

Die Bedeutung von NAADP für die  
Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung von T-Zellen der Ratte (*Rattus  
norvegicus*, Berkenhout, 1769) und ventrikulären  
Cardiomyozyten der Maus (*Mus musculus*,  
Linnaeus, 1758)

**Dissertation**

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und  
Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Merle Nebel

aus Kiel

Hamburg 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Prof. Dr. A. H. GUSE  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Priv.-Doz. Dr. H. LÜTHEN  
Tag der Disputation: 17. Dezember 2010

Hamburg, den 27. November 2010



*Axel Temming*

Professor Dr. Axel Temming  
Leiter des Fachbereichs Biologie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Ca <sup>2+</sup> -mobilisierende sekundäre Botenstoffe . . . . .	2
1.1.1	Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP <sub>3</sub> ) . . . . .	2
1.1.2	Cyclische Adenosindiphosphat-Ribose (cADPR) . . . . .	3
1.1.3	Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NAADP) . . . . .	4
1.2	Die Aktivierung von T-Zellen . . . . .	8
1.3	Die Excitations-Kontraktions-Kopplung in Cardiomyozyten . . . . .	13
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
3.1	Antikörper . . . . .	20
3.2	Zellkultur . . . . .	20
3.2.1	F10 Astrozyten . . . . .	20
3.2.2	Primäre T-Zellen der Ratte . . . . .	20
3.2.3	Primäre Cardiomyozyten der Maus . . . . .	21
3.2.4	Passage der F10 Astrozyten . . . . .	21
3.2.5	Restimulation der primären T-Zellen . . . . .	21
3.2.6	Stimulation der primären T-Zellen mit MBP-inkubierten Astrozyten . . . . .	23
3.2.7	Präparation primärer Cardiomyozyten . . . . .	24
3.2.8	Kryokonservierung von Zellen . . . . .	25
3.2.9	Puffer und Lösungen . . . . .	27
3.2.10	Geräte . . . . .	28
3.3	Molekularbiologische Techniken . . . . .	28
3.3.1	Präparation von Gesamt-RNA . . . . .	28
3.3.2	Synthese von cDNA . . . . .	29
3.3.3	<i>One Tube RT-PCR</i> . . . . .	29
3.3.4	PCR . . . . .	30
3.3.5	Aufreinigung von PCR-Produkten . . . . .	31
3.3.6	Agarosegelelektrophorese . . . . .	31
3.3.7	DNA-Sequenzierung . . . . .	31
3.3.8	Primer . . . . .	31

3.3.9	Puffer und Lösungen . . . . .	32
3.3.10	Geräte . . . . .	33
3.4	Methoden zur Expressions- und Funktionsanalyse von eukaryotischen Zellen .	33
3.4.1	Bestimmung der MHCII-Expression auf der Oberfläche von Astrozyten mittels Immunfluoreszenz . . . . .	33
3.4.2	Bestimmung der MHCII-Expression auf der Oberfläche von Astrozyten mittels Durchflusszytometrie . . . . .	34
3.4.3	Färbung der Lysosomen in Cardiomyozyten . . . . .	35
3.4.4	Puffer und Lösungen . . . . .	36
3.4.5	Geräte . . . . .	36
3.5	Digitales $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging . . . . .	36
3.5.1	Beschichtung der Messkammern - Antikörper und Protein . . . . .	37
3.5.2	Beladung der Zellen mit $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen . . . . .	38
3.5.3	Digitales $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging der T-Zellen . . . . .	39
3.5.4	Digitales $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging der Cardiomyozyten . . . . .	44
3.5.5	Puffer und Lösungen . . . . .	48
3.5.6	Geräte . . . . .	48
3.6	Bestimmung der Interleukin(IL)-2-Konzentration in Zellkulturüberständen von T-Zellen . . . . .	48
3.7	Statistik . . . . .	49
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
4.1	Die Bedeutung des NAADP-Signalweges für die Aktivierung primärer, MBP- spezifischer T-Zellen der Ratte im Zweizellsystem . . . . .	51
4.1.1	Die Etablierung des Zweizellsystems . . . . .	51
4.1.2	Die Antagonisierung des NAADP-Signalweges im Zweizellsystem mit dem spezifischen NAADP-Inhibitor BZ194 . . . . .	62
4.1.3	Parallele Analyse der $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in $T_{\text{MBP}}$ -Zellen und Astrozyten im Zweizellsystem . . . . .	70
4.2	Die Bedeutung von NAADP für die $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in Cardiomyozyten der Maus. . . . .	75
4.2.1	Der Einfluss von Isoprenalin auf das $\text{Ca}^{2+}$ -Signal von feldstimulierten Cardiomyozyten . . . . .	75
4.2.2	Der Einfluss des spezifischen NAADP-Inhibitors BZ194 auf die Anzahl zusätzlicher $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Cardiomyozyten . . . . .	78
4.2.3	Die Induktion zusätzlicher $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Cardiomyozyten durch cAMP-Analoga . . . . .	78
4.2.4	Die Rolle der CaMKII für die Entstehung von zusätzlichen $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Cardiomyozyten . . . . .	81

---

4.2.5	Der Effekt von Bafilomycin A1 auf zusätzliche $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in murinen Cardiomyozyten . . . . .	83
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>87</b>
5.1	Modellsysteme für die Analyse der $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung von T-Zellen und Cardiomyozyten auf Einzelzellebene . . . . .	87
5.1.1	Das Zweizellsystem zur Aktivierung von T-Zellen . . . . .	87
5.1.2	Der proarrhythmische Effekt des Isoprenalins auf Einzelzellebene ventrikulärer Cardiomyozyten . . . . .	95
5.2	Die Antagonisierung des NAADP-Signalweges durch BZ194 . . . . .	97
5.2.1	Antagonisten des NAADP-Signalweges . . . . .	98
5.2.2	Die Antagonisierung des NAADP-Signalweges in autoreaktiven T-Zellen	99
5.2.3	Die Bedeutung von NAADP für die $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in Cardiomyozyten der Maus . . . . .	105
5.3	Der NAADP-Signalweg in unterschiedlichen Zellmodellen . . . . .	111
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>Abstract</b>	<b>118</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>120</b>

## Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ADPRP	ADP-Ribose 2'-Phosphat
AIP	Autocamtid 2-verwandtes inhibitorisches Peptid
AM	Acetoxymethylester
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APD	Aktionspotentialdauer
ATP	Adenosintriphosphat
Baf	Bafilomycin A1
6-Bnz-cAMP	6-Benzoyl-cAMP
BDM	Butanedionmonoxim
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cADPR	cyclische Adenosindiphosphatribose
cADPRP	cyclisches Adenosindiphosphatribose 2'-Phosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Ca <sup>2+</sup>	zweiwertige Calciumionen
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	freie, cytoplasmatische Konzentration zweiwertiger Calciumionen
CaM	Calmodulin
CaMK	Ca <sup>2+</sup> -Calmodulin-abhängige Kinase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CICF	Ca <sup>2+</sup> -induzierte Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung
CREB	<i>cAMP-responsive-element-binding protein</i>
CTLA4	Cytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen 4
DAD	verzögerte Nachdepolarisation ( <i>delayed after depolarization</i> )
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DYRK	dual-spezifische Tyrosin-Phosphorylierungsregulierte Kinasen
EAD	frühe Nachdepolarisation ( <i>early after depolarization</i> )
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamin-(N,N,N',N')-tetraacetat

---

EGTA	Ethylenglykol-(N,N,N',N')-tetraacetat
EKK	Excitations-Kontraktions-Kopplung
Epac	<i>Exchange protein activated by cAMP</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
FBS	fötales Kälberserum
FKBP12.6	FK506-bindendes Protein 12.6
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GLP-1	Glucagon-ähnliches Peptid-1
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP <sub>3</sub> R	Inositol-1,4,5-trisphosphatrezeptor
Iso	Isoprenalin
ITAM	Tyrosinaktivierungssequenzen von Immunrezeptoren ( <i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> )
kD	Kilodalton
LAT	<i>Linker for activation of T cells</i>
Lck	Leukozyten-spezifische Tyrosinkinase
LFA	Funktionelles Leukozytenantigen
LTCC	L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanal
mAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	Ras-Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEF2	<i>Myocyte enhancer factor 2</i>
MBP	Myelin basisches Protein
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>Major histocompatibility complex</i> )
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger RNA</i> )
NAAD	Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid
NAADP	Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid-2'-Phosphat
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-2'-Phosphat
NCS	Serum neugeborener Kälber
NCX	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NFκB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NLS	nukleäres Lokalisationssignal

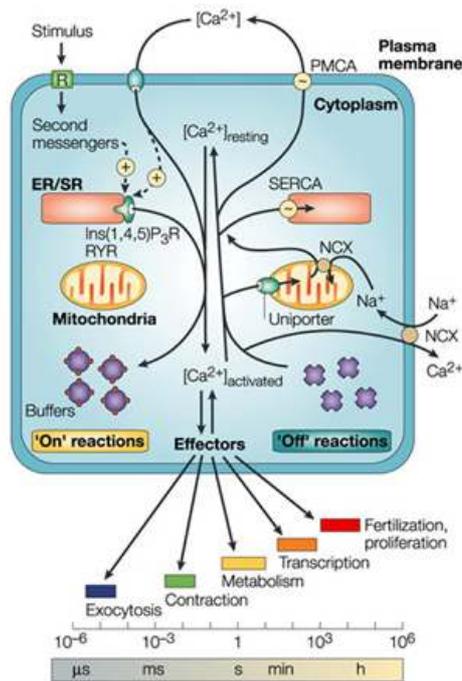
---

OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate buffered salt solution</i> )
8-pCPT	8-(4-Chlorophenylthio)-2'-O-methyladenosin-3',5'-cyclisches Monophosphat
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
PDI	Phosphatdisulfidisomerase
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
PP	Proteinphosphatase
R.E.	Ratioeinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>Region of interest</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SD	Standardabweichung ( <i>Standard deviation</i> )
SE	Standardfehler des Mittelwerts ( <i>Standard error of mean</i> )
SERCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPase des sarko-/endoplasmatischen Retikulums
SHP2	<i>SRC homology 2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2</i>
SMAC	supramolekulares Aktivierungscluster
SOCE	<i>Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry</i>
SpTPC	<i>Two pore channel</i> des Seeigels ( <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> )
SR	sarcoplasmatisches Retikulum
STIM	<i>Stromal interaction molecule</i>
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TCGF	T-Zell-Wachstumsfaktor ( <i>T cell growth factor</i> )
TCM	T-Zell-Medium
TCR	T-Zellrezeptor
TE	Tris/EDTA-Puffer
TMB	Tetramethylbenzidin
TnC	Troponin C
TnI	Troponin I
TNF	Tumornekrosefaktor
TPC	<i>Two pore channel</i>

TRP-Kanäle	<i>Transient receptor potential</i> -Kanäle
TRPM	Melastatin Unterfamilie der TRP-Kanäle
TRPML	Mucolipin Unterfamilie der TRP-Kanäle
Tg	Thapsigargin
Ü	Überstand
ZAP70	ζ-Ketten assoziiertes Protein 70
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

Die Signaltransduktion ermöglicht einer Zelle mit anderen Zellen zu kommunizieren und auf Einflüsse aus ihrer Umgebung zu reagieren. Extrazelluläre Signalmoleküle werden dabei mit Hilfe von Rezeptoren auf der Zelloberfläche erkannt und das Signal mit Hilfe von intrazellulären Signalproteinen in der Zelle weitergeleitet. Ein extrazelluläres Signal kann auf diese Weise den Stoffwechsel, die Genexpression oder auch die Bewegung einer Zelle verändern.  $\text{Ca}^{2+}$  tritt in einer Vielzahl unterschiedlicher Zellsysteme als intrazellulärer Botenstoff auf (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1: Die Dynamik der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung.** Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann durch den Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  sowie die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern wie dem sarko-/endoplasmatischen Retikulum mit Hilfe sekundärer Botenstoffe ansteigen. Freies  $\text{Ca}^{2+}$  bindet an Effektorproteine, die zahlreiche Prozesse mit unterschiedlicher Dynamik in Gang setzen können. Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal wird abgeschaltet, indem  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle gepumpt und intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher wieder aufgefüllt werden. Endoplasmatisches/sarcoplasmatisches Retikulum (ER/SR); Inositol-1,4,5-trisphosphatrezeptor (Ins(1,4,5) $\text{P}_3$ R);  $\text{Na}^+$ / $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX); Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA); Ryanodinrezeptor (RyR); sarko-/endoplasmatisches Retikulum-ATPase (SERCA). Aus: Berridge et al. (2003).

So ist  $\text{Ca}^{2+}$  für die Auslösung von Kontraktionen in Muskelzellen, die Sekretion in sekretorischen Zellen, einschließlich Nervenzellen, und das Einsetzen der Embryonalentwicklung nach der Befruchtung einer Eizelle verantwortlich. Dies ist nur aufgrund eines steilen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten zwischen dem Cytosol ( $\sim 100$  nM) und dem extrazellulären Raum ( $\sim 1$  mM) sowie intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern ( $60\text{--}400$   $\mu\text{M}$  (Miyawaki et al., 1997; Christensen et al., 2002; Lloyd-Evans et al., 2008)) möglich. Demzufolge kann  $\text{Ca}^{2+}$  nach der Stimulation einer Zelle zum einen aus dem extrazellulären Raum in das Cytosol strömen. Zum anderen kann es zur Bildung sekundärer Botenstoffe kommen, die ihrerseits  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern wie dem sarco-/endoplasmatischen Retikulum (SR/ER) freisetzen. Aufgrund seiner weitreichenden Folgen für die Funktionsfähigkeit von Zellen ist die cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration streng gepuffert. Kommt es jedoch zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, kann  $\text{Ca}^{2+}$  an Effektorproteine binden und so zelluläre Prozesse in Gang setzen. Dabei kann die Dynamik des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in Abhängigkeit vom durchzuführenden Prozess sehr unterschiedlich ausfallen. Zum Beispiel werden Kontraktionen in Herzzellen im Millisekunden-Bereich ausgelöst und müssen zudem höchst regelmäßig erfolgen. Für die Proliferation von T-Zellen ist ein wesentlich langsamerer Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nötig, dieser sollte dafür aber mehrere Stunden anhalten.

Die elektrische Stimulation von Herzzellen bewirkt den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem extrazellulären Raum, wodurch die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR durch den Ryanodinrezeptor (RyR) induziert und schließlich die Kontraktion ermöglicht wird. T-Zellen sind hingegen elektrisch nicht erregbar. Sie werden durch das Erkennen ihres spezifischen Antigens über den T-Zellrezeptor aktiviert. Dessen Kopplung an akzessorische CD3-Moleküle ermöglicht die Bildung sekundärer Botenstoffe, die die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern wie dem ER auslösen. Daraus resultiert ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem extrazellulären Raum, der das lang anhaltende  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal ermöglicht.

Drei sekundäre Botenstoffe sind für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern bisher beschrieben worden: Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NAADP), D-myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und cyclische Adenosindiphosphat-Ribose (cADPR). Sie werden im Folgenden in der Reihenfolge ihrer Entdeckung genauer beleuchtet. Anschließend wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung von T-Zellen und die Excitations-Kontraktions-Kopplung (EKK) in Cardiomyozyten näher beschrieben und welche Rolle NAADP in der Signalgebung dieser Zelltypen einnimmt.

## 1.1 $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierende sekundäre Botenstoffe

### 1.1.1 Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ )

1983 konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass  $\text{IP}_3$  in permeabilisierten Azinuszellen des Pankreas einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem ER auslöst (Streb et al., 1983). Im darauffolgen-

den Jahr konnten weitere Studien diesen  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Effekt von  $\text{IP}_3$  in Leberzellen (Burgess et al., 1984), Swiss 3T3-Zellen (Berridge et al., 1984), Insulin-sezernierenden Zellen (Prentki et al., 1984; Biden et al., 1984), Limulus Photorezeptoren (Brown et al., 1984; Fein et al., 1984) und Leukozyten (Burgess et al., 1984) bestätigen. Wie der RyR kann der  $\text{IP}_3\text{R}$  über  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert werden (Iino, 1990; Bezprozvanny et al., 1991; Finch et al., 1991). Des Weiteren ist der  $\text{IP}_3\text{R}$  sensitiv für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR (Missiaen et al., 1991). Ähnlich dem RyR kann der  $\text{IP}_3\text{R}$  einzelne kleine  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale erzeugen, die in diesem Fall als *Puffs* bezeichnet werden (Yao et al., 1995; Bootman und Berridge, 1996) und sich zu einem globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal entwickeln können (Bootman et al., 1997).  $\text{IP}_3$  ist unabdingbar für die Aktivierung von Lymphozyten (Feske, 2007). Für den Ablauf der EKK im Herzen scheint  $\text{IP}_3$  keine Rolle zu spielen, allerdings könnte  $\text{IP}_3$  an der Entwicklung von Arrhythmien beteiligt sein (siehe unten).

