



**Der Interaktionsrezeptor des Masernvirus auf hämatopoetischen Zellen;  
The Measles Virus' Interaction Receptor on Hematopoietic Cells**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Infektion und Immunität

Vorgelegt von

**Franziska Rombach**

geb. Grosso

aus

**Nürnberg**

Würzburg, **2023**



**Eingereicht am:** .....  
Bürostempel

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzender: Prof. Dr. med. Nicolas Schlegel**

**1. Betreuer: Prof. Dr. med. Lars Dölken**

**2. Betreuer: Prof. Dr. Georg Gasteiger**

**3. Betreuer: Prof. Dr. med. Hartwig Klinker**

**4. Betreuerin: Dr. Elita Avota**

**Tag des Promotionskolloquiums: Die Promovendin ist Ärztin.**

**Doktorurkunden ausgehändigt am:** .....

## Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled "The Measles Virus' Interaction Receptor on Hematopoietic Cells" is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Der Interaktionsrezeptor des Masernvirus auf hämatopoetischen Zellen“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Masern .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie .....	1
1.1.2	Klinik .....	1
1.1.3	Prophylaxe und Therapie.....	3
<b>1.2</b>	<b>Die Biologie des MV .....</b>	<b>3</b>
1.2.1	Taxonomie .....	3
1.2.2	Morphologie und Struktur.....	3
1.2.3	Replikationszyklus .....	5
1.2.4	Dissemination .....	6
1.2.5	Einfluss einer MV-Infektion auf das Immunsystem .....	6
<b>1.3</b>	<b>T-Zellen.....</b>	<b>7</b>
1.3.1	Morphologie und Ontogenese .....	7
1.3.2	Subtypen.....	8
1.3.3	T-Zell-Rezeptor und Signaltransduktion .....	8
1.3.4	Jurkat-T-Zellen .....	12
1.3.5	Effekte des MV auf T-Lymphozyten.....	12
<b>1.4</b>	<b>Potentielle Interaktionsrezeptoren des MV auf hämatopoetischen Zellen.....</b>	<b>14</b>
1.4.1	CD43 .....	15
1.4.2	Purinrezeptor 2X3.....	16
<b>1.5</b>	<b>Ziele der Arbeit .....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>Material .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Geräte.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3</b>	<b>Datenverarbeitungsprogramme .....</b>	<b>21</b>
<b>2.4</b>	<b>Kits .....</b>	<b>21</b>
<b>2.5</b>	<b>Reagenzien .....</b>	<b>22</b>
2.5.1	Antikörper .....	22
2.5.2	Farbstoffe .....	23
2.5.3	crRNA.....	23
2.5.4	Primer .....	23

2.5.5	Weitere Reagenzien .....	24
<b>2.6</b>	<b>Puffer und Lösungen .....</b>	<b>25</b>
2.6.1	Zellisolation und -kultivierung .....	25
2.6.2	Virusanreicherung .....	26
2.6.3	Durchflusszytometrie .....	26
2.6.4	RNA-Analytik.....	27
2.6.5	Protein-Analytik.....	27
2.6.6	NSM-Assay.....	28
<b>2.7</b>	<b>Zellen und Viren.....</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellkultur und -isolation aus Leukozytendepletionskammern.....</b>	<b>29</b>
3.1.1	Quantifizierung vitaler Zellen .....	29
3.1.2	Kultivierung von Suspensionszellen.....	29
3.1.3	Kultivierung semiadhärenter Zellen .....	29
3.1.4	Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Bluts aus Leukozytendepletaten .....	30
3.1.5	Isolation der Lymphozyten des peripheren Bluts.....	30
3.1.6	Anreicherung und Kultur primärer T-Zellen .....	30
3.1.7	Anreicherung CD4 <sup>+</sup> Zellen.....	31
<b>3.2</b>	<b>Virologische Methoden.....</b>	<b>33</b>
3.2.1	Virus-Präparation .....	33
3.2.2	Aliquotierung des Virus .....	33
3.2.3	Bestimmung des Virustiters.....	34
3.2.4	Aufreinigung des Virus.....	34
<b>3.3</b>	<b>Durchflusszytometrie.....</b>	<b>35</b>
3.3.1	Bestimmung der Expressionsraten zellulärer Oberflächenproteine .....	36
3.3.2	Bestimmung der gesamten Proteinexpressionsraten .....	37
3.3.3	Messung der Zellviabilität .....	37
3.3.4	Anreicherung CD43-negativer Zellen.....	38
3.3.5	Phospho-Akt-Assay .....	38
3.3.6	Rezeptorendozytose-Assay .....	38
3.3.7	Messung des zytoplasmatischen Ca <sup>2+</sup> -Gehaltes .....	39
<b>3.4</b>	<b>RNA-Analytik und Transfektion .....</b>	<b>40</b>
3.4.1	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion.....	40
3.4.2	Transfektion der Cas9-exprimierenden Jurkat-Zelllinie Jx17.....	42
<b>3.5</b>	<b>Mikroskopie.....</b>	<b>43</b>

<b>3.6</b>	<b>Messung der Proliferation von T-Zellen.....</b>	<b>44</b>
3.6.1	Proliferationsassay mit primären Zellen.....	44
3.6.2	Proliferationsassay mit Jurkat-Zellen.....	45
<b>3.7</b>	<b>Proteinanalytik .....</b>	<b>46</b>
3.7.1	Messung des Proteingehalts.....	46
3.7.2	Westernblot.....	46
3.7.3	NSM-Assay.....	48
<b>3.8</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>49</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Expression der Rezeptorkandidaten auf hämatopoetischen Zellen.....</b>	<b>50</b>
<b>4.2</b>	<b>Proliferationsassay mit Blockade der Rezeptoren durch Antikörper .....</b>	<b>52</b>
<b>4.3</b>	<b>Genetische Depletion der Rezeptoren an Jx17-Zellen .....</b>	<b>54</b>
4.3.1	CD43-Knockout.....	55
4.3.2	P2X3-Knockout .....	61
4.3.3	Doppelknockout .....	65
4.3.4	CD4-Knockout.....	68
4.3.5	pAkt-Assay mit spezifischen P2X3-Inhibitoren .....	70
<b>4.4</b>	<b>Funktionelle Charakterisierung von P2X3 in Jx17-Zellen und primären T-Zellen... 72</b>	
4.4.1	Ca <sup>2+</sup> -Einstrom nach TCR/CD28 Co-Stimulation in P2X3-Rezeptor-depletierten Jx17-Zellen .....	73
4.4.2	Ca <sup>2+</sup> -Einstrom nach TCR/CD28 Co-Stimulation mit allosterischer P2X3-Rezeptor-Inhibition in Jx17-Zellen und primären T-Zellen.....	74
4.4.3	Ca <sup>2+</sup> -Einstrom nach TCR/CD28 Co-Stimulation mit kompetitiver P2X3-Rezeptor-Inhibition in Jx17-Zellen und primären T-Zellen.....	76
4.4.4	Proliferation von primären- und Jx17-T-Zellen nach P2X3-Rezeptor-Inhibition.....	77
<b>4.5</b>	<b>MV und die zytosolische Ca<sup>2+</sup> Konzentration .....</b>	<b>79</b>
<b>4.6</b>	<b>Analyse der CD43-Oberflächenexpression auf Jx17-Zellen nach Kontakt zu MV... 79</b>	
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>81</b>
<b>5.1</b>	<b>Vorkommen von CD43 und P2X3 auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs.....</b>	<b>81</b>
<b>5.2</b>	<b>Modulation der Proliferations-Inhibition des MV mittels Blockade von P2X3 und CD43 durch Antikörper .....</b>	<b>82</b>
<b>5.3</b>	<b>CD43 und P2X3 als potentielle Interaktionsrezeptoren des MV .....</b>	<b>83</b>

<b>5.4</b>	<b>Blockade von P2X3 mit spezifischen Inhibitoren.....</b>	<b>87</b>
<b>5.5</b>	<b>Funktionelle Charakterisierung des P2X3-Rezeptors auf T-Zellen.....</b>	<b>88</b>
<b>5.6</b>	<b>Effekte des MV auf die potentiellen Interaktionsrezeptoren .....</b>	<b>91</b>
5.6.1	Einfluss des MV auf den zytoplasmatischen Ca <sup>2+</sup> -Gehalt .....	91
5.6.2	Umverteilung der Rezeptoren durch Bindung des MV.....	92
<b>5.7</b>	<b>Modell zur MV-vermittelten Suppression der T-Zell Aktivität .....</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>97</b>
<b>9</b>	<b>Formel-, Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>104</b>
9.1	Formelverzeichnis .....	104
9.2	Tabellenverzeichnis.....	104
9.3	Abbildungsverzeichnis .....	104
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>107</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>122</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Masern

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Masernvirus (MV) entwickelte sich vermutlich aus dem Rinderpest-Virus und trat vor ca. 1000 Jahren erstmalig auf<sup>1</sup>. Die Erkrankung führte früher häufig zu großen Epidemien und auch heute noch – mehr als 50 Jahre nach Einführung einer wirksamen Impfprophylaxe – sind vor allem Entwicklungsländer des Öfteren von Masern-Ausbrüchen betroffen<sup>2</sup>. Aufgrund verstärkter Implementierung der attenuierten Lebendimpfstoff-Vakzine konnte zwischen 2000 und 2014 eine Senkung der Sterblichkeitsraten um rund 80 % erzielt werden. Eine ausreichende Immunität kann dabei nach zweifacher Impfung erreicht werden. Der einzige Wirt des MV ist der Mensch, weshalb eine Elimination des Erregers in der Theorie möglich wäre. Hierfür wäre eine Durchimpfungsrate von über 95 % in allen Altersgruppen notwendig. In Deutschland lag diese 2016 bei der Schuleingangsuntersuchung von Kindern jedoch lediglich bei 92,7 %<sup>3</sup>.

Masern-assoziierte Todesfälle zählen noch immer zu den weltweit häufigsten Todesursachen von Kindern unter fünf Jahren. Betroffen sind primär Länder mit niedrigem Einkommen und schlechter Infrastruktur<sup>4</sup>. Hier war die Implementierung der Massenimpfkampagnen aufgrund logistischer und finanzieller Hindernisse bisher wenig erfolgreich<sup>5</sup>, weshalb die jährlichen Masern-assoziierten Todesraten dort wieder ansteigen. Doch auch in Deutschland haben sich im Jahr 2017 die Masern-Fälle laut Zahlen des Robert-Koch-Instituts (RKI) im Vergleich zum Vorjahr verdreifacht<sup>6</sup>. Ähnliche Phänomene werden auch in anderen Industrienationen beobachtet. Begründet ist dies zum Teil durch die immer größer werdende Zahl an Impfgegnern, welche die Vakzine aus Sorgen um deren Sicherheit, sowie aus philosophischen und religiösen Gründen ablehnen<sup>7-9</sup>.

### 1.1.2 Klinik

Die Erkrankung wird per Tröpfcheninfektion übertragen und manifestiert sich nach zehn bis zwölf Erkrankungstagen im Prodromalstadium. Erkrankte zeigen unspezifische Symptome wie Fieber, Husten, Rhinitis und Konjunktivitis, welche häufig als grippeähnlich empfunden werden. Koplik beschrieb 1896 erstmalig charakteristische weiße bis weiß-blaue Flecken, sogenannte Koplik-Flecken, an der bukkalen Mukosa, die im Prodromalstadium auftreten und



als pathognomonisch für die Krankheit gelten<sup>10</sup>. In der Folge wird ab Tag 14 ein makulopapulöses Exanthem beobachtet, welches im Kopf- und Halsbereich beginnt und sich dann über den gesamten Körper ausbreitet. Häufig treten Zeichen einsetzender Immunreaktionen auf, wie beispielsweise Lymphadenopathien. Kontagiosität besteht ca. drei bis fünf Tage vor und bis zu vier Tage nach Auftreten des Exanthems. Eine Ansteckung führt in nahezu 100 % der Fälle auch zu einem klinischen Phänotyp, da Infektions- sowie Manifestationsindex des Virus annähernd 100 % betragen. Die Eliminierung der Masern geschieht durch die körpereigene Immunabwehr und hinterlässt normalerweise lebenslange Immunität.

Komplikationen, welche vor allem in Entwicklungsländern mit schlechter Infrastruktur und mangelnder Hygiene auftreten, sind meist bakterielle Superinfektionen. Begünstigt wird die Infektion mit opportunistischen Krankheitserregern und ubiquitär auftretenden Keimen durch eine transitorische Immunsuppression, welche durch das Virus hervorgerufen wird. Diese kann bis zu sechs Wochen nach Abheilung der Krankheit andauern. Häufig sind insbesondere Pneumonien, Bronchitiden, Otitiden und Diarrhöen<sup>11</sup>.

In Immunsupprimierten kommt es in einigen Fällen im Verlauf der Erkrankung zu einer progredienten Riesenzellpneumonie oder einer auf der Persistenz der Virus beruhenden Masern-Einschlusskörperchen-Enzephalitis, welche in ca. 30 % der Fälle tödlich verläuft.

Zentralnervöse Komplikationen in Immunkompetenten sind die postinfektiöse Enzephalitis und die subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE). Die autopathologische postinfektiöse Enzephalitis tritt in rund 0,1 % der Masernfälle auf und manifestiert sich ca. vier bis sieben Tage nach Auftreten des Exanthems mit Kopfschmerzen, Fieber und Bewusstseinsstörungen. Für 10-20 % der Betroffenen endet sie tödlich, während 20-30 % Residualschäden am zentralen Nervensystem davontragen<sup>12</sup>. Die SSPE ist eine bei etwa vier bis elf Erkrankten pro 100 000 Masernerkrankungen auftretende Spät komplikation mit infauster Prognose. Bei Kindern unter fünf Jahren tritt sie deutlich häufiger auf mit 20-60 Fällen pro 100 000 Masernerkrankungen<sup>11</sup>. Sie manifestiert sich erstmalig zumeist sechs bis acht Jahre nach Infektion. Zunächst zeigen sich psychische und intellektuelle Veränderungen. Im weiteren Verlauf kommt es zum progredienten Verlust zerebraler Funktionen bis hin zum Tod. Mikroskopisch finden sich im Gehirn der Patienten entzündliche Veränderungen mit perivaskulären Infiltraten von Entzündungszellen, subkortikalen Entmarkungsherden und eine

reaktive Gliose. Intrazellulär lassen sich Einschlusskörperchen feststellen, welche virale Genome und Proteine enthalten<sup>13,14</sup>.

Insgesamt liegt die Letalität der Masern in entwickelten Ländern bei 0,05-0,1 %. In Entwicklungsländern hingegen kann sie bis zu 6 % erreichen<sup>11</sup>.

### 1.1.3 Prophylaxe und Therapie

Eine spezifische antivirale Therapie gibt es aktuell nicht. Im Fall einer Exposition soll laut Richtlinien des RKI eine Postexpositionsprophylaxe in Form von aktiver und – bei Immundefizienten – passiver Immunisierung erfolgen. Die Masern sind meldepflichtig. Bei Erkrankung und auch bei Kontakt zu infizierten Personen sollen Lehr-, Erziehungs-, Pflege- oder Aufsichtstätigkeiten bis mindestens fünf Tage nach Abklingen des Exanthems niedergelegt werden. Am wirksamsten ist noch immer die Prophylaxe in Form der Masernvakzine. Es reicht eine zweimalige Impfung mit einem attenuierten Lebendimpfstoff. Dieser wird meist in Kombination mit Mumps und Röteln verabreicht<sup>11</sup>.

## 1.2 Die Biologie des MV

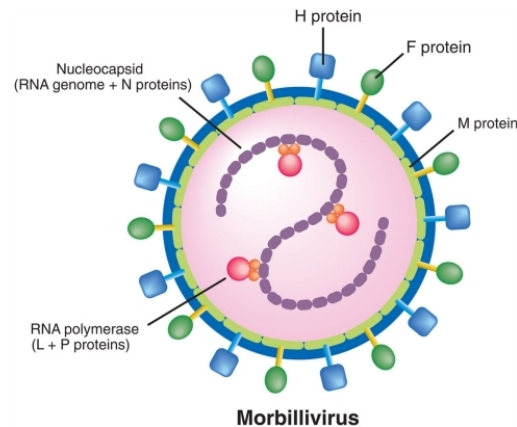
### 1.2.1 Taxonomie

MV gehört zur Ordnung der Mononegavirales, deren Vertreter alle ein einzelsträngiges RNA-Genom von negativer Polarität haben. Die Familie der Paramyxoviridae umfasst dabei behüllte Viren, welche meist das respiratorische System selbst befallen oder durch das respiratorische System übertragen werden. Das MV gehört der Gattung der Morbiliviren an<sup>15</sup>.

### 1.2.2 Morphologie und Struktur

MV ist etwa 120-140 nm groß. Es besitzt eine der Wirtsmembran entstammende Lipidschicht. Diese umhüllt den viralen Kapsid-Komplex, der das virale Genom mit den Replikations-essentiellen Strukturproteinen (Nukleokapsid-Protein, Phospho-Protein und Large-Protein) umgibt (s. Abbildung 1). Mit der Virus-Hülle direkt assoziiert sind das Matrix-Protein und die beiden inserierten viralen Glykoproteine (Hämagglutinin-Protein und Fusions-Protein). Das Virusgenom kodiert weiterhin für die Nichtstrukturproteine V und C. Diese spielen vor allem als Virulenzfaktoren in der Unterdrückung der angeborenen Immunantwort<sup>16</sup> sowie als positive Regulatoren der viralen Replikation eine Rolle<sup>17</sup>. Die Weltgesundheitsorganisation

(World Health Organisation, WHO) definiert 23 bekannte MV-Genotypen, die in die Gruppen A-H eingeteilt werden können und sich stark in ihrer weltweiten Distribution unterscheiden<sup>18</sup>.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung eines MV Partikels (mit Erlaubnis von Frontiers in Microbiology)<sup>182</sup>.

Der Eintritt des Virus in die Zielzelle wird über den F/H-Komplex, bestehend aus Fusionsprotein (F-Protein) und Hämagglutinin (H-Protein) Tetrameren, induziert. Das H-Protein vermittelt die Bindung an Rezeptoren auf der Zielzelle und katalysiert hierdurch eine Konformationsänderung des F-Proteins, welche für die Virion/Zellmembran-Fusion essentiell ist. Das F-Protein wird als inaktiver Vorläufer (F<sub>0</sub>) synthetisiert und posttranslational durch die subtilisinartige Endoprotease Furin in einen über eine Disulfidbrücke verbundenen F(1) - F(2) Komplex prozessiert. Die somit am N-Terminus des F(1) entstehende hydrophobe Sequenz wird erst infolge der durch das H-Protein vermittelten Konformation so positioniert, dass sie in die Zielzell-Membran inserieren und den Fusionsprozess einleiten kann<sup>19</sup>.

Das L-Protein verfügt über enzymatische Aktivität und katalysiert die RNA-abhängige Polymerisierung von RNA, sowie das *Capping* und die Polyadenylierung entstehender mRNAs. Es benötigt das P-Protein als Cofaktor, mit dem es einen Komplex bildet. Zusammen binden diese beiden Proteine an das virale Genom, welches vom Nucleocapsidprotein (N-Protein) umhüllt ist. So entsteht der sogenannte Ribonucleokomplex.

Das Matrixprotein (M-Protein) verbindet den Ribonucleokomplex mit der Lipidhülle des Viruspartikels und spielt daher eine Schlüsselrolle bei der Zusammen- und Freisetzung viraler Partikel. Es sitzt an der zytoplasmatischen Seite der Virushülle und dient als negativer viraler Replikations-Regulator<sup>20</sup>. Hierfür interagiert es mit dem N-Protein, welches für die Enkapsidierung des viralen Genoms über seine flexible endständige Domäne mit vielen

Wirtsproteinen interagiert. Hierzu gehören beispielsweise immunabwehrassoziierte Proteinen wie Interferon regulatorischer Faktor 3 oder Fcγ Rezeptor II<sup>21,22</sup>.

### 1.2.3 Replikationszyklus

Als Eintrittsrezeptoren des MV fungieren drei unterschiedliche Proteine. Der Lymphtropismus wird durch das Oberflächenmolekül CD150 definiert. Dieses wird lediglich auf aktivierten B- und T-Zellen, ausgereiften dendritischen Zellen (dendritic cells; DCs) und Makrophagen exprimiert. Dort dient es als Cofaktor für die zelluläre Aktivierung<sup>23</sup>. Impfstämme sind zusätzlich in der Lage, über den Komplementinhibitor CD46 in die Zellen zu gelangen, welcher auf allen kernhaltigen menschlichen Zellen exprimiert wird<sup>24</sup>. Bei epithelialen Zellen und Keratinozyten nutzt das Virus Nectin-4 als Eintrittsrezeptor. Dabei handelt es sich um ein Protein aus der Nectin-Familie, welches Teil des Adhäsoms ist<sup>25,26</sup>. Zusätzlich kann das Virus mit Pattern Recognition Receptors (PRRs) auf Antigen-präsentierenden Zellen (Toll-like Rezeptor-2; TLR-2 oder Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin; DC-SIGN) interagieren. Diese können die Aufnahme des Virus unterstützen und ferner dessen Pathogenität beeinflussen<sup>27,28</sup>.

Die Transkription viraler mRNAs in der Wirtszelle beginnt direkt nach Freisetzung des MV ins Zytoplasma. Termination, Polyadenylierung und Re-Initiierung der Transkripte werden durch sogenannte nicht-kodierende Sequenzen (non-coding sequence; NCS) reguliert. Diese flankieren die sechs offenen Leserahmen (open reading frames; ORFs) im MV-Genom<sup>29</sup>. Promotoren und Enkapsidierungssignale sind in den 5´ und 3´ terminalen NCS des Genoms enthalten<sup>30,31</sup>. Die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase bindet an die Promotorregion in der 3´-NCS und initiiert die Transkription der ersten Sequenz (N). Werden die in den intergenischen Regionen enthaltenen Regulations-Signale erreicht, erfolgt die Polyadenylierung der synthetisierten mRNA sowie die Initiation der Transkription und das 5´-*Capping* des nachfolgenden P-Gens. Der nächste Initiationspunkt bewirkt die Transskription der nachfolgenden Gene. In etwa 50 % der Fälle fällt der Polymerasekomplex vor Initiation des nachfolgenden Transkriptes vom Template ab. Hierdurch entsteht ein Gradient der mRNA-Menge nach ihrer Reihenfolge im viralen Genom (N > P/C/V, > M > F > H > L)<sup>32</sup>.

Für die Replikation des Genoms wird zunächst ein vollständiges positivsträngiges Antigenom synthetisiert, welches als Matrize für die negativsträngigen RNA-Genome dient<sup>33</sup>. Im

Anschluss wird der Ribonukleotidkomplex zur Plasmamembran der Wirtszelle transportiert. Dort führt die Interaktion der viralen M-, F- und H-Proteine zur Freisetzung neuer Viruspartikel<sup>34</sup>.

#### 1.2.4 Dissemination

Die Aufnahme des MV erfolgt über Tröpfcheninfektion durch den Respirationstrakt oder alternativ durch die Konjunktiva<sup>35</sup>. Potentielle Zielzellen sind alveoläre Makrophagen oder DCs, da diese im Gegensatz zu den alveolären Epithelzellen den Eintrittsrezeptor Differenzierungscluster (cluster of differentiation; CD) 150 exprimieren<sup>36,37</sup>. Weiterhin interagiert das Virus mit Moesin, einem Teil der ERM-Proteine (Ezrin, Radixin, Moesin), welches in der Organisation der Zellmembran und der Verankerung der Membran am Aktin-basierten Zytoskelett involviert ist. Hierdurch wird der Eintritt des Virus in die Zellen erleichtert<sup>38</sup>. Über die Lymphbahnen werden MV-infizierte Zellen in nahegelegene Lymphknoten und das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (mucosa associated lymphatic tissue; MALT) des Respirationstraktes transportiert. Dort erfolgen die Replikation und systemische Dissemination des MV. Der Transport des MV zu Leber, Niere, Haut und Atemwegen erfolgt über die Lymphe, sowie über die Blutbahn<sup>39,40</sup>; der Eintritt in die Zielzellen über CD150 und Nectin-4<sup>41,42</sup>.

Bei der Transmission wird das Virus über das respiratorische Epithel ausgeschieden, indem es basolateral in die Epithelzellen gelangt und apikal in den Mukus sekretiert wird<sup>41</sup>. Über Aerosole gelangt es schließlich in den Respirationstrakt bzw. an die Konjunktiva weiterer Personen und wird hier wieder aufgenommen (s. o.)<sup>43,44</sup>.

#### 1.2.5 Einfluss einer MV-Infektion auf das Immunsystem

Eine MV-Infektion führt zu einer spezifischen Immunantwort und anschließend lebenslanger Immunität. Klinisch äußert sich diese spezifische Immunantwort nach ca. zehn Tagen im T-Zell-abhängigen Masernexanthem<sup>45</sup>. Nach ca. zwei Wochen sind keine infektiösen Viruspartikel mehr in der zellulären Fraktion des peripheren Bluts nachweisbar. Bis zur vollständigen Elimination viraler RNA hieraus kann es jedoch mehrere Monate dauern.

In etwa so lange kann auch die MV-induzierte transiente Immunsuppression bestehen, welche opportunistische Infektionen begünstigt und teils gravierende Folgen haben kann (s. Absatz

1.2.2)<sup>46</sup>. Pirquet beschrieb 1908 eine ausbleibende Tuberkulinreaktion in MV-infizierten Patienten und stellte dabei erstmalig die Hypothese auf, dass das MV in der Lage ist, eine prolongierte Immunsuppression hervorzurufen<sup>47</sup>. Die Antwort auf Tuberkulin basiert auf der einzigen zellulär vermittelten Hypersensitivitätsreaktion (Typ IV), worin sich die zelluläre Immunität als Ziel der MV-vermittelten Immunsuppression abzeichnet.

Vor allem in der akuten Phase der Infektion lässt sich im Blut der Patienten eine Lymphopenie feststellen<sup>48</sup>. Hiervon sind langfristig überwiegend CD150 positive Gedächtniszellen betroffen<sup>49,50</sup>. Nach einer anfänglichen Aktivierung der T- Helfer (Th) 1 Lymphozyten kommt es zu einer prolongierten Th2-vermittelten Immunantwort, welche die zelluläre Immunität unterdrückt<sup>51</sup>. Zusätzlich kommt es zu einer qualitativen negativen Modulation der Lymphozyten, welche in Abschnitt 1.3.5 für T-Zellen erläutert wird.

### **1.3 T-Zellen**

T-Lymphozyten gehören zu den Leukozyten und stellen zusammen mit den B-Zellen wesentliche Komponenten der adaptiven Immunantwort dar. Seit der Zoologe Elias Metschnikov zu Beginn des 20. Jahrhunderts entdeckte, dass sich um einen in einen Seestern gestochenen Dorn bewegliche Zellen sammelten<sup>52</sup>, existierte die Theorie der zellulären adaptiven Immunabwehr. Seit den 1960er-Jahren unterscheidet man B- und T-Lymphozyten und 1974 klärten Rolf Zinkernagel und Peter Doherty wichtige Komponenten für die Aktivierung dieses Zweiges der zellulären Immunantwort auf<sup>53</sup>.

#### **1.3.1 Morphologie und Ontogenese**

Menschliche T-Lymphozyten sind rund und im inaktivierten Zustand 6-9 µm groß. Bei Aktivierung vergrößert sich ihr Durchmesser auf etwa 9-15 µm. Immunhistochemisch können sie von B-Lymphozyten durch den charakteristischen Marker CD3 differenziert werden. Hieran ist der T-Zell-Rezeptor (TCR) gebunden, welcher für die Erkennung Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex; MHC)-I- oder MHC-II-gebundener Antigene zuständig ist. Über CD3 wird das Signal in das Zellinnere weitergeleitet und prozessiert<sup>54</sup>. T-Lymphozyten haben dichtes Chromatin, einen runden Zellkern und zahlreiche Lysosomen und Ribosomen. Die Zellen werden im Knochenmark zusammen mit den B-Lymphozyten aus lymphatischen Progenitorzellen gebildet und wandern als naive T-Zellen in die kortikalen Bereiche des Thymus. Hier gehen sie durch die Wände

hochendothelialer Venolen ins Gewebe über und differenzieren sich weiter<sup>55</sup>. Autoreaktive T-Zellen werden hierbei durch negative Selektion aussortiert. T-Lymphozyten können je nach Subtyp sehr vielfältige Aufgaben erfüllen. Im Folgenden wird nur auf die der häufigsten Subtypen (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und regulatorische T-Zellen) näher eingegangen.

### 1.3.2 Subtypen

CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind die sogenannten T-Helfer-Zellen. Sie erkennen MHC-II gebundene Antigene und wirken über die Sekretion unterschiedlicher Zytokine immunregulierend. In Anwesenheit von IL-12 und IFN- $\gamma$  differenzieren sich CD4<sup>+</sup> Zellen zu einer Helferzelle vom Typ 1 aus und fördern die zelluläre Immunantwort durch Sekretion von IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$ . Die in Gegenwart von IL-4 und IL-6 differenzierten Helferzellen vom Typ 2 unterstützen hingegen eine humorale Immunantwort und sezernieren die Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13<sup>56</sup>. CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten befinden sich im peripheren Blut, wo sie den häufigsten T-Zell-Subtyp ausmachen. Außerdem sind sie in stark durchbluteten lymphatischen Geweben wie den parafollikulären Regionen in den sekundären lymphatischen Organen vorhanden.

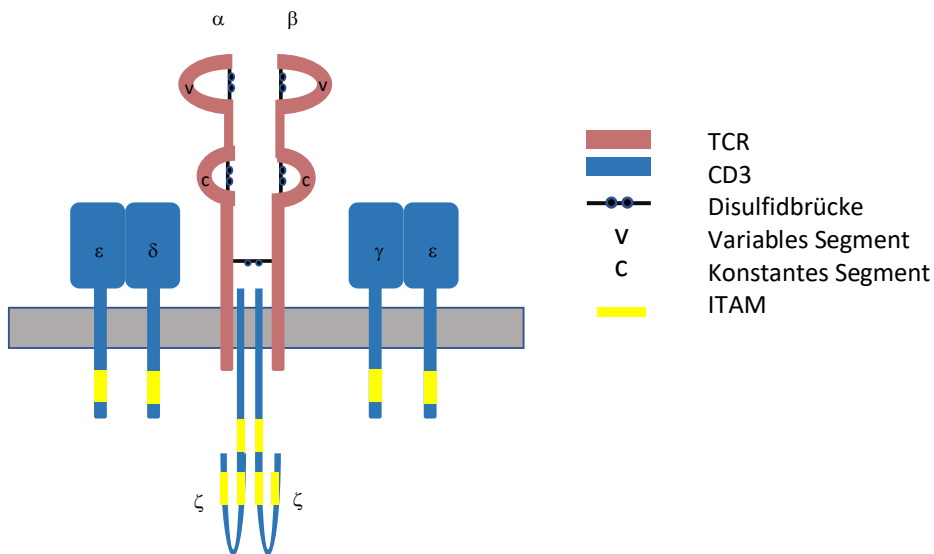
Zytotoxische T-Zellen tragen membranständige CD8<sup>+</sup> - $\alpha\beta$ -Heterodimere und erkennen Antigene, welche durch MHC-I-Moleküle präsentiert werden. Dadurch identifizieren sie vor allem Tumorzellen oder viral infizierte Zellen, in welchen sie über den Fas/FasL Signalweg oder Perforin/Granzym Apoptose induzieren können<sup>57</sup>. CD8<sup>+</sup> Zellen befinden sich überwiegend im Knochenmark, sowie in den MALT des Magen-Darm- und Respirationstraktes und der Harnwege.

Regulatorische T-Zellen kontrollieren über IL-10 und TGF- $\beta$  das Ausmaß der Immunantwort und tragen so maßgeblich dazu bei, überschießende Immunantworten (Allergien), sowie Autoimmunität zu verringern. Zudem regulieren sie die Reifung und die Produktion neuer Lymphozyten. Die Zellen können anhand ihrer Zytokinprofile in weitere Subgruppen unterteilt werden<sup>58,59</sup>.

### 1.3.3 T-Zell-Rezeptor und Signaltransduktion

Eine T-Zelle wird aktiviert, wenn der T-Zell-Rezeptor (TCR) ein Antigen erkennt und bindet. Die Aktivierung führt unter anderem zur klonalen Expansion der antigenspezifischen Zellen, der

Hochregulation von Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche, der Differenzierung zu Effektor-Zellen und der Induktion von Zytotoxizität und Zytokinproduktion (s. Abschnitt 1.3.2).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung eines T-Zell-Rezeptor-Komplexes.

Der TCR gehört zur Immunglobulin-Gen-Superfamilie<sup>60,61</sup> und ähnelt strukturell dem Fab-Fragment von Antikörpern. Er besteht aus einem  $\alpha\beta$  bzw.  $\gamma\delta$  heterodimer an der Antigenbindestelle, welches die Antigenspezifität des TCR vermittelt<sup>62,63</sup> und extrazellulär über eine Disulfidbrücke verbunden ist. Jede Untereinheit besteht aus einer konstanten Domäne (C) und einer variablen Domäne (V) sowie aus einer Transmembrandomäne und einem kurzen C-terminalen zytoplasmatischen Bereich (s. Abbildung 2). Die V-Domänen bestehen aus hochvariablen Bereichen mit V- und J-Segmenten ( $\alpha$ -Untereinheit) bzw. V- D- und J- Segmenten ( $\beta$ -Untereinheit), welche auf DNA-Ebene durch Rekombination und Insertion oder Deletion von Nukleotiden modifiziert werden. Hierdurch wird für eine große Diversität der Untereinheiten gesorgt. Dies stellt den Grundbaustein der adaptiven Immunantwort dar und ähnelt dem Prozess der Antikörper-Entstehung in B-Zellen. Positive und negative Selektion gewährleisten, dass T-Zellen mit nicht-funktionellen oder autoreaktiven TCR-Produkten vor Verlassen des Thymus aussortiert werden<sup>64</sup>.

Nach Antigenerkennung durch den TCR wird das Aktivierungssignal über CD3 ins Zellinnere weitergeleitet, wobei Stimulation durch einen anti-CD3 Antikörper ebenfalls aktivierend wirken kann<sup>54</sup>. In den zytoplasmatischen Anteilen von CD3 finden sich sogenannte Immunrezeptor Tyrosin-basierte Aktivierungsmotive (ITAMs), welche nach TCR-Ligandenbindung durch die Tyrosinkinase src phosphoryliert werden und die Zeta-Ketten-assoziierte Proteinkinase-70 (ZAP-70), ein Mitglied der Syk-Tyrosinkinase-Familie,



rekrutieren<sup>65-67</sup>. Der TCR-Komplex wird dadurch zu einer Tyrosinkinase, welche eine ganze Reihe von *downstream* Effektoren phosphoryliert und eine Signalkaskade in Gang bringt. Bei erfolgreicher Co-Stimulation führt dies zur T-Zell-Aktivierung<sup>68</sup>.

Ein wichtiges co-stimulatorisches Signal wird durch membranständiges CD28 gegeben, welches infolge Bindung an seine Liganden CD80 und CD86 auf Antigen-präsentierenden Zellen (antigen presenting cell; APC) unter anderem die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) aktiviert. Diese kann Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Triphosphat (PIP<sub>3</sub>) phosphorylieren. Daraufhin wird durch PIP<sub>3</sub> die Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne der 3-Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinase 1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase, PDK-1) sowie deren Targetprotein, die Serin-/Threoninkinase Akt rekrutiert und aktiviert. Über diesen Mechanismus werden Proliferation, Zytokinproduktion, Wachstum, Überleben und Stoffwechsel der Zelle reguliert<sup>69-72</sup>. Die Akt-Kinase kann unter anderem durch Bindung von Bax oder durch Bad-Phosphorylierung die proapoptotischen Bcl-Proteine inhibieren<sup>73</sup>. Außerdem moduliert sie über die Phosphorylierung des tuberöse Sklerose-Komplexes 2 (tuberous sclerosis complex; tsc) die Aktivierung des „im Gehirn angereicherten Ras-Homologs“ (Ras-homolog-enriched-in-brain; Rheb) und des „mechanistischen Ziels von Rapamycin“ (mechanistic target of rapamycin; mTOR), welche Translationsfaktoren und dadurch die Proteintranslation aktivieren<sup>74</sup>. Akt ist zudem in der Lage, die proliferations-inhibitorischen Proteine Forkhead-Box-Proteine O (FOXO) zu phosphorylieren, was zu deren vermehrtem Abbau und somit indirekt zu verstärkter Proliferation führt<sup>75</sup>.

Bei der TCR-Stimulation werden zunächst intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Vorräte aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) mobilisiert, sodass die zyttoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration steigt. Dadurch werden durch Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aktivierte Kanäle in der Plasmamembran aktiviert, welche zur Aufrechterhaltung der zellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration beitragen. Es werden Änderungen der Motilität und der zytoskelettalen Reorganisation der T-Zelle initiiert, wodurch der Kontakt der T-Zelle zur APC stabilisiert wird. Die Zelle polarisiert sich in Richtung der Immunsynapse (IS) zur APC hin<sup>76</sup>. Im Zuge dessen kommt es zu einer Erhöhung der Membrandynamik, welche durch transiente Vav-1-abhängige ERM-Dephosphorylierung und daraus resultierender Lockerung der Zellmembranverbindungen zu dem Aktin-Zytoskelett moduliert wird<sup>77</sup>. Im weiteren Verlauf kommt es zur

Rephosphorylierung der ERM-Proteine<sup>78</sup> und der davon abhängigen Formation des sogenannten distalen Pol Komplexes (distal pole complex; DPC). Dieser bildet sich gegenüber der IS aus und hält vermutlich negative Regulatoren der T-Zell-Funktion vom Ort der Aktivierung fern. Zudem trägt er zur Differenzierung der aktivierten Zelle bei<sup>79</sup>. Zusätzlich werden die Effektivität und Spezifität der Aktivierung unterschiedlicher stimulationsabhängiger Gene durch die Erhöhung des zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes reguliert<sup>80,81</sup>.

Ein wichtiger Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Aktivierung ist die autokrine Stimulation der purinergen Rezeptoren P2X1, P2X4 und P2X7 (s. Abschnitt 1.4.2) durch rasche Freisetzung von zellulärem Adenosintriphosphat (ATP) über Pannexin-1 Hemikanäle (Panx1). Die Öffnung der purinergen Rezeptoren trägt ebenso zur Erhöhung des zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes der stimulierten Zelle bei (s.o.) und somit zur IL-2 Produktion der Zellen und der Initiation deren T-Zell-Effektor-Funktionen<sup>82-84</sup>. Eine schnelle, lokale ATP-Freisetzung, welche durch den Stroma-Zellen-abgeleiteten Faktor (stroma cell derived factor; SDF) -1 $\alpha$  stimuliert wird, aktiviert P2X4 Kanäle. Hierdurch entsteht ein vorwärtsgekoppelter Signalkreis, der über die Aufrechterhaltung der hohen zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine hohe mitochondriale ATP-Produktion ermöglicht. Dies unterstützt einerseits die Formation von Pseudopodien und die Polarisation der Zellen und andererseits die Panx1-abhängige ATP-Freisetzung<sup>85</sup>.

Bei TCR-Stimulation der T-Zellen wird außerdem die neutrale Sphingomyelinase 2 (NSM2) aktiviert. Sphingomyelinasen katalysieren die Spaltung von Sphingomyelin zu Phosphocholin und Ceramid. Letzteres reichert sich in großen Plattformen an und verändert die biophysikalischen Eigenschaften der Zellmembran. Ceramid-angereicherte Mikrodomänen können durch die Umordnung membranständiger Proteine und Signalosomen viele biologische Prozesse modulieren. Hierzu gehören Apoptose, Migration und Proliferation<sup>86</sup>. Eingeteilt aufgrund ihres pH-Optimums werden die saure Sphingomyelinase (acid Sphingomyelinase; ASM, lysosomal lokalisiert), die alkalische Sphingomyelinase (ein intestinales Enzym), sowie die neutralen Sphingomyelinasen NSM2 (Plasmamembran) und NSM3 (ER/Golgi) unterschieden<sup>87</sup>.

Die Aktivierung der NSM2 in T-Zellen erfolgt transient und räumlich kompartimentiert. Sie scheint für die Aufrechterhaltung der T-Zell-Aktivierung notwendig zu sein: NSM2-defiziente

Zellen haben weniger phosphoryliertes CD3 $\zeta$  und ZAP-70. Mangelnde Ceramid-Freisetzung verhindert die Rekrutierung der Proteinkinase (PK) C $\zeta$  an die Zellmembran und so die Polarisierung des Mikrotubuli-organisierenden Zentrums an die Immunsynapse, die zelluläre Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung und die Proliferation<sup>88</sup>. Kontakt mit MV induziert ebenfalls eine NSM2-Aktivierung, die zeitlich und räumlich weniger begrenzt ist und so zur Suppression der T-Zell-Aktivierung beiträgt (s. Abschnitt 1.3.5)<sup>89</sup>.

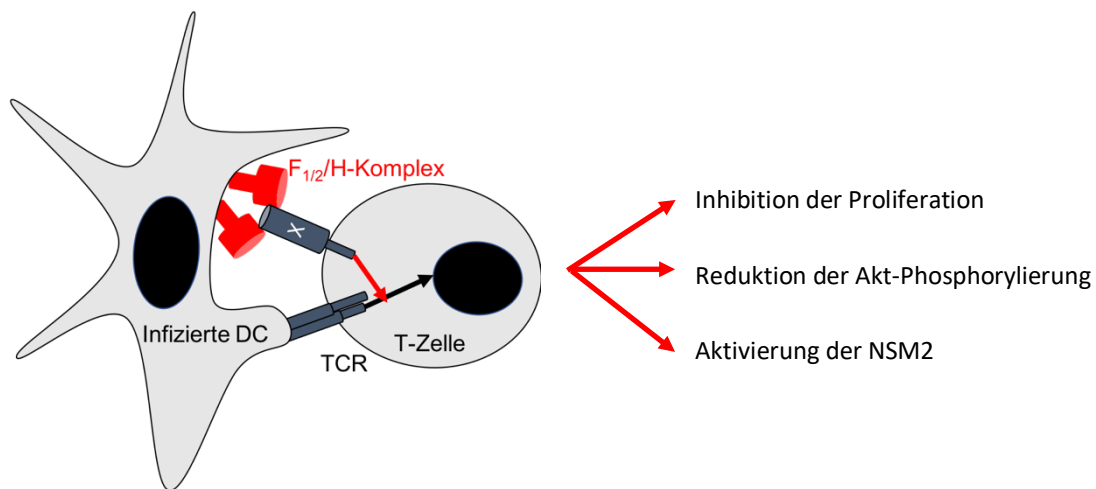
#### 1.3.4 Jurkat-T-Zellen

Die humane CD4<sup>+</sup> T-Zelllinie Jurkat wurde in den späten 1970er-Jahren aus dem peripherem Blut eines 14-jährigen, an akuter lymphatischer Leukämie (ALL) erkrankten Patienten isoliert<sup>90</sup>. In ALL-Lymphoblasten sind Defekte bzw. Veränderungen in purinergen Signalwegen häufig. So gibt es in Jurkat-Zellen eine erhöhte Expression der Adenosin-Desaminase und eine reduzierte Aktivität der Purin-Nukleosid-Phosphorylase, sowie der 5'-Ektonukleotidase<sup>91</sup>. Hinzu kommt, dass sowohl der Mitochondrien-Gehalt als auch deren Aktivität in den Jurkat-Zellen erhöht sind. Dies resultiert in verstärkter Freisetzung von ATP, erhöhten perizellulären ATP-Spiegeln und verstärkter autokriner Stimulation von P2X1 und P2X7 Rezeptoren. Diese tragen zur permanenten Aktivierung und unkontrollierten, stimulationsunabhängigen Proliferation der Zellen bei<sup>92</sup> (s. Abschnitt 1.3.3). Zudem ist in der T-Zelllinie das D3 Phosphoinositid-Phosphatase und Tensin-Homolog (PTEN) defekt, welche als Gegenspieler der PI3K die Dephosphorylierung von PIP<sub>3</sub> zu PIP<sub>2</sub> katalysiert (s. Abschnitt 1.3.3). Hierdurch kann PIP<sub>3</sub> in Jurkat-Zellen konstitutiv die Akt-Kinase binden und aktivieren, wodurch in Jurkat-Zellen dauerhaft prostimulatorische Signalwege aktiv sind<sup>93</sup>.

