004). Dies gilt für PDC vermutlich nicht, da diese auch ohne PGE<sub>2</sub> oder andere cAMP-erhöhende Stoffe effektiv auf CCR7-Liganden hin wandern (Schnurr, 2003).

ATP führte zu einer Erhöhung der Expression von CCR7 auf simultan mit CpG ODN- bzw. CD40L-stimulierten B-Zellen innerhalb von PMBC. Vorläufige Experimente mit isolierten B-Zellen haben jedoch keine Wirkung von ATP auf die CCR7-Expression von B-Zellen gezeigt (Daten nicht gezeigt). Der beobachtete Effekt könnte daher durch direkte (Di Virgilio, 2001), aber auch durch indirekte ATP-Effekte (Swennen, 2005) auf diese Lymphozytenpopulation vermittelt sein.

#### 4.2.5 IL-12-Zytokin-Produktion plasmazytoider dendritischer Zellen

Die IL-12 Zytokinfamilie nimmt eine wichtige Rolle bei der Steuerung (*orchestration*) von angeborenem und erworbenem Immunsystem durch die dendritischen Zellen ein, insbesondere bei der Abwehr intrazellulärer Pathogene (Gately, 1998).

Die hier beschriebene Hemmung der IL-12 p40 Sekretion aktivierter PDC durch ATP könnte als Schutzmechanismus vor einer überschießenden Zytokinproduktion und dessen negativen Folgen (z.B. im Rahmen einer exzessiven T-Zell-Aktivierung) interpretiert werden und ferner eine Immunreaktion in Richtung T<sub>H</sub>2-Antwort fördern. Allerdings sollte erwähnt werden, dass durch CpG alleine ohne CD40L nur geringe Mengen an IL-12 p40 induziert werden und der auch in diesem Fall beobachtete inhibitorische Effekt von ATP eingeschränkt beurteilbar ist.

Bei MonoDC ist in der Literatur die Wirkung von ATP auf die IL-12-Sekretion initial kontrovers gesehen worden. So wurde dort zum einen ein Synergismus von TNF- $\alpha$  und ATP bei der Sekretion von IL-12 und der Reifung dieser Zellen beschrieben und somit eine Förderung einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort angenommen (Schnurr, 2000; Wilkin, 2001). Eine andere Gruppe bestätigte zwar die Reifungsinduktion durch ATP, fand aber einen inhibitorischen Effekt dieses Nukleotids auf die IL-12-Produktion aktivierter MonoDC und schloss somit auf eine Förderung einer T<sub>H</sub>2-Immunantwort (la Sala, 2001). Diese Diskrepanz erklärt sich aus der jeweils unterschiedlichen Art der IL-12-Bestimmung und der Stimulationsstärke (Wilkin, 2002): In Synergismus mit TNF- $\alpha$  führt ATP zu einer Hochregulation der IL-12 p40-Expression/Sekretion, inhibiert aber die IL-12 p70-Produktion in LPS- oder CD40L-aktivierten MonoDC. Bislang wurde dabei das Heterodimer IL-12 p70 – bestehend aus einer p35-Untereinheit (IL-12p35) und einer p40-Untereinheit (IL-12 p40) – als die biologisch aktive Form angesehen.

Ferner spielen auch noch Art und Konzentration sowie die Kinetik der Stimulation eine entscheidende Rolle: Werden MonoDC so durch LPS bzw. CD40L aktiviert, dass nur niedrige Mengen an IL-12 p40 produziert werden, dann hat ATP einen potenzierenden Effekt auf die Produktion und Expression dieses Zytokins. Umgekehrt hat ATP einen inhibierenden Effekt, wenn MonoDC so aktiviert werden, dass höhere Mengen an IL-12 p40 produziert werden (Wilkin, 2002).

Wurde das abbaustabile ATP-Derivat Adenosin-5'-O-(3-thio)triphosphat (ATP $\gamma$ S) in niedriger Konzentration (100  $\mu$ M) eingesetzt, ist allerdings jüngsten Untersuchungen zu Folge – unabhängig von der LPS-Konzentration – immer eine Hemmung beobachtet worden



(Marteau, 2004). Nach Stimulation mit *E. coli* kam es zu einem initialen Anstieg, nach 48 h allerdings zu einem Rückgang auf die Ausgangswerte der Expression von IL-12 p40-mRNA. Einen analogen Verlauf mit allerdings zusätzlich erhöhtem Anstieg zeigte sich bei gleichzeitiger Gabe von ATP und *E. coli* (Marteau, 2004; Schnurr, 2005; Wilkin, 2002). Zu erwähnen ist ferner, dass Nukleotid-Diphosphonate wie ADP die IL-12 p40-Produktion von MonoDC inhibieren (Ia Sala, 2001; Marteau, 2004).

Bei den PDC führte ATP zu einer Inhibition der IL-12 p40 Produktion aktivierter Zellen, bei der Gabe von ATP alleine jedoch zu einer Steigerung der Basis IL-12-Produktion. Analog zu den Beobachtungen bei den MonoDC könnte auch bei PDC die Wirkung des ATP von der Höhe der IL-12-Produktion aktivierter Zellen abhängig sein (dosisabhängig entweder potenzierend oder inhibierend).

Eine womöglich entscheidendere Rolle als die Menge an IL-12 könnte der Stimulus bzw. der Signalweg spielen, durch den die dendritische Zelle aktiviert wird. LPS (via *TLR4*), CpG-ODN (via *TLR9*) und CD40L (via *CD40*) vermitteln ihre Wirkungen auf APC über jeweils unterschiedliche Signalwege. So scheint die Art des Stimulus zumindest bei MonoDC einen Einfluss auf das Profil der Zytokinproduktion zu haben, wie Experimente mit kompletten Bakterien und CD40L/TLR-Liganden gezeigt haben (Schnurr, 2005).

Ferner könnten die unterschiedlichen Stimuli mit ihren jeweiligen, distinktiven Rezeptoren (in unserer Untersuchung CpG ODN und TLR 9), aber ebenso gut auch andere unterschiedliche Eigenschaften dieser zwei dendritischen Zellpopulationen Ursache für die teils gegensätzlichen Effekte des ATP sein. So sind abweichende Zytokinprofile selbst innerhalb der MonoDC Zellpopulation beobachtet worden, abhängig davon, ob diese mit kompletten Bakterien oder CD40L/TLR-Liganden stimuliert worden waren (Schnurr, 2005) (siehe auch Kapitel 4.2.3 und 4.2.8).

Neben der Bildung von IL 12 p70 durch Verbindung mit der Untereinheit p35 kann die p40-Untereinheit auch mit einer anderen Untereinheit, nämlich mit p19 in Verbindung treten und somit das Interleukin IL-23 bilden (Cordoba-Rodriguez, 2003; Oppmann, 2000). Dieses unterscheidet sich nicht nur im Aufbau, sondern auch in seiner Funktion von IL-12 p70 (Schnurr, 2005; Trinchieri, 2003). Unter anderem hat es keinen Effekt auf naive T-Zellen, aktiviert jedoch T-Gedächtniszellen (*T-memory* Zellen), IFN- $\gamma$  zu sezernieren (Oppmann, 2000). Veränderungen der IL-12 p40-Sekretion könnten so auch einen größeren Einfluss auf das Zytokinprofil der PDC ausüben, indem sie neben IL-12 auch IL-23 beeinflussen.

Unserer Hypothese nach führt die durch ATP reduzierte Menge des „Zytokinbausteins“ IL-12 p40 eher zu einer geringeren Menge an IL-12 p70 sowie möglicherweise auch an IL-23 und somit eventuell zu einer schwächeren T<sub>H</sub>1-Immunantwort.

#### **4.2.6 IFN- $\alpha$ -Zytokin-Produktion plasmazytoider dendritischer Zellen**

Ein Charakteristikum der PDC ist die Fähigkeit, schnell große Mengen an Typ I Interferon (IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ ) als Antwort auf virale Stimuli zu synthetisieren. Neben Viren und Virenbestandteilen sind dabei bislang nur CpG ODN und TLR7-Liganden (wie Imiquimod) als synthetische Stimulatoren identifiziert worden, von denen das Oligonukleotid CpG 2216 (auch als CpG-A ODN bezeichnet) die höchsten IFN- $\alpha$ -Werte induzieren kann (Krug, 2001).

IFN- $\alpha$  zeichnet sich aus durch ein breites Spektrum biologischer Wirkungen auf eine Vielzahl von Immunzellen wie T-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. So besitzt es unter anderem antivirale, Zytotoxizitäts-verstärkende, zum Teil auch Apoptose-fördernde Eigenschaften und fördert die spezifische Antikörperproduktion (Pestka, 2004). Es ist ferner bekannt, dass IFN- $\alpha$  die Regulation einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort beeinflussen kann (Luft, 1998). Es gibt eine Reihe von Erkrankungen, die mit einer ätiopathologischen Rolle des Interferon-I-Systems in Verbindung gebracht werden; dazu gehören Krankheiten wie Diabetes mellitus Typ I, Psoriasis, systemischer Lupus erythematosus (SLE), rheumatoide Arthritis und juvenile Dermatomyositis (Ronnblom, 2002). Interferone werden auch in der Therapie viraler Erkrankungen wie Hepatitiden oder bei der Behandlung von Malignomen und Multipler Sklerose erfolgreich eingesetzt.

Die von uns beobachtete Inhibition/Reduktion CpG ODN-induzierter Sekretion von IFN- $\alpha$  humaner plasmazytoider dendritischer Zellen durch ATP könnte man als eine immunmodulierende Funktion dieses Nukleotids interpretieren. So könnte dies dazu dienen, überschießenden Immunreaktionen – wie sie zum Teil bei Zelluntergang im Rahmen von Autoimmunprozessen bzw. bei Infektionen auftreten – entgegenzuwirken. Überschießend hohe IFN-Spiegel können schwerwiegende systemische Folgen haben, wie sie beispielsweise beim SLE zu beobachten sind (siehe auch Kapitel „Klinische Relevanz der Ergebnisse“). Inwiefern Nukleotide und P2-Rezeptoren bei den Krankheiten von Bedeutung sind, bei denen das Interferon-I-System eine ätiopathologische Rolle spielt, ist bislang noch nicht ausreichend bekannt.

#### 4.2.7 ATP: Gefahrensignal und Immunmodulator

Lange Zeit galt in der Immunologie die Vorstellung, dass das Immunsystem lediglich zwischen körpereigenen und fremden Mustern unterscheidet, Eigenes toleriert und Fremdes attackiert. Dieses so genannte *self-nonself (SNS) model* wurde 1989 durch das *infectious-nonself (INS) model* von Janeway erweitert. Dieses besagt, dass Antigen-präsentierende Zellen *pathogen-associated molecular patterns (PAMP)* über spezielle, *Pattern-recognition*-Rezeptoren erkennen können (Janeway, 1989; Janeway, 1992). Zu den PAMP gehören Lipopolysaccharide (LPS), bakterielle DNA (CpG-DNA) und virale doppelsträngige mRNA.