### 1.1.2 Cyclische Adenosindiphosphat-Ribose (cADPR)

cADPR ist ein universeller  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzender sekundärer Botenstoff in Tieren, Pflanzen und Protozoen und spielt eine Rolle bei der Sezernierung, der Fertilisation und der Kontraktion (Galione und Churchill, 2000; Lee, 2001). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Wirkung von cADPR wurde zuerst in Seeegelleiern entdeckt (Lee et al., 1989). Es stellte sich aber heraus, dass cADPR auch in vielen eukaryotischen Zellen, wie zum Beispiel in glatten und gestreiften Muskelzellen (Boit-tin et al., 2003), in Neuronen (Zhang et al., 2005), in Azinus- sowie  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Yamasaki et al., 2004) und Zellen des Immunsystems (Guse et al., 1999; Partida-Sánchez et al., 2004) an der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung beteiligt ist. Ferner wurde eine Beteiligung von cADPR am  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom beschrieben (Guse et al., 1997), die über TRPM2 vermittelt werden könnte (Kolisek et al., 2005). cADPR wird aus NAD über ADP-Ribosylcyclasen gebildet. Dies sind lösliche oder membrangebundene Enzyme. Als cADPR-synthetisierendes Enzym wurde CD38 postuliert (Partida-Sánchez et al., 2001; Schuber und Lund, 2004). Es kommen aber auch bisher nicht weiter charakterisierte ADP-Ribosylcyclasen in Frage; vor allem, da  $\text{CD38}^{-/-}$ -Mäuse nach wie vor in der Lage sind, cADPR zu bilden (Ceni et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass cADPR die  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude in Cardiomyozyten steigert, was durch den Antagonisten 8-Amino-cADPR inhibiert werden konnte (Rakovic et al., 1996, 1999; Prakash et al., 2000). Die Wirkung von cADPR kommt wahrscheinlich über den RyR zustande, allerdings konnte bis jetzt nicht hinreichend geklärt werden, ob es sich dabei um einen direkten oder einen indirekten Effekt handelt. Es wurde eine Aktivierung von in Lipiddoppelschichten eingebrachten RyR beschrieben (Mészáros et al., 1993; Li et al., 2001; Tang et al., 2002). Teilweise waren dafür auch niedrige ATP- und hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen notwendig (Sitsapesan et al., 1995a). Allerdings gibt es weitere Publikationen, die keine Aktivierung des RyR durch cADPR (Fruen et al., 1994; Copello et al., 2001) beziehungsweise gar keinen Effekt von cADPR auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR beobachten (Guo et al., 1996). Der Effekt

von cADPR auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude in Cardiomyozyten ist stark temperaturabhängig und entwickelt sich nur langsam, was wiederum auf einen indirekten Effekt hindeuten könnte (Iino et al., 1997; Cui et al., 1999). In diesem Zusammenhang wurde beschrieben, dass die aktivierende Wirkung von cADPR indirekt über FKBP12.6 (Noguchi et al., 1997; Wang et al., 2004; Tegatz et al., 2005), Calmodulin (Lee et al., 1994; Tanaka und Tashjian, 1995) oder die Phosphorylierung durch die CaMKII (Takasawa et al., 1995) vermittelt werden könnte. Erst kürzlich wurde veröffentlicht, dass cADPR für die Dissoziation von FKBP12.6 vom RyR sorgt, wodurch dieser sensitiviert wird (Zhang et al., 2009b). Neben dem Effekt auf den RyR könnte cADPR auch die Aufnahme des  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR beeinflussen (Lukyanenko et al., 2001; Berridge et al., 2003). Zum Beispiel aktiviert cADPR die SERCA in glatten Muskelzellen (Bradley et al., 2003). Macgregor et al. (2007b) haben beschrieben, dass eine kurze Inkubation mit cADPR ausschließlich zu stärkeren Kontraktionen, sowie einer gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude und vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -*Sparks* führt. Eine höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR wurde erst bei längeren Inkubationszeiten mit cADPR beobachtet. Obwohl cADPR vor allem in elektrisch erregbaren Zellen eine Rolle zu spielen scheint, nimmt es auch Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in T-Zellen. Die Stimulation von Jurkat T-Zellen über CD3 führte zu einem intrazellulären Anstieg an cADPR (Guse et al., 1999). Durch den Einsatz des cADPR-Antagonisten 7-deaza-8-Br-cADPR konnte gezeigt werden, dass cADPR einen wesentlichen Beitrag zum lang anhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nach der Stimulation über CD3 leistet, das wiederum notwendig für die erfolgreiche Proliferation der T-Zellen ist. Des Weiteren konnte cADPR die Bindung von  $^3\text{H}$ -markiertem Ryanodin an den RyR erhöhen. Da  $^3\text{H}$ -markiertes Ryanodin nur an den RyR im offenen Zustand bindet, lässt die gesteigerte Bindung auf eine, durch cADPR induzierte, erhöhte Kanalöffnung schließen.

### 1.1.3 Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NAADP)

#### Die $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch NAADP

NAADP wurde nach  $\text{IP}_3$  und cADPR als  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzender Botenstoff identifiziert. Clapper und Lee beobachteten 1987 in Homogenaten des Seeigels, dass die Gabe von NADP zu einem sofortigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal führte (Clapper et al., 1987). Allerdings war diese  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Wirkung nicht auf NADP, sondern auf eine Verunreinigung mit NAADP zurückzuführen. Die Struktur von NAADP wurde erst fast zehn Jahre später aufgeklärt (Chini et al., 1995; Lee und Aarhus, 1995). NAADP unterscheidet sich von NADP nur durch eine Hydroxylgruppe anstelle einer Aminogruppe an der 3'-Position des Pyridinrings. Neben dieser Aminogruppe scheint außerdem die Phosphatgruppe an der südlichen Ribose und die 6'-Aminogruppe am Adeninring für die  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Wirkung von NAADP im Seeigeli entscheidend zu sein (Lee und Aarhus, 1997). NAADP weist einige Besonderheiten als sekundärer Botenstoff auf. Zum einen ist es der bisher potenteste  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende sekundäre Botenstoff, da er bereits im niedrigen nanomolaren Bereich aus intrazellulären Speichern  $\text{Ca}^{2+}$  freisetzen

kann (Clapper et al., 1987). Im Modellsystem Seeigeelei konnte zudem beobachtet werden, dass NAADP bei Konzentrationen unterhalb eines nicht aktivierenden Schwellenwertes eine irreversible Selbstinaktivierung auslöst, so dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher anschließend nicht mehr auf aktivierende NAADP-Konzentrationen ansprechen (Aarhus et al., 1996; Genazzani et al., 1996).

### **Der Metabolismus von NAADP**

Bisher konnte weder die Bildung noch der Abbau von NAADP aufgeklärt werden. Als denkbare Synthesewege kommen eine Deamidierung von NADP, eine Phosphorylierung von NAAD oder eine Oxidation von NAADPH in Frage. Zumindest die NAD-Kinase ist nicht in der Lage NAAD zu NAADP umzusetzen (Lerner et al., 2001). Die ADP-Ribosylcyclase CD38 kann hingegen über eine Basenaustauschreaktion NADP und Nikotinsäure in NAADP und Nikotinamid umwandeln (Aarhus et al., 1995). Allerdings ist für diese Reaktion ein saures Milieu und hohe Konzentrationen an Nikotinsäure erforderlich. Ansonsten kommt es zur Bildung von cADP-Ribose 2'-Phosphat (cADPRP). Des Weiteren ist CD38 ein Ektoenzym und es stellt sich die Frage, wie der schnelle Transport der Substrate und des Produktes NAADP durch die Zellmembran gewährleistet werden soll. Ferner belegen Publikationen, dass CD38 nicht notwendig für die NAADP-Bildung ist (Soares et al., 2007; Bruhn, 2008). Weitere, von CD38 unabhängige ADP-Ribosylcyclasen wurden im Skelettmuskel von Kaninchen und im Gehirn von  $\text{CD38}^{-/-}$ -Mäusen identifiziert (Ceni et al., 2003; Bacher et al., 2004). Im Seeigeelei könnte die ADP-Ribosylcyclase SpARC2 für die Bildung von NAADP verantwortlich sein (Churamani et al., 2008). Für den Abbau von NAADP könnte eine Dephosphorylierung zu NAAD in Frage kommen, die 2002 in Membranfraktionen aus dem Gehirn von Mäusen beschrieben wurde (Berridge et al., 2002). Ferner ist CD38 in der Lage, NAADP zu hydrolysieren, wobei ADP-Ribose 2'-Phosphat (ADPRP) und Nikotinsäure gebildet werden (Graeff et al., 2006). Für eine Rolle von CD38 beim NAADP-Abbau spricht, dass die Konzentration von NAADP in einigen Geweben von  $\text{CD38}^{-/-}$ -Mäusen und  $\text{CD38}^{-/-}$ -Zellen erhöht ist (Soares et al., 2007; Bruhn, 2008). Allerdings wurde auch postuliert, dass erhöhte NAADP-Level nicht auf den fehlenden Abbau von NAADP durch CD38, sondern vielmehr auf eine verstärkte Bildung von NAADP zurückzuführen seien, um die fehlende, CD38-abhängige Bildung von cADPR zu kompensieren (Soares et al., 2007). Zudem gibt es bisher auf zellulärer Ebene keine Bestätigung der CD38-katalysierten Hydrolyse von NAADP.

### **Die Konzentration von NAADP in eukaryotischen Zellen**

Die geringen cytosolischen Mengen an NAADP stellen eine besondere Herausforderung für die Bestimmung der NAADP-Konzentration dar. Die basale NAADP-Konzentration liegt im Bereich von zwei bis 16 nM (Churamani et al., 2004). Mit Hilfe eines Radiorezeptortests konnte in der  $\beta$ -Zelllinie MIN6 ein zweifacher Anstieg der NAADP-Konzentration nach ei-

ner zehnmütigen Stimulation mit Glucose beobachtet werden (Masgrau et al., 2003). In Azinuszellen des Pankreas wurden erstmalig zu mehreren Zeitpunkten nach der Stimulation mit Cholecystokin die NAADP-Konzentration bestimmt (Yamasaki et al., 2005). NAADP steigt bereits fünf Sekunden nach der Stimulation stark an und sinkt dann innerhalb der ersten Minute wieder auf basale Level ab. Auch in menschlichen myometrialen Zellen konnte nach der Stimulation mit Histamin ein vergleichbar schneller Anstieg von NAADP innerhalb von 30 Sekunden beobachtet werden (Soares et al., 2007). Ähnliche Daten wurden bei Experimenten in Jurkat T-Zellen erhalten. Die Stimulation über CD3 erzeugt dabei einen schnellen NAADP-Anstieg innerhalb von zehn bis 20 Sekunden, der innerhalb der ersten Minute nahezu wieder auf basale Konzentrationen zurückgeht (Gasser et al., 2006). Daran schließt sich ein zweiter NAADP-Anstieg an, der bei circa fünf Minuten beginnt und bis 20 Minuten anhält.

### NAADP-sensitive Rezeptoren und $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher

Im Seeiglei stellte sich relativ schnell heraus, dass NAADP auf einen anderen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher wirkt als  $\text{IP}_3$  oder cADPR (Lee und Aarhus, 2000). Es handelt sich dabei um saure, den Lysosomen ähnliche Organellen, die von Mikrosomen getrennt werden können (Churchill et al., 2002). Des Weiteren konnte die NAADP-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch die Inhibition der  $\text{H}^+$ -ATPase mittels Bafilomycin A1 blockiert werden. Dass NAADP,  $\text{IP}_3$  und cADPR auf unterschiedliche Rezeptoren wirken, wird durch die Tatsache unterstützt, dass hohe Konzentrationen der sekundären Botenstoffe die weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch denselben Botenstoff im Seeiglei verhindern (Clapper et al., 1987; Perez-Terzic et al., 1995). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch einen der beiden anderen Botenstoffe bleibt jedoch unbeeinflusst. Neue Daten deuten darauf hin, dass *Two-pore channels* des Seeigels (SpTPCs) für die  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Wirkung von NAADP auf saure  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher verantwortlich sind (Brailoiu et al., 2010).

Im Gegensatz zum Seeiglei gibt es in Säugerzellen sowohl Hinweise auf eine Beteiligung des ER als auch lysosomaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher. Wie im Seeiglei kommen für die NAADP-sensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle TPCs in der Membran der Lysosomen in Frage (Brailoiu et al., 2009; Calcraft et al., 2009; Zong et al., 2009). Eine Beteiligung von TPCs konnte bisher in der menschlichen Karzinomzelllinie SKBR3 (Brailoiu et al., 2009), in  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Calcraft et al., 2009) und in der glatten Muskulatur (Durlu-Kandilci et al., 2010) nachgewiesen werden. Erstmals in Azinuszellen des Pankreas wurde jedoch auch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Wirkung von NAADP auf die Kernhülle, die ein Kontinuum mit dem ER ausbildet, gezeigt (Gerasimenko et al., 2003a,b). Da dieser Effekt sensitiv für Ryanodin und RutheniumRot war, die beide den RyR inhibieren, wurde auf eine Aktivierung des RyR durch NAADP geschlossen (Gerasimenko et al., 2003b). Bisher gibt es einige Bindungsstudien und Einzelkanalmessungen, die die Aktivierung des RyR1 und des RyR2 durch NAADP bestätigen (Mojziszová et al., 2001; Hohenegger et al., 2002; Dammermann et al., 2009). Dem gegenüber stehen Publikatio-

nen, die einen Effekt von NAADP auf die Offenwahrscheinlichkeit aller drei RyR-Subtypen ausschließen (Copello et al., 2001; Pitt et al., 2010). Auch wenn die Beteiligung des RyR in unterschiedlichen Zelltypen kontrovers diskutiert wird, konnte zumindest in T-Zellen bisher keine Beteiligung lysosomaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher an dem NAADP-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nachgewiesen werden (Steen et al., 2007). NAADP scheint vielmehr  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER oder einem verwandten Tg-sensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher freizusetzen. Für eine Aktivierung des RyR durch NAADP spricht in T-Zellen weiterhin, dass sowohl lokale als auch globale NAADP-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale durch eine verringerte Expression des RyR mittels *antisense*-Technologie oder durch die pharmakologische Inhibition des RyR unterdrückt werden konnten (Langhorst et al., 2004; Dammermann und Guse, 2005). Da die Konzentration von NAADP sowohl direkt nach der Stimulation von T-Zellen ansteigt als auch einen zweiten, länger anhaltenden Anstieg zeigt, wurde vermutet, dass NAADP sowohl für die initiale Phase des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals als auch für das  $\text{Ca}^{2+}$ -Plateau in T-Zellen entscheidend ist (Gasser und Guse, 2005). Der Einsatz des spezifischen NAADP-Inhibitors BZ194 bestätigt diese Annahme (Dammermann et al. (2009) und Teil 4.1.2 der vorliegenden Arbeit).

