

Klonierung und funktionelle
Charakterisierung der NTPDase3
aus der Ratte

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Thomas Vorhoff
aus Menden (Sauerland)

Frankfurt am Main 2005

vom Fachbereich Biologie und Informatik der Johann Wolfgang Goethe - Universität
Frankfurt am Main als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Osiewacz

Gutachter: Prof. Dr. Zimmermann
Prof. Dr. Volkandt

Datum der Disputation: 18. Juli 2005

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Herbert Zimmermann danke ich herzlich, daß er mir die Möglichkeit gab, in seinem Labor dieses interessante Thema zu bearbeiten. Besonders bedanke ich mich für sein Interesse und seine Hilfsbereitschaft während der Betreuung meiner Doktorarbeit.

Bei Herrn PD Dr. Norbert Braun möchte ich mich für zahlreiche Ratschläge, seine konstruktive Kritik und seine stetige Diskussionsbereitschaft danken, die maßgeblich zum Erfolg der Arbeit beigetragen haben.

Für die Einarbeitung im Umgang mit radioaktiven Stoffen möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Walter Volknandt und Herrn Dr. Bernd Uwe Failer danken, dessen Anregungen häufig hilfreich waren.

Herrn Peter Brendel und Frau Dr. Petra Vollmayer danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung bei den HPLC-Analysen.

Herrn Klaus Hammer schulde ich Dank, daß er mich an seinem großen Erfahrungsschatz in der Immunzytologie und Immunhistologie teilhaben lassen.

Bei Herrn Marco Morciano möchte ich für die Bereitstellung der Primär-Kulturen bedanken.

Dem gesamten Arbeitskreis Neurochemie danke ich für die freundliche Atmosphäre und das angenehme Arbeitsklima, das ich stets in guter Erinnerung behalten werde.

Für die Herstellung und Bereitstellung der Antikörper danke ich Dr. Jean Sévigny und seinen Mitarbeitern.

Einen besonderer Dank gebührt auch meinen Eltern, die mich stets unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Nukleotide als Signalstoffe.....	1
1.2 Nukleotidrezeptoren.....	3
1.2.1 P1-Rezeptoren.....	3
1.2.2 P2X-Rezeptoren.....	4
1.2.3 P2Y-Rezeptoren.....	5
1.3 Ektonukleotidasen.....	6
1.3.1 Alkalische Phosphatase.....	6
1.3.2 Ekto-5'-Nukleotidase.....	7
1.3.3 Ekto-Nukleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase Familie (E-NPP-Familie).....	7
1.3.4 Ekto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase-Familie (E-NTPDasen) ..	8
1.3.4.1 Membrantopologie der E-NTPDasen.....	8
1.3.4.2 Charakteristika der E-NTPDase-Familie.....	8
1.3.4.3 NTPDase1 (Ekto-ATPDase, Ayrpase).....	9
1.3.4.4 NTPDase2 (Ekto-ATPase).....	9
1.3.4.5 NTPDase3.....	11
1.3.4.6 Die intrazellulären NTPDasen.....	12
2 Fragestellung.....	13
3 Material und Methoden.....	14
3.1 Material.....	14
3.1.1 Geräte.....	14
3.1.2 Chemikalien.....	14

3.1.3 Radioaktive Substanzen.....	15
3.1.4 Proteinase-Inhibitoren.....	15
3.1.5 Enzyme.....	15
3.1.6 Größenstandards.....	16
3.1.7 Medien und Zellkulturzubehör.....	16
3.1.8 Verwendete Organismen.....	17
3.1.9 Kits und Verbrauchsmaterial.....	17
3.1.10 Vektoren und cDNA-Banken.....	18
3.1.11 PCR und Sequenzierprimer.....	18
3.1.12 Häufig verwendete Lösungen.....	20
3.2 Software und Web-Ressourcen für in silico – Analysen.....	20
3.2.1 Software.....	20
3.2.2 Online - Anwendungen.....	20
3.3 Methoden.....	21
3.3.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	21
3.3.1.1 DNA-Präparation im analytischen Maßstab nach Birnboim und Doly.....	21
3.3.1.2 DNA-Präparation im präparativen Ansatz mittels Nucleobond®.....	22
3.3.1.3 Gelextraktion mittels Nucleotrap®.....	22
3.3.1.4 DNA-Reinigung mittels NucleoSpin®.....	23
3.3.1.5 Konzentrierung von Nukleinsäuren durch Fällung.....	23
3.3.1.6 Allgemeine Maßnahmen zum Arbeiten mit RNA.....	23
3.3.1.7 RNA-Isolierung mit Trizol®.....	24
3.3.1.8 mRNA-Isolierung.....	24
3.3.1.9 cDNA-Synthese.....	25

3.3.1.10	Photometrische Nukleinsäurebestimmung.....	26
3.3.1.11	Konzentrationsbestimmung im Ethidiumbromidgel.....	26
3.3.1.12	Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	27
3.3.1.13	Enzymatische DNA-Restriktion.....	28
3.3.1.14	Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA.....	29
3.3.1.15	Ligation von DNA-Strängen.....	30
3.3.2	Gentechnische Arbeiten.....	31
3.3.2.1	Maßnahmen zum sterilen Arbeiten.....	31
3.3.2.2	Anzucht von Escherichia coli.....	31
3.3.2.3	Herstellung elektrokompenter E. coli DH5 α	32
3.3.2.4	Transfektion von E. coli durch Elektroporation.....	32
3.3.2.5	Anlegen von Dauerkulturen.....	33
3.3.2.6	Klonierung des 675 bp und 324 bp-Fragmente.....	33
3.3.2.7	RACE-PCR zur Erschließung des 5'-Bereichs der NTPDase3-mRNA.....	34
3.3.2.8	Herstellung radioaktiver Sonden gegen die Ratten-NTPDase3.....	36
3.3.2.9	Anreicherung der cDNA mittels ClonCapture®.....	37
3.3.2.10	Screening der SuperScript Ratbrain cDNA Library.....	39
3.3.2.11	Screening der Uni-ZAP®XR Phagenbank.....	41
3.3.3	Zellkultur.....	43
3.3.3.1	Kultivierung der CHO-Zellen.....	43
3.3.3.2	Kultivierung der COS7-Zellen.....	43
3.3.3.3	Kultivierung der PC12-Zellen.....	44
3.3.3.4	NGF-Stimulation von PC12-Zellen.....	44
3.3.3.5	Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer.....	44

3.3.3.6	Reaktivieren von eukaryotischen Dauerkulturen.....	45
3.3.3.7	Transiente Transfektion von CHO- und COS7-Zellen.....	45
3.3.3.8	Expressionsstimulation mit Natriumbutyrat.....	46
3.3.4	Herstellung der verwendeten Antikörper.....	46
3.3.4.1	Herstellung der Antikörper N3-1, N3-2 und N3-3.....	46
3.3.4.2	Herstellung der Peptid-Antikörper 264fb und 265fb.....	47
3.3.5	Biochemische Methoden.....	47
3.3.5.1	Herstellung von Membranfraktionen aus transfizierten Zellen.....	47
3.3.5.2	Herstellung von Membranfraktionen aus Geweben.....	48
3.3.5.3	ConcavalinA-Reinigung im Batch-Verfahren.....	48
3.3.5.4	Proteinfällung mit Trichloressigsäure.....	49
3.3.5.5	Proteinbestimmung nach Spector.....	49
3.3.5.6	Proteinbestimmung nach Peterson.....	50
3.3.5.7	Westernblot.....	50
3.3.5.8	Ponceau S – Färbung der Nitrozellulosemembran.....	53
3.3.5.9	Antikörperreinigung am immobilisierten Antigen.....	53
3.3.5.10	Antikörperreinigung durch Adsorption unspezifischer Antikörper.....	55
3.3.5.11	Phosphatbestimmung nach Lanzetta.....	55
3.3.5.12	Untersuchung zur Abhängigkeit der NTPDase3 von Magnesium- und Kalzium-Ionen.....	56
3.3.5.13	HPLC-Analyse zum Hydrolyseverhalten der NTPDase3.....	56
3.3.5.14	Untersuchung zur Substratspezifität der NTPDase3.....	57
3.3.5.15	Bestimmung des pH-Optimums der NTPDase3.....	58
3.3.6	Immunzytologie.....	58
3.3.6.1	Poly(D)-Lysin-Beschichtung von Deckgläschen.....	59

3.3.6.2 Native Markierung der Zellen.....	59
3.3.6.3 Immunzytologie nach Methanol/Aceton-Fixierung.....	59
3.3.6.4 Immunzytologie nach Paraformaldehyd-Fixierung.....	60
3.3.6.5 Immunzytologie an transfizierten CHO-Zellen.....	60
3.3.6.6 Immunzytologie an NGF-stimulierten PC12-Zellen.....	61
3.3.6.7 Immunzytologie an primären Cortex-Kulturen.....	61
3.3.7 Immunhistologie.....	61
3.3.7.1 Beschichtung der Objektträger mit Poly(L)-Lysin.....	61
3.3.7.2 Beschichtung der Objektträger mit APES.....	61
3.3.7.3 Gewebepräparation für die mikroskopischen Präparate.....	61
3.3.7.4 Herstellung perfusionsfixierter Präparate.....	62
3.3.7.5 Paraformaldehyd fixierte Schnitte.....	62
3.3.7.6 Methanol-fixierte Schnitte.....	63
4 Ergebnisse.....	64
4.1 Klonierung der NTPDase3 aus der Ratte.....	64
4.2 Rechnergestützte Analyse der Nukleinsäure- und Aminosäure-Sequenz.....	72
4.2.1 Vergleich der Ratten-NTPDase3 mit anderen E-NTPDasen.....	72
4.2.2 in silico – Analysen zur Membrantopologie.....	76
4.2.3 Computergestützte Vorhersage der zellulären Lokalisation.....	77
4.2.4 Analyse potentieller Glykosilierungsstellen.....	78
4.2.5 Verteilungsmuster der Cysteine.....	83
4.2.6 Potentielle Phosphorylierungsstellen.....	85
4.2.7 Sequenzanalysen zur möglichen Sekundärstruktur und Zugehörigkeit zur Zuckerkinase/Hitzeschock-Protein 70/Aktin-Superfamilie.....	86
4.2.8 Genomische Lokalisation und Intron-Exon-Struktur der NTPDase3.....	91

4.3 Untersuchungen zur Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften der NTPDase3 der Ratte.....	93
4.3.1 Ionenabhängigkeit der NTPDase3.....	93
4.3.2 Bestimmung des pH-Optimums.....	95
4.3.3 Analyse der ATP-Hydrolyse-Produkte.....	96
4.3.4 Untersuchung der Substratspezifität.....	97
4.4 Proteinbiochemische Untersuchungen an heterolog und endogen exprimierter NTPDase3	99
4.4.1 Test der NTPDase3-Antikörper im Westernblot an heterolog exprimierter NTPDase3.....	99
4.4.2 Nachweis der endogenen NTPDase3-Expression in PC12-Zellen durch Westernblot.....	101
4.4.3 Anwendung der NTPDase3-Antikörper an Membranfraktionen aus Geweben.....	102
4.4.3.1 Versuch die Spezifität des Antikörpers durch Affinitätsreinigung zu erhöhen.....	102
4.4.3.2 Partielle Reinigung und Anreicherung der NTPDase3 aus Gewebs-Membranfraktion über ConcavalinA-Sepharose.....	103
4.4.3.3 Westernblot mit ConA-gereinigten Membranfraktionen verschiedener Gewebe.....	105
4.4.4 Test der Peptid-Antikörper.....	107
4.5 Immunzytologische Analyse der NTPDase3 der Ratte.....	109
4.5.1 Immunzytologie an transfizierten CHO-Zellen.....	109
4.5.2 Immunzytologie an PC-12-Zellen.....	111
4.5.3 Immunzytologie an primären Cortexkulturen.....	111
4.6 Immunhistologische Ansätze.....	112
5 Diskussion.....	113
5.1 Klonierung, Identifikation und heterologe Expression der NTPDase3 der Ratte.....	113

5.2 Das NTPDase3-Gen der Ratte liegt auf Chromosom8.....	115
5.3 Die NTPDase3 ist in Aminosäure-Zusammensetzung und Membrantopologie den NTPDasen1, 2 und 8 ähnlich.....	115
5.4 Zellulär ist die NTPDase3 auf der Plasmamembran lokalisiert.....	116
5.5 Bei der NTPDase3 liegt eine N-Glykosylierung vor, die teilweise konserviert ist.....	118
5.6 Die NTPDase3 zeigt Ähnlichkeiten zur Zuckerkinase/ Hitzeschock - Protein 70/ Aktin-Superfamilie.....	120
5.7 Überlegungen zur Tertiär- und Quartärstruktur der NTPDase3.....	121
5.7.1 Die Zuckerkinase/Hitzeschock-Protein 70/Aktin-Superfamilie als Modellgrundlage für Tertiärstruktur und Substratbindung.....	121
5.7.2 Cysteine stabilisieren wahrscheinlich die Tertiärstruktur der NTPDase3...122	
5.7.3 Transmembrandomänen und spezifische Aminosäuren beeinflussen vermutlich die katalytischen Eigenschaften der E-NTPDasen über die Konformation.....	123
5.8 Vergleichende Charakterisierung der katalytischen Eigenschaften der NTPDase3.....	124
5.8.1 In ihrer katalytischen Aktivität liegt die NTPDase3 zwischen NTPDase1 und NTPDase2.....	124
5.8.2 Die Aktivität der NTPDase3 ist abhängig von Kalzium-Ionen.....	126
5.9 Gewebeverteilung und mögliche physiologische Funktionen der NTPDase3....126	
5.9.1 Die NTPDase3 ist ein potentieller Regulator interzellulärer Signale.....126	
5.9.2 Mögliche nicht-neuronale Funktionen der NTPDase3.....128	
5.9.2.1 Modulation purinerg regulierter Epithelfunktionen.....128	
5.9.2.2 NTPDase3 ist möglicherweise an der Regulation endo- und exokriner Drüsenfunktionen im Pankreas beteiligt.....129	
5.9.3 NTPDase3 wird in PC12-Zellen, einem Modellsystem für Neuronen, exprimiert.....	130
5.9.4 Mögliche Funktionen der NTPDase3 in neuronalem Gewebe.....	132

5.9.4.1 Beteiligung an der Regulation Nukleotidvermittelter Prozesse im Darm.....	132
5.9.4.2 Mögliche Beteiligung der NTPDase3 an der Regulation Nukleotidvermittelter Prozesse im Genitaltrakt der Ratte.....	134
5.9.4.3 Mögliche Beteiligung an der Regulation Nukleotidvermittelter Prozesse im zentralen Nervensystem.....	135
5.9.4.3.1 Rückenmark.....	135
5.9.4.3.2 Hirnstamm.....	136
5.9.4.3.3 Cerebellum.....	137
5.9.4.3.4 Diencephalon und Hypophyse.....	138
5.9.4.3.5 Hippocampus.....	139
5.9.4.3.6 Striatum.....	139
5.9.4.3.7 Bulbus olfactorius.....	140
5.9.4.3.8 Cerebraler Cortex.....	140
5.9.5 Die Ergebnisse der primären Cortex-Kultur als Ausblick auf weitergehende Untersuchungsansätze.....	141
6 Zusammenfassung.....	142
7 Anhang.....	144
7.1 Sequenz der NTPDase3-cDNA.....	144
7.2 verwendete Einheiten.....	146
7.3 Verzeichnisse.....	149
7.3.1 Abkürzungsverzeichnis.....	149
7.3.2 Abbildungsverzeichnis.....	153
7.3.3 Tabellen-Verzeichnis.....	155
7.3.4 Stichwortverzeichnis.....	156
7.4 Literaturnachweis.....	165

1 Einleitung

1.1 Nukleotide als Signalstoffe

Nukleotide sind seit langer Zeit als Energieträger der Zelle bekannt und dienen als Kosubstrat in vielen biochemischen Reaktionen. Neben der Funktionen als Energieträger fungieren Nukleotide und Nukleoside auch als Signalmoleküle. So sind cAMP und cGMP gut beschriebene *second messenger*, die in vielen intrazellulären Signalkaskaden eine Rolle spielen. Aber auch Extrazellulär können Nukleotide als Signalstoffe agieren, wo sie an der Regulation einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt sind.

Ein gut untersuchtes Beispiel ist die Blutplättchenaggregation. Adenosindiphosphat (ADP) fördert via Nukleotid-Rezeptoren auf den Thrombozyten die Blutplättchenaggregation. Das ADP wird von den Thrombozyten in Granula gespeichert und durch Exozytose freigesetzt. Sein Abbauprodukt Adenosin wirkt als Antagonist auf die Blutplättchenaggregation (McNicol et al., 2003).

Des Weiteren spielen extrazelluläre Nukleotide eine Rolle bei der Regulation der Knochenkalzifikation (Goding, 2000) und bei Entzündungsreaktionen (Kannan, 2002; Mizumoto et al., 2002).

Seit 1972 ist die Rolle von Nukleotiden als Neurotransmitter bzw. Kotransmitter bekannt (Burnstock, 1972). Die Nukleotide werden in synaptischen Vesikeln oder Granula gespeichert und durch Exozytose freigesetzt oder auf andere Weise in den extrazellulären Raum abgegeben werden (Rathbone et al., 1999; Schwiebert et al., 2003). Die Speicherung von ATP wurde unter anderem für chromaffine Granula, oder als Kotransmitter in synaptischen Vesikeln adrenerger und cholinergischer Neuronen beschrieben (Zimmermann, 1994).

Purinerge Kotransmission ist sowohl für das periphere Nervensystem als auch im zentralen Nervensystem beschrieben (Übersicht bei Burnstock, 1997; Burnstock, 1999). Im peripheren Nervensystem agiert ATP sowohl mit Acetylcholin (ACh) als auch mit Nordrenalin als Kotransmitter (Abrachio et al., 1998; Ventura et al., 2003; Unsworth et

al., 1990; Theobald, 1995) und auch im Zentralnervensystem gibt es Hinweise für purinerge Ko-Transmission. Unter anderem wird ATP zusammen mit γ -Aminobuttersäure (GABA) ausgeschüttet (Jo et al., 1999) und in Schnitten des Hypothalamus konnte die Sekretion von ATP zusammen mit Noradrenalin gezeigt werden (Sperlágh et al., 1998). In Neuronenkulturen aus abdominalen Ganglien und der Habenula agiert ATP als schneller Neurotransmitter (Edwards et al., 1993). Desweiteren inhibiert ATP die Depolarisation von Neuronen der Substantia nigra, die eine Rolle bei der Schmerz-wahrnehmung spielen (Yoshida et al., 2002). Im Hippocampus ist ATP an der Induktion von *Long-term potentiation* (LTP) beteiligt, welches mit Lernprozessen in Zusammenhang steht (Wierazko et al., 1994; Fuji et al., 1999; Almeida et al., 2003).

Eine weitere Funktion von ATP liegt in der Neuromodulation. Sowohl im peripheren Nervensystem (Sokolova et al., 2003; Queiroz et al., 2003a) als auch im Zentralnervensystem (Cunha et al., 2000) kann die Acetylcholin- und Noradrenalin-Freisetzung durch ATP verstärkt oder inhibiert werden. Die exzitatorische Glutamat-Freisetzung in Hippocampus-Schnitten kann durch ATP inhibiert werden (Mendoza-Fernandez et al., 2000) und auch für die Modulation anderer Neurotransmitter wie Serotonin (Okada et al., 1999), Vasopressin (Kapoor et al., 2000) und GABA (Sperlágh et al., 2002) gibt es Hinweise.

Ferner reagieren auch Gliazellen auf purinerge Signale. Gliazellen erfüllen wichtige Aufgaben im ZNS. Sie schaffen Bedingungen, die neuronale Aktivität ermöglichen, modulieren neuronale Prozesse und sind an der Entwicklung des Gehirns beteiligt. Astrozyten exprimieren Rezeptoren für verschiedene Neurotransmitter, einschließlich Nukleotidrezeptoren, und sind in der Lage Neurotransmitter auszuschütten. Verschiedene Interaktionen zwischen Neuronen und Astrozyten sind bekannt (Übersicht bei Araque et al., 2001; Haydon, 2001). Von kultivierten Astrozyten ist bekannt, daß sie spontan Adenin- und Guanin- Nukleotide (Purine) freisetzen. Dieser Effekt kann durch Sauerstoff- und Nährstoffdeprivation stimuliert werden (Ciccarelli et al., 1999). Purine wirken ihrerseits Proliferationsfördernd auf Astrozyten primärer Zellkulturen (Ciccarelli et al., 2000). Cytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF α), Interleukin-6 (IL6) sowie Plasminogen werden von Mikrogliazellen unter ATP-Einfluß ausgeschüttet. Unter anderem wird diesen Faktoren eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben (Shigemoto-Mogami et al., 2001; Hide et al., 2000; Inoue, 2002; Inoue et al., 2003).

Auch für einen Einfluß von Nukleotiden auf die Ausbildung von Neuriten gibt es Hinweise (Rathbone et al., 1999; Gysbers et al., 1996a; Gysbers et al., 1996b). Diese und andere Ergebnisse sprechen für eine maßgebliche Beteiligung von Nukleotiden bei Reparaturprozessen im Falle von Hirnverletzungen oder Ischämie (Übersicht bei Ciccarelli, 2001). Weiterhin kann ATP als Transmitter zur Weiterleitung von Kalzium-Wellen in Astrozyten dienen (Guthrie et al., 1999).

Neben ATP, ADP und Adenosin fungieren weitere Nukleotide als Signalstoffe im Gehirn. Dies gilt insbesondere für UTP, UDP und die Gruppe der Diadenosinpolyphosphate (Ap_nA). Eine Besonderheit der nukleotidvermittelten Neurotransmission ist die ubiquitäre Verteilung dieser Signalstoffe und ihrer Rezeptoren im Organismus (Illes et al., 2000; Zimmermann, 2000; Miras-Portugal et al., 1998).

1.2 Nukleotidrezeptoren

Extrazelluläre Nucleoside und Nucleotide entfalten ihre Signalwirkung über membranständige Oberflächenrezeptoren. Derzeit sind mehrere verschiedene Rezeptor-Typen bekannt. Die Gruppe der P1-Rezeptoren (Nucleosid-Rezeptoren) wird von Adenosin aktiviert. Durch Nucleosidtriphosphate und Nucleosiddiphosphate aktivierbare P2-Rezeptoren können in zwei molekular unterschiedliche Familien eingeteilt werden: P2X-Rezeptoren sind ligandenabhängige Kationenkanäle. P2Y-Rezeptoren sind metabotrope Rezeptoren. Die Diadenosinpolyphosphate sind Liganden für P2X und P2Y-Rezeptoren sowie nicht-Nucleotid-sensitive P4-Rezeptoren (Lambrecht, 2000).

1.2.1 P1-Rezeptoren

Der Ligand aller vier P1-Rezeptoren ist Adenosin. Bei diesen Rezeptoren (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3) handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die intrazelluläre Signalweiterleitung erfolgt über cAMP, Inositoltriphosphat (IP3) oder die Modulation von Ionenkanälen. Für den A_1 -Rezeptor ist eine starke Expression in verschiedenen Hirnteilen (Cortex, Cerebellum, Hippocampus) beschrieben. Neben seinem Vorkommen im Thymus und auf Leukozyten wird der A_{2A} -Rezeptor auf GABAergen Neuronen verschiedener Hirnregionen stark exprimiert.

Die beiden anderen Subtypen sind hauptsächlich in somatischen Geweben lokalisiert (Übersicht bei Fredholm et al., 2000; Fredholm et al., 2001).

<i>Rezeptor</i>	<i>Ligand(en)</i>	<i>Lokalisation</i>
A ₁	Adenosin	Gehirn, Skelettmuskel, Leber, Niere
A _{2A}	Adenosin	Milz, Thymus, Leukozyten, Gehirn
A _{2B}	Adenosin	Dickdarm, Blase, Lunge, Blutgefäße
A ₃	Adenosin	Hoden, Mastzellen, Gehirn, Pinealorgan

Tabelle 1: Adenosin (P1) -Rezeptoren (nach Fredholm et al., 2001)

1.2.2 P2X-Rezeptoren

Sieben verschiedene P2X-Untereinheiten sind bis heute bekannt. Die Untereinheiten zeichnen sich durch 2 Transmembrandomänen und eine große extrazelluläre Domäne aus, welche die ATP-Bindestelle enthält. Man unterscheidet zwischen schnell desensibilisierenden Untereinheiten (P2X₁, P2X₃) und langsam desensibilisierenden (P2X₂, P2X₅, P2X₆, P2X₇) Untereinheiten (Nörenbert et al., 2000, Illes et al., 2004). Vieles spricht für eine trimere oder hexamere Struktur der P2X-Rezeptoren. Es gibt Beschreibungen verschiedener Heteromultimere (P2X₂/P2X₃, P2X₄/P2X₆, P2X₁/P2X₅) sowie von Homomultimeren (Illes et al., 2004). Für die Untereinheiten P2X₂, P2X₄ und P2X₆ wurde eine neuronale Lokalisation nachgewiesen (Kanjhan et al., 1999, Rubio et al., 2001).

<i>Rezeptor</i>	<i>Ligand(en)</i>	<i>Lokalisation</i>
P2X ₁	2-MeSATP \geq ATP $\geq\alpha,\beta$ meATP	Vas deferens, Harnblase
P2X ₂	2-MeSATP \geq ATP	cerebraler Cortex, Hippocampus, Habenula, hypothalamische Kerne, ventrolaterale Medulla
P2X ₃	2-MeSATP \geq ATP $\geq\alpha,\beta$ meATP	Spinalganglien
P2X ₄	ATP $>$ 2-MeSATP $>\alpha,\beta$ meATP	Cerebellum, Rückenmark, Cerebraler Cortex, Hippocampus, Thalamus, Hirnstamm
P2X ₅	2-MeSATP \geq ATP $>$ ADP	Ganglion coeliacum
P2X ₆	2-MeSATP \geq ATP $>$ ADP	Gehirn, Cervicalganglien

Rezeptor	Ligand(en)	Lokalisation
P2X ₇	BzATP>ATP>UTP	Makrophagen, Lymphozyten, Gliazellen

Tabelle 2: P2X-Rezeptoren: Substrate und Lokalisation (nach Bhagwat et al., 1996, Burnstock 1997, Illes et al., 2004)

Abkürzungen synthetischer ATP-Derivate: 2-meSATP= 2-methyl-thio-ATP; α,β meATP= α,β -methylen-ATP; BzATP= 2' und 3'-O-(4-benzoylbenzoyl) ATP

1.2.3 P2Y-Rezeptoren

Insgesamt sind 10 verschiedene humane P2Y-Rezeptoren bekannt, von denen P2Y₁, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄ im ZNS exprimiert werden. In der molekularen Struktur entsprechen die P2Y-Rezeptoren dem typischen Aufbau G-Protein-gekoppelter Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen (Illes et al., 2004). Bei ihrer Aktivierung lösen die P2Y-Rezeptoren intrazelluläre Signalkaskaden über *second messenger* – Systeme aus. Dazu zählen der IP₃-Signalweg über die Phospholipase C ebenso wie verschiedene andere Signalkaskaden, inklusive der Aktivierung von Proteinkinase C, Phospholipase A₂ oder kalziumsensitiver Ionenkanäle, sowie der Weg über die Adenylzyklase. Der spezielle Verlauf der Signaltransduktion hängt vom Rezeptorsubtyp und Zelltyp ab. In neuronalen und nichtneuronalen Zellen werden in einigen Fällen Ionenkanäle direkt von der G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheit moduliert (Kügelgen et al., 2000).

Rezeptor	Ligand(en)	Lokalisation
P2Y ₁	2-MeSATP>ATP>ADP (kein UTP)	Gehirn (Mensch)
P2Y ₂	ATP=UTP>>2-MeSATP	Lunge (Ratte), CT/43-Zellen (Mensch)
P2Y ₂	ADP>UTP	Gehirn (Huhn)
P2Y ₄	UTP=UDP>ATP=ADP	Plazenta (Mensch), Gehirn (Ratte)
P2Y ₆	UDP>UTP>ADP>2-MeSATP>ATP	glatte Aortamuskulatur, Plazenta, Milz (Mensch)
P2Y ₈	ATP=UTP=ITP=CTP=GTP	Neuralplatte (Frosch)
P2Y ₁₁	ADP>ATP>>UDP>UTP	Gehirn (Mensch)
P2Y ₁₂	ADP>ATP>>UDP>UTP	Gehirn (Mensch)
P2Y ₁₃	ADP>ATP>>UDP>UTP	Milz, Gehirn (Mensch)
P2Y ₁₄	UDP-Glucose>>UTP,ATP, UDP,ADP	Gehirn (Mensch)

Tabelle 3: P2Y-Rezeptoren: Substrate und Lokalisation (nach Bhagwat et al., 1996; Burnstock, 1997; DUBYAK, 2003; Illes et al., 2004).

Abkürzungen synthetischer ATP-Derivate: 2-meSATP= 2-methyl-thio-ATP; α,β meATP= α,β -methylene-ATP; BzATP= 2' und 3'-O-(4-benzoylbenzoyl) ATP

1.3 Ektonukleotidasen

Für die Aktivierung und/oder Inaktivierung von Nukleotid-Signalen sind Enzyme notwendig, die den Signalstoff umsetzen können. Ektonukleotidasen hydrolysieren Nukleotide und Diadenosinpolyphosphate und können das Signal auf diese Weise beenden. Andererseits stellen Abbauprodukte von Nukleotiden, wie ADP oder Adenosin selbst extrazelluläre Signalstoffe dar. So wird z.B. ADP, welches von Thrombozyten bei der Blutgerinnung ausgeschüttet wird und die Thrombozytenaggregation fördert, durch Ektonukleotidasen an den Plasmamembranen der Thrombozyten und Gefäßepithelien zu Adenosin abgebaut (Markus et al., 2003; Markus et al., 2003b). Adenosin ist nicht nur ein Inhibitor der Thrombozytenaggregation sondern reagiert auch mit verschiedenen Zellen des Immunsystems und spielt eine Rolle bei der Immunreaktion im Falle von Verletzungen (Hasko et al., 2004).

Im ZNS hat extrazelluläres Adenosin unter anderem neuroprotektive Effekte (Wardas, 2002). Adenosin-Freisetzung erfolgt hauptsächlich über Adenosin-Transporter oder durch Nukleotid-Hydrolyse. In Hirnbereichen in denen eine Ischämie vorlag, ist eine gesteigerte Expression von ATP-Abbauenden Enzymen nachweisbar (Braun et al., 1997; Braun et al., 1998). Mittlerweile ist eine große Anzahl von nukleotidabbauenden Ekto-Enzymen bekannt.

1.3.1 Alkalische Phosphatase

Die alkalischen Phosphatasen sind Metalloproteine, die in vielen Geweben exprimiert werden. Das von den alkalischen Phosphatasen umgesetzte Substratspektrum ist sehr breit und umfasst die meisten Phosphomonoester sowie Pyrophosphat (PPi). Neben löslichen Isoformen gibt es membranständige Varianten, die über einen GPI-Anker in der Membran verankert sind. Vier Gene kodieren die vier Isoformen des Enzyms mit unterschiedlicher Gewebeverteilung (Übersicht bei Goding, 2000).

1.3.2 Ekto-5'-Nukleotidase

Die Ekto-5'-Nukleotidase ist das am besten untersuchte Enzym aus der Gruppe der Ektonukleotidasen. Über einen GPI-Anker ist die oberflächenständige 5'-Nukleotidase an die Membran gebunden. Durch die Phospholipase C kann das Enzym in eine lösliche Form überführt werden (Vogel et al., 1992). Das Enzym wird in fast allen Geweben exprimiert und hydrolysiert Nucleosidmonophosphate (NMP) (Zimmermann, 1992).

1.3.3 Ekto-Nukleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase

Familie (E-NPP-Familie)

Die Mitglieder NPP1 bis NPP3 der Ekto-Nukleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase-Familie hydrolysieren die Phosphodiester- und Pyrophosphatbindung von Nucleotiden und Nucleotidderivaten unter der Bildung von Nucleosidmonophosphaten. Bei den Mitgliedern der Familie handelt es sich um integrale Membranproteine mit gemeinsamen strukturellen Merkmalen. Dazu zählen eine Transmembrandomäne, eine SomatomedinB-ähnliche Domäne, eine Nuklease-ähnliche Domäne sowie ein RGD-Tripeptid bei NPP1 und NPP3. Der größte Teil der Aminosäuren liegt im extrazellulären Raum vor und beinhaltet das aktive Zentrum des Enzyms. Von NPP1-3 gibt es lösliche Formen, die wahrscheinlich durch proteolytische Spaltung der membranständigen Form entstehen. Zu den Substraten der Enzyme zählen cAMP, verschiedene Nucleosid-tri- und diphosphate, NAD⁺ und Diadenosinpolyphosphate (Übersicht bei Goding, 2000).

NPP1 spielt, unter anderem eine Rolle bei der Knochenkalzifikation. Ein Produkt der Nucleotidhydrolyse ist Pyrophosphat, welches ein Inhibitor der Kalzifikation ist. NPP1-defiziente Mäuse zeigen einen entsprechenden Phänotyp mit verstärkter Kalzifikation (Goding et al., 1998; Goding, 2000).

NPP2 wird unter anderem in Dünndarm, Gehirn, Lunge, Niere exprimiert (Goding, 2000). Für das Enzym ist eine Wirkung als Tumormotilitätsfaktor beschrieben, woraus sich eine mögliche Beteiligung an Invasivität und Metastasenbildung ergibt (Nam et al., 2000).

NPP3 wird im Pankreas, Dünndarm, Dickdarm und Leber sowie in Gliomazelllinien exprimiert (Andoh et al., 1999). In Dickdarm-Karzinomen wird NPP3 verstärkt exprimiert und es gibt Hinweise an seiner Beteiligung bei der Invasivität von Tumoren (Yano et al., 2003).

1.3.4 Ekto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase-Familie (E-NTPDasen)

Eine weitere Enzymfamilie von Ektonukleotidasen, deren Mitglieder häufig im Zusammenhang mit der Beendigung purinerger Signale diskutiert werden, sind die Ekto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphatasen (E-NTPDasen).

1.3.4.1 Membrantopologie der E-NTPDasen

In ihrer Membrantopologie und zellulären Lokalisation kann man 3 verschiedene Subtypen innerhalb der Familie unterscheiden. NTPDase1, NTPDase2, NTPDase3 und NTPDase8 sind auf der Plasmamembran lokalisiert und haben 2 Transmembrandomänen, kurze intrazelluläre Proteinketten und einen großen extrazellulären Teil (Wang et al., 1996; Kegel et al., 1997; Smith et al., 1998; Bigonnesse et al., 2004). Diese Mitglieder der E-NTPDase-Familie sind stark glykosilierte Ekto-Enzyme (Christoforidis et al., 1996; Smith et al., 1999c). NTPDase4 und NTPDase7 haben ebenfalls 2 Transmembrandomänen, sind jedoch intrazellulär im Golgi bzw. lysosomal lokalisiert (Wang et al., 1998a, Shi et al., 2001). NTPDase5 und NTPDase6 sind intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum (ER) bzw. Golgi-Apparat lokalisiert und besitzen nur eine Transmembrandomäne (Trombetta et al., 1999; Braun et al., 2000). Auch bei diesen Familienmitgliedern liegt der größte Teil des Proteins inklusive des aktiven Zentrums auf der nicht-zytosolischen Seite der Membran (Abbildung 1). Von den verschiedenen E-NTPDasen, insbesondere NTPDase5 (Mulero et al., 2000) und NTPDase6 (Braun et al., 2000), sind lösliche Formen beschrieben.

1.3.4.2 Charakteristika der E-NTPDase-Familie

Als gemeinsames Merkmal der Familie besitzen alle E-NTPDasen 5 sogenannte Apyrase-konservierte Regionen (ACR's) (Handa et al., 1996; Schulte am Esch et al., 1999). Dabei handelt es sich um konservierte Aminosäuremotive, die für die Substratbindung und Aktivität der Enzyme relevant sind. Als Substrat werden verschiedene

Nukleosidtriphosphate und Nukleosiddiphosphate umgesetzt (Übersicht bei Zimmermann, 1996; Zimmermann, 1999; Zimmermann, 2000).

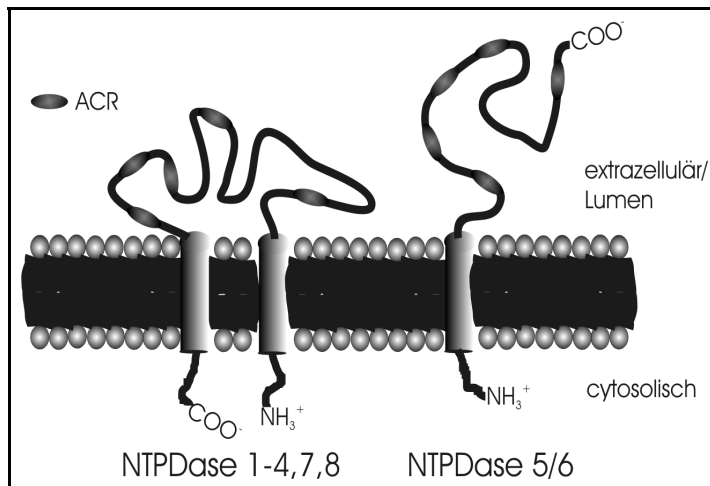


Abbildung 1: Membrantopologie der E-NTPDasen.

Das Schema zeigt die beiden Membrantopologien, die in der E-NTPDase-Familie vorzufinden sind. Die bekannten Orthologen der NTPDase 1, 2, 3, 8 (extrazellulär) sowie NTPDase 4 und 7 (intrazellulär) besitzen 2 Transmembrandomänen. Die NTPDasen 5 und 6 (intrazellulär) sind mit einer Transmembrandomäne ausgestattet. Allen Enzymen der Familie sind die 5 ACR's gemeinsam.

1.3.4.3 NTPDase1 (Ekto-ATPDase, Apyrase)

NTPDase1, ein ursprünglich aus immortalisierten B-Zellen klonierter Oberflächenmarker (CD39) für Lymphozyten, erwies sich als Magnesium- und Kalzium-abhängige Ekto-Apyrase (Maliszewski et al., 1994; Wang et al., 1996). Das Enzym hydrolysiert Nukleosid-tri- und diphosphate nahezu gleich gut, nicht jedoch Nukleosidmonophosphate (Kaczmarek et al., 1996; Kukulski et al., 2003; Zimmermann, 2000). Eine Beteiligung der NTPDasen 1 und 2 ist unter anderem für die Thrombozytenaggregation und die Immunreaktionen beschrieben (Markus et al., 1997; Enjyoji et al., 2000; Robson et al., 2001; Mizumoto et al., 2002). Im Gehirn konnte NTPDase1 auf Endothelzellen und auf Zellen der glatten Muskulatur von Gefäßen sowie auf Mikrogliazellen nachgewiesen werden (Braun et al., 2000b).

1.3.4.4 NTPDase2 (Ekto-ATPase)

Die NTPDase2 oder Ekto-ATPase hydrolysiert Nukleosidtriphosphate deutlich besser als Nukleosiddiphosphate. Nukleosidmonophosphate werden nicht umgesetzt. Die Nukleosidtriphosphatase-Aktivität (NTPase) ist 20 bis 30 mal höher als die Nukleosiddiphosphatase-Aktivität (NDPase) (Kegel et al., 1997; Knowles et al., 2003; Kukulski et al., 2003). Es gibt Hinweise für eine Beteiligung der NTPDase2 an auditorischen Prozessen (Vlajkovic et al., 2002). Im peripherem Nervensystem ist die NTPDase2 auf nicht-myelinisierten Schwann-Zellen lokalisiert (Braun et al., 2004). Innerhalb des ZNS

findet man sie in Hirnbereichen, in denen adulte Neurogenese stattfindet (Braun et al., 2003).

<i>NTPDase</i> (Lokalisation)	<i>alternativ verwendete Namen</i>	<i>Substrat</i>	<i>Orthologe</i> (GenBank-Acc-No.)
NTPDase1 (Plasma- membran)	CD39 Ekto-Apyrase Ekto-ATP-Diphosphohydrolase	ATP~ADP (1:1) kein AMP ^{26,27}	Mensch S73813 ¹ Ratte U81295 ² Maus AF037366 ¹ Schwein AJ133746 ³ Rind AF005940 ⁴
NTPDase2 (Plasma- membran)	CD39L1 Ekto-ATPase	ATP>>ADP (31:1) ⁶ kein AMP ²⁷	Mensch U91510 ⁵ ; Ratte Y11835 ⁶ Maus AF042811 ⁷ Huhn U74467 ⁸
NTPDase3 (Plasma- membran)	CD39L3 HB6	ATP>ADP (3:1) kein AMP ^{9,12}	Mensch AF034840 ⁹ , AF039917 ¹⁰ ; Ratte AJ437217 ¹¹ ; Maus AY376710 ¹² ; Huhn AF041355 ¹³
NTPDase4 (Golgi- Apparat)	CD39L5 UDPase	UDP>UTP kein UMP ¹⁴	Mensch AF016032 ¹⁴ Maus AK004761 ¹⁵
NTPDase5 (ER)	CD39L4 ER-UDPase	UDP>>UTP (34:1) ²⁵ kein UMP ¹⁷	Mensch AF039918 ¹⁶ ; Maus AJ238636 ¹⁷ ; Ratte BC062044 ¹⁸
NTPDase6 (Golgi- Apparat)	CD39L2	GDP>GTP (10:1) kein GMP ¹⁹	Mensch AF039916 ¹⁰ Ratte AJ277748 ¹⁹ Maus NM_172117 ¹⁸
NTPDase7 (lysosomal)	LALP1	UTP/GTP/CTP>UDP/G DP/CDP ²¹	Mensch AK055540 ²⁰ Maus AF288221 ²¹
NTPDase8 (Plasma- membran)		ATP>ADP kein AMP ²³	Mensch AY359088 ²² Maus AY364442 ²³ Ratte AY430414 ²⁴

Tabelle 4: E-NTPDasen: Namen, Substrate, Orthologe

Die Tabelle enthält eine Auflistung der gängigen Bezeichnungen, der präferierten Substrate und der bekannten Orthologe in verschiedenen Organismen.

¹Maliszewski et al., 1994; ²Wang et al., 1996; ³Lemmens et al., 2000; ⁴Chang et al., 1997 (unpubliziert, Veröffentlichungsdatum der Nukleotid-Sequenz); ⁵Chadwick et al., 1997; ⁶Kegel et al., 1997; ⁷Gao et al., 1998; ⁸Kirley, 1997; ⁹Smith et al., 1998; ¹⁰Chadwick et al., 1998; ¹¹Vorhoff et al., 2002 (Veröffentlichungsdatum der Nukleotid-Sequenz); ¹²Lavoie et al., 2004; ¹³Nagy et al., 1998; ¹⁴Wang et al., 1998; ¹⁵Carninci et al., 2000; ¹⁶Chadwick et al., 1998; ¹⁷Trombetta et al., 1999; ¹⁸Strausberg et al., 2002; ¹⁹Braun et al., 2000; ²⁰Ota et al., 2004; ²¹Shi et al., 2001; ²²Clark et al., 2003; ²³Bigonnesse et al., 2004; ²⁴unpublizierte Sequenz von Dr. Jean Sévigny zur Verfügung gestellt, ²⁵Mulero et al., 1999; ²⁶Kaczmarek et al., 1996; ²⁷Kukulski et al., 2003

1.3.4.5 NTPDase3

Die humane NTPDase3 wurde unabhängig voneinander von Chadwick und Frischauf (1998), sowie von Smith und Kirley (1998) kloniert. Das Enzym hydrolysiert primär kalziumabhängig Nukleosidtri- und diphosphate, mit einer Präferenz für Nukleosidtriphosphate (NTPase:NDPase~3:1) (Smith et al., 1998). Die Proteinsequenz mit einer Länge von 529 Aa beinhaltet alle charakteristischen Merkmale der E-NTPDase-Familie. Dazu zählen die Membrantopologie mit 2 Transmembrandomänen, einem großen extrazellulären Teil und kurzen zytosolischen Termini, sowie die 5 ACR's (Smith et al., 1998; Handa et al., 1996; Schulte am Esch II, 1999).

Neben verschiedenen Phosphorylierungsstellen sind sieben potentielle N-Glykosilierungs-Motive in der Proteinsequenz zu finden. Die Quartärstruktur der NTPDase3 ist wahrscheinlich ein Doppel-Dimer (Murphy et al.; 2002). Die N-Glykosilierung hat einen direkten Einfluß auf die enzymatische Aktivität und die Quartärstruktur. In deglykosylierter Form weist die NTPDase3 eine deutlich reduzierte enzymatische Aktivität auf und bildet keine Dimere. (Smith et al., 1999c). Einige Befunde lassen vermuten, dass der Oligomerisationsstatus Einfluß auf die Aktivität der E-NTPDasen hat (Wang et al., 1998c; Caldwell et al., 2001; Failer et al., 2003). Mutationen der konservierten N-Glykosilierungsstelle Asparagin 81 bewirken, vermutlich durch die Destabilisierung der Tertiärstruktur, eine Abnahme der katalytischen Aktivität ohne die Dimerbildung zu beeinflussen (Murphy et al., 2003b).

Für die humane NTPDase3 (HB6) gibt es eine Reihe von Mutationsstudien, welche die Relevanz der Apyrase-konservierten Regionen für Enzymaktivität, Membranständigkeit und Oligomerisationsstatus verdeutlicht (Smith et al., 1999a; Yang et al., 2001; Hicks-Berger et al., 2001). In der ACR I und IV findet sich das β -Phosphat1-Bindemotiv sowie ein konserviertes DXG-Motiv. Diese Motive lassen auf eine Verwandtschaft mit der Actin/Hitzeschock-Protein70/Zuckerkinasen-Superfamilie schließen. Proteine dieser Familie besitzen eine Bindestelle für Nukleotide. Das ATP bindet in einer, von zwei Domänen geformten Spalte, welche in der Tertiärstruktur durch die konservierten Regionen gebildet werden (Bork et al., 1992; Hurley, 1996; Smith et al., 1999b).

Die mRNA der humanen NTPDase3 lässt sich in verschiedenen Geweben, unter anderem in Gehirn, Pankreas, Milz und Prostata nachweisen (Chadwick et al., 1998). Zellulär ist sie in der Plasmamembran lokalisiert (Smith et al., 1999a; Lavoie et al., 2004).

1.3.4.6 Die intrazellulären NTPDasen

Die NTPDasen4, 7, 5 und 6 sind die intrazellulären Vertreter der Familie. NTPDase4 ist eine Golgi-ständige UDPase mit 2 Transmembrandomänen. Das Enzym ist primär Kalziumabhängig und in seiner Proteinsequenz sind die ACRs 1 bis 5 zu finden (Wang et al., 1998a).

Die NTPDase5 ist eine sowohl intrazellulär vorliegende als auch sekretierte Nukleosiddiphosphatase mit einer Transmembrandomäne. Intrazellulär ist das Enzym im ER zu finden (Mulero et al., 1999; Trombetta et al., 1999). Das Protein ist von zweiwertigen Ionen abhängig (Mulero et al., 1999), wird unter anderem in Leber, Niere, Prostata und Hoden exprimiert (Chadwick et al., 1998) und stellt ein potentielles Proto-Onkogen dar (Páez et al., 2001). Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der Familie scheint das monomere Protein die höchste Aktivität aufzuweisen (Mulero et al., 2000).

Die NTPDase6 ist der zweite Vertreter der Familie mit nur einer Transmembrandomäne. Das Protein hat eine breite Gewebe-Verteilung und ist intrazellulär im Golgi-Apparat lokalisiert. Nukleosiddiphosphate, vor allem GDP, werden von dem Enzym bevorzugt umgesetzt (Chadwick et al., 1998; Braun et al., 2000). Auch für dieses Protein wird eine Abgabe in das Medium beschrieben. (Yeung et al., 2000; Ivanenkov et al., 2003).

Die Bedeutung dieser E-NTPDasen für die Beendigung extrazellulärer, purinerner Signale ist aufgrund ihrer vornehmlich intrazellulären Lokalisation eher gering einzuschätzen.

2 Fragestellung

Nukleoside und Nukleotide sind Mediatoren interzellulärer Kommunikation. Purinerge Signale und Purin-Rezeptoren sind in vielen nicht-neuronalen wie neuronalen Systemen zu finden. Im peripheren und zentralen Nervensystem wirken sie als Neurotransmitter und Neuromodulatoren über ionotrope P2X- oder metabotrope P2Y-Rezeptoren. Für die Inaktivierung purinerner Signale sind Nukleotid-hydrolysierende Ekto-Enzyme verantwortlich. Insbesondere eine Enzymfamilie, die Ekto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase-Familie (E-NTPDasen), werden in diesem Zusammenhang häufig diskutiert. Die bisher bekannten Mitglieder dieser Familie hydrolysieren ein breites Spektrum an Nukleosidtri- und -diphosphaten. In ihren biochemischen Eigenschaften, wie dem ATPase:ADPase-Verhältnis, der Produktbildung und der Substratspezifität unterscheiden sich die einzelnen Mitglieder der Enzymfamilie. Insbesondere die Plasmamembranständigen Vertreter, die NTPDasen1, 2, 3 und 8 stehen im Fokus des Interesses, wenn es um die Regulation purinerner Signale geht. Die NTPDasen1 und 2 wurden hauptsächlich auf Epithelzellen, glatten Muskelzellen und Gliazellen nachgewiesen. Eine Reihe von Arbeiten berichtet über die Beteiligung dieser Enzyme an verschiedenen physiologischen Prozessen, unter anderem Blutplättchen-aggregation und Ischämie. Über die Lokalisation und funktionelle Bedeutung der NTPDase3 und der vor kurzem klonierten NTPDase8 ist nur wenig bekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die NTPDase3 der Ratte zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollte die bisher unbekannt mRNA des Ratten-Orthologes isoliert und charakterisiert werden. Neben einer vergleichenden Analyse der Proteinsequenz mit anderen bekannten E-NTPDasen, war es das Ziel dieser Arbeit die biochemischen Eigenschaften an heterolog exprimiertem Enzym zu prüfen. Weiterhin sollte, nach Herstellung geeigneter Antikörper, die zelluläre Lokalisation und Gewebeverteilung untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

ElectroCell Manipulator ECM6000	BTX Instrument Division (Holliston MA, USA)
Pipetten	Gilson Inc (Middleton USA)
	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Primus Thermocycler	MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland)
SemiDry Blotter „Pegasus“	Phase (Lübeck, Deutschland)
T-Gradient Thermocycler	Phase (Lübeck, Deutschland)
Waagen	Sartorius AG (Goettingen, Deutschland)
X-OMATIC SuperRapid Screens	Eastman Kodak (Stuttgart, Deutschland)
Biometra Minigel-Twin	Biometra GmbH (Goettingen, Deutschland)
HPLC	JASCO Labor-und Datentechnik GmbH (Gross-Umstadt, Deutschland)
Zeiss Axiophot Fluoreszenzmikroskops	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)

3.1.2 Chemikalien

Standardchemikalien und Lösungsmittel wurden von Merk (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland) und Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

TritonX100	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Nukleotide	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Roti-Phenol®	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)
PonceauS	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Trizol®	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
TEMED	Merk (Darmstadt, Deutschland)

Oligo(dT)-Cellulose	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
DAPI	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
DABCO	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
ConA-Sepharose 4B	Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg, Deutschland)
Brilliant blue G250	Serva (Heidelberg, Deutschland)

3.1.3 Radioaktive Substanzen

Desoxycytidin 5' [$\alpha^{32}\text{P}$] – triphosphat	Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg, Deutschland)
--	---

3.1.4 Proteinase-Inhibitoren

Antipain	Calbiochem (Schwalbach, Deutschland)
Aprotinin	Calbiochem (Schwalbach, Deutschland)
Benzamidin	Calbiochem (Schwalbach, Deutschland)
Cymostatin	Calbiochem (Schwalbach, Deutschland)
Leupeptin	Calbiochem (Schwalbach, Deutschland)
Pefabloc SC	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pepstatin	Calbiochem (Schwalbach, Deutschland)
PMSF	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

100xPIA: 100 mM PMSF in Ethanol

1000xPIB: 2 mg/ml Antipain; 2 mg/ml Aprotinin; 2 mg/ml Leupeptin; 10 mM HEPES
pH 7,4

1000xPIC: 2 mg/ml Chymostatin; 1 mg/ml Pepstatin in DMSO

1000xPID: 150 mg/ml Benzamidin; 10 mM HEPES pH 7,4

3.1.5 Enzyme

Enzyme wurden, soweit nicht anders angegeben, von MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) oder Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

ProteinaseK	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
SADWAY Pwo DNA Polymerase	PeqLab (Erlangen, Deutschland)

3.1.6 Größenstandards

Benchmark Prestained Protein Ladder	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
BOA Best Of All – Protein Marker	Biomol (Hamburg, Deutschland)
GenRuler™ DNA-Ladder-Mix	MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Standardblau	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

3.1.7 Medien und Zellkulturzubehör

DMEM	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Fötales Rinderserum (FCS)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Ham´s F12	PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Pferdeserum	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Steril-Filter	Millipore GmbH(Schwalbach, Deutschland)
Barrycidal	Manfred Sauer GmbH (Lobbach, Deutschland)
DMSO für Zellkultur	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

CHO-Medium: 10 % (v/v) FCS; 1 % (v/v) Penicilin/Streptomycin-Lösung
in Ham´s F12

PC12-Medium: DMEM mit GlutamaxI, 4500mg/l D-Glucose; 10 % Pferde-Serum;
5 % (v/v) FCS; 1 % (v/v) Penicilin/Streptomycin-Lösung

COS7-Medium: DMEM mit GlutamaxI, 4500mg/l D-Glucose; 10 % (v/v) hitze-
inaktiviertes FCS; 1 % (v/v) Penicilin/Streptomycin-Lösung

Luria Bertani (LB)–Medium: 1 % (w/v) Casein; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v)
NaCl; pH 7,5

LB-Agar: LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar

LB-Top-Agar: 0,75 % (w/v) Agar in LB

SOB-Medium: 2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 18 mM NaCl; 2,5 mM
KCl; pH 7,0

SOC-Medium: 20 g Bakteriotrypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 18 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 20 mM Glucose; pH 7

XL1-Blue-Medium: 0,2 % (w/v) Maltose; 10 mM MgSO₄ in LB-Medium

NZY-Medium: 0,5 % (w/v) NaCl; 0,2 % (w/v) MgSO₄·7 H₂O; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) Casein-Hydrolysat; pH 7,5

NZY-Agar: 0,015 % (w/v) Agar in NZY-Medium

NZY-Top-Agar: 0,7 % (w/v) Agarose in NZY-Medium

3.1.8 Verwendete Organismen

<i>E. coli</i> , DH5α	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
<i>E. coli</i> , XL10 Gold	StrataGene (Cedar Creek TX, USA)
<i>E. coli</i> , XL1-Blue MRF'	StrataGene (Cedar Creek TX, USA)
<i>E. coli</i> , SOLR™	StrataGene (Cedar Creek TX, USA)
<i>Cricetulus griseus</i> , CHO-K1-Zelllinie	American Type Culture Collection (Manassas VA, USA)
<i>Rattus norvegicus</i> , PC12-Zelllinie	American Type Culture Collection (Manassas VA, USA)
<i>Cercopithecus aethiops</i> , COS7-Zelllinie	American Type Culture Collection (Manassas VA, USA)
<i>Rattus norvegicus</i> , Wistar-Ratte	Charles River Lab. (Sulzfeld, Deutschland)

3.1.9 Kits und Verbrauchsmaterial

Biomax MR Röntgenfilm	Eastman Kodak (Stuttgart, Deutschland)
Chill-out 14 Liquid PCR Wax	MJ Research Inc. (Watertown MA, USA)
ClonCapture™ cDNA Selection	ClonTech (Palo Alto CA, USA)
ECL/ECL ⁺ -Lösung	Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg, Deutschland)
Elektroporationsküvetten (1mm)	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
Elektroporationsküvetten (4mm)	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
Hyperfilm ECL	Eastman Kodak (Stuttgart, Deutschland)
Nucleobond AX 500	Machery-Nagel (Düren, Deutschland)

NucleoSpin	Machery-Nagel (Düren, Deutschland)
NucleoTrap	Machery-Nagel (Düren, Deutschland)
Protran BA85	Schleicher&Schuell (Dassel, Deutschland)
Advantage PCR-Mix	ClonTech (Palo Alto CA , USA)
Protran Nitrocellulosefilter	Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland)
Roentgen liquid	Tetenetal (Leicester , UK)
Roentgen Superfix	Tetenetal (Leicester , UK)
Kodak Scientific Imaging Film	Eastman Kodak (Stuttgart, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland) Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH (Wesseling-Berzdorf , Deutschland)
Zellschaber	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
CentriPrep® Centrifugal Concentrators 30.000 MWCO	Amicon (Hamburg, Deutschland)
Papierfilter	Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland)
Oligo(dT)-Zellulose	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
RNase-Inhibitor	MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

3.1.10 Vektoren und cDNA-Banken

pBSK(-)	StrataGene (Cedar Creek TX, USA)
pcDNA3	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
SuperScript™ Rat Brain cDNA Library	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Uni-ZAP XR-Library	StrataGene (Cedar Creek TX, USA)

3.1.11 PCR und Sequenzierprimer

Die Primer wurden hergestellt von der BioSpring GmbH (Frankfurt, Deutschland).

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Schnittstelle</i>
RatL3_ce5 ^{'1)}	cgg <u>gga tcc</u> ttg ctg tgc gtg gca tt ctt	<i>Bam</i> HI
RatL3_ce3 ^{'1)}	act gat tcc tgc cag agc acc <u>tct aga gc</u>	<i>Xba</i> I
HuForL3.1	gag aag aac ctg tgg cac atg tgg	
HuRevL3.1	cgg gca tac ttc tca tca aat ctg g	

Bezeichnung	Sequenz	Schnittstelle
RatRevL3	ggt caa agg cat tct cag agc gc	
HuForL3.2	agt atg ccc ggt cct ctg gtt ctc a	
CD39L3 MoRev	tgc cac agg ttc ttc tcc agg	
CD39L3-BT1 ²⁾	atg ttc acg gtg ctg acc	
CD39L3-BT2 ²⁾	cgg cat caa gta caa ttc	
CD39L3 PräORF5'	cgg ctc cgc aca gct	
CD39L3 ORF5'	gat gtt cac tgt gct gac ccg cca	
Seq_PrimerL3_f1	cca aag cat ctc cac gaa tcc	
Seq_PrimerL3_f2	aac cca cca gag tga cac	
Seq_PrimerL3_f3	tag gca att att cga cca	
Seq_PrimerL3_f4	cac gga gta gac acc aca	
Seq_PrimerL3_r1	ttc gtg tgc ggc tgt acc aat a	
Seq_PrimerL3_r2	tca gtg gct gag agg cac gt	
Seq_PrimerL3_r3	act gtg tcg ctg gcg ttc gg	
Seq_PrimerL3_r4	aga tag aaa aga aat gcc	
Seq_PrimerL3_r5	ttt cac cct aac ctt tcc	
Seq_PrimerL3_r6	gat tta caa gag gga aca g	
Seq_PrimerL3_r7	caa agg aac tac agg tca aac c	
T7pcDNA3	taa tac gac tca cta tag gg	
SP6	agc tat tta ggt gac act ata g	
BGHrev	tag aag gca cag tcg agg	
rat rev01	gtt cgg ctc cat ctt ctc	
rat rev02	gga tat ctg ggt gga ggc gcc	
rat rev03	ggc tcc tgt ggt gtc gac	
L3Sonde1 for	ccg tcc ctg ctc cca aga ttt	
L3Sonde1 rev	cag gca cag caa ggc gat agc	
L3Sonde2 for	caa ccc ctg cta ccc tca cg	
L3Sonde2 rev	tag aat cct gca aat gcc aca aat	
gt10B221	agc aag ttc agc ctg gtt aag t	
PolyG+Adapter	tag aag gca cag tcg agg ggg ggg ggg gg	
T3(pBSK-)	aat taa ccc tca cta aag gg	

Tabelle 5: Liste der verwendeten Primer

Liste der PCR-, und Sequenzierprimer mit Bezeichnung, Sequenz und eingebauten Schnittstellen (in der Sequenz unterstrichen).¹⁾ Übernommen von Christian Ebeling; ²⁾ Übernommen von Bernd Uwe Failer

3.1.12 Häufig verwendete Lösungen

PBS: 137 mM NaCl; 3 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 18 mM KH₂PO₄; pH 7,35

TE: 10 mM Tris/Cl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8

TBE: 90 mM Tris/Borat; 2 mM EDTA; pH 8,3

3.2 Software und Web-Ressourcen für *in silico* – Analysen

3.2.1 Software

Borwin HPLC-Software	JASCO Labor-und Datentechnik GmbH (Gross-Umstadt, Deutschland)
BoxShade 3.2	Kay Hofmann und Michael D. Baron
CloneManager5	Scientific & Educational Software (Cary NC, USA)
ClustalX 1.81	Thompson et al., 1997
MCID 4 imaging analysis system	Imaging Research (St. Catherines, Canada).
Microcal™ Origin 6	OriginLab Corporation (Northampton MA, USA)
Oligo	Molecular Biology Insights, Inc. (Cascade CO, USA)
Omiga™	Accelrys GmbH (München, Deutschland)
TreeView 1.6.6	Page, 1996

3.2.2 Online - Anwendungen

PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/	Altschul et al., 1990
SignalP 3.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	Bendtsen et al., 2004
NetPhos 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/	Blom et al., 1999
PSORT	http://psort.nibb.ac.jp/	Nakai et al., 1992
TMHMM 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/	Krogh et al., 2001
NetNGlyc 1.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/	Gupta et al., 2004

NetOGlyc 3.1	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/	Julenius et al., 2004
ELM	http://elm.eu.org/	Punternvoll et al., 2003
NNSPLICE 0.9	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html	Reese et al., 1997
SSpro	http://www.igb.uci.edu/tools/scratch/	Pollastri et. al., 2002
ACCpro	http://www.igb.uci.edu/tools/scratch/	Baldi et al., 2003
Conpro	http://www.igb.uci.edu/tools/scratch/	Baldi et al., 2003
PROSITE	http://au.expasy.org/prosite/	Hulo et al., 2004
ensemble	http://www.ensembl.org/	

3.3 Methoden

3.3.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.3.1.1 DNA-Präparation im analytischen Maßstab nach Birnboim und Doly

Lösung 1: 50 mM Glukose; 25 mM; Tris/Cl pH 8,0; 10 mM; EDTA pH 8,0

Lösung 2: 0,2 M NaOH; 1 % (w/v); SDS

Lösung 3: 3 M Kaliumacetat, 11,5 % (v/v) Eisessig

Plasmid-DNA im analytischen Maßstab wurde nach Birnboim und Doly (1979) präpariert. Hierfür wurden zunächst 1-3 ml einer Flüssigkultur zentrifugiert (2.500 g_{av} , 4 °C, 30 Sek), um die Bakterien auf den Gefäßboden zu sedimentieren. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde gründlich in eiskalter Lösung 1 resuspendiert. Durch Zugabe von 200 μ l Lösung 2 (Lysis-Puffer) wurden die Zellen mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen. Die Suspension wurde fünfmal invertiert. Nach Zugabe von 150 μ l Lösung 3 wurde die Suspension gemischt und für 3 – 5 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde durch eine Zentrifugation (5 Min, 4 °C, $\geq 12.000 g_{av}$) pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde der Überstand mit einem Volumen Roti-Phenol® ausgeschüttelt. Nach Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um Phenolreste aus der Lösung zu entfernen, wurde dreimal mit einem Volumen Tertiärbutyl-methylether ausgeschüttelt. Die Ether-Phase wurde abgezogen und verworfen.

Nach dem letzten Ausschütteln wurde die wässrige Phase für 15 min in den Abzug gestellt, damit sich die Etherreste verflüchtigten. Durch Zugabe von 2 – 3 Volumen Ethanol (EtOH) absolut zur wässrigen Phase oder 0,7 – 1 Volumen Isopropanol wurden anschließend die Nukleinsäuren in der Lösung gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (15 min 4 °C $\geq 12.000 g_{av}$) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend wurde das Pellet für 5 – 10 min an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in einem geeigneten Volumen (20 – 50 μ l) TE oder H_2O_{bidest} aufgenommen.

3.3.1.2 DNA-Präparation im präparativen Ansatz mittels Nucleobond®

Nucleobond® stellt ein kommerziell erhältliches System zur Plasmid–DNA–Isolierung dar. Das Verfahren basiert auf der Bindung von Nukleinsäure an Silikaoberflächen. Die Bindung der DNA an solche Oberflächen ist abhängig von Konzentrationen an chaotrophen Salzen. Mit alkoholhaltigen Puffern, in denen DNA unlöslich ist, wird die DNA gewaschen und anschließend mit Wasser oder einem Niedrigsalzpuffer eluiert. Die Arbeitsschritte wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden üblicherweise 400 ml Bakterienkultur verwendet und Ausbeuten von 0,5 mg bis 1 mg DNA erzielt.

3.3.1.3 Gelextraktion mittels Nucleotrap®

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mittels Nucleotrap®, das auf der bereits erläuterten Bindung von von DNA an eine Silika-Matrix beruht. Für die Extraktion der DNA wurde die DNA–Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, das Gelstückchen gewogen und nach Herstellerangaben mit einem entsprechendem Volumen Puffer versetzt. Nach dem Lösen der Agarose wurde die DNA an die zugefügte Nucleotrap®-Matrix gebunden. Durch mehrere Waschschrte wurden Agarose und Salze von der DNA getrennt, welche abschließend mit TE oder H_2O_{MilliQ} von der Nucleotrap®-Matrix eluiert wurden.

3.3.1.4 DNA-Reinigung mittels NucleoSpin®

DNA aus einer Minipräparation oder einem PCR-Produkt wurde mit Hilfe des NucleoSpin®-Kits isoliert. Die Bindung erfolgt nach dem Prinzip des NucleoTrap®/NucleoBond®-Mechanismus, allerdings liegt im Falle NucleoSpin®-Kits die Silika-Matrix in Form einer Mikro-Säule vor. Die DNA-Isolierung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellerprotokolls.

3.3.1.5 Konzentrierung von Nukleinsäuren durch Fällung

Nukleinsäuren (DNA, RNA) bilden in Anwesenheit von monovalenten Kationen in Alkoholen einen unlöslichen Niederschlag. Die auf diese Weise präzipitierte Nukleinsäure kann durch Zentrifugation sedimentiert werden.

Zur Fällung wurde Natriumacetat in einer Endkonzentration von 0,3 M oder Ammoniumacetat in einer Endkonzentration von 2,0 – 2,5 M eingesetzt. Anschließend wurden 2 - 3 Volumen Ethanol zugegeben und die Lösung wurde gemischt. Die Nukleinsäuren wurden für 2-3 h bei -20 °C oder für 30 min bei -70 °C gefällt. Eine 15minütige Zentrifugation ($\geq 15.000 g_{av}$, 4 °C) sedimentierte das Präzipitat. Anschließend wurde der Bodensatz zur Entfernung der Salze mit einem geeigneten Volumen 70 %(v/v) Ethanol gewaschen. Im Falle von RNA wurde 75 %(v/v) Ethanol zum Waschen verwendet. Zum Abschluß wurde das Pellet für 5 – 15 min an der Luft getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder H_2O_{bidest} aufgenommen.