#### 1.3.5 Effekte des MV auf T-Lymphozyten

MV ist imstande, nach Kontakt mit T-Lymphozyten deren vollständige funktionelle und physikalische Paralyse zu induzieren. Dies geschieht unabhängig von deren Infektion und kann auch in hämatopoetischen Zellen von Nagern sowie in Zelllinien hämatopoetischen Ursprungs beobachtet werden. Eine Interaktion des viralen H-F(1/2) Glykoproteinkomplexes mit einem unbekanntem, vermutlich konservierten Rezeptor X auf den Zielzellen reicht aus, um Zellfunktionen negativ zu regulieren<sup>94</sup>. Dabei spielen die Expression von MV-Eintrittsrezeptoren, die Infektion der Zellen (im Verlauf einer Infektion im Schnitt nur ca. 2 % der mononukleären Zellen des peripheren Bluts<sup>95,96</sup>), Zelltod oder die Fusion des Virus keine Rolle<sup>97-99</sup>. *In vitro* zeigt sich nach Kontakt zu MV eine stark eingeschränkte Proliferation der

Lymphozyten nach Stimulation (funktionelle Paralyse) (s. Abbildung 3), sowie eine gestörte Zytoskelettdynamik (physikalische Paralyse) der T-Zellen<sup>100-103</sup>.



**Abbildung 3:** Effekte des MV auf T-Lymphozyten. Durch Kontakt des viralen Glykoproteinkomplexes zu einem unbekannten Rezeptor X auf der T-Zelle werden aktivierende Signale nach TCR-Stimulation negativ moduliert. Es kommt zu einer Paralyse der Zellen. MV-Kontakt führt hierbei unter anderem zu einer Inhibition der Proliferation, einer Reduktion der Akt-Phosphorylierung und einer Aktivierung der NSM2.

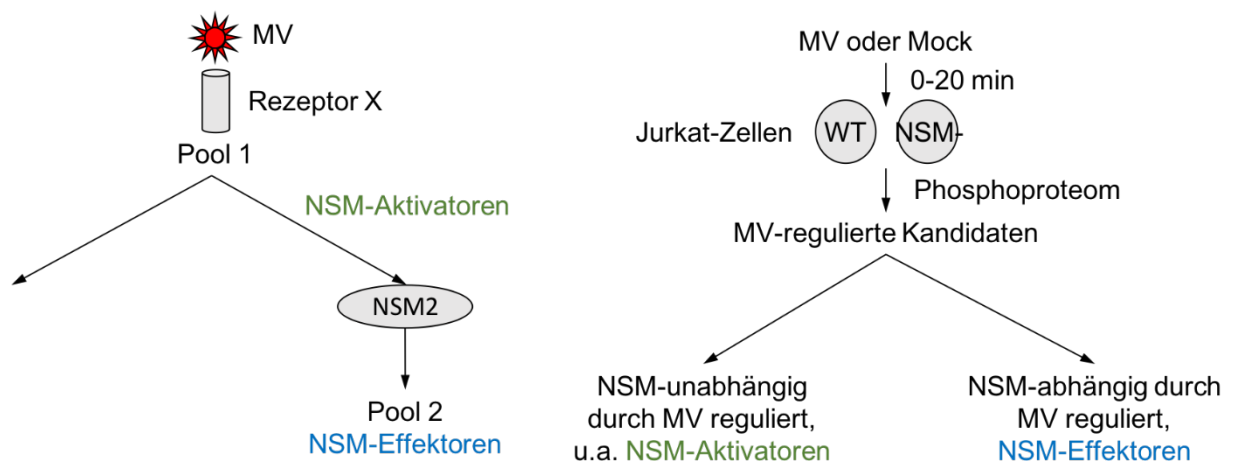
Nach Exposition zu MV erfolgt in den T-Lymphozyten eine negative Modulation des PI3K/Akt-Kinase Signalweges (s. Abschnitt 1.3.3), welche sich an einer reduzierten Phosphorylierung von Akt zeigt. Dies trägt maßgeblich zur MV-induzierten zellulären Paralyse bei, da diese durch Expression einer katalytisch aktiven Akt-Kinase in MV-kontaktierten Zellen weitestgehend aufgehoben ist<sup>102</sup>. Auch frühere Signale in der Aktivierung der Zellen wie beispielsweise die Erhöhung der zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration werden durch MV negativ beeinflusst<sup>104</sup>.

Weiterhin lässt sich beobachten, dass die Zellen nach Kontakt zu MV nicht mehr in der Lage sind, an Substraten wie Fibronectin, bzw. mit anti-CD3/CD28 Antikörpern beschichteten Platten zu adhären oder zu polarisieren. Die mangelnde Phosphorylierung von ERM-Proteinen hat eine unzureichende Ausbildung der IS mit ausgereiften DCs zur Folge<sup>100</sup>. Die Aktivierung der Ras-homologen GTPase (Rho) A und ein kompletter Ausfall zytoskelettaler Reorganisation nach Masernkontakt legen einen direkten Einfluss des Virus auf Membransignale nahe<sup>98</sup>. Nach Kontakt zu MV erfolgt ein starker Anstieg in der Aktivität der NSM2 (s. Abschnitt 1.3.3) und der ASM. Über diesen Signalweg wird vermutlich weitgehend die physikalische Paralyse der Lymphozyten initiiert, da diese in NSM2-defizienten Zellen nach Kontakt zu MV größtenteils aufgehoben ist<sup>101</sup>.

Die Charakterisierung des unbekannten Rezeptors X könnte neuen Erkenntnisgewinn über die Pathogenese der MV-induzierten Immunsuppression bringen. Durch ihn werden vermutlich zentrale Faktoren in der T-Zell-Aktivierung und -Funktion moduliert. Die Identifikation des Interaktionsrezeptors des MV auf hämatopoetischen Zellen würde daher auch zum besseren Verständnis der T-Zell-Regulation beitragen. Letztlich könnte er ein neues therapeutisches Ziel bei Masern-Patienten aber auch bei Erkrankungen mit aberranter T-Zell-Funktion darstellen.

#### 1.4 Potentielle Interaktionsrezeptoren des MV auf hämatopoetischen Zellen

Untersucht wurden in dieser Arbeit lediglich Proteine, die aufgrund der Daten eines kinetischen Phosphoproteoms als Interaktionsrezeptor des MV auf hämatopoetischen Zellen infrage kommen. Der Versuchsaufbau des Phosphoproteoms ist in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4:** Versuchsansatz des kinetischen Phosphoproteoms für die T-Zelllinie Jurkat nach Kontakt zu MV/Mock. (S. Schneider-Schaulies et al. 2018). WT und NSM2-defiziente Jurkat-Zellen wurden mit MV/Mock kontaktiert. Nach 1 h auf Eis bzw. 2, 5, 10 und 20 min bei 37 °C wurde das Phosphoproteom bestimmt. Anhand unterschiedlicher Phosphorylierung einzelner Proteine in Virus- und Mock-kontaktierten Zellen konnten potentielle Interaktionsrezeptoren des MV identifiziert werden. Die Bestimmung des Phosphoproteoms NSM2-defizienter Zellen diente hierbei der Differenzierung zwischen NSM-Aktivatoren (upstream der NSM) und NSM-Effektoren (downstream der NSM).

Das Phosphoproteom wurde für die humane T-Zelllinie Jurkat bestimmt. Eine Hälfte der Zellen wurde mit Virus kontaktiert, die andere Hälfte mit Mock. Ebenso wurde mit NSM2-defizienten Jurkat-Zellen (durch CRISPR/Cas9 auf DNA-Ebene modifiziert) verfahren. Nach 1 h auf Eis, sowie nach 2, 5, 10 und 20 min bei 37 °C wurde das Phosphorylierungsmuster des Proteoms bestimmt. Beim ersten Durchlauf wurden 2781 Phosphopeptide identifiziert, von denen nach bioinformatischer Analyse durch Florian Erhard (Institut für Virologie, Universität Würzburg) zwölf NSM-abhängige und 144 NSM-unabhängige MV-Effekte auf das Phosphorylierungsmuster zeigten. Proteine, welche sowohl in den NSM2-defizienten als auch in den Wildtyp

(WT)-Zellen erhebliche Unterschiede in der Phosphorylierung zwischen den Virus- und Mock-kontaktierten Zellen aufwiesen, kamen als Interaktionsrezeptor des MV infrage. Die Daten aller membranständigen Proteine aus dem Pool dieser 144 Kandidaten wurden weiter analysiert und die Kandidaten auf ihre Wahrscheinlichkeit geprüft. In dieser Arbeit wurden lediglich zwei der identifizierten Proteine auf ihre Interaktion mit dem MV getestet.

#### 1.4.1 CD43

CD43 (Leukosialin/Sialophorin) ist ein hochkonserviertes Transmembranprotein auf T-Lymphozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten. In B-Lymphozyten ist die CD43-Expression abhängig von Entwicklungs- und Aktivierungsstatus der Zelle. Das Molekül ist in einigen B-Zell-Subtypen nicht vorhanden<sup>105</sup>. Molekulare Defekte von CD43 sind beispielsweise beim Wiskott-Aldrich Syndrom bekannt, welches sich phänotypisch in mangelnder T-Lymphozyten- und Erythrozyten-Funktion äußert<sup>106</sup>.

CD43 hat eine Mucin-artige extrazelluläre Domäne mit nur einer N-Glykosylierungs-Stelle. Die molekulare Masse des rund 44 kDa großen Proteins wird durch etwa 80 O-Glykosylierungen um rund 62-66 % auf 115-130 kDa vergrößert<sup>107</sup>. Das Glykosylierungsniveau hängt dabei vom Aktivierungsstatus der T-Zelle ab. So wird zwischen der niedermolekularen und der hochmolekularen, aktivierungsassoziierten Glykoform unterschieden<sup>108</sup>. Eine aberrante Glykosylierung von CD43 konnte in einigen Krebsarten identifiziert werden. Spezifische Antikörper gegen solche Glykoformen sollen in Zukunft als diagnostischer Biomarker oder zur Immuntherapie verwendet werden<sup>109,110</sup>.

C-terminal verfügt CD43 über eine Serin- und Threonin-reiche intrazelluläre Domäne, welche einige Phosphorylierungsstellen aufweist und in den Nukleus transloziert werden kann<sup>111</sup>. Hier kann diese durch Interaktion mit  $\beta$ -Catenin die Expression von cMyc und Cyclin D und konsekutiv die Proliferation der Zelle fördern<sup>112</sup>. CD43 trägt außerdem zur Signaltransduktion und zur differenzierten Regulation der TCR-Aktivierung bei<sup>113,114</sup>. So wird bei TCR- und CD43-Co-Stimulation je nach Lokus der Stimulation von CD43 die Produktion proinflammatorischer oder regulatorischer Zytokine initiiert<sup>115</sup>. Hierbei hängt es zudem davon ab, wann die Stimulation von CD43 erfolgt. Wird CD43 kurz vor oder simultan mit dem TCR stimuliert, ist es in der Lage, die Aktivierungsschwelle der T-Zelle herabzusetzen, indem es die Funktionen der

E3 Ubiquitin-Protein-Ligase Casitas B-Linien-Lymphom (Cbl) inhibiert und dadurch die ZAP-70-Aktivierung verstärkt<sup>116,117</sup>.

Des Weiteren werden durch Phosphorylierung von CD43 überlebensfördernde Signalwege in den Zellen initiiert<sup>118</sup> und die Zellmigration, insbesondere zu den Lymphknoten, positiv beeinflusst<sup>113</sup>. Hierbei moduliert CD43 die Adhäsion und kann sowohl pro- als auch anti-adhäsiv wirken<sup>119,120</sup>. Bei der T-Zell-Aktivierung wird CD43 an den DPC verlagert und damit aktiv von der IS exkludiert. Der zytoplasmatische Anteil von CD43 interagiert dabei mit Moesin und wird phosphoryliert, wodurch die Migration der aktivierten Zelle positiv reguliert werden kann<sup>78,121</sup>.

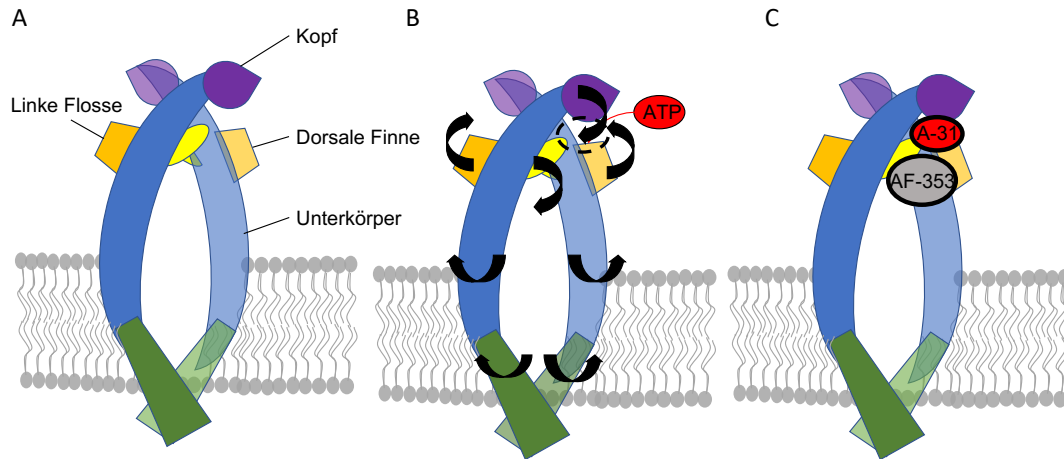
Im Gewebe ist CD43 in Kooperation mit onkogenen Signalen in der Lage, über eine Akt-abhängige Phosphorylierung und Degradierung von Merlin den Neurofibromin2/Merlin-Signalweg außer Kraft zu setzen. Hierdurch wird die Kontaktinhibition der zellulären Proliferation verhindert und unkontrolliertes Zellwachstum gefördert<sup>122</sup>. Auch an der Regulation der Apoptose ist CD43 beteiligt. In apoptotischen T-Zellen kommt es Caspase-abhängig zur lokalisierten Akkumulation (*capping*) des Sialomucins an den Zellmembranen. Zellen mit diesen *caps* werden von Makrophagen erkannt und phagozytiert<sup>123</sup>.

Diverse Pathogene wie humanes Immundefizienz Virus (HIV)<sup>124–126</sup>, Influenza A Virus<sup>127,128</sup>, Mycobakterium tuberculosis<sup>129,130</sup> und Trypanosoma cruzi<sup>131,132</sup> interagieren mit dem komplexen Glycosylierungsmuster von CD43. Dies impliziert, dass CD43 auch den Eintritt von Pathogenen verstärken kann.

#### 1.4.2 Purinrezeptor 2X3

Der Purinrezeptor 2X3 (P2X3) gehört zu einer Familie Kation-permeabler Ionenkanäle, welche sich nach Bindung extrazellulären ATPs öffnen. Die molekulare Masse des Rezeptors beträgt 44,3 kDa. Die insgesamt sieben, nach ihren pharmakologischen Eigenschaften kategorisierten, P2X-Rezeptor-Subtypen sind homolog und ähneln sich mit jeweils zwei Transmembrandomänen in ihrer Delfinförmigen Tertiärstruktur. Diese wird durch eine extrazellulär lokalisierte „Kopf“-Domäne, eine „linke Flosse“, eine „dorsale Finne“ und zwei Transmembrandomänen, welche „Körper“ und „Schwanz“ darstellen, definiert (s. Abbildung 5)<sup>133,134</sup>. Der „Schwanz“ von P2X3 ragt hierbei ins Zytoplasma und kann dort mit der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II $\alpha$  (CamKII $\alpha$ ) interagieren<sup>135</sup>. Die extrazelluläre

Domäne des Rezeptors enthält viele Schleifen mit Glycyl- und Cysteylresten. N-terminal befindet sich eine PKC-Konsensusstelle. Es wird vermutet, dass die Phosphorylierung dort die Rezeptorfunktion reguliert.<sup>136</sup>



**Abbildung 5:** Delfin-förmige Struktur des P2X3-Rezeptors. Zur besseren Übersicht sind nur zwei Untereinheiten des Trimers abgebildet. **A)** Übersicht über die Untereinheiten **B)** ATP-Bindestelle und Konformationsänderung nach ATP-Bindung. **C)** Übersicht über die Bindestelle der P2X3-Inhibitoren AF-353 (bzw. AF-219/Gefapixant) und A-317491. Abbildung angelehnt an North et al. 2013<sup>134</sup>.

Funktionelle P2X3-Rezeptoren liegen als Homo- oder Heterotrimeren mit P2X2 vor. ATP-Bindung induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch sich der Ionenkanal öffnet (s. Abbildung 5B). P2X3 liegt nur in geringer Konzentration auf der Plasmamembran vor: er wird nach Ligandenbindung rasch von der Zellmembran endozytiert und im lysosomalen Kompartiment degradiert. Nach Aktivierung kommt es zu einer ausgeprägten schnellen Desensibilisierung des Rezeptors und einer langsamen Resensibilisierung<sup>137</sup>. Diese kann durch hohe Konzentrationen an extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  beschleunigt werden<sup>138</sup>. Gleichzeitig induziert extrazelluläres ATP eine vermehrte Oberflächenexpression des Rezeptors. Hierdurch wird eine Sensitivierung auf wiederholte Stimuli begünstigt<sup>139</sup> und einer schnellen Desensibilisierung langfristig entgegengewirkt. Dieser Mechanismus ist abhängig von der  $\text{CamKII}\alpha$ , welche durch Interaktion mit P2X3 dessen Oberflächenexpression direkt moduliert<sup>135</sup>. In trigeminalen Ganglienzellen unterliegt P2X3 zudem einer Regulation durch die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Serinkinase (CASK). Bei erhöhter extrazellulärer ATP-Konzentration kommt es nach ATP-Bindung zu einem Ioneneinstrom und zu einer Konformationsänderung, wodurch CASK von P2X3 dissoziiert und dieses freigeht. Sowohl P2X3 als auch CASK können dabei mit Panx1 interagieren, wodurch es zu einem ATP-Efflux aus dem Hemikanal kommt. Auf diese Weise werden weitere P2X3-Rezeptor-Trimeren aktiviert<sup>140</sup>.



Der P2X3-Rezeptor wird primär in Nervenendigungen und Gliazellen exprimiert. Außerdem befindet er sich Herz- und Skelett- sowie glatten Muskelzellen und in einigen Leukozyten. Der Subtyp 2X3 ist in der Modulation peripherer Schmerzantworten, insbesondere neuropathischer Schmerzen<sup>141</sup>, und der Kontrolle des Harnblasenvolumens involviert. In Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (hepatocellular carcinoma; HCC) ist P2X3-Überexpression mit geringerem progressionsfreiem Überleben assoziiert. Der P2X3-Rezeptor fördert *in vitro* in HCC-Zellen nach Bindung von ATP die Proliferation der Zellen, während eine Inhibition des Rezeptors diesen Effekt aufhebt<sup>142</sup>.

Aufgrund seiner Bedeutung bei chronischen Schmerzen werden derzeit diverse P2X3-Inhibitoren entwickelt und zum Teil in klinischen Studien getestet. A-317491 ist ein isosterischer P2X3-Inhibitor, welcher in Ratten erfolgreich chronische inflammatorische und neuropathische Schmerzen reduzierte<sup>143</sup>. AF-353 hingegen ist ein allosterischer P2X3-Inhibitor, welcher ebenso für den Einsatz bei neuropathischen Schmerzen entwickelt wurde<sup>133,144</sup> (s. Abbildung 5C). Er blockiert die Konformationsänderung der P2X3 Homo- bzw. P2X2/3 Heterotrimere nach ATP-Bindung und unterbindet auf diese Weise die Kanalfunktion des Rezeptors. AF-219 (Gefapixant) bindet an dasselbe Epitop und hat denselben Wirkmechanismus. Diese allosterische Inhibition des P2X3-Rezeptors mittels Gefapixant wurde 2019 erfolgreich in einer Phase-II klinischen Studie zur Behandlung chronischen Hustens getestet<sup>145</sup>.

Über die Rolle des Subtyps P2X3 in Immunzellen ist noch wenig bekannt. In P2X3-Knockout (KO) Mäusen konnten eine Vergrößerung der Milz, sowie erhöhte Zahlen diverser mononukleärer Zellen im Milzgewebe nachgewiesen werden. Dies wird auf eine generelle Beeinträchtigung des Immunsystems und chronische Infektionen zurückgeführt<sup>146</sup>.

Durch Beeinflussung der Immunantwort können Purinrezeptoren Infektionen, insbesondere von Mykobakterien und Plasmodien retinieren<sup>147</sup>. Bei HIV-Infektionen wird die Inhibition von P2X-Rezeptoren als neue antivirale Therapiemöglichkeit diskutiert<sup>148</sup>. Diese begünstigen aufgrund ihrer proinflammatorischen Eigenschaften die Fusion, Replikation und die Freilassung des Virus<sup>149</sup>. Außerdem kann eine Inhibition des Purinrezeptor-Subtyps 2X1 die Fusion des HIV durch Blockade von Co-Rezeptor-Interaktionen verhindern<sup>150</sup>. In Hepatozyten vermitteln vor allem die Rezeptor-Subtypen P2X4 und P2X7 antivirale Immunität gegen das Hepatitis C Virus<sup>151</sup>.

## 1.5 Ziele der Arbeit

MV löst in hämatopoetischen Zellen sowohl eine physikalische als auch eine funktionelle Paralyse aus und verursacht in Patienten auf diese Weise eine langanhaltende und teils gravierende Immunsuppression. Über die frühen molekularen Ziele des MV in dieser Zell-Inhibition ist bisher wenig bekannt. Der Kontakt eines unbekanntes Rezeptors auf den Zielzellen zum viralen Glykoproteinkomplex aus F- und H-Protein ist ausreichend, um diese Paralyse zu verursachen. Auf diese Weise ist MV in der Lage, die T-Zell-Funktion fast vollständig zu inhibieren. Demnach sind die frühen molekularen Ziele des MV wohl zentrale Regulatoren der T-Zell-Immunität. Deren Identifikation liefert daher nicht nur einen Erkenntnisgewinn über die MV-induzierte Immunsuppression, sondern auch neues Wissen über die Regulation von T-Zell-Funktionen.

Ziel dieser Arbeit war, basierend auf den Daten eines kinetischen Phosphoproteoms, einige Proteine gezielt auf ihre Funktion als Interaktionsrezeptor des MV auf hämatopoetischen Zellen zu testen. Der Fokus lag dabei auf der Etablierung einer geeigneten Systematik, mit der falsche Kandidaten schnell aussortiert und richtige sicher erkannt werden können. Zunächst sollten unterschiedlichen Methoden für die Inhibition bzw. genetische Depletion der Zielproteine erprobt werden. Zudem sollten Tests angewendet werden, mit denen die physikalische und funktionelle Paralyse der hämatopoetischen Zellen quantifiziert werden konnten.

Ziel des zweiten Teils der Arbeit war die Charakterisierung der Funktion des P2X3-Rezeptors auf primären und Jurkat T-Zellen. Hierfür sollten Proliferation und stimulationsabhängige  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung nach Zugabe von spezifischen P2X3-Inhibitoren (allosterisch und isosterisch) sowie an P2X3-depletierten Jurkat-Zellen (auf DNA-Ebene durch CRISPR/Cas9 modifiziert) analysiert werden.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Amaxa Cell Line Nucleofector™ Kit V	Lonza
Brutschrank Heracell™	Thermo Fisher Scientific
EasySep™ Magnet	STEMCELL™ technologies
FACS Aria III – Durchflusszytometer	Becton Dickinson
FACS Calibur - Durchflusszytometer	Becton Dickinson
Fluorimeter Safire <sup>2</sup>	Tecan
Gelelektrophoreseschlitten (DNA)	Institutswerkstatt
Gelelektrophoreseschlitten (Protein)	Institutswerkstatt
Konfokales Laser Scanning Mikroskop CLSM 780	Zeiss
Lichtmikroskop Labovert FS	Leitz
Mehrkanalpipetten	Abimed
Neubauer-Zählkammer	Hartenstein
PCR-Maschine PTC-200 Thermo Cycler	MJ Research
Photometer	Eppendorf
Spannungsquelle	Pharmacia
Sterilarbeitsbank	Nuaire
Ultrazentrifuge Sorvall Discovery 90SE	Hitachi
Vortex	GLW
Wasserbad	GFL
Zellharvester	Tomtec
Zentrifuge Heraeus™ Pico™	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Rotina 380R	Hettich
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich

### 2.2 Verbrauchsmaterialien

Chamberslides	Labtek
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml)	Greiner bio-one

FACS-Röhrchen	Becton Dickinson
Filterpipettenspitzen SurPhob SafeSeal®	Biozym
Kryokonservierungsröhrchen	Greiner Bio One
Nylonwolle	G. Kisker GbR
Pipettenspitzen	Carl Roth GmbH
Polyvinylchlorid (PVC)-Schlauch	Hartenstein
Spritzen (50 ml)	Dispomed
Transfektions-Küvette	VWR
UV-Küvette mikro	Brand
Wasser (HPLC-Grade)	AppliChem
Zellkulturflaschen (50 ml, 250 ml, 550 ml)	Greiner bio-one
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-Napf)	Greiner bio-one
Zellkulturplatten schwarz (96-Napf, non treated)	Nunc
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one

### 2.3 Datenverarbeitungsprogramme

Cell Quest Pro	Becton Dickinson
FlowJo	Tree Star Inc.
GelDoc	Intas
ImageJ	Fiji
Image Studio™ (ver 4.0)	LI-COR Biosciences
Prism	GraphPad
Zen	Zeiss

### 2.4 Kits

First-Strand-cDNA-Synthesis-Kit	Thermo Scientific
MagniSort™ Negative Selection Kit CD4	Thermo Scientific
Phusion High Fidelity PCR Kit	Thermo Scientific

## 2.5 Reagenzien

### 2.5.1 Antikörper

Huhn anti-Kaninchen IgG Superclonal™ Alexa-Fluor®-488/633-konjugiert	Thermo Fisher Scientific
Kaninchen anti-pAkt (Threonin308)	Cell Signaling
Kaninchen anti-pAkt (Serin473)	Cell Signaling
Kaninchen anti-MV Hämagglutinin	Virolog. Institut Würzburg
Kaninchen anti-Maus IgG Superclonal™ Alexa-Fluor®-488/555/633-konjugiert	Thermo Fisher Scientific
Kaninchen anti-P2X3	Abcam
Kaninchen anti-P2X3	Alomone Labs
Kaninchen anti-P2X3 (extrazellulär)	Alomone Labs
Kaninchen anti-P2X3	Biomol
Maus anti-Cas9	Cell Signaling
Maus anti-CD3	BD Biosciences
Maus anti-CD3 PE-konjugiert	ImmunoTools
Maus anti-CD14 PE-konjugiert	ImmunoTools
Maus anti-CD19 PE-konjugiert	ImmunoTools
Maus anti-CD28	BD Biosciences
Maus anti-CD43 (DF-T1)	Santa Cruz
Maus IgG2α control FITC/PE-konjugiert	ImmunoTools
Ziege anti-Maus	Dianovo
Ziege anti-Maus HRP-konjugiert	Dianovo
Ziege anti-Maus HRP-konjugiert	Cell Signaling
Ziege anti-Kaninchen IRDye® 800CW	Licor

## 2.5.2 Farbstoffe

Annexin V FITC	BD Biosciences
HMU-PC	Moscerdam
Phalloidin-647	Atto-Tec
Propidiumiodid	BD Biosciences
Fluo-8	Molecular Probes

## 2.5.3 crRNA

Die Transfektion der Jx17-Zellen (s. Abschnitt 2.7) erfolgte mit tracrRNA und crRNA von Dharmacon™. Dabei wurden von Dharmacon generierte Sequenzen verwendet. Für jedes *Target* (Ausnahme: CD4) wurden je zwei crRNAs verwendet. Die RNAs wurden in einer Konzentration von 40 µM in HLPC-H<sub>2</sub>O aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

	crRNA 1	crRNA 2
<b>CD43</b>	CTTGATGGAACTTCCTGGT	ACCTGAGCCAACAACCTACC
<b>P2X3</b>	ATGTCCTGGCTGTCAGGT	GGCCTGAGCGCTTGCCAGGT
<b>CD4</b>	CACCTTTGACCTGAAGAACA	

**Tabelle 1:** Sequenzen der zur Transfektion verwendeten crRNAs.

## 2.5.4 Primer

Alle Primer wurden von Sigma Aldrich bezogen. Die Primer wurden in einer Konzentration von 10 µM in HLPC-H<sub>2</sub>O aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

	Vorwärts-Primer 5'	Rückwärts-Primer 5'
<b>GAPDH</b>	GAGAAGGCTGGGGCTCATTT	GTCAAAGGTGGAGGAGTGGG
<b>P2X3</b>	CCCCTCTCAACTTTGAGAAGGGA	GTGAAGGAGTATTTGGGGATGCAC

**Tabelle 2** Sequenzen der für die RT-PCR verwendeten Primer.

### 2.5.5 Weitere Reagenzien

Alle Salze wurden, wenn nicht anderweitig erwähnt, von AppliChem bezogen.

Acrylamid 4K-Solution	Applichem
AF-353	Alomone Labs (20 mM in DMSO)
Agarose	BioFrox
Annexin Binding Buffer	BD Biosciences
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich
ATP (100 mM)	Thermo Fisher Scientific
A-317491	Sigma-Aldrich (10 mM in H <sub>2</sub> O)
BCA	Sigma-Aldrich
Chloroform	AppliChem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem
Essigsäure	AppliChem
Ethanol	Applichem
Femtomax	Rockland
Fetales Kälberserum (fetal calf serum FCS)	Anprotec
Fluoromount-G®	Southern Biotech
GelRed™	Biotium
GeneRuler™ DNA Ladders (100 bp)	Thermo Fisher Scientific
Glycin	AppliChem
HANKS (-Ca <sup>2+</sup> , -Mg <sup>2+</sup> , -Phenolrot)	Thermo Fisher Scientific
HEPES pH 7,5	AppliChem
Histopaque® - 1077	Sigma-Aldrich
Isopropanol	AppliChem
Kaliumchlorid (KCL)	Hartenstein
Magermilchpulver	Saliter
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Ferak

Methanol	AppliChem
PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10 to 180 kDa	Thermo Fischer Scientific
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Protein Standard	Sigma-Aldrich
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)	AppliChem
RPMI 1640 Gibco™	Thermo Fisher Scientific
Saccharose	AppliChem
Saponin	AppliChem
TEMED	AppliChem
Tris	AppliChem
TRIzol®	Ambion
Transfektionspuffer	Mirus Bio
Tween®20	Roth

### 2.5.5.1 Lösung der Reagenzien

Substanz	Lösung
<b>AF-353</b>	20 mM ad DMSO
<b>A-317491</b>	10 mM ad H <sub>2</sub> O

**Tabelle 3:** Auflistung der Reagenzien mit Lösungsmittel.

## 2.6 Puffer und Lösungen

### 2.6.1 Zellisolation und -kultivierung

Puffer/Lösung	Inhaltsstoffe
<b>ATV</b> (Medienküche des Instituts)	136,9 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 5,6 mM D(+)-Glucose; 6,9 mM NaHCO <sub>3</sub> ; 21,5 µM Trypsin; 0,7 mM Versen; pH 7,4
<b>CD4-Isolations-Puffer</b>	PBS; 3 % FCS
<b>PBS</b> (Medienküche des Instituts)	1,4 M NaCl; 26,8 mM KCl; 71,9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 14,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Trypanblau-Lösung</b>	0,25 % (w/v) ad PBS



<b>Versen</b> (Medienküche des Instituts)	536,6 $\mu\text{M}$ KCl; 293,9 $\mu\text{M}$ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 805,9 $\mu\text{M}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 28,1 mM NaCl; 136,9 $\mu\text{M}$ Versen
---	---

**Tabelle 4:** Verwendete Lösungen zur Isolation, Kultivierung und Quantifizierung von Zellen.

## 2.6.2 Virusanreicherung

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Inhaltsstoffe</b>
<b>10 x NTE Puffer</b>	0,1 M Tris; 1 M NaCl; 0,1 M EDTA ad $\text{H}_2\text{O}$ ; pH 7,4
<b>25 % Saccharose Lösung</b>	25 % (w/v) Saccharose; ad NTE-Puffer
<b>30 % Saccharose Lösung</b>	30 % (w/v) Saccharose; ad NTE-Puffer
<b>54 % Saccharose Lösung</b>	54 % (w/v) Saccharose; ad NTE-Puffer
<b>60 % Saccharose Lösung</b>	60 % (w/v) Saccharose; ad NTE-Puffer

**Tabelle 5:** Verwendete Puffer zur Aufreinigung des MV/Mock.

## 2.6.3 Durchflusszytometrie

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Inhaltsstoffe</b>
<b><math>\text{Ca}^{2+}</math>-freier <math>\text{Ca}^{2+}</math>-Fluss-Puffer</b>	HANKS (- $\text{Ca}^{2+}$ , - $\text{Mg}^{2+}$ , -Phenolrot); 25 mM HEPES (pH 7,5); 5 % FCS
<b><math>\text{Ca}^{2+}</math>-haltiger <math>\text{Ca}^{2+}</math>-Fluss-Puffer</b>	HANKS (- $\text{Ca}^{2+}$ , - $\text{Mg}^{2+}$ , -Phenolrot); 10 mM HEPES (pH 7,5); 1,5 mM $\text{CaCl}_2$ ; 5 % FCS
<b>FACS-Puffer</b>	0,5 % (w/v) BSA; 0,02 % (w/v) $\text{NaN}_3$ ad PBS
<b>Paraformaldehydlösung</b>	2 % (w/v) Paraformaldehyd ad PBS
<b>Saponin-Puffer</b>	0,33 % (v/v); ad FACS-Puffer

**Tabelle 6:** Verwendete Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie.

## 2.6.4 RNA-Analytik

Puffer/Lösung	Inhaltsstoffe
<b>Primer</b>	10 µM ad H <sub>2</sub> O
<b>Reaktionsansatz der PCR</b>	1 µl cDNA-Lösung bzw. H <sub>2</sub> O; 5 µl 5x Phusion HF Puffer; 0,5 µl dNTPs; 1,25 µl Vorwärtsprimer; 1,25 µl Rückwärtsprimer; 0,75 µl DMSO; 15,5 µl H <sub>2</sub> O; 0,25 µl Phusion DNA-Polymerase
<b>TAE-Puffer 50x</b>	2,0 M Tris (pH 8,0); 0,1 M EDTA; 1,0 M Essigsäure; ad H <sub>2</sub> O

**Tabelle 7:** Verwendete Puffer und Lösungen für die RNA-Analytik.

## 2.6.5 Protein-Analytik

Puffer/Lösung	Inhaltsstoffe
<b>Anodenpuffer 30 mM (1 l)</b>	3,6 g Tris; 20 % Methanol; pH =10,4
<b>Anodenpuffer 300 mM (1 l)</b>	36 g Tris; 20 % Methanol; pH = 10,4
<b>Kathodenpuffer (1l)</b>	5,2 g Hexansäure; 3,0 g Tris; 20 % Methanol; pH = 9,4
<b>Laufpuffer 10x (1 l)</b>	144 g Glycin; 30,3 g Tris; 10 g SDS; pH = 8,7
<b>Lyse-Puffer</b>	1 % Triton; 50 mM Tris-HCL pH 8,0; 150 mM NaCl
<b>Milchpuffer</b>	5 g Magermilchpulver; 100 ml PBS; 0,05 % Tween®
<b>Sammelgel</b>	1,25 ml 1 M Tris pH 6,8; 1,3 ml Acrylamid-4K-Lsg. (30 %); 50 µl 20 % SDS; 100 µl 10 % APS; 10 µl TEMED; 6 ml H <sub>2</sub> O
<b>Trenngel</b>	5,3 ml 1,5 M Tris pH 8,7; 7 ml Acrylamid-4K-Lsg. (30 %); 106 µl 20 % SDS; 185 µl 10 % APS; 10 µl TEMED; 8,5 ml H <sub>2</sub> O

**Tabelle 8:** Verwendete Puffer und Lösungen für die Protein-Analytik.

## 2.6.6 NSM-Assay

Puffer/Lösung	Inhaltsstoffe
<b>NSM HMU-PC-Lösung</b>	1,35 mM HMU-PC; ad NSM Substratpuffer
<b>NSM Lyse-Puffer</b>	20 mM Hepes; 0,1 % Triton X-100; 0,2 % Chaps; 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ; 10 mM β-Glycerolphosphat; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 7,4
<b>NSM Reaktionsansatz</b>	10 µl Probe; 10 µl NSM HMU-PC-Lösung; 10 µl NSM Resuspensionspuffer; 2,2 µl ATP (100 mM, pH 7,3-7,5)
<b>NSM Resuspensionspuffer</b>	20 mM Hepes; 2 mM EDTA; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 5 mM DTT; 0,1 mM Natriummetavanadat; 10 mM Glycerolphosphat; pH 7,4
<b>NSM Substratpuffer</b>	0,1 M Natriumacetat; pH 7,4
<b>Stopp-Puffer</b>	0,2 M Glycin; 0,2 M NaOH; 0,25 % TritonX; pH 10,7

**Tabelle 9:** Verwendete Puffer und Lösungen zur Messung der Aktivität der neutralen Sphingomyelinase.

## 2.7 Zellen und Viren

Verwendet wurden die Zelllinien BJABs und B95a, welche von der Arbeitsgruppe Schneider-Schaulies zur Verfügung gestellt wurden. Die Cas9-exprimierende Jurkat-Zelllinie Jx17 wurde bei ATCC® erworben<sup>152</sup>. Leukozytendepletionskammern zur Isolation primärer Zellen wurden von der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie der Universität Würzburg bereitgestellt. Alle Spender stimmten der Ethikvereinbarung der Ethikkommission der Universität Würzburg zu. Das Wildtyp-Virus Fleckenstein (WTF) wurde ebenfalls von der Arbeitsgruppe Schneider-Schaulies bereitgestellt und wie in Abschnitt 3.2 beschrieben gezüchtet und aufgereinigt.

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkultur und -isolation aus Leukozytendepletionskammern

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Vor Verwendung wurden alle Medien mit Antibiotika (Penicillin 100 IE/ml und Streptomycin 100 µg/ml) versetzt und im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das FCS wurde vor Verwendung für 45 min bei 56 °C im Wasserbad durch Hitze inaktiviert. Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen hantiert.

#### 3.1.1 Quantifizierung vitaler Zellen

Vor dem Zählen wurden die Zellen 1:5 bis 1:10 mit Trypanblau verdünnt. Mit diesem Farbstoff können tote Zellen identifiziert werden, da er nicht in intakte Zellen diffundieren kann. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in Neubauerzählkammern unter dem Lichtmikroskop mit folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert der 4 Großquadranten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

**Formel 1:** Formel zur Berechnung der Zellzahl vitaler Zellen.

#### 3.1.2 Kultivierung von Suspensionszellen

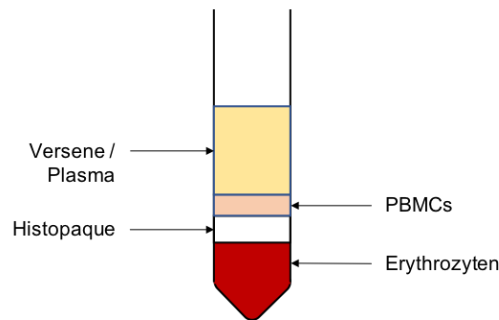
Sowohl die humane B-Zelllinie BJAB als auch die humane T-Zelllinien Jurkat und Jx17 wurden in 10 % FCS in RPMI 1640 kultiviert. Die Dichte betrug ca.  $4 \times 10^5$  Zellen/ml. Dafür wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, RT) und das Pellet in der entsprechenden Menge an Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen gegeben.

#### 3.1.3 Kultivierung semiadhärenter Zellen

B95a ist eine mit Epstein-Barr-Virus-transformierte semiadhärente B-Zelllinie. Diese wurde in RPMI 1640 mit 5 % FCS kultiviert. Sobald sich ein konfluenten Zellrasen gebildet hatte, wurden die Zellen mit 2 ml ATV von der Flasche gelöst und zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, RT). Im Anschluss wurden 1/5 – 1/10 der Zellen in RPMI 1640 mit 5 % FCS in der Zellkulturflasche ausgesät.

### 3.1.4 Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Bluts aus Leukozytendepletaten

Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) umfassen einkernige Leukozyten wie Makrophagen, Lymphozyten und Monozyten. Die PBMCs wurden aus Leukozytendepletaten, welche als Nebenprodukt bei der Aufbereitung gespendeten Bluts anfallen, isoliert.



**Abbildung 6:** Isolation von PBMCs aus Leukozytendepletaten. Schichten nach der Gradientenzentrifugation.

Das Leukozytenkonzentrat wurde mit Versene auf 50 ml verdünnt und anschließend auf 9 ml Histopaque pro 25 ml verdünnten Bluts geschichtet. Es folgte eine Dichtegradientenzentrifugation (30min, 1600 rpm, RT), durch die die zellulären Bestandteile nach Dichte aufgetrennt wurden. Die Interphase (s. Abbildung 6) enthielt die PBMCs. Sie wurde in ein frisches Röhrchen überführt und dreimal mit 50 ml PBS gewaschen (5 min, 1600 rpm, RT). Zuletzt wurden die PBMCs in je 30 ml RPMI 1640 mit 5 % FCS resuspendiert und in eine 550 ml Zellkulturflasche gegeben.

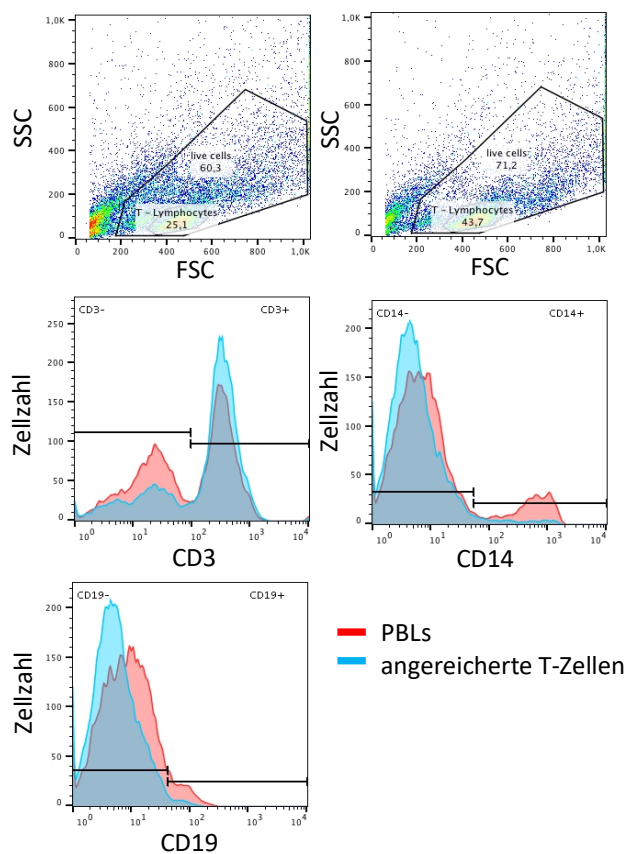
### 3.1.5 Isolation der Lymphozyten des peripheren Bluts

Die PBMCs wurden bei 37 °C liegend in RPMI/5 % FCS in den 550 ml Zellkulturflaschen inkubiert. Monozyten sind plastikhärent, weshalb der Überstand nach 2 h weitgehend frei von der monozytären Fraktion war. Die Lymphozyten des peripheren Bluts (peripheral blood lymphocytes; PBLs) konnten abgenommen und in eine neue Zellkulturflasche überführt werden.

### 3.1.6 Anreicherung und Kultur primärer T-Zellen

In dieser Arbeit wurden die T-Zellen mittels negativer Selektion durch Nylonwolle aus  $1 \times 10^8$ - $1,5 \times 10^8$  PBLs angereichert. Hierfür wurden 50 ml Spritzen mit 1 g Nylonwolle befüllt und autoklaviert. Die Säulen wurden am unteren Ende mit einem PVC-Schlauch verbunden,

welcher mit einer Metallklemme verschlossen wurde. Zunächst wurden die Spritzen zweimal mit ca. 20 ml RPMI/5 % FCS gespült, wobei das Medium zuletzt nur bis zum Rand der Wolle abgelassen wurde. Die PBLs wurden zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, RT), in 7 ml RPMI/5 % FCS resuspendiert und auf die Säule gegeben. Das Medium wurde erneut abgelassen, sodass sich die Zellsuspension in der Wolle befand, woraufhin weitere 6 ml RPMI über die Zellsuspension in die Säule gegeben wurden.