### NAADP als $\text{Ca}^{2+}$ -Trigger

Obwohl neben NAADP noch zwei weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende sekundäre Botenstoffe existieren, kommt NAADP vermutlich eine besondere Rolle als  $\text{Ca}^{2+}$ -Trigger zu (Guse und Lee, 2008). In der Funktion als  $\text{Ca}^{2+}$ -Trigger würde NAADP ein anfängliches, lokal begrenztes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal auslösen, das dann durch  $\text{IP}_3$ - und cADPR-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale sowie  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (CICF) amplifiziert würde. Hinweise darauf wurden zuerst in Azinuszellen des Pankreas gefunden. In diesen Zellen werden Cholecystokin-in-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale durch NAADP vermittelt (Cancela et al., 1999, 2000). Durch den spezifischen Einsatz eines  $\text{IP}_3$ -Inhibitors sowie eines Antagonisten für cADPR konnte gezeigt werden, dass das NAADP-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal abhängig von der Verstärkung durch cADPR- und  $\text{IP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale ist (Cancela et al., 1999). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass die NAADP-Konzentration nach der Stimulation schnell und vor einem cADPR-Anstieg in der Zelle ansteigt (Yamasaki et al., 2005). Ein schneller, dem cADPR vorangehender Anstieg der NAADP-Konzentration konnte auch in Glucagon-ähnliches Peptid-1 (GLP-1)-stimulierten Inselzellen des Pankreas beobachtet werden (Kim et al., 2008). Hier zeigte sich deutlich eine *Trigger*-Funktion für NAADP, da es den Anstieg von cADPR in den Zellen steigern konnte. Im Gegensatz zu den Azinuszellen wurde das GLP1-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal durch Inhibitoren für den  $\text{IP}_3$ R oder cADPR nicht vollständig blockiert. In diesem Fall konnte sich durch NAADP ein globales  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal ohne weitere Amplifikation durch die anderen beiden Botenstoffe entwickeln. Wie bereits beschrieben, steigt die NAADP-Konzentration auch in über CD3 stimulierten Jurkat T-Zellen schnell an und geht einem Anstieg der cADPR- und der  $\text{IP}_3$ -Konzentration voraus (Guse et al., 1993, 1999; Gasser et al.,

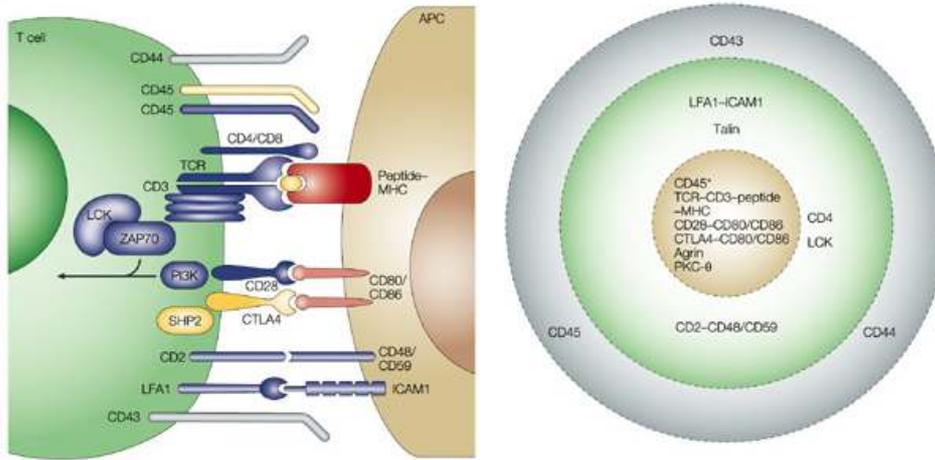
2006). Eine Blockade des anti-CD3-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in den T-Zellen durch Inhibitoren des  $\text{IP}_3$ - beziehungsweise des cADPR-Signalweges bestätigt die Daten in Azinuszellen, dass eine Amplifikation des initialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals durch cADPR und  $\text{IP}_3$  nötig ist (Guse, 1999). In arteriellen glatten Muskelzellen und in T-Zellen konnten durch NAADP-vermittelte subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beobachtet werden, die einem globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal vorausgehen und somit einen eindeutigen Beleg für die *Trigger*-Funktion von NAADP darstellen. In den Muskelzellen konnte infundiertes NAADP innerhalb einer Minute lokal begrenzte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale auslösen (Boittin et al., 2002). NAADP scheint  $\text{Ca}^{2+}$  zunächst aus lysosomalen Speichern freizusetzen, die Amplifikation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in Form einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Welle, die sich über die Zelle ausbreitet, ist dann vom SR abhängig. In T-Zellen konnten durch mikroinjiziertes NAADP ausgelöste  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale bereits nach wenigen hundert Millisekunden beobachtet werden (Dammermann und Guse, 2005). Im Gegensatz zu den Muskelzellen waren diese aber von der Expression des RyR abhängig.

## 1.2 Die Aktivierung von T-Zellen

T-Zellen sind notwendig für den erfolgreichen Ablauf der adaptiven Immunantwort. Im Thymus herangereifte naive T-Zellen durchwandern kontinuierlich das Blut und die Lymphgefäße und können dabei Kontakte zu professionellen Antigen-präsentierenden Zellen ausbilden. Dazu gehören vornehmlich dendritische Zellen, aber auch B-Zellen und Makrophagen. Präsentiert eine dieser Zellen ein Antigen, für das die T-Zelle spezifisch ist, wird diese aktiviert und zur Proliferation angeregt. Die T-Zellen wandern daraufhin zum Ort der Infektion, den sie aufgrund von Cytokingradienten aufspüren können. Dabei differenziert man zwischen  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen, die unterschiedliche Effektorfunktionen ausüben.  $\text{CD4}^+$  T-Zellen aktivieren vor allem andere Zellen des Immunsystems wie B-Zellen, die Antikörper produzieren, und entzündungsvermittelnde Makrophagen. Die cytotoxischen  $\text{CD8}^+$  T-Zellen erkennen hingegen infizierte Zellen und induzieren in diesen Apoptose. Nach einer erfolgreich abgeschlossenen Immunantwort sterben die meisten aktivierten T-Zellen. Nur ein geringer Teil ist langlebig und trägt so zum immunologischen Gedächtnis bei, das eine wesentlich effektivere Immunantwort bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Pathogen ermöglicht.

Bei der Aktivierung der T-Zelle wird ein Signalprozess in Gang gesetzt, in dem die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung unerlässlich ist (Feske, 2007). Dieser beginnt zunächst, indem der T-Zellrezeptor (TCR) sein spezifisches Antigen, das ihm von einem *Major histocompatibility complex* (MHC)-Molekül auf der Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zelle präsentiert wird, erkennt. Dabei bilden  $\text{CD4}^+$  T-Zellen einen Kontakt zu MHCII-Molekülen und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen zu MHCI-Molekülen aus. Alle Körperzellen besitzen MHCI-Moleküle, um  $\text{CD8}^+$  T-Zellen signalisieren zu können, dass sie infiziert sind. MHCII-Moleküle kommen hingegen nur auf den bereits erwähnten professionellen Antigen-präsentierenden Zellen vor. Beim Kontakt der beiden Zel-

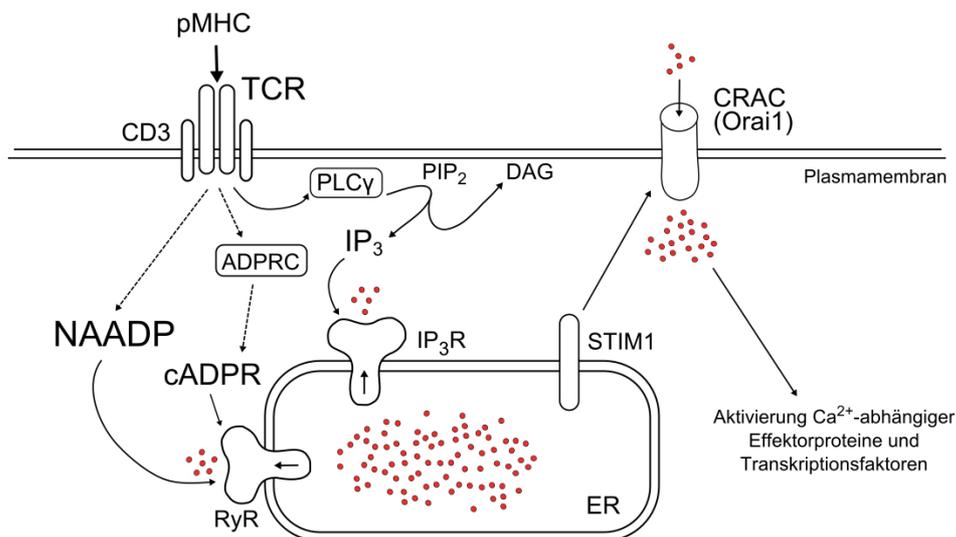
len kommt es zur Polarisierung der T-Zelle und zur Ausbildung einer sogenannten Immunologischen Synapse (Abbildung 1.2) (Monks et al., 1997, 1998; Grakoui et al., 1999).



**Abbildung 1.2: Eine reife immunologische Synapse.** Links: Der TCR erkennt sein Antigen über den Kontakt zum Peptid-MHC-Molekül (gelb/rot). Aktivierende oder kostimulierende Moleküle sind in blau dargestellt, inhibierende Moleküle in gelb und Moleküle, die nicht an der Signalgebung beteiligt sind in grau. Rechts: Blick von oben auf die immunologische Synapse. Diese lässt sich in mehrere Bereiche einteilen. In der Mitte befindet sich das sogenannte zentrale, supramolekulare Aktivierungscluster (cSMAC). Daran schließen sich das periphere (pSMAC) und schließlich das distale, supramolekulare Aktivierungscluster (dSMAC) an. Die verschiedenen Cluster enthalten unterschiedliche Signalmoleküle. APC: Antigen-präsentierende Zelle; CTLA4: Cytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen 4; ICAM1: Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1; LFA1: Funktionelles Leukozytenantigen 1; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; SHP2: *SRC homology 2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2*; TCR: T-Zellrezeptor; ZAP70: ζ-Ketten assoziiertes Protein 70. \*CD45 gelangt später in das cSMAC. Aus: Huppa und Davis (2003).

Im Zentrum einer reifen Synapse finden sich der T-Zellrezeptor, der Korezeptor CD4 beziehungsweise CD8 und das kostimulatorische Molekül CD28. Benachbart dazu finden sich Adhäsionsmoleküle, die gewährleisten, dass der Kontakt zwischen den Zellen stabilisiert wird. Dabei interagiert LFA-1 auf der T-Zelle mit ICAM-1 auf der Antigen-präsentierenden Zelle. Im peripheren Bereich finden sich weitere Adhäsionsmoleküle wie CD43 und CD44. Bei dem Kontakt einer T-Zelle zu einer Antigen-präsentierenden Zelle kommt es bereits zu einzelnen  $Ca^{2+}$ -Signalen, bevor sich eine reife Synapse ausgebildet hat. Die Synapse bleibt nur erhalten, so lange das  $Ca^{2+}$ -Signal besteht (Huppa et al., 2003). Im Verlauf der Aktivierung wandern die TCR aus den sogenannten multifokalen Synapsen in das Zentrum der Kontaktstelle, wo sie internalisiert und abgebaut werden (Lee et al., 2003). Wenn der TCR sein spezifisches Antigen erkennt, muss das Signal in die Zelle geleitet werden. Dies geschieht über akzessorische CD3-Moleküle (Abbildung 1.3). Diese besitzen sogenannte Tyrosinaktivierungssequenzen von Immunrezeptoren (ITAMs) mit mehreren Phosphorylierungsstellen. Es kommt zur Phosphorylierung der in den ITAM-Motiven enthaltenen Tyrosinreste, an

die sich weitere Tyrosinkinasen anlagern können. Mit Hilfe von Adaptorproteinen wie LAT (*Linker for activation of T cells*) und SLP-76 können sich Tec-Kinasen anlagern, die ebenfalls über Phosphorylierung aktiviert werden und die Phospholipase C (PLC)- $\gamma$  aktivieren. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) wird durch die aktivierte PLC- $\gamma$  in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) gespalten. Wie beschrieben wurde IP<sub>3</sub> als Erster der Ca<sup>2+</sup>-freisetzenden sekundären Botenstoffe entdeckt. Der Mechanismus der Bildung von NAADP, der bisher noch nicht aufgeklärt werden konnte, scheint allerdings dem Anstieg der IP<sub>3</sub>-Konzentration zeitlich voranzugehen (Gasser et al., 2006). NAADP scheint durch die Aktivierung des RyR am ER ein *Trigger*-Ca<sup>2+</sup>-Signal zu liefern, das durch die Wirkung von IP<sub>3</sub> und schließlich cADPR verstärkt wird (Guse und Lee, 2008). Dadurch kommt NAADP eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung eines globalen, lang anhaltenden Ca<sup>2+</sup>-Signals in den T-Zellen zu.



**Abbildung 1.3: Die Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung in T-Zellen.** Der TCR erkennt sein spezifisches Antigen im Zusammenhang mit einem MHC-Molekül. Daraufhin wird intern eine Signalkaskade in Gang gesetzt, bei der die sekundären Botenstoffe NAADP, IP<sub>3</sub> und cADPR Ca<sup>2+</sup> aus dem ER freisetzen. Das Absinken der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration des ER führt über die Interaktion von STIM1 und Orai1 zum Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem extrazellulären Raum. Ca<sup>2+</sup>-sensitive Effektorproteine werden aktiviert und aktivieren wiederum Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression verändern und schließlich zur Aktivierung und Proliferation der T-Zelle führen. ADPRC: ADP-Ribosylcyclase; CRAC: *Ca<sup>2+</sup>-release activated Ca<sup>2+</sup>-channel*; DAG: Diacylglycerin; ER: endoplasmatisches Retikulum; IP<sub>3</sub>R: IP<sub>3</sub>-Rezeptor; PIP<sub>2</sub>: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PLC- $\gamma$ : Phospholipase C- $\gamma$ ; pMHC: Peptid-MHC-Komplex; TCR: T-Zellrezeptor; RyR: Ryanodinrezeptor; STIM1: *Stromal interaction molecule 1*.

IP<sub>3</sub> und cADPR wirken ebenfalls auf das ER, indem sie den IP<sub>3</sub>R beziehungsweise den RyR aktivieren (Guse et al., 1999). Als Folge dessen kommt es zu einem weiteren Ausstrom von Ca<sup>2+</sup> aus dem ER. Der Abfall der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im ER wird von dem Ca<sup>2+</sup>-sensorischen Protein STIM1 erkannt, das daraufhin oligomerisiert und mit seinem C-Terminus mit Orai1 in der Plasmamembran wechselwirkt (Liou et al., 2005; Roos et al.,

2005; Zhang et al., 2005; Feske et al., 2006; Huang et al., 2006; Vig et al., 2006). Der Kanal Orai1 öffnet sich daraufhin und es kommt zu einem lang anhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem extrazellulären Raum. Mittlerweile wird angenommen, dass Stim1 und Orai1 Teil eines größeren Proteinkomplexes sind, der verantwortlich für den *Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry* (SOCE) ist (Várnai et al., 2007). Erst kürzlich wurde das, zur Proteinfamilie der Myelin-basischen Proteine (MBP) gehörende Golli-Protein beschrieben, das mit Stim und Orai wechselwirken kann und vermutlich einen negativen Regulator für den SOCE darstellt (Feng et al., 2006; Walsh et al., 2010).