Alternativ zur ethanolschen Fällung wurden Nukleinsäuren für 30 min bei Raumtemperatur mit 0,7 – 1,0 Volumen Isopropanol gefällt, wenn das Volumen des Fällungsansatzes klein gehalten werden sollte.

3.3.1.6 Allgemeine Maßnahmen zum Arbeiten mit RNA

Ribonukleasen sind äußerst widerstandsfähige, von zweiwertigen Ionen unabhängige, RNA-abbauende Enzyme. Zum Schutz der RNA wurden alle Geräte für 3 h bei 190 °C erhitzt oder mit 0,1 M NaOH behandelt und anschließend mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser abgespült. Bei allen Chemikalien und Lösungen wurde auf RNase-Freiheit bzw. saubere Arbeitsweise geachtet, um Kontaminationen mit Ribonukleasen zu vermeiden. Wenn es die chemische Zusammensetzung zuließ wurden die Lösungen mit DEPC 1:1000 (v/v) versetzt, über Nacht gerührt und autoklaviert.

3.3.1.7 RNA-Isolierung mit Trizol®

Das Trizol®-Reagenz dient der RNA-Isolierung aus Geweben, basierend auf der Methode von Chomczynski und Sacchi (1986). Das Gewebe wurde in einem Einweggefäß eingewogen und auf 50 – 100 mg Material wurde 1 ml Trizol® zugegeben. Das Gewebe wurde im Ultrathurax™ homogenisiert wurde und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 0,2 ml Chloroform pro 1 ml Trizol® zugegeben, gründlich gemischt und nach 2 – 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension 10 min lang zentrifugiert (12.000 g_{av} und 4 °C) . Dadurch wurden Zellmembranen, Polysaccharide und hochmolekulare DNA abgetrennt. Die RNA-haltige, wässrigen Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml Trizol® wurde die RNA für 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Eine anschließende 10minütige Zentrifugation (2-8 °C, 12.000 g_{av}) pelletierte die präzipitierte DNA. Der Überstand wurde entfernt und der Bodensatz einmal, mit 1 ml 75 % (v/v) Ethanol pro 1 ml Trizol®, gewaschen. Das RNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet und für 10 min bei 55-60 °C in DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

3.3.1.8 mRNA-Isolierung

Poly(A)-Bindepuffer: 10 mM Tris/Cl pH 7,5; 0,5 M NaCl

Elutionspuffer: 10 mM Tris/Cl pH 7,5

Basierend auf der Bindung des Poly(A)-Schwanzes von mRNA an eine Oligo(dT)-Matrix, kann diese aus einem RNA-Gemisch isoliert werden (Edmunds et al., 1969; Aviv et al., 1972).

Zur mRNA-Isolierung wurde zunächst Oligo(dT)-Zellulose bei Raumtemperatur für 1 h in 20 μ l/mg Poly(A)-Bindepuffer hydratisiert. Insgesamt wurde 1 mg Oligo(dT)-Zellulose pro 100 μ g Total-RNA verwendet. In Bindepuffer gelöste Gesamt-RNA wurde für 5 min bei 70 °C denaturiert, für 5 min auf Eis gestellt und anschließend zu der Oligo(dT)-Zellulose gegeben. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur und regelmäßiger Mischung, wurde die Oligo(dT)-Zellulose pelletiert (30 sek., 3000 rpm Tischzentrifuge). Der Überstandes wurde verworfen, die Oligo(dT)-Zellulose in

Bindepuffer aufgenommen und für 30 sek. bei Raumtemperatur suspendiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 5 x wiederholt. Abschließend wurde die mRNA 5 min mit 400 µl Elutionspuffer von der Oligo(dT)-Zellulose eluiert, der Ansatz zentrifugiert (30 sek., 3000 rpm Tischzentrifuge) und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die mRNA im Eluat wurde durch eine Isopropanol-Fällung präzipitiert und an der Luft getrocknet. Das mRNA-Pellet wurde in einem geeigneten Volumen DEPC-behandeltem Wassers aufgenommen.

3.3.1.9 cDNA-Synthese

Bei der verwendeten SuperScript II (200 U/µl, Invitrogen) handelte es sich um eine modifizierte M-MLV-Reverse Transkriptase (**M**oloney **m**urine **l**eukemia **v**irus RT) mit reduzierter RibonukleaseH-Aktivität und verbesserter Thermostabilität. Laut Herstellerangaben können mit dem Enzym cDNAs bis zu einer Länge von 12,3 kb erstellt werden.

Pro Reaktionsansatz wurden 500 ng mRNA als Vorlage verwendet. In Rahmen dieser Arbeit wurden genspezifische, Zufalls-Hexamer und Oligo(dT)-Primer zur cDNA-Herstellung benutzt. Genspezifische Primer binden innerhalb bekannter Sequenzen in der mRNA und produzieren die selektivsten Ergebnisse. Zufalls-Hexamer-Primer und Oligo(dT)-Primer sind in der Lage an alle RNA-Stränge bzw. alle RNAs mit Poly(A)-Schwanz zu binden und ein breites Kontingent an cDNAs zu erzeugen. Die Reaktion wurde im 20 µl-Ansatz durchgeführt. Als Template wurden 300 ng bis 500 ng mRNA eingesetzt. Zu der mRNA wurden 50-250 ng Zufalls-Hexamer-Primer, 500 ng Oligo(dT)-Primer oder 2 pmol genspezifischer Primer gegeben und der Reaktionsansatz wurde auf 12 µl aufgefüllt. Die Nukleinsäure-Lösung wurde für 5 min bei 65 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Danach wurden 4 µl First Strand Buffer (5x), 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl RNase Inhibitor (20-40 U/µl) gemischt und der Reaktionsansatz für 2 min bei 42 °C inkubiert. Das Enzym (1 µl SuperScript RT) wurde der Lösung zugeführt und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gemischt. Wenn Zufalls-Hexamer-Primer verwendet wurden, wurde eine 10 minütige Präinkubation bei 25 °C vor der cDNA-Synthese durchgeführt. Für die cDNA-Synthese wurde der Reaktionsansatz für 50 min bei 42 °C inkubiert. Die SuperScript II wurde durch Denaturierung (15 min, 65 °C) inaktiviert. Für die Amplifikation größerer Fragmente

(> 1 kb) wurde die mRNA durch eine RNaseH-Behandlung (2 U, 20 min, 37 °C) entfernt. Die cDNA's wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.3.1.10 Photometrische Nukleinsäurebestimmung

Menge und Reinheit von Nukleinsäuren können photometrisch bestimmt werden. Dazu wurde die Absorption der Nukleinsäurelösung bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes konnte die Konzentration errechnet werden (Tabelle 5).

Nukleinsäure-Typ	1 OD ₂₆₀ entspricht
doppelsträngige DNA	50 µg/ml
einzelsträngige DNA/RNA	40 µg/ml
einzelsträngige Oligonukleotide	20 µg/ml

Tabelle 6: Photometrische Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren (nach Sambrook et al., 1989).

Proteine besitzen durch ihre aromatischen Aminosäuren ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die Reinheit der DNA in Bezug auf Proteine und Phenol läßt sich daher durch Quotientenbildung des 260 nm-Wertes mit dem 280 nm-Wert bestimmen. Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte bei reiner DNA oder RNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Verunreinigungen durch Proteine oder Phenol senken den Wert (Sambrook et al., 1989).

3.3.1.11 Konzentrationsbestimmung im Ethidiumbromidgel

Ethidiumbromid (EtBr) ist ein unter UV-Licht fluoreszierender Farbstoff, der sich in den DNA-Doppelstrang einlagert. Dadurch kann DNA sichtbar gemacht werden. Trägt man DNA bekannter Konzentration, wie z.B. eine definierte Menge an geschnittener Lambda-DNA oder einen DNA-Größenstandard auf ein Gel auf, so können die DNA-Mengen abgeschätzt werden. Zur Mengenabschätzung wurden verschiedene Banden des DNA-Ladder-Mix (MBI Fermentas) verwendet.

3.3.1.12 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion¹ ermöglicht die schnelle Amplifikation von DNA-Sequenzen. Dabei wird DNA zyklisch repliziert (Mullis et al., 1987; Saiki et al., 1988). Ein PCR-Zyklus besteht üblicherweise aus den drei Schritten: Denaturierung, Hybridisieren (Annealing) und Kettenverlängerung (Elongation).

Während der Denaturierung wird bei Temperaturen um 90-94 °C die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgeschmolzen. Der Annealing-Prozeß dient der Anlagerung der Primer an die DNA. Primer sind Oligonukleotide mit einer Länge von 10 – 40 Basen mit einer zur DNA-Vorlage (Template) komplementären Sequenz. Die Bedingungen im Reaktionsansatz, insbesondere die Annealing-Temperatur, entscheiden über die Spezifität der Hybridisierung zwischen Primer und Template.

An die 3'-OH-Gruppen der hybridisierten Oligonukleotide können durch die Polymerase zum Matrizenstrang komplementäre Nukleotide angehängt werden. Der entstandene Doppelstrang dient seinerseits wieder als Template im nächsten Zyklus. Im optimalen Fall resultiert daraus eine exponentielle Amplifizierung der DNA-Sequenz.

Durch die Verwendung hitzestabiler DNA-Polymerasen kann die PCR-Reaktion ohne neue Enzymzugabe nach jedem Zyklus durchgeführt werden. Es sind verschiedene hitzestabile DNA-Polymerasen kommerziell erhältlich. Falls nicht anders angegeben, wurden die Pwo-Polymerase (PeqLab) oder die Taq-Polymerase (Fermentas) verwendet. Die Schmelztemperatur und mögliche intramolekulare Wechselwirkungen wurden von geeigneter Software (Omiga, Oligo) berechnet. Bei der Definition der Primer wurde darauf geachtet, daß die Schmelztemperaturen der Primer-Paare sich möglichst wenig unterscheiden. Außerdem wurden Sekundärstrukturen der Primer, wie Haarnadelstrukturen oder Dimerbildung bei der Primer-Auswahl wenn möglich vermieden. Das endgültige Protokoll für die jeweiligen Primerpaare wurde durch empirische Optimierung der PCR-Bedingungen (Annealingtemperatur, Elongationszeiten und Salzkonzentration) ermittelt.

¹ *engl.* Polymerase-Chain-Reaction, kurz PCR

<i>Komponente</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>Bemerkungen</i>
Template	5 pg – 200 ng	abhängig von der Größe der DNA-Fragmente, und der Häufigkeit der Zielsequenz
5'-Primer	20 pmol	die Primerkonzentration variierte in einem Bereich von 10 bis 50 pmol
3'-Primer	20 pmol	
Pwo-Puffer	1x	Standardmäßig 2 mM MgSO ₄ , wurde bei Bedarf variiert
dNTP's	200 µM	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Pwo-DNA-Polymerase	2 U	in speziellen Fällen andere Polymerase
H ₂ O _{MilliQ}	add 100 µl	

Tabelle 7: Standard PCR-Ansatz

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit in Sek.</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Bemerkungen</i>
Denaturieren	95,0 °C	120-300	1x	
Denaturieren	95,0 °C	20	25-35x	empirisch optimiert
Annealing	T _m – 5°C	30		
Elongation	72,0 °C	30-120		
Elongation	72,0 °C	300	1x	

Tabelle 8: Standard-PCR-Protokoll; T_m = Schmelztemperatur der Primer

3.3.1.13 Enzymatische DNA-Restriktion

Enzymatische DNA-Restriktionen wurden zur Restriktionsanalyse oder für gentechnische Arbeiten wie Klonierungen durchgeführt. Dabei wurde die DNA mit Restriktionsenzymen an definierten Stellen geschnitten. Die verwendeten Enzyme stammten alle von MBI Fermentas und wurden im firmeneigenen Puffersystem eingesetzt. Die DNA-Lösung wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und es wurde $\frac{1}{10}$ des Endvolumens Reaktionspuffer (10x) zugegeben. Pro µg DNA wurden 0,2 U-5 U² Restriktionsenzym zugegeben, gemischt und bei 37 °C für 1-4 h inkubiert.

2 Die eingesetzte Aktivität ist abhängig von der Definition der Unit und die Anzahl der Schnittstellen

3.3.1.14 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Elektrophoresepuffer: 50 µg/ml Ethidiumbromid in TBE

5x Ladepuffer: 50 mM EDTA; 40 % (w/v) Saccharose; 30 % (v/v) Glycerin; 0,001 % (w/v) Bromphenolblau; 0,001 % (w/v) Xylencyanol77

Bei der Gelelektrophorese werden DNA-Moleküle im elektrischen Feld aufgrund ihrer Ladung durch eine Matrix aus Agarose aufgetrennt. Die Auftrennung im Gel erfolgt aufgrund der sterischen Hinderung großer Moleküle bei der Wanderung durch die maschenartige Gelstruktur. Je größer das DNA-Molekül ist, desto langsamer windet es sich durch die Poren des Agarosegels. Die „Porengröße“ eines Gels entscheidet daher auch, in welchem Größenbereich eine optimale Auftrennung der DNA erfolgt. Reguliert wird die Porengröße durch die Agarose-Konzentration im Gel (Tabelle 8).

Trennbereich in kb	Gelkonzentration in %(w/v)
5,0 – 60	0,3
1,0 - 20	0,6
0,8 – 10	0,7
0,5 - 7	0,9
0,4 - 6	1,2
0,2 – 3	1,5
0,1 – 2	2,0

*Tabelle 9: Trennbereiche von Agarosegelen
(Tabelle nach Gassen et al., 1999)*

Sofern nicht anders beschrieben, wurde die DNA in einem 1 % (w/v) Agarosegel mit 8 bis 12 V/cm aufgetrennt. Zur Herstellung des Gels wurde die Agarose in TBE aufgeköcht, gleichmäßig auf ~60 °C abgekühlt und nach Zugabe von 50 µg/ml Ethidiumbromid in eine Gelkammer gegossen. Die Geltaschen zur Aufnahme der Probe wurden durch Einsetzen eines Kamms mit gewünschter Taschenanzahl bzw. Taschenbreite geformt. Nach dem Erstarren des Agarose-Gels wurde das Gel beladen. Zur Vorbereitung wurde die DNA-Lösung vor dem Beschicken des Gels mit $\frac{1}{5}$ Volumen 5x-Ladepuffer versetzt. Beim Beladen des Gels wurde jeweils in einer Spur ein Größenstandard (GeneRuler™ DNA-Ladder-Mix, Fermentas) zur Größenabschätzung aufgetragen.

3.3.1.15 Ligation von DNA-Strängen

Unter Ligation von DNA versteht man das kovalente Verbinden von zwei DNA-Strängen, bzw. die Zirkularisierung eines linearen DNA-Moleküls. Wesentlich für die Ligation ist das richtige Verhältnis von Vektor und Insert. Das Insert im Reaktionsansatz war zwischen 5 und 10x höher konzentriert als der Vektor. Dadurch wurde sichergestellt, daß mit hoher Wahrscheinlichkeit Ligationen zwischen Vektor und Insert stattfinden. Durch Verwendung unterschiedlicher Restriktionsenzyme oder durch Dephosphorylierung des Vektors mit alkalischer Phosphatase (CIAP)³ wurde eine Religation des Vektors verhindert.

Das Abspalten der endständigen Phosphate wurde zusammen mit dem Schneiden des Plasmids durchgeführt werden. Dazu wurden 5 µg-10 µg Plasmid-Vektor, 5 U Restriktionsenzyme, 2 U CIAP, $\frac{1}{10}$ Volumen Reaktionspuffer (10 x) gemischt und mit H₂O_{bidest.} aufgefüllt. Nach dem Mischen der Komponenten wurde der Reaktionsansatz für 3 h bei 37 °C inkubiert. Das geschnittene Plasmid wurde mittels Nucleotrap® aus dem Gel isoliert. PCR-Produkte oder Restriktionsfragmente, die mit dem Vektor Plasmidvektor ligiert werden sollten, wurden vor der Ligation ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennt und mit Nucleotrap® aus dem Gel isoliert.

Die T4-DNA-Ligase (5 U/µl, MBI Fermentas) ist in der Lage unter ATP-Verbrauch DNA-Stränge über Phosphatbrücken zu verbinden. Das Enzym kann sowohl überlappende Enden (*sticky ends*) als auch glatte Enden (*blunt ends*) verbinden. Bei *blunt end*-Ligationen ist die Ligationseffizienz deutlich reduziert. Daher wurde bei der Ligation von DNA-Fragmenten ohne *sticky ends* die 5fache Menge an DNA eingesetzt. Um die Clusterbildung der DNA-Moleküle anzuregen und auf diese Weise die Ligationseffizienz zu steigern, wurde dem Ligationsansatz bei *blunt end*-Ligationen Polyethylenglykol (PEG) zugesetzt.

3 engl. Calf Intestine Alkaline Phosphatase, kurz CIAP

sticky – end – Ligation

50 ng Vektor
 250 ng Insert
 1 µl T4-Ligase-Puffer
 2,5 U T4-DNA-Ligase
 add 20 µl mit H₂O_{bidest}

blunt – end – Ligation

400 ng Vektor
 1200 ng Insert
 2 µl 10x T4-Ligase-Puffer
 2 µl PEG 4000 (50 %)
 5 U T4-DNA-Ligase
 add 20 µl mit H₂O_{bidest}

Nach dem Mischen der Komponenten wurde der Ansatz mit überhängenden Enden für 12 Stunden bei 22 °C inkubiert. Der Ansatz mit glatten Enden wurde erst für 1 Stunde bei Raumtemperatur und anschließend für 8 h bis 12 h bei 22°C inkubiert.

3.3.2 Gentechnische Arbeiten**3.3.2.1 Maßnahmen zum sterilen Arbeiten**

Alle Materialien, die für das mikrobiologische Arbeiten, bzw. Arbeiten in der Zellkultur benutzt wurden, wurden vorher auf geeignete Weise sterilisiert. Thermostabile Lösungen wurden zu diesem Zweck autoklaviert, d.h. über einen Zeitraum von 30 min in einer gesättigten Wasserdampfatmosfera von 2 bar bei 121 °C erhitzt. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden sterilfiltriert (22 µm Millex-Filter, Millipore). Festes Material wurde durch Autoklavieren oder trockener Hitzesterilisation (3 h, 180°C) keimfrei gemacht, sofern es Temperaturbeständig war. Oberflächen wurden durch Reinigung mit geeigneten Desinfektionsmitteln (70%(v/v) Ethanol, Baricidal) desinfiziert.

3.3.2.2 Anzucht von *Escherichia coli*

Alle bakteriellen Arbeiten wurden an Sicherheitsstämmen von *Escherichia coli* (DH5α, XL10 Gold) durchgeführt. *E. coli* wurde im Regelfall mit LB-Medium angezogen. Dies geschah je nach Anwendungszweck auf festem Medium (LB-Agar) oder in flüssigem Medium.

LB-Agarplatten wurden durch Verteilung der Bakterien mit einem sterilem Glasspatel oder durch einen Vereinzelausstrich mit einer ausgeglühten Impföse angeimpft. Flüssigmedien wurden durch Zugabe von Bakterien aus einer Kolonie oder einer Glyzerindauerkultur (Glyzerinstock) angeimpft. Sofern die Bakterien über eine

Ampicillin-Resistenz verfügten, wurde dem Medium Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C im Inkubator wachsen gelassen.

Bei bestimmten Anwendungen, z.B. für die Herstellung kompetenter Zellen, war es notwendig, das Wachstum einer Flüssigkultur zu überwachen. In diesem Fall wurden, ohne die Kultur zu kontaminieren, in regelmäßigen Zeitabständen Proben genommen und eine photometrische Trübungsmessung bei einer Wellenlänge von 600 nm durchgeführt. Eine $OD_{600}=1$ entsprach bei *E. coli*-Flüssigkulturen dabei einer Zellzahl von $8 \cdot 10^8$ Zellen/ml.

3.3.2.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* DH5α

Für die Anzucht elektrokompetenter *E. coli* wurden 250 ml SOB-Medium ohne MgCl₂ mit *E. coli* DH5α angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0,6 – 0,75 wachsen gelassen. Alle folgenden Schritte fanden bei 4 °C im Kühllabor oder auf Eis statt! Die Zellen wurden bei 2.500 g und 1 °C für 15 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet zweimal mit 20 ml kaltem, sterilem 10 % (v/v) Glycerin gewaschen und nach dem letzten Dekantieren in dem verbleibenden Glycerin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde á 40 µl in sterile 1,5 ml – Reaktionsgefäßen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung bis zur Verwendung erfolgte bei –80 °C.

3.3.2.4 Transfektion von *E. coli* durch Elektroporation

Die elektrokompetenten *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut. Je 40 µl der Bakteriensuspension wurden mit 5 µl – 10 µl DNA-Lösung gemischt. Pro Transfektion wurden 20 ng bis 500 ng DNA aus einem Ligationsansatz verwendet. Für eine Retransformation von Plasmid-Vektoren wurden DNA-Mengen von 1 ng bis 50 ng eingesetzt. Nach dem Mischen wurde die Suspension in eine gekühlte Elektroporationsküvette (Peqlab) mit einem Elektrodenabstand von 1 mm überführt. Durch Elektroporation (4,2 kV/cm, 250 µF, ~3,5 mSek) wurde die Membran der Bakterien für DNA – Moleküle permeabel gemacht. Unmittelbar nach der Elektroporation wurden die Zellen in vorgewärmtes SOC-Medium überführt. Eine Stunde lang wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert, um ihnen den Aufbau der Antibiotika-Resistenz zu ermöglichen. Verschiedene Volumina (20-200 µl) der Zellsuspension wurden auf LB – Platten mit geeignetem Antibiotikum ausgespatelt und

über Nacht bei 37 °C im Brutschrank wachsen gelassen. Von den heranwachsenden Kolonien auf den Platten wurden 3 ml-Flüssigkulturen angelegt, die der Präparation von Plasmid-DNA und dem Anlegen von Glycerinstocks dienten. Durch Restriktionsanalyse oder PCR-Analyse der präparierten DNA konnten positive Klone identifiziert werden.

3.3.2.5 Anlegen von Dauerkulturen

Durch Zugabe von sterilem Glycerin mit einer Endkonzentration von 20 % (v/v) zu einer Flüssigkultur wurden die Bakterien auf eine langfristige Verwahrung vorbereitet. Bakteriensuspension und Glycerin wurden gut gemischt und die Zellsuspension wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Glycerinstocks erfolgte bei -80 ° C.

3.3.2.6 Klonierung des 675 bp und 324 bp-Fragmente

Aus verschiedenen Maus-ESTs⁴ (partiell sequenzierte mRNA-Sequenzen) abgeleitete Primer wurden genutzt, um 2 PCR-Fragmente von 324 bp und 665 bp aus Ratten cDNA zu amplifizieren (Tabelle 6). Die cDNA wurde mit Oligo(dT)-Primern aus Rattenhirn-mRNA hergestellt.

<i>Primername</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Bemerkungen</i>
RatRevL3	ggt caa agg cat tct cag agc gc	324 bp-Fragment
HuForL3.2	agt atg ccc ggt cct ctg gtt etc a	
HuForL3.1	gag aag aac ctg tgg cac atg tgg	665 bp Fragment
HuRevL3.1	cgg gca tac ttc tca tca aat ctg g	

Tabelle 10: aus Maus-EST's abgeleitete Primer der NTPDase3

Ein geeignetes PCR-Protokoll wurde anhand von Vorversuchen empirisch ermittelt und eine für die folgende Klonierung ausreichende Menge an DNA hergestellt:

PCR-Ansatz (150 µl):

Template	2,5 µl Rattenhirn cDNA
3'-Primer	100 pmol
5'-Primer	100 pmol
dNTP-Mix	200 µM
Pwo-Puffer	1 x
Pwo	2,5 U

4 engl. Estimated Sequence Tags, kurz EST

PCR-Programm:	320 bp-Fragment		670 bp-Fragment	
(1) Denaturieren	95,0 °C	120 sek	95,0 °C	120 sek
(2) Denaturieren	95,0 °C	20 sek	95,0 °C	20 sek
(3) Annealing	60,4 °C	30 sek	59,5 °C	30 sek
(4) Elongation	72,0 °C	60 sek	72,0 °C	60 sek
Schritte (2) bis (4) 10x				
(5) Denaturieren	95,0 °C	20 sek	95,0 °C	20 sek
(6) Annealing	60,4 °C	30 sek	57,5 °C	30 sek
(7) Elongation	72,0 °C	60 sek	72,0 °C	60 sek
Schritte (5) bis (7) 25x				
Elongation	72,0 °C	180 sek	72,0 °C	180 sek

PCR-Produkte und *EcoRV*-geschnittener Vektor (pBSK(-)) wurden elektrophoretisch aufgetrennt und über Nukleotrap gereinigt. Zur Steigerung der Ligationseffizienz wurde der Vektor während des Schneidens dephosphoryliert und die PCR-Produkte wurden nach der Nucleotrap-Isolierung phosphoryliert. Hierfür wurden zu 50 µl Nukleotrap-Eluat 6 µl 10xReaktionspuffer, 60 pmol ATP sowie 10 U T4-Nukleotid-Kinase zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Das phosphorylierte PCR-Produkt wurde mit Isopropanol gefällt und *blunt-end* in den *EcoRV*-geschnittenen pBlueSript SK(-) ligiert. Anschließend wurden *E. coli* DH5α durch Elektroporation mit den Ligationsansätzen transfiziert. Die resultierenden Klone wurden per Restriktionsanalyse geprüft und es wurden Glyzerinstocks angelegt. Positiv getestete Klone wurden sequenziert (Scientific Research & Development GmbH, Oberursel).

3.3.2.7 RACE-PCR zur Erschließung des 5'-Bereichs der NTPDase3-mRNA

Ein Versuch den 5'-Bereich der cDNA zu klonieren bestand in der Anwendung der RACE-PCR⁵ (Frohmann et al., 1988; Frohmann, 1993). Aus 500 ng mRNA wurde, wie beschrieben (siehe S. 25, *cDNA-Synthese*) cDNA hergestellt. Als Primer für die cDNA-Synthese wurden 2 pmol CD39L3 rat rev01 eingesetzt. Um die cDNA von mRNA zu befreien schloß sich eine RNaseH-Behandlung an. Zur Reinigung wurde die cDNA mit 1 µg tRNA als Fällhilfe versetzt, mit Roti-Phenol® ausgeschüttelt und ethanolisch gefällt. Im Anschluß wurde die gefällte cDNA in 10 µl Aqua bidest. aufgenommen.

5 engl. Rapid Amplification of cDNA Ends -PCR, kurz RACE-PCR

Nachdem die cDNA auf diese Weise von Enzymen und Pufferrückständen der vorhergehenden Arbeitsschritte befreit war, erhielt sie einen Poly(C)-Schwanz. Dazu wurden 10 µl cDNA nach Herstellerangaben mit 4 µl 5x TdT-Puffer (125 mM Tris/Cl pH 7,4; 1 M Kalium-Cacodylat; 1,25 mg/ml BSA), 1,2 µl 25 mM CoCl₂, 4 µl 1 mM dCTP und 24 U terminale Desoxynukleotidtransferase (TdT) gemischt und 15 min. bei 35 °C inkubiert. Durch 5minütiges Erhitzen des Ansatzes auf 65 °C wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurde die cDNA ethanolisch gefällt und in 10 µl Aqua bidest. aufgenommen.

Der auf diese Weise entstandene 5'-cDNA-Pool wurde für die erste PCR verwendet. 0,2 µl des 5'-cDNA als Template wurden mit je 20 pmol CD39L3 rat rev01-Primer (gtt cgg ctc cat ctt etc) und Poly(dG)-Adapter-Primer (tag aag gca cag tcg agg ggg ggg ggg gg) amplifiziert (RACE-PCR 1, Tabelle 7). Der PCR-Ansatz wurde in 2 Aliquots a 50 µl gefahren.

	<i>RACE-PCR 1</i>			<i>RACE-PCR 2</i>		
<i>PCR-Schritt</i>	<i>t in sek.</i>	<i>Temp. in °C</i>		<i>t in sek.</i>	<i>Temp. in °C</i>	
Denaturieren	180	94	1x	180	94	1x
Denaturieren	20	94	10x	20	94	5x
Annealing	30	50		30	50	
Elongation	90	72		90	72	
Denaturieren	20	94	25x	20	94	25x
Annealing	30	40		30	42°C-	
Elongation	90	72		90	0,25/Zykl. 72	
Elongation	180	72	1x	180	72	1x

Tabelle 11: RACE-PCR-Protokoll

Protokoll der ersten und zweiten RACE-PCR. Bei RACE-PCR 2 handelte es sich um eine TouchDown-PCR (Don et al., 1991), in der die Annealing-Temperatur um 0,25 °C pro PCR-Zyklus gesenkt wurde um die Spezifität und Ausbeute zu steigern.

Aus dem PCR-Produkt der ersten PCR wurden 2 µl als Template verwendet. Mit dem rat rev02-Primer (10 pmol; gga tat ctg ggt gga ggc gcc) bzw. rat rev03-Primer (10 pmol; ggc tcc tgt ggt gtc gac) und dem Adapter-Primer (10 pmol; tag aag gca cag tcg agg) wurde versucht den 5'-Bereich der NTPDase3 in verwendbarer Menge zu amplifizieren (RACE-PCR 2, Tabelle 7). Der PCR-Ansatz wurde in 2 Aliquots a 50 µl gefahren.

3.3.2.8 Herstellung radioaktiver Sonden gegen die Ratten-NTPDase3

Die aus der Ratte klonierten 665 bp- und 324 bp-Fragmente dienten als Grundlage für die Definition von Sonden. Zwei Bereiche von ~300 Basen Länge mit geeignetem GC-Gehalt und wenig Sekundärstrukturen wurden ausgewählt und die flankierenden Primer abgeleitet.

<i>Primername</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Bemerkungen</i>
L3Sonde1_for	cgc tcc ctg ctc cca aga ttt	288 bp PCR-Produkt nt 1301-1588, Tm 59 °C
L3Sonde1_rev	cag gca cag caa ggc gat agc	
L3Sonde2_for	caa ccc ctg cta ccc tca cg	264 bp PCR-Produkt nt 940-1203, Tm 57 °C
L3Sonde2_rev	tag aat cct gca aat gcc aca aat	

Tabelle 12: Primer für die Sondenherstellung

Die Positionsangaben beziehen sich auf die humane NTPDase3-cDNA (Genbank Acc. No. AF039917 von Smith et al., 1998)

Als Templates wurden für Sonde1 oligo(dT)-geprimte Rattenhirn-cDNA und für Sonde2 das Plasmid des 665 bp-Klons verwendet. Ein geeignetes PCR-Protokoll für die beiden Primerpaare wurde ermittelt (siehe unten) und eine PCR ohne Radioaktivität angesetzt. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, über Nucleotrap® isoliert und dienten als Template für die Herstellung der biotinylierten und radioaktiven Sonden. Die radioaktive Markierung erfolgte durch den Einbau von Redivue™ deoxycytidine 5' [α-³²P] triphosphate (Amersham BioScience) in die Sonden.

PCR-Ansatz (50 μ l):

Template (PCR-Produkt 1:100)	1 μ l
Primer je	20 pmol
Advantage-Puffer	1 x
Advantage-PCR-Mix	1 μ l
dNTP-Mix	10 μ M
Desoxycytidin 5' [α^{32} P] – triphosphat	80 μ Ci

PCR-Protokoll	Sonde1	Sonde2
Denaturieren	95,0 °C 120 sek.	95,0 °C 120 sek.
(2) Denaturieren	95,0 °C 20 sek.	95,0 °C 20 sek.
(3) Annealing	58,3 °C 30 sek.	57,6 °C 30 sek.
(4) Elongation	72,0 °C 60 sek.	72,0 °C 60 sek.
Schritte (2) bis (4) 25x		
(5) Elongation	72,0 °C 180 sek.	72,0 °C 180 sek.

Die radioaktiven Sonden wurden durch eine NukleoSpin®-Reinigung von Nukleotiden und Primern befreit.

3.3.2.9 Anreicherung der cDNA mittels ClonCapture®

Das ClonCapture™ cDNA Selection Kit ermöglicht laut Herstellerangaben das Anreichern bestimmter cDNAs aus einer Plasmidbank. Dazu wurden biotinylierte Sonden der gesuchten cDNA mit den homologen Sequenzen der Plasmide in der Bank, unter Zuhilfenahme des RecA-Proteins, zu einer Triple-Helix formiert. Die so markierten Plasmide wurden über Streptavidin-gekoppelte Magnetpartikel gebunden, gewaschen und eluiert. Mit der eluierten DNA wurden *E. coli* transformiert, Kontaktabzüge der Platten auf Nitrozellulosefilter gezogen und mit der zweiten Sonde die Filter auf positive Klone geprüft.

Die Herstellung der biotynilierten Sonden (Sonde1/Sonde2) erfolgte mit folgender Zusammensetzung des PCR-Ansatzes unter Verwendung bereits beschriebener Primer und zugehörigem PCR-Protokoll (siehe S. 36, *Herstellung radioaktiver Sonden gegen die Ratten-NTPDase3*).

Template	1-5 ng
3'-Primer	20 pmol
5'-Primer	20 pmol
dNTP-Mix	200 µM
Biotin-21-dUTP	50 µM
Desoxycytidin-5' [α - 32 P]-triphosphat	10 µCi
Advantage-Puffer	1 x
Advantage Polymerase-Mix	2 µl
Endvolumen	100 µl

Nach der Synthese wurde das PCR-Produkt über NucleoSpin® gereinigt und die DNA-Konzentration des Eluats wurde im Ethidiumbromid-Gel bestimmt.

Pro 50 ng Sonde wurden 2 µg RecA-Protein und 1 µg der SuperScript Ratbrain cDNA-Bank (Invitrogen) eingesetzt. Der Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

0,1 M CoCl ₂	0,6 µl
10x RecA-Puffer	2,4 µl
RecA-Protein	* µl
ATP-Mix	4 µl
biotinylierte Sonde (50 ng)	* µl
cDNA-Bank	1 µ
H ₂ O _{MilliQ}	* µg
Endvolumen	30 µl

* Volumen je nach Konzentration der Sonde

Sonde und Wasser wurden gemischt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die denaturierte Sonde wurde auf Eis abgekühlt und das Kondenswasser in einer Tischzentrifuge herunterzentrifugiert. CoCl₂, RecA-Puffer, RecA-Protein und ATP-Mix wurden gemischt und es wurde die denaturierte Sonde hinzugefügt. Der Ansatz wurde gründlich gemischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert bevor die cDNA-Bank zugegeben wurde. Während der nun folgenden 20 min Inkubation bei bei 37 °C wurden die Streptavidin-Beads vorbereitet.

Die Steptavidin-Beads wurden gut gemischt und 15 µl der Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach dreimaligem waschen mit je 100 µl Bindepuffer wurden die Beads in 30 µl Bindepuffer aufgenommen. Die Beads wurden mit 5 µg Heringssperma-DNA für 10 min abgesättigt, der Puffer entfernt und die Beads in 30 µl Bindepuffer resuspendiert.

Um überschüssiges RecA-Protein zu binden wurde dem Reaktionsansatz 1 µl *EcoRV*-verdaute Lambda-DNA zugefügt, gemischt und für 5 min inkubiert. 0,6 µl 10 % SDS und 0,4 µl Proteinase K (14 mg/ml) wurden zugegeben, der Ansatz wurde gemischt und für weitere 10 min inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl 0,1 M PMSF wurde die ProteinaseK inaktiviert. Die Steptavidin-Beads wurden dem Ansatz zugeführt. Nach gründlichem Mischen wurde das Reaktionsgefäß für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Im Magnetständer wurden die Beads für ~1 min gesammelt, der Überstand abgezogen und die Beads wurden durch 1-2minütiges Drehen des Reaktionsgefäßes mit 1 ml Waschpuffer gereinigt. Dieser Waschschrift wurde 2 mal wiederholt. Nach 5 min Inkubation bei 37 °C mit 1 ml H₂O_{bidest}, wurde der Überstand vorsichtig abgezogen und die Beads wurden in 100 µl Elutionspuffer aufgenommen. Eine 5minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit Elutionspuffer löste die Plasmide von den Beads. Während die Beads im Magnetständer immobilisiert waren, wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Dem Eluat wurden 22,5 µl der Präzipitationsmischung und 2,5 Vol. Ethanol zugegeben und 30 bis 45 min bei -70 °C gefällt. Das Präzipitat wurde für 20 min bei 4 °C und 14.000 rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert und anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem Lufttrocknen des Pellets wurde die DNA in 10 µl Wasser aufgenommen.

Jeweils 2 µl der mit Hilfe von Sonde1 bzw. Sonde2 angereicherten Plasmide wurden in *E.coli* transfiziert und ausplattiert. Anschließend wurden Kontaktabzüge der Platten auf Nitrozellulosefiltern erstellt. Mit der anderen Sonde wurden die Filter überprüft (siehe unten).

3.3.2.10 Screening der SuperScript Ratbrain cDNA Library

20x SSC: 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,5

50x Denhards: 1 % (w/v) Ficoll400; 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon; 1 % (w/v) Rinderblutserumalbumin (BSA)

Hybridisierungspuffer: 5x SSC; 5 x Denhardt's; 25 mM Phosphatpuffer pH 6,5; 0,1 % SDS; 100 µg/ml Heringssperma-DNA

Elektrokompetente *E. coli* DH5 α wurden mit 200 ng der SuperScript Ratbrain cDNA Library transfiziert und es wurden 15.000 Kolonien je Ø150 mm Agarplatte ausplattiert. Die zu erwartende Koloniezahl wurde durch vorherige Elektroporation abgeschätzt.

Der Filter wurde vorsichtig aufgelegt und mit einer Pipettenspitze zur späteren Zuordnung der Filter asymmetrisch an 3 Stellen punktiert. Nach vorsichtigem Abziehen der Filter wurden die Platten durch Umwickeln mit Parafilm® vor dem Austrocknen geschützt und bei 4-8 °C aufbewahrt. Zum Zellaufschluß und zur Denaturierung der DNA wurden die Nitrozellulosefilter für 5 min mit 1,5 M NaCl in 0,5 M NaOH behandelt, 5 min lang neutralisiert (0,5 M Tris/Cl pH 7,5; 1,5 M NaCl) und anschließend luftgetrocknet. Zur Fixierung der DNA an die Filter wurden diese bei 80 °C und \leq 100 mbar für 1 h erhitzt.

Die Filter wurden für 2 h bei 55 °C im Hybridisierungspuffer prähybridisiert und nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde für 6 h oder über Nacht bei 55 °C im Wasserbad inkubiert. Zum Entfernen ungebundener Sonde wurden die Filter 2 mal 10 min lang mit 1x SSC, 0,1 % SDS gewaschen. Anschließend wurde 3 mal für 5 min mit 0,1x SSC, 0,1 % SDS gewaschen um unspezifisch gebundene Sonde von den Filtern zu entfernen.

Die Nitrozellulosefilter wurden auf für die Filmkassetten zugeschnittenes Whatman®-Papier platziert, mit Folie abgedeckt und in Filmkassetten mit Verstärkerfolien gelegt. In der Dunkelkammer wurde der Röntgenfilm aufgelegt, eine Ecke markiert, und bei -80 °C je nach Stärke des Signals 1 bis 6 Tage ausgelegt.

Die Filme wurden für 3 min im Entwickler geschüttelt, für 1 min in Wasser gewaschen und 7 min lang fixiert. Nach mindestens 20 min wässern wurden die Filme zum Trocken aufgehängt.

Die trockenen Filme wurden auf die Filter aufgelegt und die Filterränder und Markierungen wurden übertragen. Am Leuchttisch konnten die Platten mit ihren Abbildungen auf dem Film zur Deckung gebracht werden. Signale auf dem Film zeigten potentiell positive Kolonien an.

Potentielle Klone wurden mit einem sterilen Zahnstocher oder einer abgeflamten Impföse in eine 3 ml LB-Kultur übertragen. Bei sehr dicht besiedelten oder nicht klar definierbaren Kolonien wurden die Bakterien zur Vereinzelnung weitere Male ausplattiert. Die isolierten Klone wurden durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung geprüft.

3.3.2.11 Screening der Uni-ZAP®XR Phagenbank

Wirtsstämme: XL1-Blue MRF' strain
SOLR™ strain

Phagen: f1-Helfer-Phage ExAssist™

SM-Puffer: 100 mM NaCl; 9 mM MgCl₂·7 H₂O; 50,0 mM TrisM 0,01 % (w/v)
Gelantine; pH 7,5

Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid (ITPG) 0,5 M in H₂O_{MiliQ}

5-Bromo-4-chloro-3.inoyl-β-D-galactopyranosid (X-gal) 250 mg/ml in Dimethylformamid (DMF)

Zur Vorbereitung des Screenings wurde der Phagentiter bestimmt. Dazu wurden Verdünnungen von 10⁻⁴ bis 10⁻⁷ der Phagenbank und des Helferphagen in SM-Puffer angelegt. 20 ml XL1-Blue-Medium wurden mit XL1-Blue MRF' angeimpft und über den Tag wachsen gelassen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1.000 g_{av}, 4 °C) und in sterilem 10 mM MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 0,5 (~4,2x10⁸ Zellen/ml) eingestellt. Zu 200 µl Bakterien-Suspension wurden jeweils 1 µl einer Lambda-Phagen-Verdünnung gegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert, um den Phagen die Bindung an die Bakterien zu ermöglichen. Dann wurden 3 ml auf 48 °C temperierter NZY-Top-Agar, inklusive 15 µl 0,5 M ITPG und 50 µl X-gal 250 mg/ml, zugegeben. Unverzüglich wurde der, die Bakterien enthaltende, Top-Agar auf NZY-Agar-Platten gegeben und nach Erstarren der Platte umgedreht über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Anzahl der Plaques⁶ wurde am nächsten Morgen ausgezählt und die Konzentration der aktiven Phagen (**plaque forming units pro ml [pfu/ml]**) berechnet.

⁶ Plaques sind durch phagenbedingte Zellysis entstandene „Löcher“ in einem konfluenten Bakterienrasen.

Für das Screening wurden 10 Platten (Ø150 mm) à 26.000 pfu angelegt. Für jede Platte wurden 600 µl XL1-Blue MRF' in 10 mM MgSO₄ (OD₆₀₀=0,5) mit 26.000 pfu versetzt, für 15 min bei 37 °C inkubiert und mit 3 ml NZY-Top-Agar auf NZY-Agar-Platten verteilt. Nach Erstarren des Top-Agars wurden die Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Die Platten wurden vor dem Auflegen der Nitrozellulosefilter auf 4 °C gekühlt. Die Filter wurden für 2 min aufgelegt und vorsichtig wieder abgezogen. Anschließend wurden die Filter wie bereits beschrieben (siehe S. 40, *Screening der SuperScript Ratbrain cDNA Library*) vorbereitet und hybridisiert.

Positive Plaques wurden ausgestanzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform zugegeben und gründlich gemischt. Für 1 bis 2 h wurde bei Raumtemperatur inkubiert, danach wurde das Reaktionsgefäß über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. In dieser Zeit diffundierten die Phagen in den Puffer und bildeten den Phagenstock.

Über eine Cotransfektion mit einem Helferphagen wurde die cDNA *in vivo* herausgeschnitten und lag dann als Passagier-DNA in einem pBlueScript®-Phagemid vor. Infolge einer Mutation kann sich der Phage im SOLR-Stamm nicht replizieren. Zur Exzision eines Phagemids aus einem positiven Klon wurde wie folgt vorgegangen:

Separate Kulturen der Wirtsstämme XL1-Blue MRF' und SOLR wurden über Nacht bei 30 °C angezogen. Die Zellen wurden herunterzentrifugiert (1.000 g) und in sterilem 10 mM MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt. 200 µl XL1-Blue MRF', 250 µl Phagenstock (>10⁵ Phagen) und 1 µl ExAssist Helfer-Phage (>10⁶ pfu/µl) wurden zusammengeführt.

Nach 15 minütiger Inkubation bei 37 °C wurden 3 ml LB-Medium zugegeben und 3 h bei 37 °C inkubiert. Durch 20 minütiges Erhitzen auf 65-70 °C wurden die Bakterien abgetötet. Die Zellen wurden abzentrifugiert (15 min, 1.000 g_{av}) und der Überstand wurde in ein verschließbares 15 ml-Gefäß überführt. Im Überstand befanden sich die in Phagen verpackten Phagemide.

200 µl der SOLR-Zellen wurden einmal mit 100 µl und einmal mit 10 µl des Überstandes versetzt, für 15 min bei 37 °C inkubiert und auf LB^{AMP}-Platten ausplattiert. Die

Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Da der SOLR-Stamm gegen eine Infektion mit dem Lambda-Phagen der Bank resistent ist und der Helferphage sich nicht in diesem Stamm replizieren kann, wuchsen nur Bakterien, die mit dem Phagemid transfiziert waren und so eine Ampicillin-Resistenz erlangen konnten. Die Kolonien wurden in Flüssigkulturen angezogen, Glycerinstocks angelegt, und die Passagier-DNA durch Restriktionsanalyse oder Sequenzierung geprüft.

3.3.3 Zellkultur

Bei allen Zellkulturarbeiten wurde sorgfältig auf Sterilität geachtet. Alle verwendeten Materialien wurden durch geeignete Methoden keimfrei gemacht und die notwendigen Arbeiten fanden innerhalb einer sterilen Umgebung (Cleanbench) statt.

3.3.3.1 Kultivierung der CHO-Zellen

CHO-Zellen stellen eine monoklonale Zelllinie dar, die aus undifferenzierten Tumorzellen besteht, welche ihren Ursprung in einem Ovarilkarzinom des chinesischen Hamsters haben. Die Zellen zeigen unter normalen Bedingungen eine spindelförmige Morphologie und wachsen adhärent in einem Monolayer (Puck et al., 1958; Ham, 1965).

Die CHO-Zellen wurden in Kulturschalen (Ø 150 mm; Fischer Scientific, Nidderau) bei 37 °C, 95 %iger Luftfeuchtigkeit und 5 % (v/v) Kohlendioxid angezogen. Alle 2 bis 3 Tage, bei Erreichen einer Konfluenz von 60 – 80 %, wurden sie im Verhältnis 1:3 bis 1:7 passagiert. Dazu wurde das Medium abgezogen und die Platte wurde 2 mal mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Durch 2 minütige Inkubation mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen) und anschließendem Klopfen wurden die Zellen von der Kulturschale abgelöst. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 4 ml Medium neutralisiert. Die Zellsuspension konnte nun auf neue Platten oder in ein Aufbewahrungsgefäß überführt werden.

3.3.3.2 Kultivierung der COS7-Zellen

COS7-Zellen sind eine fibroblastenähnliche, SV40 transformierte Affenzelllinie (Gulzmann, 1981). Bezüglich des Passagierens wurden sie genauso behandelt, wie CHO-Zellen. Für das Medium der COS7-Zellen wurde das FCS vor der Zugabe durch 1 stündige Inkubation bei 50 °C inaktiviert.

3.3.3.3 Kultivierung der PC12-Zellen

Die PC12-Zelllinie stammt ursprünglich aus der Nebenniere der Ratte. Eine Besonderheit der Zellen ist die Ausprägung neuronenähnlicher Merkmale unter dem Einfluß von Nervenwachstumsfaktor NGF⁷ (Greene et al., 1976). Weiterhin exprimieren PC12-Zellen nach Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe endogen verschiedene Ektokleotidasen (Vollmayer et al., 2001).

Die Zellen wurden, wie bereits für CHO-Zellen beschreiben, alle 2-3 Tage in Verhältnis 1:3 bis 1:6 passagiert. Sie wurden in 10 % Kohlendioxid und 95 % Luftfeuchtigkeit bei 37 °C kultiviert.

3.3.3.4 NGF-Stimulation von PC12-Zellen

Um PC12-Zellen zu einer neuronartigen Morphologie zu differenzieren wurden sie 50 ng/ml NGF (Invitrogen) ausgesetzt. Die Zellen wurden 3 bis 14 Tage unter dem Einfluß von NGF kultiviert, um eine deutliche Ausprägung der neuritenartigen Ausläufer zu gewährleisten. Das NGF wurde mit jedem Medienwechsel im Abstand von 3-4 Tagen erneut appliziert.

3.3.3.5 Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer

Die Zellen wurden, wie für das Passagieren beschrieben (siehe S. 43, *Kultivierung der CHO-Zellen*), von Ihrer Unterlage abgelöst und die Zellsuspension wurde in ein steriles 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. 50 µl der Suspension wurden in einer 96well-Kulturplatte 1:4 mit 50 µl Trypanblau-Lösung (Invitrogen) verdünnt. Der in der Lösung enthaltene Farbstoff Trypanblau ist nicht membrangängig, so daß nur tote Zellen angefärbt werden. Lebende Zellen heben sich in der farbigen Lösung deutlich ab. Die Anzahl der lebenden Zellen wurde in der Neubauer-Zählkammer am inversen Mikroskop bestimmt. Dazu wurden 4 Großquadrate mit einem Volumen von 10⁻⁴ ml

7 engl. Nerv Growth Factor, kurz NGF

ausgezählt und es wurde die Zellzahl pro ml errechnet (Formel 1).

$$\text{Zellzahl [Zellen/ml]} = \frac{(\text{Anzahl Zellen})}{(\text{Anzahl Großquadrate})} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Formel 1: Berechnung der Zellzahl unter Verwendung der Neubauer-Zählkammer

3.3.3.6 Reaktivieren von eukaryotischen Dauerkulturen

Zum Reaktivieren der Dauerkulturen wurde die tiefgefrorene Zellsuspension (1 ml-Aliquots) bei 37 °C im Wasserbad abgetaut. Die Zellen wurden mit 20 ml Medium gemischt, zentrifugiert (300 g_{av}, 5 min) und das Zellpellet wurde in 5 ml Medium resuspendiert. Die Suspension wurde auf eine Zellkulturplatte mit Medium gegeben und zur Anzucht der Zellen in den Inkubator gestellt.

3.3.3.7 Transiente Transfektion von CHO- und COS7-Zellen

EP-Puffer: 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,7 mM Na₂HPO₄; 6 mM D-Glucose; 20 mM Hepes; pH 7,05

Die Zellen wurden trypsinisiert und bei ~300 g_{av} 5 min lang zentrifugiert. Das Pellet wurde 2 mal mit 10 ml EP-Puffer pro Platte gewaschen. Nach diesen Waschschritten wurde das Pellet in 800 µl EP-Puffer pro Platte aufgenommen. Zu 800 µl der Zellsuspension wurden je 25-50 µg sterile DNA gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine Elektroporationsküvette (4 mm Elektrodenabstand) überführt und unter für die Zelllinie geeigneten Bedingungen (Tabelle 9) elektroporiert.

<i>Parameter</i>	<i>CHO-Zellen</i>	<i>COS7-Zellen</i>
Spannung	420 V	260 V
Kapazität	250 µF	600 µF
Gerätewiderstand	129 Ω	72 Ω
Stromdichte	1,06 kV/cm	0,65 kV/cm
Pulsdauer	~3,5 ms	~7 ms

Tabelle 13: Elektroporationsbedingungen für CHO- und COS7-Zellen im ECM600 (BTX, San Diego, CA, USA)

Nach der Elektroporation wurden die Zellen in Medium mit 3 mM EGTA überführt und für 30 min im Inkubator inkubiert. Durch Zentrifugation (300 g_{av} , 5 min) wurden die Zellen sedimentiert. Das Pellet wurde in Medium aufgenommen und auf 1 bis 2 neue Kulturplatten pro Ausgangsplatte überführt.

Am nächsten Tag wurden die Kulturplatten am inversen Mikroskop kontrolliert und gegebenenfalls wurden die Zellen auf andere Unterlagen wie Wellplates oder beschichtete Deckgläschen transferiert. In jedem Fall wurde das Medium am nächsten Tag gewechselt. Am zweiten Tag nach der Elektroporation wurden die Zellen für die nachfolgenden Anwendungen verwendet.

3.3.3.8 Expressionsstimulation mit Natriumbutyrat

Natriumbutyrat steigert die Expression von Genen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Für die Präparation von Membranfraktionen mit heterolog exprimierter NTPDase3 wurden die Zellen nach der Transfektion mit Natriumbutyrat behandelt. Dazu wurde dem Medium maximal 16 h vor der Zellernte Natriumbutyrat in einer Endkonzentration von 6 mM zugegesetzt.

3.3.4 Herstellung der verwendeten Antikörper

3.3.4.1 Herstellung der Antikörper N3-1, N3-2 und N3-3

Nach der Analyse der Sequenzdaten und einer Überprüfung der katalytischen Aktivität der heterolog exprimierten NTPDase3 wurden 9 mg Plasmid-DNA (NTPDase3-cDNA im pcDNA3-Vektor) an das Labor von Dr. Jean Sévigny⁸ geschickt. Die cDNA wurde für die Antikörper-Gewinnung durch genetische Immunisierung (Liu, 1995) genutzt.

Dazu wurde die DNA in drei Kaninchen appliziert, welche in Folge das NTPDase3-Protein heterolog exprimieren sollten, um Antikörper gegen das Ratten-Protein zu bilden. Da es sich bei Ratte und Kaninchen in beiden Fällen um Säugetiere handelt, kann man davon ausgehen, daß Unterschiede bezüglich Faltung, Verzuckerung und des intrazellulären Transportweges vernachlässigbar sind. Die auf diese Weise exprimierte NTPDase3 entspricht daher mit hoher Wahrscheinlichkeit dem nativen Protein und stellt ein geeignetes Antigen dar.

⁸ Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, 2705 Blvd Laurier, Local T1-49, Sainte-Foy, Quebec, G1V 4G2, Canada

Nach vier Antigen-Applikationen (i1-i4) wurden die Antiseren N3-1i4, N3-2i4 und N3-3i4 aus den Kaninchen gewonnen und unserem Labor wurden 3 ml Antiserum pro Tier zur Verfügung gestellt.

3.3.4.2 Herstellung der Peptid-Antikörper 264fb und 265fb

Die Firma Eurogentec (Southampton , UK) stellte in 2 Kaninchen Antiseren gegen eine Peptidsequenz (CRSENAFDQAVDSD) aus dem C-terminus der Ratten-NTPDase3 her. Das Peptid mit über 70 % garantierter Reinheit wurde über das Cystein an Hemo-cyamin als Träger gebunden. Die Tiere wurden 4 mal (Tag 0, Tag 14, Tag 28, Tag 56) immunisiert. Das finale Antiserum wurde nach der Lieferung zur weiteren Verwendung in geeigneten Aliquots bei -80 °C gelagert.

3.3.5 Biochemische Methoden

3.3.5.1 Herstellung von Membranfraktionen aus transfizierten Zellen

Waschpuffer: 20 mM MOPS; 140 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,5 mM EDTA; pH 7,4

Homogenisationspuffer: 30 mM MOPS; 250 mM Sucrose; 2 mM EDTA; 2 mM Iodoacetamid; Proteaseinhibitoren (PIB/PIC/PID 1:1000); pH 7,4

Lagerungspuffer: 25 mM Hepes; 50 % (v/v) Glycerin; Proteaseinhibitoren (PIB/PIC/PID 1:1000); 2 mM Iodoacetamid; pH 7,4

Alle Lösungen wurden kalt gestellt und die Arbeiten fanden im Kühlraum bzw. in Kühl-zentrifugen bei 4 °C statt. Die Kulturplatten mit den transfizierten Zellen wurden 3 mal mit Waschpuffer gewaschen. Nach dem Abziehen des letzten Waschpuffers wurden 2.5 ml Homogenisationspuffer auf die Kulturplatte gegeben und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Plattenoberfläche gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 2,5 ml Homogenisationspuffer nachgespült. Bei 300 g und 4 °C wurden die Zellen für 5 min sedimentiert und das Pellet wurde in 1 ml Homogenisationspuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Glas-Teflon- Homogenisator (Potter-Elvehjem-Homogenisator) aufgeschlossen. Grobe Zell-trümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch erneutes Zentrifugieren (300 g_{av}, 4 °C, 10 min) pelletiert. Der Überstand wurde 15 Pulsen Ultraschallbehandlung ausgesetzt, bevor er für 60 min bei 100.000 g_{av} zentrifugiert wurde. Das Ultra-

zentrifugationspellet wurde mit Hilfe des Glas- Teflon-Homogenisators in 500 μ l Lagerungspuffer resuspendiert. Vor der Verwendung der Membranfraktion wurden Proteingehalt und die katalytische Aktivität bestimmt.

3.3.5.2 Herstellung von Membranfraktionen aus Geweben

Die Organe wurden zügig aus einer frisch getöteten Ratte (Wistar-Ratte, Charles River Lab., Sulzfeld, Deutschland) präpariert, direkt weiterverarbeitet oder bei -80 °C bis zur weiteren Aufbereitung gelagert. Alle folgenden Arbeiten fanden auf Eis bzw. im Kühlraum statt. Zum Vorbereiten der Gewebe für den Glas-Teflon-Homogenisator wurden die weichen Gewebe mit dem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und eingewogen. Rigidere Gewebe wurden nach Einwaage und Zugabe des Homogenisationspuffers mit dem Ultrathurax® zerkleinert. Pro 1 g Gewebe wurden 5 ml Homogenisationspuffer zugesetzt und die Gewebe wurden im Glas-Teflon-Homogenisator aufgeschlossen. Die Suspension wurde zentrifugiert (300 g_{av} , 10 min, 4 °C) und der Überstand wurde in der Ultrazentrifuge eine Stunde bei 100.000 g_{av} und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in Aufbewahrungspuffer oder ConA-Bindepuffer aufgenommen. Für die weitere Verwendung wurde die Proteinmenge bestimmt.

3.3.5.3 ConcavalinA-Reinigung im Batch-Verfahren

Waschpuffer: 20 mM Tris/Cl; 150 mM NaCl; pH 7,4

Bindepuffer: 20 mM Tris/Cl; 150 mM NaCl; 2 mM CaCl₂; 2 mM MgCl₂; 2 mM MnCl₂; 0,1 % TritonX 100; pH 7,4

Elutionspuffer: 200 mM Methyl- α (D)-Mannosid in Bindepuffer

Die Membranfraktion wurde entweder nach der Präparation direkt in Bindepuffer aufgenommen oder durch Mischen mit entsprechend konzentrierten Stammlösungen eingestellt. Pro mg Protein der Membranfraktion wurden 100 μ l ConA-Sepharose-Suspension verwendet. Die ConA-Sepharose wurde 5 mal mit Waschpuffer gewaschen. Die in Bindepuffer solubilisierten Membranfraktionen wurden in 2 ml Reaktionsgefäße vorgelegt und die ConA-Sepharose zugegeben. Über Nacht wurde die Suspension unter ständiger Durchmischung bei 4 °C inkubiert. Die ConA-Sepharose wurde durch Zentrifugation (5 min, 1000 g_{av} , 4 °C) pelletiert und das Pellet wurde dreimal für 10 min mit Bindepuffer gewaschen. Zur Elution wurde das Pellet nach dem letzten Waschgang

in 1 ml Elutionspuffer resuspendiert und für 30 min bei 4 °C und guter Durchmischung inkubiert. Die ConA-Sepharose wurde durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Zur Verwendung des ConA-Eluates in einem Western-Blot wurde die Lösung über Nacht mit Trichloressigsäure gefällt.

3.3.5.4 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

DOC-Lsg: 0,15 % (w/v) Deoxicholinacid in H_2O_{bidest}

Die Proteinlösung wurde mit H_2O_{bidest} auf ein Volumen von 1 ml gebracht. Dem wurden 10 µl DOC-Lösung zugegeben. Nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 250 µl 50 %ige Trichloressigsäure zugegeben und mindestens eine Stunde auf Eis oder über Nacht bei 4 °C gefällt. Das Präzipitat wurde durch 60minütige Zentrifugation (4 °C, 15.000 g_{av}) pelletiert und in einer geeigneten Lösung aufgenommen.

3.3.5.5 Proteinbestimmung nach Spector

Spector-Lsg.: 100 mg BrilliantBlau G250; 5 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) 85% Phosphorsäure

BSA-Lsg.: 100 µg/ml Rinderblutserumalbumin (BSA) in H_2O_{demin}

Der Protein-Assay nach Spector (Spector, 1978) stellt eine Abwandlung des Bradford-Assays dar, der auf einer Färbung der Proteine mit Coomassie blue basiert. Der Farbstoff bindet dabei in seiner unprotonierten Form an kationische und nichtpolare, hydrophobe Proteinseitenketten, insbesondere Arginin. Dabei verschiebt sich die Wellenlänge des Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm.

Zu 100 µl Proteinlösung wurden 900 µl Spectorlösung gegeben. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden. Als Eichreihe wurde eine Konzentrationsreihe mit BSA, von 0 bis 8 µg/ml in 1 µg/ml – Schritten verwendet.

3.3.5.6 Proteinbestimmung nach Peterson

CTC: 25 ml 0,4 % CuSO₄; 25 ml 0,8 % K⁺-Na⁺-Tatrat; 50 ml 20 % N₂CO₃

Reagenz A: 1 Teil CTC; 1 Teil 10 % (w/v) SDS; 1 Teil 0,8 M NaOH; 1 Teil H₂O

Reagenz B: 1 Teil Folin Ciocalteu-Reagenz; 5 Teile H₂O_{demin}

BSA-Lsg.: 100 µg/ml BSA in 0,1 M NaOH

Die Proteinbestimmung nach Peterson (Peterson, 1977) basiert auf einem modifizierten Lowry-Assay bei dem vornehmlich durch Tyrosin- und Tryptophan-Reste Kupfer in einem Kupfer-Protein-Komplex reduziert wird. Das reduzierte Kupfer reagiert mit dem Molybdat und Wolfram des Folin-Ciocalteu-Reagenzes (Merk, Darmstadt, Deutschland) und verursacht eine Farbreaktion. Da die Peterson-Reaktion sehr empfindlich auf verschiedene Chemikalien, wie z.B. gebräuchliche Detergenzien, reagiert war es notwendig, die Proteinproben vor dem Assay zu fällen.

Das gefällte Protein wurde in 200 – 1.000 µl 0,1 M NaOH aufgenommen. 200 µl der Proteinlösung, gegebenenfalls in verschiedenen Verdünnungen, wurden mit 200 µl Lösung A gemischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 100 µl Lösung B versetzt. Die Lösung wurde unmittelbar nach der Zugabe von Lösung B gründlich gemischt. Nach 30 min wurde der Proteingehalt bei einer Wellenlänge von 750 nm kolorimetrisch bestimmt. Für die Eichreihe wurde BSA, welches in 0,1 M Natronlauge gelöst war, im Bereich 0 bis 16 µg/ml in 2 µg/ml-Schritten verwendet.

3.3.5.7 Westernblot

PBST: 132 mM NaCl; 7,4 mM Na₂HPO₄; 4,3 mM KH₂PO₄; 0,1 % (v/v) Tween20; pH 7,4

5x Ladepuffer: 5 % (v/v) Glycerin; 10 % (w/v) SDS; 0,4 M Tris/HCl; 0,006 % (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8

Elektrophoresepuffer: 1,21 % (w/v) Tris; 0,75 % (w/v) Glyzin; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,6

Transferpuffer: 25 mM Tris/HCl; 192 mM Glyzin; 0,05 % SDS; 1 mM EDTA; 20 % (v/v) Methanol; pH 8,3

4x Trenngel: 10 ml 30 % (w/v) Acrylamid; 3,9 ml 1 % (w/v) Bisacrylamid, 11,2 ml 1 M Tris/Cl pH 8,7; 4,3 ml Aqua_{demin.}, 150 µl 20 % (w/v) SDS; 30 µl

N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED); 150 µl 10 % (w/v)
Amoniumpersulfat (APS)

4x Sammelgel: 1,7 ml 30 % (w/v) Acrylamid; 1,3 ml 1 % (w/v) Bisacrylamid, 5,0 ml
250 mM Tris/Cl pH 6,8; 2,0 ml Aqua_{demin.}, 50 µl 10 % SDS; 50 µl
TEMED; 150 µl 10 % APS

Die Gelkammern wurden zusammgebaut und das Trenngel wurde mit Ausnahme des SDS und der Polymerisationsstarter (TEMED, APS) gemischt. Die Lösung wurde 10 min lang entgast und anschließend wurden SDS, TEMED und APS zugegeben. Durch vorsichtiges Schwenken wurde die Lösung gemischt und zum Polymerisieren in die Gelkammern gegossen. Für einen besseren Abschluß wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des PAA-Gels wurde das Isopropanol dekantiert und das Sammelgel in gleicher Weise vorbereitet und auf das Trenngel gegossen.

Zur Probenvorbereitung wurde die Proteinlösung mit $\frac{1}{5}$ Volumen 5x Ladepuffer versetzt. Bei einem Western-Blot unter reduzierenden Bedingungen wurde dem Probenpuffer 100 mM Dithiothreitol zugesetzt. Neben den Proben wurden für gewöhnlich ein oder mehrere Größenstandards aufgetragen.

Nach dem Entfernen der Kämmen und Dichtungsgummis wurden die Gele in die Gelapparaturen (Biometra Minigel-Twin) eingespannt und die Apparaturen wurden mit Elektrophoresepuffer beschickt. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden entfernt und die Geltaschen mit Elektrophoresepuffer durchgespült. Anschließend wurden die Taschen des Gels mit den Proben beladen. Das Gel lief bei 5 mA bis die Bromphenolblaubande das Trenngel erreichte und wurde dann bei 15 – 20 mA gefahren bis der Farbstoff ca. 5 mm vor Gelende angekommen war.

Eine auf Gelgröße zurecht geschnittene Nitrozellulosemembran (Protran85) und Whatman®-Papier wurden mit Transferpuffer getränkt. Für den Blot wurde das Polyacrylamidgel auf der Membran positioniert. Gel und Membran waren zwischen zwei dreilagigen Stapeln aus Whatman®-Papier platziert. In der Semi-Dry-Elektroblotapparatur wurden die Proteine aus dem Gel auf die Membran transferiert. Dazu wurde eine Spannung von 150 mA pro in der Blotapparatur befindlichem Gel angelegt und es wurde für 45 min geblottet.

Die Ecken des Gels und die Banden des farbmarkierten Standards (Benchmark Prestained Protein Ladder, Invitrogen) wurden mit Kugelschreiber auf der Membran eingezeichnet. Zur Absättigung freier Proteinbindungsstellen (quenchen) auf der Nitrozellulosemembran wurde diese in PBST mit 5 % (w/v) Magermilchpulver 30 min inkubiert. Nach dem Absättigen der Membran wurde die Milchpulverlösung gegen die Erstantikörperlösung (AK in PBST mit 1 % (w/v) BSA und 0,1 % (w/v) Natriumazid) ausgetauscht. Der Erstantikörper wurde mindestens zwei Stunden lang bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C appliziert. Anschließend wurde die Membran 5 mal für jeweils 5 min mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBST gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Zweitantikörper (Anti-rabbit, IgG, horseradish-Konjugat, Sigma-Aldrich in PBST mit 1 % BSA) für eine Stunde bei Raumtemperatur mit der Membran geschüttelt. Danach wurde der Blot 3 mal für 10 min mit PBST gewaschen.