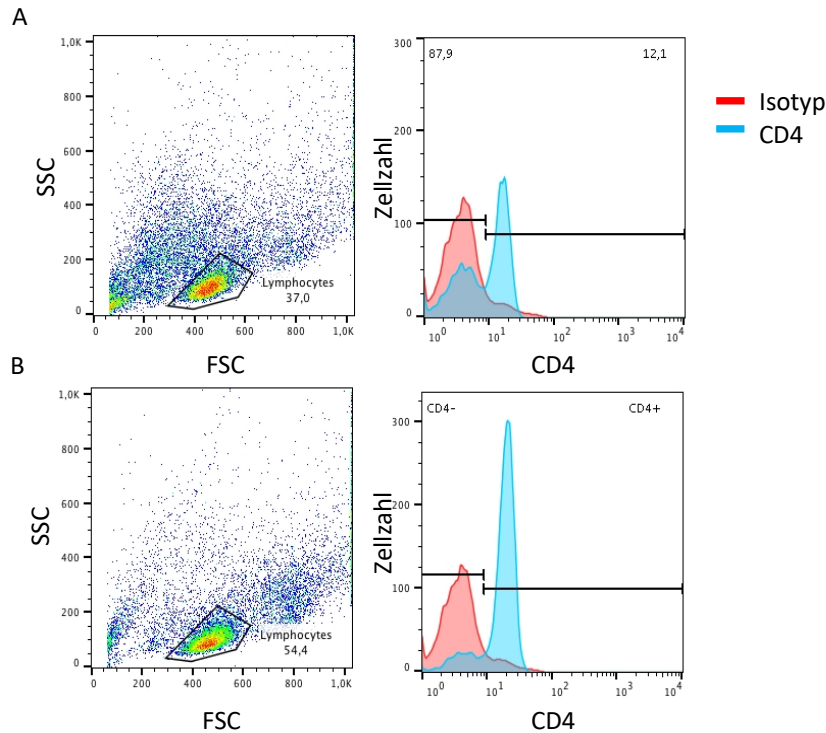
**Abbildung 7:** T-Zell-Anreicherung durch Nylonwolle. CD3 diente als Marker für T-Zellen, CD14 wurde als Makrophagen- und Monozyten-Marker genutzt und CD19 markierte die B-Zellen. Vor der Anreicherung waren 51,6 % der Zellen CD3<sup>+</sup>, danach stieg der Anteil auf 70 %.

Da T-Zellen konträr zu den restlichen PBLs nur mit sehr niedriger Affinität an Nylon binden, konnte nach 40 min Inkubation bei 37 °C eine T-Zell-angereicherte Population (s. Abbildung 7) über den PVC-Schlauch in ein 50 ml Röhrchen abgelassen und die Säule langsam mit weiteren 20 ml 5% RPMI gespült werden. Die Suspension wurde zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, RT), das Pellet in einer Dichte von  $4 \times 10^6$  in RPMI/10 % FCS resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

### 3.1.7 Anreicherung CD4<sup>+</sup> Zellen

Die Anreicherung von CD4<sup>+</sup> Zellen wurde mit dem MagniSort™ CD4 T cell Enrichment Kit von invitrogen (Thermo Fisher Scientific) an PBLs durchgeführt. Hierbei wurden mit Hilfe

magnetgebundener Antikörper und eines Magneten weitgehend alle CD4<sup>-</sup> Zellen aus der Suspension entfernt (negative Selektion); im Überstand verblieben fast ausschließlich CD4<sup>+</sup> Zellen (s. Abbildung 8).



**Abbildung 8:** CD4-Anreicherung durch negative Selektion mit Hilfe magnetgebundener Antikörper. **A)** PBLs. **B)** CD4-angereicherte PBLs. Der Anteil der CD4<sup>+</sup> Zellen betrug vor der CD4-Anreicherung 56,0 %, danach waren es 85,1 %.

Je  $1 \times 10^8$  Zellen/ml wurden in Zellisolationspuffer mit dem MagniSort™ Enrichment Antibody Cocktail (1:5) vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Die Antikörperreste wurden durch Waschen mit 4 ml Isolationspuffer (Zentrifuge: 5 min, 1600 rpm, RT) entfernt und das Pellet in der Dichte von  $1 \times 10^8$ /ml in Isolationspuffer resuspendiert. Nach Inkubation mit MagniSort™ Negative Selection Cocktail (1:5, 5 min, RT) wurde die Suspension auf 2,5 ml aufgefüllt und für 5 min in den Magneten (EasySep™ Magnet; STEMCELL™ technologies) gestellt. Der Überstand wurde in ein frisches Röhrchen gegeben, welches wiederum bis 2,5 ml aufgefüllt und für 5 min in den Magneten gestellt wurde. Schließlich wurden die CD4-angereicherten PBLs zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, RT) und in einer Dichte von  $4 \times 10^6$ /ml in RPMI/10 % FCS aufgenommen.

## 3.2 Virologische Methoden

### 3.2.1 Virus-Präparation

In dieser Arbeit wurde der MV WTF verwendet. Für die Zucht wurden pro Infektion  $5 \times 10^7$  BJABs zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, RT), in 7 ml serumfreiem RPMI aufgenommen und mit MV MOI 0,01 vermischt. Es wurden jeweils 3-7 Infektionen gleichzeitig erstellt. Die benötigte Menge an Virus wurde dabei mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Virusaliquot (ml)} = (\text{Zellzahl} \times \text{multiplicity of infection (MOI)}) : \text{Virustiter}$$

**Formel 2:** Formel zur Berechnung der nötigen Virusmenge für eine Infektion. MOI beschreibt das zahlenmäßige Verhältnis von Viruspartikeln und deren Zielzellen. In diesem Fall wurde ein MOI von 0,01 angestrebt.

Mock-Präparationen wurden analog ohne Zugabe von MV erstellt. Während der nachfolgenden 2 h Inkubationszeit bei 37 °C lagerte die Infektion im Liegen und wurde regelmäßig gewendet, um die Virus-Bindung zu verbessern. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, RT) und in 100 ml RPMI/10 % FCS aufgenommen. Nach 2-3 d Inkubation bei 37 °C im Liegen erfolgte die Virusernte. Der genaue Zeitraum hing vom zytopathischen Effekt (cytopathic effect; CPE) ab. Dieser wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Erwünscht waren dabei große Synzytien und Zellaggregate, bei denen annähernd alle Zellen involviert waren. Die Suspensionen wurden für die Virus-Ernte zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, RT) und in 3ml – 5 ml PBS pro Infektion resuspendiert. Ebenso wurde mit den Mock-Präparationen verfahren. Die Präparationen aus allen Zellkulturflaschen wurden in je einem Röhrchen gesammelt und bei -80 °C eingefroren.

### 3.2.2 Aliquotierung des Virus

Die eingefrorenen Virus- und Mock-Suspensionen wurden hierfür aufgetaut, gut gemischt und mit Hilfe eines Homogenisator-Kolbens mechanisch zerkleinert. Dadurch sowie durch das schnelle Auftauen wurden die Zellmembranen zerstört, sodass die Viruspartikel aus den Zellen isoliert werden konnten. Um die Zelltrümmer aus der Suspension zu eliminieren, wurde diese dreimal zentrifugiert (15 min, 3000 rpm, 4 °C) und das Pellet verworfen. Vom Überstand wurden ca. 2 ml für die weitere Viruszucht in Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C eingefroren. Der Rest wurde für die Bestimmung des Virustiters verwendet oder aufgereinigt (s. Abschnitt 3.2.3, Abschnitt 3.2.4).



### 3.2.3 Bestimmung des Virustiters

Die Bestimmung des Virustiters wurde an B95a-Zellen durchgeführt. Rund  $5 \times 10^4$  Zellen pro Napf wurden in einer 96-Napf Platte (half area) in RPMI/5 % FCS ausgesät und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Für die Titration wurde eine Verdünnungsreihe des aliquotierten Virus in RPMI/0 % FCS durchgeführt ( $10^{-1}$  und  $10^{-8}$ ). Jede Verdünnung wurde auf je acht Näpfe der Zellkulturplatte verteilt. Als Kontrolle dienten 8 Näpfe, die mit reinem Medium versetzt wurden. Für jede Virus-Präparation wurden zwei Platten analog erstellt. Nach 2 h Infektionsdauer bei 37 °C wurde das virushaltige Medium abgesaugt und zu jedem Napf 100 µl RPMI/5 % FCS hinzugegeben. Der Titer wurde über die 50 % Endpunkttitration (tissue culture infectious dose 50; TCID<sub>50</sub>) bestimmt. Hierfür wurde nach 3 d Inkubation bei 37 °C jeder Napf lichtmikroskopisch auf einen CPE untersucht. Mit Hilfe der Formeln nach Spearman und Kärber (Formel 3, Formel 4) konnte daraus die TCID<sub>50</sub> berechnet werden.

$$\log TCID_{50} = x_{p=1} + \frac{1}{2} d - d \sum p$$

**Formel 3:** Bestimmung der TCID<sub>50</sub>.  $x_{p=1}$  ist der dekadische Logarithmus der höchsten Verdünnungsstufe, bei der ein CPE in allen 8 Näpfen erkennbar war.  $d$  ist der dekadische Logarithmus des Verdünnungsfaktors.  $p$  entspricht dem Anteil an Näpfen in einer Verdünnungsstufe, die einen CPE aufweisen.  $\sum p$ : ist die Summe aller  $p$  ab der Verdünnungsstufe  $x_{p=1}$  und den  $p$ -Werten aller höheren Verdünnungen mit detektierbarem CPE. Als Ergebnis liefert die Formel den dekadischen Logarithmus der Verdünnungsstufe, in der bei 50 % der Näpfe ein CPE erkennbar ist.

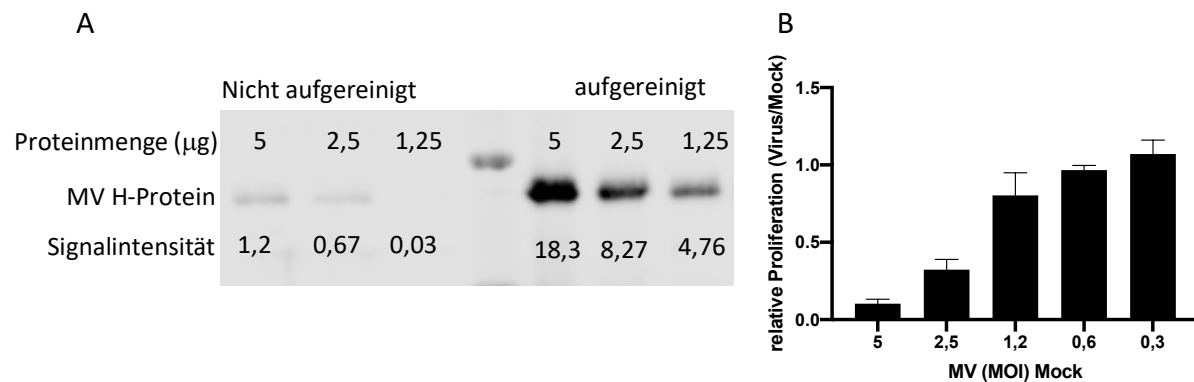
$$SE \log TCID_{50} = \sqrt{d^2 \sum p (1 - p) / (n - 1)}$$

**Formel 4:** Bestimmung des Standardfehlers der TCID<sub>50</sub>. Die Variablen wurden analog zur Formel 3 benannt.  $d$  ist der dekadische Logarithmus des Verdünnungsfaktors.  $p$  entspricht dem Anteil an Näpfen in einer Verdünnungsstufe, die einen CPE aufweisen.  $n$  ist die Anzahl der Näpfe pro Verdünnungsstufe, in diesem Fall 8.

### 3.2.4 Aufreinigung des Virus

Durch die Aufreinigung sollten das Virus konzentriert und unerwünschte Bestandteile wie Zelltrümmer aus der Virus-Präparation eliminiert werden. Insgesamt wurden drei Ultrazentrifugationsschritte bei je 26000 rpm und 4 °C unter Vakuum durchgeführt. Die Ultrazentrifugationsröhrchen wurden hierfür vor der Nutzung für 10-15 min unter UV-Licht inaktiviert und vor der Zentrifugation auf 1/100 g genau austariert. Die Mock-Präparationen wurden analog zu den Virus-Präparationen aufgereinigt. Im ersten Schritt wurden auf 5 ml Saccharose in NTE-Puffer 3-5 ml der Virus-Präparation und 35 ml steriles PBS geschichtet. Nach 1,5 h in der Ultrazentrifuge wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml NTE-

Puffer resuspendiert. Die Virussuspension sowie 10 ml NTE-Puffer wurden anschließend auf einen Saccharose-Gradienten aus 5 ml 60 % Saccharose in NTE-Puffer, 10 ml 54 % Saccharose in NTE-Puffer und 10 ml 30 % Saccharose in NTE-Puffer geschichtet. Nach der Zentrifugation (2 h) wurde die milchige Phase bei ca. 40 % Saccharose isoliert und in ein neues Röhrchen gegeben. Dieses wurde mit 35 ml NTE-Puffer aufgefüllt und erneut für 1,5 h ultrazentrifugiert. Das Pellet aus diesem letzten Schritt wurde in ca. 1-2 ml pro Infektion aliquotiert und in Portionen á 200 µl bei -80 °C eingefroren.

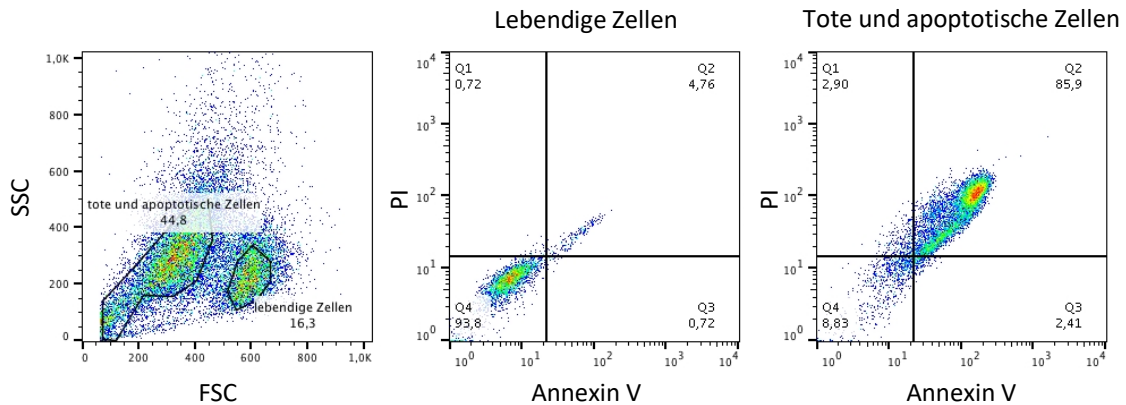


**Abbildung 9:** Übersicht über die Qualitätskontrolle der Virus-Präparationen. **A)** Westernblot eines WTF-Virus vor und nach der Aufreinigung mit einem anti-MV Hämagglutinin Antikörper. Es wurden je 5, 2,5 und 1,25 µg Gesamtprotein aufgetragen. Nach der Aufreinigung war rund 13,5-mal mehr H-spezifisches Signal innerhalb der Gesamtproteinmenge enthalten. **B)** Relative Proliferation primärer T-Zellen nach Kontakt zu den in dieser Arbeit verwendeten Viren. Die Grafik zeigt den Mittelwert der relativen Proliferationen (Virus/Mock) aller 8 Viren in den unterschiedlichen Verdünnungen.

Für die Abschätzung des Glykoproteingehaltes wurde zunächst der Proteingehalt des Aufreinigungsproduktes erfasst (s. Abschnitt 3.7.1). Im Anschluss wurden 5; 2,5 und 1,25 µg Gesamtprotein des gereinigten Virus sowie des unaufgereinigten WTF mit bekanntem Titer in einem 10 % SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem Kaninchen anti-MV-H Serum detektiert (s. Abbildung 9A). Anhand der Signalintensität im Vergleich zum unaufgereinigten WTF wurde der Gehalt an infektiösen Units ermittelt. Zur Kontrolle des Produkts wurde ein Proliferationsassay durchgeführt (s. Abschnitt 3.6.1, Abbildung 9B).

### 3.3 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können physikalische und molekulare Charakteristika von Zellen quantitativ erfasst werden. Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (fluorescence-activated cell scanning; FACS) basiert auf einer hydrodynamischen Fokussierung der Zellen, die so nacheinander an einem gebündelten Laserstrahl vorbeigeleitet werden.



**Abbildung 10:** Gating auf lebendige Zellen bei durchflusszytometrischen Messungen. Die Informationen zu Granularität und Größe der Zellen geben Auskunft über deren Viabilität und ermöglichen das Eingrenzen lebendiger Zellen für die Analyse. Annexin V und PI färben apoptotische und tote Zellen an (s. Abschnitt 3.3.3), (Annexin V und PI negative Zellen = lebendige Zellen). Die Abbildung zeigt mit 10  $\mu$ M AF-353 behandelte Jurkat Zellen nach 3 d. In der Population wurde durch die Behandlung mit dem P2X3-Inhibitor in einigen Zellen Apoptose induziert. Durch das *gating* konnte in diesem Fall eine Population mit 94 % lebendigen Zellen von einer Population mit nur 0,03 % lebendigen Zellen differenziert werden.

Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter; FSC) des Lichts durch die Zellen gibt Auskunft über deren Größe, das Seitwärtsstreulicht (sideward scatter; SSC) über deren Granularität. Da tote bzw. apoptotische Zellen geringere FSC und SSC als viable Zellen aufweisen (s. Abbildung 10), wurden Zellen mit sehr niedrigen Werten für beide Parameter in dieser Arbeit mittels gating von der Auswertung exkludiert. Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen und Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter spezifischer Antikörpern ermöglicht die Bestimmung weiterer Informationen wie beispielsweise des Expressionsniveaus eines Proteins in einer Population. Hierfür hat das verwendete FACS-Gerät (FACS Calibur; Becton Dickinson) zwei monochromatische Laser (Anregungswellenlänge 488 nm und 635 nm) und einen Photodetektor. Jeder Fluoreszenzfarbstoff verfügt über ein spezifisches Emissionsspektrum und emittiert nach Anregung durch den Laser ein charakteristisches Licht, welches durch den Photodetektor registriert wird. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit den Programmen CellQuestPro und FlowJo.

### 3.3.1 Bestimmung der Expressionsraten zellulärer Oberflächenproteine

Für eine Färbung wurden  $5 \times 10^4$ - $2 \times 10^5$  Zellen in FACS Röhrcchen überführt, je 1 ml FACS-Puffer hinzugegeben und zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, RT). Der Überstand wurde abgesaugt und der primäre Antikörper gemäß Datenblatt in FACS-Puffer verdünnt. Je 30-50  $\mu$ l der Suspension wurde zu den Zellen gegeben. Als Negativ-Kontrolle diente für jede Zelllinie jeweils mono- bzw. polyklonales IgG derselben Spezies in derselben Konzentration (Isotyp). Bei der

Kalibrierung des Lasers konnte dadurch das mittlere Energieniveau der Isotyp-Kontrolle als Hintergrundsignal festgelegt werden, welches beispielsweise durch unspezifische Bindungen mit zellulären F<sub>c</sub>-Rezeptoren, Interaktion des Immunglobulins mit zellulären Proteinen oder durch Autofluoreszenz der Zellen entsteht. Der Hintergrund wurde bei der Auswertung von der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) aller Proben abgezogen.

Nach 30-60 min Inkubation bei 4 °C wurde erneut 1 ml FACS-Puffer auf jede Probe gegeben, zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, RT) und der Überstand abgenommen. Der Sekundärantikörper war fluoreszenzgekoppelt und richtete sich gegen den konstanten F<sub>c</sub>-Teil der Spezies des primären Antikörpers. Er wurde 1:200 mit FACS-Puffer verdünnt. Jeweils 50 µl der Verdünnung wurde auf die Proben gegeben (30-60 min, 4 °C im Dunkeln). Durch den folgenden Waschschrift mit 1 ml FACS-Puffer (Zentrifuge: 5 min, 1600 rpm, RT) wurden Antikörperreste aus der Probe entfernt. Das Pellet wurde in 100-150 µl FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Messung auf Eis gestellt.

### 3.3.2 Bestimmung der gesamten Proteinexpressionsraten

Die Färbung erfolgte analog zur Färbung zellulärer Oberflächenproteine. Allerdings wurden die Zellen vor der Inkubation mit dem primären Antikörper mit 200 µl 2 % PFA in PBS fixiert (20 min auf Eis) und mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (Zentrifuge: 5 min, 1600 rpm, RT). Für die Verdünnung der Primär- und Sekundärantikörper wurde FACS-Puffer mit 0,33 % Saponin verwendet. Die Inkubation der Proben während den Färbungen erfolgte bei RT unter Lichtausschluss für 30-60 min. Saponin ist ein Detergenz, welches die Zellmembran permeabilisiert, wodurch die Antikörper in das Innere der Zelle gelangen und an ihr Zielprotein binden können. Auch bei Gesamtprotein-Färbungen wurden die Zell-Pellets nach den beiden Färbeschritten in 100-150 µl FACS-Puffer aufgenommen und konträr zu den oberflächlichen Färbungen bis zur Messung bei RT unter Lichtausschluss gelagert.

### 3.3.3 Messung der Zellviabilität

Um die Viabilität der Zellen zu messen, wurde eine Annexin A5-FITCs und Propidiumiodid (PI) Färbung durchgeführt. Bei apoptotischen Vorgängen wird Phosphatidylserin (PS) an die äußere Membran der Zellen verlagert. Annexin A5 bindet an solche negativ geladenen Phospholipide in der Zellmembran, wodurch mittels FITC-gekoppeltem Annexin A5 PS+ Zellen detektiert werden können. Propidiumiodid (PI) lagert sich in die DNA der Zellen ein, kann

allerdings nicht durch intakte Zellmembranen gelangen. Sterbende Zellen haben eine erhöhte Membranpermeabilität und werden daher durch PI angefärbt. Es wurden je  $1 \times 10^5$  Zellen gefärbt. Alle Proben wurden je einmal mit 1 ml kaltem PBS sowie mit 1 ml Annexin Binding Buffer gewaschen (Zentrifuge: 5 min, 1600 rpm, RT) und in Annexin Binding Buffer aufgenommen. Annexin A5-FITC und PI wurden 1:50 in Annexin Binding Buffer verdünnt hinzugegeben. Die Suspension wurde für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert und dann bis zur Messung auf Eis gestellt. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer (FACS Calibur; Becton Dickinson) mit dem Programm P3 für Annexin-FITCs und dem Programm P5 für PI. Bei der Auswertung wurden nur Annexin A5- und PI-negative Zellen als lebendige Zellen gewertet.

### 3.3.4 Anreicherung CD43-negativer Zellen

Die Anreicherung wurde am FACS Aria III (Becton Dickinson) durchgeführt. Alle Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Es wurden  $1 \times 10^7$  Zellen mit FACS-Puffer gewaschen (5 min, 1600 rpm, RT) und in 2 ml FACS-Puffer mit anti-CD43 Antikörper 1:50 für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen mit FACS-Puffer erfolgte die Färbung mit dem Sekundärantikörper (1:200 verdünnt in 2 ml FACS-Puffer). Bevor die Zellen in 500  $\mu$ l RPMI/5 % FCS aufgenommen wurden, wurden sie erneut mit FACS-Puffer gewaschen (5 min, 1600 rpm, RT). Der Erfolg der Anreicherung wurde direkt im Anschluss durchflusszytometrisch erfasst und die sortierten Zellen in 1 ml RPMI/10 % FCS in Kultur genommen.

### 3.3.5 Phospho-Akt-Assay

MV inhibiert in T-Zellen kontaktabhängig die Phosphorylierung von Akt im Vergleich zu Mock-kontaktierten Zellen. Für den Assay wurden  $1 \times 10^5$  Jurkat-Zellen in FACS Röhrchen transferiert und nach einer Zentrifugation (5 min, 1600 rpm, RT) in 150  $\mu$ l RPMI/10 % FCS aufgenommen. Aufgereinigtes, UV-inaktiviertes ( $1,5 \text{ J/cm}^2$ ) Virus (entsprechend MOI 5) bzw. Mock wurde hinzugegeben und auf die Zellen zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, RT). Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurde die Phosphorylierung von Akt durchflusszytometrisch mittels eines spezifischen Phospho-Akt (pAkt) Antikörpers gemessen (für das Protokoll der Färbung s. Abschnitt 3.3.2).

### 3.3.6 Rezeptorendozytose-Assay

Infolge Ligandenbindung werden Rezeptoren oft internalisiert. Um dies zu erfassen, wurde eine durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von CD43 durchgeführt.

Zunächst wurde UV-inaktiviertes ( $1,5 \text{ J/cm}^2$ ) MV (entsprechend MOI 5) bzw. Mock zu  $1 \times 10^5$  Zellen in  $100 \mu\text{l}$  RPMI/10 % FCS pro Messpunkt gegeben. Die Suspension wurde zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, RT) und für 1 h auf Eis gestellt, um die MV-Bindung zu verbessern. Im Anschluss folgte eine Inkubation der Proben bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  für 0, 10, 20 und 40 min. Vor der Färbung mit spezifischen Antikörpern wurden die Proben mit  $200 \mu\text{l}$  PBS/2 % PFA fixiert (20 min auf Eis) und mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (Zentrifuge: 5 min, 1600 rpm, RT). Die Färbung erfolgte nach dem üblichen Protokoll für die Detektion oberflächlicher Proteine (s. Abschnitt 3.3.1).

### 3.3.7 Messung des zytoplasmatischen $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes

Der zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt wurde durchflusszytometrisch mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Fluo-8 gemessen, welcher nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung verstärkt fluoresziert. Fluo-8 wird in einer veresterten Form zur Zellsuspension gegeben und kann aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften in die Zellen diffundieren. Im Zytoplasma wird die Estergruppe des grünen Fluorophors abgespalten, wodurch dieser nicht mehr aus der Zelle herausdiffundieren kann und akkumuliert.

Zunächst wurden  $4 \times 10^6$  Zellen einmal in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluss-Puffer (s. Tabelle 6) gewaschen (Zentrifuge: 5 min, 1600 rpm, RT) und in 1 ml  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Puffer mit Fluo-8 ( $4 \mu\text{M}$ ) beladen. Die Suspension wurde bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert (30 min) und im Anschluss einmal in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen (Zentrifuge: 5 min, 1600 rpm, RT). Zur optimalen Deesterifizierung des Farbstoffes wurden die Zellen in 1 ml  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluss-Puffer aufgenommen und erneut bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert (30 min). Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, RT) und das Pellet in 1 ml  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluss-Puffer (s. Abschnitt 2.6.2) resuspendiert. Im Anschluss wurden je  $100 \mu\text{l}$  der Zell-Suspension auf FACS-Röhrchen verteilt und bis zu Messung bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Bei jeder Messung wurde zunächst das basale Level aufgezeichnet und nach ca. 20 s ein Agonist hinzugegeben. Jurkat-Zellen wurden vor dem Beladen mit Fluo-8 für 2 h in RPMI/0 % FCS inkubiert, um homogenere Ergebnisse zu erhalten. Für die Auswertung wurde das Maximum der MFI (Fluo-8) innerhalb von 500 s nach Stimulation durch Flow-Jo ermittelt und auf den Mittelwert der basalen MFI vor Zugabe des Agonisten normalisiert.

#### 3.3.7.1 Messung der stimulationsabhängigen $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung nach P2X3-Inhibition

Vor der Beladung mit Fluo-8 wurden  $4 \times 10^6$  primäre Zellen für 2 h in 2 ml RPMI/10 % FCS mit A-317491 ( $10 \mu\text{M}$ ) bzw. AF-353 ( $5 \mu\text{M}$ ) inkubiert. Als Kontrolle für den allosterischen Inhibitor

AF-353 diente DMSO 1:4000. Dieses wurde in gleicher Weise zu den Zellen gegeben. Bei Jurkat-Zellen erfolgte die Präinkubation äquivalent in RPMI/0 % FCS. Die Beladung der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 3.3.7 beschrieben. Alle verwendeten  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluss-Puffer enthielten hierbei die Inhibitoren (A-317491: 10  $\mu\text{M}$ , AF-353: 5  $\mu\text{M}$ ) oder gegebenenfalls DMSO (1:4000).

### **3.4 RNA-Analytik und Transfektion**

#### **3.4.1 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion**

Mit Hilfe der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (reverse transcriptase polymerase chain reaction; RT-PCR) kann eine Analyse des Genexpressionsstatus der Zellen durchgeführt werden. Isolierte RNA wird durch die Reverse-Transkriptase in komplementäre DNA (complementary DNA; cDNA) umgeschrieben und dient dann als Template für eine Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction; PCR). Hierbei werden Gen-spezifische Primer eingesetzt, um ein DNA-Segment zu amplifizieren, welches dann mittels Gelelektrophorese detektiert werden kann.

##### *3.4.1.1 RNA-Isolation*

Die RNA wurde aus  $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  Zellen isoliert. Diese wurden zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, RT), in 1 ml TRIzol-Reagent resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach 5 min Inkubation (RT) wurde 200  $\mu\text{l}$  Chloroform hinzugegeben, die Reaktionsgefäße für 15 s geschüttelt und erneut bei RT inkubiert (3 min). Nach einer Zentrifugation (15 min, 1300 rpm, 4 °C) konnte die obere, wässrige Phase, in der die RNA enthalten war, von der proteinhaltigen Interphase und der unteren, organischen Phase mit DNA abgenommen werden. Für die Präzipitation der RNA wurden 10  $\mu\text{g}$  Glykogen und 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol (100 %) hinzugegeben. Nach 10 min Inkubation (RT) wurde das Reaktionsgemisch zentrifugiert (10 min, 13000 rpm, 4 °C), wodurch die RNA als Pellet sichtbar wurde. Dieses wurde mit 1 ml Ethanol (75 %) gewaschen (5 min, 1300 rpm, 4 °C), isoliert und luftgetrocknet (5 min, RT). Je nach Größe des Pellets wurde die isolierte RNA in 12-25  $\mu\text{l}$  Wasser (HPLC-Grade) resuspendiert und zur Lösung für 10 min bei 55 °C darin inkubiert. Die Bestimmung des RNA-Gehaltes erfolgte photometrisch. Hierfür wurde 1  $\mu\text{l}$  der Lösung 1:100 in Wasser (HPLC-Grade) verdünnt und die Extinktion bei den Wellenlängen 260 und 280 nm bestimmt.

### 3.4.1.2 cDNA-Synthese

Die isolierte, einzelsträngige RNA wurde über eine RNA-abhängige DNA-Polymerase in cDNA transkribiert. Hierfür wurde das First-Strand-cDNA-Synthesis-Kit von Thermo Scientific verwendet. Zu 0,5-5 µg RNA wurden 1 µl (100 µM) OligodT Primer und 1 µl (100 µM) random hexamer Primer geben. Nach Zugabe von H<sub>2</sub>O (HLPC-Grade) bis zu einem Gesamtvolumen von 11 µl erfolgte die Denaturierung der RNA bei 65 °C (5 min). Daraufhin wurden die Reaktionsgefäße zentrifugiert (1 min, 13000 rpm, RT) und auf Eis gestellt. Nachfolgend wurde die reverse Transkription durch Zugabe von 4 µl 5x reaction buffer, 1 µl (20 U/µl) RNase-Inhibitor, 2 µl (10 mM) dNTP-Mix und 2 µl (200 U/µl) M-MuLV Reverse Transkriptase initiiert. Dabei wurde der Reaktionsansatz zunächst bei RT (5 min) und im Anschluss für 60 min bei 37 °C inkubiert.

### 3.4.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der PCR können durch die Wahl spezifischer Primer gezielt DNA-Segmente amplifiziert und im Anschluss auf einem Agarose-Gel detektiert werden. Wird die PCR mit cDNA durchgeführt, ermöglicht dies eine Bestimmung der Expression bestimmter Gene in den Zellen. Für die Amplifizierung der DNA-Segmente wurden dabei folgende drei Schritte 35-mal wiederholt, wodurch ein exponentieller Anstieg der DNA-Menge erzielt wurde: Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Anlagerung der spezifischen Primer (Annealing) und Synthese neuer DNA-Doppelstränge (Elongation). Im ersten Zyklus wurde die Denaturierung der cDNA durch Erhitzen auf 98 °C für 1 min durchgeführt, in den nachfolgenden Zyklen wurde der Schritt dann auf 30 s verkürzt. Die optimale Temperatur für das Annealing der Primer war von der Basenfolge der verwendeten Primer abhängig und lag für den Nachweis von P2X<sub>3</sub> bei 65 °C. Nach 30 s wurde der Ansatz für 30 s auf 72 °C erhitzt, um eine optimale Effizienz der Taq-Polymerase zu gewährleisten, durch die nun die DNA-abhängige DNA-Polymerisierung erfolgte (Elongation). Durch Abkühlen auf 4 °C wurde die Reaktion beendet. In dieser Arbeit wurde für die PCR das Phusion High-Fidelity PCR Kit verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die PCR ist Tabelle 7 zu entnehmen. In jeder PCR wurde zusätzlich zu den cDNA-haltigen Ansätzen auch eine sogenannte Wasser-Probe mitgeführt, welche statt cDNA lediglich H<sub>2</sub>O (HLPC-Grade) enthielt und als Indikator für Verunreinigungen und falsch positive Ergebnisse diente.



#### 3.4.1.4 Auftrennung und Detektion der DNA mittels Gelelektrophorese

In einem elektrischen Feld können bei der Gelelektrophorese geladene Moleküle, in diesem Fall DNA-Fragmente, aufgetrennt werden. Die Agarose-Gele in dieser Arbeit enthielten 2 % Agarose, welche durch Erhitzen in der Mikrowelle in 75 ml TAE-Puffer gelöst wurde. Um die DNA sichtbar zu machen, wurden 1,5 µl des interkalierenden Farbstoffes GelRed hinzugegeben und das Gemisch in eine Gelkammer mit einem eingelegten Kamm gegeben. Nach 30 min bei RT konnte das PCR Produkt (2-6 µl) mit 2 µl 6x Ladepuffer vermischt und auf das polymerisierte Gel aufgetragen werden. Ein Marker mit definierten Fragmentgrößen von 100 bp wurden ebenso aufgetragen (3 µl) und sollte bei der Auswertung einen Anhaltspunkt über die Größe der visualisierten DNA-Fragmente geben. Für die Auftrennung wurde das beladene Gel in eine Kammer mit TAE-Puffer gegeben und ein elektrisches Feld mit einer Stärke von 120 V angelegt. Nach 1-2 h konnten die Fragmente aufgrund des GelRed-Farbstoffes unter UV-Licht visualisiert und abfotografiert werden.

#### 3.4.2 Transfektion der Cas9-exprimierenden Jurkat-Zelllinie Jx17

Für die Ablation potentieller Interaktionsrezeptoren des MV aus Jurkat-Zellen wurde ein CRISPR/Cas9 basiertes System verwendet. Die Zelllinie Jx17 exprimiert stabil die bakterielle Endonuklease Cas9, welche mit Hilfe von tracrRNA und crRNA in der Lage ist, an spezifischen DNA-Sequenzen Doppelstrangbrüche zu verursachen. Bei nachfolgender Reparatur der DNA kann es zu Frameshift-Mutationen (Deletionen oder Insertionen) kommen, wodurch die Expression des betreffenden Gens verhindert wird. Die crRNA ist bei dem System komplementär zu einem Sequenzmotiv des zu editierenden Genabschnittes. Durch deren Bindung an die tracrRNA, welche Bestandteil des Ribonukleoproteinkomplexes der Cas9 ist, wird die Endonuklease an die Sequenz rekrutiert und katalysiert die Entfernung des Sequenzmotivs aus der DNA.

Die Sequenzen der verwendeten crRNAs sind in Tabelle 1 aufgelistet. Es wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen transfiziert. Für jedes Gen (ausgenommen CD4) wurden stets zwei unterschiedliche crRNAs benutzt und entweder alleine oder in einem Verhältnis von 1:1 angewendet. Als Kontrollzellen dienten nur mit tracrRNA-transfizierte Zellen. Die nötige Menge der Jx17-Zellsuspension wurde abgenommen, zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, RT) und das Zellpellet mit der Pipette gut getrocknet. Daraufhin wurden die Transfektionsansätze vorbereitet. Hierfür

wurden je 4 µl der crRNA und 4 µl der tracrRNA für 5 min auf 95 °C erhitzt, damit sich die RNAs aneinanderlagerten.

Für jeden Ansatz wurden 100 µl Mirus Transfektionsmedium mit dem RNA Aliquot vermischt, sodass die RNA-Gesamtkonzentration 3,2 µM betrug (je 1,6 µM der tracrRNA und 1,6 µM der crRNA). Die Elektroporation wurde am Amaxa® Cell Line Nucleofector® von Lonza mit dem Programm X.005 durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen 10 min bei RT im Transfektionsmedium inkubiert und die Suspension in 1 ml RPMI/10 % FCS überführt. Nach ca. 16 h bei 37 °C wurde das Medium durch Zentrifugation (1 min, 8000 rpm, RT) entfernt und die Zellen in 1 ml frischem Medium aufgenommen (RPMI/10 % FCS). Nach 2-3 d wurde der Transfektions-Erfolg durchflusszytometrisch (s. Abschnitt 3.3) kontrolliert und die Transfektion gegebenenfalls wiederholt.

### **3.5 Mikroskopie**

Die mikroskopischen Aufnahmen in dieser Arbeit wurden mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (confocal laser-scanning microscope; CLSM) 780 von Zeiss gemacht. Für alle Aufnahmen wurde das 40x Öl Objektiv verwendet. Hierfür wurden die abzubildenden Strukturen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gefärbt. Die Anregung der in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte mit den 488, 543 oder 633 nm Laserkennlinien (Argon/Helium-Neon-Laser). In einem Konfokalmikroskop ist konträr zum herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop eine Lochblende verbaut, welche das Licht auf einen kleinen Punkt bündelt. Infolgedessen wird zu jedem Zeitpunkt nur ein kleiner Ausschnitt des Präparates abgebildet und andere Ebenen ausgeblendet. Auf diese Weise kann durch das sequenzielle, mehrfache Abrastern vieler kleiner Bildausschnitte nacheinander eine schärfere Darstellung des gesamten Präparates erreicht werden.

Für die Färbung der Zellen wurden zunächst die Kammern der *Chamber Slides* (=Objektträger mit Kammern) mit 100 µl Poly-L-Lysin überzogen und bei 37 °C inkubiert (30 min). Im Anschluss wurden Poly-L-Lysin-Rückstände durch dreimaliges Waschen mit 200 µl PBS entfernt und der Objektträger zunächst für 30 min bei 60 °C, dann für 2 h bei RT getrocknet. Die Zellen ( $1 \times 10^5$  Jurkat-Zellen oder  $5 \times 10^5$  primäre Zellen) wurden zur besseren Adhäsion in 100 µl serumfreiem RPMI auf die Objektträger gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde das Medium abgenommen und 200 µl 4 % PFA für 20 min bei RT auf die Zellen gegeben. Das PFA wurde dafür auf 37 °C erwärmt, um temperaturbedingte morphologische

Veränderungen der Zellen während der Fixierung zu vermeiden. Nach diesem und jedem der nachfolgend beschriebenen Schritte wurden die Kammern dreimal mit 200 µl PBS gewaschen.

Zur Permeabilisierung wurde 200 µl 0,1 % Triton in PBS für 5 min bei RT in die Kammern gegeben. Um unspezifische Bindestellen der Antikörper zu blockieren, erfolgte vor der Färbung mit den gemäß Datenblatt in 100 µl PBS/1 % BSA verdünnten Antikörpern eine Inkubation mit 200 µl PBS/5 % BSA für 1-2 h. Die spezifischen Primärantikörper verblieben bei 4 °C für mindestens 16 h auf dem Präparat; die Sekundärantikörper, sowie Phalloidin für 2-3 h bei RT im Dunkeln.

Vor dem Eindecken wurden die Plastikkammern vorsichtig entfernt und der Objektträger mit einem Vakuum getrocknet. Als Eindeckmedium wurde Fluoromount-G® verwendet (100 µl). Dieses wurde gleichmäßig auf dem Objektträger verteilt, woraufhin das Deckglas möglichst frei von Luftblasen angebracht wurde. Nach dem Trocknen des Eindeckmediums (2 h, RT) lagerte das Präparat bis zur Mikroskopie bei 4 °C im Dunkeln.

### **3.6 Messung der Proliferation von T-Zellen**

#### **3.6.1 Proliferationsassay mit primären Zellen**

Die Böden einer 96-Napf Platte (flat bottom) wurden zunächst mit je 50 µl Ziege-anti Maus (GAM, goat-anti-mouse) (25 µg/ml in sterilem 50 mM Tris pH 8,7-9,0) überzogen. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wurde die Lösung abgesaugt. Je  $1 \times 10^5$  Zellen/Napf wurden zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, RT) und in 100 µl RPMI/10 % FCS pro Napf aufgenommen. Daraufhin wurde RPMI/10 % FCS mit 2 µg/ml anti-CD3 Antikörper und 2 µg/ml anti-CD28 Antikörper gemischt und 1:1 auf die Suspension primärer Zellen gegeben, sodass die Antikörper in einer Endkonzentration von 1 µg/ml vorlagen. Um die Antikörperbindung zu verbessern, wurde das Gemisch 20 min auf Eis gestellt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension (je 200 µl) auf die Näpfe verteilt. Für jeden Messpunkt wurden dabei Triplikate erstellt. Nach 2 d Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen mit Tritiumthymidin (1:500, 16 h) markiert.

Proliferierende Zellen inkorporieren das markierte Thymidin bei der Zellteilung in die DNA, weshalb Näpfe mit einer stark proliferierenden Population höhere Inkorporationswerte zeigen. Die Messung erfolgte am Zellharvester von Tomtec. Die Proben wurden hierfür auf eine Fiberglasmatte gesaugt und diese bei 50 °C für 1 h getrocknet. Im Anschluss wurde die

Matte bündig in eine Folientasche eingeschweißt, in welche über ein Loch 5 ml Messlösung gegeben wurden. Hierbei wurde die Matte vollständig benetzt, wobei Luftblasen und überschüssige Flüssigkeit auf ein Papier ausgestrichen wurden. Zuletzt wurde die Folientasche zugeschweißt, in eine passende Kassette eingesetzt und die Aktivität der Platte mit dem Counter gemessen.

Bei der Auswertung wurde die relative Proliferation der Zellen ermittelt. Hierfür wurde der Mittelwert der Triplikate der Kontrollgruppe (Mock bzw. unbehandelt) errechnet und die Werte der Testgruppe (Virus bzw. behandelt) durch diesen Mittelwert geteilt. In die Auswertung wurde jeweils der Mittelwert der drei technischen Replikate einbezogen.

#### *3.6.1.1 Proliferationsassay zur Kontrolle der Funktionalität des aufgereinigten MV*

Das gereinigte MV bzw. Mock wurde zentrifugiert (1 min, 8000 rpm, RT), um Saccharose-Reste zu entfernen. Der Überstand wurde mit dem UV-Linker bei 1,5 J/ cm<sup>2</sup> inaktiviert und nach der Stimulation der Zellen in fünf unterschiedlichen Konzentrationen (entsprechend MOI 5; 2,5; 1,2; 0,6; 0,3) auf die Suspensionen gegeben. Die Zellen und das Virus wurden zentrifugiert (1 min, 8000 rpm, 4 °C), um die Bindung des Virus zu verbessern, wieder resuspendiert und auf die Näpfe verteilt (je 200 µl). Das *labeling* und das *harvesting* erfolgte nach dem in 3.6.1 beschriebenen Protokoll.

#### *3.6.1.2 Proliferationsassay mit primären T-Zellen und spezifischen Inhibitoren für P2X3*

Vor der Stimulation wurden 3x10<sup>5</sup> Zellen in 600 µl RPMI/10 % FCS, sowie je 3x10<sup>5</sup> Zellen in 600 µl RPMI/10 % FCS mit unterschiedlichen Konzentrationen von AF-353 (5, 2,5 und 1,25 µM) und A-317491 (10, 5 und 2,5 µM) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Da AF-353 in DMSO gelöst war, wurde als Kontrolle zu einigen Zellen DMSO in denselben Konzentrationen gegeben (1:4000, 1:8000, 1:16 000). Die Stimulation, das *labeling* und das *harvesting* der Zellen erfolgten wie in Absatz 3.6.1 beschrieben.