Transplantat-Abstoßungsreaktionen sowie die Tolerierung des Feten im Mutterleib ließen sich allerdings auch durch dieses Modell nicht hinreichend erklären. 1994 und in den folgenden Jahren bildete sich das so genannte Gefahrenmodell (*danger model*) heraus. Dieses postuliert neben den oben erwähnten exogenen auch endogene Gefahrensignale, welche ruhende APC aktivieren und dadurch Immunreaktionen initiieren (Ibrahim, 1995; Matzinger, 1994; Matzinger, 2002).

Zellen, die durch normale, programmierte Prozesse sterben, werden in der Regel kontrolliert abgebaut und desintegrieren nicht. Zellen, die durch nekrotische Prozesse zugrunde gehen, setzen ihren Inhalt frei; die so freigesetzten intrazellulären Bestandteile können dann als potentielle Gefahrensignale dienen. Zu diesen endogenen Gefahrensignalen können Substanzen gezählt werden, die von „gestressten“ oder geschädigten Zellen freigesetzt werden, nicht aber oder lediglich in minimalem Ausmaß von „gesunden“ oder physiologisch (apoptotisch) sterbenden Zellen.

So werden MonoDC durch Signale virusinfizierter, mechanisch gestresster oder nekrotischer Zellen in der Nachbarschaft aktiviert, nicht hingegen durch Signale gesunder oder apoptotischer Zellen (Gallucci, 1999; Sauter, 2000). Zu konstitutiven endogenen Gefahrensignalen, also physiologisch in Zellen vorkommenden Bestandteilen, zählt man neben Nukleotiden auch einige Hitzeschock-Proteine (HSP). Hitzeschock-Proteine werden von nekrotischen, nicht aber von apoptotischen Zellen freigesetzt und können dendritische Zellen aktivieren (Asea, 2000; Basu, 2000; Singh-Jasuja, 2000). Induzierbare, d.h. während Entzündungsreaktionen hochregulierte, Signale werden repräsentiert durch Zytokine (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), CD40-Ligand, Hitzeschock-Proteine (HSP) und andere.

Exo- und endogene Gefahrensignale müssen durch Antigen-präsentierende Zellen erkannt werden, wodurch es zur Aktivierung sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems kommen kann.

Zwischen Rezeptoren des exo- und des endogenen Systems bestehen enge Verbindungen. So ist beispielsweise TLR4 sowohl ein Rezeptor für das bakterielle LPS (Hoshino, 1999) als auch für das endogene Hitzeschock-Protein Hsp60 (Ohashi, 2000) und für Abbauprodukte des Hyaluronans (Taylor, 2004; Termeer, 2002).

Dendritische Zellen und andere Zellen des Immunsystems verfügen über Rezeptoren zur Erkennung von Nukleotiden (siehe Kapitel 1.3.6). Letztere liegen in hohen Konzentrationen (5-10 mM) im Zytoplasma aller Zellen vor, im extrazellulären Raum hingegen bewegen sich deren Konzentrationen lediglich im nanomolaren Bereich. Erhöhte extrazelluläre Nukleotid-Konzentrationen können durch Membran- oder Zellschäden im Rahmen von Entzündung, mechanischer Reizung oder unkontrolliertem Wachstum verursacht sein. Bemerkenswert ist, dass Nukleotide von verschiedenen Zellarten auch aktiv nach mechanischem Stress, Stimulation mit Endotoxin und bei Plättchen-Aggregation auf nicht-lytische Weise sezerniert werden (Cotrina, 1998; Ferrari, 1997; Mitchell, 1998).

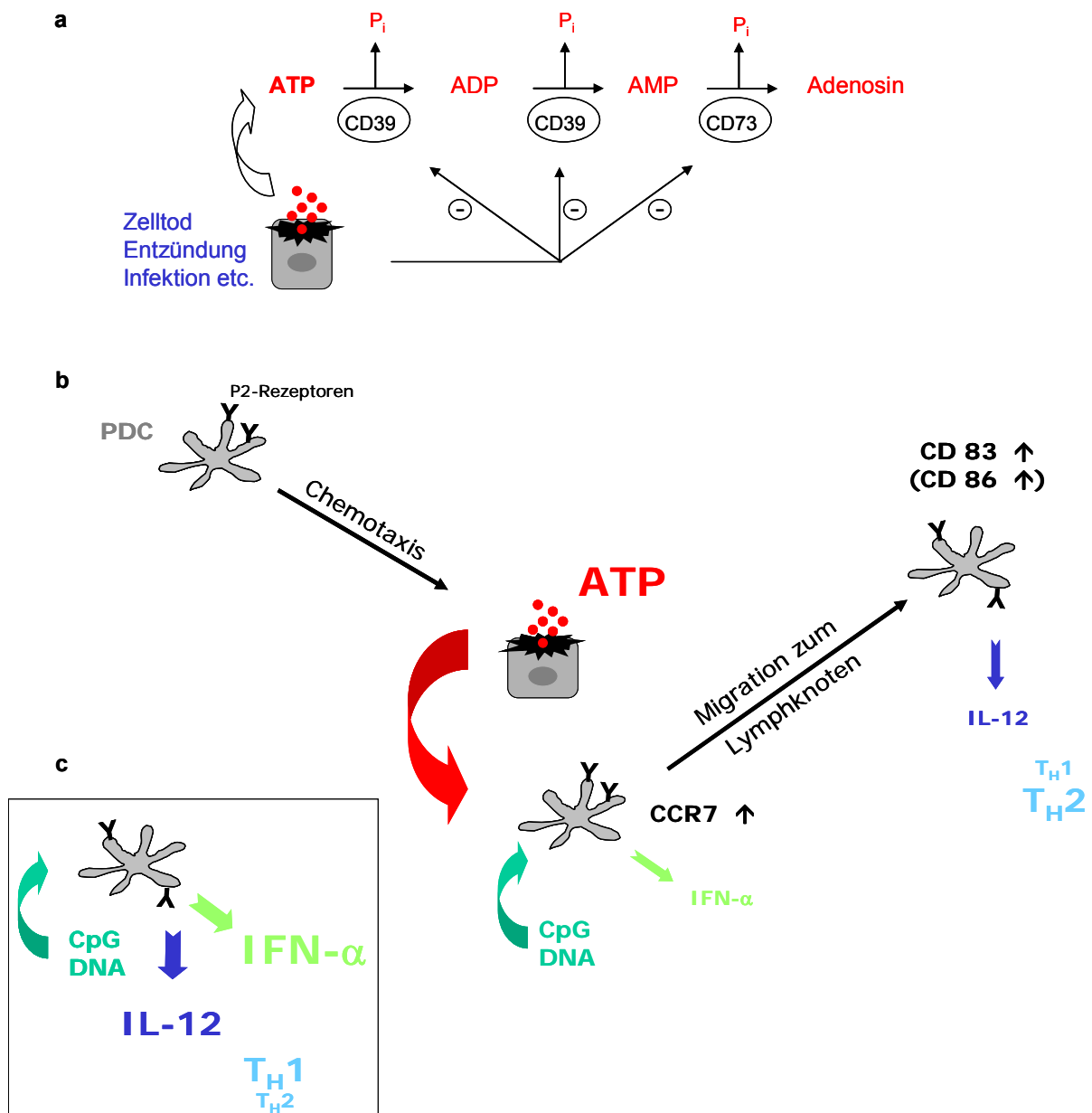
Eine weitere Rolle bei der Konzentration von extrazellulären Nukleotiden in Entzündungsgebieten spielen die Ecto-Nukleotidasen. Während unter physiologischen Bedingungen ATP durch diese Enzyme rasch abgebaut wird (Hunsucker, 2005), kommt es in entzündlichen Gebieten zu deren Herunterregulierung, wodurch es dort zu einer Akkumulation von ATP kommen kann (Robson, 1997). Gleichwohl werden durch die Aktivität der Nukleotidasen die Wirkungen der Nukleotide differenziert reguliert. Die einzelnen Nukleotide und deren jeweilige Hydrolyseprodukte haben zum Teil unterschiedliche Wirkungen. Beispielsweise unterscheiden sich – trotz weitgehend ähnlicher Effekte – ATP und ADP (in jeweils Hydrolyse-stabiler Form) in der Beeinflussung der IL-10-Produktion (verstärkt durch ATP, inhibiert durch ADP) und in der Stärke der IL-12-Inhibition durch MonoDC.

Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass auch das Gewebe, in welchem es zu einer Immunreaktion kommt, einen starken Einfluss auf die Art der Immunantwort ausübt (Gallucci, 2001). So mag die unterschiedliche Verteilung distinkter Ecto-Nukleotidasen im Gewebe zu verschiedenen, abgeschwächten oder verstärkten Wirkungen der jeweiligen Nukleotide bzw. derer Hydrolyseprodukte führen.

ATP scheint keine rein aktivierende Rolle bei PDC-vermittelten Immunreaktionen einzunehmen. Dabei zeigt es Ähnlichkeiten zu Ergebnissen von Untersuchungen von Adenosin auf PDC (Schnurr, 2004). Neben SDF-1 $\alpha$ , CXCR3-Liganden und Adenosin ist ATP auch ein Kandidat, der unreife PDC aus dem Blut in Entzündungsgebiete lockt, aber zugleich deren Beteiligung an der entzündlichen Reaktion nach Aktivierung durch Viren, Bakterien oder aktivierte T-Zellen limitiert.

Es kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass ein Teil der hier beschriebenen Effekte durch ADP (Marteau, 2004) oder Adenosin (Schnurr, 2004), die in dieser Reihenfolge aus ATP entstehen, vermittelt ist. Bei den Messungen des intrazellulären Kalziumionenanstieges nach ATP-Zugabe spricht die rasche Kinetik zumindest bei diesen Versuchen gegen einen Effekt durch die ATP-Hydrolyseprodukte ADP und Adenosin.

Zusätzlich wurde jüngst von Swennen et al. eine entscheidende Rolle von ATP bei der Limitierung der Entzündungsreaktion in LPS-stimuliertem Vollblut durch Inhibition von TNF- $\alpha$  und Stimulation der IL-10-Freisetzung gezeigt und nachgewiesen, dass dieser Effekt hauptsächlich durch ATP und nicht etwa durch Adenosin vermittelt wird. Ferner stützt diese Studie die Annahme eines immunmodulierenden Effekts von ATP auch *in vivo* (Swennen, 2005). In Abb. 12 ist ein hypothetisches Modell der Wirkung von ATP auf PDC schematisch dargestellt.



**Abb. 12: Hypothetisches Modell der ATP-Wirkung auf PDC.** (a) ATP wird durch verschiedene Stimuli verursacht aus Zellen freigesetzt und zum Teil von EctoATP/ADPase CD39 und 5'-Ecto-Nukleotidase CD73 über ADP und AMP zu Adenosin abgebaut. Die Aktivität dieser ATP-abbauenden Enzyme ist in Entzündungsorten herunterreguliert, so dass mehr ATP zur Verfügung steht (Robson, 1997). (b) Die Wirkung von ATP auf PDC wird über P2-Rezeptoren vermittelt. Freigesetztes ATP wirkt chemotaktisch und zum Teil aktivierend auf PDC (CD86, CD83), fördert die Migration der PDC in die Lymphknoten (CCR7) und führt zu einer Reduktion der CpG ODN induzierten IFN- $\alpha$ - und IL-12-Sekretion. Dadurch könnte die Art und das Ausmaß der Immunantwort beeinflusst werden (T<sub>H</sub>2 statt T<sub>H</sub>1). Im Kasten (c) wird die Wirkung von CpG DNA auf PDC dargestellt. Durch CpG induziert, kommt es zur Sekretion von IFN- $\alpha$  und IL-12. IL-12 fördert T<sub>H</sub>1-Immunantworten.