Durch das lang anhaltende  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal werden zahlreiche  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalproteine und dazugehörige Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel Calcineurin und der zugehörige Transkriptionsfaktor *Nuclear factor of activated T cells* (NFAT), aktiviert (Oh-Hora et al., 2008). Calcineurin ist eine Calmodulin-abhängige Serin/Threonin Phosphatase, die aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit besteht. Durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin an Calcineurin wird die Phosphataseaktivität aktiviert. Normalerweise liegt NFAT phosphoryliert im Cytosol vor, die Dephosphorylierung durch Calcineurin legt jedoch ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) frei und ermöglicht NFAT, auf diese Weise in den Kern zu gelangen (Hogan et al., 2003). NFAT-Moleküle sind an der Expression vieler induzierbarer Gene wie Interleukin-2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-5, dem Granulozyten-Makrophagen Koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF), Interferon (IFN)- $\gamma$ , FasL und dem Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) beteiligt (Rao et al., 1997; Macián et al., 2001; Katzav, 2004). Außerdem wird über NFAT-Moleküle auch die Expression immunregulatorischer Moleküle wie CD40L oder das zytotoxische T-Lymphozyten Antigen-4 (CTLA-4) kontrolliert. Das Cytokin IL-2 ist entscheidend für die Entwicklung der T-Zelle, da es autokrin die Proliferation der T-Zelle induziert. Die NFAT-abhängige Gentranskription hängt stark von einem lang anhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal ab. Sinkt das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal, kommt es zur Phosphorylierung von NFAT durch Proteinkinasen wie Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3), Caseinkinase 1 und dual-spezifische Tyrosin-Phosphorylierungsregulierte Kinasen (DYRK1 und DYRK2) und NFAT wird wieder ins Cytosol zurücktransportiert (Okamura et al., 2000, 2004; Gwack et al., 2006). So konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des NAADP-Signalweges zu einer verringerten Translokation von NFAT in den Kern und einer verminderten Proliferation der T-Zellen führt (Dammermann et al., 2009). Das kostimulatorische Signal über CD28 scheint die Lokalisation von NFAT im Kern zu verstärken, indem es Akt aktiviert, worüber wiederum die GSK3 inhibiert wird (Diehn et al., 2002). Für die erfolgreiche Proliferation der T-Zelle scheint deshalb die Kostimulation über CD28 notwendig zu sein. In der Abwesenheit eines kostimulatorischen Signals über CD28 geht die T-Zelle in einen anergen Zustand über (Feske et al., 2003). Neben Calcineurin und NFAT gibt es noch weitere Signalproteine, wie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-abhängige Kinase (CaMK) und ihr Zielprotein, das *cAMP-responsive-element-binding protein* (CREB), der *Myocyte enhancer factor 2* (MEF2) und nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B) (Oh-Hora et al.,

2008). Daneben aktiviert die Bildung von DAG die Signalwege der Ras-Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und der Proteinkinase C (PKC). Auf diesem Wege werden die Transkriptionsfaktoren AP-1, der sich aus c-Jun und c-Fos zusammensetzt, und NF $\kappa$ B aktiviert (Karin und Gallagher, 2005; Schulze-Luehrmann und Ghosh, 2006). NFAT kann mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 wechselwirken, wodurch es zur Integration des Ca<sup>2+</sup>/Calcineurin-Signalweges mit dem MAPK-Signalweg kommt. Die Zusammensetzung von AP-1 ist entscheidend für die Expression von IFN- $\gamma$  und IL-4 (Savignac et al., 2007).

### Die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen

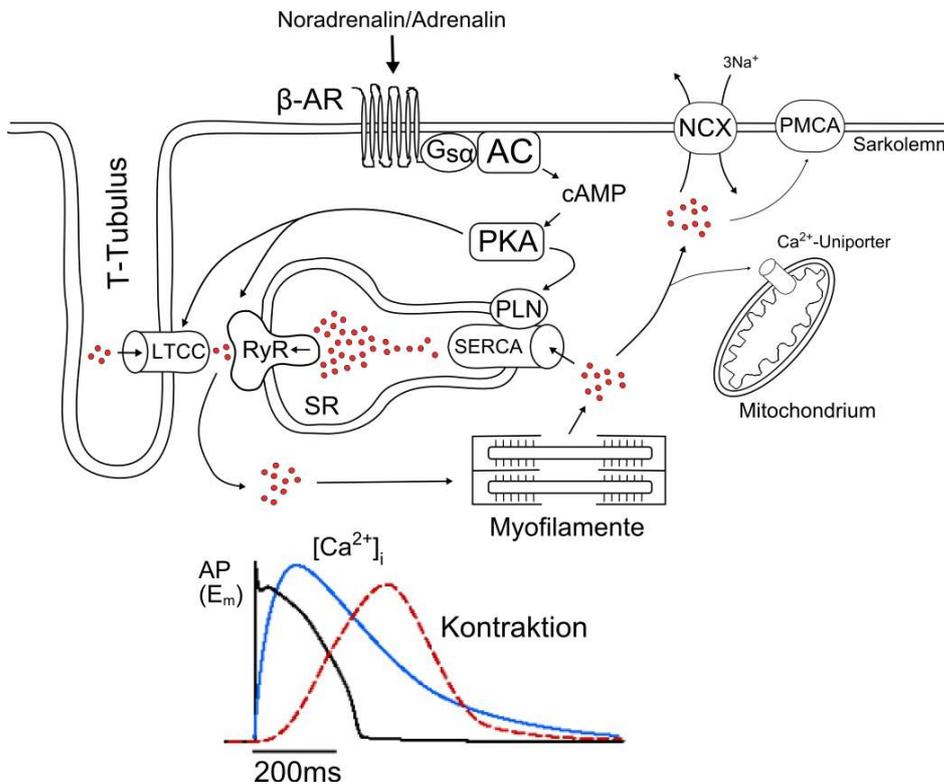
Mit Hilfe der T-Zellen können Pathogene im Regelfall schnell und effektiv aus dem Körper entfernt werden. Kritisch wird es, wenn sich T-Zellen im Fall von Autoimmunerkrankungen gegen körpereigene Proteine richten und es dabei zur Schädigung von Gewebe und lebenswichtigen Organen kommt. Die Multiple Sklerose ist ein Beispiel für eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen, bei der sich das Immunsystem gegen den eigenen Körper richtet. Im Verlauf der Krankheit entwickelt sich eine chronische Entzündung im Gehirn, bei der autoreaktive T-Zellen und Makrophagen in das Zentrale Nervensystem (ZNS) einwandern und zur Demyelinisierung sowie einem Verlust von Axonen und Neuronen führen (Hafler et al., 2005). In Folge der Demyelinisierung kommt es zu einer verlangsamten Reizweiterleitung im ZNS, die sich vor allem in Sehstörungen, Missempfindungen und Lähmungen äußert (Limmroth und Sindern, 2004). Letztere dominieren das Krankheitsbild umso stärker, je weiter die Krankheit fortgeschritten ist. Obwohl die Multiple Sklerose wahrscheinlich vornehmlich durch T-Helferzellen des Typs I vermittelt wird, ist sie eine sehr heterogene Erkrankung, bei der auch andere Zellen des adaptiven Immunsystems wie B-Zellen und T<sub>H</sub>17-Zellen sowie das angeborene Immunsystem eine Rolle spielen (Lopez-Diego und Weiner, 2008). Die Bedeutung der T-Zellen in der Multiplen Sklerose konnte bisher am besten in einem analogen Tiermodell, der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), untersucht werden.

Ein Ziel von Therapien der Multiplen Sklerose ist es, die unerwünschte Aktivierung der T-Zellen zu unterdrücken. Bisher werden vor allem Immunmodulatoren eingesetzt, die den Schweregrad der Krankheit vermindern und das Auftreten der schubartigen Anfälle verringern sollen. Dazu gehören drei rekombinante IFN- $\beta$  Agenzien sowie Glatirameracetat (Lopez-Diego und Weiner, 2008). Bei aggressiven sowie progressiven Verläufen der Multiplen Sklerose zeigen diese Medikamente jedoch keine Wirkung. Weitere Wirkstoffe wie Mitoxantron, das cytotoxisch wirkt, oder Natalizumab, das die Migration der Immunzellen beeinflusst, zeigen jedoch erhebliche Nebenwirkungen und werden deshalb nur nach genauem Abwägen in äußerst aggressiven Fällen der Multiplen Sklerose eingesetzt. Neue Therapieansätze wie die Peptid-spezifische Toleranz versuchen die Antigen-spezifität auszunutzen und somit eine generelle Immunsuppression zu verhindern sowie die Heterogenität dieser Krankheit zu berücksichtigen. Da bisher keine wirksamen Therapien zur Verfügung stehen, die das Fort-

schreiten der Krankheit verhindern und eine dauerhafte Remission herbeiführen könnten, ist es notwendig, die Reaktivierung der T-Zellen während einer Autoimmunerkrankung weiter aufzuklären. Auf diese Weise könnten neue Möglichkeiten zur Intervention in die Signalgebung von T-Zellen entstehen, die ein früheres und spezifischeres Eingreifen in die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen erlauben.

### 1.3 Die Excitations-Kontraktions-Kopplung in Cardiomyozyten

$\text{Ca}^{2+}$  ist im Herzen essentiell für die Kontraktion und die Relaxation des Organs (Bers, 2001, 2002, 2008). Dieser als Erregungs-Kontraktions-Kopplung (EKK) bezeichnete Prozess ermöglicht das regelmäßige Schlagen des Herzens (Abbildung 1.4).



**Abbildung 1.4: Die Excitations-Kontraktions-Kopplung (EKK) in ventrikulären Myozyten.** Durch die elektrische Stimulation der Myozyte tritt  $\text{Ca}^{2+}$  über den LTCC in die Zelle ein und aktiviert den RyR. Daraufhin kann  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR ausströmen, an die Myofilamente binden und so die Kontraktion auslösen. Die Kontraktion endet, indem  $\text{Ca}^{2+}$  hauptsächlich über NCX und die SERCA wieder aus dem Cytosol transportiert wird. Eine Modulation der EKK kann über eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation statt finden. Das Diagramm zeigt den Zeitverlauf eines Aktionspotentials, eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und einer Kontraktion in einer ventrikulären Myozyte aus Kaninchen bei  $37^\circ\text{C}$ . AC: Adenylatcyclase;  $\beta$ -AR:  $\beta$ -Adrenozeptor; cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; NCX:  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher;  $\text{G}_{\text{S}\alpha}$ : G-Protein  $\text{S}\alpha$ ; LTCC: L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal; PKA: Proteinkinase A; PLN: Phospholamban; PMCA: Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; RyR: Ryanodinrezeptor; SR: sarkoplasmatisches Retikulum; SERCA: sarco-/endoplasmatische Retikulum-ATPase (SERCA). Verändert nach: Bers (2002).

Die Kontraktion einer Zelle beginnt mit der Depolarisation, wodurch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Plasmamembran aktiviert werden. In ventrikulären Cardiomyozyten kommt unter normalen Bedingungen nur der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal vor. In Zellen des Reizleitungssystems und in Schrittmacherzellen findet sich auch der T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, der aufgrund seiner geringen Stromdichte jedoch auch hier nur eine untergeordnete Rolle für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom spielt. Der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal wird durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Inaktivierung auf der cytosolischen Seite begrenzt. Die Inaktivierung wird durch Calmodulin vermittelt, das an den C-Terminus des Kanals bindet (Peterson et al., 1999; Zühlke et al., 1999). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle der Plasmamembran befinden sich in enger Nachbarschaft zu den RyR, die im SR lokalisiert sind (Scriven et al., 2000). Sie bilden gemeinsam eine Funktionseinheit aus, die auch als *Couplon* bezeichnet wird. Ein Couplon besteht aus zehn bis 25 L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und 100 bis 200 RyR. Wenn sich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal öffnet, steigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration lokal in weniger als einer Millisekunde in dem Spalt zwischen dem RyR und dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal auf zehn bis  $20 \mu\text{M}$  an. Dies aktiviert den RyR über CICF, so dass  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR in das Cytosol strömen kann. Der Ausstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR trägt weiter zur Inaktivierung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bei. Pro *Couplon* öffnen sich zwischen sechs und 20 RyR gleichzeitig und generieren einen  $\text{Ca}^{2+}$ -*Spark*. Die Synchronisierung wird über CICF und vermutlich auch über physikalische Kopplung möglich (Kaftan et al., 1996). Durch das gleichzeitige Öffnen mehrerer RyR kann die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Spalte auf 200 bis  $400 \mu\text{M}$  ansteigen. Das freie  $\text{Ca}^{2+}$  diffundiert in das Cytosol und aktiviert dort die Myofilamente zur Kontraktion. Eine Zelle enthält etwa 20.000 *Couplons*. Da ein Couplon unter normalen Bedingungen nicht in der Lage ist, andere Couplons zu aktivieren, muss die Aktivierung aller *Couplons* einer Zelle synchron erfolgen. Auf diese Weise werden mehrere Tausend  $\text{Ca}^{2+}$ -*Sparks* gleichzeitig erzeugt, und es entstehen lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiege, die räumlich und zeitlich vollständig überlappen. Das freie  $\text{Ca}^{2+}$  bindet an das, dem Calmodulin ähnlichen TroponinC (TnC), das an der Regulation der dünnen Filamente in der Herzzelle beteiligt ist. Durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  kann TnC stärker an TroponinI (TnI) binden, das auf diese Weise von seiner Aktinbindungsstelle gezogen wird. Dies ermöglicht wiederum dem Tropomyosinkomplex, tiefer in die Furche des Aktinfilamentes zu reichen, so dass die Myosinköpfe mit dem Aktin interagieren können. Als Folge dessen kann der Troponin/Tropomyosinkomplex noch weiter in das Aktinfilament hineinreichen und erlaubt die weitere Querbrückenbildung an benachbarten Aktinbindungsstellen sowie die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an weiteren TnC-Molekülen. So entsteht die starke Kooperativität dieses Prozesses. Durch die Querbrückenbildung wird die Affinität von  $\text{Ca}^{2+}$  für TnC noch gesteigert, woraus eine verringerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Dissoziation resultiert und der aktive Zustand verlängert wird. Die Stärke der Kontraktion kann durch die Dauer oder die Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und durch die Sensitivität der Myofilamente für  $\text{Ca}^{2+}$  beeinflusst werden. Eine Steigerung der Sensitivität wird über die Verlängerung der Sarcomere erreicht, eine geringere Sensitivität entsteht zum Beispiel bei einer Acidose, bei angehobenen

Phosphat- und  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen oder bei einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation (siehe unten). Für die Relaxation muss das  $Ca^{2+}$  wieder aus dem Cytosol befördert werden, damit  $Ca^{2+}$  vom TnC dissoziieren kann. Im Gleichgewicht gilt, dass dieselbe Menge  $Ca^{2+}$  über die SERCA in das SR zurückgepumpt wird, wie ursprünglich durch den RyR ausgeströmt ist. Ebenso gelangt dieselbe Menge an  $Ca^{2+}$  über den  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher (NCX) in den extrazellulären Raum, wie zuvor durch den L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal eingeströmt ist. Die  $Ca^{2+}$ -ATPase des Sarcolemma leistet kaum einen Beitrag zum  $Ca^{2+}$ -Ausstrom. Der NCX kann in beide Richtungen arbeiten, transportiert aber normalerweise  $Ca^{2+}$  aus der Zelle. Zu einem Einstrom von  $Ca^{2+}$  kann es kommen, wenn die intrazelluläre  $Na^+$ -Konzentration erhöht ist, der  $Ca^{2+}$ -Ausstrom aus dem SR und/oder der  $Ca^{2+}$ -Einstrom über  $Ca^{2+}$ -Kanäle inhibiert werden oder wenn die Aktionspotentialdauer (APD) verlängert ist. Die Beteiligung der Kanäle beziehungsweise Pumpen an dem  $Ca^{2+}$ -Strom ist stark von der Spezies abhängig (Bassani et al., 1994). In der Maus oder der Ratte zirkuliert 90 bis 95 % des  $Ca^{2+}$  über das SR, im Menschen sind es hingegen nur etwa 70 %. Da die Maus häufig als Modellorganismus dient, müssen insbesondere weitere Unterschiede zum Menschen berücksichtigt werden, wie die höhere Verstärkung des  $Ca^{2+}$ -Signals in der Maus, die kürzere APD, eine andere Beteiligung der  $K^+$ -Ströme am Aktionspotential und eine höhere intrazelluläre  $Na^+$ -Konzentration. Auch die Mitochondrien können  $Ca^{2+}$  über den  $Ca^{2+}$ -Uniporter aufnehmen, allerdings macht das nur etwa 1 % des aus dem Cytosol zu entfernenden  $Ca^{2+}$  aus (Bassani et al., 1994). Mitochondrien spielen vor allem eine Rolle, um eine Überladung des Cytosols mit  $Ca^{2+}$  zu verhindern und auf diese Weise, Hyperkontraktionen, die Aktivierung von  $Ca^{2+}$ -abhängigen Proteasen und Arrhythmien zu verhindern. Allerdings geht dieser Prozess auf Kosten der ATP-Produktion und kann im schlimmsten Fall zum Zelltod führen. Ein weiterer  $Ca^{2+}$ -Ausstrom aus dem SR wird wahrscheinlich über die Beladung des SR und die Inaktivierung des RyR verhindert. Zum einen ist der RyR eine begrenzte Zeit nach der Aktivierung nicht ansprechbar, bis er sich wieder erholt hat (Fabiato, 1985; Schiefer et al., 1995; Sitsapesan et al., 1995b; Sham et al., 1998). Zum anderen weist er nach der Aktivierung eine geringere Offenwahrscheinlichkeit auf, die nur durch höhere  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen überwunden werden kann (Györke und Fill, 1993; Valdivia et al., 1995).