### 3.6.2 Proliferationsassay mit Jurkat-Zellen

#### *3.6.2.1 Proliferationsassay mit Jurkat-Zellen nach Kontakt mit MV*

Um den Einfluss der Depletion eines Oberflächenproteins auf die MV-induzierte Proliferations-Inhibition in Jurkat-Zellen zu quantifizieren, wurde die Proliferation der KO-Zellen, und tracrRNA-transfizierter Jx17-Zellen nach Kontakt zu MV bzw. Mock erfasst. Hierfür wurden 2,5x10<sup>4</sup> Zellen pro Napf zunächst für 2 h in serumfreiem RPMI mit einer Dichte von

5x10<sup>5</sup>/ml inkubiert. Mit aufgereinigtem, UV-inaktiviertem (1,5 J/cm<sup>2</sup>) Virus bzw. Mock wurde auf Eis eine Verdünnungsreihe (entsprechend MOI 20, 10, 5) in 50 µl RPMI/10 % FCS pro Napf durchgeführt und die Suspension auf die Nöpfe verteilt. Die Zellen wurden in 50 µl RPMI/10 % FCS pro Napf aufgenommen und auf die Virus- bzw. Mock-Lösungen gegeben. Die Platte wurde zentrifugiert (15 min, 1600 rpm, 25 °C), und 1 d bei 37 °C inkubiert. Um zu gewährleisten, dass den Zellen genügend Nährstoffe für eine optimale Proliferation zur Verfügung standen, wurden nach 24 h 100 µl RPMI/10 % FCS hinzugegeben. Das *labeling* mit [3H]Thymidin sowie die Messung erfolgte wie in Abschnitt 3.6.1 beschrieben.

### 3.6.2.2 Proliferationsassay mit Jurkat-Zellen und spezifischen Inhibitoren für P2X3

Je 5x10<sup>4</sup> Jurkat-Zellen wurden in 200 µl RPMI/10 % FCS mit unterschiedlichen Konzentrationen von AF-353 (5, 2,5 und 1,25 µM), DMSO (1:4000, 1:8000, 1:16 000) und A-317491 (10, 5 und 2,5 µM) aufgenommen und auf die Nöpfe verteilt. Das *Labeling* und die Messung erfolgten wie in 3.6.1 beschrieben.

## 3.7 Proteinanalytik

### 3.7.1 Messung des Proteingehalts

Mit dem Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid; BCA)-Test kann der Proteingehalt einer Probe erfasst werden. Zweiwertige Kupfer-Ionen binden an Peptidbindungen von Proteinen und werden bei alkalischen pH-Werten zu einwertigen Kupfer-Ionen reduziert. Diese bilden mit der BCA einen blau-violetten Farbkomplex, welcher photometrisch erfasst werden kann.

Je 5 µl der Probe wurde mit 1 ml BCA und 20 µl Kupfersulfat vermischt. Anstatt der Probe wurde in einem weiteren Ansatz ein Proteinstandard mit definierter Proteinmenge hinzugegeben. Im *blank*-Ansatz, welcher zur Erfassung des Hintergrunds diente, war lediglich das BCA und das Kupfersulfat enthalten. Die Proben wurden bei 60 °C (15 min) zur Ausbildung der Farbkomplexe inkubiert. Im Anschluss wurde der Proteingehalt am Photometer mit dem BCA/Protein-Programm gemessen.

### 3.7.2 Westernblot

Beim Westernblot werden Proteine zunächst auf einem Sodiumdodecylsulfat (SDS) Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Hier können sie mithilfe von Primär- und Sekundärantikörpern detektiert und ihre

Expression semiquantitativ analysiert werden. Das SDS maskiert die Ladung der Proteine, sodass die Auftrennung lediglich der Größe nach erfolgt.

#### *3.7.2.1 Herstellung von Zell-Lysaten und elektrophoretische Protein-Auftrennung*

Es wurden definierte Proteinmengen der Zell-Lysate aus  $1 \times 10^7$  Jurkat-Zellen bzw.  $3 \times 10^7$  primären Zellen aufgetragen. Diese wurden zur Lyse zunächst zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, 21 °C) und mit 1 ml PBS gewaschen (Zentrifuge: 1 min, 8000 rpm, RT). Das Pellet wurde in 200  $\mu$ l Lyse-Puffer aufgenommen. Es wurden jeweils 2  $\mu$ l Protease Inhibitor (100x) hinzugegeben. Daraufhin wurde der Ansatz für 1 h auf Eis gestellt und durch regelmäßiges Vortexen homogenisiert. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 3x Loading Dye gemischt und für 5 min bei 95 °C aufgekocht.

Das Trenngel (s. Tabelle 8) wurde gemischt, in den Schlitten gegossen und mit 300  $\mu$ l Isopropanol überzogen. In dieser Arbeit wurden Gele mit einem Polyacrylamid-Gehalt von 10 % verwendet. Sobald das Trenngel getrocknet war, wurde das Isopropanol abgenommen, das Sammelgel (s. Tabelle 8) aufgegossen und ein Kamm eingesetzt, welcher die Taschen formte.

Nach 15-30 min (RT) wurde der Schlitten in eine mit Laufpuffer befüllte Schale gestellt. Nachdem die Kammer des Schlittens mit Laufpuffer befüllt worden war, wurde der Kamm gezogen und die Taschen mit Laufpuffer ausgespült. In eine der Taschen wurden 4  $\mu$ l PageRuler™ Prestained Protein Ladder gegeben. Dies gab später Anhalt über die Größe der detektierten Proteine. Im Anschluss wurden 50, 25 und 12,5  $\mu$ g Gesamtprotein mit 20-30  $\mu$ l 6x loading dye vermischt und aufgetragen. Für die elektrophoretische Auftrennung wurde ein elektrisches Feld mit einer Stärke von 7-14 mA für 16 h angelegt.

#### *3.7.2.2 Proteintransfer auf eine Nitrozellulose-Membran*

Für den Proteintransfer wurde die untere Platte der Proteintransferbox mit destilliertem Wasser befeuchtet und zwei in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere aufgelegt. Das Gel wurde aus dem Schlitten entfernt, zurechtgeschnitten, ebenfalls in Kathodenpuffer getränkt und auf die beiden Filterpapiere gelegt. Eine Nitrozellulose-Membran sowie zwei weitere Filterpapiere wurden mit 30 mM Tris Anodenpuffer durchfeuchtet und auf das Gel gelegt. Den Abschluss bildeten zwei mit 300 mM Tris Anodenpuffer durchweichte Filterpapiere und die Anodenplatte der Proteintransferbox. Für den Transfer wurden für 1-2 h 125 mA angelegt.

### 3.7.2.3 Protein-Detektion und Entwicklung des Blots

Um unspezifische Bindestellen der Antikörper zu blockieren, wurde die Nitrozellulosemembran für 20 min bei RT in Milchpuffer inkubiert. Der Primärantikörper wurde entsprechend der Angaben im Datenblatt in Milchpuffer oder 5 % BSA in PBS/0,05 % TWEEN® verdünnt und auf die Membran gegeben, welche darin für 16 h bei 4 °C schüttelnd inkubiert wurde. Vor Zugabe des Sekundärantikörpers wurde die Membran dreimal für ca. 15 min in PBS mit 0,05 % TWEEN® gewaschen. Dieser wurde dann gemäß des Datenblatts in Milchpuffer verdünnt und für 2 h bei RT auf die Membran gegeben. Zuletzt wurde überschüssiger Antikörper durch dreimaliges Waschen (PBS/0,05 % TWEEN®, 15 min, RT) wieder entfernt.

Um die Ladekontrolle (s.u.) zu registrieren, wurde ein Sekundärantikörper verwendet, welcher an ein 800 cw Fluorophor gekoppelt war und daher direkt gemessen werden konnte. Für die Detektion der Zielproteine wurde stets an horse raddish peroxidase (HRP) -gekoppelter Antikörper verwendet. Bei diesem wurden vor der Messung je 500 µl der ECL 1 und 2 Lösung für 1 min auf die Membran gegeben und gleichmäßig verteilt. Das Signal der Chemilumineszenz wurde für 5 min gemessen, das der Fluorophor-gekoppelten Antikörper für 3 min.

Als Ladekontrolle wurde für jeden Westernblot zusätzlich zu den Zielproteinen auch ein sogenanntes *housekeeping protein* (ein Protein, welches in allen Zellen in etwa gleicher Menge konstitutiv exprimiert wird) angefärbt. Für die Auswertung wurde die Signalintensität der Banden mit dem Programm Image Studio™ bestimmt. Die Intensität des Zielproteins wurde zunächst auf die der Ladekontrolle normiert. Es folgte eine Normierung auf die Intensität der Zielprotein-Intensität (normiert auf die jeweilige Ladekontrolle) der Kontrollzellen. Durch den Vergleich der Intensitäten konnte die Expression bestimmter Proteine in den untersuchten Zell-Typen semiquantitativ analysiert werden.

### 3.7.3 NSM-Assay

Der durch das MV induzierte Anstieg der NSM2-Aktivität wurde über einen Enzymassay anhand der Umsetzung des fluorogenen Substrates 6-hexadecanoylamino-4-methylumbelliferylphosphorylcholin (HMU-PC) gemessen.

Zunächst wurden  $5 \times 10^5$  Jurkat-Zellen pro Messpunkt in 200  $\mu\text{l}$  RPMI/0 % FCS für ca. 2 h inkubiert. Aufgereinigtes, UV-inaktiviertes ( $1,5 \text{ J/cm}^2$ ) Virus (entsprechend MOI 5), bzw. Mock wurde hinzugegeben, auf die Zellen zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, RT) und die Suspensionen für 1 h auf Eis gestellt. Es folgte eine Inkubation bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  für 0, 5, 10 und 20 min. Die Proben wurden mit 1 ml kaltem PBS gewaschen, zentrifugiert (1 min, 8000 rpm,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ), in 50  $\mu\text{l}$  NSM Lyse-Puffer lysiert und fünfmal bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren und wieder aufgetaut. In der Zwischenzeit wurde der Reaktionsansatz aus 2,2  $\mu\text{l}$  ATP (100 mM), 10  $\mu\text{l}$  Resuspensionspuffer (s. Abs. 2.6.6) und 10  $\mu\text{l}$  HMU-PC (pH 7,4), welches zuvor für 5 min bei  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt worden war, erstellt und auf je drei 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße pro Messpunkt verteilt. Anschließend wurden die Lysate zentrifugiert (15 s, 8000 rpm,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) und je 10  $\mu\text{l}$  des Überstandes zum Reaktionsansatz hinzugegeben. In drei Ansätze wurde anstelle des Lysates jeweils 10  $\mu\text{l}$  Lysepuffer gegeben. Mit diesen Ansätzen konnte der Signalhintergrund bestimmt werden. Die enzymatische Reaktion erfolgte bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Nach 16 h wurde die Reaktion mit 200  $\mu\text{l}$  Stopp-Puffer angehalten und 200  $\mu\text{l}$  des Reaktionsgemisches zur Auswertung auf eine schwarze *flat bottom* 96-Napf Platte gegeben. Die Messung erfolgte an dem Fluorimeter Safire<sup>2</sup> von Tecan. Hierbei wurde die Fluoreszenz in jedem Napf gemessen und anschließend der Hintergrundwert (s.o.) abgezogen. Die absoluten Werte wurden zunächst jeweils auf den Proteingehalt der Probe (s. Abschnitt 3.7.1) und dann auf den Mittelwert der Mock-Triplikate des gleichen Messpunkts normalisiert. In die Auswertung wurde für jeden Zeitpunkt die mittlere relative NSM2-Aktivität der drei technischen Replikate einbezogen.

### **3.8 Statistik**

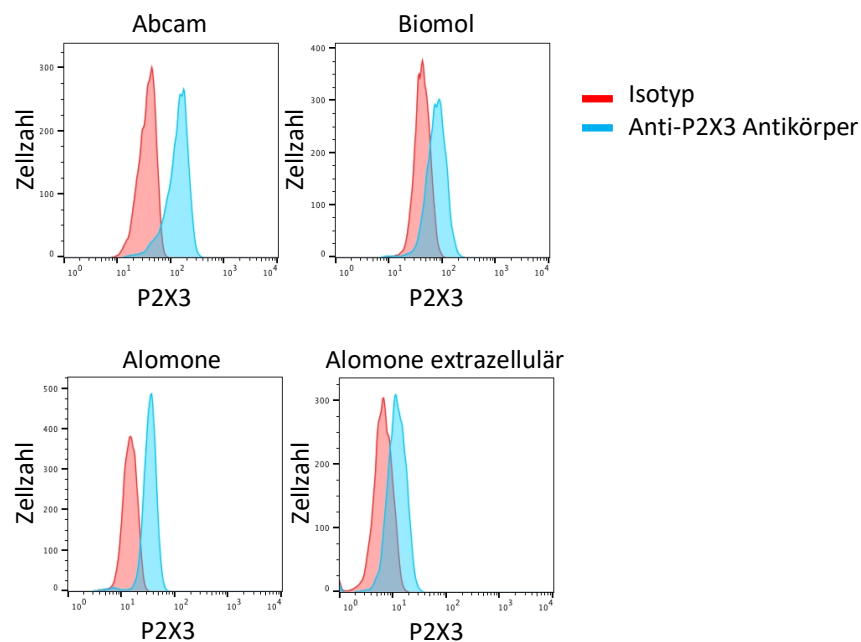
Alle Berechnungen wurden mit der Software Prism von GraphPad durchgeführt. Um zu überprüfen, ob die analysierten Daten normalverteilt waren, wurde ein Shapiro-Wilk Test ( $n > 6$ ) oder ein D'Agostino & Pearson Test ( $n > 12$ ) angewendet. Die Prüfung auf Signifikanz erfolgte bei den parametrischen Daten mittels zweiseitigen t-Test (Vergleich zweier Gruppen) und abhängigen t-Tests (Vergleich zweier Gruppen mit abhängigen Variablen). Die nichtparametrischen Daten wurden mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test getestet. Wenn nicht anders angegeben, sind die Daten als Mittelwert und Standardfehler angegeben.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Expression der Rezeptorkandidaten auf hämatopoetischen Zellen

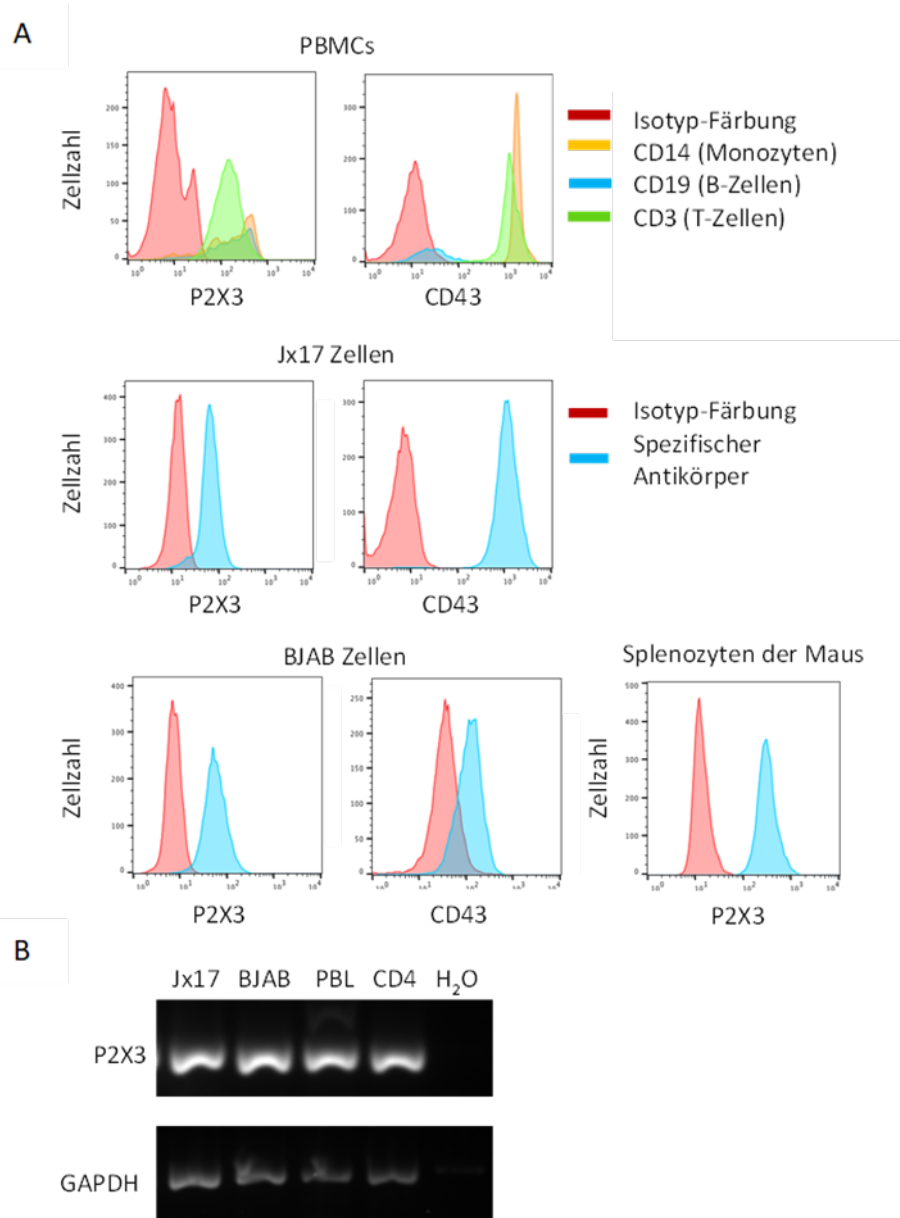
MV ist in der Lage, eine kontaktinduzierte Paralyse in diversen hämatopoetischen Zelltypen des Menschen sowie in murinen Splenozyten zu verursachen. Um zu überprüfen, ob die Rezeptorkandidaten CD43 und P2X3 in Zellen, die sensitiv gegenüber der MV-Kontaktinhibition sind, exprimiert werden (Jx17-Zellen, BJAB-Zellen, CD3<sup>+</sup> PBMCs, CD14<sup>+</sup> PBMCs, CD19<sup>+</sup> PBMCs, murine Splenozyten) wurden diese mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Expression von P2X3 wurde für einige Zelltypen zudem mit einer RT-PCR analysiert.



**Abbildung 11:** Durchflusszytometrische Analyse der P2X3-Rezeptor-Expression auf Jx17-Zellen mit vier unterschiedlichen anti-P2X3 Antikörpern (Abcam, Biomol, Alomone Labs, Alomone Labs extrazellulär bindend). Mit allen vier Antikörpern wurde die Gesamtprotein-Expression der Zellen analysiert.

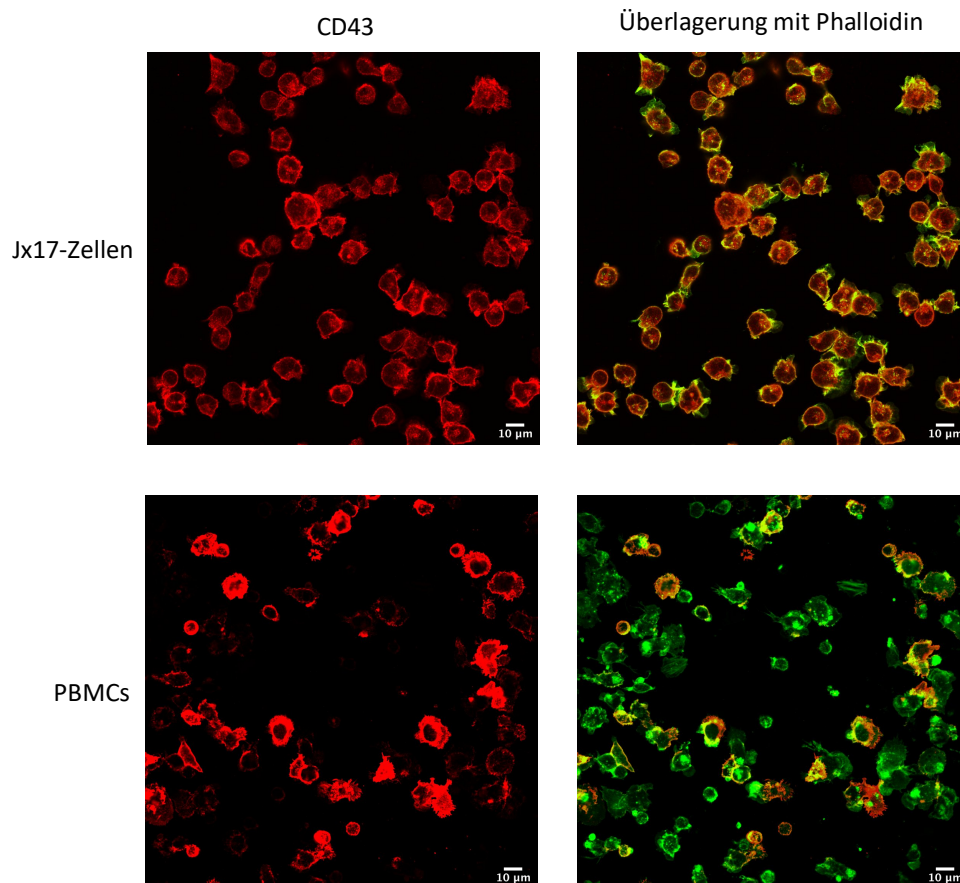
Da in der Literatur die Expression von P2X3 in Jurkat-Zellen kontrovers dokumentiert ist, wurde diese in der vorliegenden Arbeit mittels vier unterschiedlicher spezifischer Antikörper untersucht (s. Abbildung 11). Mit allen Antikörpern wurde die Expression von P2X3 in Jx17-Zellen nachgewiesen. Aufgrund der Herstellerinformation und eigener Untersuchungen erwies sich der Abcam-Antikörper auch für die Detektion von P2X3 im Westernblot als geeignet und wurde daher, wenn nicht anderweitig gekennzeichnet, für alle weiteren Analysen verwendet. Mittels dieses Antikörpers wurden P2X3-spezifische Signale auf den

untersuchten Zelltypen detektiert (s. Abbildung 12A). Die Expression von P2X3 in Jx17-Zellen, BJAB-Zellen, PBLs und für CD4<sup>+</sup> Zellen -angereicherten PBLs konnte mittels spezifischer Primer in RT-PCRs detektiert werden (s. Abbildung 12B). CD43-Expression wurde mit Ausnahme einer Subpopulation CD19<sup>+</sup> Zellen (B-Zellen) in allen untersuchten Zelltypen gemessen (s. Abbildung 12A).



**Abbildung 12:** Expression von CD43 und P2X3 in Jx17-Zellen, BJAB-Zellen, PBMCs, CD4-angereicherten PBMCs und Splenozyten der Maus. **A)** Durchflusszytometrische Analyse. Repräsentative Grafik aus einem (Splenozyten der Maus) bzw. drei (BJAB-Zellen, Jx17-Zellen, PBMCs) unabhängigen Experimenten. **B)** RT-PCR mit P2X3 spezifischen Primern, bzw. GAPDH Primern als Ladekontrolle.

Die zelluläre Lokalisation von CD43 wurde konfokalmikroskopisch mit einer Gesamtprotein-Färbung untersucht. Um einen Überblick über die Oberflächenexpression des Proteins zu erhalten, wurde zusätzlich das Aktin-Zytoskelett mittels Phalloidin angefärbt und auf Co-Lokalisation untersucht. Da für P2X3 kein geeigneter Antikörper zu Verfügung stand, konnte dieses Experiment für diesen Rezeptor nicht durchgeführt werden.



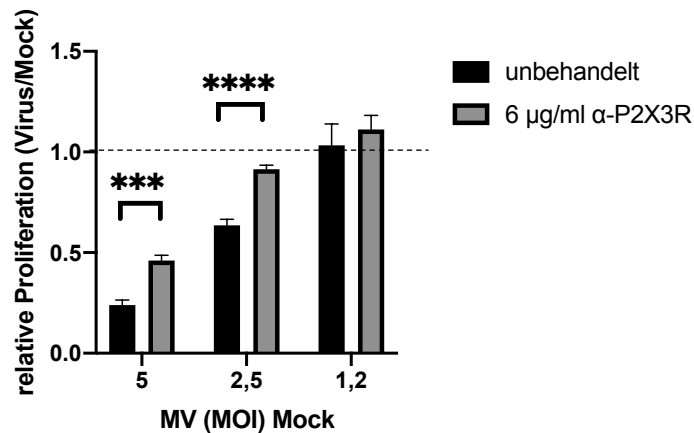
**Abbildung 13:** Konfokalmikroskopische Analyse der CD43-Expression auf Jx17-Zellen und PBMCs. CD43: rot; Phalloidin: grün, Co-Lokalisation: gelb

CD43 (Sialophorin) konnte sowohl auf Jx17-Zellen als auch auf PBMCs nachgewiesen werden. Hierbei waren alle Jx17-Zellen CD43-positiv, während einige der PBMCs mit dem spezifischen Antikörper nicht angefärbt wurden (s.o.). Im Allgemeinen war das Protein hauptsächlich membranah lokalisiert und zeigte vor allem in Jx17-Zellen starke Co-Lokalisation mit Phalloidin (s. Abbildung 13).

## 4.2 Proliferationsassay mit Blockade der Rezeptoren durch Antikörper

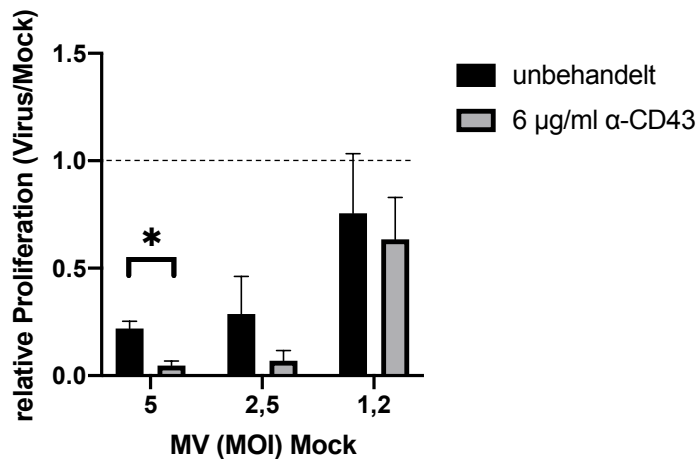
Es ist möglich, Rezeptoren mit Hilfe von Antikörpern zu blockieren und somit die Bindung mit ihren Liganden zu verhindern. Im Allgemeinen werden die Antikörper in Konzentrationen zwischen 0,25 und 10 µg/ml zu den Zellen gegeben. Für das nachfolgend beschriebene

Experiment wurden zu einem Proliferationsassay mit primären T-Zellen Antikörper in einer hohen Konzentration (6 µg/ml) in die Näpfe gegeben. Hierdurch sollte ermittelt werden, ob die so blockierten Rezeptoren (CD43 und P2X3) für die MV-vermittelte T-Zell-Paralyse verantwortlich sind.



**Abbildung 14:** Proliferationsassay für primäre T-Zellen; unbehandelt oder mit anti-P2X3 Antikörper vorbehandelt. Die Abbildung zeigt die mittlere relative Proliferation dreier technischer Replikate aus einem Experiment (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Für die Blockade von P2X3 wurde ein extrazellulär bindender Antikörper (Alomone Labs, s. Abbildung 11) verwendet. Dieser war in der Lage, die MV-induzierte Proliferationshemmung signifikant zu reduzieren (s. Abbildung 14). So erwies sich die relative Proliferation signifikant ( $p < 0,0001$ ) gesteigert (195 % bei MOI 5 bzw. 144 % bei MOI 2,5). Bei MOI 1,2 entsprach die Proliferation nach MV in etwa der von Mock-behandelten Zellen. Da für eine Wiederholung des Experimentes nicht ausreichend anti-P2X3 Antikörper zur Verfügung stand, konnte es lediglich einmal durchgeführt werden. Die in Abbildung 14 dargestellten Daten sind Mittelwerte aus drei technischen Replikaten eines Experimentes und haben daher nur beschränkte Aussagekraft.

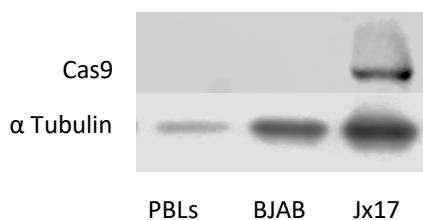


**Abbildung 15:** Relative Proliferation primärer T-Zellen (nativ und mit 6 µg/ml anti-CD43 Antikörper behandelt) nach Kontakt zu MV bzw. Mock. Der Abbildung ist die mittlere relative Proliferation (Virus/Mock) aus drei unabhängigen Experimenten zu entnehmen (\* $p=0,013$ ).

Das Blockierungsexperiment wurde analog mit einem anti-CD43 Antikörper (Klon DF-T1) durchgeführt (s. Abbildung 15). Die relative Proliferation der WT-Zellen war nach Kontakt zu MV MOI 5 rund 21,9 %. MOI 2,5 und 1,2 führten zu einer Reduktion der Inkorporation von [3H]Thymidin auf 28,7 % und 75,5 % der Mock Werte. Die Zugabe von 6 µg/ml anti-CD43 Antikörper verminderte nicht die MV-induzierte Proliferationshemmung, sondern schien diese sogar zu verstärken. Kontakt zu MV MOI 5 resultierte in einer Reduktion der Proliferation um 95,4 % im Vergleich zu den Mock-kontaktierten Zellen; bei MOI 2,5 bzw. 1,2 war die relative Proliferation 6,9 % bzw. 63,4 %. Insgesamt unterschieden sich die mit 6 µg/ml anti-CD43 Antikörper behandelten Zellen in ihrem Verhalten nach Kontakt zu MV MOI 5 signifikant von den unbehandelten Zellen ( $p=0,013$ ).

### 4.3 Genetische Depletion der Rezeptoren an Jx17-Zellen

Die Zelllinie Jx17 ist eine Jurkat-Zelllinie, welche stabil die bakterielle Endonuklease Cas9 exprimiert. Dies wurde mittels Westernblot für Zell-Lysate aus Jx17-Zellen bestätigt (s. Abbildung 16), da nur in diesen, nicht aber in der Kontrolle (BJABs und PBLs) eine Cas9-spezifische Bande erkennbar war.



**Abbildung 16:** Westernblot von Lysaten aus PBLs, BJABs und Jx17-Zellen mit anti-Cas9 Antikörper und anti-α Tubulin Antikörper als Ladekontrolle.

Für die nachfolgenden Experimente wurde eine Systematik entwickelt, mit der evaluiert werden sollte, ob durch die Ablation eines bestimmten Proteins wesentliche Parameter der MV-induzierten T-Zell-Paralyse in Jurkat-Zellen verhindert werden.

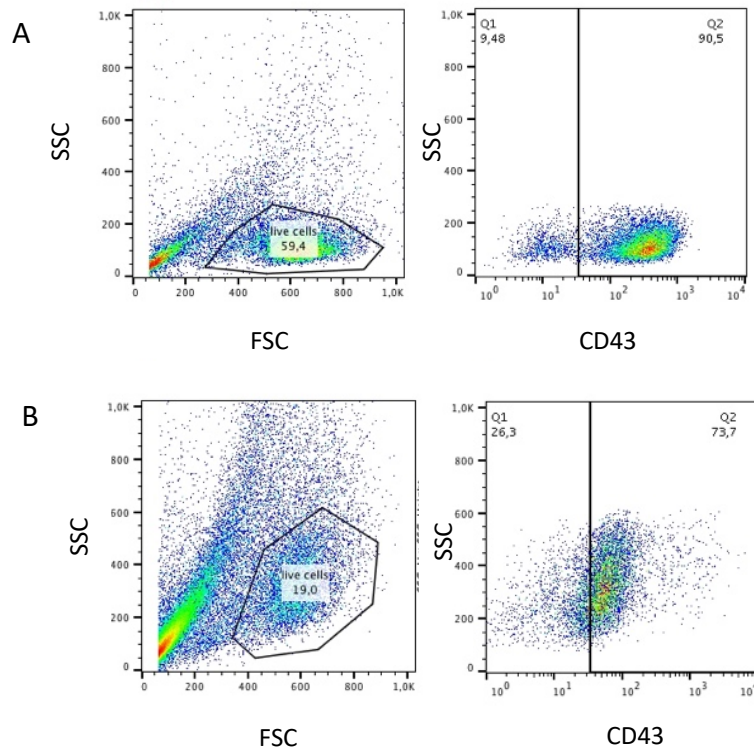
1. NSM-Assay: MV induziert kontaktabhängig die NSM-Aktivität<sup>88,89,101</sup>, wobei der Effekt nach 10-15 min am größten ist. Um zu testen, ob diese NSM-Aktivierung bei Defizienz bestimmter Proteine unterbleibt, wurde ein NSM-Assay (s. Abschnitt 3.7.3) an Rezeptor-ablatierten Jx17-Zellen durchgeführt.

2. Proliferationsassay: Jurkat-Zellen proliferieren spontan und stimulationsunabhängig. Um MV-abhängige Veränderungen ihrer Proliferationseffizienz nach genetischer Ablation der potentiellen Interaktionsrezeptoren zu ermitteln, wurde ein [3H]Thymidin-Einbau basierter Assay für die Jx17-Zellen etabliert (s. Abschnitt 3.6.2.1).

3. pAkt-Assay: In primären Zellen kommt es nach Stimulation zur Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges und zur Phosphorylierung der Akt-Kinase (s. Absatz 1.3.3). Kontakt zu MV führt zu einer starken Reduktion der stimulationsabhängigen Akt-Phosphorylierung<sup>102</sup>. In Jurkat-Zellen ist die PTEN defekt<sup>93</sup>, weshalb in diesen Zellen die Akt-Kinase basal phosphoryliert und aktiviert ist (s. Abschnitt 1.3.4). Die Reduktion dieses Phosphorylierungsniveaus 24 h nach Kontakt zu MV sollte im Folgenden durchflusszytometrisch mittels pAkt-Assay (s. Abschnitt 3.3.5) überprüft werden.

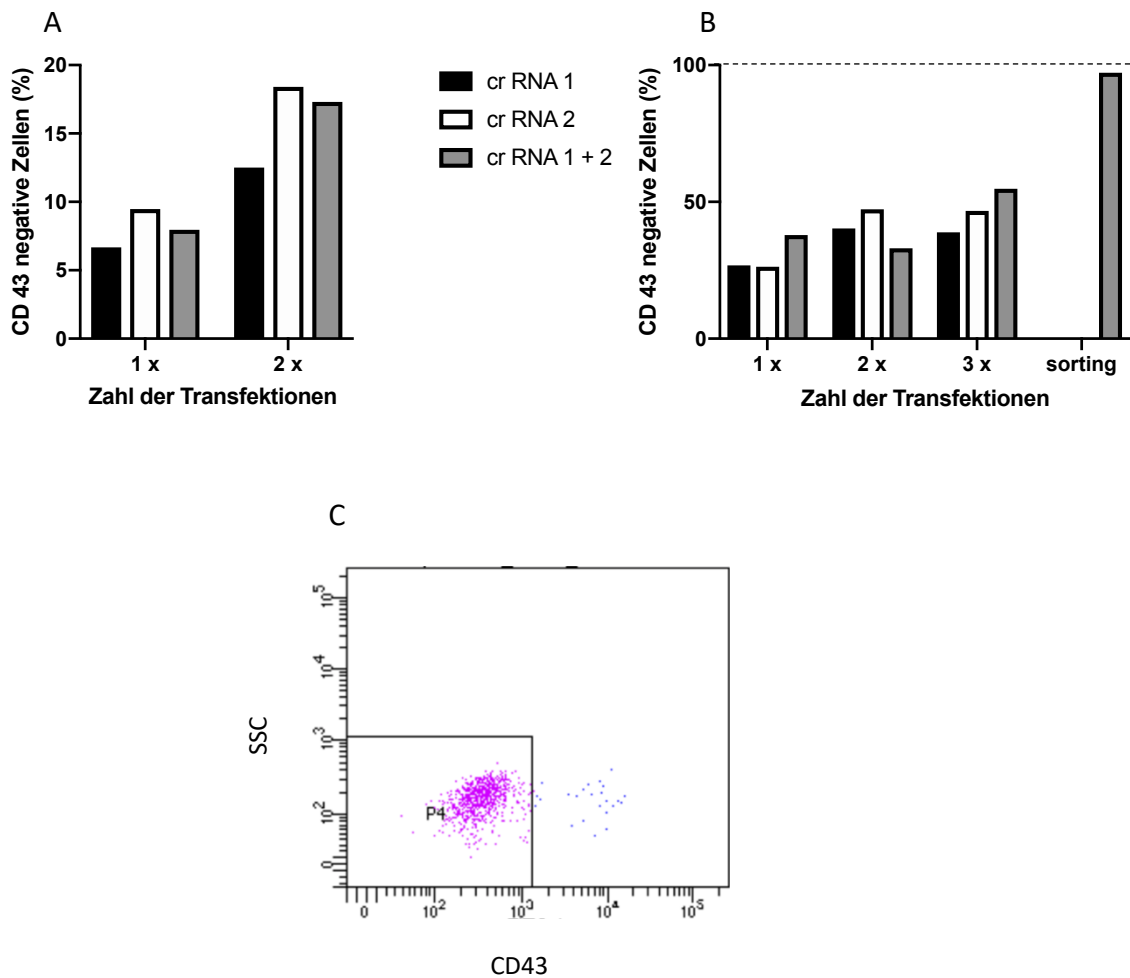
#### 4.3.1 CD43-Knockout

Jx17-Zellen wurden dreimal im Abstand von 4-5 d mit drei Kombinationen zweier unterschiedlicher CD43-spezifischer crRNAs transfiziert (s. Absatz 3.4.2). Die Effizienz des Knockouts wurde nach 4-5 d durchflusszytometrisch mittels Oberflächenfärbung überprüft. Als Kontrolle dienten hierbei sowie in allen nachfolgenden Experimenten mit ausschließlich tracrRNA-transfizierte Jx17-Zellen (im nachfolgenden als WT-Zellen bezeichnet) (s. Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Durchflusszytometrische Analyse einfach mit crRNA 1 + 2 für CD43 transfizierter Jx17-Zellen drei Tage **(A)** oder zwei Wochen nach Transfektion **(B)**.

Nach der ersten Transfektion mit der crRNA 2 waren 9,48 % CD43-negative Zellen darstellbar, die Transfektionseffizienz lag bei 8,03 % der Zellen (s. Abbildung 18A). Nach der zweiten crRNA 2-Transfektion (Effizienz 16,06 %) waren 18,4 % der Zellen CD43-defizient. Durch die dritte Transfektion wurde ein CD43-Knockout in 54,8 % der mit crRNA 1 und 2 transfizierten Jurkat-Zellen (Effizienz 46,08 %) gemessen. Die Zellen aus den ersten beiden Transfektionen wurden für ca. zwei Wochen in Kultur gehalten und ihre CD43-Depletion geprüft. CD43-defiziente T-Lymphozyten zeigen hyperproliferatives Verhalten *in vitro*<sup>119</sup>. Deshalb war zu erwarten, dass sich der Prozentsatz CD43-negativer Zellen erhöhte.

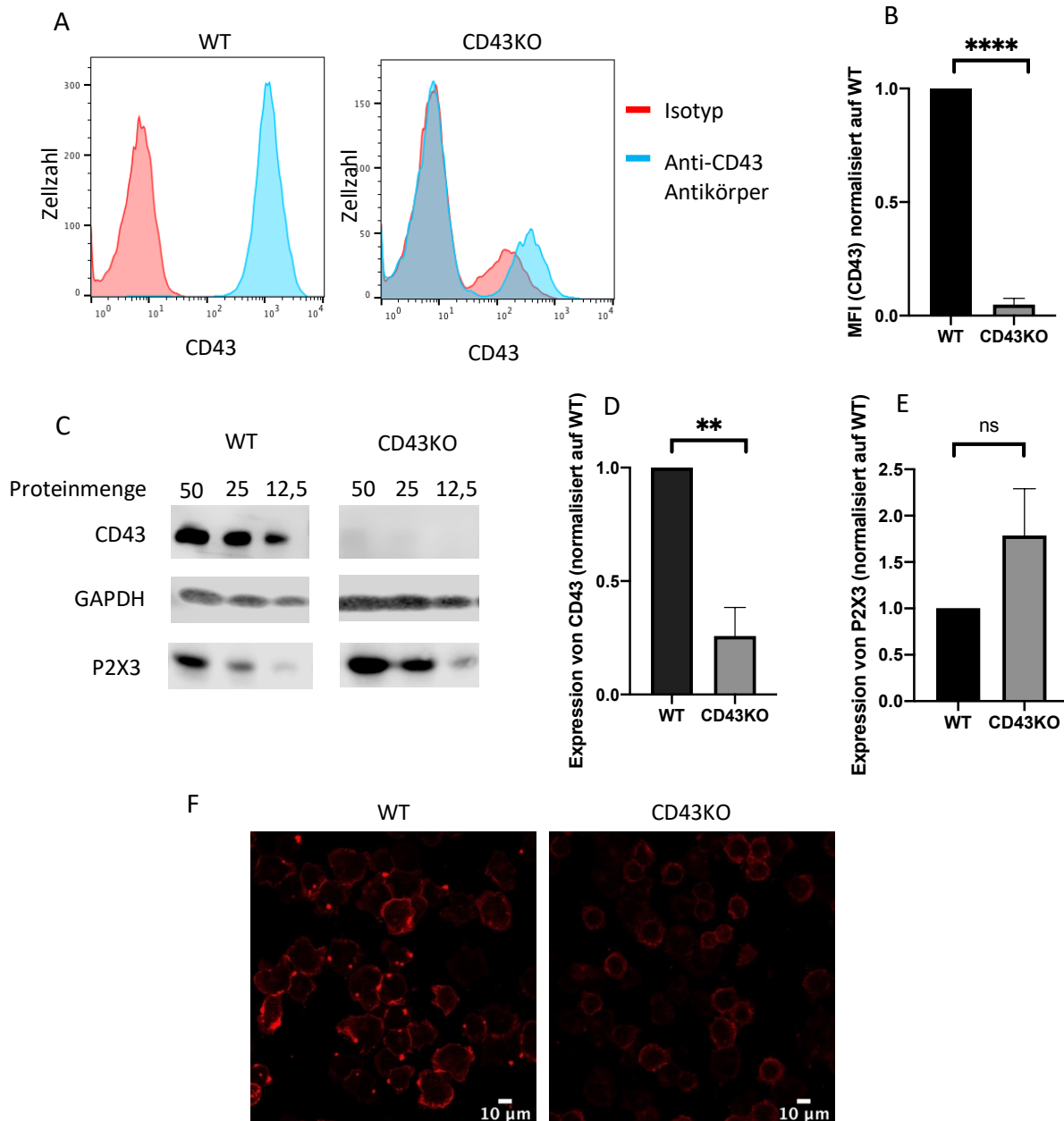


**Abbildung 18** Durchflusszytometrische Analyse der CD43-Expression mit unterschiedlichen CD43-spezifischen crRNA Kombinationen transfizierter Jx17-Zellen jeweils 3 Tage **(A)** oder zwei Wochen nach Transfektion **(B)**. Der Abbildung ist der Prozentsatz CD43-negativer Zellen zu entnehmen. **C)** Durchflusszytometrische Analyse der CD43KO-Zellen nach dem *Sorting*.

Bei der zweiten Kontrolle waren im Schnitt 30,3 % nach der ersten und 40,2 % nach der zweiten Transfektion CD43-negativ (s. Abbildung 18B). Der Prozentsatz CD43-negativer Zellen hatte sich demnach in beiden Populationen mehr als verdoppelt.



Um eine Population mit einem möglichst hohen Anteil an CD43-negativen Zellen zu erhalten, wurde am FACS Aria III (Becton Dickinson) ein *Sorting* durchgeführt. Hierfür wurde der Pool dreimal mit crRNA 1 + 2 transfizierten CD43KO-Zellen mit Anti-CD43-Antikörper markiert und CD43-positive Zellen aus der Mischpopulation herausortiert. Im Durchfluss verblieben  $8 \times 10^5$  Zellen mit einem Anteil CD43-negativer Jx17 von 97,2 % (s. Abbildung 18C).