#### 4.2.8 Beteiligte Rezeptortypen

Das Fehlen spezifischer bzw. selektiver Agonisten, Antagonisten und verfügbarer monoklonaler Antikörper gegen Rezeptoren, die Vielzahl an P2-Rezeptoren, die Heterogenität der Rezeptoren bei verschiedenen Spezies und die anzunehmende Existenz noch unbekannter Rezeptoren erschweren es, beobachtete Effekte den einzelnen P2-Rezeptoren zuzuordnen. Man kann sich aber indirekte Hinweise zu Hilfe nehmen, um Rückschlüsse darauf ziehen zu können.

Von der Expression der Rezeptoren – gemessen auf RNA-Ebene – auf deren Funktionalität zu schließen ist nicht möglich. So unterscheiden sich vier verschiedene DC-Populationen – trotz ähnlicher Rezeptor-Expression – in der Funktionalität dieser Rezeptoren (Schnurr, 2003). Übereinstimmend und zum Teil gegenseitig ergänzend mit den Ergebnissen dieser Studie von Schnurr et al. sind nun folgende P2-Rezeptoren auf PDC (auf RNA-Ebene) bestätigt worden: P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub><sup>\*</sup>, P2Y<sub>5</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>10</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub> und SP174/P2Y<sub>13</sub><sup>\*</sup> (mit \* markierte Rezeptoren sind nur bei (Schnurr, 2003) bestimmt worden. Siehe Tabelle 4). Obgleich PDC und MonoDC zumindestens auf mRNA-Ebene das gleiche Muster in der Expression der P2-Rezeptoren besitzen, kann man nicht ausschließen, dass es möglicherweise auf Proteinebene Unterschiede gibt. Analogien zu einer solchen Hypothese finden sich dazu bei den strukturell ähnlich aufgebauten Chemokinrezeptoren. So sind – trotz ebenso weitgehend ähnlichem mRNA-Muster von PDC und myeloiden DC – funktionelle Unterschiede im Migrationsverhalten dieser beiden Zelltypen beschrieben worden (Penna, 2001; Penna, 2002).

	<b>PDC</b>	<b>MonoDC</b>
<b>P2X<sub>1</sub></b>	Stuplich; (Schnurr, 2003)	(Schnurr, 2003); (Berchtold, 1999); (Idzko, 2002)
<b>P2X<sub>4</sub></b>	Stuplich; (Schnurr, 2003)	(Schnurr, 2003); (Berchtold, 1999); (Idzko, 2002)
<b>P2X<sub>5</sub></b>	Stuplich; (Schnurr, 2003)	(Schnurr, 2003); (Berchtold, 1999)
<b>P2X<sub>7</sub></b>	Stuplich; (Schnurr, 2003)	(Schnurr, 2003); (Berchtold, 1999); (Idzko, 2002)
<b>P2Y<sub>1</sub></b>	Stuplich; (Schnurr, 2003)	(Schnurr, 2003); (Berchtold, 1999); (Idzko, 2002)
<b>P2Y<sub>2</sub></b>	Stuplich	(Berchtold, 1999); (Idzko, 2002)
<b>P2Y<sub>4</sub></b>	(Schnurr, 2003)	(Schnurr, 2003); (Berchtold, 1999); (Idzko, 2002)
<b>P2Y<sub>5</sub></b>	Stuplich; (Schnurr, 2003)	(Schnurr, 2003); (Berchtold, 1999)
<b>P2Y<sub>6</sub></b>	Stuplich; (Schnurr, 2003)	(Schnurr, 2003); (Berchtold, 1999); (Idzko, 2002)
<b>P2Y<sub>10</sub></b>	Stuplich; (Schnurr, 2003)	(Schnurr, 2003); (Berchtold, 1999)
<b>P2Y<sub>11</sub></b>	Stuplich; (Schnurr, 2003)	(Schnurr, 2003); (Berchtold, 1999); (Idzko, 2002)

<b>P2Y<sub>12</sub></b>	Stuplich; (Schnurr, 2003)	(Schnurr, 2003)
<b>P2Y<sub>13</sub> /SP174</b>	(Schnurr, 2003)	(Schnurr, 2003)

**Tabelle 4: Expression der P2-Rezeptoren in PDC und MonoDC (Nachweis von Rezeptor-RNA unreifer PDC bzw. MonoDC).**

In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich eine semiquantitative Bestimmung der P2-Rezeptor-RNA durchgeführt, somit sind Aussagen über quantitative Unterschiede oder geringe Veränderungen nach Stimulation nicht möglich. Eine im weiteren Verlauf in der Arbeitsgruppe durchgeführte detailliertere Analyse der Expression von P2Y-Rezeptoren auf PDC mittels quantitativer *Realtime*-PCR ergab, dass durch Reifung mit IL-3 und CD40L die mRNA-Expression von P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> und P2Y<sub>14</sub> herunterreguliert wird, die von P2Y<sub>4</sub> und P2Y<sub>6</sub> hingegen unverändert bleibt (Shin, 2007).

Studien zum funktionellen Nachweis Ionenkanal-bildender P2X- als auch G-Proteingekoppelter P2Y-Rezeptoren anhand von Patch-clamp-Versuchen und Untersuchungen der Signaltransduktion liegen bei MonoDC vor (Idzko, 2002; Liu, 1999; Marteau, 2004).

Die Konzentration intrazellulärer Kalziumionen wird, wie eingangs erläutert (siehe Kapitel 1.3.1), durch Aktivierung der P2-Rezeptoren erhöht. Bei P2X-Rezeptoren kommt es zum Einstrom dieser bivalenten Ionen aus dem Extrazellulärraum, bei den G-Proteingekoppelten P2Y-Rezeptoren über eine Aktivierung von Phospholipase C und IP<sub>3</sub> zu einer Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Somit kann der Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration zum funktionellen Nachweis der P2-Rezeptoren herangezogen werden (Schnurr, 2003).

Veränderungen der intrazellulären Kalziumionenkonzentrationen sind bei etlichen „Immunantworten“ dendritischer Zellen bekannt, wie beispielsweise bei der Aufnahme apoptotischer Bestandteile und deren weiteren Prozessierung, bei der Chemotaxis, Reifung und Aktivierung sowie Apoptose dendritischer Zellen (Coutinho-Silva, 1999; Czerniecki, 1997; Faries, 2001; Hsu, 2001; Penna, 2001; Rubartelli, 1997). Auch durch Aktivierung von P2-Rezeptoren kann es zu Erhöhung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration in MonoDC kommen (Coutinho-Silva, 1999; Idzko, 2002; Marriott, 1999; Schnurr, 2003). Sowohl strukturell als auch durch zum Teil gleiche Signalwege zeigen zumindest die P2Y-Rezeptoren große Ähnlichkeiten mit den Chemokinrezeptoren (Baggiolini, 1997; Ralevic, 1998). Die bisher bekannten Daten bestärken daher auch die Vermutung, dass die P2Y-vermittelte Signaltransduktion an der Chemotaxis mitbeteiligt ist.



ATP führte bei PDC zu einem Anstieg des intrazellulären Kalzium-Spiegels. Dieser wurde in einem einzelnen Ansatz durch Vorinkubation mit den P2-Antagonisten Suramin und PPADS minimiert, was auf eine Beteiligung der P2-Rezeptoren bei der Signaltransduktion hinweist.

Inwieweit der vergleichsweise geringere Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration bei mit CpG ODN voraktivierten PDC nach Stimulation mit ATP eine Rolle spielt, ist nicht geklärt. Denkbar ist, dass die unterschiedlichen Wirkungen der Nukleotid-Rezeptor-Bindung auf PDC, wie zum Beispiel auf die Expression der Oberflächenmarker, die Zytokin-Hemmung, die Chemotaxis etc. jeweils durch verschiedene Signalkaskaden vermittelt werden. Studien mit Aktivatoren und Inhibitoren der Proteinkinase A haben Hinweise geliefert, dass der Nukleotid-induzierte Reifungseffekt bei MonoDC wahrscheinlich mit einem cAMP-abhängigen und somit weniger mit einem Kalziumfluss-abhängigen Signalweg verbunden ist (Wilkin, 2001). Man kann spekulieren, dass das nach Ausreifung mit CpG ODN reduzierte Kalziumionen-*signaling* auch zu einer geringeren chemotaktischen Wirkung des ATP auf PDC führt. So würden theoretisch bereits aktivierte Zellen nicht mehr in Bereiche erhöhter ATP-Konzentrationen (wie sie bei Entzündungen vorkommen) migrieren, sondern über lymphoide Chemokine vermittelt in die Lymphknoten wandern.

Da sich UTP bei unseren Versuchen hinsichtlich *intrazellulärer*  $\text{Ca}^{2+}$ -Veränderungen, CD86- und HLA-DR-Expression am potentesten zeigte, kann das für einen verantwortlichen P2Y-Rezeptor ( $\text{P2Y}_2$ ,  $\text{P2Y}_4$ ,  $\text{P2Y}_6$ ), gegen einen  $\text{P2Y}_{11}$ - und gegen einen P2X-Rezeptor sprechen (Ralevic, 1998). Dieser Schluss gilt aber vermutlich nicht für die Chemotaxis. Hier zeigten die vorliegenden Daten, dass UTP keine chemotaktische Wirkung auf PDC hat.

Bei MonoDC geht man davon aus, dass der  $\text{P2Y}_{11}$ -Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der Reifung (Expression des Oberflächenmarkers CD 83, Zytokinprofil, Endozytose und T-Zell-Stimulation), aber auch bei der Regulation der Chemotaxis durch ATP einnimmt; bei PDC hingegen spielt dieser Rezeptor eine untergeordnete Rolle: IL-3R<sup>+</sup> PDC exprimieren keinen funktionellen  $\text{P2Y}_{11}$ -Rezeptor (Schnurr, 2000; Schnurr, 2003; Wilkin, 2001; Wilkin, 2002).

Ergebnisse aus der Literatur und die hier vorliegenden Daten legen nahe, dass ATP auf die verschiedenen dendritischen Subtypen unterschiedliche Wirkungen hat, und dass möglicherweise diese verschiedenen ATP-induzierten Effekte auch innerhalb einer Zellpopulation von jeweils unterschiedlichen P2-Rezeptoren vermittelt werden.

### 4.3 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Den Ansätzen des *danger model* nach würden sich einerseits Transplantat-Abstoßungsreaktionen durch die chirurgisch verursachte Gewebeschädigung und andererseits fehlende Immunität gegen Tumore und Feten durch das Vorhandensein intakten Gewebes erklären. Experimentell konnte durch die Gabe von Tumorantigen zusammen mit *danger signals* (Gefahrensignalen) wie ATP Immunität gegen Tumore erreicht bzw. verbessert werden (Schnurr, 2001). *In vivo* konnte bei Mäusen mit CT26-Kolonkarzinom durch tägliche intraperitoneale ATP-Injektionen Tumorwachstum und Kachexie reduziert und die Überlebenszeit verlängert werden (Rapaport, 1988; Rapaport, 1990; Rapaport, 1989). Drei erste klinische Studien mit kleinen Patientenkollektiven zeigten den positiven Einfluss von ATP auf Überlebenszeit oder zumindest Lebensqualität bei Patienten mit fortgeschrittenem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (Agteresch, 2003; Agteresch, 2000) (Haskell, 1998; Haskell, 1996).