### **Modulation der EKK durch $\beta$ -adrenerge Stimulation**

Die EKK kann durch die sympathische Stimulation über  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren moduliert werden (Bers, 2002). Dies führt zu gesteigerten Kontraktionen und einer beschleunigten Relaxation, was als inotroper beziehungsweise lusitroper Effekt bezeichnet wird. Über G-Protein gekoppelte Rezeptoren wird die Adenylatcyclase zur Produktion von cyclischem AMP (cAMP) angeregt, was wiederum die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Die PKA phosphoryliert zahlreiche Zielproteine, die bei der EKK eine Rolle spielen. Dazu gehören Phospholamban, L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle, RyR, TnI und das Myosin-bindende Protein C. Der lusitrope Effekt

der PKA wird hauptsächlich durch die Phosphorylierung von Phospholamban und TnI vermittelt. Ersteres hebt die inhibierende Wirkung von Phospholamban auf die SERCA auf und beschleunigt so die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR. Durch die Phosphorylierung von TnI kann  $\text{Ca}^{2+}$  schneller von den Myofilamenten dissoziieren. Die Inotropie der PKA kommt durch einen gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und eine höhere Beladung des SR zustande. Auch der RyR kann durch die PKA phosphoryliert werden, inwiefern dieses jedoch die EKK beeinflusst, wird kontrovers diskutiert. Eisner postulierte, dass eine gesteigerte Sensitivität des RyR nur kurzzeitig einen Einfluss auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom hat (Eisner et al., 2000). Durch einen verstärkten Ausstrom aus dem SR über sensitivierte RyR würde mehr  $\text{Ca}^{2+}$  über den NCX aus der Zelle befördert werden. Dies hätte wiederum zur Folge, dass weniger  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR aufgenommen würde und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel des SR sinken würde. Ein geringerer  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel würde bei der nächsten Erregung den sensitivierten RyR ausgleichen. Derart würde sich das Gleichgewicht wieder einstellen und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude bliebe unverändert. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass ein verstärktes  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck des SR über einen sensitivierten RyR zu einem verminderten systolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal bei Herzversagen führt. Die Phosphorylierung des RyR kann durch die Proteinphosphatase 2A (PP2A) und die Proteinphosphatase 1 (PP1) rückgängig gemacht werden (Berridge et al., 2003). Eine weitere Modulation des RyR ist über das luminaire  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein Calsequestrin, sowie die cytosolischen Proteine Calmodulin und das FK506-bindende Protein 12.6 (FKBP12.6) möglich.

Im Gegensatz zu T-Zellen, in denen NAADP maßgeblich an der Entwicklung eines globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals beteiligt ist, scheint dieser Botenstoff in Cardiomyozten eher eine modulierende Funktion im Verlauf einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation einzunehmen (Macgregor et al., 2007a). NAADP ist in der Lage, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude und die Kontraktion während der Stimulation ventrikulärer Cardiomyozyten zu steigern, sowie das Auftreten und die Amplitude von  $\text{Ca}^{2+}$ -*Sparks* zu erhöhen. Der Effekt von NAADP kann durch die Inhibition der  $\text{H}^+$ -ATPase der lysosomalen Speicher mittels Bafilomycin A1 inhibiert werden. Der Einfluss von NAADP auf die EKK scheint eine Rolle bei der  $\beta$ -adrenergen Stimulation zu spielen, da die Inkubation mit Isoprenalin zu einer erhöhten NAADP-Konzentration in den Zellen führte.

### Die Entstehung von Arrhythmien

Die EKK ist streng reguliert und sobald es zu einer Störung der regelmäßigen Zu- und Abnahme des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals kommt, können arrhythmische Ereignisse auftreten. Unter arrhythmischen Ereignissen versteht man vor allem *Delayed after depolarizations* (DADs) und *Early after depolarizations* (EADs). DADs werden wahrscheinlich durch spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme aus dem SR in der diastolischen Phase aufgrund einer erhöhten SR-Beladung verursacht. Dadurch kommt es zu Nachkontraktionen und zu einem kurzzeitigen  $\text{Na}^+$ -Einstrom über den NCX. Dies führt zur Depolarisation des Membranpotentials bis zur Auslösung eines Aktionspotenti-

als. EADs treten eher bei einer langen APD, dem Langen QT-Syndrom oder einer Bradykardie (verlangsamte Schlagfolge) auf. Dabei kommt es wahrscheinlich zu einer Reaktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals, sobald dieser sich von der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Inaktivierung erholt hat (January und Riddle, 1989; Sipido et al., 1995).

Wie beschrieben, scheint  $\text{IP}_3$  nicht an der Excitations-Kontraktions-Kopplung beteiligt zu sein, allerdings wurde auch in ventrikulären Myozyten die Expression des  $\text{IP}_3\text{R}$  nachgewiesen (Perez et al., 1997; Lipp et al., 2000). Diese ist im Vergleich zum RyR aber um einen Faktor von 50 bis 100 geringer (Moschella und Marks, 1993). In ventrikulären Cardiomyozyten steigert Endothelin-1 über G-Protein gekoppelte Rezeptoren die Amplitude des globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals und das Auftreten spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Ereignisse (Proven et al., 2006). Dieser proarrhythmische Effekt kann durch Antagonisten für die PLC und den  $\text{IP}_3\text{R}$  gehemmt werden und durch membrangängiges  $\text{IP}_3$  simuliert werden. Auch in atrialen Myozyten scheint Endothelin-1 arrhythmische Ereignisse zu begünstigen. So kam es nach der Stimulation mit Endothelin-1 zu zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, die in 75 % der Fälle von vorzeitigen Aktionspotentialen begleitet waren, die durch DADs entstanden (Mackenzie et al., 2002). Wie in ventrikulären Cardiomyozyten konnte dieser Effekt durch einen membranpermeablen  $\text{IP}_3$ -Ester imitiert werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Endothelin-1 die Anzahl an nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in atrialen Cardiomyozyten erhöht, was wiederum über den  $\text{IP}_3$ -Signalweg vermittelt wird (Kockskämper et al., 2008). Auf diese Weise könnte  $\text{IP}_3$  zur Excitations-Transkriptions-Kopplung beitragen und die Entwicklung von Hypertrophien induzieren.

Sofern arrhythmische Ereignisse nur auf der Ebene von Einzelzellen auftreten, kommt es nicht zu einer Rhythmusstörung des gesamten Organs (Dhein und Stark, 2008). Erst wenn diese Veränderungen auf den gesamten Gewebeverband übertragen werden, entstehen Arrhythmien. Arrhythmien werden zum einen nach ihrem Rhythmus unterteilt. So spricht man bei einer verlangsamten Schlagfolge von einer Bradykardie und bei einer erhöhten Schlagfolge von einer Tachykardie. Des Weiteren ist eine Unterscheidung vom Ursprungsort der Arrhythmie möglich. Rhythmusstörungen können im Vorhof- und im Kammermyokard entstehen. Bisher eingesetzte Antiarrhythmika wirken auf Ionenkanäle und Rezeptoren der Plasmamembran und werden nach Vaughan Williams (1970) in vier Gruppen eingeteilt:  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -, und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker sowie  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten. Der Nachteil dieser Antiarrhythmika ist, dass sie die Elektrophysiologie des gesamten Herzens beeinflussen und nicht nur am Entstehungsort der Arrhythmie wirken (Dhein und Stark, 2008). Dies hat zur Folge, dass viele Antiarrhythmika kontraproduktiv wirken und ihrerseits einen proarrhythmischen Effekt aufweisen. Ein neuerer Ansatz versucht, die Kommunikation zwischen den Herzzellen zu erhöhen, indem Gap junctions durch antiarrhythmische Peptide beeinflusst werden. Aufgrund der bisher nur unzureichenden Therapiemöglichkeiten ist es außerordentlich erstrebenswert, neue Perspektiven in der Prävention und Behandlung von Herzrhythmusstörungen zu eröffnen.

Wie beschrieben, nimmt der  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende sekundäre Botenstoff NAADP eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion verschiedenster Zelltypen ein. Der mögliche Rezeptor von NAADP wird nach wie vor kontrovers diskutiert und eine Bindungsstelle von NAADP konnte bisher nicht identifiziert werden. Der Einsatz von Antagonisten für NAADP ist für die Forschung bedeutsam, da er neue Einblicke in den Signalweg von NAADP liefern könnte. Die beschriebene Bedeutung von NAADP als  $\text{Ca}^{2+}$ -*Trigger* machen diesen Signalweg auch aus klinisch therapeutischer Sicht interessant.

## 2 Fragestellung

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende sekundäre Botenstoff NAADP nimmt eine bedeutende Rolle bei zahlreichen physiologischen Prozessen wie der Aktivierung von T-Zellen und der Kontraktion von Muskelzellen ein. Derzeit wird davon ausgegangen, dass NAADP bereits in nanomolaren Konzentrationen wirksam ist und kleine *Trigger*-Signale liefert, durch deren Amplifikation ein globales  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal erst ermöglicht wird. Aufgrund seiner großen Bedeutung für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung stellte sich die Frage, ob der NAADP-Signalweg an pathophysiologischen Vorgängen beteiligt sein könnte. Zur Untersuchung dieser Fragestellung sollten ein immunologisches sowie ein kardiovaskuläres Zellmodell mit pathophysiologischem Hintergrund verwendet werden.

In dem ersten Modell sollte die Bedeutung von NAADP bei der Aktivierung von T-Zellen im Rahmen einer Autoimmunerkrankung analysiert werden. Das Modell ist angelehnt an die Multiple Sklerose, eine Autoimmunerkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS). Dafür sollten MBP-spezifische  $\text{CD4}^+$  T-Zellen verwendet werden, die in der Lage sind, eine Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), ein Tiermodell für die Multiple Sklerose in der Ratte, zu induzieren. Die Aktivierung der T-Zellen sollte in einem Zweizellsystem mit Astrozyten als Antigen-präsentierende Zellen stattfinden und mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging analysiert werden. Astrozyten, die zu den Gliazellen im ZNS gehören, besitzen die Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren und sind an Entzündungsvorgängen im ZNS beteiligt. Nach der Etablierung des Systems sollte durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren die Rolle von NAADP bei der Aktivierung autoreaktiver T-Zellen untersucht werden.

Bei dem zweiten Modell handelt es sich um ein zelluläres Modell für die Entstehung von Arrhythmien im Herzen. An isolierten Cardiomyozyten der Maus entstehen unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Hilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging untersucht werden, welche Rolle NAADP bei der Entstehung dieser zusätzlichen Transienten spielt.

---

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Antikörper

#### Erstantikörper:

$\alpha$ -Ratte-CD3 [IgM, aus der Maus, monoklonal, MCA772XZ] (AbD Serotec, München)

$\alpha$ -Ratte-CD3 zur Stimulation in Lösung [IgM, aus der Maus, monoklonal, MR5300] (Invitrogen, Karlsruhe)

$\alpha$ -Ratte-CD28 [IgG1, aus der Maus, monoklonal, MCA1331EL] (AbD Serotec, München)

$\alpha$ -Ratte-Ox6 (MHCII) [IgG1, aus der Maus] (erhalten von Prof. Flügel, Universitätsklinikum Göttingen)

Isotyp für  $\alpha$ -Ratte-Ox6 [IgG1,  $\kappa$ , aus der Maus, M1398] (Sigma-Aldrich, München)

#### Zweitantikörper:

$\alpha$ -Maus-IgG [FITC-konjugiertes  $F(ab')_2$  Fragment, aus der Ziege, 115-096-146] (JacksonImmunoResearch, West Grove, USA)

$\alpha$ -Maus-IgM zur Stimulation mit  $\alpha$ -CD3 in Lösung [aus der Ziege, M31500] (Invitrogen, Karlsruhe)

### 3.2 Zellkultur

#### 3.2.1 F10 Astrozyten

Der Astrozytenklon F10 wurde aus Hirnpräparationen von Lewis Ratten etabliert (Risau et al., 1990). Nach einer Kultivierung über mehrere Monate, in der sich den protoplasmischen Astrozyten ähnliche *Monolayer* herausgebildet hatten, wurden einzelne, *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP)-positive Zellkolonien ausgewählt und vermehrt. Der Klon F10 wurde freundlicherweise von Prof. Flügel (Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt.

#### 3.2.2 Primäre T-Zellen der Ratte

Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten T-Zellen handelt es sich um primäre CD4<sup>+</sup> Effektor T-Zellen, die ursprünglich aus den Lymphknoten von Lewis Ratten isoliert worden waren (Ben-Nun et al., 1981; Flügel et al., 1999). Diese T-Zellen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Flügel (Universitätsklinikum Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Für die Herstellung dieser Zellen wurden die Ratten zunächst mit MBP oder OVA immunisiert. Nach zehn Tagen wurden die inguinalen, poplietalen und paraaortalen Lymphknoten isoliert und aus den präparierten Zellen eine Primärkultur angelegt. Es folgten mehrere Restimulationszyklen mit dem spezifischen Antigen. Die Restimulationen dienen der Vermehrung der Zellen. Des Weiteren ist durch sie gewährleistet, dass die Mehrheit der Zellen auf das spezifische Antigen reagiert. Ab der dritten Restimulation können die T-Zellen eingefroren werden. Für die vorliegende Arbeit wurden T-Zellen verwendet, die mindestens drei Restimulationszyklen durchlaufen hatten. Die T-Zellen wurden für jeden Versuch frisch aufgetaut, da sie ohne Restimulation nicht länger in Kultur gehalten werden können. Um genügend T-Zellen zur Verfügung zu haben, müssen diese deshalb von Zeit zu Zeit durch Restimulationszyklen vermehrt werden.

### 3.2.3 Primäre Cardiomyozyten der Maus

Es wurden Mäuse im Alter von sechs bis 12 Wochen mit einem *Black Swiss*-, FVB- oder C57BL/6J-Hintergrund verwendet. Die letzteren beiden wurden freundlicherweise von Dr. Rudolph (Klinik und Poliklinik für Allgemeine und Interventionelle Kardiologie, UKE) zur Verfügung gestellt. Die Haltung und Behandlung der Tiere erfolgte gemäß den Richtlinien der NIH Publikation "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*" Nr. 85-23, in der revidierten Fassung von 1985.

### 3.2.4 Passage der F10 Astrozyten

Beim Astrozytenklon F10 handelt es sich um eine adhärente Zelllinie. Sie wurde bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert und alle drei bis vier Tage in einer Verdünnung von 1 : 20 umgesetzt. Für die Passage wurden die Zellen zunächst mit Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-freiem PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA pro 75 cm<sup>2</sup> Kulturfläche vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen, resuspendiert und in eine neue Kulturflasche überführt.

### 3.2.5 Restimulation der primären T-Zellen

Ein Restimulationszyklus beläuft sich in der Regel auf sieben Tage. An Tag null werden die T-Zellen mit Antigen-präsentierenden Zellen und ihrem spezifischen Antigen stimuliert. Innerhalb von zwei Tagen formen sich sogenannte Blasten, das heißt, die T-Zellen vergrößern sich und nehmen eine tropfenförmige Gestalt an. Im Verlauf der nächsten drei Tage kommt es zu einer starken Proliferation der T-Zellen, bis sie ab Tag fünf wieder in einen ruhenden Zustand übergehen und an Tag sieben erneut restimuliert werden können. Im ruhenden Zustand sind die T-Zellen wesentlich kleiner und haben eine Reiskorn-förmige Gestalt. Ab der sechsten bis siebten Restimulation proliferieren die T-Zellen nicht mehr so stark und sind sehr

empfindlich.