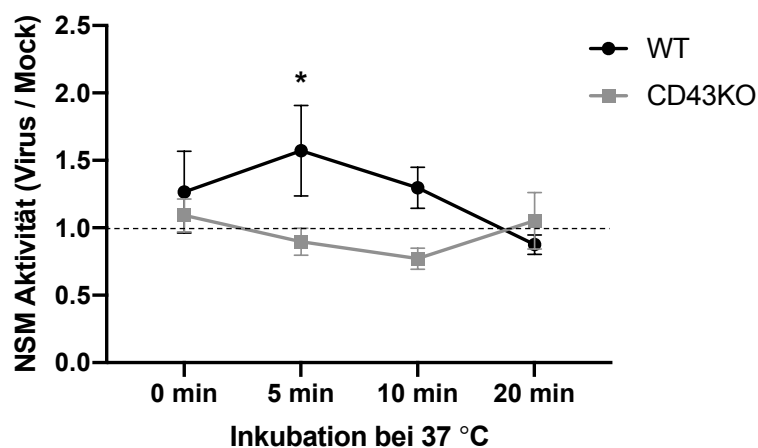


**Abbildung 19:** Analyse der Effizienz des CD43-Knockouts. **A)** Durchflusszytometrische Analyse der sortierten mit CD43-spezifischer crRNA-transfizierten Jx17-Zellen. **B)** Quantifizierung der durchflusszytometrischen Daten. Die Signalintensität für CD43 wurde auf die der WT-Zellen normalisiert (=1). Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. **C)** Repräsentativer Westernblot mit Lysaten aus WT- und CD43KO- Jx17-Zellen. Es wurden je 50, 25 und 12,5 µg Gesamtprotein aufgetragen. Analyse der Signalintensität für CD43 (**D**) und P2X3 (**E**) im Westernblot, normalisiert auf die jeweilige Intensität der WT-Banden (=1) aus drei unabhängigen Experimenten (\*\* $p=0,0041$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ ; ns: nicht signifikant). **F)** Konfokalmikroskopische Aufnahmen der WT- und CD43KO- Jx17-Zellen nach Färbung mit einem anti-CD43 Antikörper (rot).

Im Westernblot ergab sich für die Population der sortierten CD43KO-Zellen eine signifikante Reduktion der Signalintensität für CD43 auf 25 % der WT-Zellen ( $p=0,0041$ ). Laut der durchflusszytometrischen Analyse der Population betrug die residuale CD43 Expression nur ca. 4,9 % ( $p<0,0001$ ). Auch konfokalmikroskopisch war visuell eine deutliche Reduktion des CD43-spezifischen Signals erkennbar (s. Abbildung 19). Die Expression von P2X3 war durch die Transfektion mit CD43-spezifischer crRNA in den CD43KO-Zellen nicht signifikant verändert (s. Abbildung 19C, E).

#### 4.3.1.1 NSM-Assay

Für den NSM-Assay wurden CD43KO-Jx17-Zellen sowie tracrRNA-transfizierte Jx17-Zellen (WT) eingesetzt. In diesen wurde die MV-abhängige Aktivierung der NSM mittels eines *in vitro* Assays (s. Absatz 3.7.3) nach 0, 5, 10 und 20 min bestimmt (s. Abbildung 20).

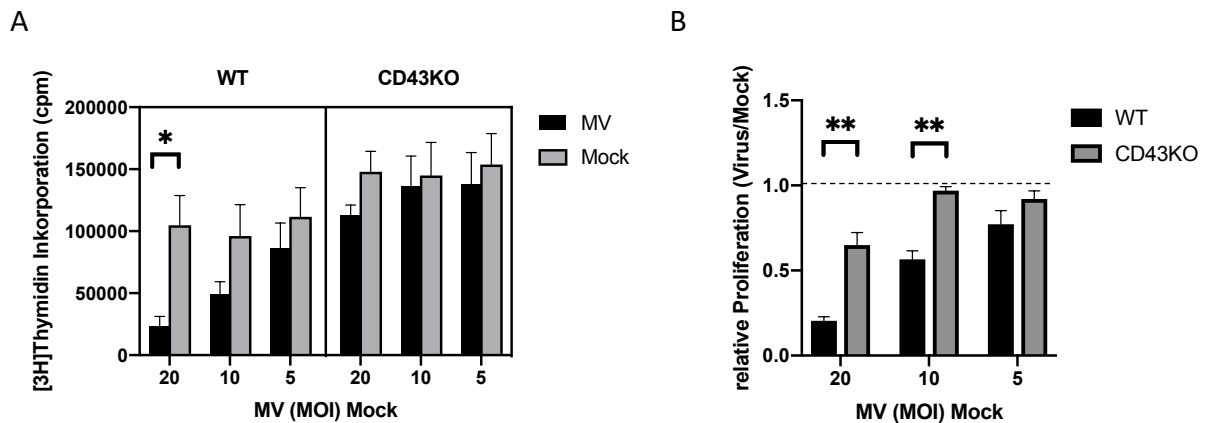


**Abbildung 20** NSM-Assay mit Lysaten aus tracrRNA-transfizierten (WT) und CD43KO-Jx17-Zellen mit Mock oder MV. Der Abbildung ist der Mittelwert der Triplikate aus vier unabhängigen Experimenten zu entnehmen (\* $p=0,023$ ).

Einzig in Lysaten aus tracrRNA-transfizierten Jx17-Zellen war infolge MV-Kontaktes im Mittel ein 1,3-facher Anstieg der NSM-Aktivität nach 1 h auf Eis (Zeitpunkt 0) bzw. 1,6-facher Aktivitätsanstieg nach 5 min erkennbar. Nach 10 min war die NSM-Aktivität noch 1,3-fach heraufreguliert, während sie nach 20 min wieder in etwa der Mock-kontaktierter Zellen entsprach. In CD43KO-Zellen schien der Kontakt zu MV keinen Effekt auf die NSM-Aktivität zu haben. Sie entsprach in etwa der Mock-kontaktierter CD43KO-Zellen (Virus/Mock zwischen 0,8 und 1,1). Nach 5 min ( $p=0,023$ ) unterschied sich die Heraufregulation der NSM-Aktivität in WT-Jx17-Zellen signifikant von der relativen NSM-Aktivität CD43-depletierter Zellen.

#### 4.3.1.2 Proliferationsassay

Die Proliferation der Jurkat-Zellen wurde nach Kontakt zu UV-inaktiviertem MV für drei Tage anhand des Tritiumthymidin-Einbaus in 16 h gemessen.



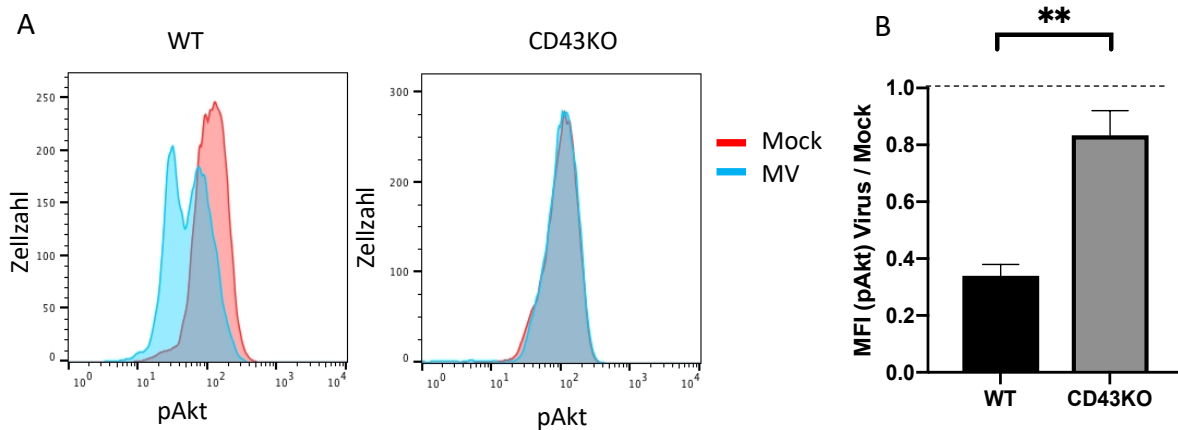
**Abbildung 21:** Proliferationsassay an Jx17-Zellen (WT und CD43KO) nach Kontakt zu MV. **A)** absolute Werte. **B)** relative Proliferation (Virus/Mock). Der Abbildung sind die Mittelwerte von WT- und CD43KO-Jx17-Zellen aus drei unabhängigen Experimenten zu entnehmen (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

Kontakt zu MV führte in WT-Zellen bei einer MOI von 20 zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation ( $p=0,03$ ). Hierbei wiesen CD43-KO-Zellen eine deutlich geringere Inhibition auf, welche das Signifikanzniveau nicht überschritt (s. Abbildung 21A). Auffällig war, dass die Inkorporationswerte bei in Mock-behandelten KO-Zellen (Einbauraten von rund 149 000 cpm) im Schnitt rund 43 % über denen der WT-Zellen (Einbauraten um 104 000 cpm) lagen. Die CD43KO-Zellen proliferierten daher signifikant schneller als WT-Zellen ( $p=0,001$ ). Um die MV-induzierte Proliferationsinhibition unter den Gruppen besser vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse der Virus-behandelten Zellen daher auf die der Kontrollzellen normiert (relative Proliferation; s. Abbildung 21B).

In WT-Zellen waren die Einbauraten durch Kontakt zu MV MOI 20 für drei Tage auf 20,4 % reduziert. Bei MOI 10 war eine Inhibition der Proliferation um im Schnitt 43,4 % zu beobachten. MOI 5 führte zu einer Reduktion der Proliferation um 22,9 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. In KO-Zellen wurde die Proliferation durch Kontakt zu MV MOI 20 um 35,0 % verringert. MOI 10 und 5 verringerten die Einbauraten nur noch geringfügig (um 3,0 % bzw. 7,9 %). Insgesamt konnten zwischen WT und CD43KO-Zellen signifikante Unterschiede im Einfluss des MV auf die zelluläre Proliferation bei MOI 20 und 10 festgestellt werden ( $p=0,0046$  und  $p=0,0019$ ).

### 4.3.1.3 pAkt-Assay

Die Phosphorylierung von Akt wurde 24 h nach Kontakt zu UV-inaktiviertem Virus- bzw. Mock-Präparationen durchflusszytometrisch untersucht (s. Abbildung 22).

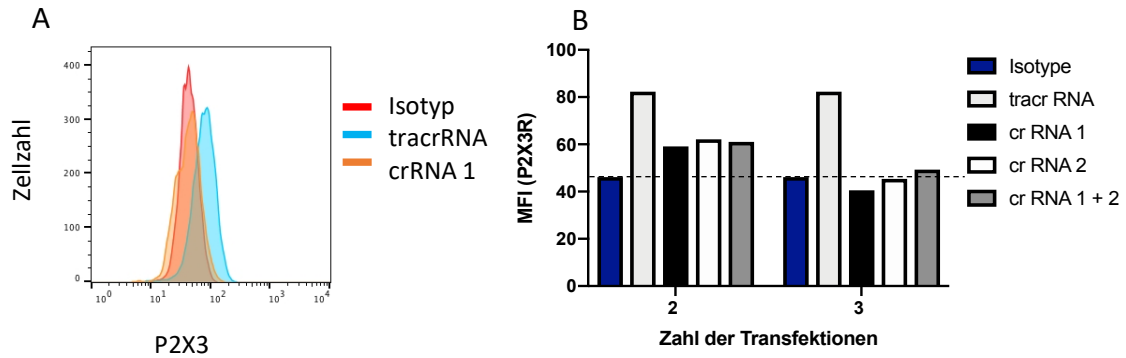


**Abbildung 22:** pAkt-Assay an Jx17-Zellen (WT und CD43KO). **A)** Durchflusszytometrische Analyse der Akt-Phosphorylierung, 24 h nach Kontakt zu MV bzw. Mock in WT- (links) und CD43KO- (rechts) Jx17-Zellen. **B)** Die MFI der Virus-kontaktierten Zellen wurde auf die der entsprechenden Kontrollzellen normiert. Dem Graph ist der Mittelwert der relativen MFI (pAkt) aus vier unabhängigen Experimenten zu entnehmen (\*\* $p < 0,0020$ ).

In WT-Zellen war die Signalintensität für pAkt in den Virus-behandelten Zellen auf im Schnitt 33,4 % der Kontrollzellen reduziert. Für die KO-Zellen gab es eine deutlich geringere Reduktion der Signalintensität auf 83,4 % nach Kontakt zu MV ( $p = 0,0020$ ).

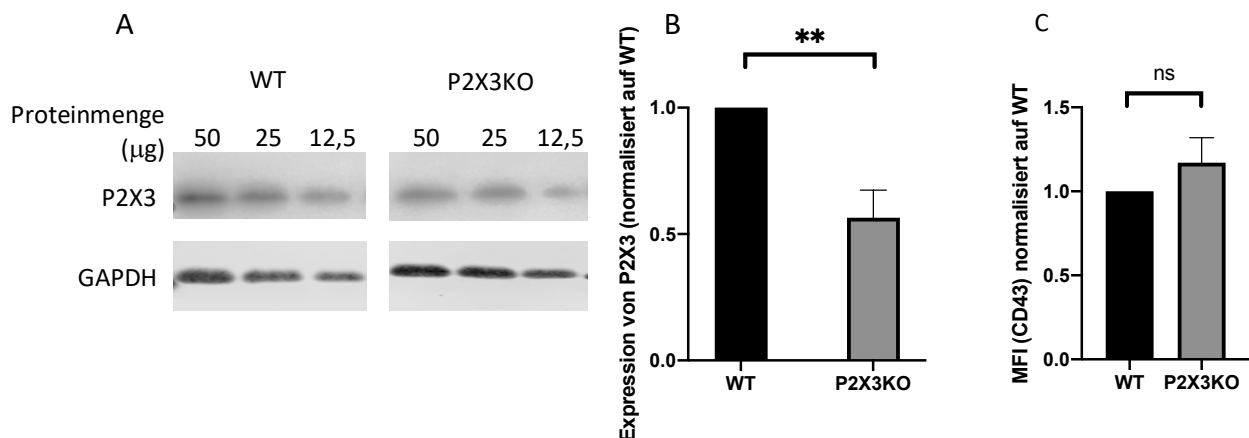
### 4.3.2 P2X3-Knockout

Für die Evaluation der Transfektionseffizienz beim Knockout von P2X3 wurde zunächst eine durchflusszytometrische Analyse der Gesamtproteinexpression mit einem anti-P2X3 Antikörper von Biomol (s. Abbildung 11) durchgeführt.



**Abbildung 23: A)** Durchflusszytometrische Analyse (mittels anti-P2X3 Antikörper von Biomol) der P2X3-Gesamtproteinexpression nach Transfektion mit unterschiedlichen Kombinationen von P2X3-spezifischer crRNA. **B)** Quantifizierung der Daten aus der Durchflusszytometrie. Die gestrichelte Linie entspricht der MFI der Isotyp-Kontrolle mit IgG des Kaninchens.

Nach zwei Transfektionen war die MFI P2X3-depletierter Zellen mit allen crRNA-Kombinationen im Mittel um 25 % niedriger als die tracrRNA-transfizierter (s. Abbildung 23). Die höchste Transfektionseffizienz konnte mit einer Reduktion der MFI um 28 % im Vergleich zu tracrRNA-transfizierten Zellen mit der crRNA 1 erreicht werden. Auch nach der dritten Transfektion wiesen mit der crRNA 1 transfizierte Zellen die geringste MFI auf. Diese war sogar geringer als die der Isotyp-Kontrolle. Basierend auf diesen Daten war davon auszugehen, dass in dieser Population nur eine geringe residuale Expression von P2X3 vorhanden war. Daher wurden in nachfolgenden Experimenten dreifach mit crRNA 1 transfizierte Zellen (P2X3KO) verwendet.

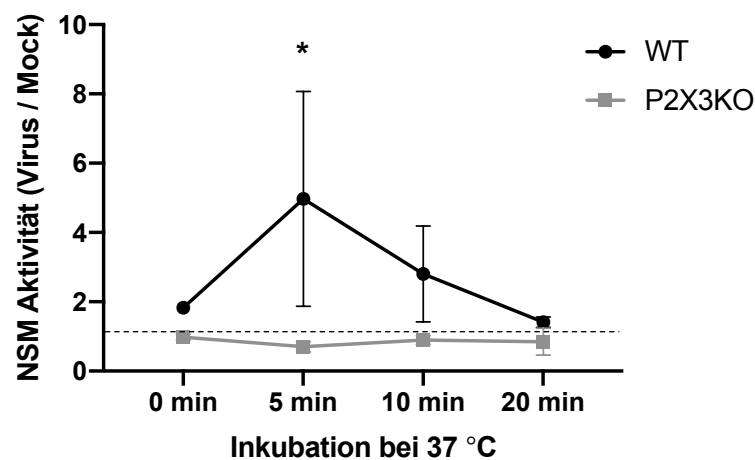


**Abbildung 24: Expression von P2X3 in WT- und P2X3KO-Zellen. A)** Repräsentativer Westernblot (anti-P2X3 Antikörper, Abcam). **B)** Quantifizierung der Daten aus den Westernblots. Für bessere Vergleichbarkeit wurde die MFI der P2X3KO-Zellen, auf die der WT-Zellen normiert. Der Abbildung ist die mittlere relative Expression von P2X3 aus drei unabhängigen Experimenten zu entnehmen (\*\*  $p=0,0073$ ). **C)** Durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD43 auf P2X3KO- und WT-Jx17-Zellen. Die Abbildung zeigt die mittlere relative MFI (P2X3KO/WT) aus drei unabhängigen Experimenten.

Da die Spezifität des Antikörpers (Biomol) aufgrund einer starken unspezifischen Bande im Westernblot fraglich war, wurde die Rezeptorexpression nach Durchführung der in Abschnitt 4.3.2.1 ff beschriebenen Experimente mit einem anderen Antikörper (Abcam) erneut überprüft (s. Abbildung 24). Im Westernblot war die Signalintensität der P2X3KO-Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen um 44 % reduziert ( $p=0,0073$ ). Die Spezifität dieses Antikörpers konnte nicht gesichert werden, weshalb keine Aussagen über die genaue residuale Expression von P2X3 getroffen werden konnten. Um sicherzugehen, dass die Expression von CD43 durch die Transfektion unbeeinflusst blieb, wurde die CD43-Oberflächenexpression der P2X3KO-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Sie unterschied sich nicht signifikant von der CD43-Oberflächenexpression der WT-Zellen (s. Abbildung 24C)

#### 4.3.2.1 NSM-Assay

Die MV-abhängige Aktivierung der NSM2 wurde in einem NSM-Assay (s. Absatz 3.7.3) überprüft.



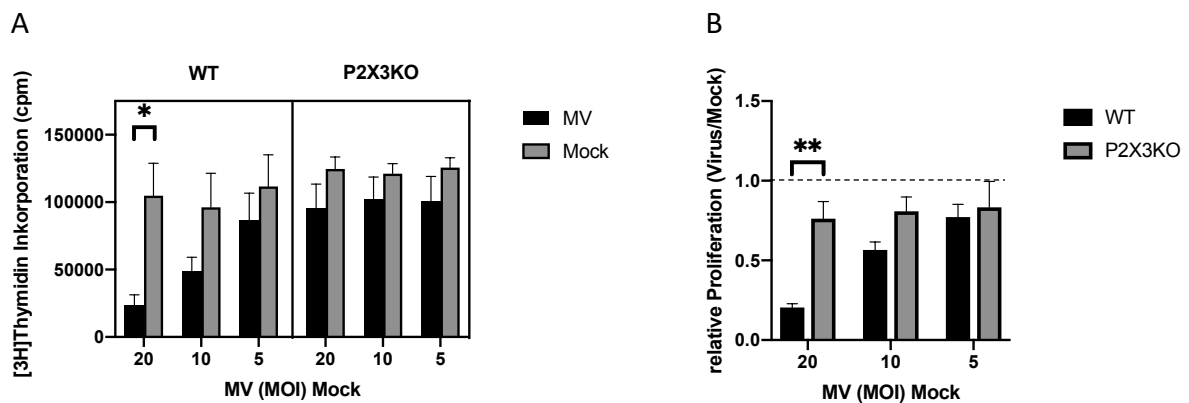
**Abbildung 25:** NSM-Assay mit Lysaten aus tracrRNA-transfizierten (WT) und P2X3KO-Jx17-Zellen mit Mock oder MV. Die Abbildung zeigt jeweils die relative Aktivität der NSM (Virus/Mock) aus drei unabhängigen Experimenten (\* $p=0,024$ ).

In WT-Zellen war nach einer Stunde auf Eis ein etwa 1,8-facher Anstieg der NSM-Aktivität messbar (s. Abbildung 25). Nach 5 min bei 37 °C kam es zu einer Aktivitätssteigerung der NSM um das 5,0-fache im Vergleich zu Mock-behandelten WT-Zellen. Diese bildete sich nach 10 min auf die etwa 2,8-fache Aktivität der Kontrollzellen zurück. Nach 20 min war die Enzymaktivität im Vergleich zu Mock-Zellen noch 1,4-fach erhöht. In P2X3KO-Zellen entsprach die Aktivität der MV-kontaktierten Zellen zu allen Zeitpunkten in etwa der Mock-behandelter

Zellen (Virus/Mock=0,70-0,98). Hieraus ergab sich nach 5 min zwischen den beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied in der Induktion der NSM durch MV ( $p=0,024$ ).

#### 4.3.2.2 Proliferationsassay

Der MV-induzierte Proliferationsarrest der WT- und P2X3KO-Zellen wurde mithilfe eines <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau-basierten Assays überprüft.



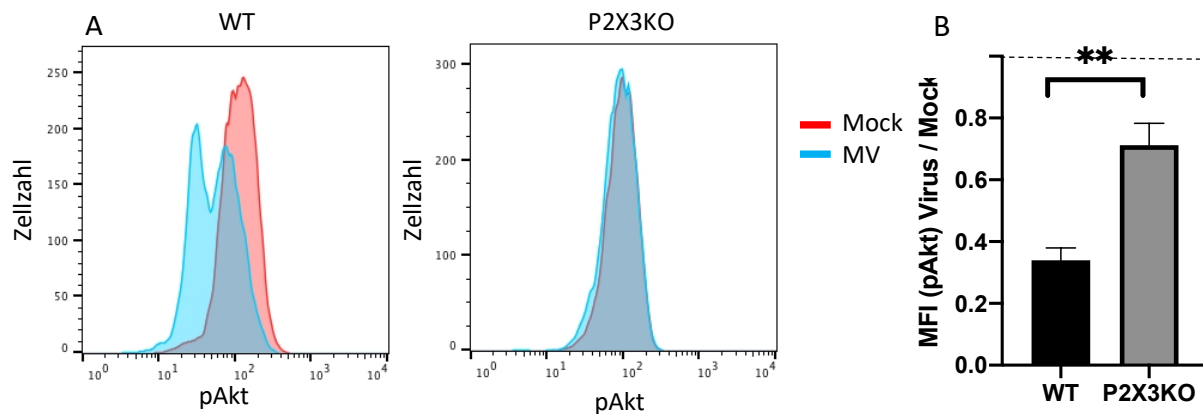
**Abbildung 26:** Proliferationsassay an Jx17-Zellen (WT und P2X3KO) nach Kontakt zu MV. **A)** Absolute Werte. **B)** Relative Proliferation. Den Abbildungen sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten zu entnehmen (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ).

Durch Kontakt zu MV MOI 20 war in WT-Zellen eine signifikante Reduktion der Proliferation messbar ( $p=0,013$ ), während in P2X3KO-Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen Virus- und Mock-behandelten Zellen festzustellen waren (s. Abbildung 26A). Auffällig war, dass die Mock-kontaktierten P2X3KO-Zellen mit einer mittleren Thymidin-Inkorporation von 124 000 cpm signifikant ( $p=0,014$ ) mehr proliferierten als die WT-Zellen (mittlere Inkorporation: 104 000 cpm).

Bei MOI 20 betrug die relative Proliferation der WT-Zellen nur ca. 20,4 %, womit diese sich signifikant ( $p=0,0014$ ) von P2X3KO-Zellen unterschieden, in denen die Proliferation durch Kontakt zu MV um nur 23,8 % reduziert war (s. Abbildung 26B). Bei MV MOI 10 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Reaktion der beiden Zelltypen auf das MV festgestellt werden. Hier waren die Einbauraten in P2X3KO-Zellen rund 80 % der Mock-behandelten P2X3KO-Zellen, während sie in WT-Zellen durch das Virus auf ca. 57 % der Kontrollzellen reduziert wurden.

### 4.3.2.3 pAkt-Assay

Der Einfluss des Kontaktes zu MV (MOI 5) auf die Akt-Phosphorylierung in P2X3KO-Zellen wurde durchflusszytometrisch überprüft.



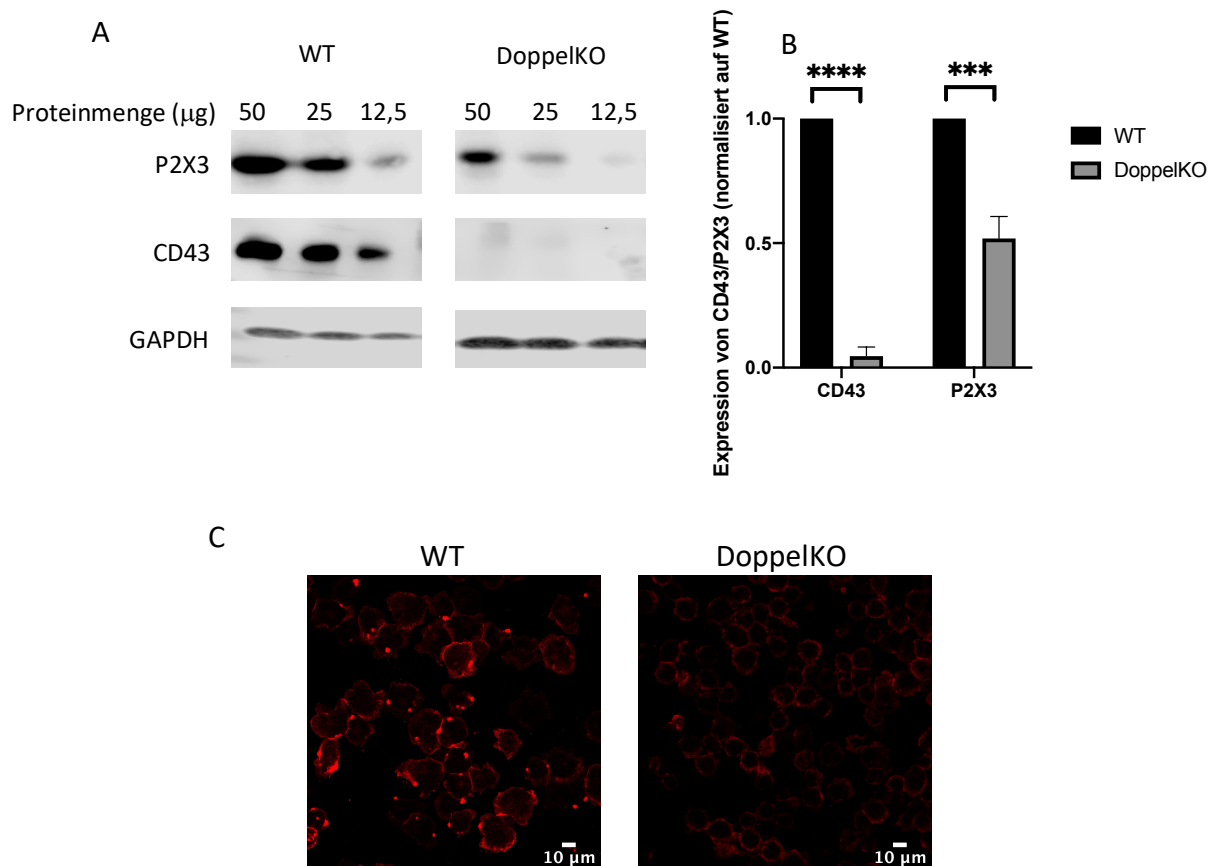
**Abbildung 27:** pAkt-Assay an Jx17-Zellen (WT und P2X3KO). **A)** Durchflusszytometrische Analyse der Akt-Phosphorylierung 24 h nach Kontakt zu MV bzw. Mock in WT- (links) und P2X3KO- (rechts) Jx17-Zellen. **B)** Die MFI der Virus-behandelten Zellen wurde auf die der entsprechenden Mock-behandelten Zellen normiert. Dem Graphen ist der Mittelwert der normierten MFI (pAkt) aus vier unabhängigen Experimenten zu entnehmen (\* $p=0,0038$ ).

Durch Kontakt zu MV kam es in WT-Zellen zu einer Reduktion der MFI um 66 % im Vergleich zu Mock Zellen (s. Abbildung 27), während die MV-induzierte Reduktion der Akt-Phosphorylierung in P2X3KO-Zellen mit 29 % signifikant geringer ausfiel ( $p=0,0038$ ).

### 4.3.3 Doppelknockout

Im Folgenden sollte eruiert werden, ob der Knockout beider potentieller Interaktionsrezeptoren (CD43 und P2X3) einen additiven Effekt bezüglich der Resistenz gegen MV im Vergleich zum singulären Knockout bietet. Hierfür wurden die sortierten CD43KO-Zellen (s. Absatz 4.3.1) viermal mit P2X3-spezifischer crRNA 1 transfiziert (DoppelKO). Diese hatte sich beim Knockout des purinergeren Rezeptors als effizienteste erwiesen (s. Abbildung 23). Der Transfektions-Erfolg wurde mittels Westernblot und konfokalmikroskopisch evaluiert.



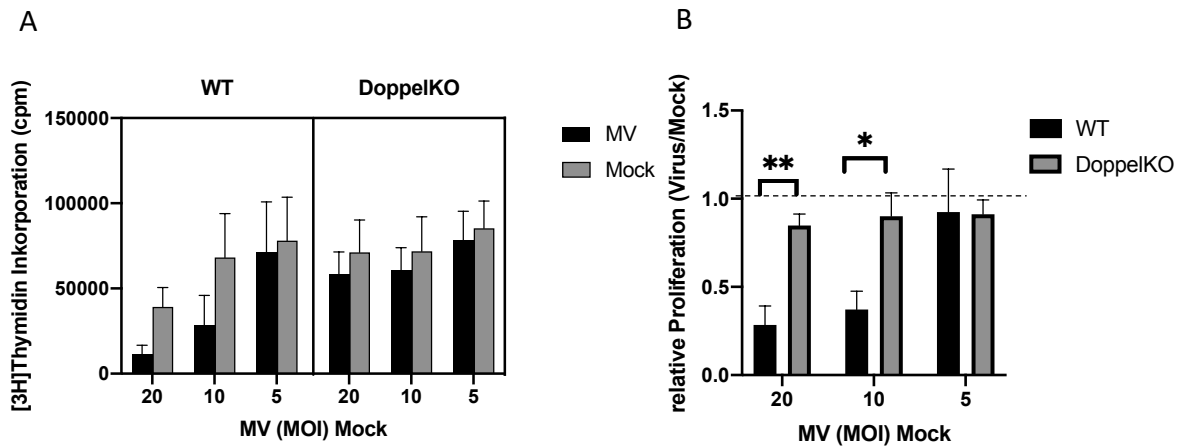


**Abbildung 28:** Expression von CD43 und P2X3 in WT- und DoppelKO-Zellen. **A)** Repräsentatives Westernblot (anti-P2X3 Antikörper von Abcam). **B)** Quantifizierung der Daten. Für bessere Vergleichbarkeit wurde die MFI der DoppelKO-Zellen auf die der WT-Zellen normiert. Den Abbildungen ist die mittlere relative Expression von P2X3/CD43 zu entnehmen (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\*\* $p = 0,00064$ ). **C)** Konfokalmikroskopie: Gesamtproteinfärbung von CD43 (rot).

Im Westernblot wurde in KO-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen eine mittlere Reduktion der Signalintensität um 95,4 % für CD43 ( $p = 0,0004$ ) und um 48,1 % für P2X3 ( $p = 0,00064$ ) gemessen (s. Abbildung 28). Es ergab sich somit eine signifikante Reduktion der Expression beider Rezeptoren in DoppelKO-Zellen. Da die Spezifität des anti-P2X3 Antikörpers fraglich war, kann allerdings keine Aussage über die genaue residuale Expression von P2X3 in DoppelKO-Zellen getroffen werden. Mikroskopisch ließ sich visuell für CD43 eine deutliche Reduktion der Signalintensität erkennen.

#### 4.3.3.1 Proliferationsassay

Der Effekt des MV auf die Proliferation der Zellen wurde mittels eines Proliferationsassays bestimmt.

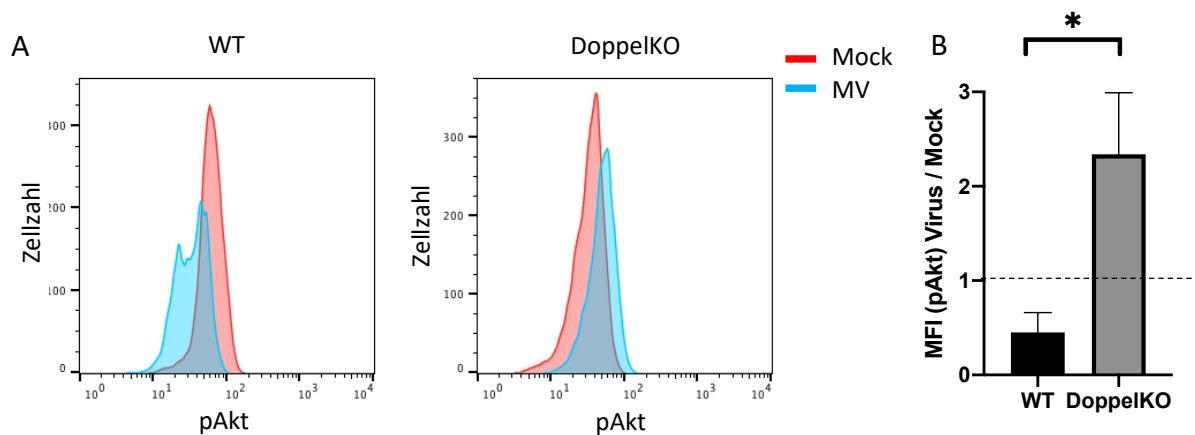


**Abbildung 29:** Proliferationsassay an WT- und DoppelKO-Zellen. **A)** Absolute Werte. **B)** Relative Proliferation. Der Abbildung ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten zu entnehmen (\*\* $p=0,0043$ ; \* $p=0,023$ ).

In WT-Zellen war durch Kontakt zu MV MOI 20 nach drei Tagen eine Inhibition der Proliferation auf 28,7 % der Mock-Zellen zu beobachten (s. Abbildung 29). Durch MV MOI 10 wurden die Tritiumthymidin-Einbauraten auf 37,1 % der Mock-Werte reduziert, während MOI 5 mit einer Reduktion der Proliferation um 7,6 % nur einen geringen Effekt hatte. Die Proliferation der DoppelKO-Zellen war durch Kontakt zu MV kaum zu beeinflussen. So resultierte der Kontakt zu MV MOI 20 in ca. 15,1 % geringeren Einbauraten im Vergleich zu Mock-kontaktierten Zellen und bei MOI 10 und 5 entsprach die Proliferation der DoppelKO-Jx17 in etwa der der Kontrollzellen (92,6 % und 93,2 %). Bei MV MOI 20 und 10 ergaben sich somit signifikante Unterschiede in der relativen Proliferation der DoppelKO- und WT-Jx17-Zellen ( $p=0,00043$  und  $p=0,023$ ). Die relative Proliferation der DoppelKO-Zellen war im Schnitt 2,13-mal größer als die der WT Zellen; die der P2X3KO- und CD43KO-Zellen 2,1- und 2,0-mal. Damit hatte der Knockout beider Proteine einen additiven Effekt bezüglich der Protektion gegenüber der Proliferations-Inhibition durch das MV.

#### 4.3.3.2 pAkt-Assay

Um zu evaluieren, ob MV MOI 5 in DoppelKO-Zellen eine Reduktion der Akt-Phosphorylierung induzieren konnte, wurde mit DoppelKO- und WT-Zellen ein pAkt-Assay durchgeführt.

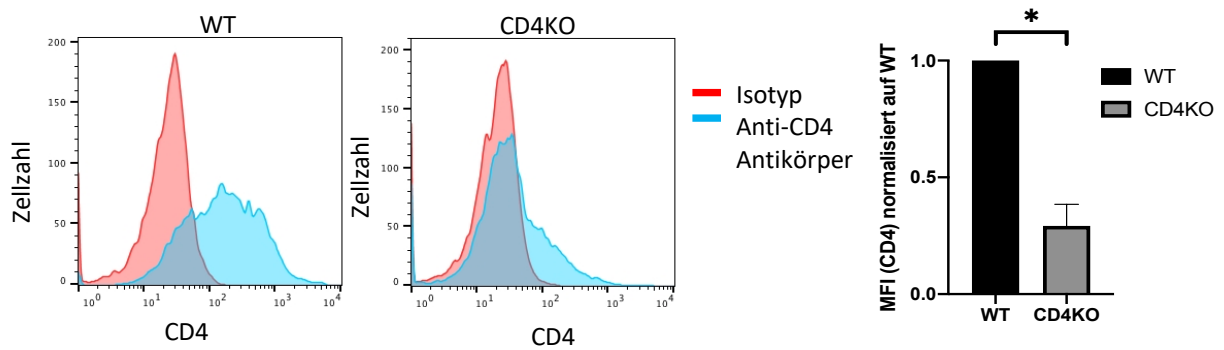


**Abbildung 30:** pAkt-Assay an DoppelKO- und WT-Zellen. **A)** Repräsentative Diagramme. **B)** Quantifizierung der durchflusszytometrischen Daten. Die MFI für pAkt der Virus-kontaktierten Zellen wurde auf die der Mock-kontaktierten Zellen normiert. Der Abbildung ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten zu entnehmen (\* $p=0,033$ ).

Kontakt zu MV MOI 5 führte in WT-Zellen zu einer Reduktion der MFI für pAkt um 54,8 %. In DoppelKO-Zellen war die MFI für pAkt für Virus-kontaktierte Zellen stets größer als für Mock-kontaktierte. Deshalb ist davon auszugehen, dass durch das Virus kein negativer Einfluss auf die Phosphorylierung von Akt in dieser Zellpopulation ausgeübt wurde (s. Abbildung 30). Die beiden Zelltypen unterschieden sich dahingehend signifikant voneinander ( $p=0,033$ ). Sowohl bei P2X3KO-Zellen als auch bei CD43KO-Zellen kam es durch Kontakt zu MV zu einer geringfügigen Reduktion der Phosphorylierung von Akt um 29 % bzw. 16,6 %. Damit hatte der Knockout beider Rezeptoren (CD43 und P2X3) auch hinsichtlich der Akt-Phosphorylierung einen additiven Effekt gegenüber dem singulären Knockout.

#### 4.3.4 CD4-Knockout

Da sowohl der CD43- als auch der P2X3-Knockout die Masernvirus-induzierten Effekte aufhob, wurde im Folgenden die Spezifität des Knockouts überprüft.

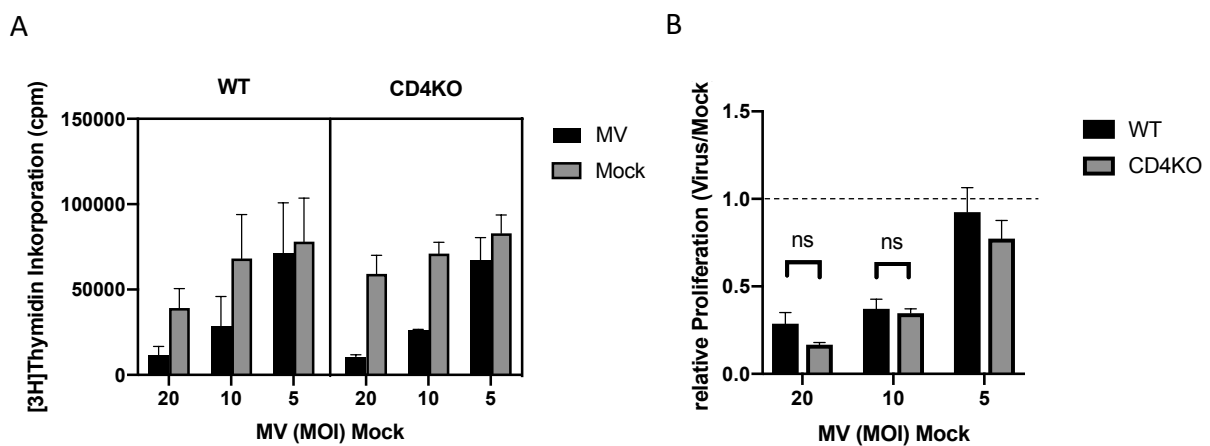


**Abbildung 31:** Durchflusszytometrische Analyse der CD4-Expression an CD4KO- und WT-Jx17-Zellen. Repräsentative Histogramme (links). Quantifizierung der durchflusszytometrischen Daten (rechts). Der Abbildung ist die mittlere relative Signalintensität (CD4) im Vergleich zu den WT-Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten zu entnehmen ( $p=0,0166$ ).

Hierfür wurden einige der in den Abschnitten 4.3.1 und 4.3.2 beschriebenen Experimente an im Zuge dieser Arbeit generierten CD4KO-Zellen durchgeführt (s. Abbildung 31). Nach vier Transfektionen mit CD4-spezifischer crRNA war die Oberflächenexpression von CD4 um ca. 71 % reduziert (CD4KO) ( $p=0,0166$ ). Diese Zellpopulation wurde mit MV kontaktiert und mittels Proliferationsassay und pAkt-Assay funktionell charakterisiert.

#### 4.3.4.1 Proliferationsassay

Die Proliferation der CD4KO-Zellen, sowie der WT-Zellen nach MV- /Mock-Kontakt wurde nach 3 d anhand der Inkorporation von Tritiumthymidin ermittelt (s. Abbildung 32).



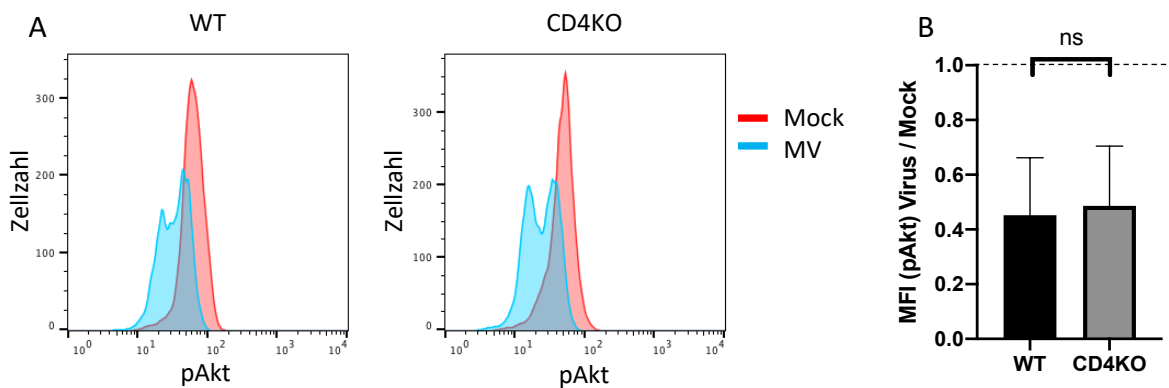
**Abbildung 32:** Proliferationsassay an WT- und CD4KO-Zellen. **A)** Absolute Werte. **B)** Relative Proliferation. Der Abbildung sind die Mittelwerte von WT und CD4KO-Jx17-Zellen aus drei unabhängigen Experimenten zu entnehmen (**ns: nicht signifikant**).

Im Allgemeinen verhielten sich CD4KO-Zellen nach Kontakt zu MV analog zu WT-Zellen. Bei MV MOI 20 war für CD4KO-Zellen eine Reduktion der Proliferation auf 16,7 % und für WT-

Zellen auf 28,7 % im Vergleich zu Mock-kontaktierten Zellen zu beobachten. Kontakt zu MV MOI 10 reduzierte die Proliferation in den Zellen auf 37,2 % (WT) bzw. 34,7 % (CD4KO), MV MOI 5 auf 92,4 % (WT) bzw. 77,2 % (CD4KO). Somit unterschieden sich die CD4KO-Zellen diesbezüglich nicht signifikant von den WT-Zellen.

#### 4.3.4.2 pAkt-Assay

Die Akt-Phosphorylierung in den CD4KO-Zellen nach Kontakt zu MV für 24 h wurde durchflusszytometrisch ermittelt.