Die Expression verschiedener P2-Rezeptoren wurde bei einer Vielzahl unterschiedlicher Tumorarten sowohl in Tumorgewebe als auch in Tumor-Zelllinien nachgewiesen. Es gibt Hinweise dafür, dass über die einzelnen P2-Rezeptoren jeweils Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Tumorzellen reguliert werden (White, 2006). Dabei scheint der jeweilige P2-Rezeptor-vermittelte Effekt (d.h. Abnahme bzw. Zunahme der Proliferation) abhängig zu sein einerseits von der ATP-Konzentration und andererseits von der Tumorart. Eine entscheidende Bedeutung wird ferner der jeweiligen Verteilung/Aktivierung der einzelnen P2-Rezeptoren beigemessen (White, 2006). Das *targeting* einzelner P2-Rezeptor-Subtypen direkt auf Tumorzellen mit spezifischen (Ant-)agonisten ist daher ein möglicher neuer Therapieansatz in der Onkologie.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch die zusätzliche Möglichkeit auf, P2-Rezeptor-aktivierende bzw. hemmende Substanzen über ihre immunmodulierenden Eigenschaften in therapeutische Konzepte gegen Tumoren und Autoimmunerkrankungen einzubinden. Eine Schwierigkeit in der Immuntherapie von Tumoren ist es, die immunsuppressive Wirkung von Tumorgewebe zu durchbrechen. Diese Arbeit belegt den P2-vermittelten immunsuppressiven Effekt von Nukleotiden auf PDC, der insbesondere in Tumorgewebe wegen des vermehrten Zellzerfalls und der dadurch anfallenden hohen Nukleotidkonzentrationen relevant werden könnte und zur immunsuppressiven Wirkung des Tumorgewebes beitragen wird. CpG-Oligonukleotide, deren Wirkungen wesentlich über PDC vermittelt werden, haben sich in zahlreichen Tiermodellen als effektiv in der Immuntherapie von Tumoren erwiesen und werden in klinischen Studien derzeit auf ihre Wirksamkeit untersucht. Die hier vorgestellten Ergebnisse lassen einen synergistischen Effekt von CpG-

Oligonukleotiden mit P2-Rezeptorantagonisten postulieren. Insbesondere Therapiekonzepte, bei denen CpG-Oligonukleotide lokal in Tumorgewebe appliziert werden, könnten daher von der gleichzeitigen Blockade von P2-Rezeptoren auf PDC profitieren. Dieses Konzept wird nun in weiterführenden Arbeiten im Tiermodell getestet.

Während in der Immuntherapie von Tumoren die Aktivierung des Immunsystems das therapeutische Ziel darstellt, erfordert die Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie des Lupus erythematodes (SLE) eine Suppression bzw. Verhinderung von Immunantworten.

Es gibt es zunehmend Hinweise, dass endogene Gefahrensignale, PDC und IFN- $\alpha$  beim SLE entscheidende pathogenetische Faktoren darstellen. Die Beobachtung, dass sich unter IFN- $\alpha$ -Therapie ein SLE oder SLE-ähnliche Krankheitsbilder als Nebenwirkungen manifestieren können, und der Nachweis erhöhter Serumkonzentrationen von Typ I-Interferonen bei SLE-Patienten wiesen erstmals auf eine Rolle von IFN- $\alpha$  beim SLE hin (Preble, 1982; Ronnblom, 1990). Weitere Untersuchungen zeigten eine Korrelation von IFN- $\alpha$ -Serumkonzentration und Krankheitsaktivität sowie eine vermehrte Ansammlung aktivierter und IFN- $\alpha$ -produzierender PDC in der Haut von SLE-Patienten (Farkas, 2001). PDC scheinen durch DNA apoptotischer Zellen und durch Immunkomplexe aus Antikörpern gegen doppelsträngige DNA aktiviert zu werden (Bave, 2001; Dzionek, 2001). Die hohen IFN- $\alpha$ -Konzentrationen bei SLE-Patienten führten zu einer DC-getriggerten T-Zell-vermittelten Autoimmunität (Blanco, 2001) und förderten die Autoantikörper-Produktion durch Plasmazellen (Colonna, 2004; Jegou, 2003).

Somit kommt der PDC und dem IFN-System eine Schlüsselposition beim SLE zu.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden PDC mit CpG-Oligonukleotiden zur Produktion von IFN- $\alpha$  stimuliert. CpG-DNA und deren Signalwege spielen womöglich eine therapeutisch beeinflussbare Rolle beim SLE: Obwohl unmethylierte CpG-Sequenzen in der DNA von Wirbeltieren nur in geringer Frequenz zu finden sind, wurde gezeigt, dass Oligonukleotide, die basierend auf DNA-Sequenzen aus SLE-Immunkomplexen synthetisiert worden sind, die Expression von IL-12 und IFN- $\alpha$  in humanen PDC stimulieren können (Sato, 1999). Kürzlich wurde berichtet, dass SLE-Antikörper die Zytokin- und Chemokinproduktion von PDC zusammen mit dem Fc $\gamma$ -Rezeptor CD32 über den *Toll-like*-Rezeptor TLR9, dem einzigen Rezeptor für die Erkennung von CpG-ODN-Motiven, aktivieren. Dabei ähnelt das durch SLE-Immunkomplexe induzierte Zytokin- und Chemokinmuster dem durch CpG-A DNA induzierten Muster von PDC (Means, 2005).

Die Daten der vorliegenden Arbeit machen den Einsatz von P2-Rezeptor-Agonisten als Inhibitoren der CpG-DNA-induzierten IFN-Produktion von PDC zu einem weiterverfolgbaren therapeutischen Konzept in der Behandlung des SLE. Hinweise auf eine Rolle von P2-Rezeptoren beim SLE gibt es bereits. So zeigten Wang et al., dass der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor, der bei der Thrombozytenaggregation eine Rolle spielt, bei SLE-Patienten sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene reduziert exprimiert wird (Wang, 2004). Ferner gibt es Hinweise dafür, dass der P2X<sub>7</sub>-Rezeptor zumindest im murinen Modell des SLE eine Rolle spielen könnte (Elliott, 2005).

Zusammenfassend bilden somit Konzepte zum therapeutischen Einsatz von P2-(Ant-) agonisten und zur Manipulation der P2-Signaltransduktion interessante Ansätze, um zum einen entzündliche und immunologisch vermittelte Prozesse zu beeinflussen und zum anderen Tumorerkrankungen zu behandeln. Bereits in der Klinik Verwendung finden als Thrombozyten-Aggregationshemmer der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor-Antagonist Clopidogrel und zur Behandlung trockener Augen der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist Diquafosol.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Plasmazytoide dendritische Zellen (PDC) spielen eine wichtige regulatorische Rolle bei Immunantworten des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Sie sind insbesondere die Hauptproduzenten von Interferon Typ I im Rahmen viraler Infektionen und der Autoimmunerkrankung Lupus erythematoses (SLE). Sie werden daher auch als natürliche Interferon-produzierende Zellen bezeichnet und stehen bei der Entwicklung neuer Ansätze zur Behandlung von Virusinfektionen, Autoimmun- und Tumorerkrankungen im Fokus grundlagen- und klinisch orientierten wissenschaftlichen Interesses.

Die Aktivierung dendritischer Zellen erfolgt durch exogene, Pathogen-assoziierte oder durch endogene, körpereigene Gefahrensignale (*danger signals*). Die Erkennung von mikrobieller CpG-DNA via *Toll-like-Rezeptor* (TLR)-9 durch PDC ist ein inzwischen gut charakterisiertes Beispiel für die Erkennung eines exogenen Gefahrensignals und führt zur Aktivierung der PDC und Produktion großer Mengen an IFN- $\alpha$ . Konstitutiv intrazellulär vorkommende Nukleotide wie ATP werden im Rahmen von Entzündungen, mechanischem Stress und Zelluntergang in den Extrazellulärraum freigesetzt, wo sie als Signalmoleküle über membrangebundene P2- und P1-Rezeptoren die Funktion zahlreicher Zellarten, insbesondere auch des Immunsystems modulieren und damit in nahezu klassischer Weise Vertreter endogener *danger signals* darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die bisher nicht bekannten P2-Rezeptor-vermittelten Wirkungen extrazellulärer Nukleotide auf PDC anhand eines *in vitro*-Modells mit humanen plasmazytoiden dendritischen Zellen untersucht.

Dabei zeigte sich, dass frisch isolierte PDC alle bekannten P2Y-Rezeptoren exprimieren und auf Stimulierung mit ATP und UTP mit der Mobilisierung intrazellulärer Kalziumionen reagieren; dieser Effekt ist durch P2Y-Rezeptorantagonisten hemmbar. Nach Ausreifung der PDC mit CpG DNA sinkt die Fähigkeit, auf Nukleotidstimulation hin Kalziumionen zu mobilisieren; die Expression der P2Y-Rezeptoren verändert sich jedoch nicht, mit Ausnahme des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors, der vermindert exprimiert wird. ATP, allerdings nicht UTP, besitzt einen dosisabhängigen chemotaktischen Effekt auf unstimulierte PDC. Die Aktivierung mit extrazellulären Nukleotiden führt zu einer erhöhten Expression von kostimulatorischen Molekülen, Reifemarkern und MHC II-Molekülen auf unreifen PDC. Auf mit TLR-9 Liganden und CD40L stimulierten Zellen führt ATP zu einer prozentual erhöhten Expression des Reifemarkers CD83 und zu einer erhöhten Expression des Chemokinrezeptors CCR7. Die Stimulierung mit ATP und UTP allein induziert kein Interferon- $\alpha$  oder IL-12 in PDC. Im Ge-

gensatz dazu inhibiert ATP überraschenderweise die durch CpG-DNA induzierte Interferon- und IL-12 Produktion in PDC.

Die Ergebnisse zeigen, dass ATP teils aktivierende, teils inhibierende Wirkungen auf humane PDC hat. Dadurch könnten in Entzündungsgebieten Immunreaktionen gefördert, gleichzeitig aber auch überschießende, möglicherweise schädliche Immunantworten begrenzt werden. Dem extrazellulären ATP können somit immunmodulierende Eigenschaften zugeordnet werden.

Die Möglichkeit, die Funktion von PDC mit P2Y-Agonisten und -Antagonisten zu beeinflussen, eröffnet neue therapeutische Strategien in der Immuntherapie von Tumorerkrankungen und des SLE, die in weiteren Studien getestet werden müssen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 1994; 64(3):445-75.

Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 2006; 58(3):281-341.

Agteresch HJ, Burgers SA, van der Gaast A, Wilson JH, Dagnelie PC. Randomized clinical trial of adenosine 5'-triphosphate on tumor growth and survival in advanced lung cancer patients. *Anticancer Drugs* 2003; 14(8):639-44.