Für die Restimulation wurden T-Zellen verwendet, die sich an Tag sieben ihres Restimulationszyklus befanden. Die T-Zellen waren entweder frisch aufgetaut worden oder wurden nach einem Restimulationszyklus direkt einer neuen Restimulation unterworfen. Als Antigen-präsentierende Zellen wurden Thymozyten aus der Ratte präpariert, die mit 5000 Rad bestrahlt worden waren, um eine Proliferation dieser Zellen während der Restimulation zu verhindern. Die Thymozyten wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Flügel (Universitätsklinikum Göttingen) zur Verfügung gestellt. Für eine Restimulation in einer 6 cm-Ø Zellkulturschale mit 5 ml Medium sollte das Verhältnis von Thymozyten zu T-Zellen 70 Mio. zu zwei bis vier Mio. betragen. Optimal sind drei Mio. für die T-Zellen. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die T-Zellen mit der entsprechenden Menge an Thymozyten vereinigt und bei 300 g und 4°C für acht Minuten zentrifugiert. Allerdings ist es nicht notwendig für die Restimulation, dass die Zellen gemeinsam zentrifugiert werden. Anschließend wurden die Zellen in Restimulationsmedium aufgenommen, dem das Antigen (OVA oder MBP) in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugefügt wurde. Das Antigen sollte bei -20°C gelagert und wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermieden werden. Die Ansätze wurden auf 6 cm-Ø Zellkulturschalen verteilt und im Brutschrank bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> gehalten. Innerhalb von zwei Tagen sollten die T-Zellen ausreichend aktiviert worden sein. Bei der Beobachtung im Lichtmikroskop an Tag zwei sind Proliferationszentren zu sehen, die im Laufe des Tages durch die Vereinzelung der Zellen verschwinden. Außerdem können unterschiedliche Zellen unterschieden werden. Kleine runde Zellen sind noch vorhandene Thymozyten, die aber im Verlauf der Restimulation absterben. Große, tropfenförmige Zellen mit einem Durchmesser von etwa 15 µm sind die T-Zell-Blasten, die stark proliferieren. Vergleichsweise große, Reiskorn-förmige Zellen sind aktivierte T-Zellen, die aber bereits in den ruhenden Zustand übergehen. Alle großen runden Zellen und etwas dunklere Zellen in den Proliferationszentren sind tote T-Zellen. In den ersten 48 Stunden ihrer Restimulation produzieren die T-Zellen zahlreiche Cytokine wie Interleukin (IL)-2, IFN-γ und IL-17. Deshalb kann der Überstand der T-Zellen von Tag zwei der Restimulation auch zur Aktivierung anderer Zellen und wie in der vorliegenden Arbeit für die Induktion der MHCII-Expression auf den Astrozyten verwendet werden. Um die T-Zellen auch ab Tag zwei noch weiter zur Proliferation anregen zu können, müssen diese Faktoren dem Medium extra zugegeben werden. Dafür wird dem Medium Mediumüberstand ConA-stimulierter Milzzellen von Mäusen zugefügt (TCGF-Medium). Dieses Medium kann den T-Zellen an Tag zwei bis vier gegeben werden, allerdings nicht an Tag fünf. Sobald sich die T-Zellen vermehren, können sie in größere Schalen (10 cm-Ø Zellkulturschalen) überführt beziehungsweise verdünnt werden. Dies ist frühestens an Tag zwei der Fall. Allerdings sollten die Zellen immer gezählt werden und nicht in größere Schalen überführt werden, solange sie nicht eine bestimmte Zellzahl erreicht haben. Dies bedeutet, dass sich mindestens 12 Mio. Blasten in einer 6 cm-Ø Zellkulturschale befinden sollten, bevor

diese in eine 10 cm-Ø Zellkulturschale mit 10 ml Medium überführt werden. T-Zellen in einer 10 cm-Ø Zellkulturschale können ab einer Dichte von 30 Mio. geteilt werden. Falls sich weniger Zellen in einer Schale befinden, sie aber über Nacht eventuell zu dicht wachsen könnten, können auch Zellen von zwei auf drei Schalen verteilt werden. Bei einer guten Restimulation teilen sich die T-Zellen alle sechs Stunden. An Tag drei tendieren die T-Zellen dazu aneinander zu hängen. An Tag fünf sollten die Zellen gar nicht mehr geteilt werden. In ihrem stabilsten Zustand befinden sich die T-Zellen an Tag vier, weshalb dieser Tag gut dafür geeignet ist, einen Teil der T-Zellen einzufrieren. In der Regel wurden T-Zellen an Tag vier und an Tag sechs eingefroren. Die T-Zellen, die nicht eingefroren wurden, konnten an Tag sieben für einen neuen Restimulationszyklus verwendet werden.

### 3.2.6 Stimulation der primären T-Zellen mit MBP-inkubierten Astrozyten

$6 \times 10^5$  Astrozyten wurden in 10 ml Medium in einer Zellkulturschale (10 cm-Ø) ausgesät und über Nacht anwachsen gelassen. Am nächsten Morgen wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch frisches Medium, das 25 % (v/v) Überstand restimulierter T-Zellen enthielt, ersetzt. Der Überstand stammte von T<sub>OVA</sub>-Zellen zwei Tage nach ihrer vierten Restimulation. Er wurde unfiltriert oder filtriert ( $2 \mu\text{m}$  *low binding* Filter) eingesetzt. Die Astrozyten wurden zur Induktion der MHCII-Expression 48 Stunden mit diesem konditionierten Medium im Brutschrank bei 37°C und 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Zwei Tage später wurden die Astrozyten mit 1 ml 2 mM EDTA in PBS pro Zellkulturschale abgelöst, in 9 ml TCM resuspendiert und in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine  $\gamma$ -Bestrahlung der Astrozyten in einer Anlage (LISA) mit einer offenen Caesium-137 Quelle für 18 Minuten (2500 rad = 25 Gy; durchgeführt am Heinrich-Pette Institut von Dr. A. Hermannstädter). Dies sollte eine weitere Proliferation der Zellen im Verlauf des Versuches verhindern. Nach der Bestrahlung wurden die Astrozyten noch ein Mal mit TCM gewaschen, um restliche Cytokine zu entfernen. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und mit TCM auf  $1 \times 10^5$  Zellen pro ml eingestellt. Anschließend wurde jeweils 1 ml der Zellsuspension pro Vertiefung einer 24-Loch Zellkulturplatte ausgesät und die Astrozyten zum Anwachsen für drei Stunden im Brutschrank bei 37°C und 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nun erfolgte die Zugabe der T<sub>MBP</sub>-Zellen und des Antigens MBP. Die T-Zellen waren bereits zwei Tage vorher aufgetaut worden. Zu diesem Zeitpunkt befanden sie sich an Tag vier ihres Restimulationszyklus, das heißt, zum Zeitpunkt der Stimulation mit den Astrozyten befanden sie sich an Tag sechs ihrer Restimulation und somit wieder im ruhenden Zustand. Zunächst wurde die Zellzahl der T-Zellen bestimmt und eine entsprechende Menge bei 300 g und 4°C für 8 Minuten zentrifugiert. Die T-Zellen wurden in TCM mit 1 % Rattenserum (Restimulationsmedium) mit einer finalen Konzentration von  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro ml aufgenommen. Außerdem wurde das Antigen MBP in einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  zugegeben. Nun wurde das Medium von den Astrozyten abgenommen und 1 ml der T-Zellsuspension, das heißt 250.000

T-Zellen inklusive Antigen, zu den Astrozyten gegeben. Als Kontrolle wurden die T-Zellen ohne das spezifische Antigen eingesetzt. Die Zellen wurden nun gemeinsam für 21 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Schließlich wurde das Medium von den Zellen abgenommen und in ein 1,5 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Überstände wurden für 25 Minuten bei 555 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand sofort abgenommen und in Volumina von 250 µl aliquotiert. Die Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung für die Bestimmung der IL-2-Konzentration (siehe 3.6) bei -80°C eingefroren.

### 3.2.7 Präparation primärer Cardiomyozyten

Die Präparation der Maus wurde in der Regel von Elisabeth Krämer (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, UKE) durchgeführt, in einigen Fällen auch von Dr. Rudolph und Bianca Mattheß (Klinik und Poliklinik für Allgemeine und Interventionelle Kardiologie, UKE). Der Maus wurden etwa 100 µl Heparin (20 Units) injiziert, um die Bildung von Thromben während der Präparation zu verhindern. Nach fünf bis zehn Minuten wurde die Maus mit CO<sub>2</sub> betäubt und durch Genickbruch getötet. Die Maus wurde auf dem Präparationsbrett festgeklebt und das Fell am Brustkorb mit Ethanol befeuchtet. Das Fell inklusive des Brustbeins wurde angehoben und eingeschnitten. Das Fell inklusive der Rippen wurde seitlich möglichst bis zum Ende aufgeschnitten und weggeklappt. Fett und ausgelaufenes Blut wurden mit Wattestäbchen von dem Herz und den Gefäßen geschoben. Nachdem die Aorta lokalisiert wurde, wurde eine spitze Pinzette unter die Aorta geführt und diese vorsichtig vom Unterewebe gelöst. Die Aorta wurde mit einer stumpfen Pinzette festgehalten und oberhalb durchgetrennt. Dabei sollte die Aorta zwei bis drei Millimeter lang sein. Das Herz wurde nun von restlichem Gewebe abgeschnitten, wobei nah am Herzen gearbeitet wurde, um Restgewebe zu vermeiden. Die Aorta wurde mit Hilfe von spitzen Pinzetten geöffnet und über die Perfusionskanüle gezogen. Anschließend wurde die Aorta mit einem Faden festgebunden und das Ventil geöffnet, um zu überprüfen, ob das Herz perfundiert wird. Das Herz sollte dabei anschwellen und durch das Ausbluten eine hellere Farbe annehmen. Dann wurde der Faden bis auf kurze Enden abgeschnitten und das Herz mit der Kanüle an die bereits laufende Perfusionsanlage (Langendorff-Apparat) gehängt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen in der Kanüle vorhanden sind. Die Perfusion wurde auf eine Geschwindigkeit von 5,5, das entspricht 3,2 ml pro Minute, bei einer Temperatur von 37°C eingestellt. Das Herz wurde vier bis sechs Minuten mit dem Perfusionspuffer durchgespült. Dabei sollten die Koronararterien frei sein und die Vorhöfe aufgebläht erscheinen. Dann wurde die Anlage auf den Verdaupuffer umgestellt. Der Puffer benötigt etwa vier Minuten, bis er durch die Anlage gelaufen ist und das Herz erreicht. Der Verdau erfolgte in der Regel für acht, maximal aber neun Minuten. Dabei sollte das Herz eine opaleszente Farbe annehmen. Während des Verdaus wurden 2,5 ml des Verdaupuffers abgenommen und in einer Porzellan-

schale vorgelegt. Nach dem Verdau wurde das Herz an der Kanüle unterhalb der Aorta und der Vorhöfe abgeschnitten, um lediglich die Ventrikel zu behalten. Das Herz wurde in dem Verdaupuffer mit zwei spitzen Pinzetten, die umgekehrt gehalten wurden, zerkleinert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Dabei wurde eine Pipette mit großem Durchmesser verwendet, die vorher mit Puffer angefeuchtet worden war, um ein Anheften der Zellen an der Wand der Pipette zu vermeiden. Die Schale wurde mit 2,5 ml der Stopplösung 1 gespült und mit den Herzzellen vereinigt. Nun wurden die Herzzellen gut resuspendiert. Anschließend wurden die groben Herzreste absitzen gelassen und der Überstand (Ü1) vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Das Pellet wurde mit 5 ml Stopplösung 2 resuspendiert und erneut wurden die größeren Stücke absitzen gelassen (Ü2). In der Zwischenzeit wurde Ü1 bei einer Umdrehung von 500 rpm (Universal 16, Hettich, Tuttlingen) eine Minute bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml Stopplösung 2 resuspendiert und in eine Zellkulturschale überführt. Ü2 wurde abgenommen und mit den Herzzellen in der Zellkulturschale vereinigt. Falls das Herz sich besonders leicht zerrupfen ließ, was auf einen starken Verdau hindeutete, wurde sofort nach dem Zerrupfen Stopplösung 1 zugegeben und die Schale mit Stopplösung 2 gespült. Schließlich musste die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Lösung langsam erhöht werden. Dazu wurden drei Zugaben einer 10 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (50, 50 und 100  $\mu\text{l}$ ) und zwei Zugaben einer 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (30 und 50  $\mu\text{l}$ ) durchgeführt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde vier bis fünf Minuten abgewartet. Bei der Zugabe wurde die Schale leicht hin- und hergeschwenkt, aber nicht im Kreis bewegt, um ein Verklumpen der Zellen zu vermeiden. Während der Aufarbeitung der Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen und unter dem Mikroskop beobachtet, um die Qualität der Zellen zu beurteilen.

Nach der abgeschlossenen Präparation wurden die Cardiomyozyten bei 500 rpm (Universal 16, Hettich, Tuttlingen) für eine Minute bei RT zentrifugiert, in 5 ml Medium aufgenommen und ihre Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Dabei wurden nur stäbchenförmige Zellen gezählt. Die Konzentration wurde auf 20.000 Cardiomyozyten pro ml eingestellt und je 300  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension pro Vertiefung eines mit Laminin-beschichteten  $\mu$ -Slides 8 well ausgesät. Pro Kammer wurden zwei Vertiefungen belegt. Die Zellen wurden während des Messtages bei 2%  $\text{CO}_2$  und 37°C im Brutschrank aufbewahrt. Die Beladung der Zellen begann frühestens nach einer 30-minütigen Inkubation im Brutschrank, um den Zellen ausreichend Zeit für das Anheften auf der Lamininbeschichtung zu geben.

### 3.2.8 Kryokonservierung von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Astrozyten zunächst wie bei der Passage (siehe 3.2.4) abgelöst. Anschließend wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ihre Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden bei 300 g und 4°C für acht Minuten zentrifugiert und mit einer Konzentration von 15 Mio. pro ml in 0°C kaltem Einfriermedium aufgenommen. Die Zellen wurden in

Kryoröhrchen aliquotiert und zunächst für zwei Tage in einer Styroporbox bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, bevor sie langfristig in flüssigen Stickstoff überführt wurden. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen in ein  $37^{\circ}\text{C}$  warmes Wasserbad gehalten. Dann wurde die Zellsuspension so schnell wie möglich in das 10-fache Volumen an frischem Medium überführt und bei 300 g und  $4^{\circ}\text{C}$  für acht Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium in Kulturflaschen überführt (2 Mio. pro  $75\text{ cm}^2$ ) und im Brutschrank kultiviert.

Nach einer Restimulation wurden die T-Zellen in der Regel an Tag vier oder an Tag sechs eingefroren. T-Zellen von Tag sechs sind nicht mehr so stabil wie die von Tag vier, weshalb meist mehr Zellen beim Einfrieren und Auftauen sterben. Allerdings können diese T-Zellen schneller für einen Versuch eingesetzt werden, da bei T-Zellen von Tag vier noch zwei Tage gewartet werden muss. Die T-Zellen sollten nur eingefroren werden, wenn sie sich im ruhenden Zustand befinden, das heißt, dass sie eine Reiskorn-förmige Gestalt mit einem Durchmesser von 8 bis  $10\text{ }\mu\text{m}$  aufweisen. Die T-Zellen wurden aus der Zellkulturschale in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und ab diesem Zeitpunkt auf Eis gehalten. Die Schale wurde mit kaltem TCM nachgespült. Nach der Bestimmung der Zellzahl, wurden die T-Zellen bei 300 g und  $4^{\circ}\text{C}$  für acht Minuten zentrifugiert und mit einer Konzentration von 20 Mio. pro ml in  $0^{\circ}\text{C}$  kaltem Einfriermedium aufgenommen. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen aliquotiert (etwa 30 Mio. in 1,5 ml und 16 Mio. in 0,8 ml Kryoröhrchen) und zunächst für zwei Tage in einer Styroporbox bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, bevor sie langfristig in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Zum Auftauen der T-Zellen wurde zunächst die 10-fache Menge an TCM in einem 50 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt. Das Kryoröhrchen wurde dann in einem  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde tropfenweise, unter Drehen des Reaktionsgefäßes in das TCM überführt. Durch das im Einfriermedium vorhandene DMSO sinken die Zellen schnell zu Boden. Würde man sie auf einmal überführen, könnten einige Zellen durch die starke mechanische Beanspruchung sterben. Anschließend wurden die T-Zellen bei 300 g und  $4^{\circ}\text{C}$  für acht Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 ml TCM inklusive 10 % Pferdeserum aufgenommen und resuspendiert. Es schloss sich ein erneuter Zentrifugationsschritt an. Schließlich wurden die T-Zellen in 10 ml TCM inklusive 10 % (v/v) Pferdeserum aufgenommen, in eine 10 cm- $\emptyset$ -Zellkulturschale überführt und im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 10 %  $\text{CO}_2$  gehalten. Wenn Blasten aufgetaut werden, müssen diese so lange in Kultur gehalten werden, bis sie in den ruhenden Zustand übergegangen sind. Erst dann können sie für weitere Versuche verwendet werden. Das bedeutet, dass Zellen, die an Tag vier eingefroren wurden, nach dem Auftauen vor ihrer Verwendung zwei Tage in Kultur gehalten werden müssen. Zwischen Tag vier und Tag fünf sollten sich die Zellen ein bis zwei Mal teilen. Falls die Zellen nicht gut aussehen, ist vermutlich ein Problem beim Einfrieren aufgetreten und es ist sehr wahrscheinlich, dass alle Zellen bei der nächsten Restimulation sterben. Im ruhenden Zustand konnten die T-Zellen für weitere Restimulationen oder für  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen verwendet werden.