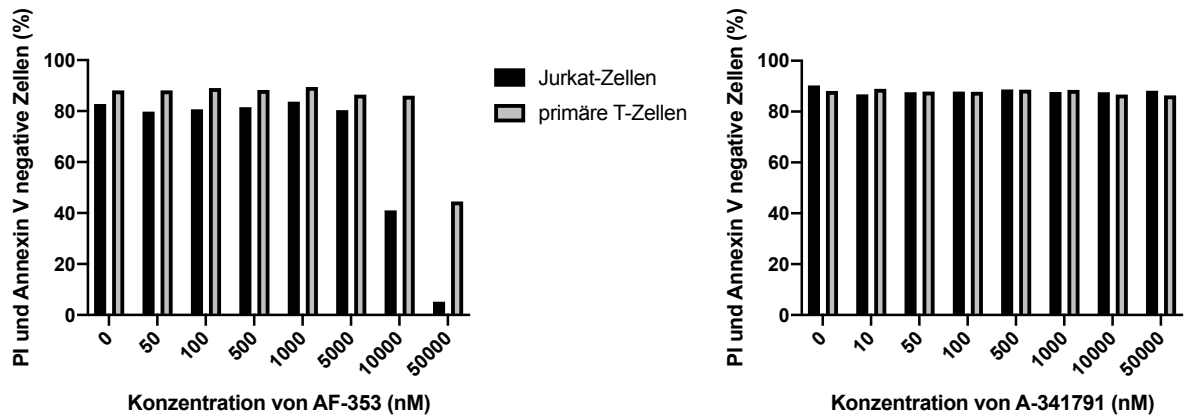


**Abbildung 33:** pAkt-Assay an CD4KO- und WT-Zellen. **A)** Durchflusszytometrie. **B)** Quantifizierung der Daten aus der Durchflusszytometrie. Die MFI (pAkt) der Virus-kontaktierten Zellen wurde auf die der Mock-kontaktierten Zellen normiert. Der Abbildung ist die mittlere relative Signalintensität (pAkt) aus vier unabhängigen Experimenten zu entnehmen (**ns: nicht signifikant**).

Im Mittel betrug die MFI (pAkt) für CD4KO-Zellen nach Kontakt zu MV für 24 h ca. 48,6 % der in Mock-Zellen gemessenen Werte. In WT-Zellen induzierte das Virus eine Reduktion der Akt-Phosphorylierung auf 45,2 % (s. Abbildung 33). Insgesamt konnte zwischen beiden Zelllinien kein signifikanter Unterschied in der Modulation der Phosphorylierung von Akt durch MV festgestellt werden.

#### 4.3.5 pAkt-Assay mit spezifischen P2X3-Inhibitoren

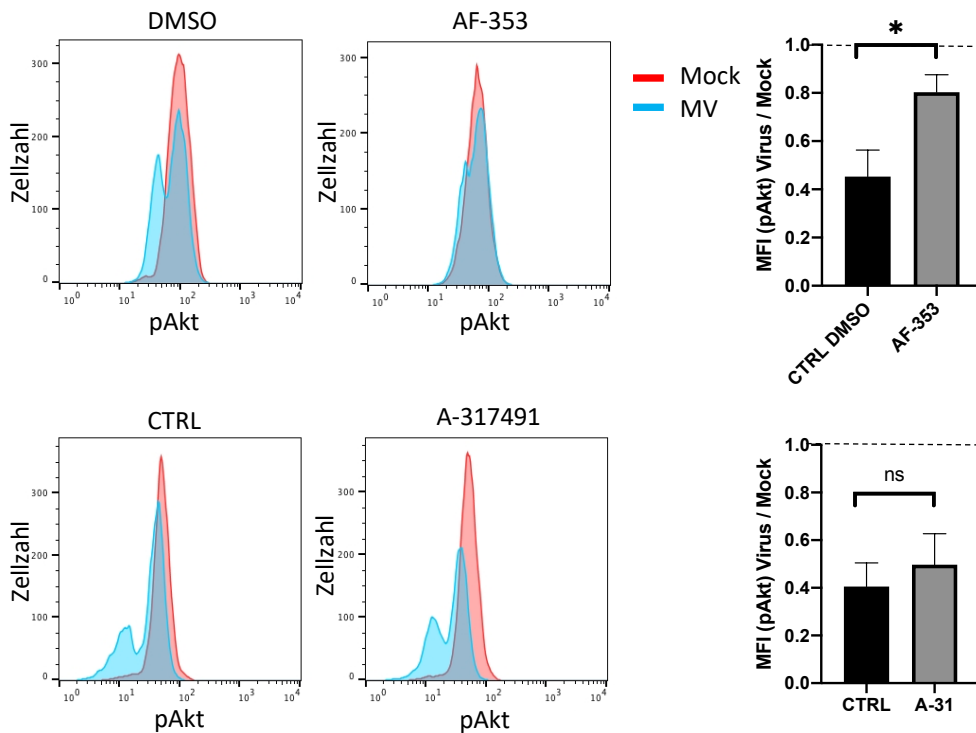
Mit A-317491 (kompetitiv) und AF-353 (allosterisch) (s. Abbildung 5C) stehen gut charakterisierte Reagentien zur Verfügung, die P2X3-Rezeptor Homotrimere sowie P2X2/3-Rezeptor Heterotrimere kompetitiv (Verhinderung der ATP-Bindung) bzw. allosterisch (Blockade der Kanalfunktion) hemmen<sup>143,144</sup>.



**Abbildung 34:** Durchflusszytometrische Analyse der Zellviabilität nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von A-317491 und AF-353 in Jurkat- und primären T-Zellen nach 3 d. Die Abbildung zeigt Daten aus je einem Experiment.

Vor dem Einsatz der Inhibitoren wurden diese an Jx17-Jurkat-Zellen und primären T-Zellen auf ihre Toxizität getestet. Hierfür wurde die Viabilität der Zellen nach 3 d Inkubation mit den spezifischen Inhibitoren durchflusszytometrisch mittels Annexin V- und PI-Färbung überprüft (s. Abbildung 34). Der isosterische Inhibitor A-317491 war in keiner der eingesetzten Konzentrationen zytotoxisch und wurde in den nachfolgenden Experimenten daher in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  verwendet. Bei AF-353 in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  waren nach 3 d nur noch 5,2 % der Jurkat-Zellen Annexin V/PI negativ, bei 10  $\mu\text{M}$  noch ca. 41,0 %. Bei primären Zellen war bei einer Inhibitor-Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  eine starke Reduktion der Zell-Viabilität auf 44,6 % zu beobachten. AF-353 wurde daher in den nachfolgenden Experimenten in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  angewandt.

Um zu ermitteln, ob die P2X3-ATP-Bindung oder dessen Kanalfunktion für die MV-Inhibition von Bedeutung sind, wurden Jx17-Zellen für 2 h mit dem jeweiligen P2X3-Inhibitor vor MV-Behandlung präinkubiert. Mittels pAkt-Assay (s. Abschnitt 3.3.5) wurde der Einfluss dieser Blockade auf die Reduktion der Phosphorylierung von Akt nach Kontakt zu MV für 24 h überprüft.



**Abbildung 35:** Durchflusszytometrische Analyse der Phosphorylierung von Akt an Jx17-Zellen mit Inhibitoren für P2X3 nach Kontakt zu MV MOI 5 für 24 h. Die Quantifizierung der Daten (rechts) zeigt die mittlere relative Signalintensität (Virus/Mock) aus vier unabhängigen Experimenten (\* $p=0,0378$ ).

Eine Reduktion der Phosphorylierung von Akt konnte für alle Gruppen beobachtet werden (s. Abbildung 35). Die Vorbehandlung mit dem isosterischen Inhibitor A-317491 hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Effekt des MV auf die Zellen. Die mittlere relative Signalintensität (MV-/Mock-kontaktierte Zellen) betrug hier 49,8 % und bei Kontrollzellen (CTRL) 40,6 %. In mit dem allosterischem Inhibitor AF-353 vorbehandelten Zellen reduzierte das Virus die Akt-Phosphorylierung nur um 19,8 %, während diese in Kontrollzellen (CTRL DMSO) um 64,7 % und damit signifikant stärker reduziert war ( $p=0,0378$ ).

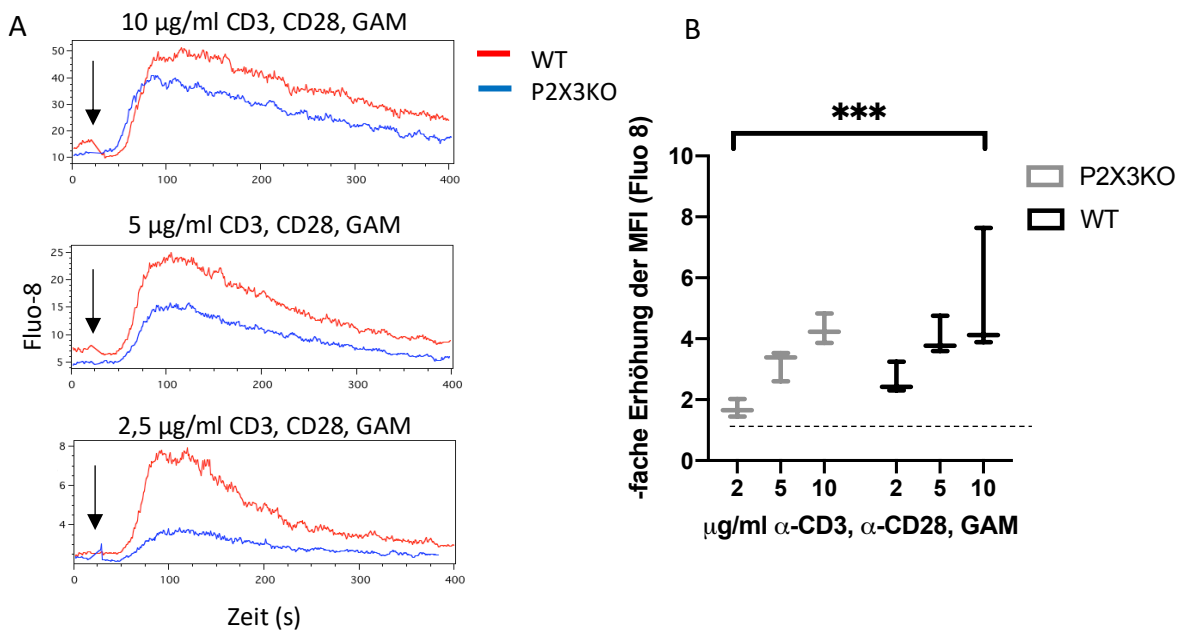
#### 4.4 Funktionelle Charakterisierung von P2X3 in Jx17-Zellen und primären T-Zellen

Die Expression von P2X3 ist in T-Zellen nur exemplarisch untersucht und noch nicht eindeutig belegt. Deshalb ist eine potentielle Funktion dieses Rezeptors im hämatopoetischen Kompartiment bis dato nicht bekannt. Im Folgenden wurde untersucht, ob P2X3 für die T-Zell-Stimulation von Bedeutung ist. Hierfür wurden einerseits der zytoplasmatische  $Ca^{2+}$ -Gehalt von P2X3KO- und WT-Jurkat-Zellen nach TCR/CD28 Co-Stimulation verglichen. Zusätzlich wurde der Effekt einer Inhibition des Rezeptors in Jurkat-Zellen und primären T-Zellen auf die co-stimulationsabhängige  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung untersucht. Zuletzt wurde der Einfluss einer

P2X3-Rezeptor-Inhibition auf die co-stimulationsabhängige Proliferation primärer T-Zellen und die stimulationsunabhängige Proliferation von Jurkat-Zellen analysiert.

#### 4.4.1 Ca<sup>2+</sup>-Einstrom nach TCR/CD28 Co-Stimulation in P2X3-Rezeptor-depletierten Jx17-Zellen

Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von anti-CD3 Antikörper, anti-CD28 Antikörper und GAM stimuliert.



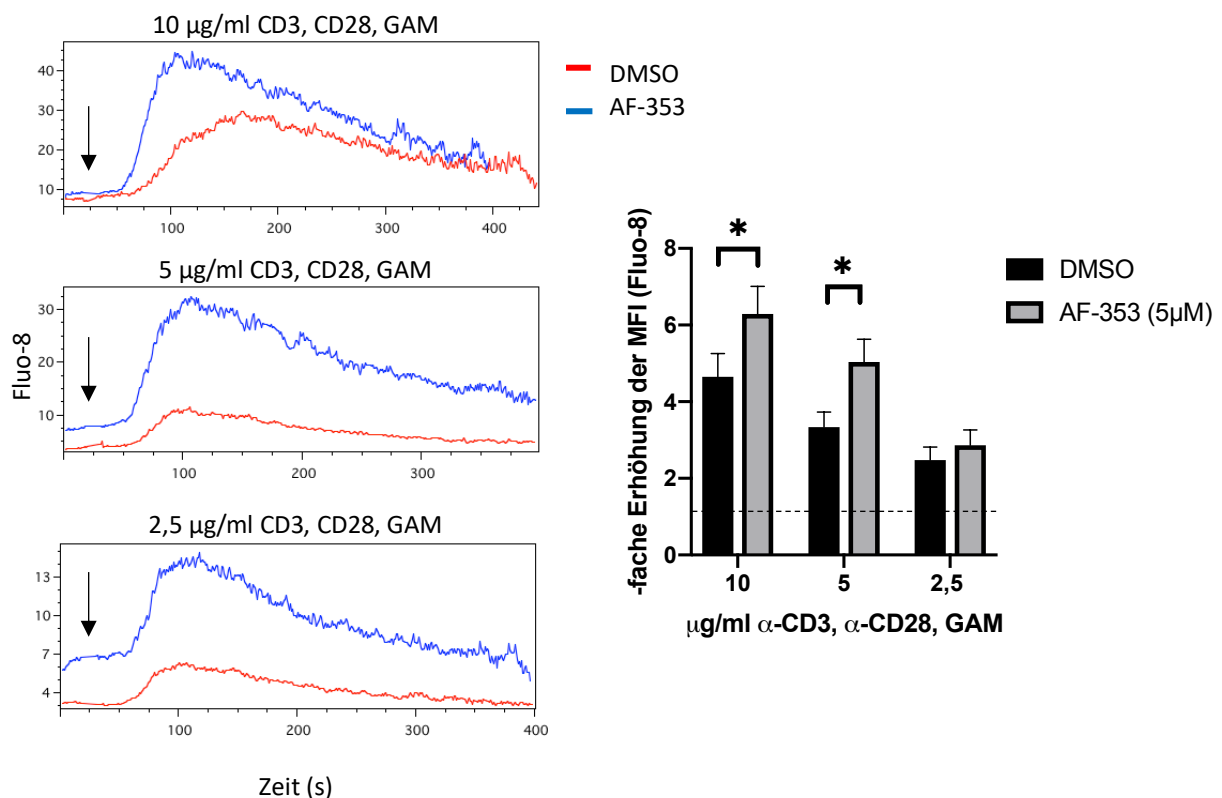
**Abbildung 36:** Ca<sup>2+</sup>-Kinetik nach Co-Stimulation in WT- und P2X3KO-Jx17-Zellen. **A)** Repräsentative Kinetik **B)** Quantifizierung der Daten aus der Durchflusszytometrie. Der Abbildung ist die mittlere relative Erhöhung der MFI aus drei unabhängigen Experimenten zu entnehmen. Der Pfeil markiert jeweils die Zugabe der Antikörper (\*\*\*)**p=0,007**).

In beiden Zelltypen konnte simultan ein Anstieg des zytosolischen Ca<sup>2+</sup> gemessen werden, der generell in WT-Zellen stärker war (s. Abbildung 36). Die Unterschiede in den Stimulationsantworten waren für 2,5 µg/ml anti-CD3-Antikörper, anti-CD28-Antikörper und GAM am stärksten ausgeprägt. Hier zeigten WT-Zellen nach Stimulation einen 2,7-fachem und P2X3KO-Zellen einen 1,7-fachem Anstieg der MFI (Fluo-8). Bei Stimulation mit 10 bzw. 5 µg/ml anti-CD3-Antikörper, anti-CD28-Antikörper und GAM stieg die MFI in WT-Zellen um das 5,2- bzw. 4,0-fache und in P2X3KO-Zellen um das 4,3- bzw. 3,2-fache. Beim Vergleich der beiden Zelllinien über alle Konzentrationen der stimulatorischen Antikörper hinweg ergab sich ein signifikanter Unterschied im Anstieg der MFI (Fluo 8) nach Stimulation (p=0,0007).



#### 4.4.2 Ca<sup>2+</sup>-Einstrom nach TCR/CD28 Co-Stimulation mit allosterischer P2X3-Rezeptor-Inhibition in Jx17-Zellen und primären T-Zellen

Zunächst wurde der Einfluss einer allosterischen P2X3-Rezeptor-Inhibition auf den zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Pool nach Co-Stimulation überprüft. Hierfür wurden die Zellen vor der Stimulation für zwei Stunden mit dem P2X3-Inhibitor AF-353 vorbehandelt.

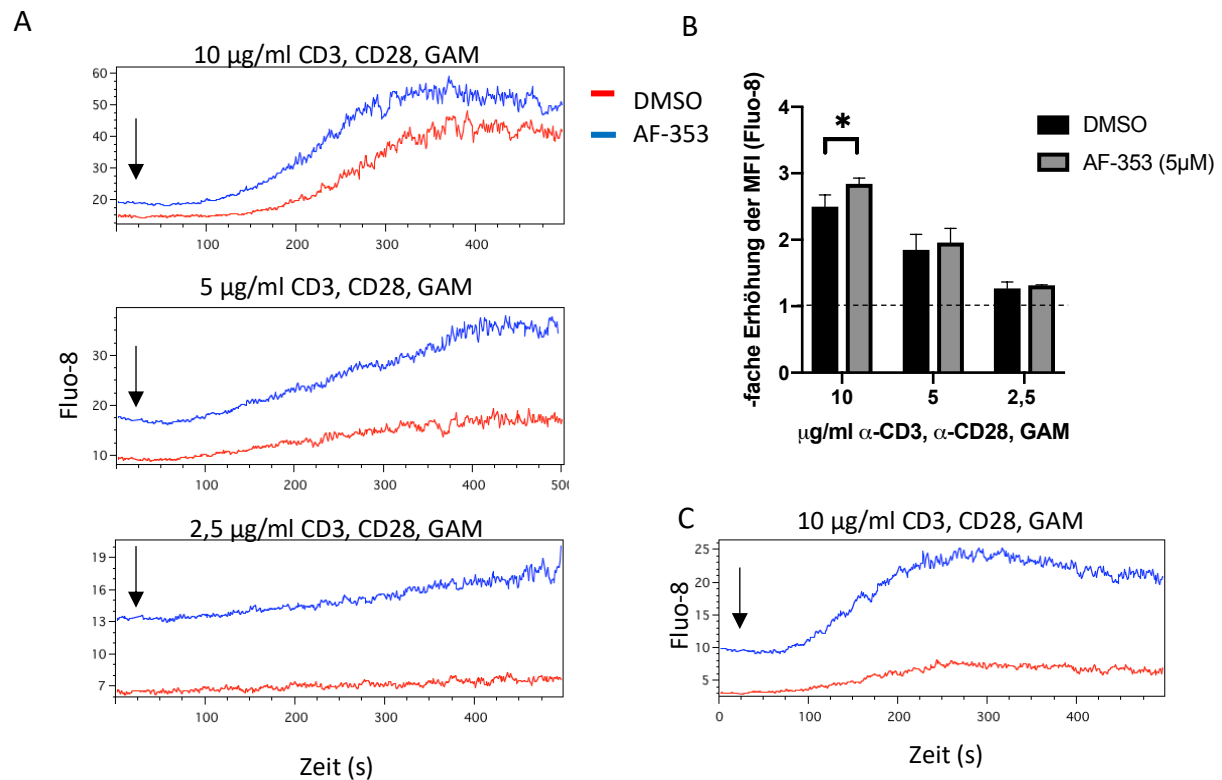


**Abbildung 37:** Ca<sup>2+</sup>-Einstrom nach Co-Stimulation mit allosterischer P2X3-Inhibition in Jx17-Zellen. Repräsentative Kinetik (links) und Quantifizierung der Daten aus vier unabhängigen Experimenten (rechts). Die Abbildung zeigt die mittlere relative Erhöhung der MFI nach Stimulation. Der Pfeil markiert jeweils die Zugabe der Antikörper (\***p<0,05**).

Die mittlere Erhöhung der MFI (Fluo-8) war nach Vorbehandlung der Jurkat-Zellen mit AF-353 bei jeder Konzentration der stimulatorischen Antikörper erhöht (s. Abbildung 37). So steigerte die Stimulation mit 10 µg/ml anti-CD3 Antikörper, anti-CD28 Antikörper und GAM in DMSO-behandelten Zellen den zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Gehalt im Mittel um das 4,65-fache, während nach AF-353-Exposition eine signifikant (p=0,042) größere Erhöhung der MFI auf 629 % des basalen Wertes gemessen wurde. Ähnlich zeigte sich nach Stimulation der DMSO-Kontrolle mit je 5 µg/ml anti-CD3 Antikörper und anti-CD28 Antikörper ein Anstieg der MFI auf das 3,34-fache, in AF-353 behandelten Zellen auf das 5,03-fache (p=0,036). Bei schwacher Co-

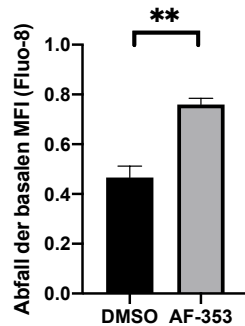
Stimulation (je 2,5 µg/ml anti-CD3 Antikörper und anti-CD28 Antikörper) war kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen sichtbar.

In primären Zellen konnte Ähnliches beobachtet werden, wenngleich hier der Effekt der allosterischen P2X3-Rezeptor-Inhibition geringer ausgeprägt war.



**Abbildung 38:** Ca<sup>2+</sup>-Einstrom nach Co-Stimulation mit allosterischer P2X3-Inhibition in primären T-Zellen. **A)** Repräsentative Kinetik. **B)** Quantifizierung der Daten aus vier unabhängigen Experimenten. Für die Auswertung wurde das Maximum der MFI (Fluo-8) auf den Hintergrund (mittlere prästimulatorische MFI (Fluo-8)) normiert (\*p=0,013). **C)** Messung ca. 40 min nach Vollendung des Beladens. Repräsentative Kinetik aus drei unabhängigen Experimenten. Der Pfeil markiert jeweils die Zugabe der Antikörper.

Für primäre Zellen war lediglich bei einer Konzentration von je 10 µg/ml anti-CD3 Antikörper und anti-CD28 Antikörper ein signifikanter Effekt auf die allosterische P2X3-Rezeptor-Inhibition durch AF-353 zu beobachten (p=0,013). So kam es durch die Stimulation in der DMSO-Kontrolle zu einer Erhöhung desselbigen um 250 %, bei den mit AF-353 behandelten Zellen um 284 % (s. Abbildung 38). Bei niedrigeren Konzentrationen der stimulatorischen Antikörper konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mehr festgestellt werden.

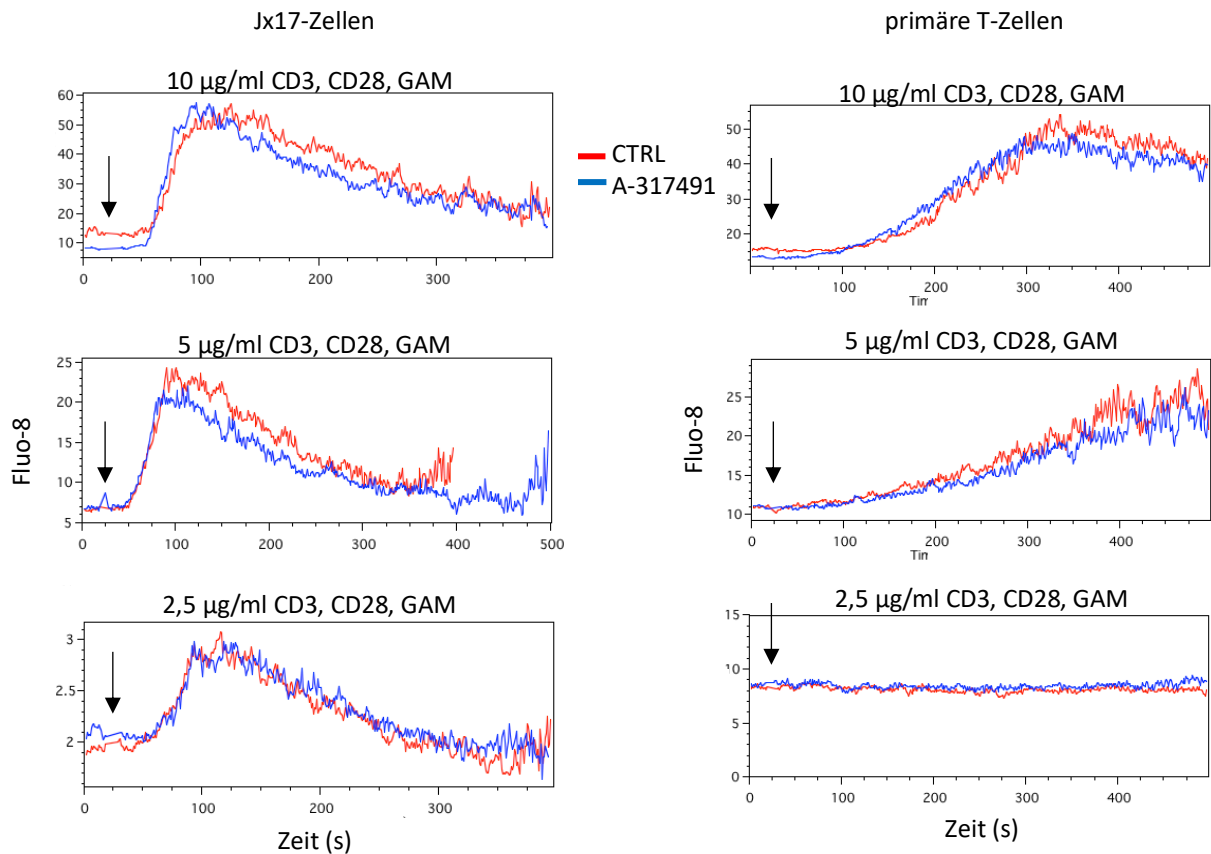


**Abbildung 39:** Abfall der basalen MFI (Fluo-8) in primären T-Zellen. Die basale MFI der letzten Messung wurde jeweils auf die der ersten Messung normiert. Die Abbildung zeigt den mittlere Signalabfall aus drei unabhängigen Experimenten (\*\*p=0,0049).

Die Zellen wurden gleichzeitig mit Fluo-8 beladen und lagerten bis zur Messung bis zu 45 min im Brutschrank. Bei dieser Art der Erfassung des zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes kommt es im Laufe der Zeit häufig zu einem Abfall der basalen Fluoreszenzintensität. Auffällig war, dass DMSO-behandelte Zellen hiervon signifikant stärker betroffen waren als AF-353-behandelte Zellen (p=0,0049). In primären Zellen betrug die basale MFI (Fluo-8) im Schnitt bei der dritten Messung nur noch 46,6 % des Ausgangswertes. Durch die Behandlung mit AF-353 steigerte sich der Prozentsatz auf 75,5 % (s. Abbildung 39). Um zu untersuchen, ob der Abfall des basalen Signals einen Einfluss auf das Ergebnis der Messung hatte, wurden die Zellen für eine vierte Messung erneut mit co-stimuliert (s. Abbildung 38C). In beiden Gruppen konnte ein Anstieg des zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes gemessen werden, welcher mit 243 % in DMSO- und 283 % in AF-353-behandelten Zellen nur geringfügig kleiner ausfiel als bei der ersten Messung. Demnach wurden die Ergebnisse nicht durch den unterschiedlich stark ausgeprägten Abfall der basalen Signalintensität verzerrt.

#### 4.4.3 $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach TCR/CD28 Co-Stimulation mit kompetitiver P2X3-Rezeptor-Inhibition in Jx17-Zellen und primären T-Zellen

Im Folgenden wurde evaluiert, ob eine isosterische Inhibition des P2X3-Rezeptors ähnliche Effekte auf den stimulationsabhängigen Anstieg des zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes in T-Zellen hat wie dessen allosterische Inhibition (s. Abschnitt 4.4.2).



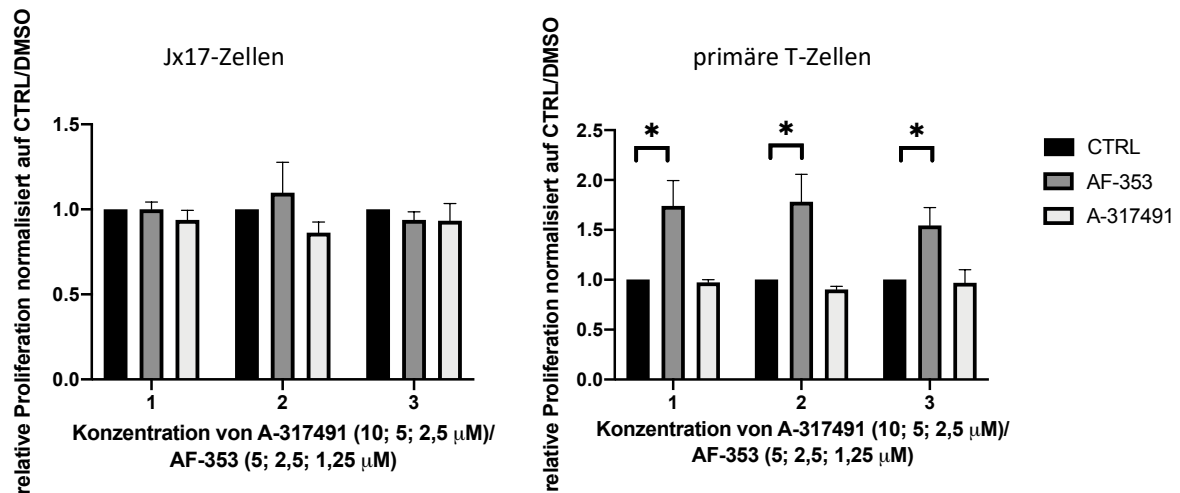
**Abbildung 40:** Ca<sup>2+</sup>-Einstrom nach Co-Stimulation mit kompetitiver P2X3-Inhibition in Jx17-Zellen (links) und primären T-Zellen (rechts). Die Abbildung zeigt je eine repräsentative Kinetik aus drei unabhängigen Experimenten. Der Pfeil markiert jeweils die Zugabe der Antikörper.

Durch die isosterische Inhibition von P2X3 durch A-317491 ergaben sich weder in primären- noch in Jurkat-T-Zellen Unterschiede in der stimulationsabhängigen Erhöhung des zyttoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Gehalts (s. Abbildung 40). So waren die Ca<sup>2+</sup>-Kinetik sowie der Anstieg des Signals für Fluo-8 bei jeder angewandten Konzentration der stimulatorischen Antikörpern in A-317491-behandelten Zellen stets vergleichbar mit denen DMSO-behandelter. Auch der in Absatz 4.4.2 beschriebene Abfall der basalen Fluoreszenzintensität war in beiden Gruppen vergleichbar. In diesem Fall konnte für primäre Zellen in keinem der drei Experimente ein Anstieg des zyttoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Gehaltes nach Stimulation mit je 2,5 µg/ml anti-CD3 Antikörper und anti-CD28 Antikörper gemessen werden (s. Abbildung 40 unten).

#### 4.4.4 Proliferation von primären- und Jx17-T-Zellen nach P2X3-Rezeptor-Inhibition

Um zu erfassen, ob die Inhibition von P2X3 einen Einfluss auf die stimulationsabhängige Proliferation primärer T-Zellen bzw. auf die stimulationsunabhängige Proliferation der Zelllinie Jx17 hatte, wurden Proliferationsassays durchgeführt (s. Abschnitt 3.6.1.2 bzw. 3.6.2.2).

A-317491 wurde hierbei in den Konzentrationen 10; 5 und 2,5  $\mu\text{M}$  und hinzugefügt; AF-353 in den Konzentrationen 5; 2,5 und 1,25  $\mu\text{M}$ .



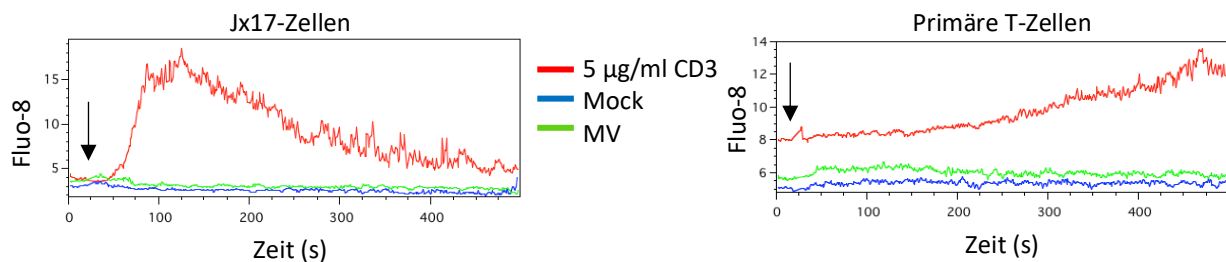
**Abbildung 41:** Proliferationsassay an Jx17-Zellen (links) und primären T-Zellen (rechts) mit P2X3-Rezeptor Inhibition. Für die Auswertung wurden die absoluten Werte jeweils auf den Mittelwert der Kontrolle in der jeweiligen Verdünnung normiert (A-317491 auf unbehandelt, AF-353 auf DMSO). Den Graphen ist die mittlere relative Proliferation aus drei unabhängigen Experimenten zu entnehmen. 1 steht hierbei für die höchste, 2 für die mittlere und 3 für die niedrigste Konzentration des jeweiligen Inhibitors (\* $p < 0,05$ ).

Die stimulationsunabhängige Proliferation der Jx17-Zellen wurde weder durch iso- noch allosterische Inhibition von P2X3 signifikant beeinflusst (s. Abbildung 41 links). So war die mittlere relative Proliferation der Jurkat-Zellen bei allen Konzentrationen des kompetitiven Inhibitors A-317491 zwischen 1,1 und 1,3, bei Behandlung mit AF-353 lag sie zwischen 0,8 und 1,1.

Auch die stimulationsabhängige Proliferation primärer T-Zellen wurde durch A-317491 nicht beeinflusst. Die mittlere relative Proliferation rangierte hier zwischen 0,9 und 1,0. Eine allosterische Inhibition von P2X3 hingegen hatte bei allen angewandten Konzentrationen von AF-353 einen signifikanten Einfluss auf die stimulationsabhängige T-Zell-Proliferation (s. Abbildung 41 rechts). Die Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  erhöhte die Proliferation signifikant auf das 1,7-fache ( $p=0,044$ ), von 2,5  $\mu\text{M}$  auf das 1,8-fache ( $p=0,046$ ) und von 1,25  $\mu\text{M}$  auf das 1,5-fache ( $p=0,038$ ). Dabei gab es große Varianz zwischen den Spendern. Für zwei ließ sich bei den beiden höchsten Konzentrationen von AF-353 ein Anstieg der Einbauraten auf etwa das Doppelte beobachten, während Zellen des dritten Spenders mit einer um nur 23 % verstärkten Proliferation in denselben Konzentrationen eine geringere Reaktion auf den Inhibitor zeigten.

#### 4.5 MV und die zytosolische Ca<sup>2+</sup> Konzentration

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob P2X3 infolge eines MV-Kontakts aktiviert wird. Dies könnte sich in einer Erhöhung des zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Gehaltes von Jx17-Zellen äußern. Hierfür wurden Jx17-Zellen oder primäre T-Zellen mit Fluo-8 beladen und während der Messung mit UV-inaktiviertem MV (entsprechend MOI 10), einer entsprechenden Menge Mock und, als Positiv-Kontrolle für die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung, CD3- und CD28-spezifischen Antikörpern behandelt.

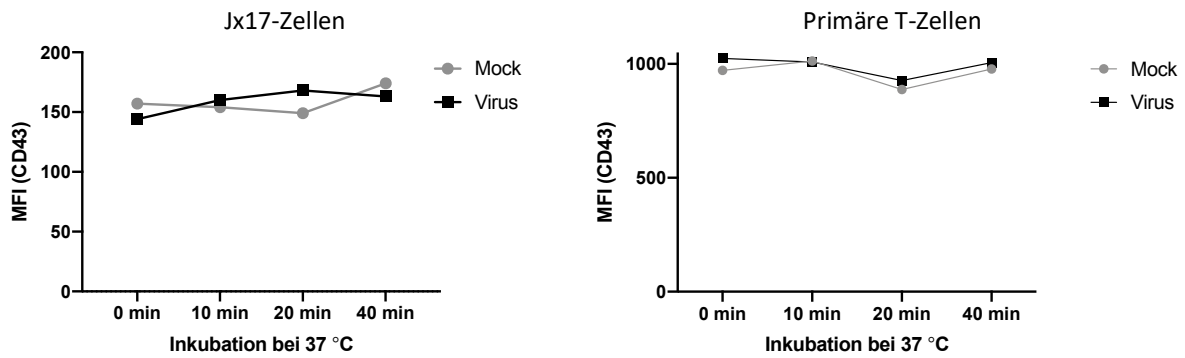


**Abbildung 42:** Durchflusszytometrische Analyse des zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Gehaltes von Jx17-Zellen (links) und primären T-Zellen (rechts) bei Zugabe von inaktiviertem MV (MOI 10) /Mock. Als Kontrolle wurden die Zellen mit 5 µg/ml anti-CD3/CD28 Antikörper stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils eine repräsentative Kinetik aus drei unabhängigen Experimenten. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe des Agonisten.

Für beide untersuchten Zellpopulationen konnte Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung infolge von TCR/CD28 Co-Stimulation nachgewiesen werden. Die Exposition der Zellen mit MV oder Mock induzierte keine Veränderungen der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Mittels dieser Methodik ergab sich also kein Hinweis darauf, dass MV innerhalb von 500 s einen Ca<sup>2+</sup>-Anstieg in den untersuchten Zellen induzierte (s. Abbildung 42).

#### 4.6 Analyse der CD43-Oberflächenexpression auf Jx17-Zellen nach Kontakt zu MV

Die Interaktion mit Liganden resultiert oft in einer Umverteilung bzw. Endozytose von Rezeptoren<sup>153,154</sup>. Daher wurde nachfolgend untersucht, ob das Expressionsmuster von CD43 infolge MV Exposition verändert ist.



**Abbildung 43:** Durchflusszytometrische Analyse der CD43-Expression an Jx17-Zellen (links) und CD4-angereicherten PBMCs (rechts). Die Abbildung zeigt jeweils eine repräsentative Kinetik aus drei unabhängigen Experimenten.

In diesem Experiment wurde durchflusszytometrisch die Oberflächenexpression von CD43 auf Jx17-Zellen nach Bindung von MV für 0, 10, 20 und 40 min überprüft. Es konnten keine relevanten Unterschiede in der Oberflächenexpression von CD43 zwischen den MV- und Mock-behandelten Jx17-Zellen festgestellt werden (s. Abbildung 43 links). Da Jurkat-Zellen mitunter weniger sensitiv auf Kontakt zu MV reagieren, wurde der Assay an CD4<sup>+</sup> Zellen angereicherten PBLs (s. Abschnitt 3.1.7) wiederholt. Auch in primären Zellen hatte das Virus keinen signifikanten Effekt auf die CD43-Oberflächenexpression (s. Abbildung 43 rechts). Der zur Detektion von P2X3 verwendete Antikörper erkennt ein intrazelluläres Epitop. Daher konnten keine Aussagen zu potentiellen quantitativen Veränderungen der Oberflächenexpression des purinergeren Rezeptors getroffen werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Vorkommen von CD43 und P2X3 auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs

Durch Kontakt nicht-infizierter hämatopoetischer Zellen mit dem MV-Glykoproteinkomplex kann das Virus diese paralyisieren. Nicht nur PBMCs und Lymphozyten von Nagern, sondern auch Zelllinien wie BJAB-Zellen (B-Zelllinie), HL60-Zellen (monozytäre Zelllinie) und Jurkat-Zellen (T-Zelllinie) können durch Kontakt zu MV in ihrer Proliferation inhibiert werden<sup>94</sup>. Um als potentieller Interaktionsrezeptor des MV auf hämatopoetischen Zellen infrage zu kommen, müssen die Rezeptoren demnach über die Spezies hinweg konserviert und in allen genannten Zelltypen exprimiert sein. Aus diesem Grund wurden PMBCs, murine Splenozyten, BJAB-Zellen und Jurkat-Zellen auf die Expression von CD43 und P2X3 überprüft.

Die Expression von CD43 auf hämatopoetischen Zellen ist bereits dokumentiert. Das aus der Literatur beschriebene Expressionsmuster konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Sialophorin (CD43) wird auf nahezu allen oben genannten Zelltypen, ausgenommen einer Subpopulation von B-Zellen exprimiert. Die Expression von CD43 auf Lymphozyten der Maus wurde für fast alle murine Splenozyten bestätigt (Ausnahme: B-Zell Subpopulationen, s. Abschnitt 1.4.1)<sup>119,155,156</sup>. Vor allem der intrazelluläre Anteil von CD43 aber auch Teile der extrazellulären Domäne sind konserviert<sup>157</sup>.

Über die Expression und Funktion des P2X3-Rezeptors in Lymphozyten ist bis dato wenig bekannt. Bei dem Menschen wurde bislang dessen Vorkommen in B-Zellen und Makrophagen bestätigt<sup>158-160</sup>. Die Expression von P2X3 auf Jurkat-Zellen und T-Zellen ist umstritten. Die Analyse der Expression von P2X3 gestaltete sich in dieser Arbeit als schwierig. P2X3 konnte mit allen verwendeten anti-P2X3 Antikörpern und P2X3-spezifische Transkripte mittels RT-PCR in allen oben genannten Zelltypen nachgewiesen werden (s. Abbildung 11, Abbildung 12). Die Spezifität der Antikörper und Primer waren allerdings fraglich. Mit dem anti-P2X3 Antikörper (Abcam) wurde im Westernblot ein positives Signal für humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney HEK) 293 Zellen detektiert, obwohl P2X3 in HEK 293 Zellen nicht exprimiert wird<sup>161</sup>. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden häufig für den Nachweis der Expression von humanem P2X3 genutzt<sup>162,163</sup>, amplifizierten jedoch auch in der P2X3-negativen Astrozytom-Zelllinie 1321N1 ein Fragment. Auch die Spezifität der



anderen Antikörper für den Nachweis von P2X3 auf Jurkat-Zellen war aufgrund unspezifischer Banden im Westernblot zweifelhaft.

Aufgrund des biologischen Effekts eines Knockouts von P2X3 mit spezifischer crRNA bzw. einer Inhibition des Rezeptors mit dem selektiven Inhibitor AF-353 in Jurkat-Zellen, ist davon auszugehen, dass diese CD4<sup>+</sup> T-Zelllinie P2X3 exprimiert. Da AF-353 in primären T-Zellen ähnliche Veränderungen im Aktivierungsverhalten induzierte wie in der Zelllinie, ist die Expression von P2X3 in diesen sehr wahrscheinlich. Dennoch sind weitere Analysen zum Vorhandensein von P2X3 auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs, eventuell mit genaueren Methoden (z.B. Ligandenbindungsassays), notwendig.

## **5.2 Modulation der Proliferations-Inhibition des MV mittels Blockade von P2X3 und CD43 durch Antikörper**

CD43- und P2X3-spezifische Antikörper wurden eingesetzt, um die Rezeptoren vor Behandlung mit ihrem potentiellen Liganden, MV, zu blockieren. Zugabe von jeweils 6 µg/ml Antikörper beeinflusste sichtbar die relative Proliferation der T-Zellen nach Kontakt zu MV. Während der anti-P2X3 Antikörper den Einfluss des MV auf die Zellen abzuschwächen schien, war die MV-induzierte Inhibition in den mit anti-CD43 Antikörper behandelten Zellen verstärkt (s. Abbildung 14, Abbildung 15). Das Blockierungsexperiment von P2X3 konnte nicht wiederholt werden, da nicht ausreichend Antikörper zur Verfügung stand. Deshalb und aufgrund der fraglichen Spezifität des Antikörpers ist das Ergebnis aus Abbildung 14 sehr eingeschränkt aussagekräftig.