Agteresch HJ, Dagnelie PC, van der Gaast A, Stijnen T, Wilson JH. Randomized clinical trial of adenosine 5'-triphosphate in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(4):321-8.

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413(6857):732-8.

Altieri DC, Wiltse WL, Edgington TS. Signal transduction initiated by extracellular nucleotides regulates the high affinity ligand recognition of the adhesive receptor CD11b/CD18. *J Immunol* 1990; 145(2):662-70.

Ardavin C, Martinez del Hoyo G, Martin P, Anjuere F, Arias CF, Marin AR, Ruiz S, Parrillas V, Hernandez H. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol* 2001; 22(12):691-700.

Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 2000; 6(4):435-42.

Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, Vicari A, O'Garra A, Biron C, Briere F, Trinchieri G. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2001; 2(12):1144-50.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:675-705.

Balazovich KJ, Boxer LA. Extracellular adenosine nucleotides stimulate protein kinase C activity and human neutrophil activation. *J Immunol* 1990; 144(2):631-7.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:767-811.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392(6673):245-52.

Barchet W, Cella M, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells-virus experts of innate immunity. *Semin Immunol* 2005; 17(4):253-61.

- Baricordi OR, Ferrari D, Melchiorri L, Chiozzi P, Hanau S, Chiari E, Rubini M, Di Virgilio F. An ATP-activated channel is involved in mitogenic stimulation of human T lymphocytes. *Blood* 1996; 87(2):682-90.
- Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 2000; 12(11):1539-46.
- Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(16):9237-42.
- Bave U, Magnusson M, Eloranta ML, Perers A, Alm GV, Ronnblom L. Fc gamma RIIa is expressed on natural IFN-alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) and is required for the IFN-alpha production induced by apoptotic cells combined with lupus IgG. *J Immunol* 2003; 171(6):3296-302.
- Bave U, Vallin H, Alm GV, Ronnblom L. Activation of natural interferon-alpha producing cells by apoptotic U937 cells combined with lupus IgG and its regulation by cytokines. *J Autoimmun* 2001; 17(1):71-80.
- Benham CD, Tsien RW. A novel receptor-operated Ca<sup>2+</sup>-permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature* 1987; 328(6127):275-8.
- Berchtold S, Ogilvie AL, Bogdan C, Muhl-Zurbes P, Ogilvie A, Schuler G, Steinkasserer A. Human monocyte derived dendritic cells express functional P2X and P2Y receptors as well as ecto-nucleotidases. *FEBS Lett* 1999; 458(3):424-8.
- Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* 2001; 294(5546):1540-3.
- Bodin P, Burnstock G. Synergistic effect of acute hypoxia on flow-induced release of ATP from cultured endothelial cells. *Experientia* 1995; 51(3):256-9.
- Bodin P, Burnstock G. Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation. *Inflamm Res* 1998; 47(8):351-4.
- Boonstra A, Asselin-Paturel C, Gilliet M, Crain C, Trinchieri G, Liu YJ, O'Garra A. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med* 2003; 197(1):101-9.
- Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 1994; 371(6497):519-23.
- Bulanova E, Budagian V, Orinska Z, Hein M, Petersen F, Thon L, Adam D, Bulfone-Paus S. Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X7 receptor in murine mast cells. *J Immunol* 2005; 174(7):3880-90.
- Burgers JA, Schweizer RC, Koenderman L, Bruijnzeel PL, Akkerman JW. Human platelets secrete chemotactic activity for eosinophils. *Blood* 1993; 81(1):49-55.
- Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 1972; 24(3):509-81.



- Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In: *Straub RW, Bolis L, eds Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach* 1978:107-19.
- Burnstock G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology* 1997; 36(9):1127-39.
- Burnstock G, Williams M. P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295(3):862-9.
- Cavanagh LL, Boyce A, Smith L, Padmanabha J, Filgueira L, Pietschmann P, Thomas R. Rheumatoid arthritis synovium contains plasmacytoid dendritic cells. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(2):R230-40.
- Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* 2000; 1(4):305-10.
- Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999; 5(8):919-23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899919>.
- Chai JG, Vendetti S, Bartok I, Schoendorf D, Takacs K, Elliott J, Lechler R, Dyson J. Critical role of costimulation in the activation of naive antigen-specific TCR transgenic CD8+ T cells in vitro. *J Immunol* 1999; 163(3):1298-305.
- Chaker MB, Tharp MD, Bergstresser PR. Rodent epidermal Langerhans cells demonstrate greater histochemical specificity for ADP than for ATP and AMP. *J Invest Dermatol* 1984; 82(5):496-500.
- Chambers JK, Macdonald LE, Sarau HM, Ames RS, Freeman K, Foley JJ, Zhu Y, McLaughlin MM, Murdock P, McMillan L, Trill J, Swift A, Aiyar N, Taylor P, Vawter L, Naheed S, Szekeres P, Hervieu G, Scott C, Watson JM, et al. A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J Biol Chem* 2000; 275(15):10767-71.
- Chang K, Hanaoka K, Kumada M, Takuwa Y. Molecular cloning and functional analysis of a novel P2 nucleotide receptor. *J Biol Chem* 1995; 270(44):26152-8.
- Charlton SJ, Brown CA, Weisman GA, Turner JT, Erb L, Boarder MR. Cloned and transfected P2Y4 receptors: characterization of a suramin and PPADS-insensitive response to UTP. *Br J Pharmacol* 1996; 119(7):1301-3.
- Cockcroft S, Stutchfield J. ATP stimulates secretion in human neutrophils and HL60 cells via a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein coupled to phospholipase C. *FEBS Lett* 1989; 245(1-2):25-9.
- Cockcroft S, Gomperts B. Activation and inhibition of calcium-dependent histamine secretion by ATP ions applied to rat mast cells. *J Physiol* 1979; 296:229-43.
- Cockcroft S, Gomperts B. ATP induced nucleotide permeability in rat mast cells. *Nature* 1979; 279:541-2.

- Cohn ZA, Parks E. The regulation of pinocytosis in mouse macrophages. 3. The induction of vesicle formation by nucleosides and nucleotides. *J Exp Med* 1967; 125(3):457-66.
- Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004; 5(12):1219-26.
- Communi D, Gonzalez NS, Detheux M, Brezillon S, Lannoy V, Parmentier M, Boeynaems JM. Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J Biol Chem* 2001; 276(44):41479-85.
- Communi D, Govaerts C, Parmentier M, Boeynaems JM. Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1997; 272(51):31969-73.
- Communi D, Janssens R, Suarez-Huerta N, Robaye B, Boeynaems JM. Advances in signalling by extracellular nucleotides. the role and transduction mechanisms of P2Y receptors. *Cell Signal* 2000; 12(6):351-60.
- Communi D, Motte S, Boeynaems JM, Piroton S. Pharmacological characterization of the human P2Y4 receptor. *Eur J Pharmacol* 1996; 317(2-3):383-9.
- Conigrave AD, Fernando KC, Gu B, Tasevski V, Zhang W, Luttrell BM, Wiley JS. P2Y(11) receptor expression by human lymphocytes: evidence for two cAMP-linked purinoceptors. *Eur J Pharmacol* 2001; 426(3):157-63.
- Cordoba-Rodriguez R, Frucht DM. 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* 2003; 3(5):715-23.
- Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC, Nedergaard M. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(26):15735-40.
- Coutinho-Silva R, Persechini PM, Bisaggio RD, Perfettini JL, Neto AC, Kanellopoulos JM, Motta-Ly I, Dautry-Varsat A, Ojcius DM. P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells. *Am J Physiol* 1999; 276(5 Pt 1):C1139-47.
- Cowen DS, Lazarus HM, Shurin SB, Stoll SE, Dubyak GR. Extracellular adenosine triphosphate activates calcium mobilization in human phagocytic leukocytes and neutrophil/monocyte progenitor cells. *J Clin Invest* 1989; 83(5):1651-60.
- Cowen DS, Sanders M, Dubyak G. P2-purinergic receptors activate a guanine nucleotide-dependent phospholipase C in membranes from HL-60 cells. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1053(2-3):195-203.
- Crane JK, Naeher TM, Choudhari SS, Giroux EM. Two pathways for ATP release from host cells in enteropathogenic Escherichia coli infection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289(3):G407-17.
- Czerniecki BJ, Carter C, Rivoltini L, Koski GK, Kim HI, Weng DE, Roros JG, Hijazi YM, Xu S, Rosenberg SA, Cohen PA. Calcium ionophore-treated peripheral blood monocytes and dendritic cells rapidly display characteristics of activated dendritic cells. *J Immunol* 1997; 159(8):3823-37.

- D'Amico G, Frascaroli G, Bianchi G, Transidico P, Doni A, Vecchi A, Sozzani S, Allavena P, Mantovani A. Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. *Nat Immunol* 2000; 1(5):387-91.
- Daar AS, Fuggle SV, Hart DNJ, Dalchau R, Abdulaziz Z, Fabre JW, Ting A, Morris PJ. Demonstration and phenotypic characterization of HLA-DR positive interstitial dendritic cells widely distributed in human connective tissues. *Trans Proc* 1983; 1:311-29.
- Dalod M, Hamilton T, Salomon R, Salazar-Mather TP, Henry SC, Hamilton JD, Biron CA. Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *J Exp Med* 2003; 197(7):885-98.
- Dawicki DD, McGowan-Jordan J, Bullard S, Pond S, Rounds S. Extracellular nucleotides stimulate leukocyte adherence to cultured pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol* 1995; 268(4 Pt 1):L666-73.
- De Vos R, De Wolf-Peeters C, Facchetti F, Desmet V. Plasmacytoid monocytes in epithelioid cell granulomas: ultrastructural and immunoelectron microscopic study. *Ultrastruct Pathol* 1990; 14(4):291-302.
- Denlinger LC, Fisette PL, Garis KA, Kwon G, Vazquez-Torres A, Simon AD, Nguyen B, Proctor RA, Bertics PJ, Corbett JA. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by macrophage purinoreceptors and calcium. *J Biol Chem* 1996; 271(1):337-42.
- Di Virgilio F. The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol Today* 1995; 16(11):524-8.
- Di Virgilio F. Dr. Jekyll/Mr. Hyde: the dual role of extracellular ATP. *J Auton Nerv Syst* 2000; 81(1-3):59-63.
- Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 2001; 97(3):587-600.
- Dichmann S, Idzko M, Zimpfer U, Hofmann C, Ferrari D, Luttmann W, Virchow C, Jr., Di Virgilio F, Norgauer J. Adenosine triphosphate-induced oxygen radical production and CD11b up-regulation: Ca(++) mobilization and actin reorganization in human eosinophils. *Blood* 2000; 95(3):973-8.
- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004; 303(5663):1529-31.
- Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 1998; 188(2):373-86.
- Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol (Lond)* 1929; 68:213-37.