### 3.2.9 Puffer und Lösungen

#### F10 Astrozyten und primäre T-Zellen

- 2 mM EDTA in  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS
- Einfriermedium F10 Astrozyten: DMEM-Grundmedium mit Glutamin, ohne HEPES; 45 % (v/v) FBS; 10 % (v/v) DMSO
- Einfriermedium T-Zellen: TCM; 50 % (v/v) Pferdeserum; 10 % (v/v) DMSO
- Kulturmedium F10 Astrozyten: T-Zell-Medium (TCM); 10 % (v/v) FBS
- 1 mg/ml MBP in  $\text{ddH}_2\text{O}$
- PBS ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -frei): 140 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,4 (mit HCl)
- Restimulationsmedium primäre T-Zellen: DMEM-Grundmedium mit Glutamin, ohne HEPES; 100 U/ml Penicillin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin; 1 % (v/v) Nicht-essentielle Aminosäuren; 36 mg/l Asparagin; 1 mM Natrium-Pyruvat; 0,004 ‰ (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 1 % (v/v) Rattenserum
- TCGF-Medium (*T cell growth factor*) primäre T-Zellen: DMEM-Grundmedium mit Glutamin, ohne HEPES; 100 U/ml Penicillin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin; 1 % (v/v) Nicht-essentielle Aminosäuren; 36 mg/l Asparagin; 1 mM Natrium-Pyruvat; 0,004 ‰ (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 7,5 % (v/v) Mediumüberstand ConA-stimulierter Milzzellen von Mäusen (sollte zwischen 5 und 10 % liegen); 10 % (v/v) Pferdeserum
- T-Zell-Medium (TCM): DMEM-Grundmedium mit Glutamin ohne HEPES; 100 U/ml Penicillin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin; 1 % (v/v) Nicht-essentielle Aminosäuren; 36 mg/l Asparagin; 1 mM Natrium-Pyruvat; 0,004 ‰ (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol
- Trypsin/EDTA: 0,05 % (w/v) Trypsin; 0,02 % (w/v) EDTA in  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS

#### Primäre Cardiomyozyten

- 10 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in  $\text{ddH}_2\text{O}$
- 100 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in  $\text{ddH}_2\text{O}$
- Heparin: 200 U/ml Liquemin N10000 (Roche, Mannheim)
- Laminin: 0,01 mg/ml Laminin (Roche, Mannheim) in  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS
- Kulturmedium primäre Cardiomyozyten: MEM-Grundmedium mit Hank's und L-Glutamin; 5 % (v/v) NCS oder FCS; 10 mM BDM (Butanedionmonoxim)
- Liberase TM *Research Grade* (Stock) (Roche, Mannheim): nach den Herstellerangaben gelöst; 5 mg/ml Collagenase; bei  $-20^\circ\text{C}$
- Liberase Blendzyme 3 (Stock) (Roche, Mannheim): nach den Herstellerangaben gelöst; 7 mg/ml; 28 Collagenase Wünsch Einheiten/ml; bei  $-20^\circ\text{C}$
- Perfusionspuffer (Stock): 113 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 0,6 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1,2 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 12 mM  $\text{NaHCO}_3$ ; 10 mM  $\text{KHCO}_3$ ; 10 mM HEPES (pH 7,46 mit NaOH); 30 mM Taurin; bei  $4^\circ\text{C}$

- Perfusionspuffer (frisch): 5,55 mM Glucose; 10 mM BDM in Perfusionspuffer (Stock); pH 7,46 (mit HCl)
- Stopplösung 1: 10 % (v/v) NCS oder FCS; 12,5  $\mu$ M  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in Perfusionspuffer (frisch)
- Stopplösung 2: 5 % (v/v) NCS oder FCS; 12,5  $\mu$ M  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in Perfusionspuffer (frisch)
- Verdaupuffer: 12,5  $\mu$ M  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 500  $\mu$ l Liberase Blendzyme 3 (Stock) oder 300  $\mu$ l Liberase TM *Research Grade* (Stock) in 35 ml Perfusionspuffer (frisch)

MBP, Rattenserum und der Mediumüberstand ConA-stimulierter Milzzellen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Flügel (Universitätsklinikum Göttingen) zur Verfügung gestellt.

### 3.2.10 Geräte

- CO<sub>2</sub>-Inkubator (Heraeus, Hanau)
- Sterile Werkbank (BDK, Sonnenbühl-Genkingen)
- Lichtmikroskop (Will, Wetzlar)
- Hämozytometer mit Teilung nach Neubauer (Hellma, Müllheim)
- Zentrifuge Universal 16 (Hettich, Tuttlingen)
- Zentrifuge Varifuge 3.OR (Heraeus, Hanau)

## 3.3 Molekularbiologische Techniken

### 3.3.1 Präparation von Gesamt-RNA

Für die Analyse der Expression der RyR-Subtypen wurde RNA aus primären T-Zellen der Ratte aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde von Angelika Harneit (Institut für Biochemie und Molekularbiologie I) mit dem *RNeasy Mini Kit* nach den Angaben des Herstellers Qiagen (Hilden) durchgeführt. Zur Präparation der Gesamt-RNA wurden  $1 * 10^7$  Zellen eingesetzt. Für die Fragmentierung der genomischen DNA wurden QiaShredder-Säulchen (Qiagen, Hilden) verwendet. Um eine Kontamination mit DNA zu verhindern, wurde zusätzlich zum Standardprotokoll des Herstellers während der RNA-Präparation ein DNase-Verdau auf der Säule durchgeführt. Die RNA wurde in RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur Verwendung bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert. Die Konzentration der RNA-Präparation wurde durch photometrische Bestimmung der Absorption bei 260 nm ermittelt. Eine  $\text{OD}_{260\text{nm}}$  von 1 entspricht dabei einer RNA-Konzentration von 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Gallagher und Desjardins, 2006). Da das Absorptionsverhalten von Nukleinsäuren vom pH-Wert abhängt und Proteinkontaminationen bei alkalischem pH-Wert leichter zu detektieren sind, wurden die Messungen in 10 mM Tris-Puffer bei einem pH-Wert von 8,0 durchgeführt (Wilfinger et al., 1997).

Für die Analyse der Expression des Tpc1 und des Tpc2 wurde RNA aus den Ventrikeln von

Mäusen aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde von Elisabeth Krämer (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, UKE) mit dem *SV Total RNA Isolation System* nach den Angaben des Herstellers Promega (Madison, USA) durchgeführt.

### 3.3.2 Synthese von cDNA

Für die Analyse der Expression des *Tpc1* und des *Tpc2* wurde die aus Ventrikeln präparierte RNA in cDNA umgeschrieben. Die Synthese der cDNA wurde von Elisabeth Krämer (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie, UKE) mit dem *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System* nach den Angaben des Herstellers Invitrogen (Karlsruhe) durchgeführt.

### 3.3.3 One Tube RT-PCR

Das Titan *One Tube* RT-PCR-System (Roche, Mannheim) wurde verwendet, um die Expression der RyR-Subtypen in der Ratte auf RNA-Ebene zu überprüfen. Bei der *One Tube* RT-PCR wird die RNA in einem Ansatz mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und die Zielsequenz anschließend amplifiziert.

Reaktionsansätze für die RT-PCR:

Mix 1		Mix 2	
0,2 mM	dNTPs	5 $\mu$ l	5x RT-PCR-Puffer
5 mM	DTT	0,5 $\mu$ l	Enzym-Mix
5 U	RNase Inhibitor		
200 ng	RNA <i>Template</i>		
ad 10,5 $\mu$ l	ddH <sub>2</sub> O	ad 12,5 $\mu$ l	ddH <sub>2</sub> O

#### Für jede Probe:

10,5 $\mu$ l	Mix 1
12,5 $\mu$ l	Mix 2
0,4 pmol/ $\mu$ l	<i>sense</i> Primer
0,4 pmol/ $\mu$ l	<i>reverse antisense</i> Primer

Die RT-PCR wurde im Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

Zyklen	Dauer	Temperatur	Prozess
1	30 min	50 °C	Synthese des Erststranges
1	2 min	94 °C	Initiale Denaturierung
30	10 s	94 °C	Schmelzen
	30 s	55 °C	<i>Annealing</i>
	1 min	68 °C	Elongation
1	7 min	68 °C	Finale Elongation
1		4 °C	Lagerung

Als Kontrolle wurde der Mix 2 für zwei Minuten auf 94°C erhitzt, um die reverse Transkriptase zu zerstören. Da in dem *One-Tube* System ein Enzymmix verwendet wird, kann keine Kontrolle ohne die reverse Transkriptase durchgeführt werden. Für den Nachweis des RyR3 wurde zusätzlich eine Kontrolle ohne RNA *Template* mitgeführt. Anschließend wurde eine *nested* PCR der Amplifikate durchgeführt. Für die Sequenzierung des RyR3 wurde das Amplifikat aus der RT-PCR mit einer normalen PCR erneut amplifiziert.

### 3.3.4 PCR

Die PCR wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen für die weitere Amplifikation der Produkte aus der RT-PCR, zum anderen zum Nachweis der Expression des Tpc1 und des Tpc2 in ventrikulären Cardiomyozyten eingesetzt. Für die Analyse der Expression von Tpc1 und Tpc2 lag bereits cDNA vor, die freundlicherweise von Elisabeth Krämer (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, UKE) zur Verfügung gestellt worden war.

Reaktionsansätze für die RT-PCR:

0,2 mM	dNTPs
0,4 pmol/ $\mu$ l	<i>sense</i> Primer
0,4 pmol/ $\mu$ l	<i>reverse antisense</i> Primer
5 $\mu$ l	10x PCR-Puffer
25 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 $\mu$ l	DNA <i>Template</i>
1 U	<i>Taq</i> DNA Polymerase
ad 50 $\mu$ l	ddH <sub>2</sub> O

Die PCR wurde im Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

Zyklen	Dauer	Temperatur	Prozess
1	*	94°C	Initiale Denaturierung
30	30 s	94°C	Schmelzen
	30 s	55°C	<i>Annealing</i>
	1 min	72°C	Elongation
1	7 min	72°C	Finale Elongation
1		4°C	Lagerung

\* : 45 s bei einer *nested* PCR beziehungsweise weiteren Amplifikation der Produkte aus der RT-PCR und 2 min bei der PCR für Tpc1 und Tpc2.

Als Kontrolle wurde ddH<sub>2</sub>O anstelle des *Templates* eingesetzt. Die Produkte wurden anschließend auf einem Agarosegel analysiert. Das Amplifikat für den RyR3 wurde für die anschließende Sequenzierung aufgereinigt.

### 3.3.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Das PCR-Produkt des RyR Subtyps3 wurde für die anschließende Sequenzierung mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* von Roche (Mannheim) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 50  $\mu$ l Elutionspuffer. Die Konzentration des PCR-Amplifikats wurde durch photometrische Bestimmung der Absorption bei 260 nm ermittelt. Eine  $OD_{260nm}$  von 1 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50  $\mu$ g/ml (Gallagher und Desjardins, 2006). Um Verunreinigungen der Präparation mit Protein auszuschließen, wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm bestimmt. Präparationen mit einem Verhältnis  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  von 1,8 bis 2,0 wurden als sauber erachtet. Wie für die Bestimmung der RNA-Konzentration wurden die Messungen in 10 mM Tris-Puffer bei einem pH-Wert von 8,0 durchgeführt.

### 3.3.6 Agarosegelelektrophorese

Zur Herstellung des Gels wurden 1,4 bis 1,6 % (w/v) Agarose (Seakem LE Agarose, Cambrex, Rockland, USA) in 50 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf ca. 50-60°C wurde Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 0,1  $\mu$ g/ml zugegeben und die Agarose luftblasenfrei in einen vorbereiteten Gelträger mit Kamm gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde das Gel in eine Gelkammer gesetzt und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Nun konnte der Kamm vorsichtig herausgezogen werden. Die DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt und 12  $\mu$ l Probe pro Geltasche aufgetragen. Für die richtige Zuordnung der DNA-Moleküle wurde als DNA-Marker die *Gene Ruler 100bp DNA Ladder* von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) mitgeführt. Es wurden jeweils 3  $\mu$ l des Markers pro Tasche aufgetragen. Der Lauf der Gele erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt für etwa eine Stunde. Schließlich konnten die Gele mit einem UV-Transilluminator bei 321 nm abgeleuchtet werden.

### 3.3.7 DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden bei der Firma MWG Biotech (Ebersberg) in Auftrag gegeben. Für die Sequenzierung von 300 bis 1000 Bp großen, aufgereinigten PCR-Produkten wurde das PCR-Produkt mit dem jeweiligen Primer in einem Mindestvolumen von 15  $\mu$ l gemischt und als Lösung verschickt. Es wurden pro Sequenzierung 15 pmol des Primers eingesetzt. Die Konzentration des PCR-Produktes betrug 16 ng/ $\mu$ l.

### 3.3.8 Primer

Die für die Primerauswahl verwendeten Sequenzen wurden der GenBank des NCBI entnommen (Benson et al., 2005). Geeignete Primer wurden mit dem Programm Primer3 ausgewählt (Rozen und Skaletsky (2000), <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Dabei sollte der GC-Gehalt möglichst zwischen 40 und 60 % und die Schmelztemperatur zwischen 57 und

63°C liegen. Außerdem sollten die Primer am 3'-Ende ein G oder ein C aufweisen (*GC-clamp*). Mit Hilfe der Datenbank Ensembl (<http://www.ensembl.org>) wurde überprüft, dass die ausgewählten Primer Exon-überspannend sind. Alle Primer wurden bei der Firma MWG Biotech (Ebersberg) in Auftrag gegeben. Die Primer wurden nach den Herstellerangaben in Wasser (*Aqua ad injectabilia*, Braun, Melsungen) gelöst (finale Konzentration: 100 pmol/ $\mu$ l) und bei -20°C gelagert.