Die Ligandierung von P2X3 durch spezifische Antikörper kann biologische Effekte auf Zellen evozieren. Je nach Klon kann die Bindung des Antikörpers nicht nur zu der Internalisierung von P2X3 führen, sondern auch agonistisch wirken und einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Zellen induzieren<sup>164</sup>. Ob der anti-P2X3 Antikörper von Alomone Labs, der für dieses Blockierungsexperiment benutzt wurde, biologische Effekte auf humane Zellen hat, ist unbekannt. Da P2X3 typischerweise konstitutiv und nach Bindung eines Liganden endozytiert wird<sup>139</sup>, ist wahrscheinlich, dass die Ligandierung des Antikörpers zur Internalisierung des Rezeptors führt. Problematisch ist allerdings, dass bei diesem anti-P2X3 Antikörpern ebenso wie bei allen weiteren in dieser Arbeit verwendeten die Spezifität fraglich war (s. Abschnitt 5.1).

Anti-CD43 Antikörper können, abhängig vom erkannten Epitop, in T-Zellen unterschiedliche biologische Prozesse auslösen<sup>115</sup>. Beispielsweise kann CD43-Ligation zu dessen *Capping* führen und dadurch eine apoptotische Wirkung ausüben<sup>123,165</sup>. Der in dieser Arbeit verwendete anti-CD43 Antikörper-Klon DF-T1 wurde in den 1990er Jahren von mehreren Arbeitsgruppen als stimulatorischer Antikörper beschrieben, der homotypische Aggregation der Zellen induziert<sup>166,167</sup>. In dieser Arbeit wurde nach der Antikörper-Stimulation von CD43 eine verstärkte Proliferations-inhibitorische Wirkung des MV auf die primären Zellen beobachtet (s. Abbildung 15).

Es ist unwahrscheinlich, dass eine proapoptotische Wirkung des Antikörpers dafür verantwortlich ist, da eine solche für diesen gut charakterisierten Antikörper-Klon in der Literatur bislang nicht beschrieben ist. Die absoluten Tritiumthymidin-Inkorporationswerte in unbehandelten und mit Antikörper behandelten Zellen waren jeweils sehr ähnlich, was gegen eine verminderte Zell-Viabilität spricht. Zusätzlich korrigiert die Normierung der Werte MV-kontaktierter Zellen auf Mock-kontaktierte Zellen eine Verzerrung der Resultate durch geringe Veränderungen in der Zell-Viabilität.

Die durch den anti-CD43 Antikörper forcierte MV-Inhibition suggeriert eine Beteiligung dieses wichtigen Oberflächenproteins an der T-Zell-Paralyse. Welche Prozesse die Stimulation von CD43 mit DF-T1 moduliert, die in dieser verstärkten Paralyse der T-Zellen resultieren, kann basierend auf diesen Daten nicht weiter spezifiziert werden. Der Antikörper könnte eine Umverteilung des Oberflächenmoleküls induzieren und dadurch eine Bindung des MV an den potentiellen Interaktionsrezeptor vereinfachen. Ebenso könnte CD43 als Effektor nach Stimulation diverse suppressive Signale vermitteln, was insbesondere für dessen zytoplasmatische Domäne beschrieben wurde<sup>168</sup>.

### **5.3 CD43 und P2X3 als potentielle Interaktionsrezeptoren des MV**

In T-Zellen wurde gezeigt, dass Kontakt zu MV zu einer ausgeprägten funktionellen und physischen Paralyse führt. So sind primäre Zellen nach Stimulation nicht mehr in der Lage zu proliferieren, was zum Teil auf einer Inhibition des PI3/Akt-Kinase-Signalwegs basiert. Aufgrund der Aktivierung der NSM2 und Akkumulation von Ceramiden, sowie beeinträchtigter Phosphorylierung der ERM-Proteine haben die Zellen eine gestörte Zytoskelettdynamik und

können *in vitro* weniger effektiv an Antikörper-überzogenen Flächen adhären. Dadurch sind vor allem die Migration, die Polarisierung und die Ausbildung der IS inhibiert<sup>100-103</sup>.

Teil dieser Arbeit war die Entwicklung von Methoden für die schnelle und gezielte Erfassung der genannten MV-modulierten Parameter. Die meisten der Methoden waren im Labor der Arbeitsgruppe Schneider-Schaulies bereits etabliert und mussten für Jurkat-Zellen, bzw. für den Vergleich zweier Zelllinien (WT/KO) angepasst werden. So gelang es, Methoden zur Erfassung der Akt-Phosphorylierung, der Proliferation und der NSM-Aktivierung zu etablieren und an den KO-Zelllinien zu testen. Mit diesen Assays konnten zentrale MV-modulierte Faktoren, die in einer MV-induzierten T-Zell-Suppression resultieren, abgeprüft werden.

Der spezifische Knockout mittels crRNA in Jx17-Zellen erwies sich als einfache Methode für die Ablation der untersuchten Proteine aus Jurkat-Zellen. Da für CD43 ein extrazellulär bindender Antikörper zur Verfügung stand, konnten die lebendigen Zellen gefärbt und durchflusszytometrisch sortiert werden, sodass am Ende eine Population mit einem sehr hohen Anteil CD43-negativer Zellen (ca. 97 %; s. Abschnitt 4.3.1) für die Durchführung der Experimente zur Verfügung stand.

Die P2X3KO-Zellen konnten nicht sortiert werden und die Evaluation des Knockouts gestaltete sich mangels spezifischer Antikörper (s. Abschnitt 5.1) als schwierig. Nach drei Transfektionen wurde eine Population erhalten, welche sich im Verhalten nach Kontakt zu MV signifikant von den WT-Zellen unterschied. Basierend auf den mit einem anti-P2X3-Antikörper von Biomol akquirierten Daten (s. Abbildung 23) wurde bei der Durchführung der Experimente von einer Population mit einem sehr hohen Prozentsatz P2X3-negativer Zellen ausgegangen. Die z.T. hochsignifikanten Unterschiede zwischen P2X3KO und tracr-Zellen sprachen dabei ebenso für einen sehr effizienten Knockout. So war beispielsweise bei keinem der drei durchgeführten NSM-Assays eine Aktivierung der NSM2 durch das MV in P2X3KO-Zellen zu beobachten. Die Daten mit dem anti-P2X3-Antikörper von Abcam standen hierzu im Widerspruch, da sie eine residuale Expression von ca. 60 % suggerierten. In einer Population mit 60 % WT-Zellen sollte theoretisch eine NSM-Aktivierung durch das MV zu beobachten sein. Insgesamt lässt sich keine Aussage über die genaue Effizienz des Knockouts treffen, wobei basierend auf den signifikanten biologischen Effekten des Knockouts vermutlich mindestens 50-60 % der Zellen in dieser Zelllinie P2X3-negativ waren.

Ablation von CD4 blieb ohne Einfluss auf die Sensitivität der Jx17-Zellen gegenüber MV-Inhibition (s. Abbildung 32, Abbildung 33). Dies impliziert, dass der Verlust abundanter Oberflächenproteine per se nicht für den reduzierten Einfluss des MV auf die Zellen verantwortlich ist. Jurkat-Zellen sind zwar CD4<sup>+</sup> T-Zellen, aber auch transformiert und damit in ihren Signaleigenschaften verändert. Es ist also notwendig, den Einfluss der Depletion von CD43 und P2X3 in primären T-Zellen auf das MV-Signal zu untersuchen.

Einflüsse des MV auf das Zytoskelett wurden in dieser Arbeit nicht direkt überprüft. Der sogenannte *spreading assay* lässt sich in primären Zellen als Methode zur Darstellung der MV-induzierten physikalischen Paralyse nutzen. Hierbei werden Zellen auf eine mit anti-CD3/CD28 Antikörper-überzogene Oberfläche gegeben und deren Ausbreitung nach 10 min konfokalmikroskopisch beurteilt. Die Stimulation induziert den Umbau des Zytoskeletts und eine Vergrößerung der Zelloberfläche – Vorgänge, die nach Kontakt zu MV stark beeinträchtigt sind<sup>100</sup>. Jurkat-Zellen haben per se bereits ein größeres Volumen und zeigen eine geringere *spreading response* als primäre Zellen, weshalb der Assay für die Zelllinie ungeeignet war. Eine weitere Möglichkeit für die Darstellung des viralen Einflusses auf das Zytoskelett ist die Beeinträchtigung der Phosphorylierung von ERM-Proteinen. Hierfür wurde mittels Phospho-ERM-Antikörper ein Durchflusszytometrie-basierter Assay entworfen. Dieser führte allerdings zu divergenten Resultaten und wurde deshalb nicht in das Testsystem aufgenommen. Die Aktivierung der NSM2 als Effektor der physikalischen Paralyse hingegen konnte mittels NSM-Assay gut überprüft werden (s. Abbildung 20, Abbildung 25)

Wie in Abschnitt 1.3.3 beschrieben gibt es die NSMasen1-3, deren Aktivität auch prinzipiell durch den verwendeten NSM-Assay erfasst wird. Die NSM2 arbeitet Mg<sup>2+</sup>-abhängig<sup>169</sup>, weshalb der Assay zur weiteren Differenzierung der gemessenen Aktivität in An- oder Abwesenheit von Mg<sup>2+</sup> durchgeführt werden kann. Die Werte der HMU-PC-Umsetzung in Abwesenheit von Mg<sup>2+</sup> können somit für die Auswertung des Assays von denen in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> abgezogen werden, um den spezifischen Beitrag der NSM2 am Assay zu ermitteln. Da der Assay in dieser Arbeit mit zwei Gruppen (WT und KO), in Triplets und zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt wurde, war er bereits sehr umfangreich. Eine Verdopplung der Proben hätte nicht nur erheblichen zusätzlichen Arbeitsaufwand und Materialverbrauch verursacht, sondern auch eine deutliche Verzögerung bei der Durchführung. Hierdurch hätten letztendlich die Ergebnisse verzerrt werden können, weshalb

in dieser Arbeit auf die Differenzierung der NSM-Aktivität verzichtet wurde. Durch das MV wird nur die NSM2 stark aktiviert<sup>89</sup>. Da in dieser Arbeit die Aktivität in MV-kontaktierten auf die Mock-kontaktierter Proben normiert wurde, führte der Beitrag anderer NSMasen als NSM2 lediglich zu einer Verkleinerung des relativen Effektes des MV.

Bei der Durchführung der Experimente zur Überprüfung des MV-Einflusses auf die Zellen gab es vor allem zwei essentielle Parameter: die Qualität der Zellkultur und die des Virusstocks. Bei schlechter Zellqualität hatte das Virus einen größeren Effekt als auf gesunde, stark proliferierende Jurkat-Zellen. Um diesen Einfluss teilweise zu kontrollieren, wurden jedes Experiment mindestens an drei unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Bei stark von der Zellqualität abhängigen Faktoren wie der Phosphorylierung von Akt oder der Proliferation wurde dieser Parameter zusätzlich durch die Normierung der Virus-Werte auf die Mock-Werte optimiert. Durch *gating* auf lebende Zellen (s. Abschnitt 3.3) konnte bei dem Durchflusszytometrie-basierten pAkt-Assay zudem gewährleistet werden, dass ein Großteil der toten und apoptotischen Zellen von der Auswertung ausgeschlossen waren.

Die Qualität der Virus-Präparation war trotz Kontrolle durch Titration und Proliferationsassay variabel. So war der Effekt des Virus auf die in dieser Arbeit gemessenen Faktoren bei gleicher MOI mitunter verschieden stark ausgeprägt. WT- und KO-Zellen wurden in einem Experiment stets mit der gleichen Virus-Präparation kontaktiert. Die Zelllinien-spezifischen Unterschiede blieben daher ungeachtet der Qualität der Virus-Präparation bestehen. Die Viren wurden aus Zell-Lysaten gewonnen, sodass stets nicht nur MV-Partikel, sondern auch Zelltrümmer und andere biologisch aktive Substanzen in den Präparationen enthalten waren. Die Aufreinigung sollte dazu dienen, diese weitestgehend zu entfernen. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die aufgereinigten Virus-Präparationen weiterhin Rückstände von biologisch aktivem Material enthielten. Die Mock-Präparationen wurden zwar auf die gleiche Art hergestellt, jedoch verändert die Infektion mit MV den metabolischen Status der Zellen, weshalb möglich ist, dass die Verunreinigungen der Virus-Präparationen andere Effekte auf die Zellen haben als die in Mock-Präparationen.

Sowohl für P2X3 als auch für CD43 konnte bewiesen werden, dass die Zellen durch deren Depletion teilweise vor der negativen Modulation durch das MV geschützt sind. Eine Depletion beider Rezeptoren hatte dabei einen zusätzlichen protektiven Effekt. Bei der Bewertung der Resultate ist zu beachten, dass in keiner der KO-Zelllinien ein vollständiger

Knockout gelang. Vor allem bei der P2X3KO-Zelllinie waren nur etwa 50 % der Zellen P2X3-negativ (s.o.). Bei den angewandten Assays konnte in einer Population jeweils nicht zwischen den CD43- bzw. P2X3-negativen und -positiven Zellen differenziert werden. Dass sowohl in den P2X3KO-Zellen als auch in den CD43KO-Zellen Kontakt zu MV eine geringe residuale Inhibition der Proliferation und Akt-Phosphorylierung verursachte, könnte daran liegen, dass Rezeptor-positive Zellen aus den Mischpopulationen noch immer durch das MV inhibiert werden konnten. Bei einer reinen Population Rezeptor-negativer Zellen könnten demnach die Unterschiede zu den WT-Zellen bezüglich der MV-induzierten Suppression deutlich größer ausfallen. Auch die weiter oben beschriebenen potentiellen Verunreinigungen in den Virus-Präparationen könnten residuale Effekte des Virus auf die KO-Zellen bedingen.

#### **5.4 Blockade von P2X3 mit spezifischen Inhibitoren**

Die spezifischen P2X3-Inhibitoren AF-353 und A-317491 inhibieren auf unterschiedliche Weise die Ionenkanal-Funktion des P2X3-Rezeptors. Die Bindung von ATP resultiert normalerweise in einer Konformationsänderung der P2X3 Homo- bzw. der P2X2/3 Heterotrimere und konsekutiv in einer Öffnung des Ionenkanals. Durch Bindung an die ATP-Bindungsstelle des purinergen Rezeptors verhindert A-317491 kompetitiv die Bindung des Liganden. Der allosterische Inhibitor AF-353 hingegen blockiert die nachfolgende Konformationsänderung<sup>143,144</sup>. Mit Gefapixant ist bereits ein klinisch getesteter allosterischer P2X3-Inhibitor vorhanden, dessen Wirkungsweise AF-353 sehr ähnelt. Die Effektivität einer P2X3-Rezeptor-Inhibition beim Schutz gegen die MV-regulierte T-Zell-Paralyse wurde mittels pAkt-Assay untersucht.

Präinkubation der Zellen mit dem allosterischen Inhibitor AF-353 hatte einen protektiven Effekt, da die Reduktion der Akt-Phosphorylierung durch MV weniger effizient erfolgte als in Lösungsmittel-behandelten Kontrollzellen (s. Abbildung 35). Die pharmakologische Inhibition hatte jedoch weniger protektives Potential als die genetische Depletion des Rezeptors, nach der MV-kontaktierte P2X3KO-Zellen sogar höhere relative pAkt-Spiegel aufwiesen (s. Abbildung 27). Demnach ist für die Inhibition der Zellen durch das MV die Kanalfunktion von P2X3 zwar relevant, jedoch möglicherweise nicht ausschließlich für die Reduktion der Akt-Phosphorylierung verantwortlich.

Der isosterische Inhibitor A-317491 hatte keinen Einfluss auf die negative Modulation der Zellen durch das MV (s. Abbildung 35). Dies könnte darauf beruhen, dass A-317491 kompetitiv agiert und daher nur an freie ATP-Bindestellen reversibel binden kann. Hohe ATP-Spiegel, wie sie bei Jurkat-Zellen vorhanden sind<sup>92</sup>, könnten das Binden des Inhibitors verhindern und eine schnellere Dissoziation des Moleküls von der ATP-Bindestelle des P2X3-Rezeptors bewirken. Somit würde eine effektive Wirkung des Inhibitors verhindert. Der Einsatz von Apyrase könnte eventuell eine effektivere Wirkung des Inhibitors gewährleisten, da das Enzym extrazelluläres ATP spaltet. Der purinerge Rezeptor wird in stabil P2X3-exprimierenden 1321N1 Astrozytomzellen durch A-317491 ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  nahezu komplett inhibiert, wobei ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  bereits unselektiv andere P2X-Rezeptoren inhibiert werden<sup>143</sup>. In dieser Arbeit wurde A-317491 in einer zehnfach höheren Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt; eine Konzentrationserhöhung wäre demnach nicht sinnvoll.

## 5.5 Funktionelle Charakterisierung des P2X3-Rezeptors auf T-Zellen

Aufgrund einer erheblichen Beteiligung des Rezeptors in der Pathogenese neuropathischer Schmerzen ist die Funktionsweise und der zelluläre Transport des P2X3-Rezeptors in anderen Zelltypen bereits ausgiebig erforscht<sup>135,136,139–141</sup>. Dessen Eigenschaften bezüglich Öffnungsverhalten,  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen und Desensitisierung sind bekannt und wurden in Abschnitt 1.4.2 beschrieben. Verfügbarkeit der Kristallstruktur des Rezeptors erleichterte die Entwicklung iso- und allosterischer Inhibitoren<sup>133,143,144</sup>, die künftig in der Therapie neuropathischer Schmerzen eingesetzt werden können.

Wie in Abschnitt 5.1 erläutert, ist die Expression von P2X3 auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs umstritten<sup>158,170</sup> und konnte auch in dieser Arbeit aufgrund der aufgetretenen Spezifitätsprobleme der verfügbaren Antikörper und Primer nicht eindeutig bestätigt werden. Die beschriebene Beeinträchtigung des Immunsystems von P2X3KO Mäusen<sup>146</sup> sowie die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde zur Wirkung spezifischer Inhibitoren auf die Aktivierbarkeit von T-Zellen in vitro (s. Abschnitt 4.4, Abbildung 36-Abbildung 41) lassen vermuten, dass P2X3 in der Tat in T-Zellen nicht nur exprimiert wird, sondern auch funktionell wichtig ist.

Expression und Funktion von P2X1, P2X4 und P2X7 sind dokumentiert<sup>137,158</sup>. Diese haben exzitatorische Funktionen und tragen durch die Erhöhung des zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -

Gehaltes positiv zur Aufrechterhaltung der T-Zell-Aktivierung bei. Es entsteht ein vorwärtsgekoppelter autokriner Regelkreis: die erhöhte mitochondriale ATP-Produktion führt zu verstärkter Freisetzung von ATP via Panx1 und wiederum zur Stimulation der purinergen Rezeptoren<sup>85</sup> (s. auch Abbildung 44).

Insbesondere für P2X7 sind immunmodulatorische Aktivitäten gut untersucht. P2X7 hat eine lange zytoplasmatische C-terminale Domäne, die mit über 50 Proteinen interagiert<sup>171</sup>. Durch Interaktion mit dem NLR3 Inflammasom kann P2X7 beispielsweise Entzündungsprozesse modulieren und in Makrophagen die IL-1 $\beta$ -Sekretion stimulieren. Außerdem führt die Stimulation von P2X7, möglicherweise durch Aktivierung der NLR2, zur Akkumulation bioaktiver Lipide<sup>172</sup>. P2X7 kann durch Translokation der ASM an die äußere Plasmamembran die Freisetzung von Mikropartikeln induzieren und vermutlich auf diese Weise in Makrophagen eine rasche Freigabe von HIV-Partikeln initiieren<sup>149,173</sup>. Durch P2X7 wird zudem via Interaktion mit CamKII und der PI3K die Phosphorylierung von Akt moduliert, wobei diesbezüglich sowohl dessen Aktivierung als auch dessen nukleäre Depletion beschrieben wurden<sup>174–176</sup>.

In dieser Arbeit wurde die Rolle des P2X3-Rezeptors bei der T-Zell-Aktivierung anhand der stimulationsabhängigen Erhöhung des zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Gehaltes, sowie anhand der Proliferation in primären T-Zellen und Jurkat-T-Zellen charakterisiert (s. Abschnitt 4.4, Abbildung 36-Abbildung 41). Es zeigte sich, dass P2X3 sowohl inhibitorisch als auch aktivierend wirken könnte. Allosterische Inhibition verstärkte Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung und Proliferation co-stimulierter T-Zellen, was eine inhibitorische Aktivität von P2X3 suggeriert (s. Abbildung 37, Abbildung 38, Abbildung 41). Diese Hypothese wurde durch die größere Spontanproliferationsaktivität von P2X3KO-Zellen gestützt, welche rund 20 % höhere Tritiumthymidin-Einbauraten zeigten als WT-Jx17-Zellen (Abbildung 26). Konträr dazu war infolge Co-Stimulation der zytoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-Gehalt in P2X3KO-Jx17-Zellen vermindert, was eine die Stimulation unterstützende Rolle von P2X3 nahelegt (s. Abbildung 36).

Die Experimente mit AF-353 zeigten, dass die Ca<sup>2+</sup>-Kinetik unverändert blieb. Es ergaben sich in Jurkat- und primären T-Zellen jedoch signifikante Unterschiede im Ausmaß der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung (s. Abbildung 37, Abbildung 38). Bei der Messung fiel auf, dass in Lösungsmittel-behandelten Zellen ein viel größerer Verlust der basalen Fluoreszenzintensität des Fluorochroms auftrat als in AF-353-behandelten Zellen (s. Abbildung 39). Im Zuge eines



Experimentes wurden alle Lymphozyten gleichzeitig mit Fluo-8 beladen und lagerten bis zur Messung (bis zu 45 min) unter Lichtausschluss bei 37 °C im Brutschrank. Ein Ausbleichen der Fluoreszenzintensität kann dabei durch diverse Faktoren bedingt sein: Fotobleichung, Kompartimentalisierung des Indikators, Indikator-Extrusion und Änderungen in der Zelldicke oder des zytoplasmatischen pH-Wertes<sup>177</sup>.

Da beide Gruppen (mit AF-353 und DMSO behandelt) unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden, ist Fotobleichung, welche alle Zellen in gleichem Maße traf, als Ursache für dieses Phänomen nicht wahrscheinlich. Fluo-8 ist ein großes Fluorophor, das nach Beladen der Zellen de-esterifiziert wird und negativ geladen im Zytoplasma vorliegt. Sowohl die Kompartimentalisierung des Indikators als auch dessen Extrusion werden wahrscheinlich nicht durch die Inhibition des P2X3-Rezeptors verändert. Geringe Änderungen des pH-Wertes bzw. der Zelldicke durch Blockade des purinergen Rezeptors könnten eine Erklärung für den größeren Verlust Fluo-8-spezifischen Signals in den unbehandelten Zellen sein. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass es durch Inhibition des Ionenkanals zu geringen Veränderungen in der Membranpermeabilität kam, wodurch der Indikator während der Lagerung in den beiden Gruppen in unterschiedlichem Maße reagierte und dabei unterschiedlich stark an Signal verlor. Der P2X3-Rezeptor könnte demnach potentiell nicht nur in der Regulation der T-Zell-Aktivierung, sondern auch der Zellhomöostase involviert sein.

Isosterische kompetitive Inhibition des purinergen Rezeptors hingegen hatte keinen Einfluss auf die Effizienz der Stimulation. Dies mag oben bereits diskutierte Gründe haben.

Wie in nicht-hämatopoetischen Zellen gezeigt, interagiert die zytoplasmatische Domäne des P2X3-Rezeptors mit unterschiedlichen zellulären Proteinen wie CamKII $\alpha$  und CASK. Hierdurch werden vor allem der Aktivierungszustand des Rezeptors und dessen Expressionsniveau reguliert<sup>178</sup>. In sensorischen Neuronen liegt P2X3 in einer Multiproteinstruktur mit ASIC3 vor, welches in der Lage ist, P2X3 negativ zu regulieren<sup>179</sup>. Weitere direkte Interaktionen des P2X3-Rezeptors sind bislang nicht charakterisiert. In HCC-Zellen führt Überexpression und Stimulation von P2X3 zu vermehrter Proliferation<sup>142</sup>, während, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, genetische Ablation von P2X3 die Proliferation von Jx17-Zellen erhöht (s. Abbildung 26).

Bei der Erfassung der TCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung konnte gezeigt werden, dass bereits dieses frühe Signal in der T-Zell-Aktivierung durch den P2X3-Rezeptor moduliert wird. Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass P2X3 in T-Lymphozyten wichtige zelluläre Funktionen beeinflussen kann. Er greift hierbei schon in frühe Signalwege der TCR-Stimulation ( $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom) ein. Für eine optimale T-Zell-Aktivierung ist die Expression des Rezeptors in Jurkat-Zellen wichtig, worin sich die stimulatorische Rolle des Rezeptors zeigt. Gleichzeitig wirkt er inhibitorisch und reduziert sowohl die stimulationsabhängige Proliferation der Zellen als auch das Aktivierungsniveau nach der Stimulation. Über den genauen Mechanismus, mit dem der P2X3-Rezeptor in der Lage ist, die T-Zell-Funktion auf diese Weise zu modulieren, kann basierend auf diesen Daten keine Aussage getroffen werden.

Diese Daten passen sehr gut zu den in den Absätzen 4.3 und 5.3 beschriebenen Folgen einer genetischen Depletion von P2X3 auf die MV-induzierte T-Zell-Paralyse. Eine allosterische Inhibition von P2X3 kann die Virus-induzierte Reduktion der Phosphorylierung von Akt nur teilweise verhindern und wirkt dabei weniger protektiv als die genetische Depletion des Rezeptors. Die Inhibition der Zellen durch das Virus basiert demnach teilweise auf der Konformationsänderung des Rezeptors nach ATP-Bindung, scheint jedoch auch noch auf andere Art durch P2X3 reguliert zu sein. Insgesamt ist der purinerge Rezeptor wohl auf vielfältige und komplexe Weise an der Regulation der T-Zell-Funktion beteiligt. Dies könnte vom MV genutzt werden, um die Zelle zu inhibieren und deren effektive Stimulation zu stoppen.

## **5.6 Effekte des MV auf die potentiellen Interaktionsrezeptoren**

### **5.6.1 Einfluss des MV auf den zytoplasmatischen $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt**

Eine Bindung des MV und Aktivierung von P2X3 könnte zu einer lokalisierten Erhöhung der zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führen. In dieser Arbeit konnten solche Effekte jedoch nicht gemessen werden (s. Abbildung 42). Dies könnte an der verwendeten Virus-Menge oder der gewählten Methodik liegen (Durchflusszytometrie, die stets die mittlere Signalintensität aller Zellen betrachtet): Ligation durch das Virus erfolgt möglicherweise nicht in allen Zellen synchron und so könnten individuelle Veränderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes bei dieser Art der Messung nicht erfasst werden. Um lokalisierte, kurz andauernde Signalerhöhungen in den Zellen gut erfassen zu können, wäre eine andere, sensitivere Methode, wie beispielsweise die Konfokalmikroskopie, besser geeignet. Mikroskopisch wäre die Betrachtung einzelner Zellen

möglich und mittels *live imaging* könnte der Signalverlauf von Fluo-8 nach Zugabe von MV genau nachverfolgt werden. In dieser Arbeit wäre ein MV-induzierter, ausgeprägter panzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom mit einer Aufrechterhaltung der Calciumkonzentration messbar. Dies war im Falle des MV bei primären T-Zellen und Jx17-Zellen nicht der Fall. Dass ein lokalisierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch P2X3-Rezeptor-Stimulation in den Zellen zustande kommt, ist jedoch basierend auf diesen Ergebnissen nicht auszuschließen.

### 5.6.2 Umverteilung der Rezeptoren durch Bindung des MV

Einige Rezeptoren, wie beispielsweise P2X3, werden nach Ligandenbindung endozytiert<sup>139</sup>. Häufig wird im Anschluss der Ligand lysosomal degradiert und der Rezeptor in Vesikeln zurück an die Zellmembran transportiert (Rezeptor *Recycling*). Dieser Mechanismus läuft z.B. auch bei der TCR-Stimulation ab und ist hier unter anderem für die Polarisierung der Zellen und die Ausbildung der IS wichtig<sup>180</sup>. Bei einigen Rezeptoren wie CD43 ändert sich nach Ligandenbindung (z.B. Galectin-1) die Verteilung des Rezeptors auf der Zellmembran: Es akkumuliert lokal und bildet sogenannte *caps* aus<sup>181</sup>. Die Umverteilung des Rezeptors löst weitere Signalkaskaden aus und kann so im Falle von CD43 unter anderem den programmierten Zelltod modulieren<sup>123</sup>. In dieser Arbeit wurde analysiert, ob die Bindung des MV an T-Lymphozyten die zelluläre Verteilung der potentiellen Interaktionsrezeptoren beeinflusst.

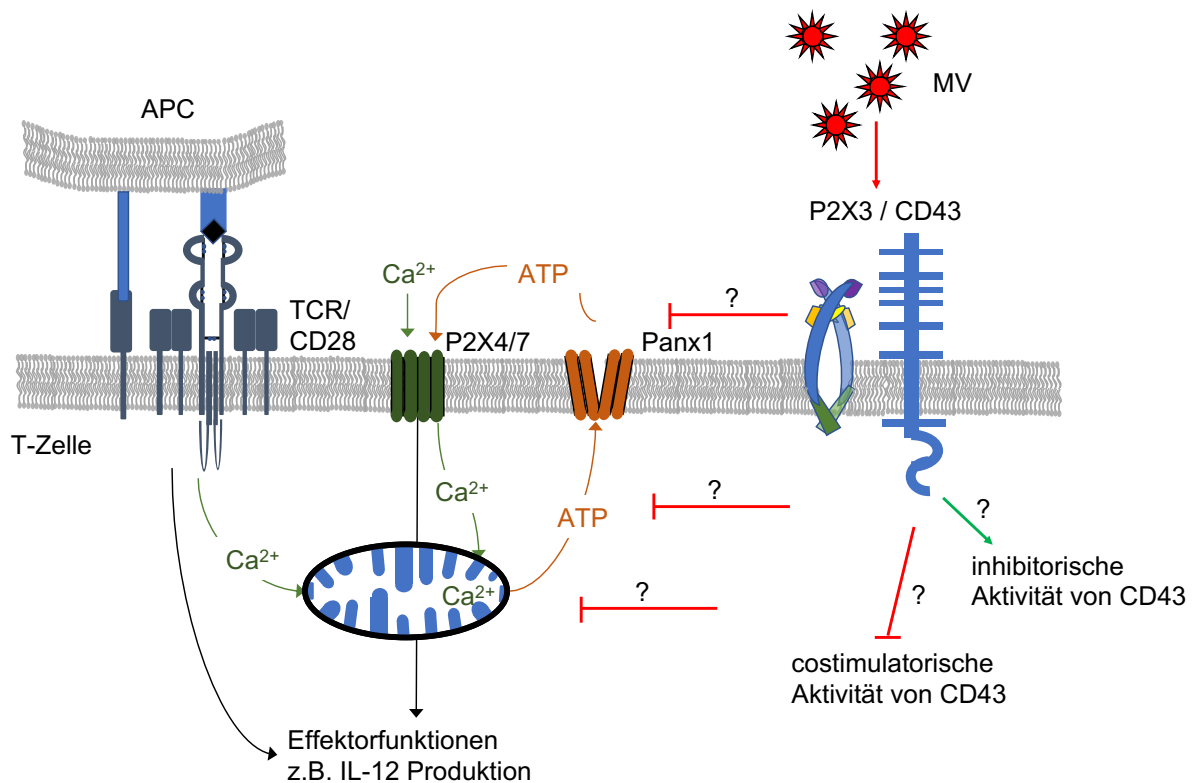
Die Oberflächenexpression der Rezeptoren nach Kontakt zu MV wurde durchflusszytometrisch untersucht (s. Abbildung 43). Da lediglich Oberflächenproteine angefärbt werden sollten, war hierfür ein Antikörper notwendig, welcher ein extrazellulär lokalisiertes Epitop erkennt. Ein solcher stand für P2X3 nicht zur Verfügung, weshalb in diesem Assay lediglich die Expression von CD43 an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Kontakt zu MV analysiert wurde. Dass sich weder in primären Zellen noch in Jurkat-T-Zellen Unterschiede in der Oberflächenexpression von Sialophorin nach Exposition zu MV ergaben, ist wenig überraschend. Für das große, stark glykosylierte Protein ist eine Endozytose nach Bindung eines Liganden untypisch.

Die oben beschriebene Umverteilung des Proteins auf der Zellmembran ist durchflusszytometrisch nicht erfassbar. Daher wären Methoden, mit denen man einzelne Moleküle darstellen kann, besser geeignet, um die Bewegung der Rezeptoren nach Kontakt

zu MV darstellen zu können. Mittels CLSM beispielsweise könnte die Lokalisation der angefärbten Moleküle grob und in Relation zueinander abgeschätzt werden. MV-induziertes *capping* von CD43 könnte so sicher erkannt werden. Auch Änderungen der Oberflächenexpression oder eine MV-Kontakt-vermittelte Umverteilung von P2X3 könnten durch eine Doppelfärbung mit Phalloidin eingeschätzt werden. Methoden wie dSTORM könnten zusätzlich ermöglichen, an lebenden Zellen die einzelnen Moleküle abzubilden und deren Bewegung nach Zugabe von MV genau zu verfolgen. Vor allem kleine Bewegungen und leichte Veränderungen in der Oberflächenexpression könnte hierbei detektiert werden, weshalb diese Methode insbesondere für den in T-Zellen wenig exprimierten P2X3-Rezeptor gut geeignet wäre.

## **5.7 Modell zur MV-vermittelten Suppression der T-Zell Aktivität**

In dieser Arbeit konnten sowohl CD43 als auch P2X3 als für die MV-vermittelte Suppression der T-Zell-Aktivität relevante Rezeptoren identifiziert werden. Hierbei ist eine Interaktion beider Rezeptoren möglich, wobei nicht auszuschließen ist, dass die Proteine auf unterschiedlichem Wege in der Inhibition der Zellen durch das MV involviert sind. Ob das MV direkt mit CD43 bzw. P2X3 oder einem Komplex aus beiden interagiert, kann basierend auf diesen Daten nicht beurteilt werden. Sowohl CD43 als auch P2X3 sind jedoch sehr früh in der Modulation der Zellen durch das MV involviert, da ein Knockout der Proteine die Zellen vor zentralen, frühen (NSM-Aktivierung) Virus-induzierten Effekten schützt. Vor allem P2X3 stellt ein neues mögliches therapeutisches Target gegen die MV-induzierte Immunsuppression dar, da sich ein Inhibitor des purinergeren Rezeptors bereits in klinischer Testung befindet<sup>145</sup>.



**Abbildung 44:** Modell der MV-induzierten Immunsuppression via CD43 und P2X3.

Insgesamt könnte MV via CD43 und P2X3 auf diversen Ebenen in die T-Zell-Aktivierung eingreifen und eine zelluläre Paralyse induzieren (s. Abbildung 44). Durch Co-Stimulation kommt es in T-Zellen zur Erhöhung des zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes. Konsekutiv wird die Mitochondrienfunktion angeregt und das vermehrt produzierte ATP zum Teil über Panx1 in den Extrazellulärraum freigesetzt. Auf diese Weise werden P2X4 und P2X7 Rezeptoren stimuliert, welche zur Erhöhung des zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes beitragen und so die T-Zell-Aktivierung unterstützen<sup>85</sup>. Durch Bindung an einen unbekanntem Rezeptor (möglicherweise an CD43 oder P2X3 oder einen Komplex aus beiden) könnte das MV den Aktivitätszustand von CD43 und P2X3 verändern und folglich in der T-Zell-Aktivierung intervenieren. Eine physische oder funktionelle Interaktion von CD43 und P2X3 könnte durch Hemmung der Mitochondrien, der Freigabe von ATP oder der Aktivierung von P2X4 bzw. P2X7 in diesen Regelkreis eingreifen. Dass P2X3 die T-Zell-Aktivität maßgeblich modulieren kann, wurde in dieser Arbeit erstmalig beschrieben (s. Abschnitt 4.4, Abbildung 36-Abbildung 41). Seine Funktion wurde bisher nur in Zellen untersucht, die CD43 nicht exprimieren. Möglicherweise ist die Co-Expression bzw. eine Interaktion mit CD43 für diese nicht-Rezeptor-Funktionen von P2X3 wichtig. Außerdem wäre denkbar, dass P2X3 in der Lage ist, die inhibitorische Aktivität von CD43 zu verstärken bzw. die Co-stimulatorische Aktivität des Rezeptors zu inhibieren.

## 6 Zusammenfassung

Das Masernvirus (MV) kann in Erkrankten eine schwere, langanhaltende Immunsuppression verursachen, wodurch Infektionen mit opportunistischen Pathogenen begünstigt werden. Diese basiert auf einer Paralyse der hämatopoetischen Zellen, welche das Virus durch Kontakt eines viralen Glykoproteinkomplexes zu einem unbekanntem Rezeptor X auf der Zelloberfläche induzieren kann. Kerncharakteristika hiervon sind unter anderem die Herabregulation der Akt-Kinase-Phosphorylierung, die Inhibition der zellulären Proliferation und die Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase 2 (NSM2).

In einem kinetischen Phosphoproteom konnten zwei potentielle Interaktionsrezeptoren des MV identifiziert werden: CD43 und P2X3. Das hochglykosylierte Oberflächenmolekül CD43 ist auf hämatopoetischen Zellen ubiquitär exprimiert und reguliert in T-Zellen deren Überleben, Proliferation, Aktivierung, Migration und Adhäsion. P2X3 wird in hämatopoetischen Zellen nur in geringem Maße exprimiert. Seine funktionelle Bedeutung ist in diesem Kompartiment nicht bekannt. Beide Kandidaten wurden mittels CRISPR/Cas9 Verfahren einzeln oder kombiniert aus Jurkat-T-Zellen ablatiert, welche nachfolgend nach MV-Kontakt hinsichtlich der oben erwähnten MV-modulierten Parameter getestet wurden. Zusätzlich wurden iso- und allosterische P2X3-Inhibitoren an primären und Jurkat-T-Zellen verwendet, um dessen Rolle in  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung und Proliferation nach T-Zell-Rezeptor Co-Stimulation zu analysieren.

Die genetische Depletion beider Rezeptor-Kandidaten verringerte die Effekte des MV auf alle getesteten Parameter signifikant, was darauf hindeutet, dass beide Proteine entscheidend an der T-Zell-Suppression beteiligt sind. Während die isosterische Inhibition von P2X3 keinen Effekt hatte, wurde die Proliferation primärer T-Zellen durch dessen allosterische Inhibition vor Co-Stimulation fast verdoppelt und die Effizienz der  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung in Jurkat- und primären T-Zellen signifikant erhöht. In P2X3-depletierten Jurkat-Zellen hingegen war die  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung nach Stimulation signifikant geringer als in WT-Zellen.

In dieser Arbeit konnten zwei wichtige Mediatoren der MV induzierten T-Zell-Suppression identifiziert werden. Vor allem P2X3, dessen Expression, Regulation und funktionelle Bedeutung im hämatopoetischen Kompartiment noch nicht erforscht wurde, könnte ein vielversprechender Kandidat für eine antivirale Therapie darstellen, da ein klinisch getesteter P2X3-Inhibitor bereits verfügbar ist.

## 7 Abstract

Measles virus (MV) infection induces a severe and long-lasting immunosuppression in patients resulting in infections through opportunistic pathogens. T cell paralysis is a major contributor to MV induced immunosuppression. This can be achieved through contact of a viral glycoprotein complex with an uncharacterized receptor X on the surface of hematopoietic cells. Contact-mediated downregulation of Akt-kinase phosphorylation, inhibition of proliferation and activation the neutral spingomyelinase 2 (NSM2) are key characteristics of T cell inhibition in vitro.

Using a kinetic phosphoproteomic approach, two potential interaction receptor candidates were identified: CD43 and P2X3 receptor. The highly glycosylated surface protein CD43 is ubiquitously expressed on hematopoietic cells and is known to regulate T cell survival, proliferation, activation, migration and adhesion. The expression of P2X3 in this compartment is low and its functional importance unknown. It is widely expressed in neuronal cells where it is a major effector in the pathogenesis of chronic neuropathic pain. Using the CRISPR/Cas9 method both candidates were knocked down singly or combined in Jurkat T cells. Cells were then tested for the MV modulated parameters mentioned above upon MV challenge. In addition to that, iso- and allosteric functional inhibitors for P2X3 were employed on primary and Jurkat T cells to determine its role in calcium influx and proliferation after T cell receptor stimulation.

The knockdown of both CD43 and P2X3 significantly decreased MV effects on all analyzed parameters (Akt-kinase phosphorylation, proliferation, NSM2 activation) indicating that both proteins play a major role in MV-induced T cell suppression. While isosteric inhibition of receptor P2X3 had no effect, its allosteric inhibition prior to stimulation increased proliferation of primary T cells almost twofold and significantly increased  $\text{Ca}^{2+}$  influx in Jurkat cells and primary T cells. In contrast, genetic depletion of P2X3 significantly reduced calcium influx after stimulation as compared to wildtype cells.