- Dubyak GR. Signal transduction by P2-purinergic receptors for extracellular ATP. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 4(4):295-300.
- Dzionek A, Inagaki Y, Okawa K, Nagafune J, Rock J, Sohma Y, Winkels G, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol* 2002; 63(12):1133-48.
- Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Gunther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Nagasaka T, Okada T, Vermi W, Winkels G, Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* 2001; 194(12):1823-34.
- Elliott JI, McVey JH, Higgins CF. The P2X7 receptor is a candidate product of murine and human lupus susceptibility loci: a hypothesis and comparison of murine allelic products. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(3):R468-75.
- Evans RJ, Lewis C, Virginio C, Lundstrom K, Buell G, Surprenant A, North RA. Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J Physiol* 1996; 497 ( Pt 2):413-22.
- Facchetti F, Vermi W, Mason D, Colonna M. The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells. *Virchows Arch* 2003; 443(6):703-17.
- Fais S, Burgio VL, Capobianchi MR, Gessani S, Pallone F, Belardelli F. The biological relevance of polykaryons in the immune response. *Immunol Today* 1997; 18(11):522-7.
- Faries MB, Bedrosian I, Xu S, Koski G, Roros JG, Moise MA, Nguyen HQ, Engels FH, Cohen PA, Czerniecki BJ. Calcium signaling inhibits interleukin-12 production and activates CD83(+) dendritic cells that induce Th2 cell development. *Blood* 2001; 98(8):2489-97.
- Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P, Jahnsen FL. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol* 2001; 159(1):237-43.
- Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Hanau S, Di Virgilio F. Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med* 1997; 185(3):579-82.
- Ferrari D, La Sala A, Chiozzi P, Morelli A, Falzoni S, Girolomoni G, Idzko M, Dichmann S, Norgauer J, Di Virgilio F. The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. *Faseb J* 2000; 14(15):2466-76.
- Ferrari D, la Sala A, Panther E, Norgauer J, Di Virgilio F, Idzko M. Activation of human eosinophils via P2 receptors: novel findings and future perspectives. *J Leukoc Biol* 2005.
- Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Munz C, Liu YJ, Bhardwaj N. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 2003; 2:2.

- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 1994; 46(2):143-56.
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Dubyak GR, Harden TK, Jacobson KA, Schwabe U, Williams M. Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18(3):79-82.
- Freissmuth M, Schutz W, Linder ME. Interactions of the bovine brain A1-adenosine receptor with recombinant G protein alpha-subunits. Selectivity for rGi alpha-3. *J Biol Chem* 1991; 266(27):17778-83.
- Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 1999; 5(11):1249-55.
- Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 2001; 13(1):114-9.
- Gasser O, Schmid TA, Zenhausem G, Hess C. Cyclooxygenase regulates cell surface expression of CXCR3/1-storing granules in human CD4+ T cells. *J Immunol* 2006; 177(12):8806-12.
- Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky DH. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:495-521.
- Gillespie JH. The biological significance of the linkage in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol (Lond)* 1934; 80:345-9.
- Girolomoni G, Lutz MB, Pastore S, Assmann CU, Cavani A, Ricciardi-Castagnoli P. Establishment of a cell line with features of early dendritic cell precursors from fetal mouse skin. *Eur J Immunol* 1995; 25(8):2163-9.
- Green HN, Stoner HB. Biological actions of the adenine nucleotides. 1950.
- Gregory S, Kern M. Adenosine and adenine nucleotides are mitogenic for mouse thymocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 83(3):1111-6.
- Grierson JP, Meldolesi J. Shear stress-induced  $[Ca^{2+}]_i$  transients and oscillations in mouse fibroblasts are mediated by endogenously released ATP. *J Biol Chem* 1995; 270(9):4451-6.
- Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997; 185:1101-11.
- Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:621-67.
- Hagenlocker BE, Walker BA, Ward PA. Superoxide responses of immune complex-stimulated rat alveolar macrophages. Intracellular calcium and priming. *J Immunol* 1990; 144(10):3898-906.
- Harden TK, Lazarowski ER, Boucher RC. Release, metabolism and interconversion of adenine and uridine nucleotides: implications for G protein-coupled P2 receptor agonist selectivity. *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18(2):43-6.

- Hart DN, Fabre JW. 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* 1981; 154(2):347-61.
- Hartmann E, Graefe H, Hopert A, Pries R, Rothenfusser S, Poeck H, Mack B, Endres S, Hartmann G, Wollenberg B. Analysis of plasmacytoid and myeloid dendritic cells in nasal epithelium. *Clin Vaccine Immunol* 2006.
- Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, Wagner M, Wellisch D, Mack B, Giese T, Gires O, Endres S, Hartmann G. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 2003; 63(19):6478-87.
- Hartmann G, Krieg AM. CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. *Gene Ther* 1999; 6(5):893-903.
- Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 2000; 164(2):944-53.
- Hartmann G, Weeratna RD, Ballas ZK, Payette P, Blackwell S, Suparto I, Rasmussen WL, Waldschmidt M, Sajuthi D, Purcell RH, Davis HL, Krieg AM. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 2000; 164(3):1617-24.
- Haskell CM, Mendoza E, Pisters KM, Fossella FV, Figlin RA. Phase II study of intravenous adenosine 5'-triphosphate in patients with previously untreated stage IIIB and stage IV non-small cell lung cancer. *Invest New Drugs* 1998; 16(1):81-5.
- Haskell CM, Wong M, Williams A, Lee LY. Phase I trial of extracellular adenosine 5'-triphosphate in patients with advanced cancer. *Med Pediatr Oncol* 1996; 27(3):165-73.
- Hasko G, Kuhel DG, Salzman AL, Szabo C. ATP suppression of interleukin-12 and tumour necrosis factor- $\alpha$  release from macrophages. *Br J Pharmacol* 2000; 129(5):909-14.
- Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 2001; 194(6):769-79.
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303(5663):1526-9.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408(6813):740-5.
- Hogquist KA, Nett MA, Unanue ER, Chaplin DD. Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(19):8485-9.
- Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurdin P, Nurdin A, Julius D, Conley PB. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001; 409(6817):202-7.

- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168(9):4531-7.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; 162(7):3749-52.
- Hsu S, O'Connell PJ, Klyachko VA, Badminton MN, Thomson AW, Jackson MB, Clapham DE, Ahern GP. Fundamental Ca<sup>2+</sup> signaling mechanisms in mouse dendritic cells: CRAC is the major Ca<sup>2+</sup> entry pathway. *J Immunol* 2001; 166(10):6126-33.
- Hu Y, Fisette PL, Denlinger LC, Guadarrama AG, Sommer JA, Proctor RA, Bertics PJ. Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem* 1998; 273(42):27170-5.
- Humphrey PP, Barnard EA. International Union of Pharmacology. XIX. The IUPHAR receptor code: a proposal for an alphanumeric classification system. *Pharmacol Rev* 1998; 50(2):271-7.
- Hunsucker SA, Mitchell BS, Spsychala J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol Ther* 2005; 107(1):1-30.
- Ibrahim MA, Chain BM, Katz DR. The injured cell: the role of the dendritic cell system as a sentinel receptor pathway. *Immunol Today* 1995; 16(4):181-6.
- Idzko M, Dichmann S, Ferrari D, Di Virgilio F, la Sala A, Girolomoni G, Panther E, Norgauer J. Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P2y receptors. *Blood* 2002; 100(3):925-32.
- Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957; 147(927):258-67.
- Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5(10):987-95.
- Jahnsen FL, Lund-Johansen F, Dunne JF, Farkas L, Haye R, Brandtzaeg P. Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123<sup>high</sup>) dendritic cells in human nasal allergy. *J Immunol* 2000; 165(7):4062-8.
- Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; 54 Pt 1:1-13.
- Janeway CA, Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 1992; 13(1):11-6.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology - The immune system in health and disease: Garland, Churchill Livingston; 2001.

- Jantzen HM, Gousset L, Bhaskar V, Vincent D, Tai A, Reynolds EE, Conley PB. Evidence for two distinct G-protein-coupled ADP receptors mediating platelet activation. *Thromb Haemost* 1999; 81(1):111-7.
- Jefford M, Schnurr M, Toy T, Masterman KA, Shin A, Beecroft T, Tai TY, Shortman K, Shackleton M, Davis ID, Parente P, Luft T, Chen W, Cebon J, Maraskovsky E. Functional comparison of DCs generated in vivo with Flt3 ligand or in vitro from blood monocytes: differential regulation of function by specific classes of physiologic stimuli. *Blood* 2003; 102(5):1753-63.
- Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 2003; 19(2):225-34.
- Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 2000; 192(2):219-26.
- Kadowaki N, Antonenko S, Liu YJ. Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN. *J Immunol* 2001; 166(4):2291-5.
- Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Seguela P, Voigt M, Humphrey PP. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 2001; 53(1):107-18.
- Klinman DM, Currie D, Gursel I, Verthelyi D. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol Rev* 2004; 199:201-16.
- Koshiba M, Apasov S, Sverdlov V, Chen P, Erb L, Turner JT, Weisman GA, Sitkovsky MV. 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* 1997; 94(3):831-6.
- Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:709-60.
- Krieg AM. From A to Z on CpG. *Trends Immunol* 2002; 23(2):64-5.
- Krieg AM. A role for Toll in autoimmunity. *Nat Immunol* 2002; 3(5):423-4.
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374(6522):546-9.
- Krug A, French AR, Barchet W, Fischer JA, Dzionek A, Pingel JT, Orihuela MM, Akira S, Yokoyama WM, Colonna M. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 2004; 21(1):107-19.
- Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31(7):2154-63.



- Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engemann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 2001; 31(10):3026-37.
- Krug A, Uppaluri R, Facchetti F, Dorner BG, Sheehan KC, Schreiber RD, Cella M, Colonna M. IFN-producing cells respond to CXCR3 ligands in the presence of CXCL12 and secrete inflammatory chemokines upon activation. *J Immunol* 2002; 169(11):6079-83.
- Krug A, Veeraswamy R, Pekosz A, Kanagawa O, Unanue ER, Colonna M, Cella M. Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells. *J Exp Med* 2003; 197(7):899-906.
- Kuhns DB, Wright DG, Nath J, Kaplan SS, Basford RE. ATP induces transient elevations of  $[Ca^{2+}]_i$  in human neutrophils and primes these cells for enhanced  $O_2^-$  generation. *Lab Invest* 1988; 58(4):448-53.
- Kuroki M, Takeshige K, Minakami S. ATP-induced calcium mobilization in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1012(1):103-6.
- Ia Sala A, Ferrari D, Corinti S, Cavani A, Di Virgilio F, Girolomoni G. Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses. *J Immunol* 2001; 166(3):1611-7.
- Ia Sala A, Ferrari D, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J, Girolomoni G. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J Leukoc Biol* 2003; 73(3):339-43.
- Ia Sala A, Sebastiani S, Ferrari D, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J, Girolomoni G. 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* 2002; 99(5):1715-22.
- Laliberte RE, Egglar J, Gabel CA. ATP treatment of human monocytes promotes caspase-1 maturation and externalization. *J Biol Chem* 1999; 274(52):36944-51.
- Lambrecht G. Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2000; 362(4-5):340-50.
- Langerhans P. Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie, und für Klinische Medizin* 1868; 44:325-37.
- Lazarowski ER, Boucher RC. UTP as an extracellular signaling molecule. *News Physiol Sci* 2001; 16:1-5.
- Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F, Tough DF. Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 2001; 14(4):461-70.
- Lennert K, Remmele W. Karyometrische Untersuchungen an Lymphknotenzellen des Menschen. I. Mitteilung. Germinoblasten. Lymphoblasten und lymphocyten. *Acta haemat* 1958; 19:99.

- Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A. Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 1995; 377(6548):432-5.
- Lipmann F. Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Adv Enzymol* 1941; 1:99-162.
- Liu QH, Bohlen H, Titzer S, Christensen O, Diehl V, Hescheler J, Fleischmann BK. Expression and a role of functionally coupled P2Y receptors in human dendritic cells. *FEBS Lett* 1999; 445(2-3):402-8.
- Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol* 2001; 2(7):585-9.
- Luft T, Jefford M, Luetjens P, Toy T, Hochrein H, Masterman KA, Maliszewski C, Shortman K, Cebon J, Maraskovsky E. Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets. *Blood* 2002; 100(4):1362-72.
- Luft T, Pang KC, Thomas E, Hertzog P, Hart DN, Trapani J, Cebon J. Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. *J Immunol* 1998; 161(4):1947-53.
- Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(15):5598-603.
- Lustig KD, Shiau AK, Brake AJ, Julius D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(11):5113-7.
- Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002; 23(9):445-9.
- MacKenzie AB, Surprenant A, North RA. Functional and molecular diversity of purinergic ion channel receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 868:716-29.
- Marrack P, Kappler J, Mitchell T. Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* 1999; 189(3):521-30.
- Marriott I, Inscho EW, Bost KL. Extracellular uridine nucleotides initiate cytokine production by murine dendritic cells. *Cell Immunol* 1999; 195(2):147-56.
- Marschner A, Rothenfusser S, Hornung V, Prell D, Krug A, Kerkmann M, Wellisch D, Poeck H, Greinacher A, Giese T, Endres S, Hartmann G. CpG ODN enhance antigen-specific NKT cell activation via plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2005; 35(8):2347-57.
- Marteau F, Communi D, Boeynaems JM, Suarez Gonzalez N. Involvement of multiple P2Y receptors and signaling pathways in the action of adenine nucleotides diphosphates on human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2004; 76(4):796-803.
- Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:991-1045.

- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; 296(5566):301-5.
- McCloskey MA, Fan Y, Luther S. Chemotaxis of rat mast cells toward adenine nucleotides. *J Immunol* 1999; 163(2):970-7.
- McKenna K, Beignon AS, Bhardwaj N. Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *J Virol* 2005; 79(1):17-27.
- Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT, Luster AD. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest* 2005; 115(2):407-17.
- Megjugorac NJ, Young HA, Amrute SB, Olshalsky SL, Fitzgerald-Bocarsly P. Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. *J Leukoc Biol* 2004; 75(3):504-14.
- Mehta VB, Hart J, Wewers MD. ATP-stimulated release of interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-18 requires priming by lipopolysaccharide and is independent of caspase-1 cleavage. *J Biol Chem* 2001; 276(6):3820-6.
- Menges M, Rossner S, Voigtlander C, Schindler H, Kukutsch NA, Bogdan C, Erb K, Schuler G, Lutz MB. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor  $\alpha$  induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med* 2002; 195(1):15-21.
- Mitchell CH, Carre DA, McGlinn AM, Stone RA, Civan MM. A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(12):7174-8.
- Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC, Seigny J, Matsue H, Enjoji K, Takashima A. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat Med* 2002; 8(4):358-65.
- Moran-Jimenez MJ, Matute C. Immunohistochemical localization of the P2Y(1) purinergic receptor in neurons and glial cells of the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; 78(1-2):50-8.
- Mutini C, Falzoni S, Ferrari D, Chiozzi P, Morelli A, Baricordi OR, Collo G, Ricciardi-Castagnoli P, Di Virgilio F. Mouse dendritic cells express the P2X7 purinergic receptor: characterization and possible participation in antigen presentation. *J Immunol* 1999; 163(4):1958-65.
- Nihei OK, de Carvalho AC, Savino W, Alves LA. Pharmacologic properties of P(2Z)/P2X(7) receptor characterized in murine dendritic cells: role on the induction of apoptosis. *Blood* 2000; 96(3):996-1005.
- North RA. Families of ion channels with two hydrophobic segments. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8(4):474-83.
- North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 2002; 82(4):1013-67.
- Novak EJ, Rabinovitch PS. Improved sensitivity in flow cytometric intracellular ionized calcium measurement using fluo-3/Fura Red fluorescence ratios. *Cytometry* 1994; 17(2):135-41.

- Novak I. ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. *News Physiol Sci* 2003; 18:12-7.
- O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N, Steinman RM. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 1994; 82(3):487-93.
- Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000; 164(2):558-61.
- Olweus J, BitMansour A, Warnke R, Thompson PA, Carballido J, Picker LJ, Lund-Johansen F. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(23):12551-6.
- Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000; 13(5):715-25.
- Padeh S, Cohen A, Roifman CM. ATP-induced activation of human B lymphocytes via P2-purinoceptors. *J Immunol* 1991; 146(5):1626-32.
- Panther E, Corinti S, Idzko M, Herouy Y, Napp M, la Sala A, Girolomoni G, Norgauer J. Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood* 2003; 101(10):3985-90.
- Panther E, Idzko M, Herouy Y, Rheinen H, Gebicke-Haerter PJ, Mrowietz U, Dichmann S, Norgauer J. Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. *Faseb J* 2001; 15(11):1963-70.
- Pashenkov M, Teleshova N, Kouwenhoven M, Smirnova T, Jin YP, Kostulas V, Huang YM, Pinegin B, Boiko A, Link H. Recruitment of dendritic cells to the cerebrospinal fluid in bacterial neuroinfections. *J Neuroimmunol* 2002; 122(1-2):106-16.
- Pedersen S, Pedersen SF, Nilius B, Lambert IH, Hoffmann EK. Mechanical stress induces release of ATP from Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1416(1-2):271-84.
- Penna G, Sozzani S, Adorini L. Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2001; 167(4):1862-6.
- Penna G, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 2002; 63(12):1164-71.
- Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004; 202:8-32.
- Preble OT, Black RJ, Friedman RM, Klippel JH, Vilcek J. Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon. *Science* 1982; 216(4544):429-31.

- Proctor RA, Denlinger LC, Leventhal PS, Daugherty SK, van de Loo JW, Tanke T, Firestein GS, Bertics PJ. Protection of mice from endotoxic death by 2-methylthio-ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(13):6017-20.
- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998; 50(3):413-92.
- Rapaport E. Experimental cancer therapy in mice by adenine nucleotides. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988; 24(9):1491-7.
- Rapaport E. Mechanisms of anticancer activities of adenine nucleotides in tumor-bearing hosts. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 603:142-9; discussion 9-50.
- Rapaport E, Fontaine J. Generation of extracellular ATP in blood and its mediated inhibition of host weight loss in tumor-bearing mice. *Biochem Pharmacol* 1989; 38(23):4261-6.
- Ray FR, Huang W, Slater M, Barden JA. Purinergic receptor distribution in endothelial cells in blood vessels: a basis for selection of coronary artery grafts. *Atherosclerosis* 2002; 162(1):55-61.
- Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; 283(5405):1183-6.
- Robson SC, Kaczmarek E, Siegel JB, Candinas D, Koziak K, Millan M, Hancock WW, Bach FH. Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. *J Exp Med* 1997; 185(1):153-63.
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180(1):83-93.
- Ronnblom L, Alm GV. The natural interferon-alpha producing cells in systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 2002; 63(12):1181-93.
- Ronnblom LE, Alm GV, Oberg KE. Possible induction of systemic lupus erythematosus by interferon-alpha treatment in a patient with a malignant carcinoid tumour. *J Intern Med* 1990; 227(3):207-10.
- Rossi M, Young JW. Human Dendritic Cells: Potent Antigen-Presenting Cells at the Crossroads of Innate and Adaptive Immunity. *J Immunol* 2005; 175(3):1373-81.
- Rothenfusser S, Tuma E, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. *Hum Immunol* 2002; 63(12):1111-9.
- Rothenfusser S, Tuma E, Wagner M, Endres S, Hartmann G. Recent advances in immunostimulatory CpG oligonucleotides. *Curr Opin Mol Ther* 2003; 5(2):98-106.
- Rounds S, Likar LL, Harrington EO, Kim KC, Smeglin A, Heins K, Parks N. Nucleotide-induced PMN adhesion to cultured epithelial cells: possible role of MUC1 mucin. *Am J Physiol* 1999; 277(5 Pt 1):L874-80.
- Rubartelli A, Poggi A, Zocchi MR. The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium. *Eur J Immunol* 1997; 27(8):1893-900.

- Saito H, Ebisawa M, Reason DC, Ohno K, Kurihara K, Sakaguchi N, Ohgimi A, Saito E, Akasawa A, Akimoto K, et al. Extracellular ATP stimulates interleukin-dependent cultured mast cells and eosinophils through calcium mobilization. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991; 94(1-4):68-70.
- Sak K, Boeynaems JM, Everaus H. Involvement of P2Y receptors in the differentiation of haematopoietic cells. *J Leukoc Biol* 2003; 73(4):442-7.
- Salio M, Cella M, Vermi W, Facchetti F, Palmowski MJ, Smith CL, Shepherd D, Colonna M, Cerundolo V. Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *Eur J Immunol* 2003; 33(4):1052-62.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. 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* 1994; 179(4):1109-18.
- Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Scharniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 1998; 28(9):2760-9.
- Sato Y, Miyata M, Sato Y, Nishimaki T, Kochi H, Kasukawa R. CpG motif-containing DNA fragments from sera of patients with systemic lupus erythematosus proliferate mononuclear cells in vitro. *J Rheumatol* 1999; 26(2):294-301.
- Sattin A, Rall TW. The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3', 5'-phosphate content of guinea pig cerebral cortex slices. *Mol Pharmacol* 1970; 6(1):13-23.
- Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. 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* 2000; 191(3):423-34.
- Scandella E, Men Y, Gillessen S, Forster R, Groettrup M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2002; 100(4):1354-61.
- Scandella E, Men Y, Legler DF, Gillessen S, Prikler L, Ludewig B, Groettrup M. CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. *Blood* 2004; 103(5):1595-601.
- Schnurr M, Galambos P, Scholz C, Then F, Dauer M, Endres S, Eigler A. Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines. *Cancer Res* 2001; 61(17):6445-50.
- Schnurr M, Then F, Galambos P, Scholz C, Siegmund B, Endres S, Eigler A. Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 2000; 165(8):4704-9.
- Schnurr M, Toy T, Shin A, Hartmann G, Rothenfusser S, Soellner J, Davis ID, Cebon J, Maraskovsky E. Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2004; 103(4):1391-7.