Für den Nachweis der Proteinbanden wurde der Blot für 1 min in ECL-Lösung (Amersham Pharmacia) geschwenkt, kurz am Küvettenrand abgestreift und in Frischhaltefolie eingeschlagen. Die an den Zweitantikörper konjugierte Meerrettichperoxidase setzte das ECL-Substrat um und erzeugte auf diese Weise eine Chemilumineszenz. Die Ecken der Membran sowie sichtbare Markerbanden wurden mit einem Lackstift auf der Frischhaltefolie nachgezeichnet und der so präparierte Blot wurde bei Rotlicht für 5 min mit einem Film (High Performance Chemiluminescens film, Amersham Bioscience) abgedeckt. Mit Bleistift wurden auf dem Film die Ecken des Blots sowie auf der Membran verzeichnete Markerbanden übertragen. Der Film wurde für 2 min im Entwickler (Roentgen liquid, Tenetal) geschwenkt, kurz mit Wasser abgespült, und 5 min lang fixiert (Roentgen SuperFix, Teneteal). Nach dem Fixieren wurde der entwickelte Film ca. 15 min lang gewässert und dann zum Trocknen aufgehängt. Je nach Intensität der Chemilumineszenz wurde die Expositionszeit angepasst. Bei sehr schwachen Signalen wurde ECL^{Plus} (Amersham Pharmacia) benutzt, welches stärker und nach Herstellerangaben bis zu 2 Stunden luminesziert.

<i>Antiserum</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Anmerkungen</i>
N3-1i4	1:2.000	aus genet. Immunisierung von Dr. J. Sévigny; Gewebe-MF vorher ConA – reinigen; nicht reduzierende Gele
N3-2i4	1:2.000	aus genet. Immunisierung von Dr. J. Sévigny; Gewebe-MF vorher ConA – reinigen; nicht reduzierende Gele
N3-3i4	1:2.000	aus genet. Immunisierung von Dr. J. Sévigny; Gewebe-MF vorher ConA – reinigen; nicht reduzierende Gele
264fb	1:2.000	Peptid-AK von Eurogentec; Gewebe-MF vorher ConA – reinigen; reduzierende Gele
265fb	1:2.000	Peptid-AK von Eurogentec; Gewebe-MF vorher ConA – reinigen; reduzierende Gele
anti-rb-horseradish-peroxidase-Konjugat	1:2.000	kommerzieller 2.AK (Sigma-Aldrich)

Tabelle 14: für Westernblots verwendete Antikörper und Verdünnung

3.3.5.8 Ponceau S – Färbung der Nitrozellulosemembran

Ponceau-S-Lösung: 0,2 % (w/v) Ponceau S; 3,0 % (w/v) Trichloressigsäure

Um Proteinbanden auf Nitrozellulosemembranen sichtbar zu machen, können die Proteine mit Ponceaurot reversibel gefärbt werden. Der Farbstoff ist wasserlöslich und kann wieder herausgewaschen werden. Dazu wurde die Membran nach dem Blotten für 1-2 min in der Färbelösung geschwenkt und anschließend so lange mit H₂O_{demin} gewaschen bis die Hintergrundfärbung verschwand und Banden sichtbar wurden.

3.3.5.9 Antikörperreinigung am immobilisierten Antigen

Zur Affinitätsreinigung der gelieferten Antiseren sollten die spezifischen Antikörper des Antiserums an heterolog exprimierte Antigen gebunden und nach Waschschrritten wieder eluiert werden.

Als Antigen wurde die heterolog in CHO-Zellen exprimierte NTPDase3 verwendet. Dazu wurde Membranfraktion transfizierter Zellen, wie bereits für den Westernblot beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Da es sich um einen

präparativen Ansatz handelte wurden, 3 bis 6 PAA-Gele angefertigt, die mit jeweils 300 µg Protein pro Gel beladen wurden. Um den Gerverlauf sichtbar zu machen, wurden die Nitrozellulosemembranen nach dem Blotting mit Ponceau S gefärbt. Der Größenbereich, in dem sich das NTPDase3-Band befand, wurde anhand eines farblich markierten Protein-Größenstandards (Benchmark Prestained Protein Ladder, Invitrogen) identifiziert und aus der Membran ausgeschnitten. Die antigenhaltigen Membranstreifen wurden durch 30 minütiges Schwenken in 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBST mit Protein abgesättigt, um unspezifische Bindungen zu unterdrücken. Anschließend wurden die Membranstreifen mit 10 ml Antiserumlösung (1 ml Antiserum + 9 ml PBST mit 5 % (w/v) Magermilchpulver und 0,1 % Natriumazid) aufgenommen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit den Membranstreifen inkubiert. Die Serum-Lösung wurde zur wiederholten Anwendung bei 4 °C gelagert. Die Membranen wurden zweimal 5 min mit je 10 ml PBS und anschließend 3 mal für 10 min mit je 10 ml 5 mM Tris/Cl pH 7,4 gewaschen. Die Elution der Antikörper erfolgte durch 5 minütiges Schütteln mit 3 ml Elutionspuffer (0,1 M Essigsäure; 150 mM NaCl). Das Eluat wurde in ein 15 ml Gefäß überführt und zur Neutralisation mit 300 µl 1 M Tris-Lösung versetzt.

Für die nächste Antikörper-Adsorption wurden die Membranstreifen 2 x 5 min lang mit 10 ml 50 mM Tris/Cl pH 7,4 neutralisiert. Danach konnten die Membranstreifen erneut gequantscht und die Arbeitsschritte von der Antiseruminkubation bis zur Elution wiederholt werden. Insgesamt wurde die Antiserumlösung 5 x an die Membranstreifen adsorbiert.

Um das Volumen des Eluats einzuengen, wurde die Lösung über ein Molekularsieb (CentriPrep® Centrifugal Concentrators, Amicon) konzentriert. Dazu wurde der affinitätsgereinigte Antikörper mit 1 % (w/v) BSA und 0,1 % (w/v) Natriumazid versetzt und die Amiconsäule beschickt. Bei 1000 g_{av} und 4 °C wurde zentrifugiert, bis das Volumen in der Säule ca. $\frac{1}{10}$ des Ausgangsvolumen betrug. Die Antikörperlösung wurde mit 15 ml 0,1 % Natriumazid in PBS aufgefüllt und wiederholt eingengt. Dieser Waschschrift wurde mit 5 ml 0,1 % Natriumazid in PBS wiederholt. Das Endvolumen betrug $\frac{1}{10}$ der ursprünglichen Antikörperlösung.

3.3.5.10 Antikörperreinigung durch Adsorption unspezifischer Antikörper

Wenn die aus Geweben isolierten Membranfraktionen vor der Verwendung im Western-Blot nicht über ConA-Sepharose partiell gereinigt wurden, war im Westernblot eine hohe Anzahl unspezifisch markierter Banden zu finden. Selbst unter Verwendung ConA-gereinigter Membranfraktionen wurden noch einzelne unspezifische Proteinbanden markiert. Um die Anzahl der unspezifisch markierten Banden zu reduzieren wurde der Erstantikörper vor seiner Anwendung auf dem eigentlichen Westernblot an Nitrozellulosemembranen mit nicht-ConA-gereinigter Membranfraktion adsorbiert. Auf diese Weise sollte zumindest ein Teil der unspezifisch bindenden Antikörper an Proteine der ungereinigten Membranfraktion binden und der Hintergrund im eigentlichen Blot reduziert werden. Zu diesem Zweck wurde aus Gewebe stammende Membranfraktion ohne vorherige ConA-Reinigung in einer Menge von 200 bis 300 µg Protein pro PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Für jeden zu reinigenden Erstantikörper wurden 3 solcher Gele angefertigt und anschließend geblottet. Die Membranen wurden mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBST für 30 min gequentscht. Der Erstantikörper (1:2000 in 10 ml PBST, 1 % (w/v) BSA und 0,1 % (w/v) Natriumazid; siehe S. 50, *Westernblot*) wurde nacheinander für je 45 min bei Raumtemperatur mit jedem einzelem der 3 Blots inkubiert. Anschließend wurde der auf diese Weise behandelte Erstantikörper direkt für den eigentlichen Westernblot verwendet oder bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.3.5.11 Phosphatbestimmung nach Lanzetta

Malachitgrün-Lsg.: 0,045 % (w/v) Malachitgrün in H₂O_{bidest}

Molybdat-Lsg: 4,2 % (w/v) Ammoniummolybdat in 4 M HCl

Citrat-Lösung: 34 % (w/v) Tri-Natriumcitrat-Hexahydrat

Zum Nachweis von anorganischem Phosphat (PO₄) wurde der Phosphat-Assay nach Lanzetta (Lanzetta et al., 1979) verwendet. 3 Teile Malachitgrünlösung und 1 Teil Molybdatlösung wurden gemischt und gerührt. Nach 5 min wurde ¹/₅₀ Vol. Tween20 zugeben und nochmals 1 h gerührt. Die Lösung wurde 2 mal mit Blaubandfiltern (Schleicher&Schuell) gefiltert und in eine Braunglasflasche überführt.

Zu 100 µl Probe wurden 800 µl Lanzetta-Lösung gegeben. Nach 1 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Natriumcitrat-Lösung gestoppt. Die Lösung wurde 30 min lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 640 nm photometrisch gemessen. Als Referenz diente eine KH_2PO_4 -Konzentrationsreihe von 0 bis 10 µM in 1 µM-Schritten.

3.3.5.12 Untersuchung zur Abhängigkeit der NTPDase3 von Magnesium- und Kalzium-Ionen

Die enzymatische Aktivität von Membranfraktionen aus NTPDase3-transfizierten CHO-Zellen und Mock-transfizierten CHO-Zellen wurden für jede Kalzium- bzw. Magnesiumkonzentration in Dreifachbestimmung gemessen. Die Kalzium- oder Magnesiumkonzentrationsreihe umfasste die Konzentrationen: 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM, 800 µM, 1.000 µM. Als Substrat wurden 500 µM NaATP und NaADP in 25 mM Hepes pH 7,4 eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert, 2 min lang bei 95 °C inaktiviert und die Orthophosphatmenge wurde mittels Lanzetta ermittelt. Um den Einfluß der bereits in der Membranfraktion enthaltenen Kationen ermitteln zu können, wurde die Aktivität in Anwesenheit von 1 mM EDTA untersucht.

Die Messwerte wurden auf pmol Pi/(µg*min) umgerechnet und um den Mock-Wert⁹ korrigiert. Anschließend wurden die Werte für die ATP- und ADP-Hydrolyse auf den Maximalwert normiert und graphisch aufgetragen. 100 % (±SD, n=3) entsprachen für die ATP-Hydrolyse 452±23 pmol Pi/(µg*min) und für die ADP-Hydrolyse 94±7 pmol Pi/(µg*min).

3.3.5.13 HPLC-Analyse zum Hydrolyseverhalten der NTPDase3

HPLC-Puffer: 50 mM Phosphatpuffer; 6 % (v/v) Methanol; 5 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAHS); pH 6,54

Von 3 verschiedenen Membranfraktionen aus NTPDase3-transfizierten CHO-Zellen wurde in Vorversuchen die ATPase-Aktivität bestimmt. Für die Ansätze wurde eine vergleichbare Aktivität (7,9 nmol Pi/min) eingesetzt. Als Kontrolle dienten Membran-

9 gemessen an Membranfraktionen aus Zellen, welche mit leerem Vektor transfiziert wurden

fraktionen von Mock-transfizierten CHO-Zellen. 250 μM ATP in 25 mM Hepes pH 7,4 und 250 μM Kalzium wurden 0, 5, 20 und 45 min mit den Membranfraktionen inkubiert. Für jeden Zeitpunkt und jede Membranfraktionen wurden drei Messpunkte ermittelt. Die Reaktion wurde durch 2minütige Inkubation bei bei 95 °C gestoppt.

Zur Bestimmung der Nukleotidhydrolyse mittels HPLC wurden die Proben 15 min bei 20.000 g_{av} zentrifugiert und der Überstand wurde 1:3 verdünnt. Zur Auftrennung in der HPLC (Jasco) wurde eine Sepsil C18 40x4,5 mm Säule (Jasco) verwendet. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und mit der Borwin HPLC-Software (Jasco) ausgewertet.

	Membranfraktion 1	Membranfraktion 2	Membranfraktion 3
Mock	11,5 $\mu\text{g}/\text{Assay}$	2,31 $\mu\text{g}/\text{Assay}$	5,61 $\mu\text{g}/\text{Assay}$
NTPDase3	11,5 $\mu\text{g}/\text{Assay}$	2,31 $\mu\text{g}/\text{Assay}$	5,61 $\mu\text{g}/\text{Assay}$

Tabelle 15: für die Produktanalyse eingesetzte Proteinmengen

Die Nukleotidmenge wurde über die Fläche der Peaks bestimmt. 100 % entsprachen einer ATP-Menge von 50 nmol. Die drei Membranfraktionen wurden um den Mock-Wert korrigiert und die Veränderung der Flächenanteile wurde über die Zeit aufgetragen.

3.3.5.14 Untersuchung zur Substratspezifität der NTPDase3

Mit verschiedenen Substraten wurden Zeitreihen (0 min, 10 min, 20 min, 30 min) gemessen. Die Reaktion fand bei 37 °C statt, wurde zum Stoppen für 2 min bei 95 °C erhitzt und das entstandene Orthophosphat wurde nach Lanzetta quantifiziert. Alle Substrate (Natriumsalze) lagen in einer Konzentration von 500 μM vor. Untersucht wurde die Hydrolyse der Nukleosidtriphosphate ATP, CTP, GTP, ITP und UTP sowie der Nukleosiddiphosphate ADP, CDP, GDP, IDP und UDP. Die Reaktion fand in 200 μl Reaktionsansätzen mit 20 mM Hepes pH 7,4 und 500 μM CaCl_2 statt. Die Substratspezifität wurde anhand von 3 unabhängigen Messungen mit jeweils Doppelbestimmung untersucht. Als Kontrolle dienten Membranfraktionen Mock-transfizierter CHO-Zellen.

Das entstehende Orthophosphat wurde nach Lanzetta bestimmt und aus den Werten

wurde die Steigung $\text{nmol Pi} / (\mu\text{g} \cdot \text{min})$ errechnet. Die Ergebnisse wurden für jede Membranfraktion (MF) auf den ATP-Umsatz normiert und anschließend wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. 100 % entsprachen für die einzelnen Membranfraktionen in $\text{pmol}/(\mu\text{g} \cdot \text{min})$: MF1= 62; MF2= 243; MF3= 92 und für ITP/IDP MF1= 149; MF2= 94; MF3= 80.

3.3.5.15 Bestimmung des pH-Optimums der NTPDase3

Die pH-Abhängigkeit wurde unter Verwendung von Membranfraktionen untersucht. Die Reaktion fand in $200 \mu\text{l}$ 25 mM HEPES/Glycin-Puffer mit $500 \mu\text{M}$ NaATP als Substrat statt. Die pH-Werte variierten im Bereich 3 bis 10. Als zweiwertige Ionen wurden $500 \mu\text{M}$ Ca^{2+} oder $500 \mu\text{M}$ Mg^{2+} eingesetzt. Die Reaktion wurde für 20 min bei 37°C durchgeführt und wurde anschließend durch Hitze-Inaktivierung (2 min, 95°C) gestoppt. Für jeden Meßpunkt wurde in Doppellbestimmung die freigesetzte Orthophosphatmenge bestimmt.

Nach der Korrektur der NTPDase3-Werte um die jeweiligen Mock-Werte wurde die Aktivität in $\text{pmol}/(\mu\text{g} \cdot \text{min})$ bestimmt. Anschließend wurden die Werte auf den Maximalwert der betreffenden Membranfraktion normiert. 100 % ATPase-Aktivität entsprachen für die Kalziumkurve in $\text{pmol}/(\mu\text{g} \cdot \text{min})$: MF1= 164,6; MF2= 1.317,7; MF3= 439,8. Für die Magnesiumkurve entsprachen 100 % ATPase-Aktivität in $\text{pmol}/(\mu\text{g} \cdot \text{min})$: MF1= 112,9; MF2= 755,0; MF3= 242,5. Aus den Prozentangaben wurden über die drei Membranfraktionen Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM) berechnet. Die Aktivität wurde in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgetragen.

3.3.6 Immunzytologie

Für immunzytologische Untersuchungen wurden die Zellen auf Poly(D)-Lysin beschichteten Deckgläschen in 24-Wellplates angezogen. Die Beschichtung diente als Matrix, an der die Zellen adhären konnten. Pro Deckgläschen wurden 15.000 Zellen ausplattiert. Zur mikroskopischen Analyse wurden die Zellen markiert, fixiert und eingebettet. Über eine an das Axiophot Fluoreszenzmikroskops (Zeiss) angeschlossene CCD-Kamera wurden die Bilder mit MCID-Software (Imaging Research) digital aufgezeichnet.

3.3.6.1 Poly(D)-Lysin-Beschichtung von Deckgläschen

Zur Sterilisation wurden die Deckgläschen bei 180 °C für 3 h gebacken. Nach dem Abkühlen wurden sie in steriler Umgebung (Cleanbench) 30 min lang mit 100 µl Poly(D)-Lysin (10 µg/ml) überschichtet. Zur Entfernung von überflüssigem Poly(D)-Lysin wurden die Deckgläschen anschließend 3 mal mit H₂O_{MiliiQ} gewaschen. Die beschichteten Deckgläschen wurden in 24-Wellplates platziert und bei Raumtemperatur getrocknet.

3.3.6.2 Native Markierung der Zellen

slow fading-Medium: 25,0 % (v/v) Glycerin; 10,0 % (v/v) Moviol; 2,5 % (v/v) DABCO; 0,1 M Tris/Cl pH 8,5

Zur Oberflächenmarkierung intakter Zellen wurde der Erstantikörper vor dem Fixieren eingesetzt. Das Deckgläschen wurde direkt nach der Entnahme aus dem Kulturmedium mit ~50 µl Erstantikörper in PBS mit 1 % BSA beschichtet und für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen 3 x mit PBS gewaschen und 7 min lang bei -20 °C mit vorgekühltem Methanol fixiert. Danach wurden die Deckgläschen zügig in PBS gewaschen, um ein Austrocknen des Präparates zu vermeiden. Eine 15 minütige Inkubation mit 5 % (w/v) BSA in PBS diente zur Absättigung unspezifischer Bindestellen. Unter Lichtausschluß wurde das Präparat dann mit dem Zweitantikörper in PBS mit 1 % (w/v) BSA und 1 µg/ml DAPI 30 min lang inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde das Deckgläschen in slow fading-Medium eingebettet.

3.3.6.3 Immunzytologie nach Methanol/Aceton-Fixierung

Die Deckgläschen wurden 3x mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen für 7 min bei -20 °C mit vorgekühltem Methanol oder Aceton fixiert. Das Präparat wurde anschließend 3 x mit PBS gewaschen und 15 min lang mit 5 % (w/v) BSA in PBS gequentscht. Mit 50 µl Erstantikörper (in PBS, 1 % (w/v) BSA) wurden die Deckgläschen vollständig benetzt und für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen 3 x in PBS gewaschen und für 15 min mit 5 % (w/v) BSA in PBS abgesättigt. Der Zweitantikörper (in PBS, 1 % (w/v) BSA, 1 µg/ml DAPI) wurde auf die Deckgläschen gegeben und 30 min lang unter Lichtausschluß inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde das Deckgläschen in slow fading-Medium

eingebettet.

3.3.6.4 Immunzytologie nach Paraformaldehyd-Fixierung

Die Deckgläschen mit den Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen und dann bei Raumtemperatur für 7 min mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Die fixierten Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen, 15 min lang mit 1 % (v/v) Triton X100 in PBS aufgeschlossen und für 15 min mit 5 % (w/v) BSA in PBS abgesättigt. 50 µl Erstantikörper (in PBS, 1 % (w/v) BSA) wurden auf die Deckgläschen geschichtet und für 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde nochmals 15 min lang mit 5 % (w/v) BSA in PBS gequentscht. Anschließend wurden die Präparate für 30 min mit dem Zweitantikörper (in PBS, 1 % (w/v) BSA, 1 µg/ml DAPI) unter Lichtausschluß inkubiert. Die Deckgläschen wurden 3x mit PBS gewaschen und in slow fading-Medium eingebettet.

3.3.6.5 Immunzytologie an transfizierten CHO-Zellen

CHO-Zellen wurden mit den cDNAs der NTPDase3 im Expressionsvektor pcDNA3 transfiziert. Am ersten Tag nach der Elektroporation wurden je 15.000 Zellen auf Poly-D-Lysin beschichtete Deckgläschen ausplattiert und in 24-Wellplates kultiviert. Zwei Tage nach der Elektroporation wurden die Zellen nativ mit den NTPDase3-Antikörpern N3-1i4 (1:2000), N3-2i4 (1:2000) und N3-3i4 (1:1000) markiert. Zur Kontrolle auf unspezifische Reaktionen wurden Mock-transfizierte CHO-Zellen, sowie mit NTPDase1- und NTPDase2 - transfizierte CHO-Zellen ebenfalls untersucht. Als Transfektionskontrolle wurden NTPDase1- und NTPDase2 - transfizierte CHO-Zellen nativ mit Antikörpern gegen die jeweiligen Enzyme markiert (NTPDase1: C92B2, 1:600; NTPDase2: BZ3B4, 1:2.000). Als Zweitantikörper diente α -rb-Cy3 (Dianova). Dieser wurde 1:400 in PBS mit 1 % (w/v) BSA verdünnt. Zur Kernfärbung wurde dem Zweitantikörper DAPI (1 µg/ml) zugesetzt.

3.3.6.6 Immunzytologie an NGF-stimulierten PC12-Zellen

PC12-Zellen wurden für 2 Wochen mit 50 ng/ml NGF kultiviert (siehe S. 44, *NGF-Stimulation von PC12-Zellen*). Die Zellen wurden anschließend nativ mit dem Antikörper N3-1i4 (1:1000) markiert. Zur Kontrolle wurden Zellen mit dem Präimmuns serum (N3-1pi, 1:1000) angefärbt. Als Zweitantikörper diente α -rb-Cy3 (1:400 in PBS mit 1 % BSA), dem zur Kernfärbung DAPI (1 μ g/ml) zugesetzt war.

3.3.6.7 Immunzytologie an primären Cortex-Kulturen

Die Cortex-Primärkulturen wurden von Marco Morciano präpariert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. 27 Tage alte Kulturen in Neurobasalmedium wurden nativ mit N3-3i4 (1:500) markiert. Als Kontrolle wurde das Präimmuns erum N3-3pi (1:400) verwendet. Als Zweitantikörper diente α -rb-Cy3 (1:400 in PBS mit 1 % BSA), dem zur Kernfärbung 1 μ g/ml DAPI zugesetzt war.

3.3.7 Immunhistologie

3.3.7.1 Beschichtung der Objektträger mit Poly(L)-Lysin

Die Objektträger wurden zum Entfetten 5 min lang in Aceton inkubiert. Nach dem Abdampfen des Acetons wurden die Objektträger in die Poly(L)-Lysin-Lösung (0,1 % (w/v) Poly(L)-Lysin in H_2O_{bidest}) getaucht und an der Luft getrocknet.

3.3.7.2 Beschichtung der Objektträger mit APES

Die Objektträger wurden für 2 h bei 42 °C mit Waschlösung (0,1 % (w/v) SDS; 1 M NaOH) gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger 30 min lang unter fließendem Leitungswasser gespült. Danach wurden sie mit H_2O_{bidest} nachgespült und für 3 h bei 180°C gebacken. Zur Beschichtung wurden die Objektträger für 20 sek in 2 % (v/v) 3-Aminipropyl-trietoxysilan (APES) in Aceton getaucht. Anschließend wurde 2 x mit H_2O_{bidest} gewaschen und die Objektträger wurden bei 37 °C getrocknet. Die beschichteten Objektträger wurden bis zur Verwendung bei 4 °C in luftdichten Behältern gelagert.

3.3.7.3 Gewebepräparation für die mikroskopischen Präparate

Das Gewebe wurde unmittelbar nach der Präparation in -80 °C kaltem Isopentan

gefroren und anschließend bis zum Schneiden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Vor dem Schneiden wurde das Gewebe zum Temperaturangleich für 2 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, dann wurde im Gefriermikrotom bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ geschnitten. Die Schnittdicke lag bei 10 bis $30\text{ }\mu\text{M}$, je nach Beschaffenheit des Gewebes. Die Schnitte wurden auf APES-beschichtete Objektträger aufgenommen und bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.3.7.4 Herstellung perfusionsfixierter Präparate

Zur Herstellung von Schnitten aus perfusionsfixierten Gewebe wurden die Tiere mit 2 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS perfundiert. Das präparierte Gewebe wurde für 2 h in 2 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS nachfixiert und anschließend über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 30 % (w/v) Saccharose inkubiert. Danach wurde das Gewebe auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und im Gefriermikrotom geschnitten. Die Schnitte wurden auf Poly-(L)-Lysin beschichtete Objektträger aufgenommen.

Für die nachfolgende immunhistologische Untersuchung wurde das Präparat für 15 min mit 1 % (v/v) Triton X100 aufgeschlossen und anschließend 3x 5 min lang mit PBS gewaschen. Durch 30 minütige Inkubation mit 5 % (w/v) BSA in PBS wurden die Schnitte abgesättigt und dann über Nacht mit $50\text{ }\mu\text{l}$ Erstantikörper (in PBS, 1 % (w/v) BSA) inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenem Antikörper wurde 3x 5 min lang mit PBS gewaschen und anschließend wurde das Präparat für 30 min mit 5 % (w/v) BSA in PBS gequentscht. Dann wurden die Schnitte für 2 – 3 h lichtgeschützt mit dem Zweitantikörper (in PBS, 1 % (w/v) BSA, $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ DAPI) inkubiert. Nach 3x 5 minütigem Waschen mit PBS wurden die Präparate in slow fading-Medium einbettet.

3.3.7.5 Paraformaldehyd fixierte Schnitte

Die Gefrierschnitte von unfixiertem Gewebe wurden bei Raumtemperatur für 7 min in 4 % (w/v) PFA in PBS fixiert und anschließend 3x 5 min lang mit PBS gewaschen. Das Präparat wurde dann 15 min lang mit 1 % (v/v) Triton X100 aufgeschlossen und nochmals für 3x 5 min mit PBS gewaschen. Durch 30 minütige Inkubation mit 5 % (w/v) BSA in PBS wurden die Schnitte abgesättigt und anschließend über Nacht mit $50\text{ }\mu\text{l}$ Erstantikörper (in PBS, 1 % (w/v) BSA) inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenem Antikörper wurde für 3x 5 min mit PBS gewaschen und anschließend wurde das Präparat 30 min lang mit 5 % BSA in PBS abgesättigt. Dann wurden die Schnitte 2 – 3 h lang lichtgeschützt mit Zweitantikörper (in PBS, 1 % (w/v) BSA,

1 µg/ml DAPI) inkubiert. Nach 3x 5minütigem Waschen mit PBS wurden die Präparate in slow fading-Medium einbettet.

3.3.7.6 Methanol-fixierte Schnitte

Die Gefrierschnitte von unfixiertem Gewebe wurden bei -20 °C mit vorgekühltem Methanol für 7 min fixiert und anschließend 3x 5 min lang mit PBS gewaschen. Durch 30 minütige Inkubation mit 5 % (w/v) BSA in PBS wurden die Schnitte abgesättigt und dann über Nacht mit 50 µl Erstantikörper (in PBS, 1 % (w/v) BSA) inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenem Antikörper wurde für 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Präparat 30 min lang mit 5 % (w/v) BSA in PBS gequentscht. Dann wurden die Schnitte für 2 – 3 h lichtgeschützt mit Zweitantikörper (in PBS, 1 % (w/v) BSA, 1 µg/ml DAPI) inkubiert und nach 3x 5 minütigem Waschen mit PBS in slow fading-Medium einbettet.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung der NTPDase3 aus der Ratte

Zu Beginn der Arbeit waren die Sequenzen verschiedener E-NTPDasen bekannt, unter anderem auch die humane Sequenz der NTPDase3, welche unabhängig voneinander 1998 von Chadwick und Frischauf sowie von Smith und Kirley kloniert wurde. Die menschliche NTPDase3-Sequenz wurde für eine Recherche in verschiedenen Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) benutzt. In den Datenbanken konnte keine vollständige Ratten- oder Maus-mRNA gefunden werden, die der NTPDase3 entsprochen hätte. Bei der Überprüfung von EST¹⁰-Datenbanken wurden jedoch kurze mRNA-Sequenzen (EST's) gefunden, die eine hohe Übereinstimmung mit Sequenzbereichen der humanen NTPDase3 aufwiesen. Insgesamt wurden 5 verschiedene Sequenzen (aw641373, bb586589,bf302156, bf466015, w46136) unterschiedlicher Länge gefunden, von denen vier aus der Maus (*Mus musculus*) und eine (aw416373) aus dem Rind (*Bos Taurus*) stammten. Die Sequenzen deckten im Alignment verschiedene Bereiche der humanen mRNA ab (Abbildung 2). Die genetische Ähnlichkeit von Ratte und Maus eröffnete die Möglichkeit Primer aus den Mausequenzen abzuleiten, die das Potential besaßen, Sequenzen der Ratte zu amplifizieren.

Aus dem Maus-EST w4613, welcher nach Alignments mit der humanen Sequenz im Bereich des Stopcodons der NTPDase3 positioniert war, wurden zwei PCR-Primer (RatL3_ce 5',RatL3_ce3') abgeleitet. Mit Hilfe der beiden Primer konnte ein 262 bp langes DNA-Fragment aus der cDNA der Ratte amplifiziert werden. Dieses aus der Ratte klonierte Stück, im folgenden als Ratfrag_ce bezeichnet, enthielt über die Primer inserierte Schnittstellen für *Bam*HI und *Xba*I und wurde nach Ligation in den Vektor pBSK(-) vollständig sequenziert¹¹. Die daraus resultierende Information wurde für die Definition eines Ratten-DNA-spezifischen Primers (RatRevL3) benutzt, welcher hinter dem offenen Leserahmen positioniert war.

¹⁰ engl. Estimated Sequenz Tag, kurz EST; entspricht einer partiell sequenzierten mRNA-Sequenz

¹¹ Definition der Primer (RatL3_ce 5',RatL3_ce3') und Sequenzierung von Ratfrag_ce durch
Dipl. Biol. Christian Ebeling

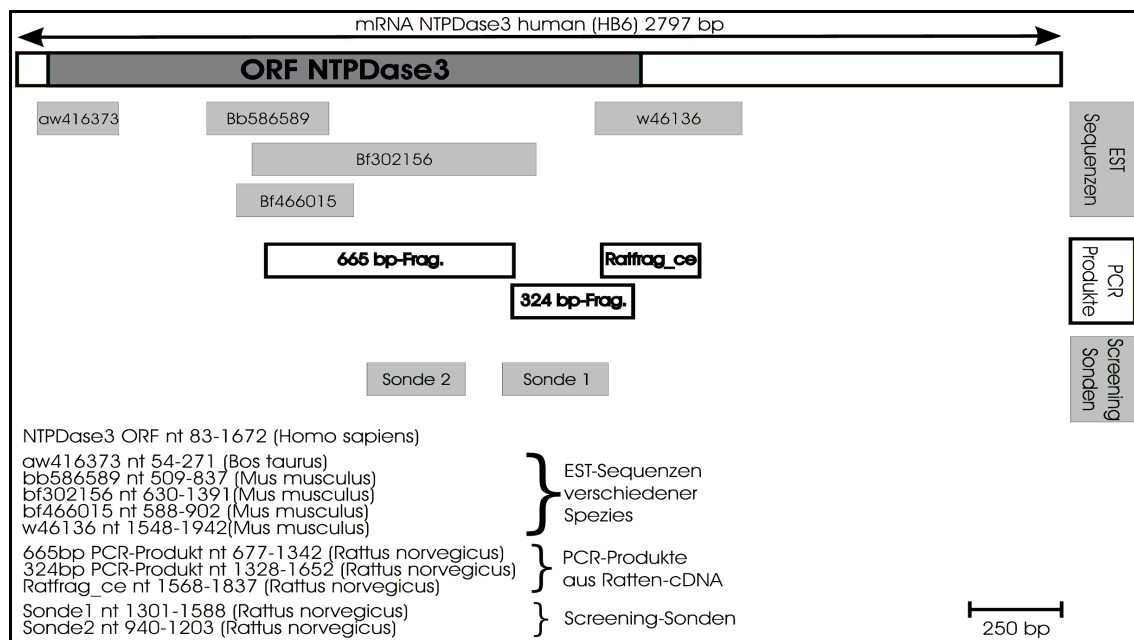


Abbildung 2: Lage der EST's, PCR-Fragmente und Sonden

In der Graphik ist die humane NTPDase3-Sequenz (Genbank-Acc. No. AF034840) schematisch dargestellt. Der offene Leserahmen (ORF) ist dunkelgrau hinterlegt. Unter der Sequenz sind die verschiedenen-EST's (Genbank Acc.No. aw416373, bb586589, bf302156, bf466015, w46136) sowie die, aus Rattenhirn-cDNA amplifizierte, PCR-Produkte abgebildet. Die Lage und Länge der DNA-Fragmente wird maßstabsgetreu durch die Kästen dargestellt. Die PCR-Produkte, die von den Maus-EST's abgeleiteten Primer, liegen innerhalb des EST bf302156 (665 bp-Frag.) und zwischen den Maus-ESTs bf302156 und w46136 (324 bp). Aus den Sequenzdaten der sich überlappenden PCR-Produkte wurden die geeigneten Bereiche für die Sonde 1 und Sonde 2 ermittelt, welche für das Screening der cDNA-Banken eingesetzt wurden.

Aus den Sequenzen der neueren Maus-EST's (bb586589, bf302156, bf466015) wurden drei weitere Primer abgeleitet (HuForL3.1, HuRevL3.1, HuForL3.2). Ein PCR-Produkt, welches den vollen Bereich der Maus-EST's abdeckte, konnte nicht amplifiziert werden. Deswegen wurden Primer für die Herstellung kürzerer, sich überlappender PCR-Fragmente ausgewählt. Das Primerpaar HuForL3.1 und HuRevL3.1 wurde benutzt, um ein 665 bp großes Fragment innerhalb des Sequenzbereichs des Maus-EST bf302156 aus Rattenhirn-cDNA zu amplifizieren. Aus derselben cDNA konnten die Primer RatRevL3 und RatForL3.2 ein 324 bp langes PCR-Produkt vervielfältigen. Dieses PCR-Amplifikat lag zwischen dem Bereich des Maus-EST bf302156 und der Rattensequenz am 3'-Ende des offenen Leserahmens (Ratfrag_ce). Zusammen deckten die PCR-Produkte den Bereich nt 677 bis nt 1837, bezogen auf die humane NTPDase3, ab (Abbildung 3).

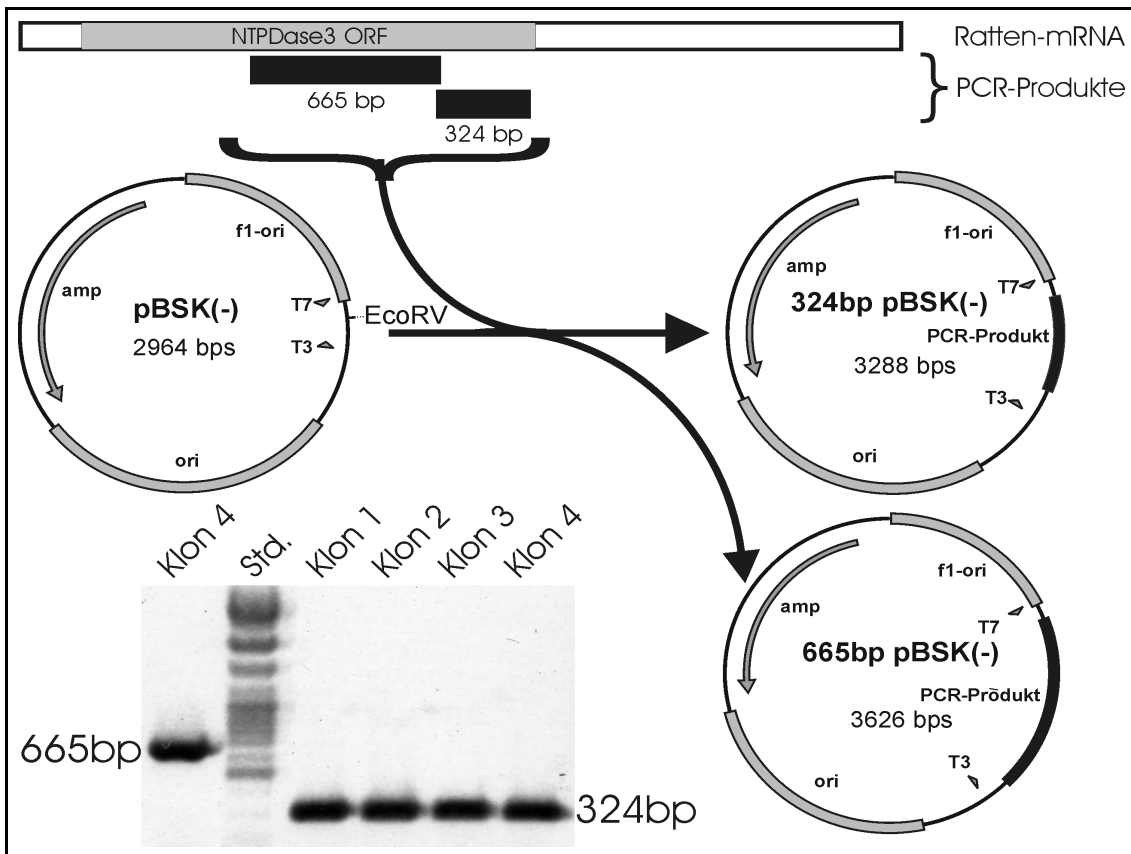


Abbildung 3: Klone der 665bp und 324bp PCR-Produkte

In der Grafik ist die mRNA-Sequenz der Ratte dargestellt. Der offene Leserahmen der NTPDase3 ist grau hinterlegt. Die beiden PCR-Produkte von 665 bp und 324 bp wurden „blunt end“ über die *EcoRV*-Schnittstelle in den Vektor pBSK(-) kloniert. Im Gel unten links sind die, via PCR positiv getesteten, Klone zu sehen. Aus der DNA der Klone wurden mit den Primern HuForL3.1 und HuRevL3.1 das 665 bp-PCR-Produkt (Klon 4, links vom Standard) und den Primern HuForL3.2 und RatRevL3 ein 324 bp langes PCR-Produkt (Klone 1-4, rechts vom Standard) amplifiziert.

Die beiden PCR-Produkte wurden *blunt end* über die *EcoRV*-Schnittstelle in pBSK(-) ligiert. Von 10, durch Restriktions- und PCR-analysierten Klone des 665 bp-Transfektionsansatz, wurde in Klon 4 ein Plasmid mit dem 665 bp-Fragmentes gefunden. Die Transfektion mit 324 bp-Ligationsansatz brachte 4 potentielle Klone hervor, die nach Restriktions- und PCR-Analysen, allesamt ein 324 bp langes Insert enthielten (Abbildung 3).

Der Klon 1 des 324 bp-Produktes und der Klon 4 mit dem 665 bp-Produkt wurden, ausgehend von der T3 und T7 Phagenpromotorsequenz, sequenziert. Zusammen mit den Sequenzdaten des 262 bp-Produktes (Ratfrag_ce) konnte eine durchgängige Sequenz mit einer Länge von 1.160 bp im 3'-Bereich des NTPDase3-ORF rekonstruiert werden.

Gemessen an der humanen cDNA-Sequenz fehlten noch 593 bp im 5'-Bereich des offenen Leserahmens. Um den fehlenden Bereich zu amplifizieren, wurden Primer (CD39L3 PräORF 5', CD39L3 BT1) im Bereich des *Bos Taurus*-EST (aw416373) abgeleitet. Dieser EST erstreckte sich in der humanen mRNA-Sequenz über die Nucleinsäuren nt 54-271 und war damit um das Start-Codon lokalisiert. Der Versuch diese Primer auf Ratten-cDNA anzuwenden und den fehlenden Bereich des offenen Leserahmens zu amplifizieren, brachte jedoch kein verwendbares PCR-Produkt hervor. Weiterhin wurde mit vektorspezifischen Primern (λ gt10B221, T7pcDNA3) und einem genspezifischen Primer (CD39MoRev) versucht, den fehlenden 5'-Bereich aus der unidirektionalen λ gt10-Phagenbank bzw. der SuperScript-cDNA-Bank zu amplifizieren (Abbildung 4c). Für eine RACE-PCR wurde cDNA mit einem Poly(C)-Schwanz versehen. Mit einem Poly(G)-Primer, dem eine Adapter-Kassette angeschlossen war, und einem Primer im vorderen Bereich der bekannten Ratten-Sequenz (RatRev01) wurde der Versuch unternommen, den fehlenden 5'-Bereich der mRNA zu amplifizieren. Dieses PCR-Produkt diente als Template für den zweiten PCR-Schritt unter Verwendung eines Primers für die Adaptersequenz (BGHrev) und eines weiteren genspezifischen Primers (RatRev02 bzw. RatRev03; Übersicht in Abbildung 4a). Alle diesbezüglichen Anstrengungen brachten jedoch keine Ergebnisse, da es nicht möglich war, eine definierte Bande zu erzeugen (Abbildung 4b).

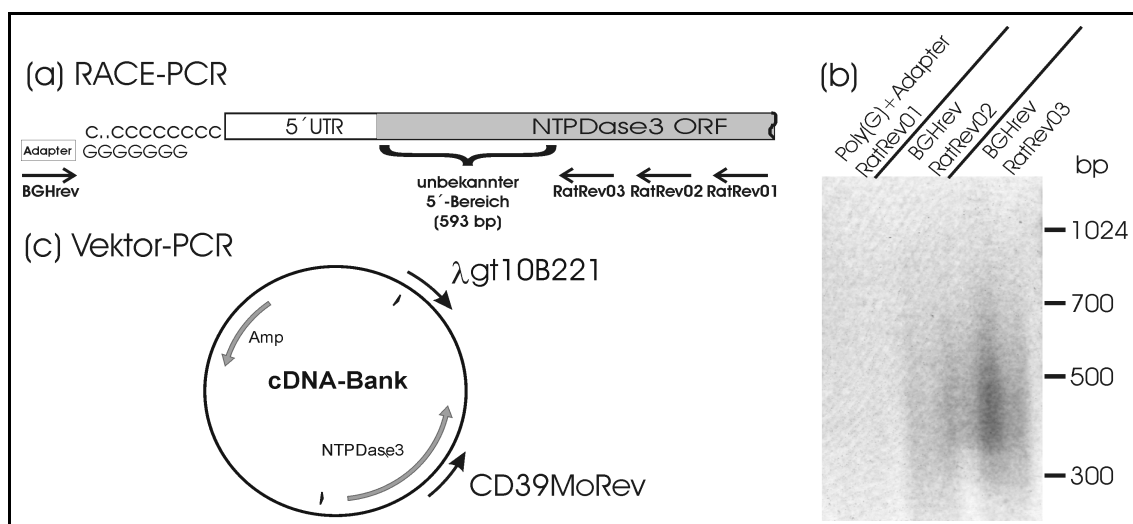


Abbildung 4: PCR-Ansätze zur Klonierung des fehlenden 5'-Bereiches der NTPDase3

(a) Schematische Darstellung der RACE-PCR zur Klonierung des fehlenden 5'-Sequenzbereiches. Oben ist ein Teil der NTPDase3-mRNA mit dem 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR) und einem Teil des offenen Leserahmens zu sehen. Die mRNA wurde für die RACE-PCR mit einem Poly(C)-Ende versehen.

An diesem sollte der erste Primer (PolyG+Adapter) binden. Bei der Adapterkassette handelte es sich um eine DNA-Sequenz, die als Bindestelle für den BGHrev-Primer dienen sollte. Als spezifische Primer innerhalb des bereits klonierten Bereichs der NTPDase3 wurden die Primer RatRev01, RatRev03 und RatRev03 verwendet.

(b) Die erste PCR mit den Primern Poly(G)+Adapter und RatRev01 brachte zu wenig Produkt hervor, um im Ethidiumbromidgel sichtbar zu sein (Spur 1). Mit diesem als Template dienenden PCR-Produkt konnte in dem folgendem PCR-Schritt mit dem Adapter-Primer (BGHrev) und einem genspezifischen Primer (RatRev02 oder RatRev03) keine definierte Bande erzeugt werden (Spur 2,3). Die PCR brachte lediglich ein breites Spektrum von Produkten hervor, die größtenteils kürzer als 500 bp waren (Spur 2,3).

(c) Schematische Darstellung des Versuchs, den fehlenden 5'-Bereich des NTPDase3-ORF's aus cDNA-Banken (λ gt10-Phagenbank, SuperScript-cDNA-Bank) zu amplifizieren. Dabei wurde ein Primer im Vektor (z.B. λ gt10B221) und ein spezifischer Primer im bekannten Bereich der NTPDase3 (CD39MoRev) kombiniert.

Da mit den bis dahin angewandten Methoden die fehlende Sequenzinformation für den 5'-Bereich nicht zu erhalten war, wurden Primer für die Herstellung von Screening-Sonden definiert (L3Sonde1for, L3Sonde1rev, L3Sonde2for, L3Sonde2rev) und verschiedene cDNA-Banken (UniZAP XR-Phagenbank, λ gt10-Phagenbank, SuperScript-cDNA-Bank) darauf hin geprüft, ob sie NTPDase3-cDNA enthielten.

Die bereits erfolgreich eingesetzten Primer HuForL3.1 und HuRevL3.1 konnten das 665 bp-Fragment der Ratten-NTPDase3 aus allen drei cDNA-Banken, am besten jedoch aus der Rattenhirn SuperScript cDNA-Bank (LifeTech), amplifizieren (Abbildung 5a). Aus diesem Grund wurde die SuperScript cDNA-Bank ausgewählt, um mittels der Screening-Sonden nach einem vollständigen cDNA-Klon zu suchen.

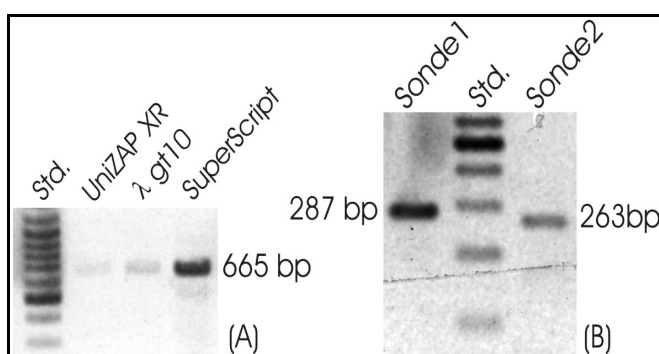


Abbildung 5: Test der cDNA-Banken

(A) 665 bp-PCR-Produkte, amplifiziert aus den verschiedenen cDNA-Banken (UniZAP XR, λ gt10, SuperScript). Aus der SuperScript-cDNA-Bank lässt sich das NTPDase3-Fragment am besten amplifizieren. (B) die Produkte der Sonden-Primer 1 und 2. Sonde1 hat eine Länge von 287 bp, Sonde2 hat eine Länge von 263 bp.

Bei der SuperScript-cDNA-Bank aus Rattenhirn handelte es sich um eine Plasmidbank. Mittels des ClonCapture©-Kit sollten NTPDase3-haltige Plasmide angereichert werden. Dazu wurden zwei Sonden mit einer vom Hersteller empfohlenen Länge von ~300 bp (Sonde1 287 bp, Sonde2 263 bp; siehe Abbildung 5b) hergestellt. Die Anreicherung der NTPDase3-haltigen Vektoren erfolgte über die erste, während der PCR-Synthese

biotinylierte, Sonde. Die RecA vermittelte Tripelhelix von Plasmid und biotinylierter Sonde sollte dabei an Streptavidin-gekoppelte Magnetbeads binden. Nach Waschschritten und Elution stellt der Hersteller eine mehrere hundert- bis zehntausendfache Anreicherung der gesuchten Plasmide in Aussicht. Die durch das Kit selektierten Vektoren wurden in *E. coli* transfiziert und es wurden 500 Kolonien mit der zweiten ³²P-markierten Sonde getestet. Keine der Kolonien gab ein positives Signal.

Alternativ wurden 130×10^3 Plaques der λ gt10-cDNA-Bank mit der radioaktiv markierten Sonde überprüft. Ein Kandidat konnte gefunden werden und wurde in weiteren Screening-Runden isoliert. Der Phage 1.2 enthielt eine verkürzte NTPDase3-cDNA. Durch partielle Sequenzierung wurde der Klon als NTPDase3 identifiziert. Die Restriktionsanalyse und PCR-Tests zeigten allerdings, dass die cDNA kürzer als der bereits bekannte Bereich war.

Letztendlich wurden *E. coli* mit der SuperScript-cDNA-Bank transfiziert und 75×10^3 Klone mit einer ³²P-markierten Sonde überprüft. Von den 14 Kandidaten des Erstrunden-Screenings blieben in der 3. Runde 6 unabhängige Klone, von denen der Klon 3.1.1.1 den kompletten offenen Leserahmen der Ratten-NTPDase3 enthielt.

Der Klon wurde in beide Richtungen sequenziert (Abbildung 6). Eine Passagier-DNA mit einer Länge von 3,1 kb war in dem pCMV-Sport 2-Vektor enthalten. Nach 213 bp 5'-UTR fand sich ein 1590 bp umfassender offener Leserahmen, dem sich eine 1,3 kb lange 3'-UTR und ein Poly(A)-Schwanz anschlossen.

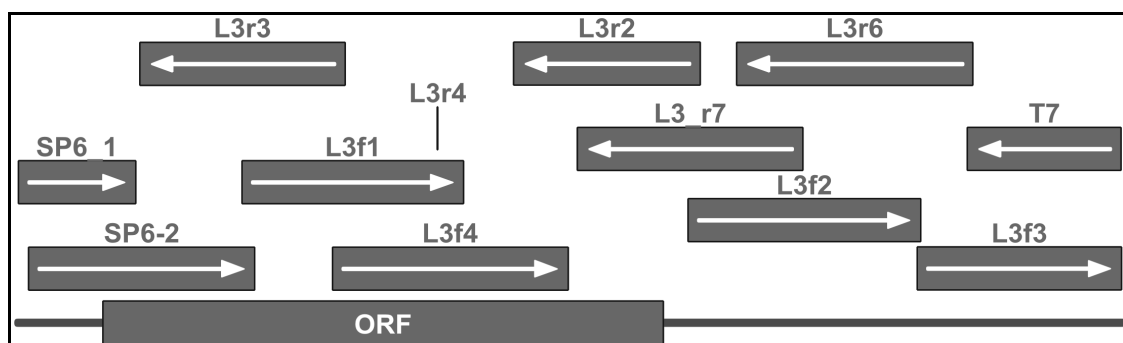


Abbildung 6: Schema der Sequenzierung

Die Abbildung zeigt einen Bereich des Klons 3.1.1.1 inklusive des offenen Leserahmens (ORF). Darüber sind die verschiedenen sequenzierten Bereiche eingetragen. Die Bezeichnung der sequenzierten Bereiche entspricht den zugehörigen Sequenzierprimern; die Pfeile in den Balken geben die Richtung der Sequenzierung an. Die Darstellung wurde erstellt mit Omega Software.

Das Start-Codon (AAGAUGU) war nicht innerhalb einer Kozak-Sequenz (A/G-³XXAUGG⁺⁴) eingebettet. Ein Polyadenylierungssignal (AAUAAA) war 24 bp vor Beginn des Poly(A)-Schwanzes zu finden. Die genomische DNA wies mit 40,0 % Thyminanteil, in den ersten 40 Basen nach dem Ende der mRNA-Sequenz¹², eine thymidinreiche Region auf, die zusammen mit der Sequenz ⁺²⁷TTTCT⁺³¹ ein Downstream-Element für die Polyadenylierung der mRNA enthält (Chou et al., 1994).

Der vollständige offene Leserahmen der Ratten-NTPDase3 kodierte ein Protein von 529 As (Abbildung 8). Ohne Berücksichtigung der Glykosylierung errechnete sich daraus ein theoretisches Molekulargewicht von 59,1 kDa, sowie ein isoelektrischer Punkt von pH 5,75.

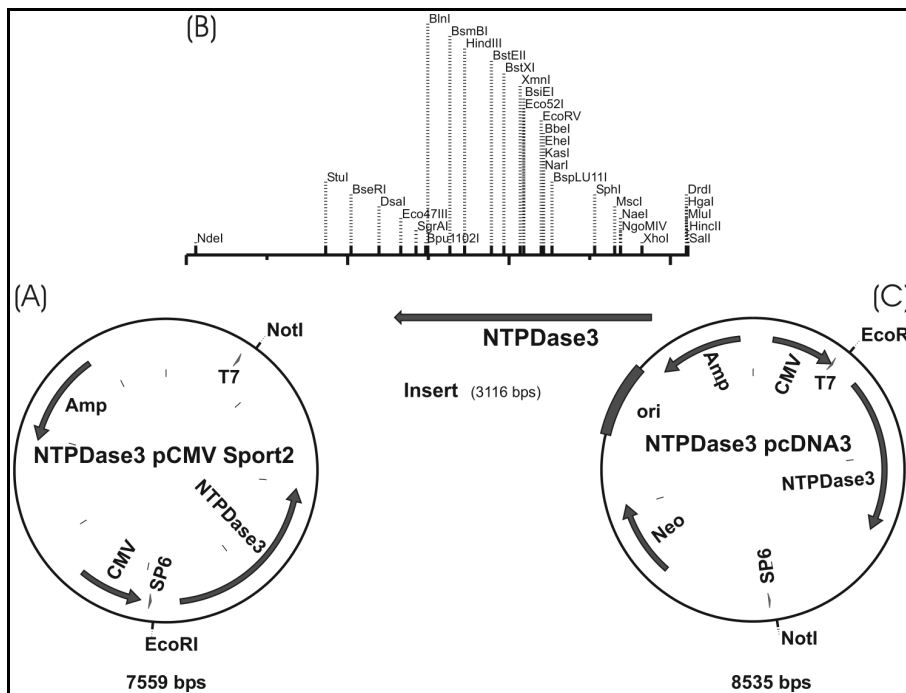


Abbildung 7:
Umklonierung der
NTPDase3

Schematische
Darstellung der
Umklonierung des
NTPDase3-Klons.
(A) Genkarte des
isolierten
NTPDase3-Klons
aus der Ratten-
hirn-cDNA-Bank
im pCMV Sport 2-
Vektor
(Invitrogen).
(B) Umgesetzte
Passagier-DNA
(Insert, 3,1 kb)
mit den darin
vorhandenen
Schnittstellen für
die
handelsüblichen

Restriktionsenzymen. (C) NTPDase3-cDNA im pcDNA3-Vektor (Invitrogen). Beide Vektoren besitzen eine Ampicillin-Resistenz und einen eukaryotischen CMV-Promotors. Die MCS der beiden Vektoren wird von Phagenpromotorsequenzen eingerahmt (pCMV Sport 2: SP6, T7; pcDNA3: SP6, T7). Die Passagier-DNA wurde über die EcoRI- und NotI-Schnittstellen umkloniert.

Die Passagier-DNA (Insert) wurde vom Hersteller der SuperScript cDNA-Bank über NotI und SalI in den Vektor pCMV Sport2 kloniert. Um die Versuche mit einem einheitlichen Vektorsystem (pcDNA3) durchführen zu können, war es notwendig die cDNA in den Vektor pcDNA3 (Invitrogen) umzuklonieren. Für das Umsetzen der

NTPDase3-cDNA in pcDNA3 wurde die Passagier-DNA über *EcoRI* und *NotI* ausgeschnitten und dann gerichtet in pcDNA3 ligiert (Abbildung 7).



Abbildung 8: Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz der NTPDase3

Unter dem offenen Leserahmen der cDNA (oben) ist die abgeleitete Aminosäuresequenz der NTPDase3 aus der Ratte mit Anmerkungen. Pfeilspitzen über der Aminosäuresequenz markieren die in NTPDase1,2,3 und 8 konservierten Cysteine der Ratte. Weiterhin sind die intrazellulären Phosphorylierungsstellen (Sternchen) sowie die wahrscheinlichen Glykosilierungsstellen (Punkte) gekennzeichnet. Die fünf Apyrase-konservierten Regionen (Kästen), sowie die Transmembrandomänen (grau hinterlegt) sind ebenfalls eingezeichnet. Der Signalanker für den sekretorischen Weg ist doppelt unterstrichen.

4.2 Rechnergestützte Analyse der Nukleinsäure- und Aminosäure-Sequenz

4.2.1 Vergleich der Ratten-NTPDase3 mit anderen E-NTPDasen

Ein Vergleich (Alignment) der klonierten Sequenz der Mitglieder der E-NTPDase-Familie und der verschiedenen Orthologen der NTPDase3 aus Mensch, Maus und Huhn bestätigte, daß es sich bei der klonierten cDNA-Sequenz, um die NTPDase3 der Ratte handelte.

Auf Aminosäureebene besteht mit 94,3 % ein hoher Grad an Identität zum Maus-Orthologe (Lavoie et al., 2004). Mit den menschlichen Orthologen (Smith et al., 1998) ist die Ratten-NTPDase3 auf Aminosäureebene zu 81,7 % identisch. Die Aminosäuresequenz des Huhnes (Nagy et al., 1998), als phylogenetisch weiter entferntes Orthologe, teilt sich 40,1 % identische Aminosäuren mit der Ratte. Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen, d.h. die Anzahl Aminosäuren mit chemisch ähnlichen Eigenschaften, ist dementsprechend höher. Die NTPDase3 von Maus, Mensch und Huhn weist eine 95 %ige, 87 %ige und 50,1 %ige Ähnlichkeit mit dem Ratten-Orthologe auf.

<i>NTPDase</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>8</i>
<i>1</i>		52,0	47,6	28,4	26,0	51,4
<i>2</i>	37,3		49,4	28,1	26,6	55,6
<i>3</i>	35,1	36,9		28,6	24,3	47,8
<i>5</i>	17,6	16,9	17,8		54,6	31,1
<i>6</i>	16,7	16,4	15,2	46,1		29,4
<i>8</i>	38,5	44,0	36,3	21,3	18,0	

Tabelle 16: Identitäten und Ähnlichkeit innerhalb der ENTPDase-Familie der Ratte

In der Tabelle wird der Anteil der identischen Aminosäurereste (unterhalb der dunkelgrau gefüllten Felder) und ähnlichen Aminosäureresten (oberhalb der dunkelgrau gefüllten Felder) in Prozent angegeben. Die erste Spalte bzw. Zeile (grau hinterlegt) gibt die Nummern (1,2,3,5,6,8) der verglichenen NTPDasen an. Bsp.: Die Identität zwischen NTPDase2 (Zellenwert erste Spalte/Zeile=2) und NTPDase3 (Zellenwert erste Spalte/Zeile=3) beträgt 36,9 % (Zelle in der sich die NTPDase2-Spalte mit der NTPDase3-Zeile unterhalb der dunkelgrauen Felder kreuzt), die Ähnlichkeit 49,4 % (Zelle in der sich die NTPDase2-Zeile mit der NTPDase3-Spalte oberhalb der dunkelgrauen Felder kreuzt). Die Identitäts- und Ähnlichkeitsangaben der NTPDase3 sind hellgrau hinterlegt und zusätzlich eingerahmt.

Die Proteinsequenzen wurden abgeleitet aus den mRNA's von NTPDase1 (U81295), NTPDase2 (Y11835), NTPDase3 (AJ437217), NTPDase5 (BC062044), NTPDase6 (AJ277748), NTPDase8 (AY536920)¹³. Von der NTPDase4 und NTPDase7 existieren keine vollständigen Sequenzen aus der Ratte. Die Aminosäuresequenzen wurden mit ClustalX 1.81 verglichen und mit BoxShade v3.31c die Identitäten bzw. Ähnlichkeiten berechnet.

Vergleicht (aligned) man die Aminosäuresequenzen der verschiedenen E-NTPDasen der Ratte kann man die Ähnlichkeit der NTPDase3 mit den anderen membranständigen Ektoenzymen der Familie erkennen. Die Identität der NTPDase3 auf Aminosäureebene liegt für die plasmamembranständigen NTPDasen1, 2 und 8 zwischen 35,1 % und 36,9 % (Tabelle 16). Den höchsten Verwandtschaftsgrad, mit 36,9 % Aminosäureidentität, weist die NTPDase3 zur NTPDase2 auf. Zu den intrazellulär lokalisierten NTPDasen 5 und 6 ist die Identität mit 17,8 % und 15,2 % deutlich geringer. Von den Orthologen der NTPDasen 4 und 7 sind keine vollständigen Aminosäuresequenzen aus der Ratte bekannt. Ein Vergleich mit den Maus-Orthologen ergibt mit 20,4 % für die NTPDase4 und 20,3 % für die NTPDase7 eine geringe Identität zur Aminosäuresequenz der Ratten-NTPDase3. Um die Position der NTPDase3 in E-NTPDase-Familie näher zu untersuchen, wurden die Proteinsequenzen aligned und ein Phylogramm erstellt.

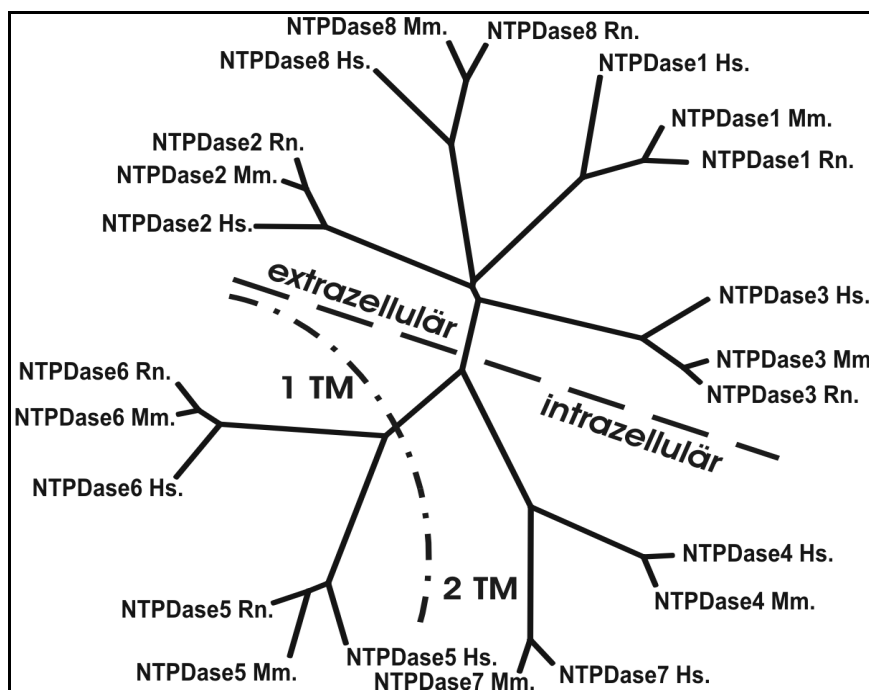


Abbildung 9: Phylogramm der E-NTPDasen aus Mensch, Maus und Ratte

Die Aminosäuresequenzen der NTPDasen1 bis 8 aus Mensch, Maus und Ratte wurden mit ClustalX 1.81 aligned und mit TreeView 1.6.6 zu einem Phylogramm ausgewertet. Die Länge der Verbindungslinien steht für die phylogenetischen Abstände zwischen den Aminosäuresequenzen.

Die Proteinsequenzen wurden aus den mRNA-Sequenzen

abgeleitet. Genbank Acc-No.: NTPDase1 Homo sapiens (S73183), NTPDase1 Mus musculus (AF037366), NTPDase1 Rattus norvegicus (U81295), NTPDase2 Homo sapiens (U91510), NTPDase2 Mus musculus (AF042811), NTPDase2 Rattus norvegicus (Y11835), NTPDase3 Homo sapiens (AF034840), NTPDase3 Mus musculus (AY376710), NTPDase3 Rattus norvegicus (AJ437217),

13 unpubliziert Sequenz von Dr. Jean Sévigny

NTPDase4 Homo sapiens (AF016032), NTPDase5 Homo sapiens (AF039918), NTPDase5 Mus musculus (AF006482), NTPDase5 Rattus norvegicus (BC62044), NTPDase6 Homo sapiens (AF039916), NTPDase6 Mus musculus (NM_172117), NTPDase6 Rattus norvegicus (AJ277748), NTPDase7 Homo sapiens (AK055540), NTPDase7 Mus musculus (AF288221) NTPDase8 Homo sapiens (AY359008), NTPDase8 Mus musculus (AY364442), NTPDase8 Rattus norvegicus (AY430414)

Das hypothetische Phylogramm (Abbildung 9) veranschaulicht die Aufteilung der E-NTPDase-Familie in drei Untergruppen. Auf der einen Seite des Baums steht die erste Gruppe der E-NTPDasen mit den NTPDasen1, 2, 3 und 8. Diese Enzyme sind auf der Plasmamembran lokalisiert und haben 2 Transmembrandomänen. Auf der anderen Seite spaltet sich der Baum in die NTPDasen4 und 7, die zwei Transmembrandomänen besitzen, jedoch intrazellulär lokalisiert sind und die NTPDasen5 und 6, welche nur eine Transmembrandomäne haben und ebenfalls eine intrazelluläre Lokalisation aufweisen.

Um konservierte Bereiche, insbesondere, die für die E-NTPDase-Familie charakteristischen Apyrase-konservierten Regionen zu identifizieren, wurde ein Alignment der verschiedenen E-NTPDasen erstellt.