In this study two important mediators of MV induced T cell suppression were identified. Amongst those, P2X3 whose expression, regulation and functional importance in the hematopoietic compartment has not been investigated yet, may represent a promising candidate for anti-viral therapy due to the existence of a clinically tested inhibitor.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

a	Jahr(e)
ALL	akute lymphatische Leukämie
APC	Antigen präsentierende Zelle (antigen presenting cell)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASM	saure Sphingomyelinase (acid sphingomyelinase)
ATP	Adenosintriphosphat
ATV	adjusted trypsin versine
Bad	Bcl-2 Antagonist des Zelltods (Bcl-2-antagonist of cell death)
Bax	Bcl-2-assoziiertes X Protein
BCA	Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid)
Bcl	B-Zell Lymphom (B-cell lymphoma)
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Grad Celsius
CamKII	Ca <sup>2+</sup> -/Calmodulin- abhängige Proteinkinase II
CASK	Ca <sup>2+</sup> -/Calmodulin- abhängige Serinkinase



Cas9	CRISPR assoziiertes Protein 9
Cbl	Casitas B Linie Lymphom
cDNA	complementary DNA
CD	Differenzierungscluster (Cluster of differentiation)
CPE	zytopathischer Effekt (cytopathic effect)
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
crRNA	CRISPR RNA
d	Tag(e)
DC	dendritische Zelle (dendritic cell)
DC-SIGN	dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPC	distaler Pol Komplex (distal pole complex)
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERM	Ezrin/Radixin/Moesin
FACS	durchflusszytometrische Analyse

(fluorescence-activated cell scanning)

FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOXO	Forkhead-Box-Proteine O
FSC	forward scatter
F-Protein	Fusionsprotein
g	Gramm
GAM	Ziege-anti-Maus Antikörper (goat-anti-mouse)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HCC	hepatozelluläres Karzinom (hepatocellular carcinoma)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HMU-PC	6-Hexadecanoylamino-4- methylumbelliferylphosphorylcholine
H-Protein	Hämagglutinin-Protein
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

IS	immunologische Synapse
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-basierte Aktivierungsmotive
l	Liter
kDA	kilo Dalton
KO	Knockout
L-Protein	Large-Protein
M	Molar
m	Meter
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (mucosa associated lymphatic tissue)
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute(n)
MOI	multiplicity of infection
M-Protein	Matrix-Protein
mRNA	Messenger RNA
mTOR	mechanistisches Ziel von Rapamycin (mechanistic target of rapamycin)
MV	Masernvirus
NCS	Nicht-kodierende Sequenz (non-coding sequence)
N-Protein	Nukleokapsid-Protein

n.s.	nicht signifikant ( $p > 0,05$ )
NSM	neutrale Sphingomyelinase
NTE-Puffer	NaCl-Tris-EDTA Puffer
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
Panx1	Pannexin-1
PBL	Lymphozyten des peripheren Bluts (peripheral blood lymphocytes)
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDK	3-Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinase (3-phosphoinositide-dependent protein kinase)
PFA	Paraformaldehyd
PH	Pleckstrin-Homologie
PI	Propidiumiodid
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase

PK	Proteinkinase
P-Protein	Phosphoprotein
PRR	Mustererkennungsrezeptor (pattern recognition receptor)
PS	Phosphatidylserin
PTEN	Phosphatase und Tensin-Homolog
PVC	Polyvinylchlorid
P2X	Purinerger Rezeptor Subtyp 2X
Rheb	im Gehirn angereichertes Ras-Homolog (Ras-homolog-enriched-in-brain)
Rho	Ras-homologe GTPase
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDF	Stroma-Zellen-abgeleiteter Faktor (stroma cell derived factor)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s	Sekunde
SSC	sideward scatter
SSPE	subakute sklerosierende Panenzephalitis
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA Puffer

TCID <sub>50</sub>	tissue culture infectious dose 50 %
TCR	T-Zell-Rezeptor (T-cell receptor)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	transformierender Wachstumsfaktor (transforming growth factor)
Th	T-Helfer
TLR	toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
tracrRNA	transaktivierende CRISPR RNA
Triton	Polyethylenglycol-mono-[p-1,1,3,3-tetramethylbutyl)- phenyl]-ether
tsc	tuberöse Sklerose-Komplex (tuberous sclerosis complex)
Tween	Polyoxyethylen Sorbitanmonolaurat
UV	Ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation (world health organization)
WTF	Wildtyp Fleckenstein
ZAP-70	Zeta-Ketten-assozierte Proteinkinase

## 9 Formel-, Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

### 9.1 Formelverzeichnis

<b>Formel 1:</b> Formel zur Berechnung der Zellzahl vitaler Zellen.....	29
<b>Formel 2:</b> Formel zur Berechnung der nötigen Virusmenge für eine Infektion .....	33
<b>Formel 3:</b> Bestimmung der TCID <sub>50</sub> .....	34
<b>Formel 4:</b> Bestimmung des Standardfehlers der TCID <sub>50</sub> .....	34

### 9.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Sequenzen der zur Transfektion verwendeten crRNAs.....	23
<b>Tabelle 2</b> Sequenzen der für die RT-PCR verwendeten Primer.....	23
<b>Tabelle 3:</b> Auflistung der Reagenzien mit Lösungsmittel.....	25
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Lösungen zur Isolation, Kultivierung und Quantifizierung von Zellen	26
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete Puffer zur Aufreinigung des MV/Mock.....	26
<b>Tabelle 6:</b> Verwendete Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie.....	26
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete Puffer und Lösungen für die RNA-Analytik.....	27
<b>Tabelle 8:</b> Verwendete Puffer und Lösungen für die Protein-Analytik.....	27
<b>Tabelle 9:</b> Verwendete Puffer und Lösungen zur Messung der Aktivität der neutralen Sphingomyelinase.....	28

### 9.3 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung eines MV Partikels.....	4
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung eines T-Zell-Rezeptor-Komplexes.....	9
<b>Abbildung 3:</b> Effekte des MV auf T-Lymphozyten.....	13
<b>Abbildung 4:</b> Versuchsansatz des kinetischen Phosphoproteoms für die T-Zelllinie Jurkat nach Kontakt zu MV/Mock.....	14
<b>Abbildung 5:</b> Delfin-förmige Struktur des P2X3-Rezeptors.....	17
<b>Abbildung 6:</b> Isolation von PBMCs aus Leukozytendepletaten.....	30
<b>Abbildung 7:</b> T-Zell-Anreicherung durch Nylonwolle.....	31

<b>Abbildung 8:</b> CD4-Anreicherung durch negative Selektion mit Hilfe magnetgebundener Antikörper. ....	32
<b>Abbildung 9:</b> Übersicht über die Qualitätskontrolle der Virus-Präparationen. ....	35
<b>Abbildung 10:</b> <i>Gating</i> auf lebendige Zellen bei durchflusszytometrischen Messungen. ....	36
<b>Abbildung 11:</b> Durchflusszytometrische Analyse der P2X3-Rezeptor-Expression auf Jx17-Zellen mit vier unterschiedlichen anti-P2X3 Antikörpern .....	50
<b>Abbildung 12:</b> Expression von CD43 und P2X3 in Jx17-Zellen, BJAB-Zellen, PBMCs, CD4-angereicherten PBMCs und Splenozyten der Maus. ....	51
<b>Abbildung 13:</b> Konfokalmikroskopische Analyse der CD43-Expression auf Jx17-Zellen und PBMCs. ....	52
<b>Abbildung 14:</b> Proliferationsassay für primäre T-Zellen; unbehandelt oder mit anti-P2X3 Antikörper vorbehandelt. ....	53
<b>Abbildung 15:</b> Relative Proliferation primärer T-Zellen (nativ und mit 6 µg/ml anti-CD43 Antikörper behandelt) nach Kontakt zu MV bzw. Mock.....	54
<b>Abbildung 16:</b> Westernblot von Lysaten aus PBLs, BJABs und Jx17-Zellen mit anti-Cas9 Antikörper und anti-α Tubulin Antikörper als Ladekontrolle. ....	54
<b>Abbildung 17:</b> Durchflusszytometrische Analyse einfach mit crRNA 1 + 2 für CD43 transfizierter Jx17-Zellen drei Tage oder zwei Wochen nach Transfektion.....	56
<b>Abbildung 18</b> Durchflusszytometrische Analyse der CD43-Expression mit unterschiedlichen CD43-spezifischen crRNA Kombinationen transfizierter Jx17-Zellen jeweils 3 Tage oder zwei Wochen nach Transfektion und nach dem <i>Sorting</i> . ....	57
<b>Abbildung 19:</b> Analyse der Effizienz des CD43-Knockouts. ....	58
<b>Abbildung 20</b> NSM-Assay mit Lysaten aus tracrRNA-transfizierten (WT) und CD43KO-Jx17-Zellen mit Mock oder MV. ....	59
<b>Abbildung 21:</b> Proliferationsassay an Jx17-Zellen (WT und CD43KO) nach Kontakt zu MV ....	60
<b>Abbildung 22:</b> pAkt-Assay an Jx17-Zellen (WT und CD43KO). ....	61
<b>Abbildung 23:</b> Durchflusszytometrische Analyse (mittels anti-P2X3 Antikörper von Biomol) der P2X3- Gesamtproteinexpression nach Transfektion mit unterschiedlichen Kombinationen von P2X3-spezifischer crRNA.....	62
<b>Abbildung 24:</b> Expression von P2X3 in WT- und P2X3KO-Zellen.....	62
<b>Abbildung 25:</b> NSM-Assay mit Lysaten aus tracrRNA-transfizierten (WT) und P2X3KO-Jx17-Zellen mit Mock oder MV. ....	63



<b>Abbildung 26:</b> Proliferationsassay an Jx17-Zellen (WT und P2X3KO) nach Kontakt zu MV. ...	64
<b>Abbildung 27:</b> pAkt-Assay an Jx17-Zellen (WT und P2X3KO). .....	65
<b>Abbildung 28:</b> Expression von CD43 und P2X3 in WT- und DoppelKO-Zellen.....	66
<b>Abbildung 29:</b> Proliferationsassay an WT- und DoppelKO-Zellen. ....	67
<b>Abbildung 30:</b> pAkt-Assay an DoppelKO- und WT-Zellen.....	68
<b>Abbildung 31:</b> Durchflusszytometrische Analyse der CD4-Expression an CD4KO- und WT- Jx17-Zellen.....	69
<b>Abbildung 32:</b> Proliferationsassay an WT- und CD4KO-Zellen .....	69
<b>Abbildung 33:</b> pAkt-Assay an CD4KO- und WT-Zellen.....	70
<b>Abbildung 34:</b> Durchflusszytometrische Analyse der Zellviabilität nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von A-317491 und AF-353 in Jurkat- und primären T- Zellen nach 3 d.....	71
<b>Abbildung 35:</b> Durchflusszytometrische Analyse der Phosphorylierung von Akt an Jx17-Zellen mit Inhibitoren für P2X3 nach Kontakt zu MV MOI 5 für 24 h.....	72
<b>Abbildung 36:</b> Ca <sup>2+</sup> -Kinetik nach Co-Stimulation in WT- und P2X3KO-Jx17-Zellen. ....	73
<b>Abbildung 37:</b> Ca <sup>2+</sup> -Einstrom nach Co-Stimulation mit allosterischer P2X3-Inhibtion in Jx17- Zellen. ....	74
<b>Abbildung 38:</b> Ca <sup>2+</sup> -Einstrom nach Co-Stimulation mit allosterischer P2X3-Inhibtion in primären T-Zellen. ....	75
<b>Abbildung 39:</b> Abfall der basalen MFI (Fluo-8) in primären T-Zellen.. ....	76
<b>Abbildung 40:</b> Ca <sup>2+</sup> -Einstrom nach Co-Stimulation mit kompetitiver P2X3-Inhibition in Jx17- Zellen und primären T-Zellen .....	77
<b>Abbildung 41:</b> Proliferationsassay an Jx17-Zellen und primären T-Zellen mit P2X3-Rezeptor Inhibition. ....	78
<b>Abbildung 42:</b> Durchflusszytometrische Analyse des zytoplasmatischen Ca <sup>2+</sup> -Gehaltes von Jx17-Zellen und primären T-Zellen bei Zugabe von inaktiviertem MV (MOI 10) /Mock. ....	79
<b>Abbildung 43:</b> Durchflusszytometrische Analyse der CD43-Expression an Jx17-Zellen und CD4-angereicherten PBMCs. ....	80
<b>Abbildung 44:</b> Modell der MV-induzierten Immunsuppression via CD43 und P2X3. ....	94

## 10 Literaturverzeichnis

1. Furuse, Y., Suzuki, A. & Oshitani, H. Origin of measles virus: Divergence from rinderpest virus between the 11th and 12th centuries. *Virology*. (2010). doi:10.1016/j.virol.2010.07.022
2. Grais, R. F. *et al.* Unacceptably high mortality related to measles epidemics in Niger, Nigeria, and Chad. *PLoS Med.* (2007). doi:10.1371/journal.pmed.0040016
3. Robert-Koch-Institut. Epidemiologisches Bulletin. (2016).
4. WHO. Measles Fact Sheet. (2016).
5. Shibeshi, M. E. *et al.* Measles resurgence in southern Africa: Challenges to measles elimination. *Vaccine* (2014). doi:10.1016/j.vaccine.2014.01.089
6. Robert-Koch-Institut. No Title. *Epidemiol. Bull.* (2017).
7. Muscat, M., Bang, H., Wohlfahrt, J., Glismann, S. & Mølbak, K. Measles in Europe: an epidemiological assessment. *Lancet* (2009). doi:10.1016/S0140-6736(08)61849-8
8. Richard, J. L. & Masserey Spicher, V. Large measles epidemic in Switzerland from 2006 to 2009: consequences for the elimination of measles in Europe. *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.* (2009). doi:19443 [pii]
9. Centers for Disease Control and Prevention. Measles — United States, 2011. *Morbidity Mortal. Wkly. Rep.* (2012). doi:mm6115a2 [pii]
10. Koplik, H. The diagnosis of the invasion of measles from a study of the exanthema as it appears on the buccal mucous membrane. *Arch. Pediatr.* **79**, 162–165 (1962).
11. Robert-Koch-Institut. RKI-Ratgeber für Ärzte. *Epidemiol. Bull.* (2014). doi:10.1016/j.khinf.2015.12.001
12. Leung, A. K. C., Hon, K. L., Leong, K. F. & Sergi, C. M. Measles: A disease often forgotten but not gone. *Hong Kong Med. J.* **24**, 512–520 (2018).
13. Garg, R. K. Subacute sclerosing panencephalitis. *J. Neurol.* **255**, 1861–1871 (2008).
14. Jafri, S. K., Kumar, R. & Ibrahim, S. H. Subacute sclerosing panencephalitis - current perspectives. *Pediatr. Heal. Med. Ther.* **9**, 67–71 (2018).
15. Griffin, D. E. Measles virus. in *Fields Virology* (Lippincott Williams & Wilkins, 2007).
16. Palosaari, H., Parisien, J. P., Rodriguez, J. J., Ulane, C. M. & Horvath, C. M. STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J. Virol.* (2003). doi:10.1128/JVI.77.13.7635
17. Escoffier, C. *et al.* Nonstructural C protein is required for efficient measles virus

- replication in human peripheral blood cells. *J. Virol.* (1999).
18. WHO. Nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses (update). *Wkly. Epidemiol. Rec.* (2001).
  19. Plattet, P., Alves, L., Herren, M. & Aguilar, H. C. Measles virus fusion protein: Structure, function and inhibition. *Viruses* (2016). doi:10.3390/v8040112
  20. Iwasaki, M. *et al.* The Matrix Protein of Measles Virus Regulates Viral RNA Synthesis and Assembly by Interacting with the Nucleocapsid Protein. *J. Virol.* (2009). doi:10.1128/JVI.01056-09
  21. TenOever, B. R., Servant, M. J., Grandvaux, N., Lin, R. & Hiscott, J. Recognition of the Measles Virus Nucleocapsid as a Mechanism of IRF-3 Activation. *J. Virol.* (2002). doi:10.1128/JVI.76.8.3659-3669.2002
  22. Laine, D. *et al.* Measles virus (MV) nucleoprotein binds to a novel cell surface receptor distinct from FcγRII via its C-terminal domain: role in MV-induced immunosuppression. *J. Virol.* (2003). doi:10.1128/JVI.77.21.11332
  23. Wang, N. *et al.* CD150 is a member of a family of genes that encode glycoproteins on the surface of hematopoietic cells. *Immunogenetics* (2001). doi:10.1007/s002510100337
  24. Buchholz, C. J. *et al.* Mapping of the primary binding site of measles virus to its receptor CD46. *J. Biol. Chem.* (1997). doi:10.1074/jbc.272.35.22072
  25. Mühlebach, M. D. *et al.* Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* (2011). doi:10.1038/nature10639
  26. Noyce, R. S. *et al.* Tumor cell marker pvr14 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog.* (2011). doi:10.1371/journal.ppat.1002240
  27. Bieback, K. *et al.* Hemagglutinin Protein of Wild-Type Measles Virus Activates Toll-Like Receptor 2 Signaling. *J. Virol.* (2002). doi:10.1128/JVI.76.17.8729-8736.2002
  28. De Witte, L. *et al.* DC-SIGN and CD150 have distinct roles in transmission of measles virus from dendritic cells to T-Lymphocytes. *PLoS Pathog.* (2008). doi:10.1371/journal.ppat.1000049
  29. Bellini, W. J., Rota, J. S. & Rota, P. A. Virology of measles virus. *J. Infect. Dis.* (1994). doi:10.1093/infdis/170.Supplement\_1.S15
  30. Crowley, J. C. *et al.* Sequence variability and function of measles virus 3' and 5' ends and intercistronic regions. *Virology* (1988). doi:10.1016/0042-6822(88)90564-8

31. Parks, C. L. *et al.* Analysis of the Noncoding Regions of Measles Virus Strains in the Edmonston Vaccine Lineage. *J. Virol.* (2001). doi:10.1128/JVI.75.2.921–933.2001
32. Cattaneo, R. *et al.* Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain. *EMBO J.* (1987).
33. Brunel, J. *et al.* Sequence of Events in Measles Virus Replication: Role of Phosphoprotein-Nucleocapsid Interactions. *J. Virol.* (2014). doi:10.1128/JVI.00664-14
34. Vincent, S., Gerlier, D. & Manie, S. N. Measles Virus Assembly within Membrane Rafts. *J. Virol.* (2000). doi:10.1128/JVI.74.21.9911-9915.2000
35. Papp, K. Experiments proving that the route of infection in measles is the contamination of the conjunctival mucosa. *Rev. Immunol. Ther. Antimicrob.* **20**, 27–36 (1956).
36. De Swart, R. L. *et al.* Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *PLoS Pathog.* (2007). doi:10.1371/journal.ppat.0030178
37. Lemon, K. *et al.* Early target cells of measles virus after aerosol infection of non-human primates. *PLoS Pathog.* (2011). doi:10.1371/journal.ppat.1001263
38. Dunster, L. M. *et al.* Moesin: A cell membrane protein linked with susceptibility to measles virus infection. *Virology* (1994). doi:10.1006/viro.1994.1029
39. McChesney, M. B. *et al.* Experimental measles: I. Pathogenesis in the normal and the immunized host. *Virology* (1997). doi:10.1006/viro.1997.8576
40. Ludlow, M., McQuaid, S., Milner, D., De Swart, R. L. D. & Duprex, W. P. Pathological consequences of systemic measles virus infection. *J. Pathol.* (2015). doi:10.1002/path.4457
41. Ludlow, M. *et al.* Measles Virus Infection of Epithelial Cells in the Macaque Upper Respiratory Tract Is Mediated by Subepithelial Immune Cells. *J. Virol.* (2013). doi:10.1128/JVI.03258-12
42. Frenzke, M. *et al.* Nectin-4-Dependent Measles Virus Spread to the Cynomolgus Monkey Tracheal Epithelium: Role of Infected Immune Cells Infiltrating the Lamina Propria. *J. Virol.* (2013). doi:10.1128/JVI.03037-12
43. De Jong, J. G. & Winkler, K. C. Survival of measles virus in air [48]. *Nature* (1964). doi:10.1038/2011054a0
44. Bloch, A. B. *et al.* Measles outbreak in a pediatric practice : Airborne transmission in an Office setting. *Pediatrics* (2011).

45. Griffin, D. Immune responses during measles virus infection. in *Measles virus* (1995). doi:10.1111/j.1600-0706.2013.00822.x
46. Mina, M. J., Metcalf, C. J. E., De Swart, R. L., Osterhaus, A. D. M. E. & Grenfell, B. T. Long-term measles-induced immunomodulation increases overall childhood infectious disease mortality. *Science* (80-. ). (2015). doi:10.1126/science.aaa3662
47. Pirquet, C. V. Das Verhalten der kutanen Tuberkulinreaktion während der Masern. *Dtsch. Medizinische Wochenschrift* (1908). doi:10.1055/s-0028-1135624
48. Okada, H. *et al.* Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch. Virol.* (2000). doi:10.1007/s007050050683
49. de Vries, R. D. *et al.* Measles Immune Suppression: Lessons from the Macaque Model. *PLoS Pathog.* (2012). doi:10.1371/journal.ppat.1002885
50. de Vries, R. D. & de Swart, R. L. Measles immune suppression: functional impairment or numbers game? *PLoS Pathog.* **10**, e1004482 (2014).
51. Griffin, D. E. & Ward, B. J. Differential CD4 T cell activation in measles. *J. Infect. Dis.* **168**, 275–281 (1993).
52. Cavaillon, J.-M. The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. *J. Leukoc. Biol.* (2011). doi:10.1189/jlb.0211094
53. Zinkernagel, R. M. & Doherty, P. C. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* (1974). doi:10.1038/248701a0
54. Weiss, A. & Stobo, J. D. Requirement for the coexpression of T3 and the T cell antigen receptor on a malignant human T cell line. *J. Exp. Med.* (1984). doi:10.1084/JEM.160.5.1284
55. Lüllmann-Rauch, R. & Asan, E. *Taschenlehrbuch Histologie.* (Georg Thieme Verlag, 2015).
56. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**, 2348–2357 (1986).
57. Andersen, M. H., Schrama, D., Thor Straten, P. & Becker, J. C. Cytotoxic T cells. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 32–41 (2006).
58. Hadaschik, E. N. & Enk, A. H. TGF-beta1-induced regulatory T cells. *Hum. Immunol.* **76**, 561–564 (2015).

59. Palomares, O. *et al.* Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF-beta. *Genes Immun.* **15**, 511–520 (2014).
60. Yanagi, Y. *et al.* A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature* (1984). doi:10.1038/308145a0
61. Malissen, M. *et al.* Mouse T cell antigen receptor: Structure and organization of constant and joining gene segments encoding the  $\beta$  polypeptide. *Cell* (1984). doi:10.1016/0092-8674(84)90444-6
62. Dembić, Z. *et al.* Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes. *Nature* (1986). doi:10.1038/320232a0
63. Bonneville, M., O'Brien, R. & Born, W. K.  $\gamma$   $\delta$  T cell effector functions: A blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature Reviews Immunology* (2010). doi:10.1038/nri2781
64. Janeway, C., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. *Immunologie*. (Spektrum Akademischer Verlag, 2002).
65. Wegener, A. M. *et al.* The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. *Cell* **68**, 83–95 (1992).
66. Irving, B. A. & Weiss, A. The cytoplasmic domain of the T cell receptor  $\zeta$  chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* (1991). doi:10.1016/0092-8674(91)90314-O
67. Chan, A. C., Iwashima, M., Turck, C. W. & Weiss, A. ZAP-70: A 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR  $\zeta$  chain. *Cell* (1992). doi:10.1016/0092-8674(92)90598-7
68. Iwashima, M., Irving, B. A., Van Oers, N. S. C., Chan, A. C. & Weiss, A. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *J. Immunol.* (2014). doi:10.1126/science.7509083
69. Acuto, O. & Michel, F. CD28-mediated co-stimulation: A quantitative support for TCR signalling. *Nature Reviews Immunology* (2003). doi:10.1038/nri1248
70. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology* (2013). doi:10.1038/nri3405
71. Ford, M. L., Adams, A. B. & Pearson, T. C. Targeting co-stimulatory pathways: transplantation and autoimmunity. *Nat. Rev. Nephrol.* (2013). doi:10.1038/nrneph.2013.183

72. Pagès, F. *et al.* Binding of phosphatidyl-inositol-3-OH kinase to CD28 is required for T-cell signalling. *Nature* (1994). doi:10.1038/369327a0
73. Datta, S. R. *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell* (1997). doi:10.1016/S0092-8674(00)80405-5
74. Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. & Guan, K. L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* (2002). doi:10.1038/ncb839
75. Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K. & Fukamizu, A. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2003). doi:10.1073/pnas.1934283100
76. Holsinger, L. J. *et al.* Defects in actin-cap formation in Vav-deficient mice implicate an actin requirement for lymphocyte signal transduction. *Curr. Biol.* (1998). doi:10.1016/S0960-9822(98)70225-8
77. Burkhardt, J. K., Carrizosa, E. & Shaffer, M. H. The Actin Cytoskeleton in T Cell Activation. *Annu. Rev. Immunol.* (2008). doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090347
78. Allenspach, E. J. *et al.* ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity* (2001). doi:10.1016/S1074-7613(01)00224-2
79. Chang, J. T. *et al.* Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* (80-. ). (2007). doi:10.1126/science.1139393
80. Feske, S., Giltzane, J., Dolmetsch, R., Staudt, L. M. & Rao, A. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat. Immunol.* (2001). doi:10.1038/86318
81. Gallo, E. M., Canté-Barrett, K. & Crabtree, G. R. Lymphocyte calcium signaling from membrane to nucleus. *Nat. Immunol.* (2006). doi:10.1038/ni1295
82. Yip, L. *et al.* Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X 7 receptors. *FASEB J.* (2009). doi:10.1096/fj.08-126458
83. Junger, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nature Reviews Immunology* (2011). doi:10.1038/nri2938
84. Woehrle, T. *et al.* Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. *Blood* (2010). doi:10.1182/blood-2010-04-277707
85. Ledderose, C. *et al.* Purinergic P2X4 receptors and mitochondrial ATP production regulate T cell migration. *J. Clin. Invest.* **128**, 3583–3594 (2018).

86. Bollinger, C. R., Teichgräber, V. & Gulbins, E. Ceramide-enriched membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (2005). doi:10.1016/j.bbamcr.2005.09.001
87. Schneider-Schaulies, S., Müller, N. & Gulbins, E. Membrane microdomains enriched in ceramides from generation to function. in *Cell Membrane Nanodomains: From Biochemistry to Nanoscopy* 133–172 (2014). doi:10.1201/b17634
88. Börtlein, C. *et al.* The neutral sphingomyelinase 2 is required to polarize and sustain T cell receptor signaling. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
89. Mueller, N., Avota, E., Collenburg, L., Grassmé, H. & Schneider-Schaulies, S. Neutral Sphingomyelinase in Physiological and Measles Virus Induced T Cell Suppression. *PLoS Pathog.* **10**, (2014).
90. Schneider, U., Schwenk, H. -U & Bornkamm, G. Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* (1977). doi:10.1002/ijc.2910190505
91. Poplack, D. G., Blatt, J. & Reaman, G. Purine Pathway Enzyme Abnormalities in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res.* (1981).
92. Ledderose, C. *et al.* Cutting off the power: inhibition of leukemia cell growth by pausing basal ATP release and P2X receptor signaling? *Purinergic Signal.* (2016). doi:10.1007/s11302-016-9510-y
93. Shan, X. *et al.* Deficiency of PTEN in Jurkat T Cells Causes Constitutive Localization of Itk to the Plasma Membrane and Hyperresponsiveness to CD3 Stimulation. *Mol. Cell. Biol.* (2002). doi:10.1128/mcb.20.18.6945-6957.2000
94. Schlender, J. *et al.* Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13194–13199 (1996).
95. Schneider-Schaulies, S., Kreth, H. W., Hofmann, G., Billeter, M. & Ter Meulen, V. Expression of measles virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with measles, SSPE, and autoimmune diseases. *Virology* **182**, 703–711 (1991).
96. Forthal, D. N., Aarnaes, S., Blanding, J., de la Maza, L. & Tilles, J. G. Degree and length of viremia in adults with measles. *J. Infect. Dis.* **166**, 421–424 (1992).
97. Niewiesk, S. *et al.* Measles virus-induced immunosuppression in cotton rats is



- associated with cell cycle retardation in uninfected lymphocytes. *J. Gen. Virol.* (1999). doi:10.1099/0022-1317-80-8-2023
98. Avota, E., Gassert, E. & Schneider-Schaulies, S. Measles virus-induced immunosuppression: From effectors to mechanisms. *Medical Microbiology and Immunology* (2010). doi:10.1007/s00430-010-0152-3
  99. Erlenhoefer, C. *et al.* CD150 (SLAM) Is a Receptor for Measles Virus but Is Not Involved in Viral Contact-Mediated Proliferation Inhibition. *J. Virol.* (2001). doi:10.1128/jvi.75.10.4499-4505.2001
  100. Müller, N. *et al.* Measles virus contact with T cells impedes cytoskeletal remodeling associated with spreading, polarization, and CD3 clustering. *Traffic* (2006). doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00426.x
  101. Gassert, E. *et al.* Induction of membrane ceramides: A novel strategy to interfere with T lymphocyte cytoskeletal reorganisation in viral immunosuppression. *PLoS Pathog.* **5**, (2009).
  102. Avota, E. *et al.* Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus. *Nat. Med.* (2001). doi:10.1038/89106
  103. Schneider-Schaulies, S. & Dittmer, U. Silencing T cells or T-cell silencing: Concepts in virus-induced immunosuppression. *Journal of General Virology* (2006). doi:10.1099/vir.0.81713-0
  104. Avota, E., Müller, N., Klett, M. & Schneider-Schaulies, S. Measles Virus Interacts with and Alters Signal Transduction in T-Cell Lipid Rafts. *J. Virol.* (2004). doi:10.1128/jvi.78.17.9552-9559.2004
  105. Wikén, M., Björck, P., Axelsson, B. & Perlmann, P. Induction of CD43 Expression during Activation and Terminal Differentiation of Human B Cells. *Scand. J. Immunol.* **28**, 457–464 (1988).
  106. Remold-O'Donnell, E. & Rosen, F. S. Sialophorin (CD43) and the Wiskott-Aldrich syndrome. *Immunodefic.Rev.* (1990).
  107. Clark, M. C. & Baum, L. G. T cells modulate glycans on CD43 and CD45 during development and activation, signal regulation, and survival. *Annals of the New York Academy of Sciences* (2012). doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06304.x
  108. Jones, A. T. *et al.* Characterization of the activation-associated isoform of CD43 on murine T lymphocytes. *J. Immunol.* **153**, 3426–3439 (1994).

109. Tuccillo, F. M. *et al.* Cancer-Associated CD43 Glycoforms as Target of Immunotherapy. *Mol. Cancer Ther.* (2014). doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0651
110. Tuccillo, F. M. *et al.* Aberrant glycosylation as biomarker for cancer: Focus on CD43. *BioMed Research International* (2014). doi:10.1155/2014/742831
111. Seo, W. & Ziltener, H. J. CD43 processing and nuclear translocation of CD43 cytoplasmic tail are required for cell homeostasis. *Blood* (2009). doi:10.1182/blood-2009-06-228791
112. Andersson, C. X. *et al.* CD43 has a functional NLS, interacts with  $\beta$ -catenin, and affects gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2004). doi:10.1016/j.bbrc.2004.02.011
113. Mody, P. D. *et al.* Signaling through CD43 regulates CD4 T-cell trafficking. *Blood* **110**, 2974–2982 (2007).
114. Rosenstein, Y., Santana, A. & Pedraza-Alva, G. CD43, a molecule with multiple functions. *Immunol Res* (1999).
115. Modak, M. *et al.* Engagement of distinct epitopes on CD43 induces different co-stimulatory pathways in human T cells. *Immunology* (2016). doi:10.1111/imm.12642
116. Pedraza-Alva, G. *et al.* CD43 regulates the threshold for T cell activation by targeting Cbl functions. in *IUBMB Life* (2011). doi:10.1002/iub.554
117. Fierro, N. A., Pedraza-Alva, G. & Rosenstein, Y. TCR-Dependent Cell Response Is Modulated by the Timing of CD43 Engagement. *J. Immunol.* (2006). doi:10.4049/jimmunol.176.12.7346
118. Bravo-Adame, M. E. *et al.* An alternative mode of CD43 signal transduction activates pro-survival pathways of T lymphocytes. *Immunology* (2017). doi:10.1111/imm.12670
119. Manjunath, N., Correa, M., Ardman, M. & Ardman, B. Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43. *Nature* (1995). doi:10.1038/377535a0
120. Velázquez, F. E. *et al.* Sialomucin CD43 regulates T helper type 17 cell intercellular adhesion molecule 1 dependent adhesion, apical migration and transendothelial migration. *Immunology* (2019). doi:10.1111/imm.13047
121. Cannon, J. L. *et al.* CD43 interaction with ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins regulates T-cell trafficking and CD43 phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* (2011). doi:10.1091/mbc.E10-07-0586
122. Camacho-Concha, N. *et al.* CD43 promotes cells transformation by preventing merlin-

- mediated contact inhibition of growth. *PLoS One* (2013). doi:10.1371/journal.pone.0080806
123. Oguri, E., Miki, Y., Hirano, K., Yamanaka, M. & Beppu, M. Clearance of CD43-capped cells by macrophages: Capping alone leads to phagocytosis. *Biol. Pharm. Bull.* (2012). doi:10.1248/bpb.35.551
  124. Giordanengo, V. *et al.* Autoantibodies directed against CD43 molecules with an altered glycosylation status on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected CEM cells are found in all HIV-1+ individuals. *Blood* (1995).
  125. Ardman, B., Sikorski, M. A., Settles, M. & Staunton, D. E. Human immunodeficiency virus type 1-infected individuals make autoantibodies that bind to CD43 on normal thymic lymphocytes. *J. Exp. Med.* (1990). doi:10.1084/jem.172.4.1151
  126. Barat, C. & Tremblay, M. J. Engagement of CD43 enhances human immunodeficiency virus type 1 transcriptional activity and virus production that is induced upon TCR/CD3 stimulation. *J. Biol. Chem.* (2002). doi:10.1074/jbc.M111935200
  127. Hartshorn, K. L. & White, M. R. Influenza A virus up-regulates neutrophil adhesion molecules and adhesion to biological surfaces. *J. Leukoc. Biol.* (1999). doi:10.1002/jlb.65.5.614
  128. Abramson, J. S. & Hudnor, H. R. Role of the sialophorin (CD43) receptor in mediating influenza A virus-induced polymorphonuclear leukocyte dysfunction. *Blood* (1995). doi:https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2012.08.003
  129. Randhawa, A. K., Ziltener, H. J., Merzaban, J. S. & Stokes, R. W. CD43 is required for optimal growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and in mice. *J. Immunol.* (2005). doi:10.4049/jimmunol.175.3.1805
  130. Randhawa, A. K., Ziltener, H. J. & Stokes, R. W. CD43 controls the intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* through the induction of TNF- $\alpha$ -mediated apoptosis. *Cell. Microbiol.* (2008). doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01194.x
  131. Todeschini, A. R. *et al.* Costimulation of Host T Lymphocytes by a Trypanosomal trans - Sialidase: Involvement of CD43 Signaling. *J. Immunol.* (2015). doi:10.4049/jimmunol.168.10.5192
  132. Todeschini, A. R. *et al.* Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* binds host T-lymphocytes in a lectin manner. *J. Biol. Chem.* (2002). doi:10.1074/jbc.M203185200
  133. Wang, J. *et al.* Druggable negative allosteric site of P2X3 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U. S. A. (2018). doi:10.1073/pnas.1800907115
134. North, R. A. & Jarvis, M. F. P2X receptors as drug targets. *Molecular Pharmacology* (2013). doi:10.1124/mol.112.083758
  135. Chen, X.-Q., Zhu, J.-X., Wang, Y., Zhang, X. & Bao, L. CaMKIIalpha and caveolin-1 cooperate to drive ATP-induced membrane delivery of the P2X3 receptor. *J. Mol. Cell Biol.* **6**, 140–153 (2014).
  136. Zhou, Y. feng *et al.* Suppressing PKC-dependent membrane P2X3 receptor upregulation in dorsal root ganglia mediated electroacupuncture analgesia in rat painful diabetic neuropathy. *Purinergic Signal.* (2018). doi:10.1007/s11302-018-9617-4
  137. North, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological Reviews* (2002). doi:10.1152/physrev.00015.2002
  138. Cook, S. P., Rodland, K. D. & McCleskey, E. W. A memory for extracellular Ca<sup>2+</sup> by speeding recovery of P2X receptors from desensitization. *J. Neurosci.* (1998).
  139. Vacca, F., Giustizieri, M., Ciotti, M. T., Mercuri, N. B. & Volonté, C. Rapid constitutive and ligand-activated endocytic trafficking of P2X 3 receptor. *J. Neurochem.* (2009). doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06029.x
  140. Bele, T. & Fabbretti, E. The scaffold protein calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase controls ATP release in sensory ganglia upon P2X3 receptor activation and is part of an ATP keeper complex. *J. Neurochem.* (2016). doi:10.1111/jnc.13680
  141. Barclay, J. *et al.* Functional downregulation of P2X3 receptor subunit in rat sensory neurons reveals a significant role in chronic neuropathic and inflammatory pain. *J. Neurosci.* (2002).
  142. Maynard, J. P. *et al.* P2X3 purinergic receptor overexpression is associated with poor recurrence-free survival in hepatocellular carcinoma patients. *Oncotarget* (2015). doi:10.18632/oncotarget.6240
  143. Jarvis, M. F. *et al.* A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2002). doi:10.1073/pnas.252537299
  144. Gever, J. R. *et al.* AF-353, a novel, potent and orally bioavailable P2X3/P2X2/3 receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* (2010). doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00796.x
  145. Morice, A. H. *et al.* The effect of gefapixant, a P2X3 antagonist, on cough reflex sensitivity: a randomised placebo-controlled study. *Eur. Respir. J.* (2019).

doi:10.1183/13993003.00439-2019

146. Coutinho-Silva, R., Knight, G. E. & Burnstock, G. Impairment of the splenic immune system in P2X2/P2X3 knockout mice. *Immunobiology* (2005). doi:10.1016/j.imbio.2004.09.007
147. Adinolfi, E. *et al.* The P2X7 receptor: A main player in inflammation. *Biochemical Pharmacology* (2018). doi:10.1016/j.bcp.2017.12.021
148. Soare, A. Y. *et al.* P2X Antagonists Inhibit HIV-1 Productive Infection and Inflammatory Cytokines Interleukin-10 (IL-10) and IL-1 $\beta$  in a Human Tonsil Explant Model. *J. Virol.* **93**, (2018).
149. Graziano, F. *et al.* Extracellular ATP induces the rapid release of HIV-1 from virus containing compartments of human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2015). doi:10.1073/pnas.1500656112
150. Giroud, C., Marin, M., Hammonds, J., Spearman, P. & Melikyan, G. B. P2X1 Receptor Antagonists Inhibit HIV-1 Fusion by Blocking Virus-Coreceptor Interactions. *J. Virol.* **89**, 9368–9382 (2015).
151. Parvaiz, F. *et al.* Ionotropic Purinergic Receptors P2X4 and P2X7: Proviral or Antiviral? An Insight into P2X Receptor Signaling and Hepatitis C Virus Infection. *Viral Immunol.* (2016). doi:10.1089/vim.2016.0008
152. Chi, S., Weiss, A. & Wang, H. A CRISPR-Based Toolbox for Studying T Cell Signal Transduction. *Biomed Res. Int.* **2016**, 5052369 (2016).
153. Bronfman, F. C., Tcherpakov, M., Jovin, T. M. & Fainzilber, M. Ligand-induced internalization of the p75 neurotrophin receptor: a slow route to the signaling endosome. *J. Neurosci.* (2003).
154. Haberstock-Debic, H. Morphine Promotes Rapid, Arrestin-Dependent Endocytosis of Opioid Receptors in Striatal Neurons. *J. Neurosci.* (2005). doi:10.1523/jneurosci.5045-04.2005
155. Wells, S. M., Kantor, A. B. & Stall, A. M. CD43 (S7) expression identifies peripheral B cell subsets. *J. Immunol.* (1994).
156. Hey, Y. Y., Tan, J. K. H. & O'Neill, H. C. Redefining myeloid cell subsets in murine spleen. *Front. Immunol.* (2016). doi:10.3389/fimmu.2015.00652
157. Shelley, C. S. *et al.* Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U. S. A. (1989). doi:10.1073/pnas.86.8.2819
158. Lee, D. H., Park, K. S., Kong, I. D., Kim, J. W. & Han, B. G. Expression of P2 receptors in human B cells and Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines. *BMC Immunol.* **7**, 22 (2006).
  159. Marques-da-Silva, C., Burnstock, G., Ojcius, D. M. & Coutinho-Silva, R. Purinergic receptor agonists modulate phagocytosis and clearance of apoptotic cells in macrophages. *Immunobiology* (2011). doi:10.1016/j.imbio.2010.03.010
  160. Lee, J. H. *et al.* Single Transcription Factor Conversion of Human Blood Fate to NPCs with CNS and PNS Developmental Capacity. *Cell Rep.* (2015). doi:10.1016/j.celrep.2015.04.056
  161. Apicella, L. & Fabbretti, E. P2X3 receptor expression by HEK cells conditions their survival. *Purinergic Signal.* (2012). doi:10.1007/s11302-011-9285-0
  162. Inoue, K. *et al.* Characterization of multiple P2X receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* (2005). doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23683.x
  163. Kim, S. A., Choi, H. S. & Ahn, S. G. Pin1 induces the ADP-induced migration of human dental pulp cells through P2Y1 stabilization. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.13377
  164. Shcherbatko, A. *et al.* Modulation of P2X3 and P2X2/3 Receptors by Monoclonal Antibodies. *J. Biol. Chem.* **291**, 12254–12270 (2016).
  165. Seveau, S. *et al.* Leukosialin (CD43, sialophorin) redistribution in uropods of polarized neutrophils is induced by CD43 cross-linking by antibodies, by colchicine or by chemotactic peptides. *J. Cell Sci.* (1997).
  166. de Smet, W., Walter, H. & van Hove, L. A new CD43 monoclonal antibody induces homotypic aggregation of human leucocytes through a CD11a/CD18-dependent and -independent mechanism. *Immunology* **79**, 46–54 (1993).
  167. Babina, M., Weber, S., Mammeri, K. & Henz, B. M. Signal transduction via CD43 (leukosialin, sialophorin) and associated biological effects in a human mast cell line (HMC-1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1998). doi:10.1006/bbrc.1998.8083
  168. Tong, J. *et al.* CD43 Regulation of T Cell Activation Is Not through Steric Inhibition of T Cell-APC Interactions but through an Intracellular Mechanism. *J. Exp. Med.* (2004). doi:10.1084/jem.20021602

169. Shamseddine, A. A., Airola, M. V & Hannun, Y. A. Roles and regulation of neutral sphingomyelinase-2 in cellular and pathological processes. *Adv. Biol. Regul.* **57**, 24–41 (2015).
170. Wang, C. M., Ploia, C., Anselmi, F., Sarukhan, A. & Viola, A. Adenosine triphosphate acts as a paracrine signaling molecule to reduce the motility of T cells. *EMBO J.* (2014). doi:10.15252/emboj.201386666
171. Kopp, R., Krautloher, A., Ramírez-Fernández, A. & Nicke, A. P2X7 Interactions and Signaling – Making Head or Tail of It . *Frontiers in Molecular Neuroscience* **12**, 183 (2019).
172. Garcia-Marcos, M. *et al.* Coupling of two pools of P2X 7 receptors to distinct intracellular signaling pathways in rat submandibular gland. *J. Lipid Res.* (2006). doi:10.1194/jlr.M500408-JLR200
173. Bianco, F. *et al.* Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *EMBO J.* (2009). doi:10.1038/emboj.2009.45
174. Gomez-Villafuertes, R. *et al.* Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II signalling cascade mediates P2X7 receptor-dependent inhibition of neuritogenesis in neuroblastoma cells. *FEBS J.* **276**, 5307–5325 (2009).
175. Jacques-Silva, M. C. *et al.* P2X 7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* (2004). doi:10.1038/sj.bjp.0705685
176. Mistafa, O., Ghalali, A., Kadekar, S., Högberg, J. & Stenius, U. Purinergic receptor-mediated rapid depletion of nuclear phosphorylated Akt depends on pleckstrin homology domain leucine-rich repeat phosphatase, calcineurin, protein phosphatase 2A, and PTEN phosphatases. *J. Biol. Chem.* (2010). doi:10.1074/jbc.M110.117093
177. Bootman, M. D., Rietdorf, K., Collins, T., Walker, S. & Sanderson, M. Ca<sup>2+</sup>-Sensitive Fluorescent Dyes and Intracellular Ca<sup>2+</sup> Imaging. in *Calcium Techniques: A Laboratory Manual* 25–49 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2014).
178. Fabbretti, E. ATP P2X3 receptors and neuronal sensitization. *Frontiers in Cellular Neuroscience* (2013). doi:10.3389/fncel.2013.00236
179. Stephan, G. *et al.* The ASIC3/P2X3 cognate receptor is a pain-relevant and ligand-gated cationic channel. *Nat. Commun.* **9**, 1354 (2018).
180. Arkhipov, S. N. & Maly, I. V. Quantitative analysis of the role of receptor recycling in T cell polarization. *Biophys. J.* (2006). doi:10.1529/biophysj.106.083204

181. Thiemann, S., Man, J. H., Chang, M. H., Lee, B. & Baum, L. G. Galectin-1 regulates tissue exit of specific dendritic cell populations. *J. Biol. Chem.* (2015). doi:10.1074/jbc.M115.644799
182. Sato, H., Yoneda, M., Honda, T. & Kai, C. Morbillivirus receptors and tropism: Multiple pathways for infection. *Front. Microbiol.* (2012). doi:10.3389/fmicb.2012.00075  
mit Erlaubnis CC BY-NC 3.0, <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>



## 11 Danksagung

Ich möchte mich vor allem bei meinem Betreuer Prof. Dr. Lars Dölken bedanken, der mich sowohl bei der Themenfindung als auch während des Projekts mit diversen anregenden Diskussionen unterstützt hat.

Ein ganz besonderer Dank geht an Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies, die als Leiterin meiner Arbeitsgruppe und als Betreuerin des Projektes sehr engagiert war und mir mit ihrem Wissen, ihren Anregungen sowie mit konstruktiver Kritik viel geholfen hat.

Vielen Dank an Dr. Elita Avota, die mich geduldig in das Labor-Leben eingearbeitet und mir Einiges erklärt hat. Sie stand mir bei meinen unzähligen Fragen stets beiseite und hat mir viele wertvolle Ratschläge gegeben.

Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. Hartwig Klinker und Prof. Dr. Georg Gasteiger für ihre Unterstützung und ihre Betreuung.

Ein großes Dankeschön geht an Anna Hoffbauer für die sehr unterhaltsame Zusammenarbeit und ihre Hilfe, durch die sie mir die Durchführung vieler Versuche erleichtert oder überhaupt ermöglicht hat. Vielen Dank an Charlene Börtlein für die Einarbeitung und insbesondere die Unterstützung bei der Anzucht von Masernvirus.

Vielen Dank auch an Shaghayegh Derakhshani und Maria de Lira sowie an Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies und die Kolleginnen aus seiner Arbeitsgruppe. Danke für die schöne Arbeitsatmosphäre, die Unterstützung und die tollen gemeinsamen Erlebnisse.

Ein Dankeschön geht auch Dr. Florian Erhard für seine statistischen Analysen des Phosphoproteoms.

Bei dem SphingoFOR-Netzwerk möchte ich mich für die spannenden Diskussionen und Treffen sowie für finanzielle Mittel bedanken. Vielen Dank auch an die Graduierten Schule und die Medizinische Fakultät Würzburg für die zahlreichen Fortbildungsangebote und die finanzielle Unterstützung.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mir das Studium und das freie Jahr für meine Promotion ermöglicht haben und mir stets zur Seite standen. Außerdem Mathias Rombach, der mir während der Zeit den Rücken gestärkt und mich bekräftigt und unterstützt hat.