- Schnurr M, Toy T, Shin A, Wagner M, Cebon J, Maraskovsky E. Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. *Blood* 2005; 105(4):1582-9.
- Schnurr M, Toy T, Stoitzner P, Cameron P, Shin A, Beecroft T, Davis ID, Cebon J, Maraskovsky E. ATP gradients inhibit the migratory capacity of specific human dendritic cell types: implications for P2Y<sub>11</sub> receptor signaling. *Blood* 2003; 102(2):613-20.
- Schuler G, Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* 1985; 161(3):526-46.
- Shin A, Toy T, Rothenfusser S, Robson N, Vorac J, Dauer M, Stuplich M, Endres S, Cebon J, Maraskovsky E, Schnurr M. P2Y receptor signaling regulates phenotype and IFN- $\alpha$  secretion of human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2008; 111(6):3062-9.
- Shortman K, Heath WR. Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. *Nat Immunol* 2001; 2(11):988-9.
- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; 284(5421):1835-7.
- Singh-Jasuja H, Scherer HU, Hilf N, Arnold-Schild D, Rammensee HG, Toes RE, Schild H. The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur J Immunol* 2000; 30(8):2211-5.
- Sluyter R, Wiley JS. Extracellular adenosine 5'-triphosphate induces a loss of CD23 from human dendritic cells via activation of P2X<sub>7</sub> receptors. *Int Immunol* 2002; 14(12):1415-21.
- Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R, Mantovani A. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 1998; 161(3):1083-6.
- Steinberg TH, Newman AS, Swanson JA, Silverstein SC. ATP<sub>4</sub>- permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *J Biol Chem* 1987; 262(18):8884-8.
- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137(5):1142-62.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:685-711.
- Swennen EL, Bast A, Dagnelie PC. Immunoregulatory effects of adenosine 5'-triphosphate on cytokine release from stimulated whole blood. *Eur J Immunol* 2005; 35(3):852-8.
- Takasaki J, Kamohara M, Saito T, Matsumoto M, Matsumoto S, Ohishi T, Soga T, Matsushima H, Furuichi K. Molecular cloning of the platelet P2T(AC) ADP receptor:

- pharmacological comparison with another ADP receptor, the P2Y(1) receptor. *Mol Pharmacol* 2001; 60(3):432-9.
- Taylor KR, Trowbridge JM, Rudisill JA, Termeer CC, Simon JC, Gallo RL. Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem* 2004; 279(17):17079-84.
- Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2002; 195(1):99-111.
- Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72:955-62.
- Tonetti M, Sturla L, Bistolfi T, Benatti U, De Flora A. Extracellular ATP potentiates nitric oxide synthase expression induced by lipopolysaccharide in RAW 264.7 murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203(1):430-5.
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM. Topological analysis of the ATP-gated ionotropic [correction of ionotropic] P2X2 receptor subunit. *FEBS Lett* 1998; 425(1):19-23.
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM. Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem* 1999; 274(10):6653-9.
- Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 2003; 19(5):641-4.
- Trinchieri G, Santoli D, Dee RR, Knowles BB. Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Identification of the anti-viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation. *J Exp Med* 1978; 147(5):1299-313.
- Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 1994; 371(6497):516-9.
- Vanbervliet B, Bendriss-Vermare N, Massacrier C, Homey B, de Bouteiller O, Briere F, Trinchieri G, Caux C. The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *J Exp Med* 2003; 198(5):823-30.
- Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 1997; 36(9):1285-94.
- Vissers JL, Hartgers FC, Lindhout E, Teunissen MB, Figdor CG, Adema GJ. Quantitative analysis of chemokine expression by dendritic cell subsets in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* 2001; 69(5):785-93.
- Wang L, Erling P, Bengtsson AA, Truedsson L, Sturfelt G, Erlinge D. Transcriptional down-regulation of the platelet ADP receptor P2Y(12) and clusterin in patients with systemic lupus erythematosus. *J Thromb Haemost* 2004; 2(8):1436-42.



- Webb TE, Simon J, Krishek BJ, Bateson AN, Smart TG, King BF, Burnstock G, Barnard EA. Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett* 1993; 324(2):219-25.
- White N, Burnstock G. P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27(4):211-7.
- Wilkin F, Duhant X, Bruyins C, Suarez-Huerta N, Boeynaems JM, Robaye B. The P2Y<sub>11</sub> receptor mediates the ATP-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166(12):7172-7.
- Wilkin F, Stordeur P, Goldman M, Boeynaems JM, Robaye B. 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* 2002; 32(9):2409-17.
- Williams M, Jarvis MF. Purinergic and pyrimidinergic receptors as potential drug targets. *Biochem Pharmacol* 2000; 59(10):1173-85.
- Wolberg G, Zimmerman TP, Hiemstra K, Winston M, Chu LC. Adenosine inhibition of lymphocyte-mediated cytotoxicity: possible role of cyclic adenosine monophosphate. *Science* 1975; 187(4180):957-9.
- Wollenberg A, Wagner M, Gunther S, Towarowski A, Tuma E, Moderer M, Rothenfusser S, Wetzel S, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 2002; 119(5):1096-102.
- Zhang FL, Luo L, Gustafson E, Lachowicz J, Smith M, Qiao X, Liu YH, Chen G, Pramanik B, Laz TM, Palmer K, Bayne M, Monsma FJ, Jr. ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999. *J Biol Chem* 2001; 276(11):8608-15.
- Zhang FL, Luo L, Gustafson E, Palmer K, Qiao X, Fan X, Yang S, Laz TM, Bayne M, Monsma F, Jr. P2Y<sub>13</sub>: identification and characterization of a novel Gα<sub>q</sub>-coupled ADP receptor from human and mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301(2):705-13.
- Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2000; 362(4-5):299-309.
- Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, Borvak J, Nome F, Isaeva T, Wei S, Krzysiek R, Durand-Gasselin I, Gordon A, Pustilnik T, Curiel DT, Galanaud P, Capron F, Emilie D, Curiel TJ. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 2001; 7(12):1339-46.

## Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

% vol	Volumenprozent
2MeSATP	2-methylthio-Adenosin-5'-triphosphat
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AP4A	P1,P4-Diadenosin-tetraphosphat
AP5A	P1,P5-Diadenosin-pentaphosphat
AP6A	P1,P6-Diadenosin-hexaphosphat
APC	Antigen-präsentierende Zellen
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPyS	Adenosin-5'-O-(3-thio)triphosphat
BZ-ATP	2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-Adenosin-5'-triphosphat
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumionen
cAMP	Zyklisches Adenosin-5'-monophosphat
CD	Cluster of differentiation
CD(x) <sup>+</sup>	positiv für einen gegebenen Oberflächenmolekül x
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
CpG-ODN	CpG-Oligodeoxynukleotid
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
DDC	Dermale dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluorescein-Isocyanat
flt3-Ligand	fms-related tyrosine kinase 3 Ligand
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
H <sup>+</sup>	Wasserstoffionen
HEV	Hochendotheliale Venolen
I.E.	Internationale Einheit
IDC	Interstitielle dendritische Zelle
IFN-α/β/γ	Interferon-α/β/γ
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IPC	Interferon-produzierende Zelle
K <sup>+</sup>	Kaliumionen
LC	Langerhans-Zellen
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MDC	Myeloide dendritische Zelle
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumionen
MHC	Membran-histocompatibility-complex
min	Minute
MIP-3β	Macrophage inflammatory protein-3β
MLR	Mixed lymphocyte reaction
MonoDC	Monozyten-abgeleitete dendritische Zelle
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure

---

Na <sup>+</sup>	Natriumionen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ODN	Oligodesoxynukleotid
P2R/P1R	P2/P1-Rezeptoren
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBMC	Peripher blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridin Chlorophyll Protein
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E2
PI	Propidiumiodid
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PPADS	Pyridoxal-5'-phosphat-6-azophenyl 2',4'-disulfonsäure
PRRs	Pattern-recognition-Rezeptoren
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
SDF-1α	Stromal-derived factor 1α
SEM	Standard error of mean
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
T <sub>H</sub> -Zellen	T-Helferzellen
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
UDP	Uridin-5'diphosphat
UTP	Uridin-5'triphosphat
αβmeATP	α,β-methylen-Adenosin-5'-triphosphat
βγmeATP	β,γ-methylen-Adenosin-5'-triphosphat
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase

## Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. Stefan Endres bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die sich durch eine ganz hervorragende und produktive Arbeitsatmosphäre auszeichnete. Außerdem möchte ich mich dafür bedanken, dass er stets ein offenes Ohr auch für Anliegen außerhalb dieses Projekts hatte.

Meinem Doktorvater Professor Dr. Gunther Hartmann und ganz besonders meinem Betreuer Dr. Simon Rothenfußer, der mich auch über die Doktorarbeit hinaus zu Fragen des Berufsweges mit gutem Rat unterstützte, möchte ich ganz herzlich danken für die kontinuierliche Betreuung und die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten.

Für ihre Anregungen, die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit geht mein Dank auch an die damaligen Mitdoktoranden und Mitarbeiter der Abteilung, dabei vor allem an Rosemarie Kiefl, Julia Battiany, Miren Kerkmann, Anja Marschner, Daniela Sauter und Hendrik Poeck.

Ich möchte mich bei meinen Eltern für ihre große und liebevolle Unterstützung, für die Ratschläge beim Erstellen der Arbeit bei meinen Freunden sowie bei Anke und Christiane bedanken.

## Veröffentlichungen:

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgendem Kongress vorgestellt und als Abstract veröffentlicht:

**Moritz Stuplich**, Simon Rothenfusser, Max Schnurr, Anca Branzan, Stefan Endres, Gunther Hartmann.  
ATP has chemotactic activity on plasmacytoid dendritic cells, increases their costimulatory phenotype but downregulates their ability to produce IFN- $\alpha$  in response to CpG ODN.  
*American Association of Immunologists 90<sup>th</sup> Anniversary Annual Meeting, 2003 Denver, USA*

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen in folgender internationaler Fachzeitschrift als Originalarbeit veröffentlicht:

Amanda Shin, Tracey Toy, Simon Rothenfusser, Neil Robson, Julia Vorac, Marc Dauer, **Moritz Stuplich**, Stefan Endres, Jonathan Cebon, Eugen Maraskovsky, Max Schnurr.  
P2Y receptor signaling regulates phenotype and IFN- $\alpha$  secretion of human plasmacytoid dendritic cells.  
*Blood* 2008; 111(6):3062-9.

## Lebenslauf

### Moritz Stuplich

geboren am 13. April 1978 in München

als Sohn von Anna-Elisabeth Stuplich und Dr. Hans-Werner Stuplich

### Schule

1984 – 1988	Grundschule St. Anna, München
1988 – 1997	Wilhelmsgymnasium, München
01/1995 – 02/1995	Launceston College, Launceston, Großbritannien, Gast-schüler
06/1997	Abitur

### Zivildienst

09/1997 – 09/1998	Malteser München, Ausbildung und Tätigkeit als Rettungssanitä-ter
-------------------	-------------------------------------------------------------------

### Studium

10/1998	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
09/2000	Physikum
09/2001	Erstes Staatsexamen
02/2002	Beginn der Promotion bei Prof. Dr. med. S. Endres, Abteilung für Klinische Pharmakologie, Medizinische Klinik Innenstadt, Klini-kum der Universität München
04/2004	Zweites Staatsexamen
2004-2005	Praktisches Jahr: <i>Teil I:</i> Innere Medizin im Manchester Royal Infirmary University of Manchester, Großbritannien <i>Teil II:</i> Neurologie im Inselspital Bern Universität Bern, Schweiz <i>Teil III:</i> Chirurgie im Victoria Hospital Wynberg University of Cape Town, Südafrika
04/2005	Drittes Staatsexamen
05/2005	Approbation als Arzt
seit 01/2006	Assistenzarzt, Neurologische Klinik und Poliklinik, Universitätskli-nikum Bonn