Alignment der E-NTPDasen im Bereich der ACR's				
		ACR I	ACR II	
NTPDase4 Homo sapiens	88	VNYGIVVDCGSSGSRVFVYQWE	173	TPLYILCTAGMRILPESQQKAI
NTPDase4 Mus musculus	87	VNYGIVVDCGSSGSRVFVYQWE	172	TPLYILCTAGMRVLPESQQKAI
NTPDase7 Homo sapiens	82	LNYGLVDCGSSGSRVFVYQWE	167	TPLYILCTAGMRLLPERKQLAI
NTPDase7 Mus musculus	82	LNYGLVDCGSSGSRVFVYQWE	167	TPLYILCTAGMRLLPERKQLAI
NTPDase3 Mus musculus	55	LKYGIVLDAGSSRRTVYVYQWE	132	TRIVLGATAGMRLLRLQNETAA
NTPDase3 Rattus norvegicus	55	LKYGIVLDAGSSRRTVYVYQWE	132	TRVYLGATAGMRLLRLQNETAA
NTPDase3 Homo sapiens	55	LKYGIVLDAGSSRRTVYVYQWE	132	TRIVLGATAGMRLLRLQNETAA
NTPDase1 Mus musculus	47	VKYGIVLDAGSSHTNLYIYKWE	124	TPVYLGATAGMRLLRMESEQSA
NTPDase1 Rattus norvegicus	47	VKYGIVLDAGSSHTNLYIYKWE	124	TPVYLGATAGMRLLRMESEQSA
NTPDase1 Homo sapiens	47	VKYGIVLDAGSSHTSLYIYKWE	124	TPVYLGATAGMRLLRMESEELA
NTPDase8 Mus musculus	41	TKFGIVFDAGSSHTSFLVYQWE	118	TPTFLGATAGMRLLSQKNSSQA
NTPDase8 Rattus norvegicus	41	TKFGIVFDAGSSHTSFLVYQWE	118	TPAFLGATAGMRLLSQKNSSQA
NTPDase8 Homo sapiens	41	IKFGIVFDAGSSHTSFLVYQWE	118	TPTFLGATAGMRLLSRKNSSQA
NTPDase2 Mus musculus	38	LKYGIVLDAGSSHTSMFVYKWE	115	TPLYLGATAGMRLLNLTSPPEAT
NTPDase2 Rattus norvegicus	38	LKYGIVLDAGSSHTSMFVYKWE	115	TPLYLGATAGMRPFNLTSPPEAT
NTPDase2 Homo sapiens	38	LKYGIVLDAGSSHTSMFVYKWE	115	TPLYLGATAGMRLLNLTNPEAS
NTPDase5 Mus musculus	46	TFYGIMFDAGSTGTRIHVYTFV	122	TPVVLKATAGLRLLPEQKAQKL
NTPDase5 Rattus norvegicus	46	TFYGIMFDAGSTGTRIHVYTFV	122	TPVVLKATAGLRLLPEQKAQTL
NTPDase5 Homo sapiens	47	TLYGIMFDAGSTGTRIHVYTFV	123	TPVVLKATAGLRLLPEHKAQKL
NTPDase6 Mus musculus	72	VFYGIMFDAGSTGTRIHVFOFA	147	TPLVLKATAGLRLLPGEKAQKL
NTPDase6 Rattus norvegicus	72	VFYGIMFDAGSTGTRIHVFOFA	147	TPLVLKATAGLRLLPGEKAQKL
NTPDase6 Homo sapiens	100	VFYGIMFDAGSTGTRVHVFQFT	175	TPLVLKATAGLRLLPGEKAQKL

		ACR III		ACR IV	
NTPDase4	Homo sapiens	213	SHAEVISGKQEGVYAWTGINFV	264	KRTAGILDMGGVSTQIAYEVPK
NTPDase4	Mus musculus	212	SHAEVISGKQEGVYAWTGINFV	263	KRTAGVLDMGGVSTQIAYEVPQ
NTPDase7	Homo sapiens	207	SQAEVISGKQEGVYAWTGINFV	250	RRTVGILDMGGASLQIAYEVPV
NTPDase7	Mus musculus	207	SQAEVISGKQEGVYAWTGINFV	250	RRTVGILDMGGASLQIAYEVPV
NTPDase3	Mus musculus	172	RGAQIISGQEGVYGVWITANYI	211	VDITGALDLGGASTQISFVAGE
<u>NTPDase3</u>	<u>Rattus norvegicus</u>	<u>172</u>	<u>RGAQIISGQEGVYGVWITANYI</u>	<u>211</u>	<u>VDITGALDLGGASTQISFVSEE</u>
NTPDase3	Homo sapiens	172	RGAQIISGQEGVYGVWITANYI	211	VEITGALDLGGASTQISFVAGE
NTPDase1	Mus musculus	164	QGAKIITGQEEGAYGWITINYL	204	QETFGALDLGGASTQITFVFNQ
NTPDase1	Rattus norvegicus	164	QGAKIITGQEEGAYGWITINYL	204	QATFGALDLGGASTQITFVFLN
NTPDase1	Homo sapiens	164	QGAKIITGQEEGAYGWITINYL	205	QETFGALDLGGASTQITFVFNQ
NTPDase8	Mus musculus	158	WGAKILLAGQDEGAFGWITINYL	196	GMLVGLDLGGASTQISFVFNQ
NTPDase8	Rattus norvegicus	158	WGAKILLAGQDEGAFGWITINYL	196	GTLVGLDLGGASTQISFVFNQ
NTPDase8	Homo sapiens	158	WGAKILLAGQDEGAFGWITINYL	197	EMLVGLDLGGASTQITFVFGG
NTPDase2	Mus musculus	155	RGARILSGQDEGVFGWVTANYI	193	KGTLGAMDIGGASTQITFETTS
NTPDase2	Rattus norvegicus	155	RGARILSGQDEGVFGWVTANYI	193	KGTLGAMDIGGASTQITFETTS
NTPDase2	Homo sapiens	155	RGARILSGQDEGVFGWVTANYI	193	KGTLGAMDIGGASTQITFETTS
NTPDase5	Mus musculus	161	GSVSIIMDGSYEGILAWVTINFL	190	QETVGTLDLGGASTQITFLEQF
NTPDase5	Rattus norvegicus	161	DSVSIIMDGSYEGILAWVTINFL	190	QETVGTLDLGGASTQITFLEQL
NTPDase5	Homo sapiens	161	GSVSIIMDGSYEGILAWVTINFL	191	QETVGTLDLGGASTQITFLEQF
NTPDase6	Mus musculus	186	DCVSIIMNGTDEGSAWITINFL	215	SSSVGMLDLGGSTQITFLEHRV
NTPDase6	Rattus norvegicus	186	DCVSIIMNGTDEGSAWITINFL	215	SSSVGMLDLGGSTQITFLEHRV
NTPDase6	Homo sapiens	214	DCVSIIMNGTDEGSAWITINFL	243	GSSVGMIDLGGSTQITAFLEHRV
		ACR V			
NTPDase4	Homo sapiens	512	VYDKEVQWTLGAILYRTRFLEL		
NTPDase4	Mus musculus	519	VYDKEVQWTLGAILYRTRFLEL		
NTPDase7	Homo sapiens	506	VYDREVQWTLGAILYKTRFLEL		
NTPDase7	Mus musculus	506	VYDREVQWTLGAILYKTRFLEL		
NTPDase3	Mus musculus	452	VGNSSIAWSLGYMLSLTNQIPA		
<u>NTPDase3</u>	<u>Rattus norvegicus</u>	<u>452</u>	<u>VGNSSIAWSLGYMLSLTNQIPA</u>		
NTPDase3	Homo sapiens	452	VGNSSIAWSLGYMLSLTNQIPA		
NTPDase1	Mus musculus	443	IKDSNAGWTLGYMLNLTNMI PA		
NTPDase1	Rattus norvegicus	444	IKDSNAGWTLGYMLNLTNMI PA		
NTPDase1	Homo sapiens	443	IQGSDAGWTLGYMLNLTNMI PA		
NTPDase8	Mus musculus	435	AGDTDIGWTLGFMLNLTGMI PA		
NTPDase8	Rattus norvegicus	432	AGGTDIGWTLGFMLNLTGMI PA		
NTPDase8	Homo sapiens	296	AGGVDIGWTLGYMLNLTGMI PA		
NTPDase2	Mus musculus	429	AADTAVGWTLGYMLNLTNLI PA		
NTPDase2	Rattus norvegicus	429	AADTAVGWTLGYMLNLTNLI PA		
NTPDase2	Homo sapiens	406	AADTAVGWTLGYMLNLTNLI PA		
NTPDase5	Mus musculus	403	SEQHRDWLGLGGHLSPA----		
NTPDase5	Rattus norvegicus	403	VNNIETGVALG-----		
NTPDase5	Homo sapiens	404	VNNIETGVALG-----		
NTPDase6	Mus musculus		-----		
NTPDase6	Rattus norvegicus	427	IDNVETSWALG-----		
NTPDase6	Homo sapiens	456	IDNVETSWALG-----		

Abbildung 10: partielles Alignment der E-NTPDasen aus Mensch, Maus und Ratte

Die Abbildung zeigt ein Alignment der NTPDasen 1 bis 8 aus Homo sapiens, Mus musculus und Rattus norvegicus im Bereich der ACR's. Identische Bereiche sind dunkelgrau hinterlegt, Bereiche mit ähnlichen Aminosäuren sind hellgrau hinterlegt. Die besonders hoch konservierten Aminosäuren sind **fett** gedruckt.

Die NTPDase3 (unterstrichen) weist alle 5 für die E-NTPDasen typischen ACR's auf. In den Bereichen um die ACR's ist die Anzahl identischer und ähnlicher Aminosäuren höher als in den restlichen Sequenzbereichen.

Das Alignment wurde mit ClustalX 1.8 und BoxShade 3.3.1 erstellt. Die Proteinsequenzen wurden aus den mRNA-Sequenzen abgeleitet. Genbank Acc-No. NTPDase1 Homo sapiens (S73183), NTPDase1 Mus musculus(AF037366), NTPDase1 Rattus norvegicus (U81295),NTPDase2 Homo sapiens(U91510), NTPDase2 Mus musculus (AF042811), NTPDase2 Rattus norvegicus (Y11835),NTPDase3 Homo sapiens (AF034840), NTPDase3 Mus musculus (AY376710), NTPDase3 Rattus norvegicus (AJ437217), NTPDase4 Homo sapiens (AF016032), NTPDase5 Homo sapiens (AF039918), NTPDase5 Mus musculus (AF006482), NTPDase5 Rattus norvegicus (BC62044),NTPDase6 Homo sapiens(AF039916), NTPDase6 Mus musculus (NM_172117), NTPDase6 Rattus norvegicus (AJ277748), NTPDase7 Homo sapiens (AK055540), NTPDase7 Mus musculus (AF288221) NTPDase8 Homo sapiens(AY359008), NTPDase8 Mus musculus (AY364442), NTPDase8 Rattus norvegicus (AY430414)

Das Alignment verdeutlichte die Ähnlichkeit der NTPDase3 mit den membranständigen E-NTPDasen1, 2, 3 und 8. Besonders in den Bereichen um die ACR's zeigte sich ein hoher Grad an Ähnlichkeit zwischen den verschiedenen E-NTPDasen aller drei Untergruppen. Alle 5, für die E-NTPDase-Familie typischen ACR's (Handa et al., 1996; Schulte am Esch II et al., 1999), konnten in der NTPDase3 nachgewiesen werden (Abbildung 10).

4.2.2 in silico – Analysen zur Membrantopologie

Der Kyte-Doolittle-Hydrophathie-Blot zeigte zwei stark hydrophobe Bereiche am N- und C-Terminus des Proteins (Abbildung 11), welche auf die Existenz von 2 Transmembrandomänen schließen ließ.

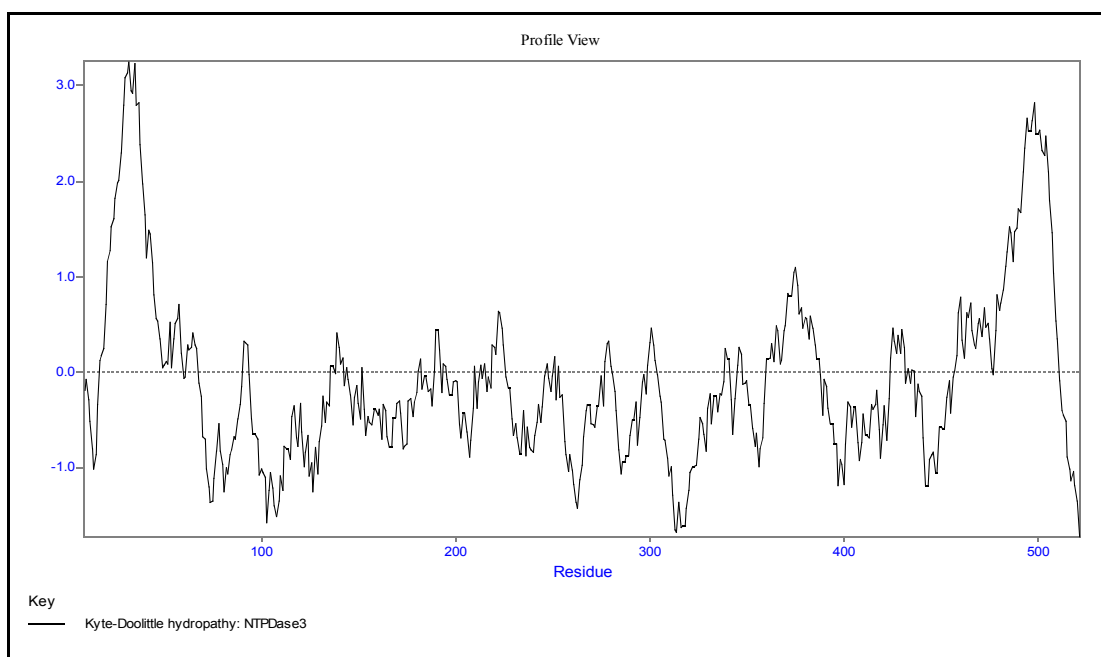


Abbildung 11:Hydrophathie-Blot nach Kyte-Doolittle

Die graphische Darstellung zeigt einen mit Omega erstellten Hydrophathie-Blot nach Kyte et al. (1982). An den beiden Termini der Proteinsequenz sind hydrophobe Bereiche zu erkennen, die wahrscheinlich die Bereiche der zwei Transmembrandomänen darstellen.

Für eine exaktere Vorhersage der Membrantopologie wurde die Sequenz mit dem TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), einem Programm zur Berechnung von Transmembrandomänen und Membrantopologie, analysiert (Abbildung 12). Dabei zeigte sich, daß mit großer Wahrscheinlichkeit 2 Transmembrandomänen im Bereich as 21-43 (TPAIVTLVLLVSIVVLVTLTLI) und as 486-508

(VFMGVLAFFTAIALLLCLAFLFYI) vorliegen. Der größte Teil des Proteins (as 44-485) ist extrazellulär lokalisiert. Die ersten und letzten 20 Aminosäuren liegen im Cytosol. Damit entspricht das Enzym in seiner Membrantopologie der ersten Gruppe von E-NTPDasen, zu der auch die NTPDase1, 2 und 8 gehören.

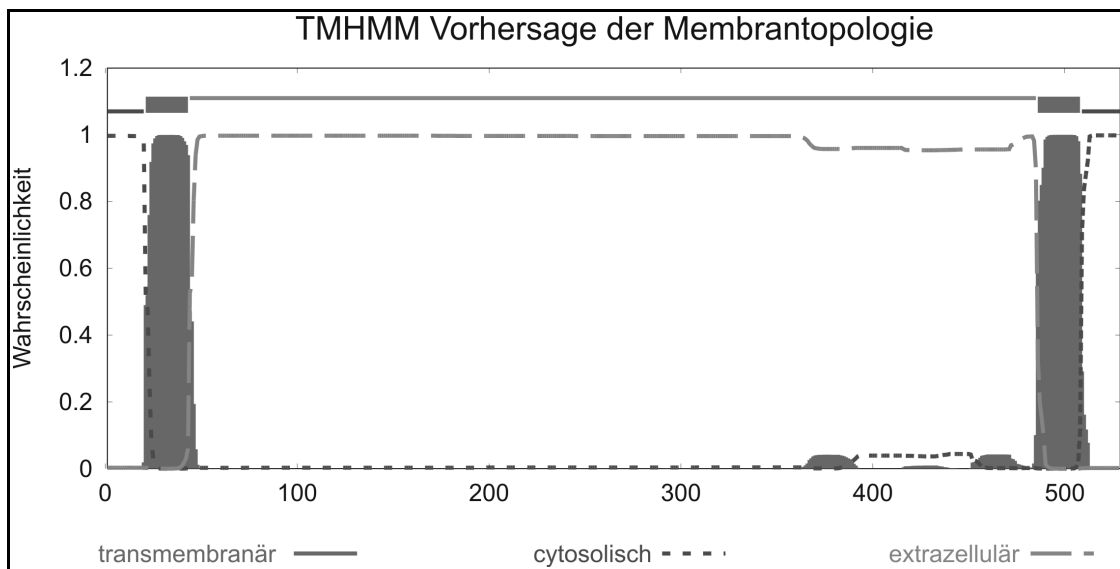


Abbildung 12: Graph der TMHMM 2.0 -Analyse zur Membrantopologie

Der Bereich der durchgezogenen Linie kennzeichnet die Wahrscheinlichkeit für transmembranäre Bereiche. Die kurz gestrichelte Linie zeigt die Wahrscheinlichkeit für eine cytosolische Lokalisation der Aminosäuren und die lang-gestrichelte Linie gibt die Wahrscheinlichkeit für extrazelluläre Aminosäurereste an.

4.2.3 Computergestützte Vorhersage der zellulären Lokalisation

Eine Analyse mit SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), einem Programm zur Identifikation von Signalpeptiden, ergab eine hohe Wahrscheinlichkeit für einen N-terminalen Signal-Anker. Darunter versteht man ein Signalpeptid, welches nicht abgespalten wird und das Protein dem sekretorischen Weg zuführt. Der sekretorische Weg über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat ist der übliche Transportweg für sekretierte und plasmamembranständige Proteine (van Vliet et al., 2003).

Zur Untersuchung auf weitere Sortiersignale wurde eine PSORT II-Analyse (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>) durchgeführt. Sortiersignale für Peroxisomen (SKL, (R/K(L/V/I)X₅(H/Q)(L/A)) oder ER-Retentions-Signale (KDEL/HNEL, N-terminales KKXX / KXXKX, C-terminales XXRR), die das Enzym in der Zelle zurückhalten

würden, waren in der Sequenz nicht zu finden.

Angesichts des Signalankers und der Verteilung der am nächsten verwandten E-NTPDasen 1, 2 und 8 erschien eine primäre Lokalisation innerhalb der Plasmamembran am wahrscheinlichsten. Ein Vorversuch, in dem an intakten, NTPDase3-transfizierter Zellen eine 11fach höhere ATP-Hydrolyse gemessen wurde als an Mock-transfizierten Zellen, sprach ebenfalls für eine plasmamembranständige Lokalisation des Enzyms.

4.2.4 Analyse potentieller Glykosilierungsstellen

Ektoenzyme von Eukaryonten sind sehr häufig stark glykosiliert und in vielen Fällen ist die Verzuckerung für die Synthese eines aktiven Enzyms wichtig. Da eine Glykosilierung bereits für Mitglieder der E-NTPDasen beschrieben wurde (Zhong et al., 2001; Smith et al., 1999c), wurde auch die Proteinsequenz der Ratten-NTPDase3 auf potentielle Glykosilierungsstellen analysiert.

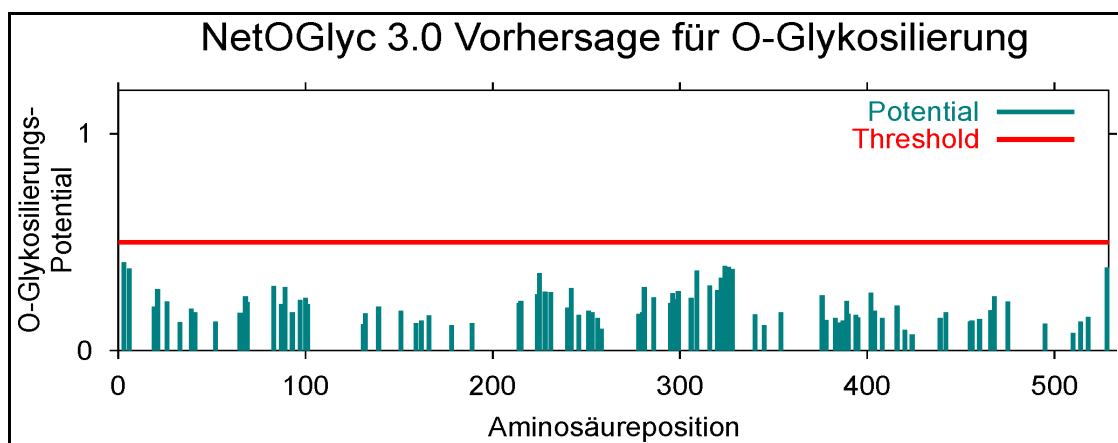


Abbildung 13: O-Glykosilierungsdiagramm nach NetOGlyc 3.0

Dargestellt ist das Potential für eine O-Glykosilierung innerhalb der Aminosäuresequenz der NTPDase3 der Ratte. Der Grenzwert für eine wahrscheinliche O-Glykosilierung wird in bei keinem der Serin oder Threonin-Reste überschritten. Graphik durch <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/> erzeugt.

Im Falle der O-Glycosilierung wird ein Zuckerbaum über die Hydroxylgruppe an Serin oder Threonin gekoppelt. Nach Angabe von NetOGlyc 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) ist bei den 89 Serin und Threonin-Resten eine O-Glykosilierung unwahrscheinlich (Abbildung 13).

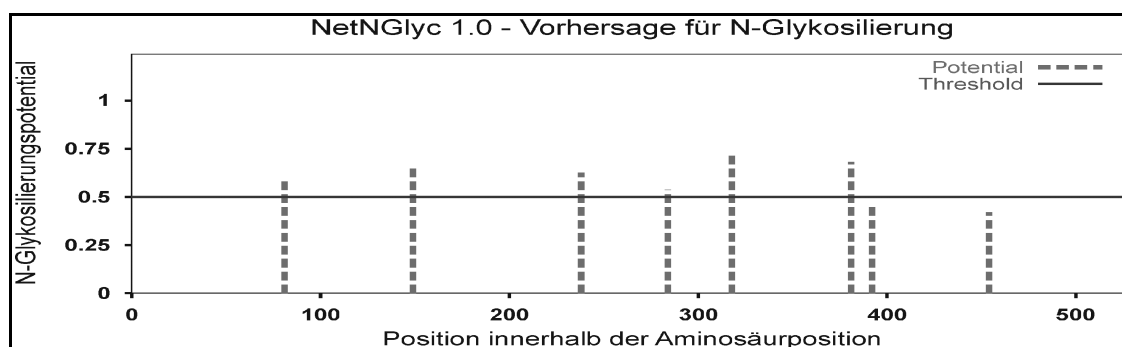


Abbildung 14: N-Glykosilierungsdiagramm nach NetNGlyc 1.0

Dargestellt ist das Potential für N-Glykosilierungen innerhalb der Aminosäuresequenz der NTPDase3 der Ratte. An sechs Positionen überschreitet das errechnete Potential den Grenzwert von 0,5 was auf eine Glykosilierung der Asparagin-Reste an dieser Position hindeutet. Graphik durch <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> erzeugt.

Bei der N-Glykosilierung werden die Zuckerreste auf ein Asparagin innerhalb einer Asn-Xaa-Ser/Thr-Aminosäurefolge (Sequon) übertragen. Eine Analyse der Sequenz mit NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) zeigt 8 mögliche N-Glykosylierungsstellen (N^{81} , N^{149} , N^{238} , N^{284} , N^{318} , N^{381} , N^{392} , N^{454}), von denen 6 in einem Sequenzkontext liegen, der eine Glykosilierung wahrscheinlich machen (Abbildung 14).

Bis auf N^{318} , bei dem ein auf das Asparagin folgendes Prolin eine Glykosilierung mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließt, werden alle Glykosilierungsstellen auch mit PROSITE (<http://au.expasy.org/prosite/>) gefunden. Die nach NetNGlyc wahrscheinlich glykosilierten Positionen liegen im extrazellulären Loop zwischen den beiden Transmembrandomänen. Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit liegt eine N-Glykosilierung an N^{149} und N^{381} vor. Weitere, wahrscheinlich glykosilierte, Asparagin-Reste finden sich im Protein auf den Positionen N^{81} , N^{238} und N^{284} (Tabelle 17).

Position	Sequence	Potential	Abstimmung	Resultat	Warnungen
81	NNTG	0.5884	(7/9)	+	
149	NETA	0.6560	(9/9)	++	
238	NASD	0.6252	(8/9)	+	
284	NISN	0.5359	(6/9)	+	
318	NPSD	0.7357	(9/9)	++	PRO-X1
381	NLSG	0.6807	(9/9)	++	
392	NDSS	0,4618	(5/9)	-	

Position	Sequence	Potential	Abstimmung	Resultat	Warnungen
454	NSSI	0,4196	(5/9)	-	

Tabelle 17: Potentielle N-Glykosilierungsstellen

Die Tabelle listet die von NetNGlyc 1.0 errechneten N-Glykosilierungsstellen auf. Die Berechnung wurde in 9 neuronalen Netzwerken ausgeführt, deren Abstimmungsergebnis in der Spalte Abstimmung zu sehen ist. Daraus ergab sich die Bewertung: – wahrscheinlich nicht glykosiliert, + wahrscheinlich Glykosiliert, ++ mit hoher Wahrscheinlichkeit glykosiliert. Die Warnung Pro-X1 weist auf ein Prolin in direkter Folge des Asparagin-Restes hin, was eine Glykosilierung an Position N³¹⁸ sehr unwahrscheinlich macht.

Ein Alignment verschiedener NTPDase3-Orthologen und ein Vergleich deren NetNGlyc-Vorhersagen sollte Aufschluß über die Konservierung der Glykosilierungsstellen in der Primärsequenz der NTPDase3 geben.

Lfd. Nr.	Organismus	Acc-No.	as	Sequenz	as	NetNGlyc Resultat
1a	Mensch	AF034840	73	YQWPAEKENNTGVVSQTFKC	92	N ⁸¹ +
1b	Ratte	AJ437217	73	YQWPAEKENNTGVVSQTFRC	92	N ⁸¹ +
1c	Maus	AY376710	73	YQWPAEKENNTGVVSQTFRC	92	N ⁸¹ +
1d	Huhn	AF041355	57	YQWPADKENGTGIVSQVESC	76	N ⁶⁵ ++
				***** ** * * * *		
2a	Mensch	AF034840	140	GMRLRLRLQNETAANEVLESI	160	N ¹⁴⁹ ++
2b	Ratte	AJ437217	140	GMRLRLRLQNETAAAEVLESI	160	N ¹⁴⁹ ++
2c	Maus	AY376710	140	GMRLRLRLQNETAAREVLESI	160	N ¹⁴⁹ ++
2d	Huhn	AF041355	124	GMRLRLREQNSTKAEQVFAEV	144	N ¹³³ ++
				***** * * * * *		
3a	Mensch	AF034840	232	VAGEKMDLNTSDIMQVSLYG	251	N ²³⁸ +
3b	Ratte	AJ437217	232	VSEEKMEPNASDTVQVSLYG	251	N ²³⁸ +
3c	Maus	AY376710	232	VAGEKMEPNASDTVQVSLYG	251	N ²³⁸ +
3d	Huhn	AF041355	218	GVTIE-DKNTSVLFRLYGTN	236	N ²²³ --

4a	Mensch	AF034840	275	LQNSPTKNHLTNP CYPRDYS	295	keine
4b	Ratte	AJ437217	275	LQSPSTDANISNPCYPHGYS	295	N ²⁸⁴ +
4c	Maus	AY376710	275	LQSPSTEANISNPCYPQGYS	295	N ²⁸⁴ +
4d	Huhn	AF041355	258	HQDGSYVQNISHPCYPKGYR	278	N ²⁶⁷ +
				* * * * *		

Lfd. Nr.	Organismus	Acc-No.	as	Sequenz	as	NetNGlyc Resultat
5a	Mensch	AF034840	310	VDQRPE SYNPNDVITF EGTG	330	keine
5b	Ratte	AJ437217	310	EKQRPKSYN PSD TITFTGTG	330	N ³¹⁸ ++ ⁽¹⁾
5c	Maus	AY376710	310	EKQRPESY NSSK SVTFMGTG	330	N ³¹⁸ +
5d	Huhn	AF041355	293	P--TPSMLSPAQILTVTGTG	310	keine
				* * **		
6a	Mensch	AF034840	373	FYYTASAL NLSGSF SLDTFN	392	N ³⁸¹ ++
6b	Ratte	AJ437217	373	FYYTASAL NLSGSF SLTSEFN	392	N ³⁸¹ ++
6c	Maus	AY376710	373	FYYTASAL NLSGSF SLTSEFN	392	N ³⁸¹ ++
6d	Huhn	AF041355	353	FYYTFSFL NLTG QQLSHVN	372	N ³⁶¹ ++
				**** * ** * ** *		

Tabelle 18: Vergleich der Asn-Xaa-Ser/Thr-Sequons von 4 NTPDase3-Orthologen

In der Tabelle sind die 6 wahrscheinlichen Glykosilierungsstellen (1-6) der NTPDase3-Orthologen aus Mensch (a), Ratte (b), Maus (c) und Huhn (d) aufgelistet. Das Sequon und die umgebenden Aminosäuren sind, mit der Start- und End-Position der aufgeführten Sequenz, in der 4ten bis 6ten Spalte aufgeführt. Das glykosilierte Asparagin ist **fett** formatiert und das gesamte Sequon **grau** unterlegt.

Die Sternchen (*) unterhalb der Sequenzen zeigen die Aminosäuren an, welche in allen 4 Orthologen identisch sind. In der letzten Spalte ist die Position des potentiell glykosilierten Asparagins (N^{xxx}) und das Ergebnis NetNGlyc-Vorhersage angegeben: (--) sehr unwahrscheinlich, (-) unwahrscheinlich, (+) wahrscheinlich, (++) höchstwahrscheinlich.

⁽¹⁾ Dem Asparagin folgt ein Prolin was die Glykosilierungswahrscheinlichkeit stark senkt.

Die Proteinsequenzen der NTPDase3 von Mensch (*Homo sapiens sapiens*), Ratte (*Rattus norvegicus*), Maus (*Mus musculus*) und Huhn (*Gallus gallus*), wurden mittels NetNGlyc 1.0 auf potentielle Glykosilierungsstellen untersucht. Anschließend wurden die 4 Proteinsequenzen mit ClustalX 1.8 aligned und es wurden die Glykosilierungsmotive zugeordnet.

Vier der sechs für die Ratte errechneten Asn-Xaa-Ser/Thr-Sequons waren in allen analysierten Sequenzen an vergleichbaren Positionen zu finden (Tabelle 18). Insbesondere die Asparagine N¹⁴⁹ und N³⁸¹ wiesen in allen 4 Spezies eine sehr hohe Glykosilierungswahrscheinlichkeit auf. Das Sequon N²⁸⁴ISN war in Ratte, Maus und Huhn, jedoch nicht im menschlichen Orthologe zu finden (Tabelle 18, 4a-d).

Das Asparagin 318 lag nur bei der Ratte und der Maus innerhalb eines Asn-Xaa-Ser/Thr-Sequons (Tabelle 18, 6a-d). Bei der Ratte ist trotz des hohen Potentials eine Glykosilierung an diesem Asparagin sehr unwahrscheinlich, da dem Asparagin ein Prolin folgt. Weiterhin zeigt der Sequenzbereich um das N³¹⁸ nur geringe Identität auf

Aminosäureebene gegenüber den anderen Spezies.

NTPDase 1 Homo sapiens	69	AEKEN NDT GVVH	79
NTPDase 1 Rattus norvegicus	69	AEKEN NDT GVVQ	79
NTPDase 1 Mus musculus	69	AEKEN NDT GVVQ	79
NTPDase 2 Homo sapiens	60	ADKEN NDT GIVG	70
NTPDase 2 Rattus norvegicus	60	ADKEN NDT GIVG	70
NTPDase 2 Mus musculus	60	ADKEN NDT GIVG	70
NTPDase 3 Homo sapiens	77	AEKEN NT GVVS	87
NTPDase 3 Rattus norvegicus	77	AEKEN NT GVVS	87
NTPDase 3 Mus musculus	77	AEKEN NT GVVS	87
NTPDase 8 Homo sapiens	63	ANKEN NGT GVVS	73
NTPDase 8 Rattus norvegicus	63	ANKEK DT GVVS	73
NTPDase 8 Mus musculus	63	ANKEK DT GVVS	73
NTPDase 4 Mus musculus	109	RHNGNPHDLLD	119
NTPDase 7 Mus musculus	104	RHNGNPHDLLD	114
NTPDase 5 Rattus norvegicus	68	QRTSGQLPFLE	78
NTPDase 6 Rattus norvegicus	94	R-PPGETPTLT	103

Abbildung 15: Alignment verschiedener

E-NTPDasen im Bereich des konservierten Asn-Xaa-Ser/Thr-Seqouns N⁸¹

Im Vergleich wird ersichtlich, daß bei den membranständigen

Nukleotidasen 1, 2 und 3 bei Mensch, Maus und Ratte die Glykosilierungsstelle zu finden ist (grau hinterlegt, Asparagin **fett**).

Die intrazellulär lokalisierten Familienmitglieder (NTPDase 4, 5, 6, 7) haben an dieser Stelle kein Sequon. In einer noch unpublizierten Sequenz der membranständigen, humanen NTPDase8 ist das konservierte Sequon ebenfalls zu finden, in den restlichen NTPDase8-Orthologen jedoch nicht.

Genbank-Acc.-No. der verwendeten Sequenzen: Homo sapiens: NTPDase1 S73813, NTPDase2 U91510, NTPDase3 AF034840, NTPDase8 AY430414; Mus musculus: NTPDase1 AF037366, NTPDase2 AF042811, NTPDase3 AY376710, NTPDase4 AK004761, NTPDase7 AF288221, NTPDase8 AY364442; Rattus norvegicus: NTPDase1 U81295, NTPDase2 Y11835, NTPDase3 AJ437217, NTPDase5 BC062044, NTPDase6 AJ277748, NTPDase8 AY536920

Das erste Asn-Xaa-Ser/Thr-Sequon (N⁸¹NTG) liegt wenige Aminosäuren hinter der ACR I und ist in allen vier Spezies an vergleichbarer Position zu finden. Als einzige Glykosilierungsstelle ist dieses Sequon in der NTPDase1, NTPDase2 und NTPDase3 aus Mensch, Maus und Ratte zu finden. Bei den intrazellulär lokalisierten Mitgliedern der E-NTPDase-Familie (NTPDase4, 5, 6, 7) ist das Sequon nicht vorhanden (Abbildung 15,). Die NTPDase8 von Maus und Ratte¹⁴, welche ebenfalls zur Gruppe der E-NTPDasen mit 2 Transmembrandomänen und plasmamembranständiger Lokalisation gehört, weist das konservierte N⁸¹ interessanterweise ebenfalls nicht auf. In einer kürzlich klonierten humanen NTPDase8-Sequenz (AF037366) ist das konservierte N⁸¹ jedoch zu finden.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß innerhalb der NTPDase3 der Ratte wahrscheinlich 5 Asparaginsäurereste (N⁸¹, N¹⁴⁹, N²³⁸, N²⁸⁴, N³⁸¹) glykosiliert sind. Ebenso sind 2 der Sequons innerhalb der NTPDase3 (N¹⁴⁹, N³⁸¹) und ein weiteres (N⁸¹) innerhalb der meisten plasmamembranständigen Mitglieder der E-NTPDase-Familie konserviert.

14 unpublizierte Sequenz freundlicherweise von Dr. Jean Sévigny zur Verfügung gestellt

Zusätzlich zur N-Glykosylierung existiert bei W²⁰³ eine C-Mannosylierungs-Sequenz (WXXW). Bei der C-Mannosylierung werden Zuckerketten über eine C-C-Bindung an ein Tryptophan gehängt (Furmanek et al., 2000).

4.2.5 Verteilungsmuster der Cysteine

Zwischen Cysteinen können in Proteinen Sulfidbrücken gebildet werden, welche in vielen Fällen der Stabilisierung der globulären Struktur dienen. Um Hinweise auf Cysteine zu finden, die für die tertiäre Struktur der NTPDase3 relevant sein könnten, wurden verschiedene Sequenzen mit ClustalX aligned, um konservierte Cysteine zu finden.

Dazu wurden verschiedene Orthologe der NTPDase1-4 sowie NTPDase7 und 8 ausgewählt, da diese Enzyme über dieselbe Membrantopologie verfügen. Von den E-NTPDasen mit einer Transmembrandomäne, wurde die NTPDase5 und 6 der Ratte ausgewählt.

Ein Alignment der Sequenzen zeigte für die plasmamembranständigen E-NTPDasen eine erstaunlich ähnliche Verteilung der Cysteine, insbesondere im Bereich zwischen der ACR IV und V (Abbildung 16). Die NTPDase3 der Ratte hat insgesamt 13 Cysteine (C¹⁰, C⁹², C¹¹⁶, C²⁶¹, C²⁸⁹, C³⁰⁸, C³³⁴, C³⁴⁷, C³⁵³, C³⁹⁹, C⁴²², C⁵⁰¹, C¹⁵⁰⁹). Davon sind 10 Cysteine (C⁹²¹⁵, C¹¹⁶, C²⁶¹, C²⁸⁹, C³⁰⁸, C³³⁴, C³⁴⁷, C³⁵³, C³⁹⁹¹⁶, C⁴²²) innerhalb der Orthologen NTPDase1 (*Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Sus scrofa*), NTPDase2 (*Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Gallus gallus*), NTPDase3 (*Gallus gallus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Homo sapiens*) und NTPDase8 (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*) an gleicher Stelle vorhanden.

15 kein Cystein in NTPDase1 von *Bos Taurus*

16 kein Cystein in NTPDase8 von *Homo sapiens*

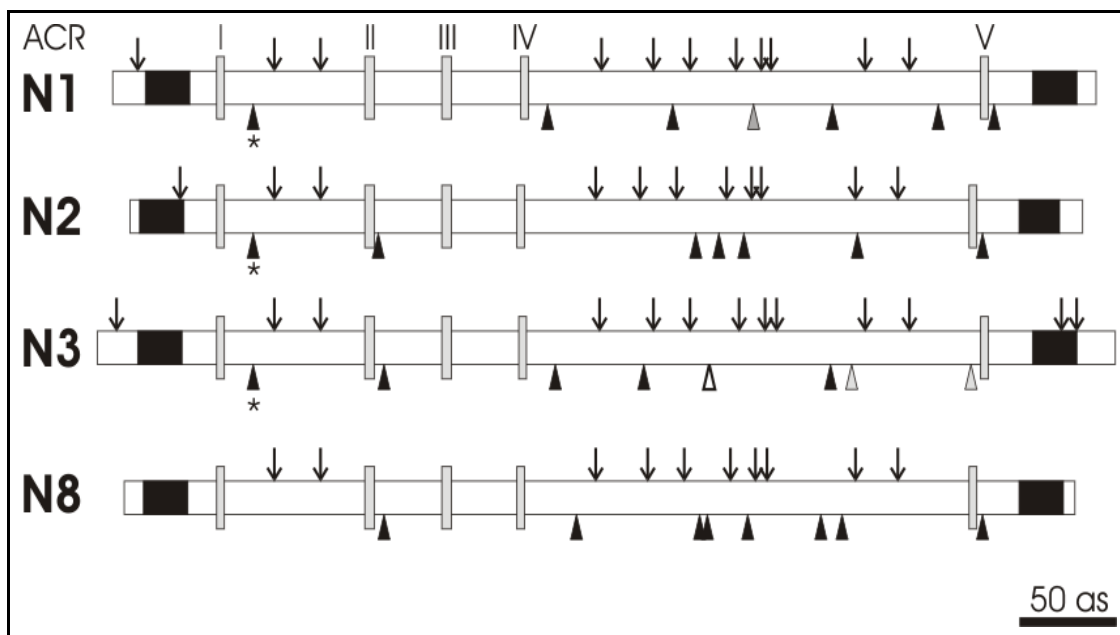


Abbildung 16: Glykosilierungsschema und Cystein-Verteilung

Dargestellt sind die NTPDasen 1 bis 3 sowie 8 (N1, N2, N3, N8) aus *Rattus norvegicus*. Zur Orientierung sind die ACR's I-V als grau hinterlegte Kästen eingezeichnet. Der Bereich der Transmembrandomänen ist schwarz hinterlegt. Die aufwärts gerichteten Pfeilspitzen zeigen auf die Asn-Xaa-Ser/Thr-Sequons der Proteinsequenzen. Schwarze Pfeilspitzen sind nach NetNGlyc wahrscheinlich glykosiliert, grau gefüllte Pfeilspitzen sind nach NetNGlyc wahrscheinlich nicht glykosiliert. Der weiße Pfeilkopf markiert das Sequon, in dem ein, dem Asparagin folgendes Prolin, die Glykosilierung sehr unwahrscheinlich macht. Die Sterne (*) markieren das in *Homo sapiens*, *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* konservierte Sequon der NTPDasen 1 bis 3. In der ebenfalls membranständigen NTPDase8 ist diese Glykosilierungsstelle nicht zu finden. Die Positionen der Cysteine sind durch die abwärts gerichteten Pfeile markiert. Eine auffällig gleiche Verteilung zeigt sich insbesondere zwischen der ACR IV und V.

Genbank Acc-No. der verwendeten Sequenzen: NTPDase1 U811295, NTPDase2 Y11835, NTPDase3 AJ437217; NTPDase8 AY536920

Betrachtet man die intrazellulär lokalisierten Enzyme NTPDase4 (*Homo sapiens*, *Mus musculus*) und NTPDase7 (*Homo sapiens*, *Mus musculus*), so sind im Vergleich mit der NTPDase3 trotz gleicher Membrantopologie, nur noch drei der konservierten Cysteine (C^{334} , C^{399} , C^{422}) zu finden. Ein Vergleich der NTPDase3 mit der NTPDase5 (*Mus Musculus*, *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*) und NTPDase6 (*Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Cavea porcellus*) zeigt ebenfalls deutliche Unterschiede im Cystein-Muster. Nur 3 Cystein-Reste C^{289} , C^{334} , C^{422} stimmen mit der NTPDase3 überein.

4.2.6 Potentielle Phosphorylierungstellen

Eine große Anzahl von Enzymen wird über Phosphorylierung moduliert. Eine Untersuchung der NTPDase auf möglichen Phosphorylierungs-Stellen mit NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) prognostizierte potentielle Phosphorylierungsstellen für 13 Serine, 3 Threonine und 4 Tyrosine (Tabelle 19). Eine Analyse mit PROSITE (<http://au.expasy.org/prosite/>) zeigte 5 ProteinkinaseC-Sites (as 65-67 SsR; as 89-91 TfR; as 93-95 SvK; as 131-133 StR; as 309-311 TeK) die alle im Bereich des extrazellulären Loops lokalisiert waren.

<i>Serinreste</i>			<i>Threoninreste</i>		
<i>Position</i>	<i>Kontext</i>	<i>Score</i>	<i>Position</i>	<i>Kontext</i>	<i>Score</i>
19	FRAL S RTPA	0,952	26	PAIV T LVVL	0,603
65	LDAG S SRTT	0,639	69	SSRT T VYVY	0,949
93	TFRC S VKGS	0,985	214	HGVD T TGAL	0,754
100	GSGI S SYEN	0,895	<i>Tyrosinreste</i>		
101	SGISS Y ENN	0,988	<i>Position</i>	<i>Kontext</i>	<i>Score</i>
231	ISFV S EEKM	0,822	102	GISS Y ENNP	0,832
240	EPNAS D TVQ	0,602	185	EEGV Y GWIT	0,935
246	TVQV S LYGY	0,610	290	SNPC Y PHGY	0,676
316	QRPK S YNPS	0,997	417	FDE T YARSY	0,979
340	EKVAS S VFDF	0,994			
390	FSLT S FNDS	0,960			
394	SFN D SSWDF	0,984			
518	TKER S ENAF	0,960			

Tabelle 19: Potentiell phosphorylierte Aminosäurereste der NTPDase3 der Ratte

Von NetPhos 2.0 ermittelte Phosphorylierungsstellen (**fett** gedruckte **S**, **T** oder **Y** in der Kontext-Spalte) mit Angabe der Aminosäurepositionen (*Position*), den umgebenden Aminosäuren (*Kontext*) und dem Phosphorylationspotentials (*Score*).

Die beiden Serinreste S¹⁹ und S⁵¹⁸ liegen, nach der berechneten Lage der Transmembrandomänen, intrazellulär vor. Die restlichen, potentiell phosphorylierten Aminosäuren liegen im Bereich des extrazellulären Loop, mit Ausnahme des Threonin 26, welches im Bereich der N-terminalen Transmembrandomäne lokalisiert ist. Einige der Kandidaten liegen im Bereich der ACR I (S⁶⁵, T⁶⁹) bzw. der ACR III

(T¹⁸⁵) was eine Phosphorylierung an diesen Stellen eher unwahrscheinlich erscheinen läßt.

4.2.7 Sequenzanalysen zur möglichen Sekundärstruktur und Zugehörigkeit zur Zuckerkinase/Hitzeschock-Protein 70/Aktin-Superfamilie

Um Anhaltspunkte für eine mögliche Sekundär- und Tertiärstruktur des Enzyms zu erlangen, wurden die Aminosäuresequenz der NTPDase3 und die Aminosäuresequenzen anderer E-NTPDasen analysiert. Die wahrscheinliche Sekundärstruktur, Solvenz-Zugänglichkeit und Aminosäuredichte innerhalb der NTPDase3 wurde computergestützt (<http://www.igb.uci.edu/tools/scratch/>) analysiert und die Sekundärstrukturvorhersagen der NTPDase3 wurde mit denen anderer E-NTPDasen verglichen.

Die ACCpro-Analyse gibt Aufschluß über die theoretische Zugänglichkeit für Lösungsmittel zu den Aminosäureresten. Wie für die Transmembrandomänen der NTPDase3 zu erwarten, war in den Bereichen der hydrophoben Alphahelices die Wahrscheinlichkeit gering, daß Aminosäuren dieses Bereichs dem umliegenden Lösungsmittel ausgesetzt sind. Da die ACR's voraussichtlich an der Substratbindung und der katalytischer Aktivität beteiligt sind, wurden auch sie in Augenschein genommen. Die Analyse zeigte weiterhin, daß im Bereich der ACR I die Aminosäuren wahrscheinlich dem Lösungsmittel ausgesetzt sind. Im Bereich der ACR II, III und IV besteht nur für einige Aminosäuren eine Wahrscheinlichkeit für eine Lösungsmittelzugänglichkeit. ACR V dagegen liegt wahrscheinlich in einer dem Lösungsmittel unzugänglichen Region des Proteins. Wenn die ACR's I bis IV dem Lösungsmittel zugänglich sind, eröffnet das die Möglichkeit, daß sie mit den im Lösungsmittel vorliegenden Ionen und Substraten interagieren, wie es z.B. im katalytischen Zentrum zu erwarten wäre.

Die ConPro-Analyse gibt die Wahrscheinlichkeit an, ob eine Aminosäure mit mehr als der durchschnittlichen Anzahl anderer Aminosäuren Kontakt hat. Für alle ACR's zeigt die ConPro-Analyse mit 70-73 % Wahrscheinlichkeit eine überdurchschnittliche Kontaktdichte der Aminosäuren in einem Radius von 10 Å. Dieser Befund könnte auf Proteinregionen mit verstärkter Wechselwirkung zwischen den Aminosäuren hinweisen,

wie er für Bereiche, die strukturell oder katalytisch relevant sind, zu erwarten ist.

In der SSpro-Analyse wurden mutmaßliche Sekundärstrukturen der NTPDase3 sowie anderer Mitglieder der E-NTPDase-Familie aus der Aminosäuresequenz errechnet. Dabei wurde deutlich, daß zwischen NTPDase1, 2, 3 und 8 bzw. zwischen NTPDase4 und 7 sowie zwischen NTPDase 5 und 6 nahezu kein Unterschied in der Sekundärstruktur besteht. Das Ergebnis zeigte jedoch nicht nur eine starke der Ähnlichkeit zwischen den jeweiligen Enzymen der drei Untergruppen sondern vermittelte ein alle E-NTPDasen umfassendes einheitliches Bild der Sekundärstruktur. Die Abfolge der Alpha-Helices und Beta-Stränge ist zwar nicht identisch, aber bei allen Mitgliedern ist ein Muster mit bestimmten Konstanten zu erkennen. So folgen der ersten α -Helix im Bereich der Transmembrandomäne stets β -Stränge innerhalb derer das konservierte DXG-Motiv der ersten ACR liegt. Auch das zweite DXG-Motiv in der ACR IV ist immer zwischen 2 β -Strängen positioniert. Im Bereich zwischen ACR I und ACR IV ist bei allen E-NTPDasen eine alternierende Folge von α -Helices und β -Strängen zu finden, bei der die ACR II stets am Ende eines β -Strangs liegt, gefolgt von einer α -Helix. Die ACR V ist immer am Anfang einer α -Helix positioniert, dem ein β -Strang vorangeht (Abbildung 17).

Nach dem Vergleich der verschiedenen E-NTPDasen untereinander wurde der Frage nachgegangen, in welcher Beziehung die Ratten-NTPDase3 zur Zuckerkinase/Hitzeschock-Protein 70/Aktin-Superfamilie steht. Die Mitglieder dieser Superfamilie besitzen eine Nukleotid-Bindestelle und sind Phosphotransferasen und Phosphohydrolasen. Sie haben zwei konservierte Domänen mit gleicher Topologie ($\beta_1\beta_2\beta_3\alpha_1\beta_4\alpha_2\beta_5\alpha_3$), die in der Tertiärstruktur eine Tasche bilden, in der das Substrat bindet. Innerhalb dieser Domänen gibt es nur wenige konservierte Aminosäuren, zu denen auch ein DXG-Motiv zählt. Ansonsten ist die Ähnlichkeit der verschiedenen Mitglieder bezüglich der Aminosäuresequenz gering (Übersicht bei Hurley, 1996).

Um die Verwandtschaft der NTPDase3 mit der der Zuckerkinase/Hitzeschock-Protein 70/Aktin-Superfamilie näher zu untersuchen, wurde die Sekundärstruktur der NTPDase3 und anderer E-NTPDasen graphisch aufgetragen. Die Sequenzen wurden dabei an dem DXG-Motif der ACR I ausgerichtet, welches auch in allen Mitgliedern der Zuckerkinase/Hitzeschock-Protein 70/Aktin-Superfamilie zu finden ist. Zum Vergleich

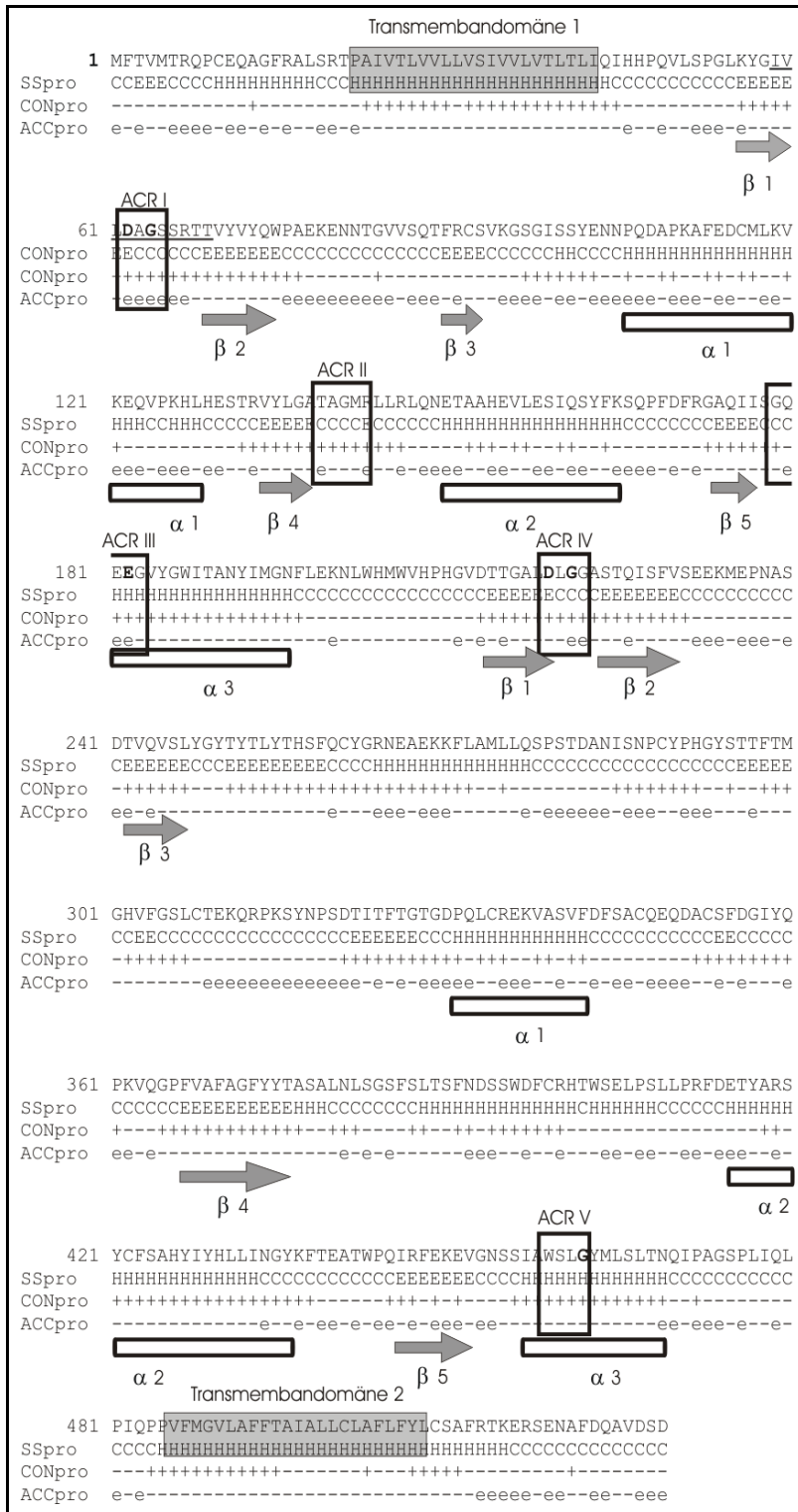


Abbildung 18: Kommentierung der potentiellen Sekundärstruktur.

Die Aminosäuresequenz der Ratten-NTPDase3 mit verschiedenen computerunterstützten Vorhersagen kommentiert. In der Sequenz sind die ACR's (Kästen) und Transmembrandomänen (grau hinterlegt) zur besseren Orientierung kenntlich gemacht. Kandidaten für konservierte Aminosäuren der Zuckerkinase/Hitzeschock-Protein 70/Aktin-Superfamilie in den ACR's I, IV und V sind **fett** gedruckt.

Die SSpro-Analyse beschriftet die Aminosäuren mit 'H' für Helix-Strukturen, 'E' für β -Stränge, die Bestandteile von β -Faltblättern sind und 'C' für den Rest.

Um die Ähnlichkeit zur Zuckerkinase/Hitzeschock-Protein 70/Aktin-Superfamilie in der Anordnung der Sekundärstruktur zu verdeutlichen sind ausgewählte Sekundärstrukturen durch Pfeile (β -Stränge) und Röhren (α -Helices) unter dem Text markiert. Die Auswahl dieser Sequenzbereiche wurde anhand der **DXG**-Motive in ACR I und ACR IV und dem konservierten **G** der ACR V getroffen.

Die CONpro-Analyse markiert mit einem '+' die Aminosäuren, die innerhalb eines Radius von

10 Å wahrscheinlich eine überdurchschnittliche Anzahl von Kontakten zu anderen Aminosäure haben.

Mit der ACCpro-Analyse wurde die Sequenz auf Lösungsmittel-Exposition der Aminosäuren untersucht. Ein 'e' steht für exponierte Aminosäurereste, also Aminosäuren, die wahrscheinlich mit dem umliegenden Lösungsmittel in Berührung kommen. Der Grenzwert liegt bei 30 %.

Die SSpro, CONpro, ACCpro - Analysen wurden unter <http://www.igb.uci.edu/tools/scratch/> durchgeführt.

Im graphischen Vergleich der Sekundärstrukturen wird die Ähnlichkeit der E-NTPDase-Familie mit dem Hsc70/Actin-Zweig der Zuckerkinase/Hitzeschock-Protein 70/Aktin-Superfamilie erkennbar. Dieser Teil der Familie besitzt, wie auch die E-NTPDasen, 2 DXG-Motive. Beide **DXG**-Motive liegen zwischen zwei β -Strängen (β_1 , β_2) eingebettet. In den untersuchten E-NTPDasen 1 bis 8 sind die **DXG**-Motive der ACR I und ACR IV ebenfalls zwischen zwei β -Strängen lokalisiert. Das erste **DXG** im Bereich der ACR I entspricht der Konsensus-Sequenz des β -Phosphat-Binde-Motifs (... $(I/L/V)X(I/L/V/C)DXG(T/S/G)(T/S/G)XX(R/K/C)...$) (Flaherty et al., 1991). Dem β_5 -Strang folgt bei den Mitgliedern der Superfamilie unmittelbar die α_3 -Helix der ersten Domäne (IA) in der es eine konservierte Aminosäure (D/E/Q) dieser Familie gibt. Die ACR III (**GXXEG**) liegt ebenfalls stets zwischen einem β -Strang und einer α -Helix. Das konservierte Glycin der ACR V (**WXLG**) entspricht möglicherweise dem, in α_3 gelegenen, konservierten, Glycin der Superfamilie.

Ausgehend von den **DXG**-Motiven in der ACR I und IV, welche auch im Aktin und Hsp70 als konservierte Aminosäuren vorliegen, wurde eine Zuordnung der α -Helices und β -Stränge vorgenommen um eine hypothetische $\beta_1\beta_2\beta_3\alpha_1\beta_4\alpha_2\beta_5\alpha_3$ -Domänenstruktur in der NTPDase3 der Ratte zu finden. Die β -Stränge um das **DXG** entsprechen dabei dem β_1 und β_2 des Aktins/Hsc70. β_5 und α_3 der ersten Domäne werden auf den β -Strang und die α -Helix gelegt, welche die ACR III umschließt. Berücksichtigt man die Distanz zwischen dem β_3 und dem α_1 in der zweiten $\beta_1\beta_2\beta_3\alpha_1\beta_4\alpha_2\beta_5\alpha_3$ -Domäne (IIA) des Aktins und nimmt man weiterhin an, daß das konservierte Glycin in der ACR V mit dem konservierten Glycin des α_3 -Strangs der Zuckerkinase/Hitzeschock70/Aktin-Superfamilie identisch ist, ergibt sich eine mögliche $\beta_1\beta_2\beta_3\alpha_1\beta_4\alpha_2\beta_5\alpha_3$ -Zuordnung (Abbildung 18). Im β_4 -Strang der Superfamilie gibt es ein weiteres konserviertes Glycin. Ein Alignment der NTPDasen 1 bis 8 aus Mensch, Ratte und Maus zeigte zwei Glycine in der Nähe des für die NTPDase3 postulierten β_4 -Strangs, die innerhalb der NTPDase1, 2, 3 und 8 (G^{365}) bzw. der NTPDasen1, 2, 3, 4, 5, 7 und 8 (G^{357}) konserviert sind.

4.2.8 Genomische Lokalisation und Intron-Exon-Struktur der NTPDase3

Zur Lokalisation der mRNA innerhalb des Rattengenoms wurde die cDNA-Sequenz mit dem Rattengenom abgeglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/RnBlast.html>). Die Exons, aus denen sich die cDNA zusammensetzt, wurden mit hoher Identität ($\geq 98\%$) auf Chromosom 8, im Bereich 8q32 gefunden. Desweiteren zeigte sich, daß nach dem BLAST-Ergebnis das NTPDase3-Gen in 11 Exons vorlag, von denen 10 den offenen Leserahmen abdeckten (siehe Abbildung 19).

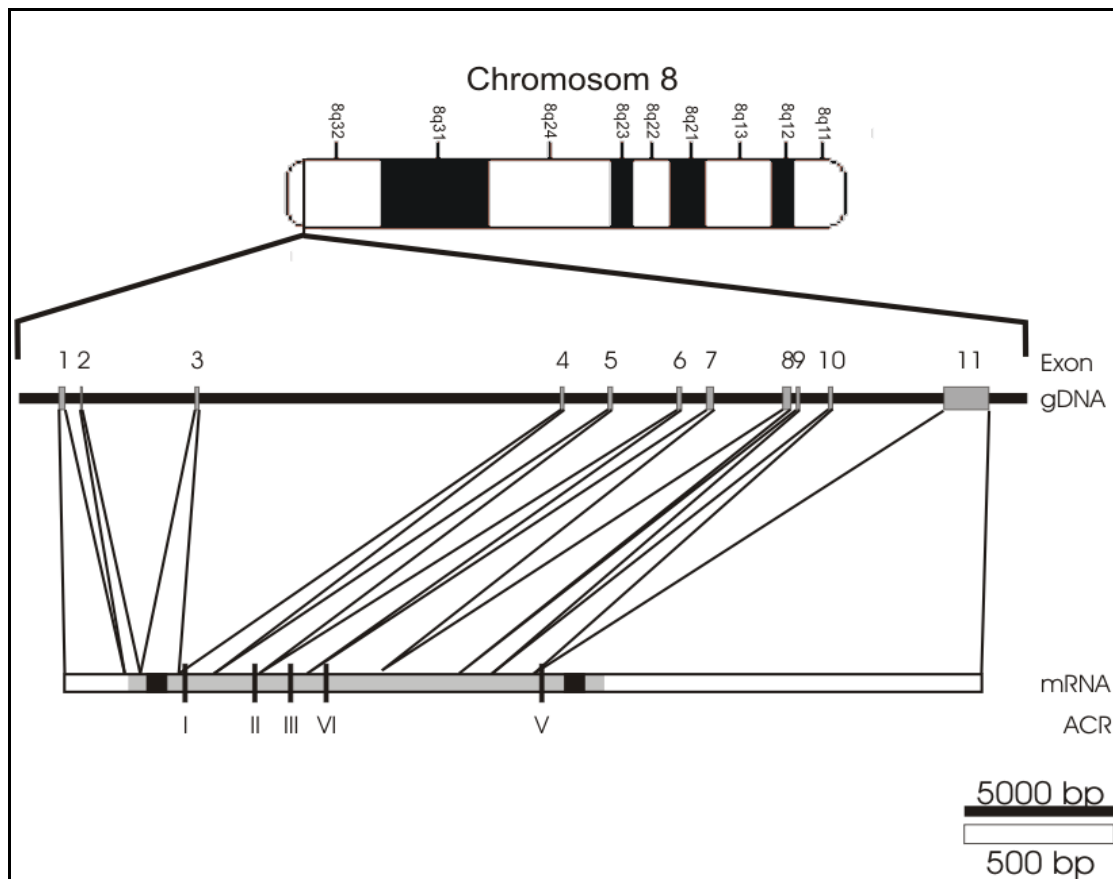


Abbildung 19: Chromosomale Lokalisation und Intron-Exon-Struktur der NTPDase3

Oben ist das Ideogramm des Chromosoms 8 der Ratte dargestellt, welches den BLAST-Resultaten entnommen wurde. In der Mitte ist der Teil der genomischen DNA (gDNA) dargestellt, der die NTPDase3-Exons (graue Kästen) umfasst. Im unteren Teil der Abbildung zeigt das Schema die RNA, mit der Lage des offenen Leserahmens (grau hinterlegt), der Transmembrandomänen (schwarz hinterlegt) und der ACR's (schwarze Balken).

<i>Intron Nr.</i>	<i>Donor Site</i>	<i>Sequenz-Umgebung</i>	<i>Akzeptor Site</i>	<i>Sequenz-Umgebung</i>
1	34697	tgcag GTgct	35216	ttacccttacAG ctcggactga
2	35269	ggcag GTaag	39039	tcctcactgcAG gcttcagggc
3	39168	tgaag GTaag	51236	ttttcccttcAG tatggaatcg
4	51355	gaaag GTaaa	52825	tttgctcttcAG gctcgggaat
5	52977	ctgag GTaag	55123	cctgctgtgcAGA agaacctgt
6	55284	tgag GTgtg	56110	cctgctgtgcAGA agaacctgt
7	56345	tgcag GTacc	58659	gtctgcctccAG agcccttcta
8	58933	ttgtg GTaag	59111	tcctgctcacAG gcatttgcag
9	59223	gcgag GTcag	60179	tccccttttcAG ctcccgtccc
10	60318	aagaa GTaag	64007	tctcctccacAG gtggggaata

Tabelle 20: Introns in der genomischen Sequenz der NTPDase3.

Die Tabelle zeigt die Positionen der Splice-Donor und Splice-Akzeptor-Stellen im Chromosom 8q32-Contig (Genbank Acc-No. NW_047803 Rn8_2327:3551369-3651370), sowie die umgebende Sequenz. Die Splice-Stelle (GT/AG) ist groß geschrieben, die Exon-Sequenz ist **fett** formatiert.

Durch Abgleich des BLAST-Resultats mit den potentiellen Splice-Stellen der Online-Analyse (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) wurden die Splice-Stellen bestimmt. Der Score der Online-Analyse lag für die Donor-Sites zwischen 0,77 und 1,00 und für die Akzeptor-Sites zwischen 0,67 und 0,97.

Um die Intron-Exon-Struktur weiter zu analysieren wurde ein Teil der genomischen Sequenz von Chromosom 8 aus der Datenbank herangezogen. Die Sequenz-Information stammt aus dem *Rattus norvegicus* chromosome 8 WGS Supercontig (Genbank Acc-No. NW_047803 Rn8_2327:3551369-3651370). Von dieser Sequenz wurde der die cDNA abdeckende Bereich von 31 kb mit ClustalX 1.81 gegen die cDNA aligned und parallel dazu auf potentielle Splice-Stellen untersucht (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html). Die Splice-Donor und Splice-Akzeptor-Stellen, die mit den Ergebnissen des Alignments übereinstimmen sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Die gefunden 11 Exons umfassten die komplette cDNA-Sequenz. Der größte Teil des in der cDNA vorliegenden 5' untranslatierten Bereichs war im Exon 1 zu finden. In den Exons 2 bis 11 war der offene Leserahmen der NTPDase3 und der 3' untranslatierte Bereich enthalten. Die Transmembrandomänen waren im Exon 2 und 11 kodiert. In den Exons 3 bis 6 lagen die ACR's I-IV. Die fünfte ACR war im Exon11 lokalisiert (Tabelle 21).

<i>Exon Nr.</i>	<i>cDNA nt Start - Ende</i>	<i>genomisch nt Start - Ende</i>	<i>Protein as Start - Ende</i>	<i>Protein-Charakteristica</i>
1	1-201	34495-34696		
2	202-253	35217-35268	1-13	
3	254-381	39040-39167	14-56	TM
4	382-499	51237-51354	57-95	ACR I
5	500-650	52826-52976	96-146	ACR II
6	651-810	55124-55283	147-199	ACR III
7	811-1044	56111-56344	200-277	ACR IV
8	1045-1317	58660-58932	278-368	
9	1318-1428	59112-59222	369-405	
10	1429-1566	60180-60317	406-451	
11	1567-3064	64008-65505	452-529	ACR V, TM, Stop-Codon

Tabelle 21: Exons der NTPDase3.

In der Tabelle sind die 11 Exons der Ratten-NTPDase3 aufgelistet. Die Bereiche innerhalb der cDNA (Genbank Acc-No. AJ437217), eines genomischen Contigs des Chromosoms 8q32 (Genbank Acc-No. NW_047803 Rn8_2327:3551369-3651370) sowie der Aminosäuresequenz sind in der zweiten bis dritten Spalte der Tabelle angegeben.

In der Spalte Protein-Charakteristika sind die Transmembrandomänen und ACR's des Protein den einzelnen Exons zugeordnet.

4.3 Untersuchungen zur Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften der NTPDase3 der Ratte

4.3.1 Ionenabhängigkeit der NTPDase3

Vorversuche mit NTPDase3-transfizierten CHO-Zellen hatten eine ATP- und eine ADP-Hydrolyse gezeigt. Da von verschiedenen Mitgliedern der E-NTPDasen bekannt war, daß ihre katalytische Aktivität von Kalzium oder Magnesium abhängig ist, wurde durch Messung der ATP- und ADP-Hydrolyse unter Einfluß verschiedener Ionenkonzentrationen eine mögliche Abhängigkeit der Ratten-NTPDase3 von den divalenten Kationen Mg^{2+} und Ca^{2+} untersucht.

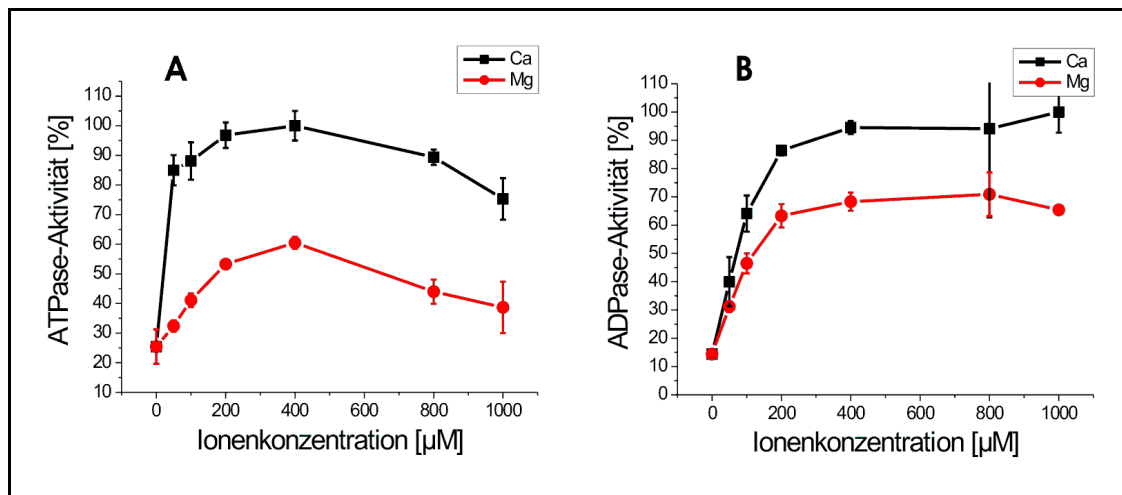


Abbildung 20: Unterschiedlicher Einfluß von Kalzium und Magnesium

ATP-Hydrolyse (A) in Abhängigkeit von den divalenten Kationen Kalzium (Quadrate), und Magnesium (Punkte). ADP-Hydrolyse (B) in Abhängigkeit von Kalzium und Magnesium. Die Abzisse gibt die Ionenkonzentration an, während auf der Ordinate, das entstehende Orthophosphat normiert auf den Maximalwert des jeweiligen Substrates unter Kalziumeinfluß in Prozent angegeben ist. 100 % (\pm SD, $n=3$) entsprechen für die ATP-Hydrolyse 452 ± 23 pmol Pi/($\mu\text{g} \cdot \text{min}$) und für die ADP-Hydrolyse 94 ± 7 pmol Pi/($\mu\text{g} \cdot \text{min}$).

Die Ergebnisse bestätigten eine Abhängigkeit der NTPDase3 von zweiwertigen Ionen. Es konnte gezeigt werden, daß die Hydrolyse beider Substrate sowohl durch Kalzium, als auch durch Magnesium stimuliert wird (Abbildung 20). Unter dem Einfluß von Kalzium war bei ATP und ADP ein starker Anstieg der Aktivität bis zu einer Kalziumkonzentration von 200 μM zu beobachten. Anschließend flachten die Kurven ab (Abbildung 20, Quadrate). In Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen stiegen die Kurven bis 400 μM an, bevor sie eine Plateau-Phase erreichten (Abbildung 20, Punkte). Zumindest im Falle des ATP schien bei den hohen Ionenkonzentrationen (800 μM Kalzium bzw. 1000 μM Magnesium) die Aktivität des Enzyms wieder abzunehmen (Abbildung 20a).

Von den beiden divalenten Kationen wurde Kalzium von der NTPDase3 bevorzugt. So wurden unter Einfluß von Ca^{2+} -Ionen größere Mengen von ATP und ADP umgesetzt als bei der gleichen Konzentration Magnesium. Bei einer Ionenkonzentration von 400 μM , was einem Punkt innerhalb des Plateaus entsprach, wurde ATP unter Kalziumeinfluß $1,7 \pm 0,1$ mal besser umgesetzt als unter Anwesenheit von Magnesium. Für ADP zeigte sich bei einer Ionenkonzentration von 400 μM ein Kalzium:Magnesium-Verhältnis von $1,4 \pm 0,1$.

<i>Substrat</i>	<i>Mock</i>	<i>NTPDase3</i>
ATP	11,8±3,0 pmol Pi/(µg*min)	7,1±2,8 pmol Pi/(µg*min)
ADP	43,3±0,8 pmol Pi/(µg*min)	47,2±6,8 pmol Pi/(µg*min)

Tabelle 22: Phosphatwerte für die EDTA-Proben pro µg Membranfraktionsprotein

In den Kurven (Abbildung 20) ist zu erkennen, daß in den Membranfraktionen trotz Abzug der Mock-Werte eine geringe Anfangsaktivität bei 0 µM Ionenkonzentration gefunden wurde. Die Ursache dieser anfänglichen Aktivität liegt wahrscheinlich in der Verunreinigung der Membranfraktionen durch zweiwertige Ionen. Wurde dem Reaktionsansatz EDTA (1 mM) zum Entfernen der divalenten Kationen zugefügt, bestand kein signifikanter Unterschied¹⁷ zwischen den Membranfraktionen von Mock- und NTPDase3-transfizierten CHO-Zellen (Tabelle 22).

Zusammenfassend kann man sagen, daß für die katalytische Aktivität der NTPDase3 die Anwesenheit von divalenten Kationen eine Voraussetzung ist. Das Enzym ist primär von Kalzium abhängig. Bei einem halben bis äquimolaren Verhältnis von Kalzium zu Substrat arbeitete das Enzym optimal. Mit Magnesium hydrolysierte das Enzym Nukleotide bei einem äquimolaren Verhältnis von Substrat zu Ion am besten.

4.3.2 Bestimmung des pH-Optimums

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der NTPDase3 vom pH-Wert wurde die ATP-Hydrolyse in einem Bereich von pH 2 bis pH 11 untersucht. Unter dem Einfluß von Kalzium-Ionen wurde ein breites pH-Optimum von pH 7,5 bis pH 8,0 gefunden (Abbildung 21). Bei der Verwendung von Magnesium als Ion entsprach der pH-Bereich von pH 7,5 bis pH 8,5 dem Optimum (Abbildung 21). Die pH-Optima für die NTPDase3 lagen damit in einem physiologischen Bereich.

¹⁷ Student t-Test mit 5 % Fehlerwahrscheinlichkeit

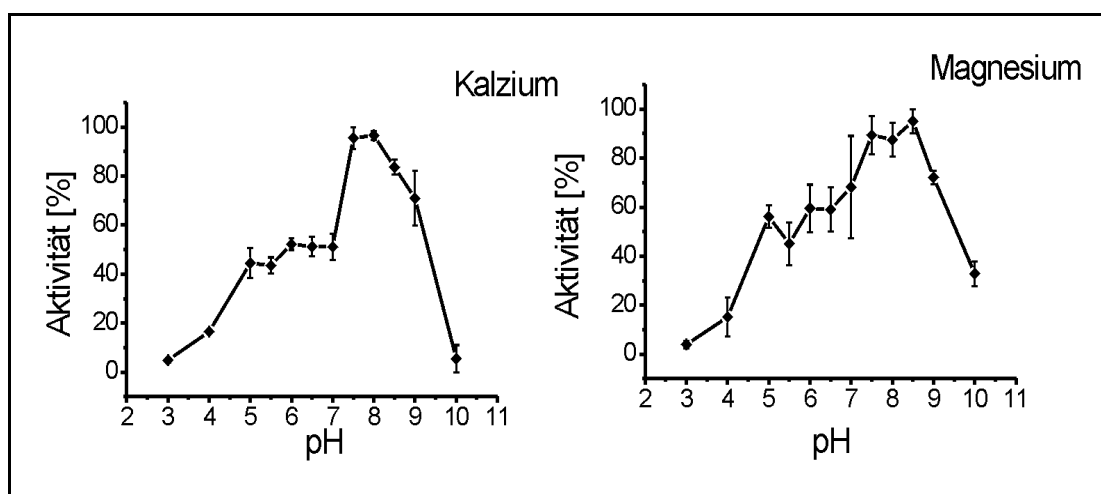


Abbildung 21: pH-Optimum unter Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Einfluß.

ATP-Hydrolyse in Abhängigkeit vom pH-Wert unter Einfluß von Kalzium- und Magnesium-Ionen. Die Ordinate stellt die Orthophosphatfreisetzung (Aktivität) in Prozent dar. Die Werte sind in Prozent des Maximalwerts (=100 %) angegeben. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von drei Membranfraktionen mit der Standardabweichung der Mittelwerte (SEM) als Fehlerbalken.

100 % ATPase-Aktivität entsprechen für die Kalziumkurve in $pmol/(\mu g \cdot min)$: MF1=164,6; MF2=1.317,7; MF3=439,8. 100 % ATPase-Aktivität entsprechen für die Magnesiumkurve in $pmol/(\mu g \cdot min)$: MF1=112,9; MF2=755,0; MF3=242,5

4.3.3 Analyse der ATP-Hydrolyse-Produkte

Um das katalytische Verhalten der NTPDase3 näher zu untersuchen, wurden der Abbau von ATP über die Zeit, sowie die entstehenden Hydrolyseprodukte gemessen. Das ATP und die Abbau-Produkte wurden per Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC¹⁸) analysiert. Für die Reaktion wurden jeweils 3 Membranfraktionen von NTPDase3- und Mock-transfizierten CHO-Zellen eingesetzt, die zuvor auf ihre ATPase-Aktivität getestet wurden. Pro Ansatz wurde Membranfraktion mit einer Aktivität von 7,9 nmol Pi/min eingesetzt. Als Kontrolle wurden gleiche Mengen Protein aus Mock-transfizierten Zellen verwendet.

Das ATP wurde im Laufe der Zeit abgebaut. Korrelierend mit der Abnahme des Adenosintriphosphats entstanden die Hydrolyseprodukte ADP und AMP. Eine Zunahme bzw. Bildung von Adenosin konnte nicht detektiert werden. Dies lässt darauf schließen, daß die NTPDase3 ATP über das Zwischenprodukt ADP zu AMP hydrolysiert. Das dabei entstehende Adenosinmonophosphat wurde von dem Enzym nicht weiter abgebaut (Abbildung 22).

¹⁸ engl. High Performance Liquid Chromatography, kurz HPLC

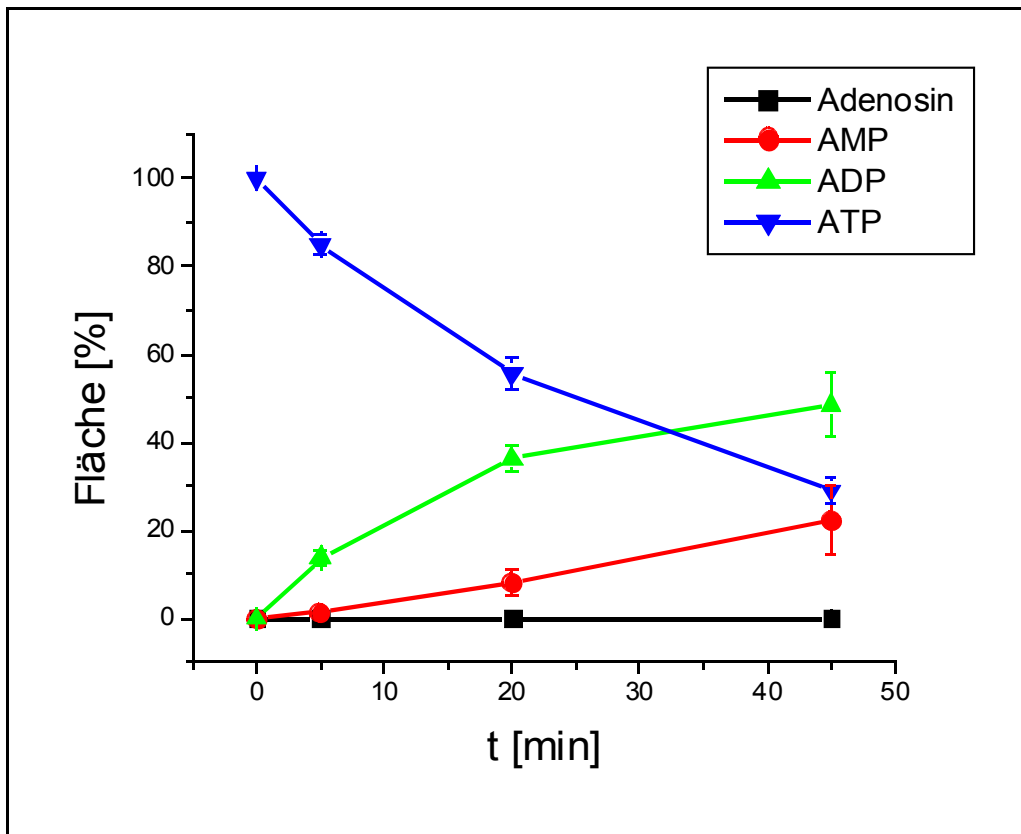


Abbildung 22: Produktanalyse.

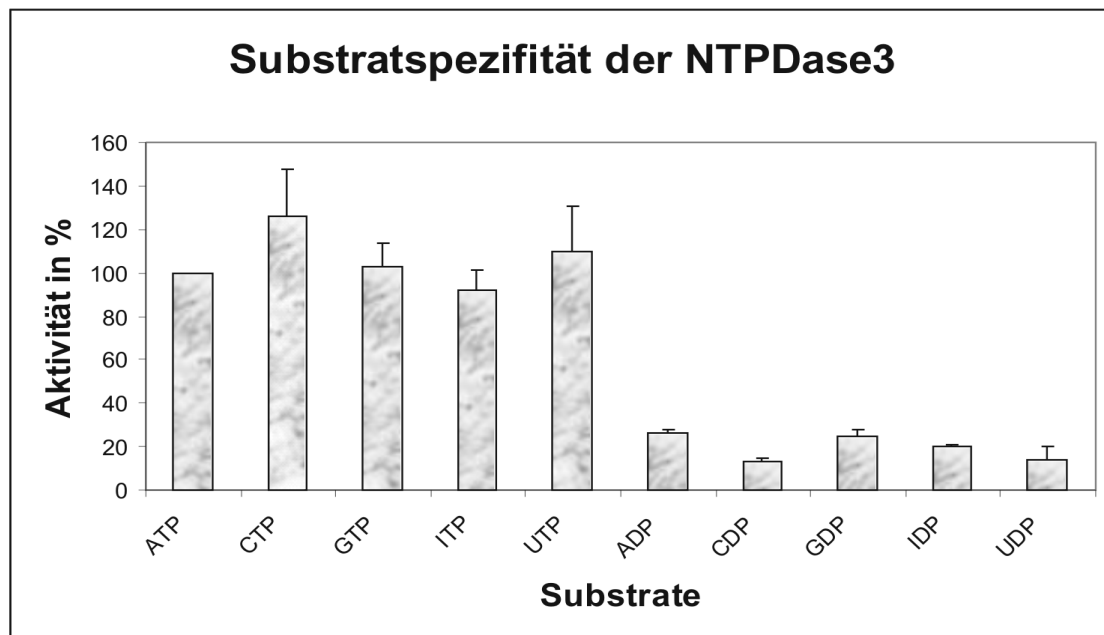
Der Graph zeigt den Abbau von ATP (auf der Spitze stehendes Dreieck), sowie die entstehenden Produkte ADP (Dreieck) und AMP (Kreisfläche). Adenosin (Quadrate) entsteht nicht.

Die Graphen zeigen den zeitlichen Verlauf des Substratumsatzes. Substrat- bzw. Produktmenge wird durch den Flächenanteil dargestellt. 100 % der Fläche entsprechen 50 nmol ATP. Aufgetragen sind die Mittelwerte von drei Membranfraktionen mit ihren Standardabweichungen (Fehlerbalken).

4.3.4 Untersuchung der Substratspezifität

In den vorhergehenden Versuchen wurden die ATP- und ADP-Hydrolyse in verschiedenen Zusammenhängen analysiert. Um zu untersuchen, welche weiteren Substrate von der NTPDase3 umgesetzt werden können, wurde die katalytische Aktivität des Enzyms mit verschiedenen Nucleosiddi- und -triphosphaten gemessen. Alle getesteten Nucleotide wurden von der heterolog exprimierten NTPDase3 hydrolysiert. Die Nucleosidtriphosphate wurden signifikant¹⁹ besser umgesetzt als jedes der Nucleosiddiphosphate (Abbildung 23).

¹⁹ Student t-test 5% Fehlerwahrscheinlichkeit



<i>Substrat</i>	<i>Hydrolyserate [%]</i>	<i>Substrat</i>	<i>Hydrolyserate [%]</i>
ATP	100	ADP	20,1±1,3
CTP	126,2±21,9	CDP	13,3±2,4
GTP	103,2±11,1	GDP	25,0±3,2
ITP	92,1±8,8	IDP	20,2±0,9
UTP	109,5±20,6	UDP	14,3±6,0

Abbildung 23: Vergleich der Hydrolyseraten verschiedener Substrate.

In der Abbildung werden die Hydrolyseraten (\pm SD, $n=3$) der NTPDase3 für verschiedene Tri- und Diphosphate verglichen. Alle Angaben sind auf die Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse normiert.

100 % entsprechen in $\text{pmol}/(\mu\text{g}\cdot\text{min})$: MF1=62; MF2=243; MF3=92 $\text{pmol}/(\mu\text{g}\cdot\text{min})$. Für ITP/IDP MF1=149; MF2=94; MF3=80.

Aus den Werten resultierte folgende Reihenfolge der Substrat-Präferenz: $\text{CTP} \geq \text{UTP} \geq \text{GTP} \geq \text{ATP} \geq \text{ITP} \gg \text{GDP} > \text{ADP} \geq \text{IDP} > \text{UDP} \geq \text{CDP}$ (Abbildung 23: Tabelle). Die Verhältnisse zwischen NTPase und NDPase-Aktivität variierten von 4,2 bis 9,7fach (Abbildung 24).

<i>Substrat</i>	<i>ATP:ADP</i>	<i>CTP:CDP</i>	<i>GTP:GDP</i>	<i>ITP:IDP</i>	<i>UTP:UDP</i>
<i>Verhältnis</i>	5,0±0,3	9,7±2,3	4,2±1,0	4,5±0,3	8,7±4,2

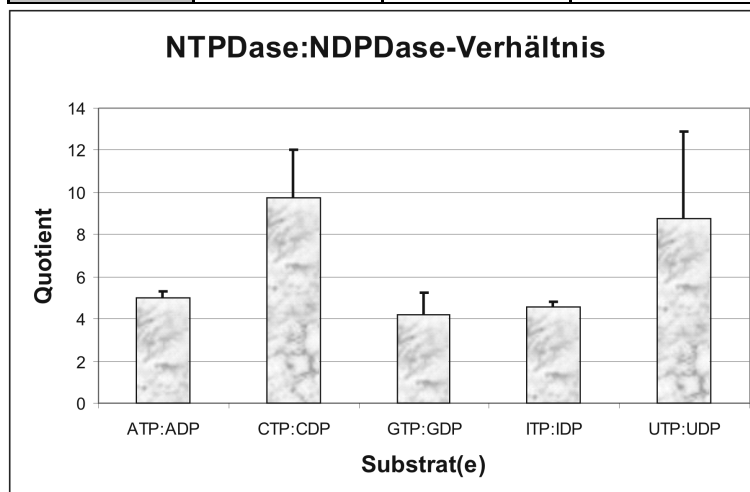


Abbildung 24: NTPase:NDPase-Verhältnis

In der Tabelle sind die Verhältnisse der Umsatzgeschwindigkeiten der Triphosphate und Diphosphate aufgeführt. Bei den Werten handelt es sich um die Mittelwerte von 3 unabhängigen Membranfraktionen mit Standardabweichungen.

Eine graphische Darstellung der Werte ist im Balkendiagramm unten zu sehen.

4.4 Proteinbiochemische Untersuchungen an heterolog und endogen exprimierter NTPDase3

4.4.1 Test der NTPDase3-Antikörper im Westernblot an heterolog exprimierter NTPDase3

Auf der Grundlage der cDNA-Sequenz wurden in Kooperation mit Dr. Jean Sévigny durch genetische Immunisierung Antiseren gegen die cDNA der Ratten-NTPDase3 hergestellt.

Um zu prüfen, ob die gebildeten Antiseren in der Lage waren, die NTPDase3 der Ratte zu erkennen, wurden Membranfraktionen aus CHO-Zellen verwendet, welche mit leerem Vektor (mock) oder NTPDase3-cDNA transfiziert waren. Als zusätzliche Kontrolle wurden die vor der ersten Immunisierung entnommen Präimmunsereen (N3-1pi, N3-2pi, N3-3pi) getestet.

Es zeigt sich, dass alle drei Antiseren (N3-1i4, N3-2i4, N3-3i4) in der Lage waren die heterolog in CHO-Zellen exprimierte NTPDase3 zu erkennen. Das Protein lief als das 80 kDa-Band im Westernblot. In den mock-transfizierten CHO-Zellen und bei den Präimmunsereen war kein Band bei 80 kDa zu erkennen (Abbildung 25).

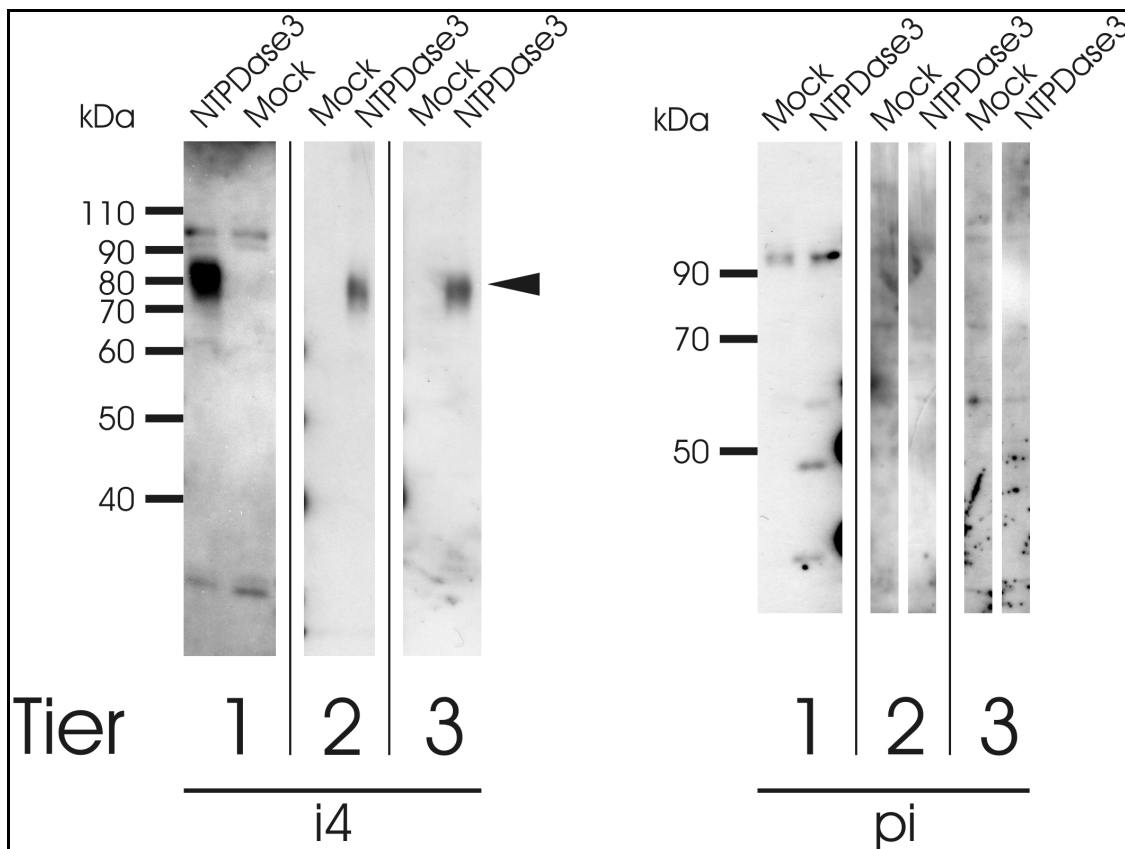


Abbildung 25: Test der durch genetische Immunisierung gewonnenen Antikörper.

Die von Dr. Jean Sévigny hergestellten Antiseren gegen Ratten-NTPDase3 wurden an Membranfraktionen von transfizierten CHO-Zellen getestet. Die Antiseren (i4) aus den drei Kaninchen (Tier 1-3) erkannten alle das heterolog exprimierte NTPDase3-Protein (Pfeilspitze). Das 80 kDa-Band der NTPDase3 wurde weder in Mock-transfizierten Zellen, noch mit einem der Präimmunseren (pi) detektiert.

Die Antiseren der Tiere 2 und 3 lieferten schwächere Signale als das Antiserum aus Tier 1. In den Spuren für Tier 2 und 3 wurden für das Antiserum und das Präimmunserum jeweils 10 µg Membranfraktion aufgetragen. Für die Spuren des Antiserums des Tieres 1 wurden 2,5 µg Membranfraktion eingesetzt. Das Präimmunserum für Tier 1 wurde an 5 µg Membranfraktion getestet. Alle Antiseren wurden in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt.

Von den drei Antiseren erzeugte das Antiserum N3-1i4 im Westernblot das stärkste Signal. Neben dem eigentlichen NTPDase3-Band wurde bei 100 kDa ein weiteres Proteinband erkannt. Hierbei handelte es sich um eine unspezifische Markierung, da das Band bereits im Präimmunserum zu finden war.

Auch unter Verwendung der Seren N3-2i4 und N3-3i4 wurden unspezifische Bänder detektiert. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde daher das N3-1i4-Antiserum gewählt, da es die NTPDase3 am effektivsten erkannte.

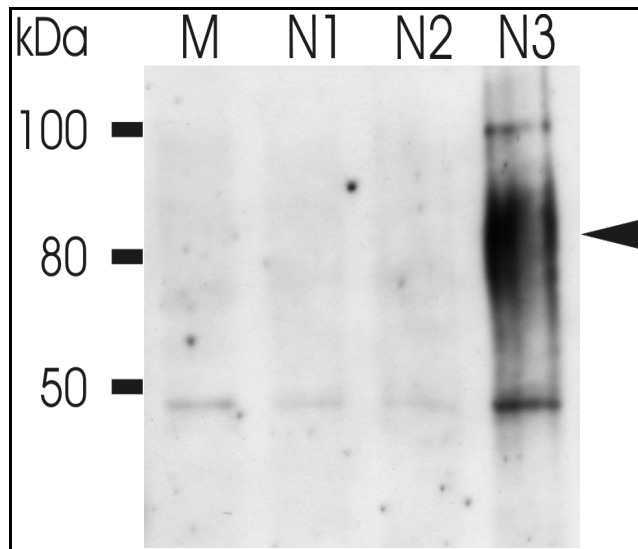


Abbildung 26: Antikörpertest auf Kreuzreaktivität.

Membranfraktionen aus transfizierten CHO-Zellen wurden im Westernblot mit dem Antiserum N3-1i4 auf Kreuzreaktivität mit dem nächst verwandten E-NTPDasen überprüft.

Die NTPDase3-Bande (Pfeil) wird nicht bei Membranfraktionen erkannt die mit leerem Vektor (M), NTPDase1 (N1) oder NTPDase2 (N2) transfiziert sind.

Zwei unspezifische Banden bei 100 kDa und unter 50 kDa sind ebenfalls zu erkennen.

Auftragsmenge: 10 µg Membranfraktion;
Antikörperverdünnung: N3-1i4 1:2000.

Um zu prüfen, ob das Antiserum (N3-1i4) vielleicht mit anderen Mitgliedern der NTPDase-Familie kreuzreagiert, wurden je 10 µg Membranfraktionen von NTPDase1-, NTPDase2-, NTPDase3- und Mock-transfizierten CHO-Zellen im Westernblot untersucht. Nur bei Membranfraktionen der NTPDase3 war ein 80 kDa-Band zu detektieren (Abbildung 26). Ein NTPDase1-Band (70-80 kDa, Wang et al., 1998b) oder ein NTPDase2-Band (70 kDa, Braun et al., 2003) war ebenfalls nicht markiert. Dies zeigte, daß das Antiserum an Membranfraktion transfizierter CHO-Zellen nur mit der NTPDase3 reagiert aber nicht mit anderen E-NTPDasen.

4.4.2 Nachweis der endogenen NTPDase3-Expression in PC12-Zellen durch Westernblot

PC12-Zellen sind eine etablierte Zelllinie, die unter Einfluß von Nervenwachstumsfaktor (NGF) neuritenähnliche Fortsätze ausbilden (Greene et al., 1976). Für die Expression von verschiedenen ENTPDasen in PC12-Zellen gab es bereits in vorhergehenden Arbeiten positive RT-PCR-Befunde (Vollmayer et al., 2001).

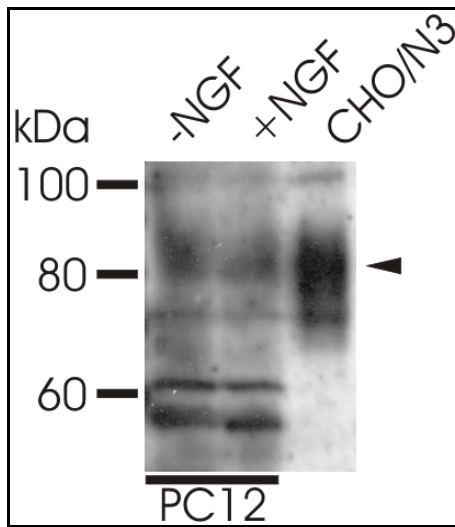


Abbildung 27: NTPDase3-Expression in PC-12 Zellen.

Mit dem Antikörper N3-1i4 nachgewiesene NTPDase3 in der Membranfraktion von PC12-Zellen (je 12 μ g) ohne NGF-Stimulation (-NGF) und nach NGF-Stimulation (+NGF: 5 Tage 50 ng/ml NGF).

Zum Vergleich ist Membranfraktion aus transfizierten CHO-Zellen (CHO/N3; 10 μ g) aufgetragen. Die NTPDase3-Bande ist durch eine Pfeilspitze markiert.

Um zu prüfen, ob der Antikörper endogen exprimiertes NTPDase3-Protein erkennt, wurden Membranfraktionen von PC12 Zellen untersucht. Die Auswirkung von NGF, d.h. der neuronähnlichen Differenzierung der PC12-Zellen auf die NTPDase3-Expression, wurde getestet, indem ein Teil der Zellen für 5 Tage mit 50 ng/ml NGF stimuliert wurde. In den Membranfraktionen der unstimulierten PC12-Zellen ließ sich, ebenso wie in den Membranfraktionen aus NGF stimulierten PC12-Zellen, endogene NTPDase3-Expression mittels Westernblot nachweisen (Abbildung 27). Ein Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen war nicht erkennbar.

4.4.3 Anwendung der NTPDase3-Antikörper an Membranfraktionen aus Geweben

4.4.3.1 Versuch die Spezifität des Antikörpers durch Affinitätsreinigung zu erhöhen

Westernblots mit aus Geweben isolierten Membranfraktionen, zeigten keine verwertbaren Ergebnissen. Die große Zahl unspezifischer Banden, die bei der Anwendung von Antiserum N3-1i4 und dem dazugehörigen Präimmenserum N3-1pi an Membranfraktionen aus Geweben zu finden waren, machten eine eindeutige Identifikation der NTPDase3-Bande unmöglich (Abbildung 28). Aus diesem Grund wurde eine Affinitätsreinigung des Antiserums versucht, um unspezifische Antikörper aus dem Antiserum zu entfernen. Für die Affinitätsreinigung wurde Membranfraktion aus heterolog mit NTPDase3-transfizierten CHO-Zellen elektrophoretisch aufgetrennt,

geblottet und der Membranbereich des NTPDase3-Bandes um 80 kDa wurde isoliert. An diese Membranstreifen sollten die NTPDase3-spezifischen Antikörper gebunden und nach Waschschrritten wieder eluiert werden. Die Anzahl der unspezifischen Banden konnte durch diese Prozedur zwar verringert werden, jedoch war trotz 10facher Konzentrierung des gereinigten Antikörpers nur noch ein schwaches Signal in den Membranfraktion NTPDase3-transfizierter Zellen zu erkennen (Abbildung 28). In den Membranfraktionen aus Gewebe konnte mit dem affinitätsgereinigten Antikörper überhaupt kein NTPDase3-Band mehr gefunden werden. Das ließ auf eine deutliche Verringerung des Antikörper-Titers während der Reinigungsprozedur schließen. Eventuell weist der Antikörper selbst auch eine geringe Spezifität auf.

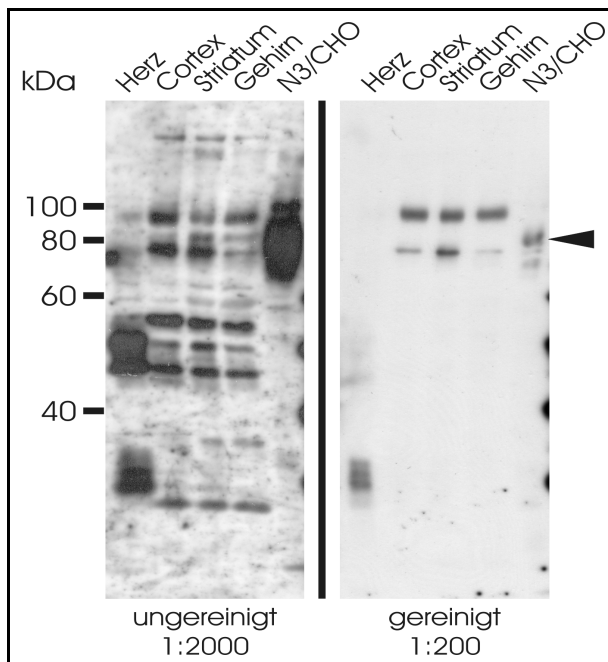


Abbildung 28: Ungereinigter und affinitätsgereinigter Antikörper im Vergleich.

Pro Spur wurden je 10 µg Membranfraktion von NTPDase3-transfizierten CHO-Zellen (N3/CHO), Gesamthirn, Striatum, Cortex und Herz aufgetragen. Links: Western-Blot mit dem ungereinigten Antikörper N3-1i4 (1:2000); Rechts: Western-Blot mit dem affinitätsgereinigten und 10fach konzentrierten Antikörper N3-1i4 (1:200).

In den Membranfraktionen der transfizierten CHO-Zellen ist ein NTPDase3-Band (Pfeilspitze) zu erkennen. Bei dem ungereinigten Antiserum sind in den Membranfraktionen verschiedener Gewebe zu viele unspezifische Banden vorhanden, um eine NTPDase3-Bande zu identifizieren. Im rechten Blot mit dem gereinigten Antikörper ist die Anzahl unspezifischer Banden deutlich reduziert. Im Bereich des NTPDase3-Bandes ist jedoch nur noch ein schwaches Signal bei der heterolog exprimierten NTPDase3 zu

erkennen. In den aus Geweben isolierten Membranfraktionen ist kein NTPDase3-Band zu erkennen. Daraus lässt sich auf einen stark verringerten Antikörper-Titer nach der Affinitätsreinigung schließen.

4.4.3.2 Partielle Reinigung und Anreicherung der NTPDase3 aus Gewebs-Membranfraktion über ConcavalinA-Sepharose

Ein alternativer Ansatz sah vor, das NTPDase3-Protein partiell zu reinigen und konzentrieren. Da es sich bei den E-NTPDasen um glykosilierte Ektoenzyme handelt, wurde ConcavalinA-Sepharose, eine zuckerbindende Matrix, zur Reinigung gewählt. Um dieses Verfahren zu testen, wurden Membranfraktion mit heterolog exprimierter

NTPDase3 solubilisiert und im Batch-Verfahren über ConA-Sepharose gereinigt. Nach Bindung an das Lektin und wiederholten Waschschritten wurde das Enzym mit einer aufsteigender Konzentrationsreihe an Methyl- α (D)-Mannosid eluiert. Die einzelnen Fraktionen dieses Stufengradienten wurden zur Konzentrierung gefällt und im Westernblot analysiert.

Die erfolgreiche Bindung der NTPDase3 an die ConA-Sepharose unterstützte das Ergebnis der *in silico*-Analyse, daß es sich bei der NTPDase3 um ein glykosiliertes Enzym handelt. Die Proteinlösung zeigte nach Inkubation mit dem Lektin kein Signal mehr im Westernblot, was vermuten lässt, daß die NTPDase3 quantitativ an die Zuckermatrix gebunden werden konnte. Das schwache Signal im Waschpuffer spricht für eine stabile Bindung an das ConcavalinA während der Waschschrritte. Die Ergebnisse des Stufengradienten lassen darauf schließen, daß bei einer Mannosid-Konzentration von 150 mM die maximale Elutionsmenge erreicht wird (Abbildung 29). Um eine möglichst vollständige Elution zu erreichen wurde bei der Reinigung aller weiteren Membranfraktionen ein 200 mM Mannosid enthaltender Elutionspuffer verwendet.

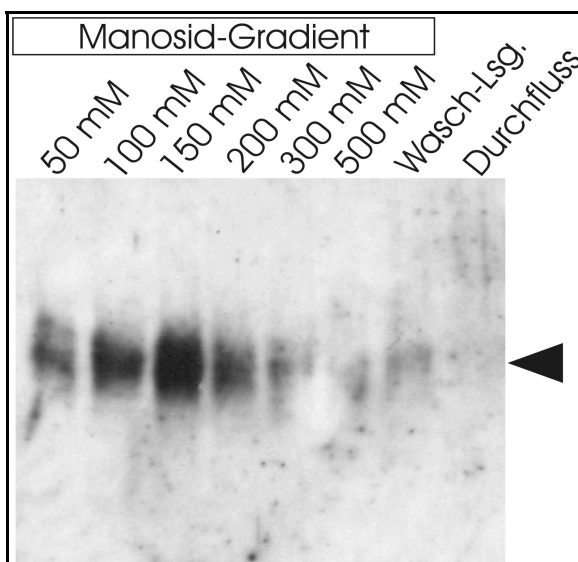


Abbildung 29: Elutionsprofil der NTPDase3 von ConA-Sepharose.

Western-Blot von Aliquots der Elutionspuffer (50-500 mM Mannosid), des ersten Waschpuffer und der solubiliserten Membranfraktion die auf die ConA-Sepharose gegeben wurde (Durchfluß).

Die Pfeilspitze markiert die NTPDase3-Bande.

4.4.3.3 Westernblot mit ConA-gereinigten Membranfraktionen verschiedener Gewebe

Für die Westernblots wurde Gewebe aus verschiedenen Organen präpariert. Da die Antiseren nicht in der Lage waren, die NTPDase3 aus einem Gesamthomogenat oder einer Membranfraktion heraus zu markieren, wurde die in den Geweben enthaltene NTPDase3 in vorhergehenden Arbeitsschritten angereichert. Dazu wurden aus den Geweben Membranfraktionen hergestellt, die darin enthaltene NTPDase3 über ConA-Sephrose partiell gereinigt und abschließend durch eine Trichloressigsäure-Fällung konzentriert. Um vergleichbare Mengen aufzutragen, wurde auf das Ausgangsgewebe zurückgerechnet und Proteinmengen aufgetragen, die der gleichen Menge Ausgangsgewebe entsprachen.

Aufgrund dieser Vorbehandlung war es nun möglich, mit den Antikörper die NTPDase3 in Membranfraktionen aus Geweben nachzuweisen. Bedauerlicherweise stellte sich heraus, daß wegen präparationsbedingter Schwankungen die Banden-Stärke stark variierte. Aus diesem Grund war ein quantitativer Vergleich zwischen den Geweben nicht möglich. Es konnte jedoch eine qualitative Aussage hinsichtlich der Expression der NTPDase3 in einem Gewebe getroffen werden.

Es wurden 2 Westernblots mit ConA-gereinigten Membranfraktionen von Lunge, Herz, Leber, Niere, Dünndarm, Dickdarm, Milz, Ovarien, Prostata, Nebennieren, Nebenhoden, Hoden, Uterus, Thymus und Gehirn angefertigt. In beiden Blots zeigte sich ein deutliches Band beim Hirngewebe, welches stärker war, als jede Bande in nicht-neuronalem Gewebe. Weitere Signale fanden sich im Dünndarm, Pancreas, Prostata, Samenleiter und sehr schwach im Nebenhoden (Abbildung 30a-f).

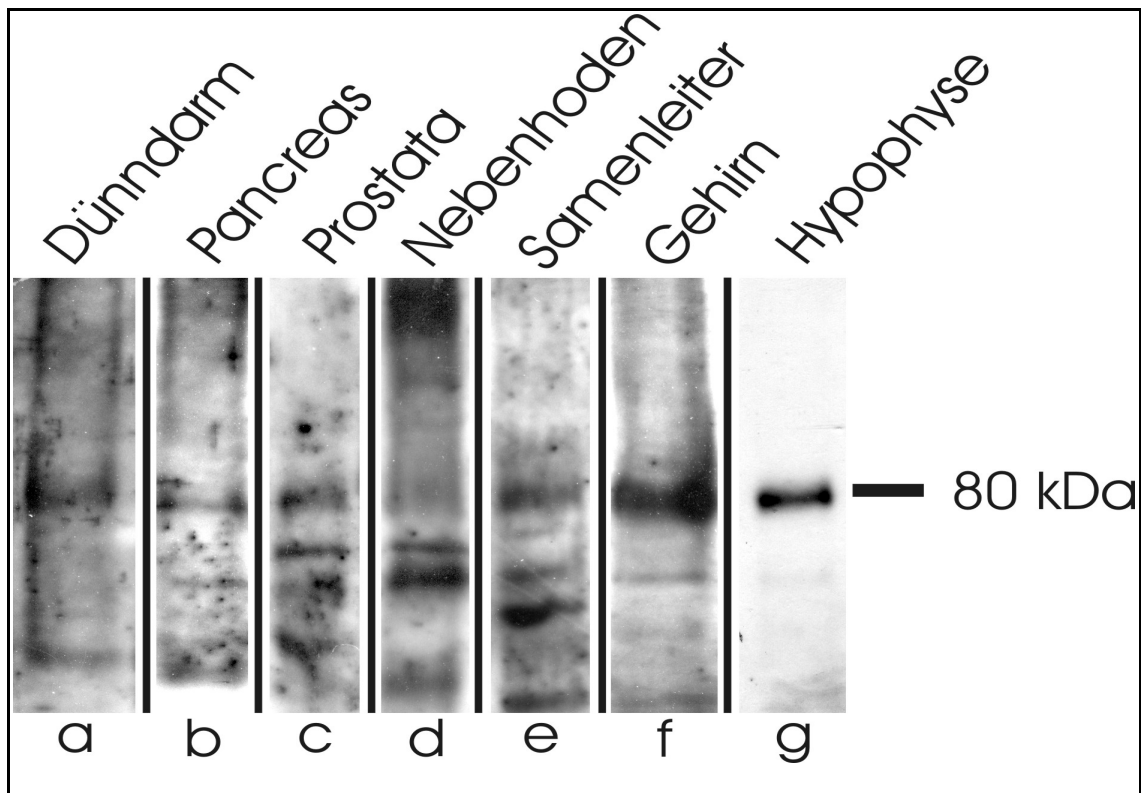


Abbildung 30 :Westernblot von verschiedenen Organen.

Western-Blots mit ConA gereinigter Membranfraktionen von verschiedenen Geweben. Die aufgetragene Menge an Membranfraktion entspricht für die Spuren a,b,f einer Gewebemenge von je 20 mg und bei den Spuren c,d,e je 50 mg. Im Falle der Hypophyse (g) ist ConA-gereinigtes Gesamthomogenat von einer Ausgangsgewebemenge von 3,3 mg aufgetragen.

Um die Lokalisation des Enzyms im Gehirn näher zu untersuchen wurden einzelne Gehirnregionen präpariert, ConA-gereinigt, gefällt und im Westernblot analysiert.

Zu den untersuchten Geweben des zentralen Nervensystems zählten Bulbus olfactorius, Cerebellum, Cortex, Mesencephalon, Diencephalon, Hippocampus, Striatum, Pons, Medulla oblongata und Medulla spinalis. Insgesamt wurden die verschiedenen Hirngewebe in 4 Westernblots verwendet. In allen untersuchten Geweben des zentralen Nervensystems waren NTPDase3-Bänder bei mindestens einem der Westernblots in einer Höhe von 80 kDa zu erkennen (Abbildung 31). Im Cerebellum war das NTPDase3-Band in den 4 Blots stets von geringer Intensität oder nicht nachweisbar.

Die Ergebnisse sprechen dafür, daß die NTPDase3 im gesamten ZNS exprimiert wird. Die für die Westernblots eingesetzte Menge an Gewebe, von 20 mg bzw. 25 mg, läßt die Hypothese zu, daß die NTPDase3 nur in geringer Menge endogen exprimiert wird. Eine generell geringe Expression ist dabei ebenso möglich, wie die Expression auf

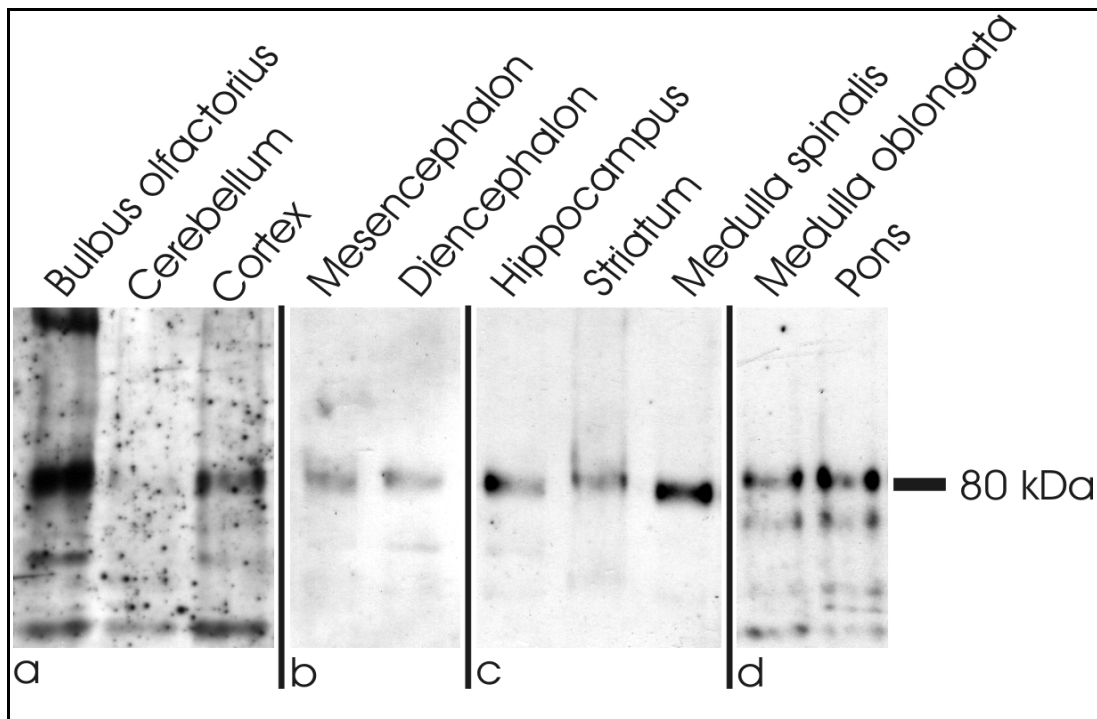


Abbildung 31: Westernblots verschiedener Gewebe des zentralen Nervensystems.

In jeder der Spuren sind ConA-gereinigte Membranfraktionen aufgetragen, die in Ihrer Menge 20 mg (a, d) bzw. 25 mg (b,c) Ausgangsgewebe entsprechen. Die NTPDase3 läuft in einer Höhe von 80 kDa.

spezifischen Zellpopulationen.

Weiterhin konnte in ConA-gereinigtem Gesamthomogenat der Hypophyse ein, gemessen an der Menge Ausgangsgewebe, starkes NTPDase3-Band gefunden werden (Abbildung 30g).

4.4.4 Test der Peptid-Antikörper

Da die vorhandenen Antikörper nicht die in sie gesetzten Erwartungen erfüllten, wurden durch die Firma Eurogentec (Southampton, UK) 2 Antiseren (264fb, 265fb) gegen eine Peptidsequenz der NTPDase3 hergestellt. Beide Antiseren waren in der Lage das 80 kDa-Band der NTPDase3 in Membranfraktionen NTPDase3-transfizierter Zellen zu markieren (Abbildung 32). Der Antikörper 265fb erzeugte dabei das stärkere Signal. In ungereinigter Membranfraktion waren bei beiden Antiseren eine ganze Reihe unspezifischer Banden zu erkennen. Die Membranfraktionen aus transfizierten Zellen zeigen sowohl unter reduzierenden Bedingungen (100 mM DTT) als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen ein deutliches Signal bei 80 kDa. In ConA-gereinigten

Membranfraktionen konnte ein 75 kDa-Band nachgewiesen werden, welches vermutlich die NTPDase3 darstellt (Abbildung 32). Der Größenunterschied zwischen der heterolog exprimierten NTPDase3 und der ConA-gereinigten Membranfraktion erklärt sich möglicherweise durch eine variierende Glykosilierung und einer unterschiedlichen Präferenz der Antikörper für verschieden glykosilierte Proteine.

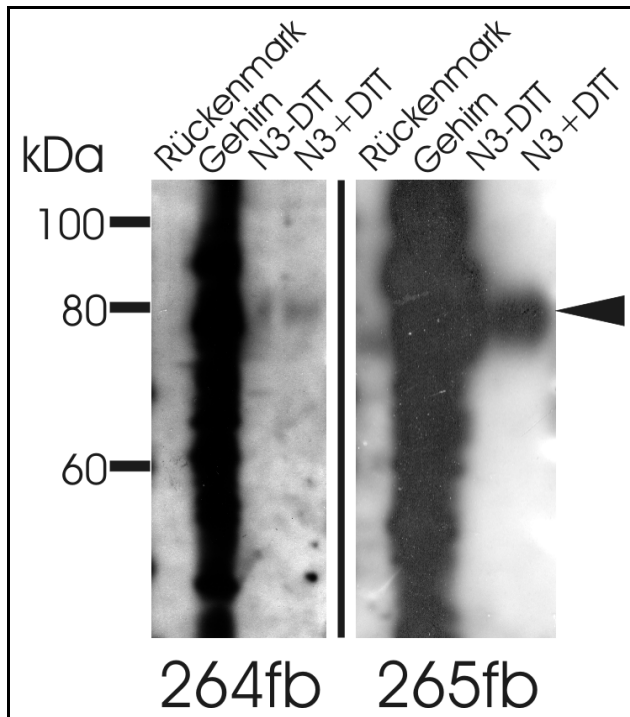


Abbildung 32: Test der Peptid-Antikörper 264fb und 265fb.

Rückenmark: ConA-gereinigte Membranfraktion (5 mg Ausgangsgewebe), Gehirn: ungereinigte Gesamthirn-Membranfraktion (10 µg), N3: Membranfraktionen von NTPDase3-transfizierten COS7-Zellen unter nicht-reduzierenden (N3-DTT, 5 µg) und reduzierenden (N3+DTT, 5 µg) Bedingungen.

Die heterolog exprimierte NTPDase3 wurde unter reduzierenden wie nicht-reduzierenden Bedingungen von den Antikörpern erkannt (Pfeil). In der ConA-gereinigten Membranfraktion ist eine Bande bei 75 kDa zu erkennen. In der ungereinigten Membranfraktion zeigen sich viele unspezifische Banden.

Die Peptid-Antikörper erkannten die heterolog exprimierte NTPDase3, waren jedoch nicht geeignet bei ungereinigter Membranfraktion eingesetzt zu werden. Daher boten sie bei ihrem Einsatz im Westernblot keine Vorteile gegenüber den durch genetische Immunisierung hergestellten Antiseren von Dr. Jean Sévigny.

4.5 Immunzytologische Analyse der NTPDase3 der Ratte

4.5.1 Immunzytologie an transfizierten CHO-Zellen

Zum Eignungstest der Sévigny-Antiseren für immunzytologische Untersuchungen wurden CHO-Zellen mit NTPDase1, 2 und 3 sowie leerem Vektor (Mock) transfiziert und nativ mit den drei Antiseren behandelt.

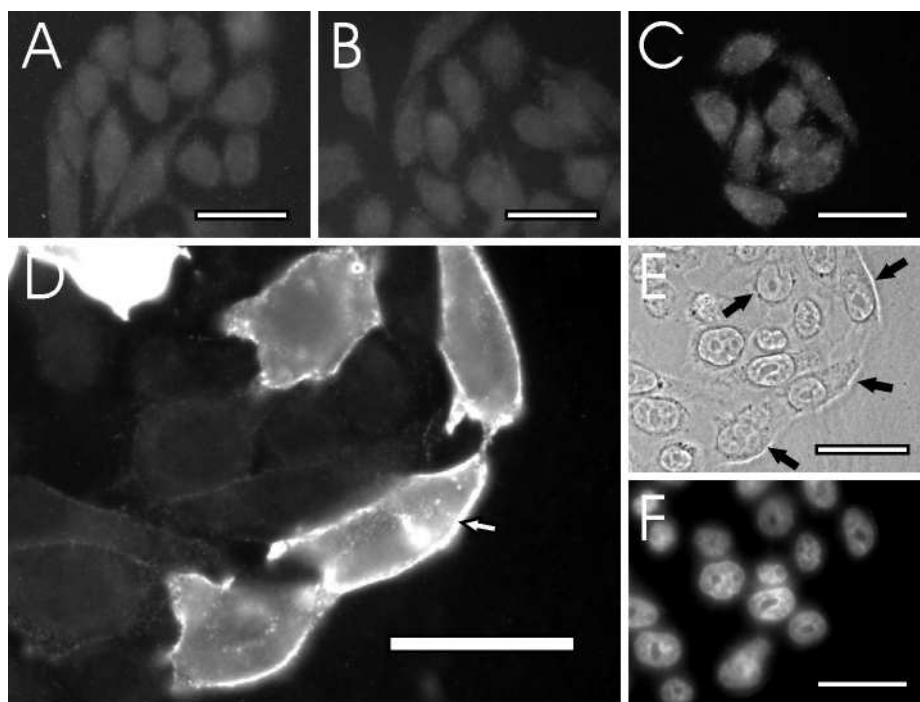


Abbildung 33:
Immunzytologie
mit N3-1i4.

CHO-Zellen wurden mit Mock (A), NTPDase1 (B), NTPDase2 (c) und NTPDase3 (D) transfiziert.

Bei den mit Mock, NTPDase1 oder NTPDase2 transfizierten Zellen (A-C) ist keine Markierung zu erkennen. Die NTPDase3-transfizierten CHO-Zellen (D) zeigen eine deutliche Markierung der Plasmamembran

(weißer Pfeil). Nicht-transfizierte Zellen in der Umgebung wurden ebenfalls nicht markiert, wie die Phasenkontrastaufnahme (E) und die Kernfärbung (DAPI, F) belegen. Die in (D) angefärbten Zellen sind in der Phasenkontrastaufnahme mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Der Maßstab beträgt 25 µm.

N3-1i4 ergab eine deutliche Markierung der Plasmamembran in den transfizierten CHO-Zellen erkennen (Abbildung 33d). Nicht transfizierte Zellen zeigten keine Markierung (Abbildung 33e,f). Die mit den (am nächsten verwandten) NTPDasen1 und 2 transfizierten Zellen sowie die mit Mock transfizierten Zellen waren ebenfalls nicht markiert (Abbildung 33a-c). Eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit den beiden Enzymen konnte also auch in der Immunzytologie ausgeschlossen werden.

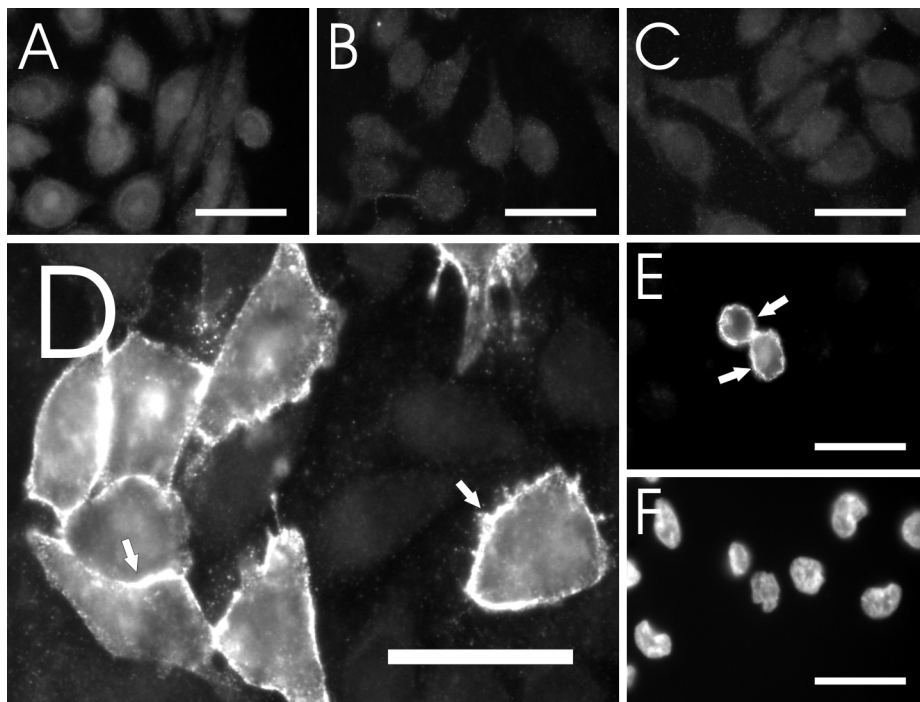


Abbildung 34: Immunzytologie mit N3-2i4.

CHO-Zellen wurden mit Mock (A), NTPDase1 (B), NTPDase2 (C) und NTPDase3 (D,E) transfiziert.

Bei den mit Mock, NTPDase1 oder NTPDase2 transfizierten Zellen (A-C) ist keine Markierung durch N3-2i4 zu erkennen. Die NTPDase3-transfizierten CHO-Zellen (D) zeigen eine deutliche

Markierung der Plasmamembran (weiße Pfeile) mit N3-2i4.

Eine plasmamembranständige Markierung durch N3-2i4 (1:1000) ist bei NTPDase3-transfizierten CHO-Zellen auch nach PFA-Fixierung zu erkennen (E, weiße Pfeile). (F) DAPI-Kernfärbung im Bereich von (E). Der Maßstab beträgt 25 μ m.

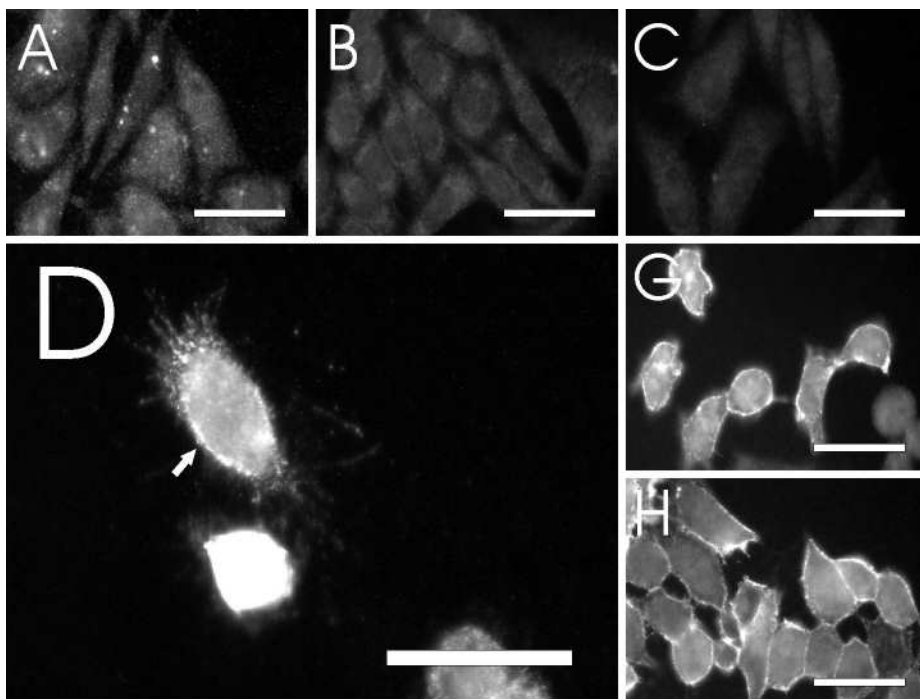


Abbildung 35: Immunzytologie mit N3-3i4.

CHO-Zellen wurden mit Mock (A), NTPDase1 (B,G), NTPDase2 (C,H) und NTPDase3 (D) transfiziert.

Bei den mit Mock, NTPDase1 oder NTPDase2 transfizierten Zellen (A-C) ist keine Markierung mit N3-3i4 zu erkennen. NTPDase3-transfizierte CHO-Zellen (D) zeigen eine deutliche

Markierung der Plasmamembran (weißer Pfeil). Mit NTPDase1- bzw. NTPDase2- transfizierte Zellen ließen sich auch mit Antikörpern gegen NTPDase1 (G) oder NTPDase2 (H) anfärben. Der Maßstab beträgt 25 μ m.

Die in den *in silico* – Analysen vorhergesagte membranständige Lokalisation wurde durch die Immunzytologie für die NTPDase3 bestätigt (Abbildung 33-35d). Mit Paraformaldehyd fixierte CHO-Zellen zeigten ebenfalls eine Markierung des Plasmamembran bei NTPDase3-transfizierten Zellen. Eine intrazelluläre Lokalisation wurde dort nicht beobachtet (Abbildung 34e).

Für die Antiseren N3-2i4 und N3-3i4 (Abbildung 34a-d, 35a-d) sah das Ergebnis entsprechend aus. Nur die Plasmamembran NTPDase3-transfizierter Zellen war markiert (Abbildung 34d, 35d). Eine Färbung untransfizierter Zellen oder eine Markierung von NTPDase1- oder NTPDase2-transfizierter Zellen wurde nicht beobachtet.

Als Transfektionskontrolle wurden die mit NTPDase1 transfizierten Zellen mit einem NTPDase1-spezifischen Antikörper (Abbildung 35g) markiert. Dasselbe wurde mit den NTPDase2-transfizierten Zellen gemacht (Abbildung 35h). Beide Färbungen zeigten markierte Zellen, was die erfolgreiche Transfektion der Kontrollen belegt.

4.5.2 Immunzytologie an PC-12-Zellen

Zur Analyse der zellulären Lokalisation endogen exprimierter NTPDase3, sowie zur Validierung der Westernblotdaten wurden PC12-Zellen immunzytologisch analysiert. Das NTPDase3-Antiserum markierte die PC12-Zellen im Bereich der Plasmamembran und Ausläufer (Abbildung 36).

4.5.3 Immunzytologie an primären Cortexkulturen

Die bisherigen Befunde zeigen, daß die Antikörper gegen NTPDase3 das Enzym auf der Oberfläche transfizierter Zellen und auf der Oberfläche von PC12-Zellen erkennt. Daher wurde die Expression in primären Cortexkulturen getestet.

Die Kulturen wurden von Marco Morciano zur Verfügung gestellt. In den Kulturen waren markierte Zellen mit neuronähnlichem Aussehen zu finden, die eine Markierung im Bereich der Plasmamembran und der Zellausläufer aufwiesen (Abbildung 37a). Bei Anwendung des Präimmunserums waren diese Markierungen nicht zu finden (Abbildung 37c).

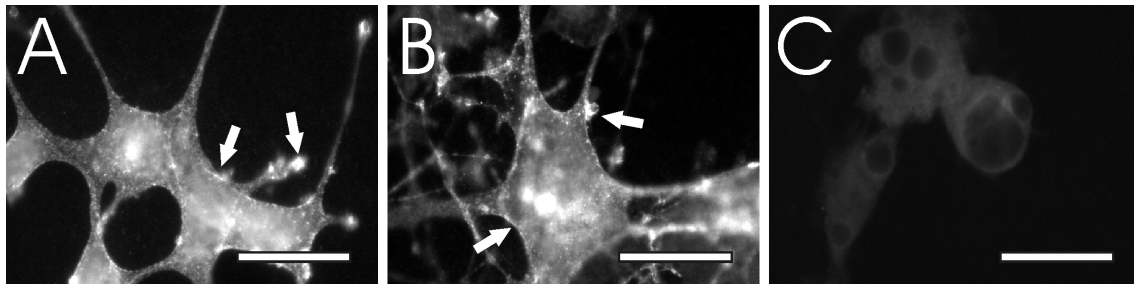


Abbildung 36: Immunzytologie an PC12-Zellen.

Mit NGF (2 Wochen, 50 ng/ml) differenzierte PC-12-Zellen wurden nativ mit NTPDase3-Antiserum (A,B) und Prämimmunserum (C) markiert. Die Pfeile markieren Signale an der Plasmamembran und den Wachstumskegeln. Im Prämimmun-Serum ist keine Markierung zu sehen. Der Maßstab beträgt 25 μ M.

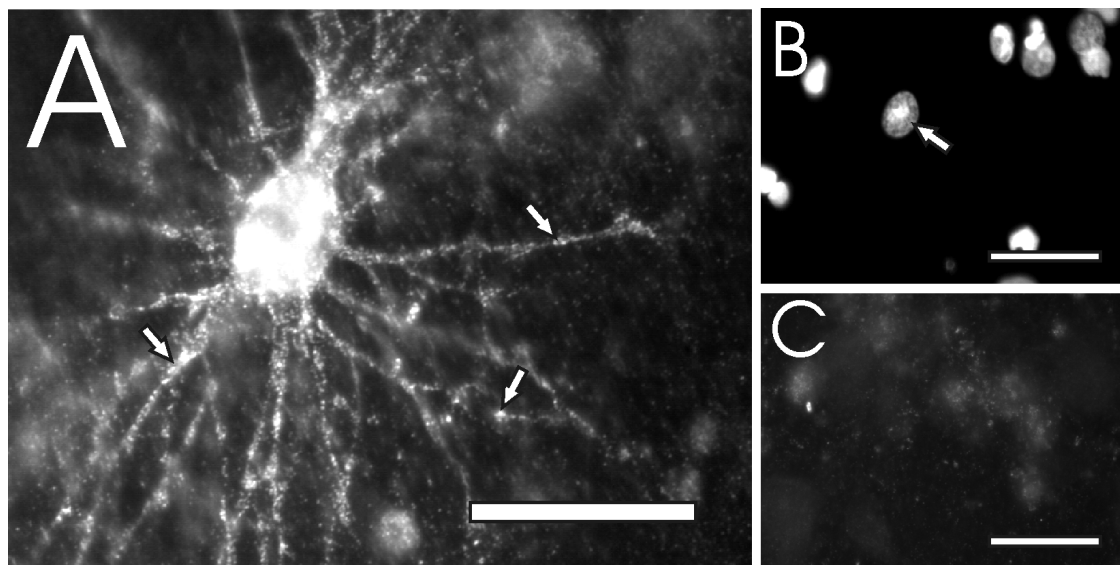


Abbildung 37: Immunzytologie an primären Cortex-Kulturen.

(A) zeigt eine mit NTPDase3-Antiserum (N3-3i4 1:500) markierte Zelle mit neuronalem Aussehen. Die Markierung ist an Zellmembran und Ausläufern zu erkennen (weiße Pfeile). (B) zeigt eine DAPI-Kernfärbung desselben Ausschnittes. Ein Pfeil deutet auf den Kern der markierten Zelle. Bei Anwendung des Prämimmunserums (C) ist eine vergleichbare Markierung nicht zu erkennen. Der Maßstab beträgt 25 μ M.

4.6 Immunhistologische Ansätze

Versuche die verschiedenen Antiseren gegen NTPDase3 auf Gewebeschnitte anzuwenden scheiterten, da die Antikörper keine Markierungen hervorbrachten, die nicht auch im Prämimmunserum zu finden gewesen wären. Angesichts der großen Anzahl der unspezifischen Signale im Western-Blot bei der Verwendung ungereinigter Membranfraktion und der vermutlich geringen endogenen Expression war dieses Ergebnis nicht weiter verwunderlich.

5 Diskussion

Nukleotide und Ihre Abbauprodukte erfüllen Funktionen als extrazelluläre Signalstoffe und Neurotransmitter in verschiedenen Geweben, einschließlich des zentralen Nervensystems (Übersicht bei Burnstock, 1997). Die ubiquitäre Präsenz der Nukleotide sowie die breite Verteilung von P1 und P2-Rezeptoren läßt auf vielfältige Funktionen schließen (Illes et al., 2000; Zimmermann, 2000; Miras-Portugal et al., 1998). Verschiedene Enzyme sind in der Lage, Nukleotide zu hydrolysieren, darunter auch die Mitglieder der E-NTPDase-Familie. Zur Zeit sind für den Menschen 8 Mitglieder der Familie, sowie zahlreiche Orthologe in verschiedenen Spezies, bekannt (Übersicht bei Zimmermann, 2001; Kukulski et al., 2004).

5.1 Klonierung, Identifikation und heterologe Expression der NTPDase3 der Ratte

In der vorliegenden Arbeit konnte die NTPDase3 der Ratte kloniert und funktionell charakterisiert werden. Ausgehend von verschiedenen EST's wurden mittels PCR größere Teile der Ratten-mRNA amplifiziert und in der Folge sequenziert. Die daraus resultierenden Sequenzinformationen konnten erfolgreich eingesetzt werden, um eine cDNA einer Rattenhirn-cDNA-Bank zu isolieren, welche den vollständigen offenen Leserahmen der NTPDase3 enthielt.

Die eingehende Untersuchung dieser cDNA-Sequenz zeigte, daß das Startcodon des NTPDase-ORF nicht innerhalb einer Kozak-Konsensus-Sequenz lag. Die Kozak-Sequenz ($\underline{A/G}^{-3}\text{XXAUGG}^{+4}$) ist eine das Start-Codon (AUG) umgebende Konsensus-Sequenz, welche die Initiation des Translations-Prozesses fördert. Nach Kozak (1981) sind dabei vor allem ein A oder G auf Position -3 vor dem Startcodon und ein G auf Position +4 nach dem Startcodon von Bedeutung. Neuere Studien zeigen jedoch, daß mehr als 50 % aller Startcodons nicht innerhalb einer Kozak-Sequenz lokalisiert sind (Kozak, 1999; Peri et al., 2001). Das Startcodon der NTPDase3-mRNA aus *Homo sapiens* und *Mus musculus* sind ebenfalls nicht in einer Kozak-Sequenz eingebettet

(Smith et al., 1998; Lavoie et al., 2004).

Die meisten bekannten mRNA's weisen einen Poly(A)-Schwanz auf, der die mRNA vor Abbau schützt und einen Export aus dem Zellkern ermöglicht. Der Poly(A)-Schwanz wird der Prä-mRNA während der Prozessierung angehängt. Dies erfolgt ~10 bis 30 Nukleotide nach dem Polyadenylierungssignal (Übersicht bei Zhao et al., 1999). Die Konsensus-Sequenz (AAUAAA) des Polyadenylierungssignal (Proudfoot et al., 1976) war 24 bp vor Beginn des Poly(A)-Schwanzes zu finden. Zusätzlich wurde in der genomischen DNA, im Anschluß an den Bereich der mRNA-Sequenz, ein downstream-Element (DSE-Element) der Polyadenylierung gefunden. Die DNA in diesem Bereich codiert eine Uridin-reiche RNA (40 % Uridingehalt) mit einem Poly(U)-Stretch (UUUCU), was nach Chou et al. (1994) ein Element des Polyadenylierungsprozesses ist.

Zur Identifikation der isolierten cDNA wurde die Primärsequenz des Proteins aus der mRNA abgeleitet und analysiert. Das gemeinsame Merkmal aller Mitglieder der E-NTPDase-Familie sind die 5 ACR's (Handa et al., 1996; Schulte am Esch II et al., 1999). Diese Aminosäure-Muster konnten auch in der klonierten Sequenz nachgewiesen werden, was das Protein als Mitglied der E-NTPDase-Familie identifizierte. Ein Alignment verschiedener E-NTPDasen identifizierte die aus der Ratte klonierte Sequenz als Orthologe der humanen NTPDase3 (Chadwick et al., 1998; Smith et al., 1998).

Die heterologe Expression der NTPDase3-cDNA in CHO-Zellen zeigte, daß die klonierte Sequenz ein katalytisch aktives Protein codiert. Mit Membranfraktionen aus NTPDase3-tranfizierten CHO-Zellen konnte die für eine E-NTPDase zu erwartende Nukleotidase-Aktivität (Smith et al., 1998; Kukulski et al., 2003) nachgewiesen werden. Durch Immunzytologie und Westernblot-Analysen an NTPDase3-transfizierten CHO-Zellen wurde die Exprimierbarkeit der klonierten NTPDase3-cDNA in einem eukaryotischen Zellkultursystem ebenfalls bestätigt.

5.2 Das NTPDase3-Gen der Ratte liegt auf Chromosom 8

Nach einem Datenbankabgleich der mRNA-Sequenz mit genomischen Sequenzen der Ratte konnte die NTPDase3 im Chromosom 8 im Bereich 8q32 gefunden werden. Die mRNA lag in 11 Exons vor, die von 10 Introns getrennt wurden. Die Exons 2 bis 11 enthielten den vollständigen offenen Leserahmen des Enzyms. Alle Intron/Exon-Übergänge folgten der GT-AG-Regel (Krämer, 1996; Lewin, 1997).

Ein Vergleich der genomischen Lokalisation der Ratten-NTPDase3 mit anderen E-NTPDasen zeigte, daß die verschiedenen E-NTPDasen auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert (Chadwick et al., 1997; Chadwick et al., 1998; Schoenborn et al., 1998) sind. Das *Mus musculus* - Orthologe der NTPDase3-mRNA ist auf Chromosom 9F4 lokalisiert und liegt in 10 Exons vor (Lavoie et al., 2004). Die humane NTPDase3 ist nach einer Blast-Analyse (Altschul et al., 1990) auf Chromosom 3p21 lokalisiert und voraussichtlich in 11 Exons unterteilt. Nach Datenbank-Auskunft (<http://www.ensembl.org/>) liegen die Gene der NTPDase3 von Maus und Ratte in übereinstimmenden Chromosomenbereichen (Syntenie).

5.3 Die NTPDase3 ist in Aminosäure-Zusammensetzung und Membrantopologie den NTPDasen1, 2 und 8 ähnlich

Das Dendrogramm der verschiedenen E-NTPDasen aus der Ratte verdeutlichte die Unterteilung der Familie in drei Zweige. Zum ersten Zweig der Familie gehören die bekannten Orthologe der NTPDase1, 2, 3 und 8 (Wang et al., 1996, Kegel et al. 1997, Smith et al., 1998, Bigonnesse et al., 2004). Diese NTPDasen erwiesen sich im Alignment der Primärsequenzen, als die am nächsten verwandten Mitglieder der Ratten-NTPDase3. Die Enzyme dieser Gruppe haben eine Membrantopologie mit 2 Transmembrandomänen nahe der Termini und die *in silico*-Analyse der Ratten-NTPDase3 bestätigte, daß dieses Enzym die gleiche Membrantopologie besitzt.

Die NTPDasen 4 und 7 besitzen ebenfalls 2 Transmembrandomänen (Wang et al., 1998a; Shi et al., 2001), weisen aber, im Vergleich mit der NTPDase3, deutliche Unterschiede in der Primärsequenz auf.

Zu den Enzymen des dritten Zweigs zählen die NTPDase5 und 6 (Trombetta et al., 1999; Braun et al., 2000), mit nur einer Transmembrandomäne. Die beiden Enzyme unterscheiden sich damit in der Membrantopologie von der NTPDase3 und ihre Ähnlichkeit zur NTPDase3 auf Aminosäureebene ist ebenfalls gering.

5.4 Zellulär ist die NTPDase3 auf der Plasmamembran lokalisiert

Die *in silico* – Analyse der Ratten-NTPDase3 ermittelte einen Signalanker in der Primärsequenz der NTPDase3. Signalpeptide und Signalanker sorgen für eine Translation in das ER und schicken das Protein in den sekretorischen Weg (Walter et al., 1994), den alle membranständigen und sekretierten Proteine einschlagen. Neben den posttranslationalen Modifikationen findet beim Durchlaufen des ER und des Golgi-Apparates bzw. des Trans-Golgi-Netzwerkes (TNG) eine Sortierung der Proteine statt. Die zelluläre Lokalisation hängt von verschiedenen Motiven in der Proteinsequenz ab (Übersicht bei van Vliet et al., 2003; Taesdale et al., 1996). Deswegen wurde die Sequenz nach verschiedenen, in der Literatur beschriebenen, Sortier- bzw. Retentions-Signalen untersucht.

ER-Retentionssignale wie KDEL (Munro et al., 1987), HNEL (Bu et al., 1997), welche hauptsächlich in löslichen ER-Proteinen zu finden sind, waren in der NTPDase3-Sequenz nicht enthalten. Ein, in ER-ständigen Membranproteinen vorkommendes Retentionssignal, wie das C-terminale Di-Lysin-Motiv (KKXX / KXKXX; Nilsson et al., 1989; Jackson et al., 1993), bzw. das N-terminale Di-Arginin-Motiv (XXRR; Schutze et al., 1994), konnte ebenfalls nicht gefunden werden.

Die Frage nach Signalen für eine mögliche Lokalisation der NTPDase3 im Golgi-Apparat läßt sich durch *in silico*-Analysen nur unzureichend beantworten, da Golgi-Lokalisations-Motive im Normalfall keine diskrete Aminosäuresequenz darstellen, sondern aus einer Kombination verschiedener Variablen bestehen (Gleeson, 1998).

Bekannte Motive, die für eine Endozytose des Proteins und einen möglichen Rücktransport in den Golgi-Apparat oder Endosomen bzw. Lysosomen sprechen, konnten nicht gefunden werden. Zu den ausgeschlossenen Motiven zählten das im zytoplasmatischen Teil des Proteins lokalisierte YXXZ-Motiv (Z = hydrophobe Aminosäure), welches Internalisierung und Golgi-ständigkeit initiiert (Humphrey et al., 1993; Owen et al., 1998), ebenso wie das in den zytoplasmatischen Proteinenden lokalisierte Di-Leucin-Motiv (LL/LI/LV/II, Pond et al., 1995), welches das Protein dem endozytotischen Weg zu den Lysosomen zuführt. Signale (SKL, (R/K(L/V/I)X₅(H/Q)(L/A)); Terlecky et al., 2000; Holroyd et al., 2001), die zum Transport des Proteins in Peroxisomen führen, konnten ebenfalls ausgeschlossen werden. Zusammenfassend legen der Signalanker und das Fehlen von bekannten Retentionssignalen in der Primärsequenz ein Durchlaufen des sekretorischen Wegs mit der Plasmamembran als Zielort nahe.

Unter Verwendung der NTPDase3-Antikörper von Dr. Jean Sévigny konnte die plasmamembranständige Lokalisation der NTPDase3 auch immunzytologisch belegt werden. Eine Markierung der Plasmamembran war sowohl in NTPDase3-transfizierten CHO-Zellen, als auch in PC-12 Zellen mit endogen exprimierter NTPDase3 zu finden, was ausschließt daß es sich bei der Membranständigkeit um ein Artefakt der Überexpression handelte. Weiterhin spricht die Nukleotidase-Aktivität in den Membranfraktionen NTPDase3-transfizierter CHO-Zellen für eine membranständige Lokalisation.

Die Identifizierung der Ratten-NTPDase3 in der Plasmamembran ordnet sie auch bezüglich des Merkmals der zellulären Lokalisation dem ersten Zweig (NTPDase1-3, NTPDase8) der E-NTPDase-Familie zu. Sowohl für die NTPDase1 (Wang et al., 1996), als auch für die NTPDase2 (Mateo et al., 2003) wurde eine Lokalisation in der Plasmamembran gezeigt. Dasselbe gilt für die beiden NTPDase3-Orthologe aus Mensch (Smith et al., 1999) und Maus (Lavoie et al., 2004), sowie für die NTPDase8 (Bigonnesse et al., 2004).

Dagegen sind die NTPDase4 und NTPDase7, welche ebenfalls 2 Transmembranen besitzen, intrazellulär lokalisiert. Die NTPDase4 ist im Golgi-Apparat zu finden (Wang et al., 1998a), während die NTPDase7 in lysosomalen Segmenten zu finden ist (Shi et al., 2001). Auch die E-NTPDasen mit nur einer Transmembrandomäne lassen sich

intrazellulär lokalisieren. Die NTPDase5 wurde im ER nachgewiesen (Trombetta et al., 1999), während die NTPDase6 im Golgi-Apparat gefunden wurde (Braun et al., 2000). Für beide Enzyme sind zusätzlich sekretierte Formen beschrieben (Mulero et al., 2000; Braun et al., 2000).

5.5 Bei der NTPDase3 liegt eine N-Glykosylierung vor, die teilweise konserviert ist

Für verschiedene E-NTPDasen ist eine Glykosilierung beschrieben (Christoforidis et al., 1996; Smith et al., 1999c; Mulero et al., 2000). Die *in silico*-Analysen der klonierten NTPDase3 identifizierte mehrere N-Glykosilierungsstellen, was vermuten ließ, daß es sich um ein stark glykosiliertes Protein handelt. Durch Bindung des NTPDase3-Proteins an ConA-Sepharose, einer zuckerbindenden Matrix, konnte diese Hypothese bestätigt werden. Die N-Glykosilierung steht in Zusammenhang mit Prozessen der Qualitätskontrolle von Proteinen, Proteindegradation sowie Proteinsortierung (Übersicht bei Helenius et al., 2001; Trombetta, 2003). Viele Glykoproteine benötigen die Glykosilierung für ihre korrekte Faltung und sind bei fehlerhafter oder fehlender Verzuckerung nicht funktionell (Helenius, 1994).

Die katalytische Aktivität der humanen NTPDase1 und 3 sind ist der Glykosilierung abhängig. Die NTPDase1 wird bei mangelnder Glykosilierung nicht an die Zelloberfläche transportiert und zeigt keine katalytische Aktivität (Zhong et al., 2001). Im menschlichen NTPDase3-Orthologe beeinflusst die Glykosilierung den Oligomerisationsstatus und die katalytische Aktivität, nicht jedoch die zelluläre Lokalisation (Smith et al., 1999c). Es konnte gezeigt werden, daß eine Glykosilierungsstelle nahe der ACRI in verschiedenen Orthologen der NTPDase1, 2 und 3, einschließlich der Ratten-NTPDase3, vorkommt. Obwohl die NTPDase8 einen vergleichbaren Grad an Aminosäure-Identität zur NTPDase3 aufweist, wie die NTPDasen1 und 2, die selbe Membrantopologie inne hat (Bigonnesse et al., 2004) in ihrem katalytischen Eigenschaften der NTPDase3 nahesteht, ließ sich nur im humanen Orthologe der NTPDase8 diese konservierte Glykosilierungsstelle finden.

Eine Mutation des konservierten Asparagin 81, innerhalb der konservierten Glykosilierungsstelle der humanen NTPDase3, hatte eine Minderung der Nukleotidase-Aktivität sowie verminderte Proteolysis-Resistenz zur Folge. Eine umfassende Fehlfaltung oder eine Änderung der Tertiärstruktur lag in den Mutanten nicht vor (Murphy et al., 2003b). Viele Enzyme benötigen die Glykosilierung um cotranslational im endoplasmatischen Reticulum richtig gefaltet zu werden, jedoch nicht unbedingt zur Aufrechterhaltung ihrer Aktivität (Helenius, 1994). Wahrscheinlich bezieht sich der Einfluß der Glykosilierung im Falle der NTPDase3 weniger auf die Faltung, sondern mehr auf die Stabilisierung der Tertiärstruktur. Dafür spricht die Tatsache, daß die Glykosilierung nicht schon während der Proteinsynthese inhibiert werden muß, sondern auch eine Deglykosilierung des fertigen Enzyms zu Aktivitätsverlust führt (Smith et al., 1999c). Auch bei der NTPDase1 führt Deglykosilierung zu einem Aktivitätsverlust (Christoforidies et al., 1996) und ein stabilisierender Einfluß von Glykanen auf die Tertiär- und Quartär-Struktur ist für verschiedene Proteine beschrieben (Wormwald et al., 1999).

Für den Großteil der plasmamembranständigen Enzyme der ersten Gruppe scheint die Glykosilierung eine funktionelle Notwendigkeit zu sein. Dagegen konnte in den intrazellulär lokalisierten NTPDasen4 bis 7 (Wang et al., 1998a; Braun et al., 2000; Shi et al., 2001) die konservierte Glykosilierungsstelle nicht gefunden werden. Weiterhin scheint die Glykosilierung, zumindest bei den Enzymen der dritten Gruppe (NTPDase5/6) nur einen geringen Einfluß auf die katalytische Aktivität auszuüben (Mulero et al., 2000; Ivanenkov et al., 2003).

Auch ein Einfluß der Glykosilierung auf die zelluläre Lokalisation der NTPDasen ist vorstellbar. Für die NTPDase2 ist eine Lokalisation in der apikalen Zelloberfläche beschrieben ist (Lin, 1989). Lektine sind an der Proteinsortierung im sekretorischen Weg beteiligt (Übersicht bei Hauri et al., 2000). N- und O-Glykane stellen, neben anderen Faktoren, auch Signale für die Sortierung von Proteinen zur apikalen Oberfläche polarisierter Zellen dar (Rodriguez-Boulean et al., 1999).

5.6 Die NTPDase3 zeigt Ähnlichkeiten zur Zuckerkinase/ Hitzeschock - Protein 70/ Aktin-Superfamilie

Die Zuckerkinase/Hitzeschock-Protein 70/Aktin-Superfamilie zeichnet sich durch wenige konservierte Aminosäure-Sequenzen und Gemeinsamkeiten in der dreidimensionalen Struktur aus. Zwei, über eine β -Brücke verbundene $\beta_1\beta_2\beta_3\alpha_1\beta_4\alpha_2\beta_5\alpha_3$ -Domänen, bilden eine Tasche, in der Nukleotide binden können (Hurley, 1996). Bindung von Nukleotiden führt dann zur einer Konformationsänderung der zwei Domänen (Bystrom et al., 1999; Chick et al., 1996). Die zwei Domänen werden in 4 Subdomänen (Ia, IIa, Ib, IIb) unterteilt, von denen Ia und Ib die selbe Faltung haben. Innerhalb der Subdomänen sind 5 Sequenzmotive zu finden: Phosphate1, Connect1, Phosphate2, Adenosine und Connect2. Die Sequenzmotive Phosphate1 und Phosphate2 enthalten im Aktin/Hsp70-Zweigs der Superfamilie als strikt konservierte Aminosäuren das DXG-Motiv. Der Hexokinase-Zweig der Superfamilie hat in der Phosphate2-Sequenz anstelle des DXG ein konserviertes GT (Bork et al., 1992).

Der Vergleich verschiedener E-NTPDasen ließ vergleichbare Sekundärstrukturen erkennen und zeigten im Vergleich mit den $\beta_1\beta_2\beta_3\alpha_1\beta_4\alpha_2\beta_5\alpha_3$ -Domänen von Aktin (Hurley, 1996) als Vertreter der Superfamilie ein ähnliches Muster in der Sekundärstruktur. Innerhalb der ACR I und IV sind bei den E-NTPDasen ebenfalls die hochkonservierten Aminosäuren DXG zu finden (Handa et al., 1996; Vasconcelos et al., 1996). Im Falle des ersten DXG-Motivs liegen die Aminosäuren innerhalb der β -Phosphatbindesequenz (Flaherty et al., 1991).

Punktmutationen der konservierten Asparaginsäure- bzw. Glycin-Reste innerhalb der ACR I oder IV der humanen NTPDase3 führen zu einem starken bis völligen Aktivitätsverlust (Smith et al., 1999c). Bei einer Mutation in der β -Phosphat-Binde-Sequenz der Hexokinase wird die enzymatische Aktivität ebenfalls massiv reduziert (Zeng et al., 1996). In Aktin und Hexokinase dient die Asparaginsäure im ersten DXG-Motiv zur Koordination des divalenten Kations (Ca^{2+} , Mg^{2+}) des Me^{2+}ATP (Zeng et al., 1996; Chik et al., 1996). Die Abhängigkeit von Kalzium und Magnesium ist vielfach für die E-NTPDase-Familie beschrieben (Wang et al., 1996; Zimmermann, 2000) und wurde in dieser Arbeit auch für die Ratten-NTPDase3 nachgewiesen. Mutationsstudien an

NTPDase1 haben gezeigt, dass der Austausch der Asparaginsäuren in ACR I und IV zu einer Änderung der $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Präferenz und der Enzymaktivität führen (Drosopoulos, 2002).

Die Ähnlichkeiten in der Sekundärstruktur, die Präsenz der β -Phosphat-Binde-Sequenz und die konservierten DXG-Motive in den Apyrase-konservierten Regionen I und IV lassen darauf schließen, daß die E-NTPDasen mit den Vertretern der Zuckerkinase/Hitzeschock-Protein 70/Aktin-Superfamilie einen gemeinsamen Vorfahren besitzen. Der Einfluß der DXG-Motive auf Enzymaktivität und Mg^{2+} -Präferenz lassen einen ähnlichen Mechanismus der Substratbindung wie in Actin oder Hsp70 vermuten.

5.7 Überlegungen zur Tertiär- und Quartärstruktur der NTPDase3

5.7.1 Die Zuckerkinase/Hitzeschock-Protein 70/Aktin-Superfamilie als Modellgrundlage für Tertiärstruktur und Substratbindung

Tertiärstrukturen sind häufig stärker konserviert als die Primärsequenz der Proteine. Verschiedene Proteinfamilien bzw. Protein-Superfamilien zeigen oftmals, trotz geringer Identität der Primärsequenzen ihrer Mitglieder, konservierte Faltungsmuster (Hurley, 1996; Flower et al., 2000). Häufig bleibt die globuläre Struktur bzw. die Faltung bestimmter Domänen selbst zwischen Enzymen mit sehr verschiedenen Funktionen gleich (Ogura et al., 2001). Es konnte in dieser und anderen Arbeiten (Vasconcelos et al., 1996; Smith et al., 1999c) gezeigt werden, daß Ähnlichkeiten der E-NTPDasen zu der Zuckerkinase/Hitzeschock-Protein 70/Aktin-Superfamilie bestehen. Dies legt die Vermutung nahe, daß die Tertiärstruktur der NTPDase3 zumindest teilweise der Tertiärstruktur der Superfamilie entspricht. Nach diesem Modell bilden 2 $\beta_1\beta_2\beta_3\alpha_1\beta_4\alpha_2\beta_5\alpha_3$ -Domänen die Nukleotidbindetasche (Kabsch et al., 1995), in der das Mg^{2+} -Nukleotid über die konservierten DXG-Motive koordiniert wird (Bork et al., 1992). Zwischen den Elementen der $\beta_1\beta_2\beta_3\alpha_1\beta_4\alpha_2\beta_5\alpha_3$ -Domänen sind die andere Aminosäuren bzw. Sekundärstrukturen der NTPDase3 integriert, wie das auch bei anderen Mitgliedern der Superfamilie zu beobachten ist (Buss et al., 2001). Während das Grundgerüst der Nukleotidbindetasche durch $\beta_1\beta_2\beta_3\alpha_1\beta_4\alpha_2\beta_5\alpha_3$ -Domänen gebildet wird,

bestimmen die in den Mitgliedern variierenden Aminosäuren und Sekundärstrukturen die genaue Konformation und die Präferenz für bestimmte Nukleotide und Me^{2+} -Ionen. Für diese Hypothese sprechen den strukturellen Ähnlichkeiten auch Mutationsstudien im Bereich der DXG-Motive und der umliegenden Aminosäuren von NTPDase1 und 3. Es wurde nahezu immer ein Effekt auf die Substratspezifität oder die Ionenabhängigkeit beobachtet (Smith et al., 1999c; Drosopoulos, 2002; Yang et al., 2001).

5.7.2 Cysteine stabilisieren wahrscheinlich die Tertiärstruktur der NTPDase3

Innerhalb einer Untergruppe der drei Zweige der E-NTPDase-Familie erwies sich die wahrscheinliche Anordnung der Sekundärstrukturen als annähernd identisch. Ebenso konnte im Vergleich die Gleichverteilung der Cysteine bei den NTPDasen1-3 und 8 gezeigt werden. Chimären der NTPDase1 und 2 zeigen, dass der cysteinreiche Bereich zwischen ACR III und ACR V die Produktbildung beeinflusst (Heine et al., 2001). Eine wichtige Eigenschaft von Cystein ist ihr Potential Disulfidbrücken zu bilden, die die Tertiärstruktur eines Proteins stabilisieren können. Der Befund, daß ein monoklonaler Antikörper die NTPDase1 nur unter nichtreduzierenden Bedingungen erkennt (Schulte am Esch II et al., 1999), lässt vermuten, dass die Tertiärstruktur der E-NTPDasen von Disulfidbrücken stabilisiert wird. Ivanenkov et al. (2003) konnte für die NTPDase6 4 Cysteine bestimmen, die an der Bildung von Disulfidbrücken beteiligt sind. Drei dieser Cysteine (C^{289} , C^{334} , C^{422}) sind innerhalb der E-NTPDasen hochkonserviert und konnten bei einem Alignment der Primärsequenzen auch in der NTPDase3 identifiziert werden. Nahe der Position des vierten Cysteins liegt in der NTPDase2 und 3 das Cys^{399} , das im Fall der NTPDase2 bei einem Aminosäureaustausch zur Fehlfaltung führt (Mateo et al., 2003). Das lässt den Schluß zu, daß zumindest diese vier Cysteine an der Bildung von Disulfidbrücken (C^{289} - C^{334} , C^{399} - C^{422}) beteiligt sind, welche für die Tertiärstruktur des Enzyms von Bedeutung sind. Vermutlich werden von den anderen konservierten Cysteinen weitere Disulfidbrücken gebildet.

5.7.3 Transmembrandomänen und spezifische Aminosäuren beeinflussen vermutlich die katalytischen Eigenschaften der E-NTPDasen über die Konformation

Obwohl die Transmembrandomänen für die Fähigkeit der E-NTPDasen, Nukleotide zu spalten nicht essentiell sind (Schulte am Esch II, 1999), üben sie einen wesentlichen Einfluß auf die katalytische Aktivität und die Tetramerbildung aus (Wang et al., 1998c; Grinthal et al., 2002; Grinthal et al., 2004). Insbesondere in der oligomeren Form scheinen die Transmembrandomänen einen Einfluß auf die Aktivität der NTPDasen zu auszuüben. Für die NTPDasen 1 und 2 zeigten Versuche mit Quervernetzern, daß diese Enzyme in einer oligomeren Form eine höhere Aktivität aufweisen, während Detergenzien einen negativen Einfluß auf die Aktivität haben (Stout et al., 1996; Wang et al., 1998c). Durch Zusatz des multivalentem ConA lässt sich die katalytische Aktivität ebenfalls steigern und der Effekt von Detergenzien reduzieren (Caldwell et al., 2001; Knowles et al., 2003). Für die NTPDase1 und 2 ist eine Anordnung in Dimeren bis Tetrameren sehr wahrscheinlich (Wang et al., 1998c; Failer et al., 2003). Die humane NTPDase3 liegt vermutlich als Doppel-Dimer vor. Der tetramere Komplex wird dabei von zwei Dimeren gebildet, welche aus je 2 NTPDase3-Molekülen bestehen, die über das Cys¹⁰ kovalent verbunden sind (Murphy et al., 2002). Wie für eine Splice-Variante der NTPDase2 unlängst gezeigt wurde, können auch die zytosolisch lokalisierten Termini Einfluß auf die katalytischen Eigenschaften des Enzyms nehmen (Wang et al., 2005). Chemische Modifikation spezifischer Aminosäuren wie Cystein (Murphy et al., 2002) oder Histidin (Grinthal et al., 2000; Dzhandzhugazyan et al., 2002) kann zu einer Abnahme der NTPDase-Aktivität in Abhängigkeit vom Oligomerisations-Zustand zu führen.

Bereits Unterschiede einzelner Aminosäuren an bestimmten Positionen können die katalytischen Eigenschaften der E-NTPDasen beeinflussen. Anstelle des His⁵⁹, dessen Mutation die NTPDase2 in eine ADPase verwandelt (Grinthal et al., 2000), haben die NTPDase3-Orthologen ein Arginin. Mutationen dieses Arginins (R67H, R67G) sorgen ebenfalls für eine Änderung des ATPase:ADPase-Verhältnisses. Verschiedene Punktmutationen in der humanen NTPDase3 im Bereich der ACR II bewirken eine Verschiebung der de Ca²⁺/Mg²⁺-Präferenz (Kirley et al., 2001) oder des

ATPase:ADPase-Verhältnisses (Yang et al., 2001).

Diese Befunde sprechen dafür, daß enzymatische Charakteristika der E-NTPDasen wie $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Präferenz oder ATPase:ADPase-Verhältnis, durch die Konformation der Proteine bestimmt werden. Dabei scheinen, zumindest bei den den Oligomer-bildenden Vertretern der E-NTPDasen, zu denen auch die humane NTPDase3 gehört, Wechselwirkungen zwischen den Transmembrandomänen der assoziierten Proteine die Konformation zu beeinflussen. Für die NTPDase1 konnte gezeigt werden, das die Konformation der Transmembrandomänen auf die katalytische Aktivität Einfluß nimmt, und umgekehrt Substratbindung die Konformation der Transmembrandomänen beeinflusst (Grinthal et al., 2004). Der Einfluß einzelner Aminosäuren auf die katalytischen Eigenschaften des Enzyms könnte sowohl indirekt durch die Beeinflussung der Konformation als auch durch direkte Beteiligung am katalytischen Prozess erklärt werden.

5.8 Vergleichende Charakterisierung der katalytischen Eigenschaften der NTPDase3

5.8.1 In ihrer katalytischen Aktivität liegt die NTPDase3 zwischen NTPDase1 und NTPDase2

Die E-NTPDasen hydrolysieren Nukleosidtri und -diphosphate in verschiedenen NTPase:NDPase-Verhältnissen (Zimmermann, 2000). Die NTPDase1 hydrolysiert Nukleosidtriphosphate und Nukleosiddiphosphate etwa gleich gut (Kaczmarek et al., 1996; Kegel et al., 1997). Das ATPase:ADPase-Verhältnis der NTPDase2 beträgt 31:1 (Kegel et al., 1997), zeigt also eine deutliche Präferenz des Enzyms für Nukleosidtriphosphate. Die NTPDase8 hydrolysiert Nukleosidtriphosphate (ATP, UTP) besser als Nukleosiddiphosphate und das ATPase:ADPase-Verhältnis beträgt 4:1 (Bigonnesse et al., 2004). Nukleosidmonophosphate werden von keinem der Enzymen hydrolysiert (Kukulski et al., 2003; Bigonnesse et al., 2004).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die NTPDase3 der Ratte Nukleosidtriphosphate und Nukleosiddiphosphate, nicht jedoch Nukleosidmonophosphate hydrolysiert. Das Verhältnis der ATP:ADP-Hydrolyse von mit 5:1 liegt zwischen dem

der NTPDase1 und der NTPDase2 und ist der NTPDase8 am ähnlichsten (Bigonnesse et al., 2004).

Im Vergleich ergeben die drei Orthologe der NTPDase3 ein einheitliches Bild. Sowohl die humane, als auch die *Mus musculus*-NTPDase3 hydrolysieren Nukleosidtriphosphate besser als Nukleosiddiphosphate. Eine AMP-Hydrolyse konnte in keinem Orthologe nachgewiesen werden (Smith et al., 1999c; Lavoie et al., 2004). Das ATP:ADP-Verhältnis bei pH 7,4 liegt für das humane Enzym (Smith et al., 1998) und das Maus-Orthologe (Lavoie et al., 2004) bei 3:1. Interessanterweise zeigt das Maus-Orthologe ein zweites pH-Optimum bei pH 5,0, welches im Mensch- und Ratten-Orthologen nicht zu finden ist. Bei pH5 verschiebt sich das NTPase:NDPase-Verhältnis im Maus-Enzym zugunsten der NTPase-Aktivität (Lavoie et al., 2004).

Unterschiede zwischen den E-NTPDase-Mitgliedern gibt es nicht nur hinsichtlich des ATPase:ADPase-Verhältnisses, sondern auch in der Produktbildung. Von der NTPDase1 ist bekannt, daß ATP ohne Freisetzung von ADP zu AMP hydrolysiert wird, während die NTPDase2 das Zwischenprodukt ADP freisetzt (Heine et al., 1999). Die NTPDase8 setzt ebenfalls ADP als Intermediat frei (Bigonnesse et al., 2004). Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß bei der ATP-Hydrolyse der NTPDase3 ADP freigesetzt wird, welches dann weiter zu AMP hydrolysiert wird. Bezüglich der Produktbildung entspricht die NTPDase3 eher den NTPDasen2 und 8 als der NTPDase1.

Die Substratspezifität der intrazellulär lokalisierten E-NTPDasen unterscheidet sich deutlich von der NTPDase3. Die NTPDasen4 und 5 sind in Golgi und ER lokalisierte UDPasen (Wang et al., 1998a; Mulero et al., 1999). Neben UDP werden auch andere Nukleosiddiphosphate hydrolysiert. Das UTP:UDP-Verhältnis liegt bei 1:5 für die NTPDase4 (Wang et al., 1998a) und 1:34 für die NTPDase5 (Mulero et al., 1999). Die Golgi-ständige NTPDase6 präferiert GDP als Substrat. Das GTP:GDP-Verhältnis beträgt 1:10 (Braun et al., 2000). Die meisten bekannten, intrazellulären E-NTPDasen bevorzugen also im Gegensatz zur NTPDase3 Nukleosiddiphosphate. Eine Ausnahme bildet die lysosomal lokalisierte NTPDase7, die Nukleosidtriphosphate, insbesondere UTP, GTP und CTP bevorzugt (Shi et al., 2001). Keine der intrazellulären NTPDasen hydrolysiert ATP.

5.8.2 Die Aktivität der NTPDase3 ist abhängig von Kalzium-Ionen

Die Abhängigkeit der E-NTPDasen von divalenten Kationen ist vielfach beschrieben (Übersicht bei Zimmermann, 2000). Die Messungen am Ratten-Orthologe zeigten eine Präferenz der NTPDase3 für Kalzium. Sowohl die ATPase als auch die ADPase-Aktivität ist in Gegenwart von Kalzium höher. Auch die beiden anderen Orthologen der NTPDase3 weisen eine Präferenz für Kalzium (Murphy et al., 2003; Lavoie et al., 2004) auf. Die NTPDasen1 und 4 haben ebenfalls eine Präferenz für Kalzium (Markus et al., 1997; Wang et al., 1998a; Biederbick et al., 2000). Von der NTPDase2 dagegen existieren 2 Isoformen, von denen eine (NTPDase2 α ²⁰) mit Ca²⁺ oder Mg²⁺ gleich aktiv ist, während die andere (NTPDase2 β) primär Magnesiumabhängig ist (Wang et al., 2005). Die NTPase5 präferiert ebenfalls Magnesium (Mulero et al., 1999) während die NTPDase6 gleich gut in Gegenwart von Magnesium oder Kalzium arbeitet (Braun et al., 2000).

5.9 Gewebeverteilung und mögliche physiologische Funktionen der NTPDase3

5.9.1 Die NTPDase3 ist ein potentieller Regulator interzellulärer Signale

Extrazelluläre Nucleotide stellen ubiquitäre Signalstoffe dar, die über P2-Rezeptoren an Ihrem Zielort wirken (Bhagwat et al., 1997; Burnstock, 1997) können und durch Zytolyse, Sekretion oder andere Wege aus Zellen freigesetzt werden (Bodin et al., 2001). Ekto-Nucleotidasen wie die NTPDase3 sind in der Lage, extrazelluläre Nucleotide zu Nucleosidmonophosphaten zu hydrolysieren. Auf diese Weise sind die Enzyme Kandidaten, um Nucleotid-vermittelte Signale zu beenden oder auch zu erzeugen. Zusammen mit der 5'-Nucleotidase können sie Adenosin bilden, das über P1-Rezeptoren vielfältige Wirkungen ausüben (Fredholm et al., 2000; Fredholm et al., 2001) oder von den Zellen über Nucleosidtransporter resorbiert werden kann.

Das Zusammenspiel der NTPDasen1 und 2 bei der Thromboregulation zeigt, wie E-

20 NTPDase2 α entspricht der NTPDase2 nach Kegel et al., 1999

NTPDasen mit verschiedenen katalytischen Eigenschaften und unterschiedlicher Verteilung bei der Modulation extrazellulärer Signale interagieren können. NTPDase1 ist die dominierende E-NTPDase in Blutgefäßen und spielt aufgrund ihrer Fähigkeit ADP, einen Aktivator der Blutplättchenaggregation zu hydrolysieren, eine wesentliche Rolle in der Thromboregulation (Markus et al., 1997; Enjyoji et al., 1999; Markus et al., 2001). Die NTPDase1 ist hauptsächlich auf dem Epithel der Gefäßwand zu finden, während die primär ATP hydrolysierende NTPDase2 in der das Gefäß umgebenden Tunica adventitia lokalisiert ist (Sévigny et al., 2002). Im Gegensatz zur inhibierenden Rolle der NTPDase1 im intakten Gefäß wird bei Verletzung eines Gefäßes ATP aus verletzten Zellen und Thrombozytenfreisetzung durch Mitwirkung der NTPDase2 zum koagulationsfördernden Faktor ADP hydrolysiert.

Neben der, wie eben beschriebenen, direkten Beeinflussung Nukleotid-vermittelter Signale sind auch indirekte Wirkungsweisen vorstellbar. Extrazelluläres ATP ist das Kosubstrat von Ekto-Proteinkinasen, deren Aktivität auf verschiedenste nicht-neuronale wie neuronale Prozesse Einfluß hat (Chen et al., 1996; Redegeld et al., 1999). Ekto-Nukleotidasen könnten also auch Ekto-Proteinkinase-vermittelte Signale durch Hydrolyse ihres Kosubstrates ATP modulieren.

Eine weitere, mögliche Funktion liegt in der Resorption ausgeschütteter Nukleotide. Geladenen Moleküle, wie ATP können nicht durch die Plasmamembran diffundieren. Nukleoside, die Produkte der katalytischen Aktivität von E-NTPDasen und Nukleosid-monophosphat- spaltenden Enzymen, wie der Ekto-5'-Nukleotidase, können über Nukleosid-Transporter wieder in die Zelle aufgenommen werden (Thorne et al., 1996; Kong et al., 2004).

Zusammenfassend ist folgendens festzustellen: Es konnte anhand der Immunzytologie gezeigt werden, daß es sich bei der NTPDase3 aus *Rattus norvegicus* um ein plasmamembranständiges Ekto-Enzym handelt. Das Enzym hydrolysiert ein breites Spektrum an Nukleosidtri- und -diphosphaten und ist mit seinem ATPase:ADPase-Verhältnis zwischen NTPDase1 (Ekto-Apyrase) und 2 (Ekto-ATPase) positioniert. Die NTPDase3 ist nach ihrer zellulären Lokalisation und ihren katalytischen Eigenschaften ein Kandidat für die Kontrolle Nukleotid-vermittelter Signale. Da das Enzym Nukleosidtriphosphate als Substrat bevorzugt, jedoch im Gegensatz zur NTPDase2 auch

Nukleosiddiphosphate in nennenswertem Maßstab hydrolysiert, ist eine eigenständige physiologische Funktion ebenso denkbar, wie die Zusammenarbeit mit anderen plasmamembranständigen Vertretern der E-NTPDasen.

5.9.2 Mögliche nicht-neuronale Funktionen der NTPDase3

Im Westernblot konnte die NTPDase3 in Pankreas (Bauchspeicheldrüse), Dünndarm (Intestitium tenue), Samenleiter (Vas deferens), Prostata (Vorsteherdrüse) und Nebenhoden (Epididymidis) nachgewiesen werden. Die NTPDase3 könnte in diesen Geweben an verschiedenen nichtneuronalen Prozessen eine Rolle spielen.

5.9.2.1 Modulation purinerg regulierter Epithelfunktionen

Purinerge Modulation des epithelialen Ionentransports ist vielfach beschrieben (Leipziger, 2003; Bucheimer et al., 2003). Im Vas deferens scheint Adenosin an der Regulation des K⁺-Transportes (Phillips et al., 2002) und Cl⁻-Transportes (Sedlacek et al., 2001; Carlin et al., 2002) beteiligt zu sein. Dieses Adenosin könnte durch Abbau von ATP durch plasmamembranständige E-NTPDasen, wie der NTPDase3, und Nukleosidmonophosphat-abbauenden Enzymen bereitgestellt werden.

In den Epithelien von Prostata (Slater et al., 2000) und Nebenhoden (Shariatmadari et al., 2003) wurden P2-Rezeptoren lokalisiert, deren Rolle im Zusammenhang von Apoptose (Slater et al., 2000) und epitheliale Ionentransport (Shariatmadari et al., 2003) diskutiert wird.

Nukleotid-vermittelte Signale sind im Dünndarm am Chlorid-Transport durch das Darmepithels beteiligt. Luminal appliziertes ATP, UTP oder UDP bewirken im Jejunum (Leerdarm) eine verstärkte Chlorid-Sekretion (Cressman et al., 1999). Knock-out-Mäuse zeigen eine Beteiligung des P2Y₄ – Rezeptors an der Regulation der Chloridsekretion im Jejunum (Robaye et al., 2003). Weiterhin kann der Cl⁻-Transport in T84, einer Darmepithel-Zelllinie, durch Adenosin via A_{2b}-Rezeptoren gefördert werden (Strohmeier et al., 1995; Crane et al., 2002).

Über eine Beteiligung von Ekto-Nuklotidasen an epithelialen Funktionen innerhalb dieser Geweben gibt es keine Daten. E-NTPDasen werden jedoch auch in anderen Epithelien exprimiert (Sévigny et al., 2002; Dranoff et al., 2002) und die purinerge Regulation von Ionentransport-Vorgängen (Leipziger, 2003; Bucheimer et al., 2003)

sowie die Beteiligung von Purino-Rezeptoren und Ekto-Nukleotidasen bei apoptotischen Prozessen (Wiendl et al., 1998; Schrier et al., 2002; Wang et al., 2004) sind mehrfach beschrieben.

5.9.2.2 NTPDase3 ist möglicherweise an der Regulation endo- und exokriner Drüsenfunktionen im Pankreas beteiligt

Im Pankreas findet sich sowohl endokrines Drüsengewebe (Langerhans-Inseln), als auch exokrines Drüsengewebe, welches den Bauchspeichel produziert. Die Zellen der Acini sekretieren die Enzyme des Verdauungssaftes. Vom Lumen des Acini wird das Sekret über die Pankreas-Gänge Richtung Darm geleitet. Dabei wird der Pankreas-Saft von den Epithelien der Pankreas-Gänge durch HCO_3^- -Sekretion auf einen alkalischen pH gebracht. Purinerge Signale spielen bei diesen Sekretionsvorgängen eine Rolle. Die Verdauungsenzym-produzierenden Acini-Zellen speichern ATP in zymogenen Granula und setzen es unter cholinergem Stimulation frei (Sorensen et al., 2001; Novak, 2003). Die Acini-Zellen selbst exprimieren aber nur zu einem geringen Anteil (15 %) P2X und P2Y-Rezeptoren (Novak et al., 2002). In den Pankreas-Gängen (pancreatic ducts) dagegen werden metabotrope (P2Y₂, P2Y₄) sowie ionotrope (P2X₄, P2X₇) Purino-Rezeptoren exprimiert (Hede et al., 1999; Luo et al., 1999). Luminal appliziertes ATP oder UTP fördern Flüssigkeits- und HCO_3^- -Sekretion, während basolateral appliziertes ATP oder UTP einen negativen Effekt auf die Sekretion haben (Ishiguro et al., 1999). Der luminal lokalisierte P2X₇-Rezeptor kann dabei Einfluß auf den intrazellulären pH-Wert (Hede et al., 1999; Henriksen et al., 2002) und die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration (Lou et al., 1999; Hede et al., 1999) ausüben. Ein intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg aktiviert Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanäle (Zsembery et al. 2000), die den Chlorid-Gradienten aufrechterhalten, welchen die $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter nutzen. Von einigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Anionen Austauschern ist bekannt, daß sie über den zytosolischen pH-Wert reguliert werden (Alper et al., 2001). Zusammenfassend erscheint es wahrscheinlich, daß luminales ATP als autokriner oder parokriner Mediator im exokrinen Pankreas dient. Die basolaterale Wirkung von ATP und UTP legen auch auf dieser Seite eine parakrine oder synaptische Signal-Funktion durch Nukleotide nahe. Eine Beteiligung von E-NTPDasen bei der Regulation der purinergen Signale ist sehr wahrscheinlich. Membranfraktionen des Schweine-Pankreas (Sévigne et al., 1998) und Protein-Präparationen aus dem Pankreas der Maus (Kittel et al., 2004) zeigen ATPase- und

ADPase-Aktivität. Im Bauchspeichel der Ratte konnte eine ATPase-Aktivität festgestellt werden, die nicht von Inhibitoren der Na^+ , K^+ - ATPase oder der alkalischen Phosphatase beeinflusst wird, und zumindest teilweise auf eine sekretierte Form der NTPDase1 zurückzuführen ist (Sorensen et al., 2003). Im Gegensatz zum Menschen (Kittel et al., 2002; Kórdaz et al., 2004) und Mehrschweinchen (Kórdaz et al., 2004) zeigen Ratten eine starke histochemische ATPase-Reaktion in den Acini und Pankreas-Gängen (Kórdaz et al., 2004). Immunfluoreszenz-Aufnahmen des Ratten-Pankreas konnten die NTPDase1 in der luminalen Membran der kleinen Pankreas-Gänge und in der basolateralen Membran größerer Gänge sowie der basolateralen Membran und Granula-reichen Regionen der Acinus-Zellen lokalisieren (Sorensen et al., 2003). In der Maus konnte weiterhin die NTPDase2 in der Basalmembran der Acini lokalisiert werden (Kittel et al., 2004). E-NTPDasen spielen also sehr wahrscheinlich eine Schlüsselrolle bei der Regulation purinerger Signale im exokrinen Pankreas. NTPDase3 könnte bei dieser Regulation in Kooperation mit der NTPDase1 und 2 beteiligt sein.

Der endokrine Pankreas wird durch die Langerhans-Inseln repräsentiert, die die Zuckerhaushalts-regulierenden Hormone Insulin und Glucagon produzieren. Hauptregulator der Insulin und Glucagon-Produktion ist Glykose. Die Insulin-produzierenden β -Zellen stellen den größten Teil der Insel-Zellen dar (Übersicht bei Kulkarni, 2004). ATP verstärkt über P2-Rezeptoren die Insulin-Ausschüttung (Fischer et al., 1999; Fernandez-Alvarez et al., 2001; Chevassus et al., 2002). Weiterhin ist ATP in den sekretorischen Granula enthalten (Leitner et al., 1975) und wird von β -Zellen sekretiert (Hazama et al., 1998). Eine ATPase-Aktivität läßt sich histochemisch auf den β -Zellen nachweisen (Kittel et al., 2002). Ebenso konnten auf den Glucagon-produzierenden alpha-Zellen P2-Rezeptoren, speziell der P2X_7 -Rezeptor gefunden werden (Coutinho-Silva et al., 2001). Möglicherweise übt die NTPDase3 eine regulierende Funktion auf autokrine purinerge Signale im endokrinen Pankreas aus.

5.9.3 NTPDase3 wird in PC12-Zellen, einem Modellsystem für Neuronen, exprimiert

PC12-Zellen wurden aus einem Pheochromocytoma-Tumor der Nebenniere isoliert (Greene et al., 1976). Die Nebenniere ist eine der Niere angegliederte endokrine Drüse, welche in der Rinde Steroidhormone produziert, während im im Nebennierenmark die

Botenstoffe Adrenalin und Noradrenalin ausgeschüttet werden (Faller, 1995). Das Nebennierenmark wird von präganglionären Fasern des Sympathikus innerviert (Trepel, 2004), die auf die Adrenalin-ausschüttenden chromaffinen Zellen projizieren (Leviatan et al., 1997). Nebennierenmark und sympathische Neuronen entstammen denselben Vorläuferzellen (Leviatan, 1997; Fujita et al., 1989). Die aus einem Nebennieren-Tumor isolierten PC12-Zellen benötigen im Gegensatz zu Neuronen kein NGF zum Überleben, stellen jedoch unter NGF-Einfluss die Zellteilung ein und bilden neuritenähnliche Fortsätze aus (Greene et al., 1976). PC12-Zellen besitzen chromaffinen Zellen und sympathischen Neuronen ähnliche Granula mit verschiedenen Neurotransmittern, wie Catecholaminen, ATP und Acetylcholin (Greene et al., 1976; Fujita et al., 1989; Leviatan et al., 1997). Der NGF-induzierten morphologischen Veränderung liegen umfassende Veränderungen des Zell-Metabolismus zugrunde, darunter die verstärkte Expression verschiedener Rezeptoren und Ionenkanälen sowie damit verbundener elektrischer Erregbarkeit. Die NGF-induzierte Differenzierung der PC12-Zellen gleicht die Eigenschaften der Zelle einem sympathischen Neuron an und verleiht ihnen sogar die Fähigkeit funktionelle Synapsen auszubilden (Übersicht bei Fujita et al., 1989). Wegen der Kombination aus der guten Handhabbarkeit einer Tumor-Zelllinie und den neuronähnlichen Eigenschaften NGF-differenzierter PC12-Zellen wurde diese Zelllinie zu einem Modellsystem für die neuronale Differenzierung.

Zusätzlich zur NGF-Wirkung wird ein purinerges Einfließen auf die Differenzierung von PC12-Zellen diskutiert. cAMP-Analoga (Gunning et al., 1981), Adenosin (Gysber et al., 1996a; Cheng et al., 2002), Guanosin (Gysber et al., 1996a; Gysber et al., 1996b) und GTP (Gysbers et al., 1996a; Gysbers et al., 2000) fördern synergistisch NGF-induziertes Neuritenwachstum. Anhaltende Stimulation von NGF in Kombination mit cAMP kann sogar zu einer irreversiblen Differenzierung führen (Michael et al., 1995; Lambeng et al., 1999; Lambeng et al., 2001). Im Einklang damit führt die Inhibition von P2-Rezeptoren zur Inhibition der NGF-induzierbaren Neuritenbildung (D'Ambrosi, 2000).

Eine Regulation der purinergen Signale durch E-NTPDasen liegt nahe. Eine Inhibition der von PC12-Zellen exprimierten Ekto-5'-Nukleotidase wirkt sich negativ auf die Neuritenbildung aus (Heilbronn et al., 1995a, Heilbronn et al., 1995b). Die Ekto-5'-Nukleotidase hydrolysiert jedoch nur Nukleosidmonophosphate. Plasmamembranständige E-NTPDasen können autokrin oder parakrin freigesetztes NTP zu NMP

hydrolysieren. Die Expression von NTPDase1 und 2 wurde in PC12-Zellen nachgewiesen (Kegel et al., 1997; Vollmayer et al., 2001). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die NTPDase3 ebenfalls von PC12-Zellen exprimiert wird. Sowohl die NTPDase1 und 2 (Vollmayer et al., 2001) als auch die NTPDase3 (diese Arbeit) ist zellulär auf der Plasmamembran lokalisiert. Die Oberflächenaktivität der PC12-Zellen zeigt ein ATPase:ADPase-Verhältnis von 3,6:1 (Vollmayer et al., 2001) was in guter Annäherung der in dieser Arbeit ermittelten ATPase:ADPase-Verhältnisses der NTPDase3 entspricht. Für den Befund, daß NTPDase1, 2 (Vollmayer et al., 2001) und 3 (diese Arbeit) sowohl mit als auch ohne NGF-Stimulation exprimiert werden lassen sich verschiedene Gründe anführen. Zum einen sind die NGF-induzierten Änderungen zumindest teilweise transkriptionsunabhängig, d.h. die mRNA liegt schon vor der Stimulation bereit (Fujita et al., 1989), zum anderen sind inhibitorische Wirkungen von ADP und ATP über P2Y-Rezeptoren auf die Sekretion in PC12-Zellen (Vartian et al., 2001; Lechner et al., 2004) und den ursprünglichen chromaffinen Zellen (Lim et al., 1997; Hernández-Gijo et al., 1999) beschrieben. Möglicherweise sind purinerge Signale also bei den meisten oder allen Differenzierungsmöglichkeiten der PC12-Zellen relevant.

5.9.4 Mögliche Funktionen der NTPDase3 in neuronalem Gewebe

5.9.4.1 Beteiligung an der Regulation Nukleotidvermittelter Prozesse im Darm

Im Westernblot konnte ein NTPDase3-Signal in Dünndarm (Intestitium tenue) lokalisiert werden. Auch im humanen Dünndarm wurde die NTPDase3-mRNA im Northern-Blot nachgewiesen werden (Chadwick et al., 1998). Der Dünndarm dient der Resorption von Nährstoffen aus den Darmlumen und wird weitgehend über das enterische Nervensystem (ENS) gesteuert. Das ENS besteht aus verschiedenen Nervengeflechten (Plexus), die sich in der Darmwand befinden. Der Plexus myentericus liegt zwischen Ringmuskulatur und Längsmuskulatur und in ihm befinden sich sensorische Neuronen, Interneuronen und Motor-Neuronen der Ring- und Längsmuskulatur die jeweils verschiedene Neurotransmitter-Kombinationen verwenden (Costa et al., 1996; Brookes, 2001). Die Interneuronen nehmen Signale von den lokalen sensorischen

Neuronen auf und projizieren ihrerseits auf andere Interneurone und exzitatorische oder inhibitorische Motorneuronen (Übersicht bei Bornstein et al., 2004; Brookes, 2001). Das Meerschweinchen-Ileum ist ein gut untersuchtes Modell für die ENS-Funktionen, wobei eine purinerge Beteiligung an exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (EPSP's) in 20% aller Neurone des Plexus myentericus zu beobachten ist (Nurgalli et al., 2003). Neben verschiedenen anderen Neurotransmittern wurde auch ATP als schneller Neurotransmitter identifiziert (Galligan et al., 1994; LePard et al., 1997). Intrinsische sensorische Neuronen (IPAN's) des Plexus myentericus detektieren chemische und mechanische Bedingungen im Darm und vermitteln sie an die Inter- und Motorneurone des Plexus myentericus weiter (Clerc et al., 2004; Furness et al., 2004; Kunze et al., 1997). Aus sensorischen Reizen basierende Kontraktion und Relaxation der Darmmuskulatur stellt einen wichtigen Bestandteil der Darmperistaltik dar (Waterman et al., 1994). IPAN's reagieren über P2X-Rezeptoren sowohl an ihren Nervenendigungen in der Mucosa als auch an ihrem im Plexus myentericus liegenden, Soma auf ATP schütten jedoch selbst kein ATP aus (Bertrand et al., 2002). ATP dient als schneller Neurotransmitter zwischen Interneuronen (Spencer et al., 2000; Monro et al., 2002) und an inhibitorischen Motor-Neuronen (Bian et al., 2000; Furness et al., 2004), welche zur Relaxation der Darmmuskulatur führen. Die Longitudinalmuskulatur selbst kann letztendlich über P2Y-Rezeptoren zur Kontraktion angeregt werden (Matsuo et al., 1997). Auch in der Ratte konnte in verschiedenen Darmbereichen eine Beteiligung von ATP bei der Relaxation der Longitudinalmuskulatur gezeigt werden (Waseda et al., 2005). Ebenso ist Adenosin als Modulator des Darmreflexes via P1-Rezeptoren beschrieben (Stor et al., 2002) und dient in der Darmmuskulatur als präsynaptischer Modulator der Acetylcholin-Ausschüttung (Nitahara et al., 1995).

Sowohl ATPase als auch ADPase-Aktivität sind im Darm zu finden (Sévigny et al., 1998), darunter auch eine starke Ekto-ATPase-Aktivität an Nervenendigungen in der glatten Muskulatur des Darms (Nitahara et al., 1995). Im Zusammenhang mit dem großen Anteil von purinergem Ko-Transmission im ENS, lässt das eine Beteiligung von NTPDasen an der neuronalen Kommunikation im Darm vermuten. Ein Vertreter der Familie, die NTPDase2, konnte bereits auf Gliazellen des ENS lokalisiert werden (Braun et al., 2004). Die NTPDase3 ist ein Kandidat für die Termination schneller purinergem Signale und der Bereitstellung von modulierendem Adenosin im ENS.

5.9.4.2 Mögliche Beteiligung der NTPDase3 an der Regulation Nukleotid-vermittelter Prozesse im Genitaltrakt der Ratte

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Expression der NTPDase3 in Nebenhoden, Vas deferens und Prostata gezeigt werden. Übereinstimmend mit den Westernblot-Ergebnissen dieser Arbeit wurde in der Prostata des Menschen NTPDase3-mRNA nachgewiesen (Chadwick et al., 1998). Die NTPDase3 könnte bei verschiedenen Prozessen in diesen Geweben mitwirken.

Der Samenleiter (Vas deferens) ist ein gut beschriebenes Beispiel purinerger Neurotransmission. Das röhrenförmige Organ ist mit glatter Ring- und Längsmuskulatur ausgestattet, die das Spermia von den Nebenhoden in die Harnröhre transportiert. Die die Muskulatur innervierenden Nerven verwenden primär ATP und Noradrenalin als Neurotransmitter (Übersicht bei Dixon et al., 1998). Die Muskulatur des Vas deferens reagiert bei neuronaler Stimulation mit einer biphasischen Kontraktion. ATP ist dabei für die erste, schnelle Phase der Reaktion verantwortlich; Noradrenalin bewirkt die langsamere, tonische Phase (Kennedy et al., 1997; Westfall et al., 2002). Die ATP-abhängige Stimulation der Muskeln wird durch P2X₁-Rezeptoren der glatten Muskulatur vermittelt (Liang et al., 2001; Mulryan et al., 2000).

Interessanterweise werden am Vas deferens des Merschweinchens bei der Transmitter-Ausschüttung auch lösliche Ekto-Nukleotidasen sekretiert (Todorov et al., 1997; Kennedy et al., 1997; Mihaylova-Todorova et al., 2001). Durch diese Ekto-Nukleotidasen wird ATP über ADP und AMP zu Adenosin abgebaut (Todorov et al., 1997, Mihaylova-Todorova et al., 2002). Die K_M-Werte für die ATPase und ADPase-Aktivität liegen im µmolaren Bereich und beide Aktivitäten sind abhängig von Ca²⁺ oder Mg²⁺ (Mihaylova-Todorova et al., 2002; Ghildyal et al., 2004). Inhibitoren gegen Na⁺/K⁺-ATPase, H⁺-ATPase, alkalische Phosphatasen (Mihaylova-Todorova et al., 2002; Ghildyal et al., 2004) sowie NPP's (Ghildyal et al., 2004) zeigten keinen Effekt auf die Aktivität. Inhibitoren der E-NTPDasen wie Suramin (Todorov et al., 1997) oder ARL 67156 (Mihaylova-Todorova et al., 2002, Ghildyal et al., 2004) dagegen reduzieren die ATPase-Aktivität. Die AMP-Hydrolyse ist wahrscheinlich auf die ebenfalls sekretierte Ekto-5'-Nukleotidase zurückzuführen (Mihaylova-Todorova et al., 2002). Das ATPase:ADPase-Verhältnis von 2:1 (Mihaylova-Todorova et al., 2002) und die Akkumulation von ADP während der Hydrolyse (Todorov et al., 1997; Mihaylova-

Todorova et al., 2002) sprechen für eine mögliche Beteiligung der NTPDase3 oder der NTPDase8, bzw. einer Kombination verschiedener E-NTPDasen. Obwohl alle E-NTPDasen Transmembrandomänen besitzen, sind von verschiedenen Familienmitglieder lösliche Formen bekannt (Mulero et al., 1999; Sorensen et al., 2003).

Auch das fibromuskuläre Stroma der Prostata (Vorsteherdrüse) wird über P2X₁-Rezeptoren durch ATP als exzitatorischem Neurotransmitter erregt (Ventura et al., 2003). Neben der Muskulatur der Prostata (Lee et al., 2000; Slater et al., 2000) konnten auch in der Muskulatur der Nebenhoden (Lee et al., 2000) P2X₁-Rezeptoren immunhistologisch nachgewiesen werden. Das legt eine purinerge neuromuskuläre Transmission und die bereits vom Vas deferens bekannte Beteiligung von Ekto-Nukleotidasen für die Funktion der Prostata und der Nebenhoden nahe.

Weiterhin ist im Vas deferens eine presynaptische Regulation der Transmitter-Ausschüttung durch ATP (Queiroz et al. 2003a) sowie seines Abbauproduktes Adenosin (Queiroz et al., 2002; Queiroz et al., 2003b; Queiroz et al., 2004) beschrieben. Auch an der Modulation der Transmitter-Ausschüttung wirken wahrscheinlich Ekto-Nukleotidasen mit, da der Ekto-Nukleotidase-Inhibitor ARL 67156 (Crack et al. 1995) die Transmitterausschüttung fördert (Queiroz et al. 2003a).

5.9.4.3 Mögliche Beteiligung an der Regulation Nukleotidvermittelter Prozesse im zentralen Nervensystem

Neben dem Rückenmark (Medulla spinalis) konnte per Westernblot ein NTPDase3-Band in verschiedenen Hirnteilen (Medulla oblongata, Pons, Mesencephalon, Diencephalon, Hippocampus, cerebraler Cortex, Bulbus olfactorius) sowie der Hypophyse der Ratte nachgewiesen werden.

5.9.4.3.1 Rückenmark

In Synaptosomen-Präparationen des Rückenmarks wurde die Nukleotidase-Aktivität unter verschiedenen Bedingungen bzw. Altersstufen bestimmt und zeigte größtenteils ATPase:ADPase-Verhältnisse von 3:1 bis 6:1 (Torres et al., 2002; Torres et al., 2003; Bruno et al., 2005) Diese ATPase:ADPase-Verhältnisse lassen sich gut mit der in dieser Arbeit gemessenen ATPase:ADPase-Verhältnis der NTPDase3 in Übereinstimmung bringen und sprechen für die Möglichkeit einer NTPDas3-Aktivität in Neuronen des Rückenmarks. Das Enzym könnte an der Modulation verschiedener neuronaler

Prozessen beteiligt sein.

Es liegen viele Evidenzen für eine maßgebliche purinerge Beteiligung an der Schmerzwahrnehmung vor. Schmerz-Signale werden von den sensorischen Neuronen über die Spinalganglien ins Rückenmark und das Gehirn gesendet (Übersicht bei Millan, 1999). Extrazelluläres Adenosin (Sawnok, 1998) und ATP (Burnstock, 2000; Burnstock et al., 1996) sind dabei auf verschiedenen Ebenen der Schmerzwahrnehmung beteiligt. Im Hinterhorn des Rückenmarks enden afferente Fasern aus dem peripheren Nervensystem und auf die Lamina II im Hinterhorn des Rückenmarks projizieren viele Neuronen der Schmerzwahrnehmung (Trepel, 2004). In diesem Bereich sind Endigungen afferenter Fasern mit präsynaptischen P2X₃-Rezeptoren (Vulchanova et al., 1998; Llewellyn-Smith et al., 1998) zu finden. Die präsynaptischen Rezeptoren verstärken die Ausschüttung von Glutamat (Gu et al., 1997; Gu et al., 1998; Nakatsuka et al., 2001; Nakatsuka et al., 2003) und Glycin (Rhee et al., 2000; Jang et al., 2001). Für eine Beteiligung von E-NTPDasen an der Modulation spricht eine Verstärkung der ATP-Wirkung in Anwesenheit des Ekto-Nukleotidase-Inhibitor AR67156 (Nakatsuka et al., 2001). Weiterhin scheint ATP bei einer kleinen Population (< 5 %) von Lamina II – Neuronen als schneller Neurotransmitter zu fungieren (Bardoni et al., 1997). Neben der verstärkten Neurotransmitter-Ausschüttung über P2X-Rezeptoren wird auch über eine Inhibition der langsamen Depolarisation von Neuronen der Substantia gelatinosa via P2Y-Rezeptoren berichtet (Yoshida et al., 2002).

Abgesehen von der neuronalen Modulation sind purinerge Signale wahrscheinlich Mediatoren bei glialen Kalziumwellen im Rückenmark (Scemes et al., 2000; Suadicani et al., 2003). Weiterhin sind Purin-Rezeptoren an der Mikroglia-Aktivierung im Zentralnervensystem involviert (Inoue et al., 2002; Inoue et al., 2004), die in Zusammenhang mit pathologischen Effekten, wie neuropathischen Schmerz, steht. Die Modulation der Mikroglia-Aktivierung wird sehr wahrscheinlich durch die NTPDase1 bewirkt, da diese hauptsächlich für die Nukleotidase-Aktivität von Gliazellen verantwortlich ist (Braun et al., 2000b; Braun et al., 2001).

5.9.4.3.2 Hirnstamm

Neben dem Rückenmark sind auch Regionen des Gehirns an der Schmerzwahrnehmung beteiligt. Im Locus coeruleus der Pons ist ATP ein Kotransmitter noradrenerger

Neuronen (Poelchen et al., 2001) und kann Neuronen des Locus coeruleus über P2Y-Rezeptoren (Shen et al., 1993) und P2X-Rezeptoren (Sansum et al., 1998) erregen. Fukui et al. (2004) postulierten eine ATP-vermittelte Beteiligung von Neuronen des Locus coeruleus in der Schmerzwahrnehmung.

Weitere lebenswichtige Funktionen, die im Hirnstamm reguliert werden, sind Atmung und Kreislauf (Trepel, 2004). Der Hirnstamm wird von der Medulla oblongata (verlängertes Mark), der Pons (Brücke) und dem Mesencephalon (Mittelhirn) gebildet (Trepel, 2004). Das Atemzentrum, das größtenteils in der Medulla oblongata lokalisiert ist, besitzt inspiratorische und respiratorische Neuronen, die abwechselnd Motorneurone der Atemmuskulatur aktivieren und selbst von chemosensorischen Neuronen (O₂/CO₂-Detektion) reguliert werden (Trepel, 2004; Nattie, 1999).

Neben den peripheren Chemorezeptoren im Glomus caroticum befinden sich auch im Hirnstamm selbst chemosensorische Neuronen (Ballentyne et al., 2000; Nattie 1999) und ATP ist möglicherweise einer der wichtigsten Signalstoffe der chemosensorischen Transduktion (Übersicht bei Spyer et al., 2004). Im Glomus caroticum, ist ATP wahrscheinlich Cotransmitter für chemosensorische Signale an afferente Neuronen (Prasad et al., 2001; Nurse et al., 2001; Zhang et al., 2004) und auch im Stammhirn lässt die weit verbreitete Expression verschiedener P2X-Rezeptoren auf eine wesentliche Rolle als Neurotransmitter schließen (Kanjhan et al., 1999; Thomas et al., 2001; Yao et al., 2000; Yao et al., 2001). Dafür sprechen auch die Hypoxie-induzierbare ATP-Ausschüttung in der Medulla oblongata (Gourine et al., 2005) sowie der Einfluß von ATP und ATP-Analoga auf Neuronen der Atmungskontrolle (Thomas et al., 2000; Thomas et al., 2001). Weiterhin steigert ATP bei direkter Applikation in die venterolaterale Medulla den Blutdruck und die Herzfrequenz (Thomas et al., 2001). Durch ATP-Abbau entstehendes Adenosin scheint an der Modulation von kardiovaskulären und respiratorischen Reaktionen beteiligt zu sein (Spyer et al., 2000; Gourine et al., 2002).

5.9.4.3.3 Cerebellum

Das Cerebellum (Kleinhirn) zeigte im Westernblot nur ein schwaches Signal, was allerdings auch an präparativen Schwankungen liegen könnte. Die stärkste Expression von P2-Rezeptoren findet sich in Purkinje-Zellen (Kanjhan et al., 1999; Rubio et al.,

2001) auf denen postsynaptische, exzitatorische P2X_{2,4,6}-Rezeptoren lokalisiert werden konnten (Rubio et al., 2001; Collo et al., 1996) und extrazelluläres ATP exzitatorische und inhibitorische synaptische Inputs moduliert (Brockhaus et al., 2004). Unter dem Einfluß des Ektonukleotidase-Inhibitors ARL67156 wird die Frequenz der synaptischen Inputs erhöht (Brockhaus et al., 2004), was für eine Beteiligung von E-NTPDasen spricht.

5.9.4.3.4 Diencephalon und Hypophyse

Im Diencephalon (Zwischenhirn) und der Hypophyse (Hirnanhangdrüse) sind verschiedene purinerge Signale beschrieben. Im Hypothalamus (Sperlágh et al. 1998) und in der medialen Habenula (Sperlágh et al., 1997; Robertson et al., 1998) wird ATP als Kotransmitter ausgeschüttet und dient in der Habenula als schneller Neurotransmitter (Edwards et al., 1993; Sperlágh et al., 1995). Eine membranständige ATPase und ADPase-Aktivität konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Sperlágh et al., 1995).

Die Neuronen des Nucleus supraopticus und des Nucleus paraventricularis im Hypothalamus produzieren das antidiuretische Hormon Vasopressin sowie Oxytocin und setzen diese über die Neurohypophyse frei (Trepel, 2004; Faller, 1995). Die Neuronen der beiden Nuclei werden von den Neuronen der CA1-Gruppe der Medulla oblongata innerviert, die ATP als Transmitter benutzen (Smith et al., 1995; Buller et al., 1996). Sowohl im Hypothalamus als auch in der Hypophyse wurde die Expression verschiedener P2X-Rezeptoren nachgewiesen (Loesch et al., 1999; Shibuya et al., 1999, Yao et al. 2000) und an die Nuclei appliziertes ATP verstärkt synergistisch mit Noradrenalin die Vasopressin- und Oxytocin-Ausschüttung (Kapoor et al., 2000; Kapoor et al., 2001). Auch an den Nervenendigungen der neurosekretorischen Zellen in der Hypophyse bewirkt ATP eine verstärkte Hormonausschüttung (Troadek et al., 1998; Troadek et al., 2002). Weiterhin reagieren spezialisierte Astrozyten der Neurohypophyse (Pituizyten), wahrscheinlich über P2Y-Rezeptoren, mit einer Erhöhung intrazellulären Kalziums (Troadek et al., 1999; Troadek et al., 2000). Eine Regulation durch Ektonukleotidasen, möglicherweise durch die NTPDase3, scheint wahrscheinlich. In der Hypophyse, in der nach Westernblot-Analysen dieser Arbeit ein vergleichsweise starkes NTPDase3-Band zu sehen ist, wird extrazelluläres ATP zu ADP und AMP abgebaut (Sperlágh et al., 1999). Die ATPase-Aktivität ist an der Plasmamembran zu finden und

teilt Charakteristika der E-NTPDase-Familie, wie Abhängigkeit von Mg^{2+} oder Ca^{2+} und Insensitivität gegen verschiedene P, V, und F-Typ ATPase-Inhibitoren (Thirion et al., 1996). Extrazelluläres Adenosin wirkt in der Neurohypophyse inhibierend auf die Hormonausschüttung (Wang et al., 2002).

5.9.4.3.5 Hippocampus

Der Hippocampus ist maßgeblich an Lernvorgängen (Davidson et al., 2004; Eichenbaum, 2004) und Gedächtnisprozessen (Squire, 2004; Schimanski et al., 2004; Sokolov et al., 2004) beteiligt. P2-Rezeptoren sind im Hippocampus sowohl auf Neuronen (Sperlágh et al., 2002; Rubio et al., 2001; Kawamura et al., 2004) als auch auf Astrozyten (Koizumi et al., 2002; Zhu et al., 2001; Zhu et al., 2004) zu finden. ATP moduliert im Hippocampus über präsynaptische P2X₇-Rezeptoren (Armstrong et al., 2002; Sperlágh et al., 2002; Papp et al., 2004) die Transmitterausschüttung, agiert über postsynaptische P2X_{2,4,6}-Rezeptoren (Rubio et al., 2001) als schneller Neurotransmitter (Mori et al., 2001; Pankratov et al., 1998) und ist am Prozess der Long Term Potentiation (LTP) beteiligt (Pankratov et al., 2002; Fujii, 2003; Wang et al., 2004b). In synaptischen Membranen des Hippocampus wurde ATPase- und ADPase-Aktivität wurde (Bonan et al., 2000; Cunha, 2001; Nedelkovic et al., 2003; Rücker et al., 2005) und eine Reduktion von 30 % (ATPase) bzw. 42 % (ADPase) der Nukleotidase-Aktivität bei Lernvorgängen (Bonan et al., 2000), läßt eine Beteiligung von Ektonukleotidasen bei Prozessen synaptischer Plastizität vermuten. Bei einem ATPase:ADPase-Verhältnis von 2:1 (Nedelkovic et al., 2003; Rücker et al., 2005) in den synaptischen Membranen des Hippocampus, könnte eine Kombination von NTPDase1 und NTPDase3 für den Abbau von ATP verantwortlich sein.

5.9.4.3.6 Striatum

ATP verstärkt im Nucleus accumbens, einem Kerngebiet des Striatums, über P2-Rezeptoren die Ausschüttung von Dopamin (Zhang et al., 1995; Krügel et al., 1999, 2001), während Adenosin einen gegensätzlichen Effekt hat (Krügel et al., 2003). Adenosin ist ein häufig beschriebener, meist inhibitorisch wirkender Neuromodulator im ZNS (Übersicht bei Dunwiddie et al., 2001). Im Striatum bewirkt Adenosin über Adenosin-Rezeptoren (Dunwiddie et al., 2001; Rosin et al., 1998; Rosin et al., 2003) eine Modulation des Neurotransmitters GABA (Mayfield et al., 1999; Mori et al., 2003) und Aktivierung neuronaler Genexpression (Schiffmann et al., 2003). Die ATPase- und

ADPase-Aktivität der Synaptosomen des Striatums, im Verhältnis 1:3 bis 1:4 (Lara et al., 2001; da Silva et al., 2003) spricht für Beteiligung der NTPDase3 am Abbau des Neuromodulators ATP. In Kombination mit der 5'-Ektonukleotidase (Lara et al. 2001, da Silva et al. 2003) und Nukleosid-Transportern (Anderson et al. 1999, Baldwin et al. 2004) könnte die NTPDase3 auch zur Regulation des extrazellulären Adenosinspiegels beitragen.

5.9.4.3.7 Bulbus olfactorius

Im Bulbus olfactorius (Riechhirn) findet die Verschaltung der Axone der olfaktorischen Sinneszellen des Riechepithels statt (Treppel, 2004). Das Riechhirn zeigt eine starke Expression von P2X₂- (Kanjhan et al., 1999) und P2X₄- (Le et al., 1998; Collo et al., 1996) Rezeptoren. Die prä- wie auch postsynaptische Lokalisation des P2X₄-Rezeptors (Le et al., 1998) spricht für eine Funktion von ATP als Neuromodulator und schnellem Neurotransmitter im Bulbus olfactorius. Eine neuromodulatorische Funktion von ATP wurde bereits für die olfaktorischen Neuronen des Riechepithels berichtet (Hegg et al., 2003; Spehr et al., 2005).

Die NTPDase3 ist ein potentieller Regulator der Neurotransmission chemosensorischer Neuronen des Riechepithels. Ferner wandern in den Bulbus olfactorius neuronale Vorläuferzellen aus der subventrikulären Zone ein und bilden dort auch in adulten Tieren neue Neuronen (Lois et al., 1996; Hatten et al., 2002). Braun et al. (2003) lokalisierten die NTPDase2 in diesen Gebieten der adulten Neurogenese und formulierten die Hypothese, daß E-NTPDasen an der Modulation purinerner Entwicklungs- und Differenzierungssignale beteiligt sein könnten. Möglicherweise spielt die NTPDase3 auch in diesem Zusammenhang eine Rolle.

5.9.4.3.8 Cerebraler Cortex

Neuronen in allen Schichten des cerebralen Cortex (Hirnrinde) zeigen P2X₂-Rezeptor-Immunoreaktivität (Kanjhan et al., 1999). Die Pyramiden-Neuronen der Schichten II und III exprimieren weiterhin P2X₄ (Le et al., 1998; Collo et al., 1996). Extrazelluläres ATP kann an cereberocorticalen Nervenendigungen Ca²⁺-Influx und Depolarisation bewirken (Pintor et al., 1999). In Pyramiden-Zellen des somatosensorischen Cortex dient ATP als schneller exzitatorischer Neurotransmitter (Pankratov et al., 2002b; Pankratov et al., 2003). Bei einem ATPase:ADPase-Verhältnis von 2:1 (Rücker et al.,

2005; Bruno et al., 2005) könnte die im Westernblot ebenfalls nachweisbare NTPDase1 (Nedelkovic et al., 2005) und die NTPDase3 der Beendigung purinerger Neurotransmission im cerebralen Cortex dienen.

5.9.5 Die Ergebnisse der primären Cortex-Kultur als Ausblick auf weitergehende Untersuchungsansätze

In primären Cortex-Kulturen zeigte der NTPDase3-Antikörper eine schwache Markierung an Zellmembran und Ausläufern von Zellen mit neuronähnlichem Erscheinungsbild. Die Markierung war im Präimmenserum nicht zu finden, wirkte jedoch sehr punktuell verteilt. Das könnte eine lokale Konzentrierung in bestimmten Bereichen der Plasmamembran, ähnlich Acetylcholinrezeptor-Clustern der neuromuskulären Synapse (Madhavan et al., 2003; Banks et al., 2003), oder eine artifizielle Präzipitation des Antikörpers bedeuten. Im Hinblick darauf, daß die vorhandenen Antikörper NTPDase3 zwar in Zellkultur und Westernblot nachweisen, jedoch nicht in histologischen Präparaten, sind weitergehende immunzytologische Versuche an Primärkulturen möglicherweise ein erfolgsversprechender Ansatz, die zelluläre Lokalisation und funktionelle Bedeutung der NTPDase3 weiter zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Extrazelluläre Nukleotide fungieren als auto- und parakrine Signalstoffe aus. Im peripheren und zentralen Nervensystem dienen Nukleotide als Neurotransmitter und Neuromodulatoren. Die nahezu ubiquitäre Expression von Purin-Rezeptoren läßt auf umfassende physiologische Funktionen schließen. Nukleotide können über ionotrope P2X-Rezeptoren oder metabotrope P2Y-Rezeptoren ihre Signalwirkung vermitteln. Via P1-Rezeptoren kann Adenosin, ein Baustein bzw. Abbauprodukt von ATP, seine neuromodulatorische und neuroprotektive Wirkung entfalten.

Alkalische Phosphatasen, die Ekto-Nukleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase Familie (NPP-Familie) und die Ekto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase-Familie (E-NTPDasen) können Nukleosiddiphosphate und Nukleosidtriphosphate hydrolysieren. Die E-NTPDasen sind die wahrscheinlichsten Kandidaten für die Modulation purinerger Signale im Nervensystem.

In dieser Arbeit wurde die Klonierung und Charakterisierung der NTPDase3 der Ratte beschrieben. Ein vollständiger cDNA-Klon der NTPDase3 wurde aus einer Rattenhirnbank isoliert, sequenziert und anhand der familientypischen Sequenzmuster (ACR's) als E-NTPDase identifiziert. Die Sequenz enthielt einen offenen Leserahmen der für ein 529 Aminosäuren großes Protein kodierte. Sequenzvergleiche zeigten eine große Ähnlichkeit des Proteins mit den NTPDasen 1, 2 und 8, welche plasmamembranständige Ekto-Enzyme sind. Eine plasmamembranständige Lokalisation konnte in NTPDase3-transfizierten CHO-Zellen und in PC12-Zellen mit endogener NTPDase3-Expression nachgewiesen werden. Anhand von Computeranalysen und Sequenzvergleichen wurden Überlegungen zur Sekundär- und Tertiärstruktur angestellt und Ähnlichkeiten zur Zuckerkinase/ Hitzeschock-Protein 70/Aktin-Superfamilie aufgezeigt. Das Protein war entsprechend der *in silico*-Analyse glykosiliert und ließ sich über das Lektin ConcanavalinA anreichern.

Messungen an Membranfraktionen heterolog transfizierter CHO-Zellen zeigten die Hydrolyse verschiedener Nukleosidtriphosphate und Nukleosiddiphosphate mit einer Präferenz für Nukleosidtriphosphate. Das Enzym ist primär Kalziumabhängig und

arbeitet optimal im physiologischen pH-Bereich von pH 7,5 bis pH 8,0. Mit einem ATPase:ADPase-Verhältnis von 5:1 liegt die NTPDase3 zwischen der NTPDase1 und der NTPDase2. Seine biochemischen Eigenschaften machen das Ekto-Enzym zu einem Kandidaten für die Modulation purinergere Signale. Nukleotid-vermittelte Signale können via Hydrolyse durch die NTPDase3, möglicherweise in Kombination mit anderen E-NTPDasen, beendet werden. Als Bestandteil einer Enzymkette mit der Ekto-5'-Nukleotidase kann das Enzym zur Produktion des neuromodulatorisch und neuroprotektiv wirkenden Adenosins beitragen. Mögliche Rollen bei der Regulation autokriner, parakriner und synaptischer Signale in nichtneuronalen wie neuronalen Geweben wurden für die Gewebe diskutiert, in denen die NTPDase3 per Westernblot nachgewiesen werden konnte. Neben Dünndarm, Prostata, Pancreas, Nebenhoden und Samenleiter wurde ein NTPDase3-Band vor allem im zentralen Nervensystem gefunden. In allen geprüften Hirnteilen (Bulbus olfactorius, Cerebellum, Cortex, Mesencephalon, Diencephalon, Hippocampus, Striatum, Medulla oblongata), dem Rückenmark und der Hypophyse wurde die NTPDase3 im Westernblot detektiert. Das Enzym könnte an der Regulation exokriner Drüsenfunktionen im Pancreas und am epithelalem Ionentransport involviert sein oder auch bei endokrinen Funktionen des Pankreas und der Hypophyse mitwirken. Möglicherweise hat die NTPDase3 funktionelle Bedeutung bei der Termination und Modulation purinergere Neurotransmission im enterischen Nervensystem, im Rückenmark und in verschiedenen Hirnregionen. An verschiedenen zentralnervösen Funktionen, wie Schmerzwahrnehmung, Atmungs- und Kreislauf-Regulation sowie Gedächtnis- und Lernprozessen sind purinerge Signale maßgeblich beteiligt und es ist wahrscheinlich, daß E-NTPDasen an der Modulation dieser Signale mitwirken. Die in dieser Arbeit beschriebene NTPDase3 ist ein viel versprechender Kandidat für die Regulation purinergere Signale im peripheren und zentralen Nervensystem.

7 Anhang

7.1 Sequenz der NTPDase3-cDNA

AGCGAGCGCAGCGCGCAGGTAAGGTCTGGACCGGCGCGCAGGAGTGGGATGGAGCAGCTG
CCGGAGGCTTGAAGCACGGAGAGAAGGACCCGGCACAGCTTCCCACAGAGGACCGCAGGC
TGGAGCCGAAACCCGGGAGCTGGGCACTGTCATCTGACAGGCACAGGACACCGCGTCAC
GAAACGCCCAAGACCTGCAGCTCGGACTGAAGATGTTTACGGTGATGACCCGCCAGCCC
TGTGAACAGGCAGGCTTCAGGGCCCTCTCGAGGACTCCAGCCATCGTACCTTGGTGGTC
CTGCTTGTGAGCATCGTGGTACTTGTGACACTTACACTCATCCAGATCCACCACCCACAG
GTTCTCTCTCCAGGGCTGAAGTATGGAATCGTGTTGGATGCCGGCTCTTCCAGAACCCT
GTCTATGTGTATCAGTGGCCAGCAGAGAAGGAGAATAACACAGGAGTGGTCAGCCAAACC
TTCAGATGTAGTGTGAAAGGCTCGGGAATCTCCAGCTATGAGAATAACCCCAAGATGCC
CCCAAAGCCTTTGAGGACTGCATGCTAAAGGTCAAGGAACAGGTCCCAAAGCATCTCCAC
GAATCCACCCGAGTTTACCTGGGGGCCACAGCTGGGATGCGCTTGCTGAGGTTGCAAAAT
GAGACAGCAGCTCATGAAGTCCTTGAGAGCATCCAAAGCTACTTCAAGTCCCAGCCTTTT
GATTTTAGGGGTGCTCAAATCATTTCTGGGCAAGAGGAAGGGGTGTATGGATGGATTACA
GCCAACTATATAATGGGAAAATTCCTGGAGAAGAACCTGTGGCACATGTGGGTGCACCCG
CACGGAGTAGACACCACAGGAGCCCTGGATTTGGGCGGCGCCTCCACCAGATATCCTTT
GTGTCCGAAGAGAAGATGGAGCCGAACGCCAGCGACACAGTGCAGGTGTCCTTGTACGGC
TACACGTACACTCTCTACACGCACAGTTTCCAGTGCTACGGCCGGAACGAAGCAGAGAAG
AAGTTCCTGGCGATGCTTCTGCAGAGCCCTTCTACAGATGCCAACATCAGCAACCCCTGC
TACCCTCACGGTTACAGCACCACCTTCACAATGGGCCACGTGTTTGGCAGCCTGTGCAGC
GAGAAGCAGAGGCCGAAGAGCTACAACCCAGTGATAACCATCACCTTACAGGAACTGGT
GACCCACAGCTGTGCAGGGAGAAGGTGGCTTCTGTGTTGACTTCAGTGCTTGCCAAGAG
CAAGATGCCTGCTCCTTTGATGGCATTACCAGCCCAAGGTTCAAGGGCCATTTGTGGCA
TTTGCAGGATTCTATTACACAGCCAGTGCCCTAAACCTCTCTGGAAGCTTCTCCCTTACC
TCCTTCAATGACAGCAGCTGGGACTTCTGCAGACACACTTGGAGCGAGCTCCCGTCCCTG
CTCCCCAGATTTGATGAGACGTATGCCCGGTCTACTGCTTCTCAGCTCACTACATCTAC
CACTTGCTCATAAATGGATACAAATTCAGTGGGCAACTTGGCCTCAGATACGGTTTGAA
AAAGAAGTGGGGAATAGCAGCATCGCCTGGTCCCTAGGCTACATGCTCAGCTTGACCAAC
CAGATCCCAGCTGGAAGTCCGCTGATCCAACCTACCATAACAGCCGCGGTGTTTATGGGA
GTCCTGGCCTTCTTACGGCTATCGCCTTGCTGTGCCTGGCATTCTTTTCTATCTATGT
TCAGCATTTAGGACAAAGGAGCGCTCTGAGAATGCCTTTGACCAAGCAGTGGATTCTGAT
TGAATCTTCCAAGCAGCACCTGGGGCCTGAGGCTGCCATAACCCACCAGAGTGACACCAG

GCAGGGAGTGAAGTGGCTGCCACCAGGACCTGTCCCGTGGTTAAATGCCAAGATCACGTG
CCTCTCAGCCACTGGTTCCCTGCTGGAGCACCTCCTGGGAGTCCCTCAGCCACCCAGTGGG
TGTTGCCTCTGCACCCTTCGTACCCGCTTGCTGATCCATTGGAAATCAAGGAGACACTGG
CAGTTGGTGTCAAGGGCTTCACCCTGTCTCCTCCAGAGGATGTTGAGAGTATAATTTAAT
TCGGAAGGATTGACCCAGGCTGGGTTTCCATTTTCTCTCCCTCCGTATTCTCTCTAGCAA
GCTGCCCAGGAAGGCTCTGACTCAGACACTTCACCCTGTAGGTTTGACCTGTAGTTCCTT
TGCAAGGCCTTCCAGTCTTTTAGTTGAGTGGGGCCCTATCTCAAGCCACTGATACTTTCT
CTTAGCAATCTGGTAAGCACTAAGCTCCCTGACTGGTAGCTTGTAGCACTTAGCAGGGAA
GATGATACCTTTTGAGACAGAGTTTCATGTAGCCATTCACTATGTAGCCAAGACCACTC
ACTAAGTAGCTCTTTTCCCTGAGGGCTGCGATTATGGGTTGTGAGGTCCTGGGGGTGGAAC
CCCAGGGCTTCATGTATGCTAGGCAATTATTCGACCAGCCTGAGTCACATGCCCAGCCTA
AGAAGACTCACAGCCCCAAGGACAGACGGCCTCTGTCAATGTAGGCAGAACCTGAAGCACA
AAGCCACACAGGAGTCCCTAAGCTATTAGCTATTCTTATTTTGGAAATGCCCACTTGGAGC
TCTGGTCATGACTTTGCTACTTGGAGTATGTCATCCTTGTGTAAGTGCCTCCCCGCTGTT
CCCTCTTGTAATCGCACCCAGTGGACTGCACCAAGGTGGGAGGTTGGGGGTGGATCCCA
TTGACCTGACAAAGCTCCTGCCCAAGGTGCCTTTGGGCTATAACCATGTCGGCGTGTGCT
TTCTTCCCCTGCTCCCACAGGTATCCAGGATCCTGTCCAAAAACATCCCTACGTTTCT
TCCTGCATAACTGCTTCCCAGCTTGACTTTGGGGAAAGAAAAGGCAGTCTTGGGAATGTT
TGCTTCCAAAGTGGGATGGGAAAGGTCTTCAAACCCAGTAGCTACAAGCGACAAATCAAT
GCTGTGCCTCAAGGCTGGTCGTTGGCTCCATATGGAATAAACTATTATTTTTATTTTGCA
ATATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGG

7.2 verwendete Einheiten

<i>SI-Vorsätze</i>		
G	Giga	10^9
M	Mega	10^6
k	Kilo	10^3
h	Hekto	10^2
da	Deka	10^1
d	Dezi	10^{-1}
c	Zenti	10^{-2}
m	Milli	10^{-3}
μ	Mikro	10^{-6}
n	Nano	10^{-9}
p	Piko	10^{-12}
f	Femto	10^{-15}

Tabelle 23: SI-Vorsätze

<i>SI-Einheiten und abgeleitete Einheiten</i>			
<i>Größe</i>	<i>Grundeinheit</i>	<i>abgeleitete Einheit</i>	<i>Definition</i>
Länge	m (Meter)	Å (Ångström)	$1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$
		l (Liter)	$1 \text{ l} = 1 \text{ dm}^3$
Masse	kg (Kilogramm)	g (Gramm)	$1 \text{ g} = 10^{-3} \text{ kg}$
		Da (Dalton)	$1 \text{ Da} = 1,66 \cdot 10^{-24} \text{ g}$
Zeit	s (Sekunde)	min (Minute)	$1 \text{ min} = 60 \text{ s}$
		h (Stunde)	$1 \text{ h} = 3600 \text{ s}$
		d (Tag)	$1 \text{ d} = 86\,400 \text{ s}$
Temperatur	K (Kelvin)	°C (Grad Celsius)	$\text{Temp.}[^{\circ}\text{C}] = \text{Temp.}[\text{K}] - 273,15$
Elektrizität	A (Ampere)	V (Volt)	$1 \text{ V} = 1 \text{ kg} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{A}^{-1} \cdot \text{s}^{-3}$
		Ω (Ohm)	$1 \text{ Ω} = 1 \text{ kg} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{A}^{-2} \cdot \text{s}^{-3}$
		F (Farrad)	$1 \text{ F} = 1 \text{ A}^2 \cdot \text{s}^4 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{kg}^{-1}$
Radioaktivität		Bq (Becquerel)	$1 \text{ Bq} = 1 \text{ s}^{-1}$
Chemie	mol (Mol)	M (Molar)	$1 \text{ M} = 1 \text{ mol dm}^{-3}$

Tabelle 24: SI-Einheit und abgeleitete Einheiten

<i>Nicht-SI-Einheiten</i>			
<i>Kategorie</i>	<i>Einheit</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Definition</i>
Mengeinheit	% (v/v)	Volumenanteil in %	1 % (v/v) = 1 ml·100 ml ⁻¹
	% (w/v)	Masse pro Volumen in %	1 % (w/v) = 1 g·100 ml ⁻¹
	pfu	Plaque Forming Units	
	Vol	Volumen	
	U	Unit	
Längeneinheit DNA	nt	Nukleotide	
	bp	Basenpaare	
	kb	Kilobasen	10 ³ bp
	Mb	Megabasen	10 ⁶ bp
Längeneinheit Protein	as	Aminosäuren	
Rotations- geschwindigkeit	rpm	Rotationen pro Minute	
Beschleunigung	g _{av}	Erdbeschleunigung	9,8 m/s ²

Tabelle 25: Nicht-SI-Einheiten

7.3 Verzeichnisse

7.3.1 Abkürzungsverzeichnis

2-meSATP	2-methyl-thio-ATP
a, β meATP	α,β -methylen-ATP
ACh	Acetylcholin
ACR	Apyrase Conserved Region (Apyrase konservierte Regionen)
ADP	Adenosindiphosphat
ADPase	Adenosindiphosphatase
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
APES	3-Aminipropyl-trietoxysilan
Ap _n A	Diadenosinpolyphosphate
APS	Amoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderblutserumalbumin)
BzATP	2' und 3'-O-(4-benzoylbenzoyl) ATP
cAMP	cyclic AMP (zyklisches Adenosinmonophosphat)
cDNA	complementary DNA (komplimentäre DNA)
cGMP	cyclic GMP (zyklisches Guanosinmonophosphat)
CIAP	Calf intestine alkaline phosphatase (alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)
CMV	Cytomegalovirus
ConA	ConcavalinA
d.h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Diethylformamid
DNA	Desoxynucleinacid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat

dsDNA	double stranded DNA (doppelsträngige DNA)
DSE	Downstream element (3'-liegendes Sequenzmotiv)
E-NTPDase	Ekto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Natriumsalz
ENS	enterisches Nervensystem
EPSP	exzitatorischen postsynaptische Potentiale
EST	estimated sequence tag (partielle mRNA-Sequenz)
EtBr	Ethidiumbromid
EtBr	Ethidiumbromid
etc	et cetera
EtOH	Ethanol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetal Calf Serum (fötales Rinderserum)
GABA	λ -Aminobuttersäure
H ₂ O _{bidest.}	bidestilliertes Wasser
H ₂ O _{demin.}	demineralisiertes Wasser
H ₂ O _{MilliQ}	MilliQ gefiltertes Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IPAN's	Intrinsische sensorische Neuronen
ITPG	Isopropyl-1-thio- β -galactopyranosid
K _m	Michaelis Menten -Konstante
LB	Luria-Bertani

MCS	multiple cloning site (Klonierungsbereich)
MeOH	Methanol
mRNA	messenger RNA (Botschafter-Ribonukleinsäure)
NDP	Nukleosiddiphosphat
NDPase	Nukleosiddiphosphatase
NGF	Nerve Growth Factor (Nervenwachstumsfaktor)
NMP	Nukleosidmonophosphat
NPP	Ekto-Nukleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase
NTP	Nukleosidtriphosphat
NTPase	Nukleosidtriphosphatase
OD _{xxx}	Optische Dichte bei xxx nm Wellenlänge
Oligo(dT)	Oligodesoxythymidin
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
pBSK(-)	pBlueScript SK(-)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
pfu	Plaque Forming Unit
pH	pH-Wert
Pi	Orthophosphat
PNS	peripheres Nervensystem
PPi	Pyrophosphat
RACE-PCR	Rapid Amplification of cDNA Ends – PCR
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur

SD	standard deviation (Standardabweichung)
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylphosphat)
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
ssDNA	single stranded DNA (einzelsträngige DNA)
TBAHS	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBE	Tris Borat EDTA – Puffer
TdT	Terminale Desoxynukleotid-Transferase
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tet	Tetracylin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
Tm	Schmelztemperatur
TNG	Trans-Golgi-Netzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA (transfer-Ribonukleinsäure)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3.inoyl- β -galactopyranosid
z. Bsp.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

7.3.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Membrantopologie E-NTPDasen	9
Abbildung 2: Lage der EST's, PCR-Fragmente und Sonden	65
Abbildung 3: Klone der 665bp und 324bp PCR-Produkte	66
Abbildung 4: PCR-Ansätze zur Klonierung des fehlenden 5'-Bereichs der NTPDase3	67
Abbildung 5: Test der cDNA-Banken	68
Abbildung 6: Schema der Sequenzierung	69
Abbildung 7: Umklonierung der NTPDase3	70
Abbildung 8: Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz der NTPDase3	71
Abbildung 9: Phylogramm der E-NTPDasen aus Mensch, Maus und Ratte	73
Abbildung 10: partielles Alignment der E-NTPDasen aus Mensch, Maus und Ratte	75
Abbildung 11:Hydrophathie-Blot nach Kyte-Doolittle	76
Abbildung 12: Graph der TMHMM 2.0 -Analyse zur Membrantopologie	77
Abbildung 13: O-Glykosilierungsdiagramm nach NetOGlyc 3.0	78
Abbildung 14: N-Glykosilierungsdiagramm nach NetNGlyc 1.0	79
Abbildung 15: Alignment verschiedener E-NTPDasen im Bereich des konservierten Asn-Xaa-Ser/Thr – Seqouns N81	82
Abbildung 16: Glykosilierungsschema und Cystein-Verteilung	84
Abbildung 17: Vergleich der Sekundärstruktur innerhalb der E-NTPDase-Familie	88
Abbildung 18: Kommentierung der potentiellen Sekundärstruktur.	89
Abbildung 19: Chromosomale Lokalisation und Intron-Exon-Struktur der NTPDase3	91
Abbildung 20: Unterschiedlicher Einfluß von Kalzium und Magnesium	94
Abbildung 21: pH-Optimum unter Mg ²⁺ -und Ca ²⁺ -Einfluß.	96
Abbildung 22: Produktanalyse.	97
Abbildung 23: Vergleich der Hydrolyseraten verschiedener Substrate.	98
Abbildung 24: NTPase:NDPase-Verhältnis	99
Abbildung 25: Test der durch genetische Immunisierung gewonnen Antikörper.	100
Abbildung 26: Antikörpertest auf Kreuzreaktivität.	101
Abbildung 27: NTPDase3-Expression in PC-12 Zellen.	102
Abbildung 28: Ungereinigter und affinitätsgereinigter Antikörper im Vergleich.	103
Abbildung 29: Elutionsprofil der NTPDase3 von ConA-Sepharose.	104
Abbildung 30: Westernblot von verschiedenen Organen.	106

Abbildung 31: Westernblots verschiedener Gewebe des zentralen Nervensystems.	107
Abbildung 32: Test der Peptid-Antikörper 264fb und 265fb.	108
Abbildung 33: Immunzytologie mit N3-1i4.	109
Abbildung 34: Immunzytologie mit N3-2i4.	110
Abbildung 35: Immunzytologie mit N3-3i4.	110
Abbildung 36: Immunzytology an PC12-Zellen.	112
Abbildung 37: Immunzytologie an primären Cortex-Kulturen.	112

7.3.3 Tabellen-Verzeichnis

Tabelle 1: Adenosin (P1) -Rezeptoren (nach Fredholm et al., 2001)	4
Tabelle 2: P2X-Rezeptoren: Substrate und Lokalisation (nach Bhagwat et al., 1996, Burnstockm 1997, Illes et al., 2004)	5
Tabelle 3: P2Y-Rezeptoren: Substrate und Lokalisation (nach Bhagwat et al., 1996; Burnstock, 1997; Dubyak, 2003; Illes et al., 2004).	6
Tabelle 4: E-NTPDasen: Namen, Substrate, Orthologe	10
Tabelle 5: Liste der verwendeten Primer	19
Tabelle 6: Photometrische Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren (nach Sambrook et al., 1989).	26
Tabelle 7: Standard PCR-Ansatz	28
Tabelle 8: Standard-PCR-Protokoll; T _m = Schmelztemperatur der Primer	28
Tabelle 9: Trennbereiche von Agarosegelen (Tabelle nach Gassen et al., 1999)	29
Tabelle 10: aus Maus-EST's abgeleitete Primer der NTPDase3	33
Tabelle 11: RACE-PCR-Protokoll	35
Tabelle 12: Primer für die Sondenherstellung	36
Tabelle 13: Elektroporationsbedingungen für CHO- und COS7-Zellen im ECM600 (BTX, San Diego, CA, USA)	45
Tabelle 14: für Westernblots verwendete Antikörper und Verdünnung	53
Tabelle 15: für die Produktanalyse eingesetzte Proteinmengen	57
Tabelle 16: Identitäten und Ähnlichkeit innerhalb der ENTPDase-Familie der Ratte	72
Tabelle 17: Potentielle N-Glykosilierungsstellen	80
Tabelle 18: Vergleich der Asn-Xaa-Ser/Thr-Sequons von 4 NTPDase3-Orthologen	81
Tabelle 19: Potentiell phosphorylierte Aminosäurereste der NTPDase3 der Ratte	85
Tabelle 20: Introns in der genomischen Sequenz der NTPDase3.	92
Tabelle 21: Exons der NTPDase3.	93
Tabelle 22: Phosphatwerte für die EDTA-Proben pro µg Membranfraktionsprotein	95
Tabelle 23: SI-Vorsätze	146
Tabelle 24: SI-Einheit und abgeleitete Einheiten	147
Tabelle 25: Nicht-SI-Einheiten	148

7.3.4 Stichwortverzeichnis

A

A1-Rezeptor	3f., 89, 138, 186, 199, 202, 204, 219
A2A-Rezeptor	3f., 181, 200, 206ff.
A2B-Rezeptor	3f., 128, 206, 212
A3-Rezeptor	3f., 18f., 46, 60, 67, 70f., 89, 176, 200
ACCpro	21, 86
Acetylcholin	1f., 4ff., 9, 12f., 15ff., 21ff., 29ff., 38ff., 66ff., 76, 78ff., 84f., 87f., 91, 94f., 98, 100ff., 108, 110ff., 118ff., 125ff., 137f., 141ff., 148, 150, 152, 154, 176f., 179, 187, 191, 193, 196, 198, 202, 208, 211, 214, 218
Acini	129f., 211
Acinus	130
Adenosin	1, 3f., 6, 96, 120, 126, 128, 131, 133ff., 139f., 142f., 148, 154, 176, 181f., 186, 188f., 195, 206, 208f., 212f., 215f., 218
Adenosindiphosphat	148
Adenosinmonophosphat	148
ADP	1, 3ff., 10, 13, 56f., 93ff., 123ff., 130, 132ff., 138ff., 143, 148, 188, 198, 208
Adrenalin	131
AK	52f., 148
Alignment	64, 72, 74ff., 80, 83, 89, 92, 114f., 122, 152, 176
alpha-Helix	87, 89
Aminosäuresequenz	71, 73, 93, 152
Amp	25, 27, 32, 43, 65, 146, 150, 186
AMP	1, 3, 7, 10, 42, 96, 125, 131, 134, 138, 148, 181, 189, 196, 199f., 212
apikal	119
Astrozyten	2, 138f.
ATP	1ff., 9ff., 13, 28, 30, 34, 38, 56ff., 78, 93ff., 120, 123ff., 142f., 148, 177ff.

ATPase:ADPase-Verhältnis 13, 123ff., 127, 132, 134f., 139f., 143
autokrin 129ff., 143

B

basolateral 129f., 198
Bauchspeicheldrüse 128
beta-Strang 87, 89
Blutplättchen 1
Blutplättchen-Aggregation 1
BoxShade 20, 73, 75

C

cAMP 1, 3, 7, 131, 148, 181, 189, 212
CHO-Zellen 1ff., 11, 16f., 24, 43ff., 49, 53, 56f., 60, 70, 86ff., 93, 95f.,
99, 101f., 109ff., 114f., 117, 119ff., 129, 131ff., 141f.,
148, 154, 181f., 187, 190f., 196, 198, 202, 205, 208, 210f.,
213ff.
Chromosom vii, 91ff., 115, 152, 208
ClustalX 20, 73, 75, 81, 83, 92, 213
ConPro 87
cortex 178f., 195, 202, 204, 207, 215
Cortex 3ff., viif., 61, 106, 111, 135, 140f., 143, 153
COS7-Zellen iiif., 16f., 43, 45, 154
CTP 5, 10, 28, 35, 57, 98f., 125

D

Di-Arginin-Motiv 116
Di-Leucin-Motiv 117
Di-Lysin-Motiv 116
Diencephalon viii, 106, 135, 138, 143
Dimere 11, 123
Disulfidbrücken 122
DNA-Isolation
 Extraktion aus Agarosegelen 22
Dopamin 195, 139, 199, 218

Dünndarm 7f., 105, 128, 132, 143

DXG-Motiv 11, 87, 89, 120ff.

E

E-NPP's

E-NPP-Familie i, 7, 217

NPP1 7

NPP2 7

NPP3 7f., 217

E-NTPDase(n) i, v, viif., 10ff., 64, 72ff., 82f., 86ff., 93, 101, 103, 113ff.,
117f., 120ff., 133ff., 138ff., 142f., 149, 152, 154, 193f.

E. coli DH5 32, 34, 40

elektrokompetente E. coli 32

Ekto-Apyrase 9f., 127

Ekto-ATPase i, 9f., 127, 133

Ekto-Proteinkinasen 127

endokrin 129f., 143

Endosom 117

Endozytose 117

enterisches Nervensystem 1ff., viiff., 12ff., 16, 21, 24f., 27ff., 32ff., 37f., 40f., 43ff.,
47ff., 51f., 54ff., 59f., 62ff., 67f., 72ff., 80ff., 86, 89, 91,
96, 102, 106f., 113ff., 117f., 122ff., 139f., 142f., 149ff.,
176f., 180ff., 184f., 187f., 190, 195ff., 204ff., 214, 218

Epithelien 128f.

EPSP 133, 149

exokrin viii, 129f., 143

Exon vi, 91ff., 115, 152, 154

Exozytose 1

extrazellulär 1, 4, 12, 77, 79, 113, 126f. 136,, 138, 140, 142

exzitatorisch 2, 133, 135, 138, 140, 149

G

G-Protein-gekoppelt 3

GABA	2f., 139, 149, 192, 199f.
Gedächtnis	139, 143
Gliazellen	5, 13, 133
Glutamat	2, 136, 199
Glycin	58, 89, 120, 136
Glykosilierung	v, 70f., 78ff., 108, 118f., 152, 154
Glykosilierungs	81
Granula	1, 129ff.
GT-AG-Regel	115
GTP	5, 10, 28, 57, 98f., 125, 131, 189
Guanosinmonophosphat	148
H	
Hippocampus	3f., viii, 106, 135, 139, 143, 178f., 183, 185, 204, 207f., 211, 217, 219
Hormon(e)	130, 138f., 207
Hypophyse	viii, 107, 135, 138, 143
Hypothalamus	138, 218
I	
Illeum	133
in silico-Analyse	ii, v, 20, 76, 104, 111, 115f., 118, 142
in vitro	177, 200
in vivo	42, 195, 203
Inhibitor	ii, 6f., 15, 18, 25, 47, 130, 132f., 134ff., 138f., 177, 183, 190, 193, 206, 217
inhibitorisch	132f., 138f.
Inhibitors	138
intrazellulär	i, 8, 12, 46, 71, 73f., 82, 84f., 111, 118, 125, 129
Intron	vi, 91f., 115, 152, 154
Ionentransport	128
ionotrop	13, 129, 142, 196, 204, 218
IP3	3, 5
IPAN's	133, 149

J	
Jejunum	128, 207, 216
K	
Kalzium	3f., vii, 5, 9, 11, 12, 56ff., 93ff., 120, 126, 136, 138, 142, 152
Konformation	vii, 120, 122ff.
Kosubstrat	1, 127
Kotransmission	1, 133
L	
Lamina	136, 215
Lernprozesse	143
Lysosom	8, 10, 117, 125
M	
Magnesium	iv, 9, 56, 58, 93ff., 120, 126, 152
Medulla oblongata	106, 135, 137f., 143
Mesencephalon	106, 135, 137, 143
metabotrop	13, 129, 219
multimere	4
N	
NDP	9, 11, 98f., 124f., 150, 152
Nebenhoden	105, 128, 134f., 143
Nervenendigung	133
Nervensystem	
entrisches Nervensystem	1ff., viiff., 12ff., 16, 21, 24f., 27ff., 32ff., 37f., 40f., 43ff., 47ff., 51f., 54ff., 59f., 62ff., 67f., 72ff., 80ff., 86, 89, 91, 96, 102, 106f., 113ff., 117f., 122ff., 139f., 142f., 149ff., 176f., 180ff., 184f., 187f., 190, 195ff., 204ff., 214, 218
peripheres Nervensystem	150
zentrales Nervensystem	2, 5f., 10, 107, 139, 151
Neuriten	3, 44, 101, 131
Neuritenbildung	131

Neurohypophyse	138
Neuromodulator	13, 139f.
neuronale Differenzierung	131
Neuronen	1ff., viii, 44, 102, 111, 130ff., 131ff., 135ff., 141, 149
Neurotransmission	180
Neurotransmitter	1f., 13, 113, 131ff., 135ff., 142, 184, 193, 199, 200, 209, 211, 213
NMP	7, 131, 150
Noradrenalin	2, 131, 134, 138, 204, 206, 211, 215
NTP	1, iiiif., 28, 33f., 36ff., 46f., 53f., 56ff., 60, 64ff., 80ff., 91ff., 138ff., 148ff., 152, 154, 178f., 184f., 190, 192ff., 198ff., 202f., 209f., 215f.
NTPase:NDPase-Verhältnis	99, 124f., 152
NTPDase1	i, viiif., 60, 71, 73ff., 77, 82ff., 87, 89, 101, 109ff., 111, 115, 117ff., 121ff., 127, 130, 132, 136, 139, 141, 143, 185, 190, 194f., 209, 215
NTPDase2	i, viiif., 60, 72ff., 82ff., 101, 110f., 117, 119, 122ff., 130, 133, 140, 143, 179, 184f., 190, 194, 199, 209, 215f.
NTPDase3	i, iiiif., 33f., 36f., 46f., 53f., 56ff., 60, 64ff., 78, 80ff., 91ff., 132ff., 138ff., 152, 154
NTPDase4	8, 10, 12, 73ff., 82, 84, 87, 117, 125
NTPDase5	8, 10, 12, 73ff., 82ff., 116, 118f., 125
NTPDase6	8, 10, 12, 73ff., 82, 84, 118, 122, 125f., 178, 192
NTPDase7	8, 10, 73ff., 82ff., 117, 125
NTPDase8	8, 10, 13, 73ff., 82ff., 117f., 124f., 135
Nukleinsäure	iif., v, 21ff., 25f., 67, 71f., 148, 150f., 152
Nukleosid-Rezeptoren	3
Nukleosid-Transporter	127, 140
Nukleosid(e)	1, 3, 7ff., 11ff., 57, 97, 124ff., 131, 140, 142, 149f.
Nukleotid-Rezeptor	1, 3
Nukleotid-vermittelt	126ff., 143
Nukleotid(e)	1ff., 6ff., 10f., 13f., 27, 34f., 37, 57, 87, 95, 97, 113f., 117,

119ff., 126ff., 131f., 134ff., 138ff., 142f., 147, 150f., 184

O

OD	32
oligomere	123
Omiga	20, 27
Oxytocin	138, 193, 211

P

P1-Rezeptor	i, 3, 126, 133, 142
P2-Rezeptor	3, 113, 126, 128, 130f., 137, 139
P2X-Rezeptor	i, 3ff., 13, 129f., 133ff., 142, 154, 176f., 180, 182, 187f., 191ff., 196ff., 200ff., 204ff., 214ff.
P2Y-Rezeptor	i, 3, 5f., 13, 128f., 132f., 136ff., 142, 154, 181, 183ff., 193ff., 198f., 206f., 209, 212, 214f., 218f.
Pankreas	8, 12, 128ff., 143
parakrin	129, 131, 142f.
PC12-Zellen	vii, 111, 117, 152
Peptid	iv, vi, 7, 47, 53, 77, 107f., 116, 177, 153, 202, 214, 216
Peptid-Antikörper	iv, vi, 47, 107f., 153
peripheres Nervensystem	150
photometrische Bestimmung von bakteriellen Zelldichten	32
Phylogramm	73
Phylogramm	73f.
Pituizyten	138
plasmamembran	77, 82f., 110, 119
Plasmamembran	vii, 12, 78, 110f., 116f., 127, 138, 141
Plasminogen	2
Plexus myentericus	132f.
Poly(A)	24f., 69f., 114
Polyadenylierung	114
Pons	106, 135ff.
postsynaptisch	133, 138f., 149

präsynaptisch	133, 136, 139
Primärkultur	61
Promotor	46, 66, 176
Prostata	12, 105, 128, 134f., 143
ProteinkinaseC	85
Purkinje-Zellen	137, 179
Pyramiden-Zellen	140
	R
Rückenmark	4, viii, 135f., 143
	S
Samenleiter	105, 128, 143
Schmerzwahrnehmung	136f.
Schwann-Zellen	9
second messenger	1, 5
Sekretion	2, 126, 128f., 132
Serotonin	2
Signalanker	71, 78, 116
Signalpeptid	77, 116
Signalstoff(e)	1, 6, 113, 126, 137, 142
SKL-Motiv	3, 77, 117
Sortiersignale	77
Splice-Stelle	92
SSpro	21, 87
Stammhirn	137
substrat	1, 127, 185, 188, 207
Substrat	ivff., 10, 52, 56ff., 86f., 94f., 97ff., 121f., 124f., 127, 152, 154
Synapse	131, 141, 188, 190, 195, 197, 199, 201, 206
synaptisch	1, 129, 133, 135f., 138ff., 143, 149
synaptische Plastizität	139
	T
Tertiärstruktur	vii, 121

tetramere	123
Tetramere	123
Thalamus	2, 4, 138, 218
Thrombozyten	127
Thrombozytenfreisetzung	127
transfiziert	ivff., 34, 39, 47, 53, 56f., 60, 69, 78, 93, 95f., 99, 101ff., 107ff., 114, 117, 142
Translation	113, 116, 194, 204
Transmembrandomäne(n)	4, vii, 12, 85, 92f., 116, 123, 135
U	
UTP	3, 5, 10, 38, 57, 98f., 124f., 128f.
UTR	
3'-UTR	69
5'-UTR	67, 69
V	
Vasopressin	2, 138, 180, 193, 211
Vesikel	1
Z	
Zelllinie	8, 17, 43, 44f., 101, 128, 131
Zellkultur	iif., 16, 43, 114, 141
zentrales Nervensystem	2, 5f., 10, 107, 139, 151

7.4 Literaturnachweis

Abbrachio MP, Burnstock G

Purinergic Signaling: Pathophysiological Roles
Japanese Journal of Pharmacology 1998, 78: 113-145

Almeida T, Rodrigues RJ, Mendonca ADE, Ribeiro JA, Cunha RA

Purinergic P2 Receptors Trigger Adenosine Release Leading To Adenosine A_{A2} Receptor Activation and Facilitation of Long-Term Potentiation In Rat Hippocampal Slices
Neuroscience 2003, 122: 111-121

Alper S, Chernova MN, Stewart AK

Regulation of Na⁺-Independent Cl⁻/HCO₃⁻ Exchangers by pH
Journal of Pancreas 2001, 2(4): 171-175

Altschul SF, Gish W, Miller W, Meyers EW, Lipman DJ

Basic Local Alignment Search Tool
Journal of Molecular Biology 1990, 215(3): 403-410

Anderson CM, Baldwin SA, Young JD, Cass CE, Parkinson FE

Distribution of mRNA encoding a nitrobenzylthioinosine-insensitive nucleoside transporter (ENT2) in rat brain
Brain Res Mol Brain Res. 1999, 70(2):293-297

Andoh K, Jin-Hua P, Terashima K, Nakamura H, Sano K,

Genomic structure and promoter analysis of the ecto-phosphodiesterase I gene (PDNP3) expressed in glial cells
Biochimica et Biophysica Acta 1999, 1446: 213-224

Araque A, Carmignoto G, Haydon PG

Dynamic signaling between astrocytes and neurons
Annu Rev Physiol. 2001, 63: 795-813

Armstrong JN, Brust TB, Lewis RG, MacVicar BA

Activation of presynaptic P2X7-like receptors depresses mossy fiber-CA3 synaptic transmission through p38 mitogen-activated protein kinase
Journal of Neuroscience 2002, 15;22(14):5938-5945

Aviv H, Leder P

Purification of Biologically Active Globin Messenger RNA by Chromatography on Oligothymidylic acid-Cellulose
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1972, 69(6): 1408-1412

Baghwat SS, Williams

P2 purine und pyrimidine receptors: emerging superfamilies of G-protein coupled and ligand gated ion channel receptors

European Journal of Medical Chemistry 1997, 32: 183-193

Baldi P, Pollastri G

The Principled Design of Large-Scale Recursive Neural Network Architectures—DAG-RNNs and the Protein Structure Prediction Problem

Journal of Machine Learning Research 2003, 4: 575-602,.

Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD

The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29

Pflugers Archiv 2004, 447(5):735-743

Ballantyne D, Scheid P

Mammalian brainstem chemosensitive neurones: linking them to respiration in vitro

Journal of Physiology 2000, 525 Pt 3:567-577

Banks GB, Fuhrer C, Adams ME, Froehner SC

The postsynaptic submembrane machinery at the neuromuscular junction: requirement for rapsyn and the utrophin/dystrophin-associated complex

J Neurocytol. 2003, 32(5-8):709-726

Bardoni R, Goldstein PA, Lee CJ, Gu JG, MacDermott AB

ATP P2X receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord

Journal of Neuroscience 1997, 17(14):5297-5304

Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S

Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0

J. Mol. Biol. 2004, 340:783-795

Bertrand PB, Bornstein JC

ATP as a Putativ sensory Mediator: Activation of Intrinsic Sensory Neurons of the Myenteric Plexus via P2X-Receptors

The Journal of Neuroscience 2002, 22(12): 4767-4775

Bertrand PB, Kunze WA, Bornstein JC, Furness JB, Smith ML

Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa

American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology 1997, 273 (1): G422-35

Bian X, Bertrand PB, Bornstein JC

Descending inhibitory reflexes involve P2X receptormediated transmission from interneurons to motor neurons in guinea_pig ileum

Journal of Physiology 2000, 528(3): 551-560

Biederbick A, Kosan C, Kunz J, Elsasser HP*First apyrase splice variants have different enzymatic properties*

Journal of Biological Chemistry 2000, 275(25):19018-19024

Bigonnesse F, Levesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJ, Sevigny J*Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8*

Biochemistry 2004, 43(18):5511-5519

Birnboim HC, Doly J.*A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*

Nucleic Acids Res. 1979, 7(6):1513-23

Blom N, Gammeltoft S, Brunak S*Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites.*

Journal of Molecular Biology 1999: 294(5): 1351-1362

Bodin P, Burnstock G*Purinergic signalling: ATP release*

Neurochem Research 2001, 26(8-9):959-969

Bonan CD, Roesler R, Pereira GS, Battastini AM, Izquierdo I, Sarkis JJ*Learning-specific decrease in synaptosomal ATP diphosphohydrolase activity from hippocampus and entorhinal cortex of adult rats*

Brain Research 2000, 854(1-2):253-256

Bork P, Sander C, Valencia A*An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins*

Proc Natl Acad Science 1992, 89: 7290-7294

Bornstein JC, Costa M, Grider JR*Enteric motor and interneural circuits controlling motility*

Neurogastroenterologie and Motility 2004, 16(1): 34-38

Braun N, Fengler S, Ebeling C, Servos J, Zimmermann H*Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family*

Biochemical Journal 2000, 351: 639-647

Braun N, Lenz C, Gillardon F, Zimmermann M, Zimmermann H*Focal cerebral ischemia enhances glial expression of ecto-5'-nucleotidase*

Brain Research 1997, 766(1-2):213-226

Braun N, Sévigne J, Robson SC, Enjoji K, Guckelberger O, Hammer K, Di Virgilio F, Zimmermann H

Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain

European Journal of Neuroscience 2000b, 12: 4357-4366

Braun N, Sévigne J, Robson SC, Hammer K, Hanani M, Zimmermann H

Association of the Ecto-ATPase NTPDase2 With Glial Cells of the Peripheral Nervous System

Glia 2004, 45: 124-132

Braun N, Sévigny J, Mishra SK, Robson SC, Barth SW, Gerstberger R, Hammer K, Zimmermann H

Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult brain

European Journal of Neuroscience 2003, 17: 1355-1364

Braun N, Zhu Y, Kriegstein J, Culmsee C, Zimmermann H

Upregulation of the enzyme chain hydrolyzing extracellular ATP after transient forebrain ischemia in the rat

Journal of Neuroscience 1998, 18(13): 4891-4900

Braun N, Zimmermann H,

Microglial Ectonucleotidases: Identification and Functional Roles

Drug Development Research 2001, 53: 208-217

Brockhaus J, Dressel D, Herold S, Deitmer JW

Purinergic modulation of synaptic input to Purkinje neurons in rat cerebellar brain slices

European Journal of Neuroscience 2004, 19(8):2221-2230

Brookes SJ

Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine

Anat Rec. 2001, 262(1):58-70

Bruno AN, Ricachenevsky FK, Pochmann D, Bonan CD, Battastini AM, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ

Hypothyroidism changes adenine nucleotide hydrolysis in synaptosomes from hippocampus and cerebral cortex of rats in different phases of development

Int J Dev Neurosci. 2005, 23(1):37-44

Bu G, Rennke S, Geuze HJ

ERD2 proteins mediate ER retention of the HNEL signal of LRP's receptor-associated protein (RAP)

Journal of Cell Science. 1997, 110: 65-73

Bucheimer RE, Linden J*Purinergic regulation of epithelial transport*

The Journal of Physiology 2003, 555(2): 311-321

Buller KM, Khanna S, Sibbald JR, Day TA*Central noradrenergic neurons signal via ATP to elicit vasopressin responses to haemorrhage*

Neuroscience 1996, 73(3):637-642

Burnstock G*Purigenic nerves*

Pharmacological Reviews 1972, 24: 509-581

Burnstock G, Wood JN*Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission*

Current Opininn in Neurobiology 1996, 6(4):526-32

Burnstock G*The Past, Present and Future of Purine Nucleotides as Signaling Molecules*

Neuropharmacology 1997, 36(9): 1127-1139

Burnstock G*Purigenic cotransmission*

Brain Research Bulletin 1999, 50(5/6): 355-357

Burnstock G*P2X receptors in sensory neurones*

Br J Anaesth. 2000, 84(4):476-88

Buss KA, Cooper DR, Ingram-Smith C, Ferry JG, Sanders DA, Hasson MS*Urkinase: Structure of Acetat Kinase, a Member of the ASKHA Superfamily of Phoshotransferases*

Journal of Bacteriology 2001, 138(2): 680-686

Bystrom CE, Pettigrew DW, Branchaud BP, O'Brian Patrik, Remington SJ*Crystal Structures of Escherichia coli Glycerol Kinase Variant S58-->W in Complex with Nonhydrolyzable ATP Analogues Reveal a Putative Active Conformation of the Enzyme as a Result of Domain Motion*

Biochemistry 1999, 38: 3508-3518

Caldwell CC, Hornyak SC, Pendleton E, Campbell D, Knowles AF*Regulation of chicken gizzard ecto-ATPase activity by modulators that affect its oligomerization status*

Arch Biochem Biophys. 2001, 387(1):107-116

Carlin RW, Lee JH, Marcus DC, Schultz BD

Adenosine stimulates anion secretion across cultured and native adult human vas deferens epithelia

Biology of Reproduction 2003, 68(3): 1027-1034

Carninci P, Shibata Y, Hayatsu N, Sugahara Y, Shibata K, Itoh M, Konno H, Okazaki Y, Muramatsu M, Hayashizaki Y

Normalization and subtraction of cap-trapper-selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes

Genome Research 2000, 10(10):1617-1630

Chadwick BP, Frischauf AM

Cloning and mapping of a human and mouse gene with homology to ecto-ATPases genes

Mammalian Genome 1997, 8: 668-672

Chadwick BP, Frischauf AM

The CD39-like gene family: identification of three new human members (CD39L2, CD39L3, and CD39L4), their murine homologues, and a member of the gene family from Drosophila melanogaster

Genomics 1998, 50(3):357-367

Chen W, Wieraszko A, Hogan MV, Yang HA, Kornecki E, Ehrlich YH

Surface protein phosphorylation by ecto-protein kinase is required for the maintenance of hippocampal long-term potentiation

Proc Natl Acad Sci U S A. 1996, 93(16):8688-8693

Cheng HC, Shih HM, Chern Y

Essential role of cAMP-response element-binding protein activation by A2A adenosine receptors in rescuing the nerve growth factor-induced neurite outgrowth impaired by blockage of the MAPK cascade

Journal of Biological Chemistry 2002, 277(37):33930-33942

Chevassus H, Roig A, Belloc C, Lajoix AD, Broca C, Manteghetti M, Petit P

P2Y receptor activation enhances insulin release from pancreatic β -cells by triggering the cyclic AMP/protein kinase A pathway

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 2002, 366: 464-469

Chik JK, Lindberg U, Schutt CE

The Structure of an Open State of β -Actin at 2.65 Å Resolution

Journal of molecular Biology 1996, 263: 607-623

Chomczynski P, Sacchi N

Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction

Analytical Biochemistry 1987, 162:156-159

Chou ZF, Chen F, Wilusz

Sequence and position requirements for uridylate-rich downstream elements of ployadenylation signals

Nucleic Acid Research 1994, 22(13): 2525-2531

Christoforidis S, Papamarcaki T, Tsolas O

Human placental ATP diphosphohydrolase is a highly N-glycosylated plasma membrane enzyme

Biochim Biophys Acta. 1996, 1282(2):257-262

Cicarelli R, Ballerini P, Sabatino G, Rathbone MP, D'Onofrio M, Caciagli, F, Di Iorio P

Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain

International Journal of Developmental Neuroscience 2001, 19: 395-414

Cicarelli R, Di Iorio P, D'Alimonte I, Guilani P, Florio T, Caciagli F, Midllemiss PJ, Rathbone MP

Cultured Astrocyte Proliferation Induced by Extracellular Guanosine Involves Endogenous Adenosine and Is Raised by the Co-Presence of Microglia

Glia 2000, 29: 202-211

Cicarelli R, Di Iorio P, D'Alimonte I, Guilani P, Florio T, Caciagli F, Midllemiss PJ, Rathbone MP

Rat Cultured Astrocytes Release Cuanine-Based Purines in Basal Conditions and After Hypoxia/Hypoglycemia

Glia 1999, 25: 93-98

Clark HF, Gurney AL, Abaya E, Baker K, Baldwin D, Brush J, Chen J, Chow B, Chui C, Crowley C, Currell B, Deuel B, Dowd P, Eaton D, Foster J, Grimaldi C, Gu Q, Hass PE, Heldens S, Huang A, Kim HS, Klimowski L, Jin Y, Johnson S, Lee J, Lewis L, Liao D, Mark M, Robbie E, Sanchez C, Schoenfeld J, Seshagiri S, Simmons L, Singh J, Smith V, Stinson J, Vagts A, Vandlen R, Watanabe C, Wieand D, Woods K, Xie MH, Yansura D, Yi S, Yu G, Yuan J, Zhang M, Zhang Z, Goddard A, Wood WI, Godowski P, Gray A

The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment

Genome Res. 2003, 13(10):2265-2270

Clerc N, Furness JB

Intrinsic primary afferent neurones of the digestive tract

Neurogastroenterologie and Motility 2004, 16(1): 24-27

Collo G, North RA, Kawashima E, Merlo-Pich E, Neidhart S, Surprenant A, Buell G

Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels

Journal of Neuroscience 1996, 16(8):2495-2507

Costa M, Brookes SJ, Steele PA, Gibbins I, Burcher E, Kandiah CJ
Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum
Neuroscience 1996, 75(3):949-967

Coutinho-Silva R, Parsons M, Robson T, Burnstock G
Changes in expression of P2 receptors in rat and mouse pancreas during development and aging
Cell Tissue Research 2001, 306: 373-383

Crack BE, Pollard CE, Beukers MW, Roberts SM, Hunt SF, Ingall AH, Mckechnie KCW, Ijzerman AP, and Leff P
Pharmacological and biochemical analysis of FPL 67156, a novel, selective inhibitor of ecto-ATPase
British Journal of Pharmacology 1995, 114: 475-481

Crane JK, Olson RA, Jones HM, Duffey ME
Release of ATP during host cell killing by enteropathogenic E. coli and its role as a secretory mediator
American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology 2002, 283: G74-G86

Cressman VL, Lazarowski E, Homolya L, Boucher RC, Koller BH, Grubb BR
Effect of loss of P2Y(2) receptor gene expression on nucleotide regulation of murine epithelial Cl(-) transport
Journal of Biological Chemistry 1999, 274(37):26461-26468

Cunha RA
Regulation of the ecto-nucleotidase pathway in rat hippocampal nerve terminals
Neurochem Research 2001, 26(8-9):979-991

Cunha RA, Ribeiro JA
ATP as a presynaptic modulator
Life Science 2000, 68: 119-137

D'Ambrosi N, Cavliere F, Merlo D, Milazzo L, Mercanti D, Volonté C
Antagonists of P2 receptor prevent NGF-dependent neuriteogenesis in PC12 cells
Neuropharmacology 2000, 39: 1083-1094

da Silva RS, Bruno AN, Battastini AM, Sarkis JJ, Lara DR, Bonan CD
Acute caffeine treatment increases extracellular nucleotide hydrolysis from rat striatal and hippocampal synaptosomes
Neurochem Research 2003, 28(8):1249-1254

Davidson TL, Jarrard LE
The hippocampus and inhibitory learning: a 'Gray' area?
Neurosci Biobehav Rev. 2004, 28(3):261-271

Dixon JS, Jen PYP, Gosling JA

Structure and Autonomic Innervation of the Human Human Vas Deferens: A Review
Microscopy Research and Technique 1998, 42: 423-432

Dombrowski KE, Brewer KA, Maleckar JR, Kirley TL, Thomas TW, Kapp JA

Identification and Partial Characterization of EctoATPase Expressed by Immortalized B Lymphocytes
Archives of Biochemistry and Biophysics 1997, 340: 10-18

Don, RH, Cox, PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick J S

'Touschdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification
Nucleic Acid Research 1991, 19(14): 4008

Dranoff JA, Kruglov EA, Robson SC, Braun N, Zimmermann H, Sevigny J

The ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase NTPDase2/CD39L1 is expressed in a novel functional compartment within the liver
Hepatology 2002, 36(5):1135-1144

Drosopoulos JHF

Roles of Asp54 and Asp213 in Ca²⁺ utilization by soluble human CD39/ecto-nucleotidase
Archives of Biochemistry and Biophysics 2002, 406: 85-95

Dubyak GR

Knock-out mice reveal tissue-specific roles of P2Y receptor subtypes in different epithelia
Molecular Pharmacology 2003, 63(4):773-776

Dunwiddie TV, Masino SA

The role and regulation of adenosine in the central nervous system
Annual Reviews of Neuroscience 2001, 24:31-55

Dzhandzhugazyan KN, Plesner L

Diethyl pyrocarbonate inactivates CD39/ecto-ATPDase by modifying His-59
Biochimimica et Biophysica Acta 2000, 1466(1-2): 267-277

Edmonds M, Caramella MG

The Isolation and Characterisation of Monophosphate-rich Polynukleotides Synthesized by Ehrlich Ascites Cells
The Journal of Biological Chemistry 1969, 244(5): 1314-1324

Edwards FA, Gibb AJ

ATP – a fast neurotransmitter
FEBS Letters 1993, 325(1,2): 86-89

Eichenbaum H

Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory

Neuron 2004, 44(1):109-120

Enyoji K, Sévigne J, Lin Y, Frenette PS, Christie PD, Schulte am Esch J, Imai M, Edelberg JM, Rayburn H, Lech M, Beeler DL, Csizmadia E, Wagner DD, Robson SC, Rosenberg RD

Target disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation

Nature Medicine 1999, 5(9): 1010-1017

Enyoji K, Sevigny J, Lin Y, Frenette PS, Christie PD, Esch JS 2nd, Imai M, Edelberg JM, Rayburn H, Lech M, Beeler DL, Csizmadia E, Wagner DD, Robson SC, Rosenberg RD

Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation

Nature Medicine 1999, 5(9):1010-1017

Failor BU, Aschrafi A, Schmalzing G, Zimmermann H

Determination of native oligomeric state and substrate specificity of rat NTPDase1 and NTPDase2 after heterologous expression in Xenopus oocytes

European Journal of Biochemistry 2003, 270(8):1802-1809

Faller A

Der Körper des Menschen: Einführung in Bau und Funktion

Georg Thieme Verlag (Stuttgart) 1995, 12. Auflage

Fernandez-Alvarez, Hillaire-Buys D, Loubatières-Mariani MM, Gomis R, Petit P

P2 Receptor Agonists Stimulate Insulin Release from Human Pancreatic Islands

Pancreas 2001, 22(1): 69-71

Fischer B, Chulkin A, Boyer JL, Harden KT, Gendron FP, Beaudoin AR, Chapal J, Hillaire-Buys D, Petit P

2-Thioether 5'-O-(2-Thiotriphosphate)adenosine Derivatives as New Insulin Secretagogues Acting through P2Y-Receptors

Journal of Medicinal Chemistry 1999, 42: 3636-3446

Flaherty KM, McKay DB, Kabsch W, Holmes KC

Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70 kDa heat shock cognate protein

Proc Natl Acad Sci USA 1991, 88: 5041-5045

Flower DR, North ACT, Sansom CE

The lipocalin protein family: structural and sequence overview

Biochimica et Biophysica Acta 2000, 148: 9-24

Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W*Structure and function of adenosine receptors and their genes*

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2000, 362(4-5):364-374

Fredholm BB, Ijzerman AP, Kenneth JA, Klotz KN, Linden J*International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosin Receptors*

Pharmacological Reviews 2001, 53: 527-552

Frohmann MA, Dush, MK, Dush M, Gail R*Rapid production of full-length cDNAs form rare transkripts: Amplification using a single gene-spezific oligonucleotid primer*

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85: 8998 – 9002

Frohmann, MA*Rapid Amplification of Complementary DNA Ends for Generation of Full-Length Complementary DNAs: Thermal RACE*

Methods in Enzymology 1993, 218: 242 – 356

Fuji S, Kato H, Kuroda Y*Extracellular adenosine 5'-triphosphate plus activation of glutamatergic receptors induces long-term potentiation in CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices*

Neuroscience Letters 1999, 276: 21-24

Fujii S*ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: the role of extracellular ATP in hippocampal long-term potentiation*

J Pharmacol Sci. 2004, 94(2):103-106

Fujita K, Lazarovici P, Guroff G*Regulation of the Differentiation of PC12 Pheochromocytoma Cells*

Environmental Health Perspectives 1989, 80: 127-142

Furmanek A, Hofsteenge J*Protein C-mannosylation: Facts and questions*

Acta Biochimica Polonica 2000: 47(3): 781-789

Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N*Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine*

Progress in Neurobiology 2004, 72: 143–164

Galligan JJ*Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system*

Neurogastroenterol Motil. 2002, 14(6):611-623

Galligan JJ, Bertrand PP*ATP mediates fast synaptic potentials in enteric neurons*

Journal of Neuroscience 1994, 14(12):7563-7571

Galligan JJ, LePard KJ, Schneider DA, Zhou X

Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system

J Auton Nerv Syst. 2000, 81(1-3):97-103

Galligan JJ, North RA

Pharmacology and function of nicotinic acetylcholine and P2X receptors in the enteric nervous system

Neurogastroenterol Motil. 2004, 16 Suppl 1:64-70

Gao L, Dong L, Whitlock JP

A novel response to dioxin. Induction of ecto-ATPase gene expression

Journal of Biological Chemistry 1998, 273(25): 15358-15365

Gassen HG, Schrimpf G

Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor

Spektrum Akademischer Verlag 1999, 2 Auflage

Ghildyal P, Manchanda R

Effects of cooling and ARL 67156 on synaptic ecto-ATPase activity in guinea pig and mouse vas deferens

Auton Neurosci 2004, 115(1-2):28-34

Giniatulin RA, Sokolova EM

ATP and adenosine inhibit transmitter release at the frog neuromuscular junction through distinct presynaptic receptors

British Journal of Pharmacology 1998, 124: 839-844

Gleeson PA

Targeting of proteins to the Golgi apparatus

Histochem Cell Biol 1998, 109: 517-532

Goding JW

Ecot-enzymes: physiology meets pathology

Journal of Leucocyte Biology 2000, 67(3): 285-311

Goding JW, Terkeltaub R, Maurice M, Deterre P, Sali A, Belli SI

Ecto-phosphodiesterase/pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: structure and function of PCI-Family

Immunological Reviews 1998, 161: 11-26

Gourine AV, Llaudet E, Dale N, Spyer KM

Release of ATP in the ventral medulla during hypoxia in rats: role in hypoxic ventilatory response

Journal of Neuroscience 2005, 25(5): 1211-1218

Gourine AV, Llaudet E, Thomas T, Dale N, Spyer KM

Adenosine release in nucleus tractus solitarii does not appear to mediate hypoxia-induced respiratory depression in rats

Journal of Physiology 2002, 544(Pt 1):161-170

Grandolfo M, Nistri A

An electron microscopy study of changes in dense core vesicles of PC12 cells following pulse depolarization

Neuroreport 2005, 16(4):381-385

Greene LA, Tischler TS

Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1976, 73(7):2424-2428

Grinthal A, Guidotti G

Dynamic Motions of CD39 Transmembrane Domains Regulate and Are Regulated by the Enzymatic Active Site

Biochemistry 2004, 43: 13849-13858

Grinthal A, Guidotti G

Substitution of His59 converts CD39 apyrase into an ADPase in a quaternary structure dependent manner

Biochemistry 2000, 39(1): 9-16

Grinthal A, Guidotti G

Transmembrane domains confer different substrate specificities and adenosine diphosphate hydrolysis mechanisms on CD39, CD39L1, and chimeras

Biochemistry 2002, 41(6): 1947-1956

Gu JG, MacDermott AB

Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses

Nature 1997, 389(6652):749-753

Gu JG, Bardoni R, Magherini PC, McDermott AB

Effects of the P2-purinoceptor antagonists suramin and pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid on glutamatergic synaptic transmission in rat dorsal horn neurons of the spinal cord

Neuroscience Letters 1998, 253: 167-170

Gulzmann Y

SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants

Cell 1981 23(1):175-82

Gunning PW, Letourneau PC, Landreth GE, Shooter EM

The action of nerve growth factor and dibutyryl adenosine cyclic 3':5'-monophosphate on rat pheochromocytoma reveals distinct stages in the mechanisms underlying neurite outgrowth

Journal of Neuroscience 1981, 1(10):1085-1095

Gupta R, Jung E, Brunak S

Prediction of N-glycosylation sites in human proteins

In preparation, 2004.

Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennet MVL, Charles AC, Kater SB

ATP Released from Astrocytes Mediates Glial Calcium Waves

The Journal of Neuroscience 1999, 19(2): 520-528

Gysbers JW, Guarnieri S, Mariggio MA, Pietrangelo T, Fano G, Rathbone MP

Extracellular guanosine 5' triphosphate enhances nerve growth factor-induced neurite outgrowth via increases in intracellular calcium

Neuroscience 2000, 96(4):817-824

Gysbers JW, Rathbone MP

GTP and guanosine synergistically enhance NGF-induced neurite outgrowth from PC12 cells

International Journal of Developmental Neuroscience 1996a, 14(1):19-34

Gysbers JW, Rathbone MP

Neurite outgrowth in PC12 cells is enhanced by guanosine through both cAMP-dependent and -independent mechanisms

Neuroscience Letters 1996b, 220: 175-178

Ham RG

Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined synthetic medium

J Proc Natl Acad Sci U S A. 1965, 53:288-93

Handa M, Guidotti G

Purification and Cloning of a Soluble ATP-Diphosphohydrolase (Apyrase) from Potato Tubers (Solanum tuberosum)

Biochemical and Biophysical Research Communications 1996, 218: 916-923

Hasko G, Cronstein BN

Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity

Trends Immunol. 2004, 25(1):33-39

Hatten ME

New directions in neuronal migration

Science 2002, 297(5587):1660-1663

Hauri H, Appenzeller C, Kuhn F, Nufer O*Lectins and traffic in the secretory pathway*

FEBS Letters 2000, 476(1-2):32-37

Haydon PG*GLIA: listening and talking to the synapse*

Nat Rev Neurosci. 2001, 2(3):185-193

Hazama A, Hayashi S, Okada Y*Cell surface measurements of ATP release from single pancreatic beta cells using a novel biosensor technique*

Pflugers Archiv 1998, 437(1):31-35

Hede SE, Amstrup J, Christoffersen BC, Novak I*Purinoreceptors Evoke Different Electrophysiological Responses in Pancreatic Ducts*

The Journal of Biological Chemistry 1999, 274(45): 31784

Hegg CC, Greenwood D, Huang W, Han P, Lucero MT*Activation of purinergic receptor subtypes modulates odor sensitivity*

Journal of Neuroscience 2003, 23(23):8291-8301

Heilbronn A, Maienschein V, Carstensen K, Gann W, Zimmermann H*Crucial role of ecto-5'-nucleotidase in differentiation and survival of developing neural cells*

Neuroreport 1995a, 7(1):257-261

Heilbronn A, Zimmermann H*5'-nucleotidase activates and an inhibitory antibody prevents neuritic differentiation of PC12 cells*

European Journal of Neuroscience 1995b, 7(6):1172-1179

Heine P, Braun N, Heilbronn A, Zimmermann H*Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells*

European Journal of Biochemistry 1999, 262(1):102-107

Heine P, Braun N, Sévigne J, Robson SC, Servos J, Zimmermann H*The C-terminal cysteine-rich region dictates specific catalytic properties in chimeras of the ectonucleotidases NTPDase1 and NTPDase2*

European Journal of Biochemistry 2001, 268: 364-373

Helenius A*How N-linked Oligosaccharides Affect Glycoprotein Folding in the Endoplasmic Reticulum*

Molecular Biology of the Cell 1994, 5:253-265

Helenius A, Aebi M

Intracellular Functions of N-Linked Glycans
Science 2001, 291: 2364-2369

Henriksen KL, Novak I

Effect of ATP on intracellular pH in pancreatic ducts involves P2X7 receptors
Cell Physiol Biochem. 2003, 13(2):93-102

Hernandez-Guijo JM, Carabelli V, Gandia L, Garcia AG, Carbone E

Voltage-independent autocrine modulation of L-type channels mediated by ATP, opioids and catecholamines in rat chromaffin cells
European Journal of Neuroscience 1999, 11(10):3574-3584

Hicks-Berger CA, Yang F, Smith TM, Kirley TL

The importance of histidine residues in human ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3 as determined by site-directed mutagenesis
Biochimica et Biophysica Acta 2001, 1547: 72-82

Hide I, Tanaka M, Inoue A, Nakjima K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y

Extracellular ATP Triggers Tumor Necrosis Factor- α Release from Rat Microglia
Journal of Neurochemistry 2000, 75(3):965-972

Holroyd C, Erdmann R

Protein translocation machineries of peroxisomes
FEBS Letters 2001, 501(1):6-10

Hulo N, Sigrist CJA, Le Saux V, Langendijk-Genevaux PS, Bordoli L, Gattiker A, De Castro E, Bucher P, Bairoch A

Recent improvements to the PROSITE database
Nucleic Acids Research, 2004, 32: D134-D137

Humphrey JS, Peters PJ, Yuan LC, Bonifacino JS

Localization of TGN38 to the trans-Golgi Network: Involvement of a Cytoplasmic Tyrosine-containing Sequence
Journal of Cell Biology, 120: 1123-1135

Hurley JH

The Sugar Kinase/Heat Shock Protein 70/Actin Superfamily: Implications of Conserved Structure for Mechanisms
Annual Reviews of Biophysical Biomolecular Structure 1996, 25: 137-162

Illes P, Klotz KN, Lohse MJ

Signaling by extracellular nucleotides and nucleosides
Naynyn-Smiedeberg's Archiv Pharmacology 2000, 362: 295-298

Illes P, Ribeiro JA

Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system
European Journal of Pharmacology 2004, 483(1):5-17

Inoue K

Microglial Activation by Purines and Pyrimidines

Glia 2002, 40: 156-163

Inoue K

Microglial activation by purines and pyrimidines

Glia 2002; 40(2):156-153

Inoue K, Koizumi S, Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y

Signaling of ATP receptors in glia-neuron interaction and pain

Life Science 2003, 74: 189-197

Inoue K, Tsuda M, Koizumi S

ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X4

J Pharmacol Sci. 2004; 94(2):112-114

Ishiguro H, Naruse S, Kitagawa M, Hayakawa T, Case RM, Steward MC

Luminal ATP stimulates fluid and HCO₃⁻ secretion in guinea pig pancreas

Journal of Physiology 1999, 591(2): 551-558

Ivanenkov VV, Murphy-Piedmonte MM, Kirley TL

Bacterial Expression, Characterization and Disulfide Bond Determination of Soluble Human NTPDase6 (CD39L2) Nucleotidase: Implications for Structure and Function

Biochemistry 2003, 42: 11726-11735

J. Sambrook, E. Fritsch, and T. Maniatis

Molecular Cloning

Cold Spring Harbor Lab, NY 1989

Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA

Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum

Journal of Cell Biology 1993; 121: 317 – 333

Jang IS, Rhee JS, Kubota H, Akaike N, Akaike N

Developmental changes in P2X purinoceptors on glycinergic presynaptic nerve terminals projecting to rat substantia gelatinosa neurons

Journal of Physiology 2001, 536(Pt 2):505-219

Jo YH, Schlichter R

Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured neurons

Nature Neuroscience 1999, 2(3): 241-245

Julenius K, Mølgaard A, Gupta R, Brunak S

Prediction, conservation analysis and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites

Submitted to Glycobiology

Kabsch W, Holmes KC*The actin fold*

FASEB-Journal 1995, 9: 167-174

Kaczmarek E, Koziak K, Sévigne J, Siegel JB, Anrather J, Beaudin AR, Bach FH, Robson SC*Identification and Characterization of CD39/Vascular ATP Diphosphohydrolase*

The Journal of Biological Chemistry 1996, 271(51): 33116-33122

Kanjhan R, Housley GD, Burton LD, Christie DL, Kippenberger A, Thorne PR, Luo L, Ryan AF*Distribution of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channels in the rat central nervous system*

J Comp Neurol. 1999, 407(1):11-32

Kannan S*E-NTPDase/NTPDase: potential role as a regulatory element in inflammation*

Medical Hypotheses 2002, 58(6): 527-528

Kapoor JR, Sladek CD*Purinergic and Adrenergic Agonists Synergize in Stimulating Vasopressin and Oxytocin Release*

The Journal of Neuroscience 2000, 20(23): 8868–8875

Kapoor JR, Sladek CD*Substance P and NPY differentially potentiate ATP and adrenergic stimulated vasopressin and oxytocin release*

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2001, 280(1): R69-78

Kawamura M, Gachet C, Inoue K, Kato F*Direct excitation of inhibitory interneurons by extracellular ATP mediated by P2Y1 receptors in the hippocampal slice*

Journal of Neuroscience 2004,24(48):10835-10845

Kegel B, Braun N, Heine P, Maliszewski CR, Zimmermann H*An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain*

Neuropharmacology 1997, 36(9):1189-1200

Kennedy C, Todorov LD, Mihaylova-Todorova S, Sneddon P*Release of soluble nucleotidases: a novel mechanism for neurotransmitter inactivation?*

Trends in Pharmacological Sciences 1997, 18(8): 263-6

Kirley TL*Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase. Homology with the lymphoid cell activation antigen CD39*

Journal of Biological Chemistry 1997, 272(2):1076-81

Kirley TL, Yang F, Ivanenkov VV

Site-directed mutagenesis of human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3: the importance of conserved glycine residues and the identification of additional conserved protein motifs in eNTPDases

Archives of Biochemistry and Biophysics 2001, 395(1):94-102

Kittel A, Garrido M, Varga G

Localization of NTPDase1/CD39 in normal and transformed human pancreas

J Histochem Cytochem. 2002, 50(4):549-56

Kittel A, Pelletier J, Bigonnesse F, Guckelberger O, Kordas K, Braun N, Robson SC, Sevigny J

Localization of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (NTPDase1) and NTPDase2 in pancreas and salivary gland

J Histochem Cytochem 2004, 52(7):861-871

Knowles AF, Chiang W

Enzymatic and transcriptional regulation of human ecto-ATPase/E-NTPDase 2

Archives of Biochemistry and Biophysics 2003, 418: 217-227

Koizumi S, Saito Y, Nakazawa K, Nakajima K, Sawada JI, Kohsaka S, Illes P, Inoue K

Spatial and temporal aspects of Ca²⁺ signaling mediated by P2Y receptors in cultured rat hippocampal astrocytes

Life Science 2002, 72(4-5):431-442

Kong W, Engel K, Wang J

Mammalian Nucleoside Transporters

Current Drug Metabolism 2004, 5: 63-84

Kordas KS, Sperlagh B, Tihanyi T, Topa L, Steward MC, Varga G, Kittel A

ATP and ATPase secretion by exocrine pancreas in rat, guinea pig, and human

Pancreas 2004, 29(1):53-60

Kozak M

Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes

Gene 1999, 234(2):187-208

Kozak M

Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes

Nucleic Acids Research 1981, 9(20): 5233-5252

Koziak K, Kaczmarek E, Kittel A, Sévigne J, Blusztajan JK, Schulte am Esch J, Imai M, Guckelberger O, Goepfert C, Qawi I, Robson SC

Palmitolation Targets CD39/Endothelial ATP Diphosphoydrolase to Caveolae

The Journal of Biological Chemistry 2000, 275(3):2057-2062

Krämer A

The Structure and Function of Proteins involved in mammalian Pre-mRNA Splicing
Annual Reviews Biochemistry 1996, 65:367-409

Krogh A, Larsson B, von Heijne G, and Sonnhammer ELL

Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes
Journal of Molecular Biology 2001, 305(3):567-580

Krügel U, Kittner H, Franke H, Illes P

Purinergic modulation of neuronal activity in the mesolimbic dopaminergic system in vivo
Synapse 2003, 47(2):134-142

Krügel U, Kittner H, Illes P

Adenosine 5'-triphosphate-induced dopamine release in the rat nucleus accumbens in vivo
Neuroscience Letters 1999, 265(1):49-52

Krügel U, Kittner H, Illes P

Mechanisms of adenosine 5'-triphosphate-induced dopamine release in the rat nucleus accumbens in vivo
Synapse 2001, 39(3):222-232

Kügelgen I, Wetter A

Molecular pharmacology of P2Y-receptors
Naunyn-Schmiedeberg's Archiv of Pharmacological 2000, 362: 310-323

Kukulski F, Komoszynski M

Purification and characterization of NTPDase 1 (ectoapyrase) and NTPDase 2 (ecto-ATPase) from porcine brain cortex synaptosomes
European Journal of Biochemistry 2003, 270: 3447-3454

Kukulski F, Lévesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, Robsen SC, Kirley TL, Sevigny J

Comperative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDase1, 2, 3 and 8
Purinergic Signaling 2005, 1: 193-204

Kulkarni RN

The island β -cell
The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2004, 36: 365-371

Kunze WAA, Bertrand PB, Furness JB, Bornstein JC

Influence of the mucosa of the excitability of myenteric neurons
Neuroscience 1997, 76(2): 619-634

Kyte J, Doolittle RF

A simple method for displaying the hydropathic character of a protein

Journal of Molecular Biology 1982, 157(1):105-32

Lambeng N, Michel PP, Agid Y, Ruberg M

The relationship between differentiation and survival in PC12 cells treated with cyclic adenosine monophosphate in the presence of epidermal growth factor or nerve growth factor

Neuroscience Letters 2001, 297(2):133-136

Lambeng N, Michel PP, Brugg B, Agid Y, Ruberg M

Mechanisms of apoptosis in PC12 cells irreversibly differentiated with nerve growth factor and cyclic AMP

Brain Research 1999, 821(1):60-68

Lambrecht G

Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications

Naunyn-Schmiedeberg's Archiv of Pharmacological 2000, 362: 340-350

Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia OA

An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate

Anal Biochem. 1979, 100(1):95-97

Lara DR, Vianna MR, de Paris F, Quevedo J, Oses JP, Battastini AM, Sarkis JJ, Souza DO

Chronic treatment with clozapine, but not haloperidol, increases striatal ecto-5'-nucleotidase activity in rats

Neuropsychobiology 2001, 44(2):99-102

Lavoie EG, Kukulski F, Levesque SA, Lecka J, Sevigny J

Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3

Biochem Pharmacol. 2004, 67(10): 1917-1926

Le KT, Villeneuve P, Ramjaun AR, McPherson PS, Beaudet A, Seguela P

Sensory presynaptic and widespread somatodendritic immunolocalization of central ionotropic P2X ATP receptors

Neuroscience 1998, 83(1):177-190

Lechner SG, Dorostkar MM, Mayer M, Edelbauer H, Pankevych H, Boehm S

Autoinhibition of transmitter release from PC12 cells and sympathetic neurons through a P2Y receptor-mediated inhibition of voltage-gated Ca²⁺ channels

European Journal of Neuroscience 2004, 20(11):2917-2928

Lee HY, Bardini M, Burnstock G

P2X receptor immunoreactivity in the male genital organs of the rat

Cell Tissue Research 2000, 300(2):321-330

Leipziger J

Control of epithelial transport via luminal P2 receptors

American Journal of Physiology 2003, 284: F419–F432

Leitner JW, Sussman KE, Vatter AE, Schneider FH

Adenine nucleotides in the secretory granule fraction of rat islets

Endocrinology 1975, 96(3):662-677

Lemmens R, Vanduffel L, Kittel A, Beaudin AR, Benrezzak O, Sévigne J

Distribution, cloning, and characterization of porcine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1

European Journal of Biochemistry 2000, 267: 4106-4114

LePard KJ, Galligan JJ

Analysis of fast synaptic pathways in myenteric plexus of guinea pig ileum

American Journal of Physiology 1999, 276(2 Pt 1):G529-538

LePard KJ, Messori E, Galligan JJ

Purinergic fast excitatory postsynaptic potentials in myenteric neurons of guinea pig: distribution and pharmacology

Gastroenterology 1997, 113(5):1522-1534

Levitan IB, Kaczmarek LK

The Neuron: Cell and Molecular Biology

Oxford University Press (New York) 1997, second edition

Lewin B

Genes VI

Oxford University Press (New York) 1997

Liang SX, Motin L, Moussa CEH, Lavidis NA, Phillips WD

Spatial Distribution and Developmental Appearance of Postjunctional P2X₁ Receptors ofn Smooth Muscle Cells of the Mouse Vas Deferens

Synapse 2001, 42: 1-11

Lim W, Kim SJ, Yan HD, Kim J

Ca²⁺-channel-dependent and -independent inhibition of exocytosis by extracellular ATP in voltage-clamped rat adrenal chromaffin cells

Pflugers Archiv 1997, 435(1):34-42

Lin SH

Localisation of the Ecto-ATPase (Ecto-nucleotidase) in the Rat Hepatocyte Plasma Membrane – Implications for the Function of the Ecto-ATPases

The Journal of Biological Biochemistry 1989, 264(24): 14403-14407

Liu MAF

Overview of DNA vaccines

Ann N Y Acad Sci. 1995, 772:15-20

Llewellyn-Smith IJ, Burnstock G*Ultrastructural localization of P2X3 receptors in rat sensory neurons*

Neuroreport 1998, 9(11):2545-2550

Loesch A, Miah S, Burnstock G*Ultrastructural localisation of ATP-gated P2X2 receptor immunoreactivity in the rat hypothalamo-neurohypophysial system*

Journal of Neurocytology 1999, 28(6):495-504

Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A*Chain migration of neuronal precursors*

Science 1996, 271(5251):978-981

Luo X, Zheng W, Yan M, Lee MG, Muallem S*Multiple functional P2X and P2Y receptors in the luminal and basolateral membranes of pancreatic duct cells*

American Physiology Society 1999, 277: C205-C214

Madhavan R, Peng HB*A synaptic balancing act: local and global signaling in the clustering of ACh receptors at vertebrate neuromuscular junctions*

J Neurocytol. 2003, 32(5-8):685-696

Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, Armitage RJ, Fanslow WC, Nakajima T, Baker E, Sutherland GR, Poindexter K, Birks C, Alpert A, Friend D, Gimpel SD, Gayle III RB*The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization*

Journal of Immunology 1994, 153(8):3574-3583

Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos HF, Islam Naziba, Alyonycheva TN, Safler LB, Jaijar KA, Posnett DN, Schoenborn MA, Schooley KA, Gayle RB, Maliszewski CR*The Endothelial Cell Ecto-ADPase REsponsible for Inhibition of PlateletFunktion is CD39*

The Journal of Clinical Investigation 1997, 99(6): 1351-1360

Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Pinsky DJ, Sesti C, Levi R*Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1)*

J Thromb Haemost. 2003, 1(12):2497-509

Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Pinsky DJ, Sesti C, Levi R*Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases*

J Pharmacol Exp Ther. 2003b, 305(1):9-16

Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Pinsky DJ, Islam N, Gayle III RB, Maliszewski CR

Thromboregulation by Endothelial Cells: Significance for Occlusive Vascular Diseases
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001, 21: 178-182

Mateo J, Harden TK, Boyer JL

Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase
British Journal of Pharmacology 1999, 128(2):396-402

Mateo J, Kreda S, Henry CE, Harden TK, Boyer JL

Requirement of Cys³⁹⁹ for Processing of the Human Ecto-ATPase (NTPDase2) and Its Implication of the Activitis of Splice Variants of the Enzyme
The Journal of Biochemistry Chemistry 2003, 278(41): 39960-39968

Matsuo K, Katsuragi T, Fujiki S, Sato C, Furukawa T

ATP release and contraction mediated by different P2-receptor subtypes in guinea-pig ileal smooth muscle
British Journal of Pharmacology 1997, 121(8):1744-748

Mayfield RD, Jones BA, Miller HA, Simosky JK, Larson GA, Zahniser NR

Modulation of endogenous GABA release by an antagonistic adenosine A1/dopamineD1 receptor interaction in rat brain limbic regions but not basal ganglia
Synapse 1999, 33(4):274-281

McNicol A, Israels SJ

Platelets and Anti-platelet Therapy
Journal of Pharmacological Science 2003, 93: 381-396

Mendoza-Fernandez V, Andrew RD, Barajas-Lopez C

ATP Inhibits Glutamate Synaptic Release by Acting at P2Y REceptors in Pyramidal Neurons of Hippocampal Slices
The Journal of Pharmacology and Experemental Therapeutics 2000, 293(1): 172-179

Michel PP, Vyas S, Agid Y

Synergistic differentiation by chronic exposure to cyclic AMP and nerve growth factor renders rat phaeochromocytoma PC12 cells totally dependent upon trophic support for survival
European Journal of Neuroscience 1995, 7(2):251-260

Middlemiss PJ, Glasky AJ, Rathbone MP, Werstuik E, Hindley S, Gysbers J

AIT-082, a unique purine derivative, enhances nerve growth factor mediated neurite outgrowth from PC12 cells
Neuroscience Letters 1995, 199(2):131-134

Mihaylova-Todorova S, Todorov LD, Westfall DP

Correlation between the Release of the Sympathetic Neurotransmitter ATP and Soluble Nucleotidases from the Guinea Pig Vas Deferens
The Journal of Pharmacology And Expermental Thearapeutics 2001, 296(1): 64-70

Mihaylova-Todorova ST, Todorov LD, Westfall DP

Enzyme kinetics and pharmacological characterization of nucleotidases released from the guinea pig isolated vas deferens during nerve stimulation: evidence for a soluble ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-like ATPase and a soluble ecto-5'-nucleotidase-like AMPase

J Pharmacol Exp Ther. 2002, 302(3):992-1001

Millan MJ

The induction of pain: an integrative review

Progress in Neurobiologie 1999, 57(1):1-164

Miras-Portugal MT, Gualix J, Pintor J

The neurotransmitter role of diadenosin polyphosphates

FEBS Letters 1998, 430: 78-82

Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC, Sevigne J, Matsue H, Enyoji K, Takashima A

CD39 is the dominant Langerhans cell – associated ecto-NTPDase: Modulatory roles in inflammation and immune responsiveness

Nature Medicine 2002, 8(4): 358-365

Monro RL, Bertrand PP, Bornstein JC

ATP and 5-HT are the principal neurotransmitters in the descending excitatory reflex pathway of the guinea-pig ileum

Neurogastroenterol Motil. 2002, 14(3):255-264

Mori A, Shindou T

Modulation of GABAergic transmission in the striatopallidal system by adenosine A2A receptors: a potential mechanism for the antiparkinsonian effects of A2A antagonists

Neurology 2003, 61(11 Suppl 6):S44-S48

Mori M, Heuss C, Gahwiler BH, Gerber U

Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures

Journal of Physiology 2001, 535(Pt 1):115-123

Mulero JJ, Yeung G, Nelken ST, Bright JM, McGowan DW, Ford JE

Biochemical characterization of CD39L4

Biochemistry 2000, 39(42):12924-12928

Mulero JJ, Yeung G, Nelken ST, Ford JE

CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates

Journal of Biological Chemistry 1999, 274(29): 20064-20067

Mullis KB, Faloona FA

Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction

Methods Enzymology 1987;155:335-50

Mulryan K, Gitterman DP, Lewis CJ, Vial C, Leckie BJ, Cobb AL, Brown JE, Conley EC, Buell G, Pritchard CA, Evans RJ

Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X₁ receptors
Nature 2000, 403(6765): 86-9

Munro S, Pelham HR

A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins
Cell 1987, 48(5):899-907

Murphy DM, Ivanenkov VV, Kirley TL

Identification of Cysteine Residues Responsible for Oxidative Crosslinking and Chemical Inhibition of Human Nucleoside-triphosphate Diphosphohydrolase 3
The Journal of Biological Chemistry 2002, 277(8): 6162-6196

Murphy DM, Ivanenkov VV, Kirley TM

Bacterial Expression and Characterization of a Novel, Soluble, Calcium-Binding and Calcium-Activated Human Nucleotidase
Biochemistry 2003, 42: 2412-2421

Murphy DM, Kirley TL

Asparagin 81, an invariant glycosylation site near Apyrase conserved region 1, is essential for full enzymatic activity of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3
Archives of Biochemistry and Biophysics 2003b, 413: 107-115

Nagy AK, Knowles AF, Nagami GT

Molecular cloning of the chicken oviduct ecto-ATP-diphosphohydrolase
Journal of Biological Chemistry 1998, 273(26): 16043-16049

Nakai, K, Kanehisa M

A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells
Genomics 1992, 14: 897-911

Nakatsuka T, Gu JG

ATP P2X receptor-mediated enhancement of glutamate release and evoked EPSCs in dorsal horn neurons of the rat spinal cord
Journal of Neuroscience 2001, 21(17):6522-6531

Nakatsuka T, Tsuzuki K, Ling JX, Sonobe H, Gu JG

Distinct roles of P2X receptors in modulating glutamate release at different primary sensory synapses in rat spinal cord
Journal of Neurophysiology 2003, 89(6):3243-3252

Nam SW, Clair T, Campo CK, Lee HY, Liotta LA, Stracke ML

Autotaxin (ATX), a potent tumor motogen, augments invasive and metastatic potential of ras-transformed cells
Oncogene 2000, 19: 241-247

Nattie E

CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing
Progress in Neurobiology 1999,, 59(4):299-331

Nedeljkovic N, Banjac A, Horvat A, Stojiljkovic M, Nikezic G

Developmental profile of NTPDase activity in synaptic plasma membranes isolated from rat cerebral cortex
Int J Dev Neurosci. 2005, 23(1): 45-51

Nedeljkovic N, Banjac A, Horvat A, Stojiljkovic M, Nikezic G

Ecto-ATPase and ecto-ATP-diphosphohydrolase are co-localized in rat hippocampal and caudate nucleus synaptic plasma membranes
Physiol Res. 2003, 52(6): 797-804

Nielsen H, Brunak S, von Heijne G

Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals
Protein Engineering 1999, 12(1): 3-9

Nilsson T, Jackson M, Peterson PA

Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum
Cell 1989, 58(4):707-18

Nitahara K, Kittel A, Liang SD, Vizi ES

A1-receptor-mediated effect of adenosine on the release of acetylcholine from the myenteric plexus: role and localization of ecto-ATPase and 5'-nucleotidase
Neuroscience 1995, 67(1):159-168

Novak I

ATP as a signaling Molecule: the Exocrine Focus
News in Physiological Science 2003, 18: 12-17

Novak I, Nischke R, Amstrup J

Purinergic Receptors Have Different Effects in Rat Exocrine Pancreas. Calcium Signals Monitored by Fura-2 Using Confocal Microscopy
Cellular Physiology and Biochemistry 2002, 12: 83-92

Nörenberg W, Illes P

Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2000, 362(4-5):324-339

Nurgali K, Furness JB, Stebbing MJ

Analysis of purinergic and cholinergic fast synaptic transmission to identified myenteric neurons
Neuroscience 2003, 116(2):335-347

Nurse CA, Zhang M

Synaptic mechanisms during re-innervation of rat arterial chemoreceptors in co-culture
Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2001, 130(2):241-251

Ogura T, Wilkinson AJ

AAA⁺ superfamily ATPases: common structure diverse funktion
Gene to Cells 2001, 6: 575-597

Okada M, Kawata Y, Murakami T, Wada K, Mizuno K, Kaneko S

Interaction between purinoceptor subtypes on hippocampal serotonergic transmission using in vivo microdialysis
Neuropharmacology 1999,38: 707-715

Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, Wakamatsu A, Hayashi K, Sato H, Nagai K, Kimura K, Makita H, Sekine M, Obayashi M, Nishi T, Shibahara T, Tanaka T, Ishii S, Yamamoto J, Saito K, Kawai Y, Isono Y, Nakamura Y, Nagahari K, Murakami K, Yasuda T, Iwayanagi T, Wagatsuma M, Shiratori A, Sudo H, Hosoiri T, Kaku Y, Kodaira H, Kondo H, Sugawara M, Takahashi M, Kanda K, Yokoi T, Furuya T, Kikkawa E, Omura Y, Abe K, Kamihara K, Katsuta N, Sato K, Tanikawa M, Yamazaki M, Ninomiya K, Ishibashi T, Yamashita H, Murakawa K, Fujimori K, Tanai H, Kimata M, Watanabe M, Hiraoka S, Chiba Y, Ishida S, Ono Y, Takiguchi S, Watanabe S, Yosida M, Hotuta T, Kusano J, Kanehori K, Takahashi-Fujii A, Hara H, Tanase TO, Nomura Y, Togiya S, Komai F, Hara R, Takeuchi K, Arita M, Imose N, Musashino K, Yuuki H, Oshima A, Sasaki N, Aotsuka S, Yoshikawa Y, Matsunawa H, Ichihara T, Shiohata N, Sano S, Moriya S, Momiyama H, Satoh N, Takami S, Terashima Y, Suzuki O, Nakagawa S, Senoh A, Mizoguchi H, Goto Y, Shimizu F, Wakebe H, Hishigaki H, Watanabe T, Sugiyama A, Takemoto M, Kawakami B, Yamazaki M, Watanabe K, Kumagai A, Itakura S, Fukuzumi Y, Fujimori Y, Komiyama M, Tashiro H, Tanigami A, Fujiwara T, Ono T, Yamada K, Fujii Y, Ozaki K, Hirao M, Ohmori Y, Kawabata A, Hikiji T, Kobatake N, Inagaki H, Ikema Y, Okamoto S, Okitani R, Kawakami T, Noguchi S, Itoh T, Shigeta K, Senba T, Matsumura K, Nakajima Y, Mizuno T, Morinaga M, Sasaki M, Togashi T, Oyama M, Hata H, Watanabe M, Komatsu T, Mizushima-Sugano J, Satoh T, Shirai Y, Takahashi Y, Nakagawa K, Okumura K, Nagase T, Nomura N, Kikuchi H, Masuho Y, Yamashita R, Nakai K, Yada T, Nakamura Y, Ohara O, Isogai T, Sugano S

Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs
Nature Genetics 2004, 36(1):40-45

Owen DJ, Evans PR

A Structural Explanation for Recognition of Tyrosine-Based Endocytotic Signals
Science 1998, 282: 1327-1332

Paez JG, Recio JA, Rouzaut A, Notario V

Identity between the PCPH proto-oncogene and the CD39L4 (ENTPD5) ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase gene
Int J Oncol 2001, 19(6):1249-1254

Page RDM

TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers

Computer Applications in the Biosciences 1996, 12: 357-358

Pankratov Y, Castro E, Miras-Portugal MT, Krishtal O

A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus

European Journal of Neuroscience 1998, 10(12):3898-3902

Pankratov Y, Lalo U, Krishtal O, Verkhratsky A

Ionotropic P2X purinoreceptors mediate synaptic transmission in rat pyramidal neurones of layer II/III of somato-sensory cortex

Journal of Physiology 2002b, 542(Pt 2):529-536

Pankratov Y, Lalo U, Krishtal O, Verkhratsky A

P2X receptor-mediated excitatory synaptic currents in somatosensory cortex

Mol Cell Neurosci. 2003, 24(3):842-849

Pankratov YV, Lalo UV, Krishtal OA

Role for P2X receptors in long-term potentiation

Journal of Neuroscience 2002,22(19):8363-8369

Papp L, Balazsa T, Kofalvi A, Erdelyi F, Szabo G, Vizi ES, Sperlagh B

P2X receptor activation elicits transporter-mediated noradrenaline release from rat hippocampal slices

J Pharmacol Exp Ther. 2004, 310(3): 973-980

Peri S, Pandey A

A reassessment of the translation initiation codon in vertebrates

Trends in Genetics 2001, 17(12):685-7

Peterson GL

A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable

Anal Biochem. 1977, 83(2):346-56.

Phillips ML, Schultz BD

Steroids modulate transepithelial resistance and Na(+) absorption across cultured porcine vas deferens epithelia.

Biology of Reproduction 2002, 66(4): 1016-1023

Pintor J, Diaz-Hernandez M, Bustamante C, Gualix J, de Terreros FJ, Miras-Portugal MT

Presence of dinucleotide and ATP receptors in human cerebrocortical synaptic terminals

European Journal of Pharmacology 1999, 366(2-3):159-165

Poelchen W, Sieler D, Wirkner K, Illes P

Co-transmitter function of ATP in central catecholaminergic neurons of the rat
Neuroscience 2001, 102(3):593-602

Pollastri G, Baldi P, Fariselli P, Casadio R

Improved Prediction of the Number of Residue Contacts in Proteins by Recurrent Neural Networks
Bioinformatics 2001, 17(1): 234-242

Pollastri G, Przybylski D, Rost B, Baldi P

Improving the Prediction of Protein Secondary Structure in Three and Eight Classes Using Recurrent Neural Networks and Profiles
Proteins 2002, 47: 228-235

Pollastri, Baldi P, Fariselli, Casadio R

Prediction of Coordination Number and Relative Solvent Accessibility in Proteins
Proteins 2002b, 47: 142-153

Pond L, Kuhn LA, Teyton L, Schutze MP, Tainer JA, Jackson, Peterson PA

A Role for Acidic Residues in Di-leucine Motif-based Targeting to the Endocytic Pathway
The Journal of Biological Chemistry 1995, 270(34): 19989-19997

Prasad M, Fearon IM, Zhang M, Laing M, Vollmer C, Nurse CA

Expression of P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat carotid body afferent neurones: role in chemosensory signalling
Journal of Physiology 2001, 537(Pt 3):667-677

Proudfoot NJ, Brownlee GG

3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA
Nature 1976, 263(5574):211-214

Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A

Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects
J Exp Med. 1958, 108(6):945-56

Puntervoll P, Linding R, Gemünd C, Chabanis-Davidson S, Mattingsdal M, Cameron S, Martin DMA, Ausiello G, Brannetti B, Costantini A, Ferrè F, Maselli V, Via A, Cesareni G, Diella F, Superti-Furga G, Wyrwicz L, Ramu C, McGuigan C, Gudavalli R, Letunic I, Bork P, Rychlewski L, Küster B, Helmer-Citterich M, Hunter WN, Aasland R, Gibson TJ

ELM server: a new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins.
Nucleic Acids Res.2003, 31: 3625-3630

Queiroz G, Diniz C, Goncalves J

Facilitation of noradrenaline release by adenosine A(2A) receptors in the epididymal portion and adenosine A(2B) receptors in the prostatic portion of the rat vas deferens
European Journal of Pharmacology 2002, 448(1): 45-50

Queiroz G, Quintas C, Talaia C, Goncalves J

Coupling to protein kinases A and C of adenosine A2B receptors involved in the facilitation of noradrenaline release in the prostatic portion of rat vas deferens
Neuropharmacology 2004, 47(2): 216-24

Queiroz G, Talaia C, Goncalves J

ATP Modulates Noradrenaline Release by Activation of Inhibitory P2Y Receptors and Facilitatory P2X Receptors in the Rat Vas Deferens
The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2003a, 307(2): 809-815

Queiroz G, Talaia C, Goncalves J

Adenosine A2A receptor-mediated facilitation of noradrenaline release involves protein kinase C activation and attenuation of presynaptic inhibitory receptor-mediated effects in the rat vas deferens
Journal of Neurochemistry 2003b,85(3): 740-8

Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysbers JW, Andrew G, Herman MAR, Reed JK, Cccarelli R, Di Iorio P, Caciagli F

Trophic Effects of Purines in Neurons and Glial Cells
Progress in Neurobiology 1999, 59: 663-690

Redegeld FA, Caldwell CC, Sitkovsky MV

Ecto-protein kinases: ecto-domain phosphorylation as a novel target for pharmacological manipulation?
Trends in Pharmacology Science 1999, 20(11):453-459

Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D

Improved Splice Site Detection in Genie
J Comp Biol 1997 4(3): 311-23

Renart J, Reiser J, Stark GR

Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure
Proc Natl Acad Sci U S A. 1979,76(7):3116-20

Rhee JS, Wang ZM, Nabekura J, Inoue K, Akaike N

ATP facilitates spontaneous glycinergic IPSC frequency at dissociated rat dorsal horn interneuron synapses
Journal of Physiology 2000, 524 Pt 2:471-483

Robaye B, Ghanem E, Wilkin F, Fokan D, Van Driessche W, Schurmans S, Boeynaems JM, Beauwens R

Loss of nucleotide regulation of epithelial chloride transport in the jejunum of P2Y4-null mice

Molecular Pharmacology 2003, 63(4):777-783

Robertson SJ, Edwards FA

ATP and glutamate are released from separate neurons in the rat medial habenula nucleus: frequency dependence and adenosin-mediated inhibition of release

Journal of Physiology 1998, 508(3): 691-701

Robson SC, Enjyoji K, Geopfert C, Imai M, Kaczmarek E, Lin Y, Sévigny J, Warny M

Modulation of Extracellular Nucleotide-Mediated Signaling by CD39/Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-1

Drug Development Research 2001, 53: 193-207

Rodriguez-Boulan E, Gonzales A

Glycans in post-Golgi apical targeting: sorting signals or structural probs?

Trends in Cell Biology 1999, 9: 291-294

Rosin DL, Hettinger BD, Lee A, Linden J

Anatomy of adenosine A2A receptors in brain: morphological substrates for integration of striatal function

Neurology 2003, 61(11 Suppl 6):S 12-8

Rosin DL, Robeva A, Woodard RL, Guyenet PG, Linden J

Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system

J Comp Neurol. 1998, 401(2):163-186

Rubio ME, Soto F

Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations

Journal of Neuroscience 2001, 21(2):641-53

Rücker B, Pochmann D, Furstenau CR, Carneiro-Ramos MS, Battastini AM, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ

Effects of steroid hormones on synaptosomal ectonucleotidase activities from hippocampus and cortex of adult female rats

Gen Comp Endocrinol. 2005, 140(2):94-100

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase

Science 1988, 239(4839):487-491

Sambrook J, Fritsch, EF, Maniatis T*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*Cold Spring Harbor (N.Y.) Laboratory Press 1989, 2nd Edition**Sansum AJ, Chessell IP, Hicks GA, Trezise DJ, Humphrey PP***Evidence that P2X purinoceptors mediate the excitatory effects of alphanbetamethylene-ADP in rat locus coeruleus neurones*

Neuropharmacology 1998, 37(7):875-885

Sawynok J*Adenosine receptor activation and nociception*

European Journal of Pharmacology 1998, 347(1):1-11

Scemes E, Suadicani SO, Spray DC*Intercellular communication in spinal cord astrocytes: fine tuning between gap junctions and P2 nucleotide receptors in calcium wave propagation*

Journal of Neuroscience 2000, 20(4):1435-1445

Schiffmann SN, Dassel D, d'Alcantara P, Ledent C, Swillens S, Zoli M*A2A receptor and striatal cellular functions: regulation of gene expression, currents, and synaptic transmission*

Neurology 2003, 61(11 Suppl 6): S24-29

Schimanski LA, Nguyen PV*Multidisciplinary approaches for investigating the mechanisms of hippocampus-dependent memory: a focus on inbred mouse strains*

Neurosci Biobehav Rev. 2004, 28(5):463-483

Schoenborn MA, Jenkins NA, Copeland NG, Gilbert DJ, Gayle RB 3rd, Maliszewski CR*Gene structure and chromosome location of mouse Cd39 coding for an ecto-apyrase*

Cytogenet Cell Genet. 1998, 81(3-4):287-289

Schrier SM, Florea BI, Mulder GJ, Nagelkerke JF, IJzerman AP*Apoptosis induced by extracellular ATP in the mouse neuroblastoma cell line NIE-115: studies on involvement of P2 receptors and adenosine*

Biochemical Pharmacology 2002, 63(6):1119-1126

Schulte am Esch II J, Sévigny J, Kaczmarek E, Siegel, JB, Imai M, Koziak K, Beaudoin AR, Robson SC*Structural Elements and Limited Proteolysis of CD39 Influence ATP Diphosphohydrolase Activity*

Biochemistry 1999, 38: 2248-2258

Schutze MP, Peterson PA, Jackson MR*An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum*

EMBO Journal 1994, 13: 1696-705

Schwiebert EM, Zsembery A*Extracellular ATP as signaling molecule for epithelial cells*

Biochimica et Biophysica Acta 2003, 1615: 7-32

Sedlacek RL, Carlin RW, Singh AK, Schultz BD*Neurotransmitter-stimulated ion transport by cultured porcine vas deferens epithelium*

American Journal of Physiology: Renal Physiology 2001, 281(3):F557-570

Sevigny J, Grondin G, Gendron FP, Roy J, Beaudoin AR*Demonstration and immunolocalization of ATP diphosphohydrolase in the pig digestive system*

American Journal of Physiology 1998, 275(3 Pt 1):G473-482

Sévigny J, Sundberg C, Braun N, Guckelberger O, Csizmadia E, Qawi I, Imai M, Zimmermann H, Robson SC*Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation*

Blood 2002, 99(8):2801-2809

Shariatmadari R, Sipila P, Vierula M, Tornquist K, Huhtaniemi I, Poutanen M*Adenosine triphosphate induces Ca²⁺ signal in epithelial cells of the mouse caput epididymis through activation of P2X and P2Y purinergic receptors*

Biol Reprod. 2003, 68(4): 1185-1192

Shen KZ, North RA*Excitation of rat locus coeruleus neurons by adenosine 5'-triphosphate: ionic mechanism and receptor characterization*

Journal of Neuroscience 1993, 13(3):894-989

Shi JD, Kukar T, Wang CY, Li QZ, Cruz PE, Davoodi-Semiromi A, Yang P, Gu Y, Lian W, Wu DH, She JX*Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1)*

Journal of Biological Chemistry 2001, 276(20): 17474-17478

Shibuya I, Tanaka K, Hattori Y, Uezono Y, Harayama N, Noguchi J, Ueta Y, Izumi F, Yamashita H*Evidence that multiple P2X purinoceptors are functionally expressed in rat supraoptic neurones*

Journal of Physiology 1999, 514 (Pt 2):351-367

Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Tsuda M, Ohsawa K, Kohsaka S, Inoue K*Mechanisms underlying extracellular ATP-evoked interleukin-6 release in mouse microglial cell line, MG-5*

Journal of Neurochemistry 2001, 78: 1339-1349

Slater M, Barden JA, Murphy CR

The purinergic calcium channels P2X_{1,2,5,7} are down-regulated while P2X_{3,4,6} are up-regulated during apoptosis in the ageing rat prostate
Histochemical Journal 2000, 32(9):571-580

Smith DW, Buller KM, Day TA

Role of Ventrolateral Medulla Catecholamine Cells in Hypothalamic Neuroendocrine Cell Response to Systemic Hypoxia
The Journal of Neuroscience 1995, 15(12): 7979-7988

Smith TM, Kirley TL

Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases
Biochim Biophys Acta 1998, 1386(1):65-78

Smith TM, Carl SAL, Kirley TL

Mutagenesis of Two Conserved Tryptophan Residues of the E-Type ATPases: Inactivation and Conversion of an Ecto-Apyrase to an Ecto-NTPase
Biochemistry 1999a, 38: 5849-5857

Smith TM, Kirley TL

Site-Direct Mutagenesis of a Human Brain Ecto-Apyrase: Evidence That the E-Type ATPases Are Related to the Actin/Heat Shock 70/Sugar Kinase Superfamily
Biochemistry 1999b, 38: 321-328

Smith TM, Kirley TL

Glycosylation Is Essential for Functional Expression of a Human Brain Ecto-apyrase
Biochemistry 1999c, 38: 1509-0516

Smith TM, Hicks Berger CA, Kim S, Kirley TL

Cloning, expression and characterization of a soluble calcium-activated nucleotidase, a human enzyme belonging to a new familieof extracellular nucleotidases
Archives of Biochemistry and Biophysics 2002, 406: 105-115

Sokolov EN, Nezlina NI

Long-term memory, neurogenesis, and signal novelty
Neurosci Behav Physiol. 2004, 34(8):847-857

Sokolova E, Grishin S, Shakirzyanova A, Talantova M, Giniatulin R

Distinct receptors and different transduction mechanisms for ATP and andenosine at the frog motor nerve endings
European Journal of Neuroscience 2003, 18: 1254-1264

Sorensen CE, Amstrup J, Rasmussen HN, Ankorina-Stark I, Novak I

Rat pancreas secretes particulate ecto-nucleotidase CD39
Journal of Physiology 2003, 551(3): 881-892

Sorensen CE, Novak I

Visualisation of ATP-Release in Pancreatic Acini in Response to cholinergic Stimulus
The Journal of Biological Chemistry 2001, 276(35): 32925-32932

Soto F, Rubio ME

Cloned P2X Receptor Subunits in Cerebellum and Hippocampus
Drug Development Research 2001, 52:133-139

Spector T

Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0,5 to 50 microgram of protein
Analytical Biochemistry 1978, 86(1): 142-146

Spehr J, Spehr M, Hatt H, Wetzel CH

Subunit-specific P2X-receptor expression defines chemosensory properties of trigeminal neurons
European Journal of Neuroscience 2004, 19(9):2497-2510

Spencer NJ, Walsh M, Smith TK

Purinergic and cholinergic neuro-neuronal transmission underlying reflexes activated by mucosal stimulation in the isolated guinea pig ileum
Journal of Physiology 2000, 522(2): 321-331

Sperlágh B, Andás I, Vizi ES

Effect of Subtype-Specific Ca²⁺-Antagonists and dCa²⁺-Free Media on the Field Stimulation-Evoked Release of ATP and [³H]Acetylcholine from Rat Habenula Slices
Neurochemical Research 1997, 22(8): 967-975

Sperlágh B, Kittel Á, Lajtha A, Vizi ES

ATP Acts As Fast Neurotransmitter In Rat Habenula: Neurochemical And Enzymocytochemical Evidence
Neuroscience 1995, 66(4): 915-920

Sperlágh B, Köfalvi A, Deuchars J, Atkinson L, Milligan CJ, Buckley NJ, Vizi ES

Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus
Journal of Neurochemistry 2002, 81: 1196-1211

Sperlagh B, Mergl Z, Juranyi Z, Vizi ES, Makara GB

Local regulation of vasopressin and oxytocin secretion by extracellular ATP in the isolated posterior lobe of the rat hypophysis
Journal of Endocrinology 1999, 160(3):343-50

Sperlágh B, Sershen H, Lajtha A, Vizi ES,

Co-Release Of Endogenous ATP and [³H]Noradrenaline From Rat Hypothalamic Slices: Origin And Modulation By α_2 -Adrenoceptors
Neuroscience 1998, 8(2): 511-520

Spyer KM, Dale N, Gourine AV

ATP is a key mediator of central and peripheral chemosensory transduction

Exp Physiol. 2004, 89(1):53-59

Spyer KM, Thomas T

A role for adenosine in modulating cardio-respiratory responses: a mini-review

Brain Research Bulletin 2000, 53(1):121-124

Squire LR

Memory systems of the brain: a brief history and current perspective

Neurobiol Learn Mem. 2004, 82(3):171-177

Stout JG, Kirley TL

Control of cell membrane ecto-ATPase by oligomerization state: intermolecular cross-linking modulates ATPase activity

Biochemistry 1996, 35(25): 8289-8298

Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF, Zeeberg B, Buetow KH, Schaefer CF, Bhat NK, Hopkins RF, Jordan H, Moore T, Max SI, Wang J, Hsieh F, Diatchenko L, Marusina K, Farmer AA, Rubin GM, Hong L, Stapleton M, Soares MB, Bonaldo MF, Casavant TL, Scheetz TE, Brownstein MJ, Usdin TB, Toshiyuki S, Carninci P, Prange C, Raha SS, Loquellano NA, Peters GJ, Abramson RD, Mullahy SJ, Bosak SA, McEwan PJ, McKernan KJ, Malek JA, Gunaratne PH, Richards S, Worley KC, Hale S, Garcia AM, Gay LJ, Hulyk SW, Villalon DK, Muzny DM, Sodergren EJ, Lu X, Gibbs RA, Fahey J, Helton E, Ketteman M, Madan A, Rodrigues S, Sanchez A, Whiting M, Madan A, Young AC, Shevchenko Y, Bouffard GG, Blakesley RW, Touchman JW, Green ED, Dickson MC, Rodriguez AC, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Butterfield YS, Krzywinski MI, Skalska U, Smailus DE, Schnerch A, Schein JE, Jones SJ, Marra MA; Mammalian Gene Collection Program Team

Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences

Proc Natl Acad Sci U S A. 2002, 99(26):16899-16903

Strohmeyer GR, Reppert SM, Lencer WI, Madara JL

The A_{2b} Adenosine Receptor Mediates cAMP Responses to Adenosine Receptor Agonists in Human Intestinal Epithelia

The Journal of Biological Chemistry 1995, 270(5): 2387-2394

Suadicani SO, De Pina-Benabou MH, Urban-Maldonado M, Spray DC, Scemes E

Acute downregulation of Cx43 alters P2Y receptor expression levels in mouse spinal cord astrocytes

Glia 2003, ;42(2):160-1671

Taesdaile RD, Jackson MR

Signal-Mediated Sorting Of Membrane Proteines Between The Endoplasmatic Reticulum And The Golgi Apparatus

Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 1996, 12: 27-54

Terlecky SR, Fransen M

How peroxisomes arise

Traffic 2000, 1(6):465-473

Theobald RJ

Purinergic and choninergetic components of bladder contractility and flow

Life Science 1995, 56(6): 445-454

Thirion S, Troadec JD, Nicaise G

Cytochemical localization of ecto-ATPases in rat neurohypophysis

J Histochem Cytochem. 1996, 44(2):103-111

Thomas T, Ralevic V, Bardini M, Burnstock G, Spyer KM

Evidence for the involvement of purinergic signalling in the control of respiration

Neuroscience 2001, 107(3): 481-490

Thomas T, Spyer KM

ATP as a mediator of mammalian central CO₂ chemoreception

Journal of Physiology 2000, 523 Pt 2: 441-447

Thompson,J.D., Gibson,T.J., Plewniak,F., Jeanmougin,F. and Higgins,D.G.

The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.

Nucleic Acids Research 1997, 24:4876-4882

Thorn JA, Jarvis SM

Adenosine Transporters

General Pharmacology 1996, 27(4): 613-620

Todorov LD, Mihaylova-Todorova S, Westfall TD, Sneddon P, Kennedy C, Bjur RA, Westfall DP

Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation

Nature 1997, 387(6628): 76-79

Todorov LD, Mihaylova-Todorova S, Westfall TD, Sneddon P, Kennedy C, Bjur RA, Westfall DP

Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation

Nature 1997, 387(6628):76-79

Torres IL, Battastini AM, Buffon A, Furstenau CR, Siqueira I, Sarkis JJ, Dalmaz C, Ferreira MB

Ecto-nucleotidase activities in spinal cord of rats changes as function of age
Int J Dev Neurosci. 2003, 21(8):425-429

Torres IL, Buffon A, Silveira PP, Duarte MZ, Bassani MG, Oliveira SS, Battastini AM, Sarkis JJ, Dalmaz C, Ferreira MB

Effect of chronic and acute stress on ectonucleotidase activities in spinal cord
Physiol Behav. 2002, 75(1-2):1-5

Trepel M

Neuroanatomie: Struktur und Funktion
Urban&Fischer (München) 2004, 3. Auflage

Troadec JD, Thirion S, Petturiti D, Poujeol P

Potassium efflux triggered by P2Y purinoceptor activation in cultured pituicytes
Pflügers Archiv – European Journal of Physiology 2000, 440: 770-777

Troadec JD, Thirion S

Multifaceted purinergic regulation of stimulus-secretion coupling in the neurohypophysis
Neuroendocrinology Letters 2002, 23: 273-280

Troadec JD, Thirion S, Nicaise G, Lemos JR, Dayanithi G

ATP-evoked increases in $[Ca^{2+}]_i$ and peptide release from rat isolated neurohypophysial terminals via a P2X2 purinoceptor
Journal of Physiology 1998, 511 (Pt 1):89-103

Troadec JD, Thirion S, Petturiti D, Bohn MT, Poujeol

ATP acting on P2Y receptors triggers calcium mobilization in primary cultures of rat neurohypophysial astrocytes (pituicytes)
Pflügers Archiv – European Journal of Physiology 1999, 437: 745-753

Trombetta ES

The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmatic reticulum to glycoprotein biosynthesis
Glycobiology 2003, 13(9): 77-91

Trombetta ES, Helenius A

Glycoprotein reglucosylation and nucleotide sugar utilization in the secretory pathway: identification of a nucleoside diphosphatase in the endoplasmic reticulum
European Molecular Biology Organization 1999, 18(12): 3282-3292

Unsworth CD, Johnson RG

*Acetylcholine and ATP are coreleased from the electromotor nerve terminals of *Narcine brasiliensis* by an exocytotic mechanism*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87:553-557

van Vliet C, Thomas EC, Merino-Trigo A, Teasdale RD, Gleeson PA

Intracellular sorting and transport of proteins

Progress in Biophysics & Molecular Biology 2003, 83: 1-45

Vartian N, Boehm S

P2Y receptor-mediated inhibition of voltage-activated Ca(2+) currents in PC12 cells

European Journal of Neuroscience 2001, 13(5):899-908

Vasconcelos EG, Ferreira ST, de Carvalho TMU, de Souza W, Kettlun AM, Mancilla M, Valenzuela MA, Verjovski-Almeida S

Partial Purification and Immunohistochemical Localisation of ATP Diphosphoydrolase from Schistosoma mansoni

The Journal of Biological Chemistry 1996, 271(36): 22139-22149

Ventura S, Dewalagama RK, Lau LC

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) is an excitatory cotransmitter with noradrenaline to the smooth muscle of the rat prostate gland.

British Journal of Pharmacology 2003, 138(7): 1277-1284

Vlajkovic SM, Thorne PR, Sévigne J, Robson SC, Housley GD

NTPDase1 and NTPDase2 Immunolocalization in Mouse Cochlea: Implications for Regulation of P2 Receptor Signaling

The Journal of Histochemistry & Cytochemistry 2002, 50(11): 1435-1441

Vogel M, Kowalewski H, Zimmermann H, Hooper NM, Turner AJ

Soluble low-K_m 5'-nucleotidase from electric-ray (Torpedo marmorata) electric organ and bovine cerebral cortex is derived from the glycosyl-phosphatidylinositol-anchored ectoenzyme by phospholipase C cleavage

Biochemical Journal 1992, 284: 621-624

Vollmayer P, Koch M, Braun N, Heine P, Servos J, Israr E, Kegel B, Zimmermann H

Multiple ecto-nucleotidases in PC12 cells: identification and cellular distribution after heterologous expression

Journal of Neurochemistry 2001, 78(5):1019-1028

Vulchanova L, Riedl MS, Shuster SJ, Stone LS, Hargreaves KM, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R

P2X₃ is expressed by DRG neurons that terminate in inner lamina II

European Journal of Neuroscience 1998, 10(11):3470-3478

Walter P, Johnson AE

Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane

Annual Reviews of Cell Biology 1994, 10: 87-119

Wang CJ, Vlajkovic SM, Housley GD, Braun N, Zimmermann H, Robson SC, Sevigny J, Soeller C, Thorne PR

C-terminal splicing of NTPDase2 provides distinctive catalytic properties, cellular distribution and enzyme regulation

Biochem Journal 2005, 385(Pt 3): 729-736

Wang G, Dayanithi G, Custer EE, Lemos JR

Adenosine inhibition via A(1) receptor of N-type Ca(2+) current and peptide release from isolated neurohypophysial terminals of the rat

Journal of Physiology 2002, 540(Pt 3):791-802

Wang Q, Wang L, Feng YH, Li X, Zeng R, Gorodeski GI

P2X7 receptor-mediated apoptosis of human cervical epithelial cells

American Journal of Physiology - Cell Physiology 2004, 287(5):C1349-C1358

Wang TF, Guidotti G

CD39 Is an Ecto-(Ca²⁺, Mg²⁺)-apyrase

The Journal of Biological Chemistry 1996, 271(17): 9898-9901

Wang TF, Guidotti G

Golgi Localization and Functional Expression of Human Uridine Diphosphatase

The Journal of Biological Chemistry 1998a, 273(18): 11392-11399

Wang TF, Guidotti G

Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system

Brain Research 1998b, 790(1-2):318-322

Wang TF, Ou Y, Guidotti G

The Transmembrane Domains of Ectoapyrase (CD39) Affect Its Enzymatic Activity and Quaternary Structure

The Journal of Biological Chemistry 1998c, 273(38): 24814-24821

Wang Y, Chan SL, Miele L, Yao PJ, Mackes J, Ingram DK, Mattson MP, Furukawa K

Involvement of Notch signaling in hippocampal synaptic plasticity

Proc Natl Acad Sci U S A. 2004b, 101(25):9458-9462

Wardas J

Neuroprotective role of adenosine in the CNS

Polish Journal of Pharmacology 2002, 54(4): 313-326

Waseda K, Takeuchi T, Ohta M, Okishio Y, Fujita A, Hata F, Takewaki T

Participation of ATP in nonadrenergic, noncholinergic relaxation of longitudinal muscle of wistar rat jejunum

J Pharmacol Sci. 2005, 97(1):91-100

Waterman SA, Tonini M, Costa M

The role of ascending excitatory and descending inhibitory pathways in peristalsis in the isolated guinea-pig small intestine

Journal of Physiology 1994, 481: 223–232

Westfall DP, Latchezar DT, Mihaylova-Todorova TS

ATP as a Cotransmitter in Sympatic Nerves and Its Inactivation by Releasable Enzymes

The Journal of Pharmacology And Expremental Thearapeutics 2002, 303(2): 439-444

Wiendl HS, Schneider C, Ogilvie A

Nucleotide metabolizing ectoenzymes are upregulated in A431 cells periodically treated with cytostatic ATP leading to partial resistance without preventing apoptosis

Biochimica et Biophysica Acta 1998, 1404(3):282-298

Wieraszko A, Ehrlich YH

On the role of Extracellular ATP in the Induction of Long-Term Potentiation in the Hippocampus

Journal of Neuroscience 1994,63(5): 1731-1738

Wormwald MR, Dwek RA

Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability

Structure 1999: 7:155-160

Yang F, Hicks-Berger CA, Smith TM, Kirley TL

Site-Direct Mutagenesis of Human Nucleosid Triphosphate Diphosphohydrolase 3: The Impotence of Residues in the Apyrase Conserved Regions

Biochemistry 2001, 40: 3943-3950

Yang F, Hicks-Berger CA, Smith TM, Kirley TL

Site-Directed Mutagenesis of Human Nucleoside Triphosphate Diphophohydrolase 3: The Importance of Residues in the Apyrase Conserved Regions

Biochemistry 2001, 40: 3943-3950

Yano Y, Hayashi Y, Sano K, Shinmaru H, Kuroda Y, Yokozaki H, Yoon S, Kasuga M.

Expression and localization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I-3 (E-NPP3/CD203c/PD-I beta/B10/gp130RB13-6) in human colon carcinoma

International Jounal of Molecular Medicine 2003, 12(5): 763-766

Yao ST, Barden JA, Finkelstein DI, Bennett MR, Lawrence AJ

Comparative study on the distribution patterns of P2X(1)-P2X(6) receptor immunoreactivity in the brainstem of the rat and the common marmoset (Callithrix jacchus): association with catecholamine cell groups

J Comp Neurol. 2000, 427(4): 485-507

Yao ST, Barden JA, Lawrence AJ

On the immunohistochemical distribution of ionotropic P2X receptors in the nucleus tractus solitarius of the rat

Neuroscience 2001, 108(4):673-685

Yao ST, Gourine AV, Spyer KM, Barden JA, Lawrence AJ

Localisation of P2X2 receptor subunit immunoreactivity on nitric oxide synthase expressing neurones in the brain stem and hypothalamus of the rat: a fluorescence immunohistochemical study

Neuroscience 2003, 121(2): 411-419

Yeung G, Mulero JJ, McGowan DW, Bajwa SS, Ford JE

CD39L2, a Gene Encoding a Human Nucleoside Diphosphatase, Predominantly Expressed in the Heart

Biochemistry 2000, 39: 12916-12923

Yoshida K, Nakagawa T, Kaneko S, Akaike A, Satoh M

Adenosine 5'-triphosphate inhibits slow depolarization induced by repetitive dorsal root stimulation via P2Y purinoceptors in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord slices with the dorsal root attached

Neuroscience Letters 2002, 320(3): 121-124

Zarudnaya MI, Kolomiets IM, Potyahaylo AL, Hovorun DM.

Downstream elements of mammalian pre-mRNA polyadenylation signals: primary, secondary and higher-order structures

Nucleic Acids Res. 2003, 31(5):1375-1386

Zeng C, Aleshin AE, Hardie, JB, Harrison, RW, Fromm HJ

ATP-Binding Site of Human Brain Hexokinase As Studied by Molecular Modeling and Site-Directed Mutagenesis

Biochemistry 1996, 35:13157-13164

Zhang M, Nurse CA

CO₂/pH chemosensory signaling in co-cultures of rat carotid body receptors and petrosal neurons: role of ATP and ACh

Journal of Physiology 2004, 92(6):3433-3445

Zhang YX, Yamashita H, Ohshita T, Sawamoto N, Nakamura S

ATP increases extracellular dopamine level through stimulation of P2Y purinoceptors in the rat striatum

Brain Research 1995, 11;691(1-2):205-212

Zhao J, Hyman L, Moore C

Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis

Microbiology And Molecular Biology Reviews 1999, 63(2):405-445

Zhong X, Malhotra R, Woodruff R, Guidotti G

Mammalian plasma membrane ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1, CD39, is not active intracellularly. The N-glycosylation state of CD39 correlates with surface activity and localization

Journal of Biological Chemistry 2001, 276(44):41518-41525

Zhu Y, Kimelberg HK

Cellular expression of P2Y and beta-AR receptor mRNAs and proteins in freshly isolated astrocytes and tissue sections from the CA1 region of P8-12 rat hippocampus

Brain Res Dev Brain Res. 2004, 148(1):77-87

Zhu Y, Kimelberg HK

Developmental expression of metabotropic P2Y(1) and P2Y(2) receptors in freshly isolated astrocytes from rat hippocampus

Journal of Neurochemistry 2001, 77(2):530-541

Zimmermann H

Signalling via ATP in the nervous system

Trends in Neurosciences 1994, 14(10): 420-426

Zimmermann H

5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects

Biochemical Journal 1992, 285: 345-365

Zimmermann H

Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system

Progress in Neurobiology 1996, 49(6):589-618

Zimmermann H

Ectonucleotidases: Some Recent Developments and a Note on Nomenclature

Drug Development Research 2001, 52: 44-56

Zimmermann H

Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides

Naunyn-Schmiedeberg's Archiv of Pharmacological 2000, 362: 299-309

Zimmermann H

Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and search for function

Trends in Pharmacological Science 1999, 20: 231-236

Zsembery Á, Strazzabosco M, Graf J

Ca²⁺-activated Cl⁻ channels can substitute for CFTR in stimulation of pancreatic duct bicarbonate secretion

FASEB Journal 2000, 14: 2345-2356

Lebenslauf



Persönliche Daten

Thomas Vorhoff
Heidestrasse 32a
58708 Menden
Tel.: (02373) 66380
Thomas.Vorhoff@web.de

Schulbildung

1980 bis 1981	Westschule (Städtische Grundschule) Menden
1981 bis 1984	Städtische Nicolaus-Groß-Schule Menden-Bösperde
1984 bis 1990	Städtische Gemeinschaftshauptschule Menden-Bösperde

Beruflicher Werdegang

1993 bis 1995	Berufliche Schulen des Hochsauerlandkreises in Olsberg
1995	Staatlich geprüfter Biologisch Technischer Assistent
1995 bis 2000	Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt
1997	Vordiplom im Fachbereich Biologie
2000	Diplom im Fachbereich Biologie Hauptfach: Zoologie Nebenfächer: Anthropologie und Humangenetik, Toxikologie, Mikrobiologie
seit 2000	Promotion im Zoologischen Institut der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt zum Thema „Klonierung und funktionelle Charakterisierung der NTPDase3 aus der Ratte“ unter der Betreuung von Prof. Dr. Zimmermann