<b>Subtyp-spezifische Primer für die RyR (Ratte)</b>		
Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Beschreibung
MN1	CCA TCC TCA AGA GGA AGC TG	<i>sense</i> -Primer für RyR1
MN2	CAG CTC CGG AAC CTT CTA TG	<i>reverse antisense</i> -Primer für RyR1
MN3	TCA TTG CGG TTC ACT ACG TC	<i>sense</i> -Primer für RyR2
MN4	GCC CAG TAA CTC GCT GAT TC	<i>reverse antisense</i> -Primer für RyR2
MN7	TGG ACG GAG AAG AAG AGG AG	<i>nested sense</i> -Primer für RyR1
MN8	TCA CCC CAG AAT TCT TCC AG	<i>nested reverse antisense</i> -Primer für RyR1
MN9	ACG TCC TGG AGG AGA GTA GC	<i>nested sense</i> -Primer für RyR2
MN10	GCC CAT CAA ACT CCA ACT TC	<i>nested reverse antisense</i> -Primer für RyR2
MN13	CGG GTC AGG AAT CCT ATG TG	<i>sense</i> -Primer für RyR3
MN14	TCC TCT TGC ATG ACG TTC AG	<i>reverse antisense</i> -Primer für RyR3
MN15	AAA CCT GGG CTC ACA ACA AG	<i>nested sense</i> -Primer für RyR3
MN16	CAA TCA GGT GGA GTC CTT GG	<i>nested reverse antisense</i> -Primer für RyR3
<b>Subtyp-spezifische Primer für die TPCs (Maus)</b>		
Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Beschreibung
MN17	ACT ATT CCT TCG CCA TCG TG	<i>sense</i> -Primer für TPC1
MN18	CGC TCC TCA CGA TAA AGC TC	<i>reverse antisense</i> -Primer für TPC1
MN19	GTG CAG CCT ACG AAG TCC TC	<i>sense</i> -Primer für TPC2
MN20	ACG AGG TTC CCC AGG TAG TC	<i>reverse antisense</i> -Primer für TPC2

### 3.3.9 Puffer und Lösungen

- 6x Ladepuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot): 10 mM Tris-Cl pH 7,6; 0,03 % (v/v) Bromphenolblau, 0,03 % (v/v) Xylencyanol FF; 60 % (v/v) Glycerol; 60 mM EDTA
- TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat pH 8,5 (mit Eisessig); 1 mM EDTA

### 3.3.10 Geräte

- Biophotometer (Eppendorf, Hamburg)
- Gelelektrophoreseapparatur GNA-100 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- PCR-Cycler Mastercycler Personal (Eppendorf, Hamburg)
- Netzteil Power-Pac 3000 (BioRad, München)
- UV-Transilluminator IL-350-M ( $\lambda = 321nm$ ) (Bachhofer, Reutlingen)
- Tischzentrifuge 5415 D (Eppendorf, Hamburg)
- Tischzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)

## 3.4 Methoden zur Expressions- und Funktionsanalyse von eukaryotischen Zellen

### 3.4.1 Bestimmung der MHCII-Expression auf der Oberfläche von Astrozyten mittels Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurde zunächst eine ausreichende Menge an Deckgläschen (13 mm- $\emptyset$ , Stärke 1, Marienfeld, Lauda-Königshofen) hitzesterilisiert. Dafür wurden die Deckgläschen in eine Glas-Petrischale überführt, mit Alufolie umwickelt und für mehrere Stunden bei 180°C im Ofen erhitzt. Nach dem Abkühlen der Deckgläschen wurden  $5 \cdot 10^4$  Astrozyten pro Deckgläschen in 1 ml Medium in einer Vertiefung einer 24-Loch-Zellkulturplatte ausgesät und über Nacht anwachsen gelassen.

Am nächsten Morgen wurde das alte Medium abgenommen und durch neues Medium, das 20% (v/v) eines Überstandes restimulierter T-Zellen enthielt, ersetzt. Der Überstand war zwei Tage nach der Restimulation der T-Zellen entnommen und bei -80°C gelagert worden. Die Astrozyten wurden nun für 48 Stunden mit diesem konditionierten Medium im Brutschrank inkubiert bis die Analyse im Fluoreszenzmikroskop erfolgte. Unbehandelte Zellen erhielten normales Medium.

Nach der Inkubation wurde das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen wurden drei Mal mit 0,5 ml PBS inklusive 1 mM  $CaCl_2$  und 0,5 mM  $MgCl_2$  gewaschen.  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  sollen das Ablösen der Zellen während des Waschvorgangs verhindern. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 ml Paraformaldehyd (4% (w/v) PFA in PBS) für 20 Minuten fixiert. Die Zellen wurden erneut drei Mal mit 0,5 ml PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen für 30 Minuten mit 0,5 ml Blockierpuffer (2% (w/v) BSA (Fraktion V) in PBS) bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nun erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper für eine Stunde auf Eis (finale Konzentration: 10  $\mu g/ml$  in PBS + 2% (w/v) BSA). Dafür wurde eine Glas-Petrischale mit Parafilm ausgekleidet und 20  $\mu l$  der Antikörperlösung darauf pipettiert. Das Deckgläschen ließ man nun mit der Zellseite nach unten vorsichtig auf den Tropfen gleiten. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut drei Mal mit PBS gewaschen. Dazu wurden drei Bechergläser mit PBS gefüllt, das Deckgläschen mit einer Pinzette gegriffen (Millipore,

Billerica, USA) und untergetaucht in jeder PBS-Lösung für etwa 30 Sekunden vorsichtig hin- und herbewegt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper für 45 Minuten auf Eis im Dunkeln (finale Konzentration:  $13 \mu\text{g/ml}$  in PBS + 2% (w/v) BSA). Es wurden erneut  $20 \mu\text{l}$  pro Deckgläschen verwendet. Daran schlossen sich erneut drei Waschschrte in PBS an. Schließlich erfolgte eine Anfärbung der Kerne mit DAPI (finale Konzentration:  $1 \mu\text{g/ml}$  in  $\text{ddH}_2\text{O}$ , Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Auch hierfür wurden wiederum  $20 \mu\text{l}$  der Verdünnung auf Parafilm pipettiert und die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten darauf platziert. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei RT mit DAPI inkubiert. Normalerweise genügt eine Inkubationszeit von höchstens 10 Minuten, diese wurde aber verlängert, da die Zellen nicht permeabilisiert worden waren. Nach weiteren drei Waschschrten in PBS wurden zur Konservierung der Deckgläschen etwa  $10 \mu\text{l}$  Permafluor (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld) auf einen Objektträger gegeben und das Deckgläschen mit den Zellen auf der Unterseite vorsichtig auf den Tropfen gelegt. Die Deckgläschen wurden zunächst einige Stunden bei RT im Dunkeln getrocknet und dann bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Die Aufnahmen der Astrozyten wurden am Fluoreszenzmikroskop DM IRE2 (Leica, Wetzlar) bei 40- und 100-facher Vergrößerung durchgeführt. Für die Kernfärbung mit DAPI wurde folgender Filter verwendet: BS:400DCLP + EM:510/540 (Analysetechnik, Tübingen). Die Anregungswellenlänge betrug  $372 \text{ nm}$  und die Expositionszeit bei 40-facher Vergrößerung 2 ms und bei 100-facher Vergrößerung 4 sowie 10 ms. Für die Färbung der MHCII-Moleküle mit einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper wurde folgender Filter verwendet: BS:Q505LP + EM:HQ527/30 (Analysetechnik, Tübingen). Die Anregungswellenlänge betrug  $488 \text{ nm}$  und die Expositionszeit bei 40-facher Vergrößerung 50 ms und bei 100-facher Vergrößerung 100 ms. Bei 100-facher Vergrößerung wurden mehrere Schichten in z-Ebene mit Hilfe eines *Piezostepers* aufgenommen. Einzelheiten dazu sowie die verwendeten Einstellungen für die Dekonvolution zur Entfernung des Streulichtes sind in der Abbildung 4.2 im Ergebnisteil angegeben.

### 3.4.2 Bestimmung der MHCII-Expression auf der Oberfläche von Astrozyten mittels Durchflusszytometrie

$6 \cdot 10^5$  Astrozyten wurden in 10 ml Medium pro Zellkulturschale ( $10 \text{ cm-}\varnothing$ ) ausgesät und über Nacht im Brutschrank anwachsen gelassen. Am nächsten Morgen wurde das alte Medium abgenommen und durch neues Medium, das 20% (v/v) eines Überstandes restimulierter T-Zellen enthielt, ersetzt. Der Überstand war zwei Tage nach der Restimulation der T-Zellen entnommen und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert worden. Die Astrozyten wurden nun für 48 Stunden mit diesem konditionierten Medium im Brutschrank inkubiert, bis die Analyse im Durchflusszytometer erfolgte. Unbehandelte Zellen erhielten normales Medium.

Das Medium wurde von den Zellen abgenommen und die Zellen wurden mit  $5 \text{ ml Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen. Um die Astrozyten möglichst schonend vom Untergrund zu trennen und die Oberfläche nicht anzugreifen, wurde für die Ablösung lediglich 1 ml einer 2 mM EDTA-

Lösung (in PBS) ohne Trypsin verwendet. Die Zellen wurden mit 2x 5 ml PBS abgelöst, in ein 13 ml-Röhrchen überführt und gut resuspendiert, da Astrozyten dazu tendieren, zu verklumpen. Die Zellen wurden für acht Minuten bei 300 g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 4 ml PBS aufgenommen. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden  $3 \cdot 10^5$  Zellen pro Färbung eingesetzt und für fünf Minuten bei 555 g und 4 °C zentrifugiert. Die Färbung sollte möglichst in FACS-Röhrchen erfolgen, da beobachtet wurde, dass in Eppendorf Reaktionsgefäßen durch die Zentrifugationsschritte ein großer Teil der Zellen verloren geht. Es folgten zwei Waschschrte mit 200  $\mu$ l PBS + 3 % (v/v) FBS. Die Pellets wurden in 200  $\mu$ l Erstantikörper (finale Konzentration: 10  $\mu$ g/ml in PBS + 3 % (v/v) FBS) aufgenommen und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zentrifugiert und das Pellet jeweils zwei Mal mit 200  $\mu$ l PBS + 3 % (v/v) FBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 200  $\mu$ l Zweitantikörper (finale Konzentration: 13  $\mu$ g/ml in PBS + 3 % FBS) aufgenommen und für 45 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 200  $\mu$ l PBS ohne FBS. Die Zellpellets wurden jeweils in 200  $\mu$ l PBS aufgenommen und im Durchflusszytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert. Die Analyse wurde von Sabrina Laing oder Dr. N. Schwarz am Institut für Immunologie des UKE durchgeführt. Erfolgte die Analyse erst am nächsten Tag, wurden die Zellen mit 1 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert und über Nacht bei 4 °C gelagert. Pro Kondition wurden 10.000 Zellen analysiert.

### 3.4.3 Färbung der Lysosomen in Cardiomyozyten

Die Cardiomyozyten wurden wie im Methodenteil 3.5.4 und im Ergebnisteil 4.2.5 angegeben mit Bafilomycin A1 (1  $\mu$ M beziehungsweise 0,5  $\mu$ M final) oder DMSO (0,4 % (v/v)) als Kontrolle inkubiert. Für die Färbung der Lysosomen wurde eine 1 mM Stocklösung von LysoTracker<sup>®</sup> Red (Invitrogen, Karlsruhe) bis zu einer Endkonzentration von 75 nM in Medium verdünnt und für 20 Minuten bei RT mit den Cardiomyozyten inkubiert. Während der Messung wurden die Zellen in IonOptix gehalten. Die Anregung erfolgte bei 575 nm mit dem dichroischen Filter bsQ585LP und dem Emissionsfilter emHQ620/60 (Analytentechnik, Tübingen) bei einer Expositionszeit von 30 ms. Mit Hilfe des *Piezosteppers* wurden bei 100-facher Vergrößerung 150 Bilder im Abstand von 200 nm in z-Richtung durch die Zelle aufgenommen. Die Bilder wurden anschließend dekonvolviert. Die Einstellungen sind im Ergebnisteil in Abbildung 4.2.4 angegeben. Für die Bestimmung der Anzahl der Lysosomen pro Zelle sowie der mittleren Fluoreszenzintensität wurden mit Hilfe der Software Openlab die mittleren 80 Bilder über den Befehl "*merge RGB planes*" in ein Bild zusammengefügt, in 16-bit Graustufen umgewandelt und als .raw-Datei abgespeichert. Diese Datei konnte mit dem *Open source* Programm ImageJ 1.44a (<http://rsb.info.nih.gov/ij/disclaimer.html>) geöffnet werden. Über die Funktion "*Analyze particles*" wurden die Fluoreszenzintensität der Zelle und die Anzahl der Lysosomen bestimmt.

### 3.4.4 Puffer und Lösungen

- 2 mM EDTA in  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS
- PBS ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -frei): 140 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,4 (mit HCl)
- PBS (mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ): 140 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; pH 7,4 (mit HCl)

### 3.4.5 Geräte

- Durchflusszytometer FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Imaging System mit Openlab Software Version 3.5.2 und 4.0.2 (Improvision Systems, Tübingen), bestehend aus:
  - Fluoreszenzmikroskop DM IRE2 mit *Piezostepper* (Leica, Wetzlar)
  - Polychrom IV (TILL Photonics, München)
  - CCD-Kamera mit Camera Controller ORCA C4742-95-12ER (Hamamatsu, Enfield)
  - Computer Macintosh G4 (Apple)
- Ofen (Heraeus, Hanau)

## 3.5 Digitales $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging

Die Einzelzellmessungen wurden an einem computergestützten, digitalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Imagingsystem durchgeführt. Mit Hilfe eines Monochromators (Polychrom IV, TILL Photonics, Gräfelfing), der mit einer Xenon-Bogenlampe ausgestattet ist, wird monochromatisches Licht erzeugt, das über einen Lichtleiter durch einen Kondensator in den Strahlengang eines inversen Fluoreszenzmikroskops (DM IRE2, Leica, Wetzlar) übertragen wird. Der Strahl passiert einen dichroischen Filter und wird dann durch das Objektiv auf die Probe gelenkt. Das von der Probe erzeugte Fluoreszenzlicht passiert ebenfalls das Objektiv und den dichroischen Filter und wird über den seitlichen Ausgang des Mikroskops zur Kamera gelenkt. Weitere systemspezifische Komponenten wie zum Beispiel Emissionsfilter sind in dem entsprechenden Methodenteil angegeben. Die Digitalkamera mit CCD-Chip (C4742-95-12ER, Hamamatsu, Herrsching) war in der Regel auf den 8-bit Modus (256 Graustufen) und ein *Binning* von zwei (T-Zellen) beziehungsweise acht (Cardiomyozyten) eingestellt. Abweichende Einstellungen sind gesondert angegeben. Dies entsprach einer räumlichen Auflösung von 640x512 (*Binning* 2) beziehungsweise 168x126 (*Binning* 8) Bildpunkten. Die Messungen wurden computergestützt durch einen Apple G4-Computer durchgeführt. Mit Hilfe der Software Openlab (Versionen 3.0.9 und 4.0.2, Improvision, Heidelberg) konnten der Monochromator, das Mikroskop, das Filterrad für Emissionsfilter und die Kamera gesteuert werden. Zur Software gehörten sogenannte programmierbare Automaten, mit denen alle nötigen Variablen definiert und die jeweils durchzuführenden Aufgaben festgelegt werden konnten.

### 3.5.1 Beschichtung der Messkammern - Antikörper und Protein

Für alle Beschichtungen wurden die Kammern der Firma ibidi (Martinsried) *μ-Slides 8 well* verwendet. Collagen IV und Poly-L-Lysin/Poly-D-Lysin beschichtete Platten wurden direkt vom Hersteller bezogen. Abhängig von der Beschichtung wurden hydrophobe oder Gewebekultur behandelte Kammern eingesetzt.

- Hydrophob: Fibronectin, Antikörper
- Gewebekultur behandelt: Poly-L-Lysin, Laminin

#### Die Auswahl der Beschichtung für das Zweizellsystem

Humanes Fibronectin (Stocklösung: 1 mg/ml, Invitrogen, Karlsruhe) wurde mit ddH<sub>2</sub>O bis zu einer finalen Konzentration von 50 μg/ml verdünnt und je 300 μl pro Vertiefung eingesetzt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Fibronectinlösung vorsichtig in die Vertiefung pipettiert wurde, so dass sich der Flüssigkeitsfilm langsam von einer Seite der Vertiefung zur anderen ausbreiten konnte, um eine gleichmäßige Beschichtung zu gewährleisten. Die Kammern wurden zwei bis drei Stunden bei RT mit der Fibronectinlösung inkubiert, dann wurde diese abgenommen und die Kammern unter der sterilen Werkbank trocknen gelassen. Für eine Beschichtung mit Poly-L-Lysin wurden die im Ergebnisteil 4.1.1 angegebenen Molekulargewichte und Konzentrationen verwendet. Die Verdünnungen wurden in ddH<sub>2</sub>O angesetzt und die Kammern eine Stunde bei RT mit 300 μl der Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und die Kammern unter der sterilen Werkbank trocknen gelassen.

#### Beschichtung für die Stimulation mit Antikörpern gegen CD3 und CD28

α-CD3 und α-CD28 wurden bis zu einer Endkonzentration von 5 μg/ml in *Coating Buffer* verdünnt. Pro Vertiefung wurden 300 μl der Antikörperlösung eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurde die Lösung abgenommen und die Vertiefungen wurden ein Mal mit 300 μl Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-freiem PBS und zwei Mal mit Ca<sup>2+</sup>-Messpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Vertiefungen bis zum Start der Messung in 300 μl Ca<sup>2+</sup>-Messpuffer gehalten.

#### Beschichtung für das Zweizellsystem

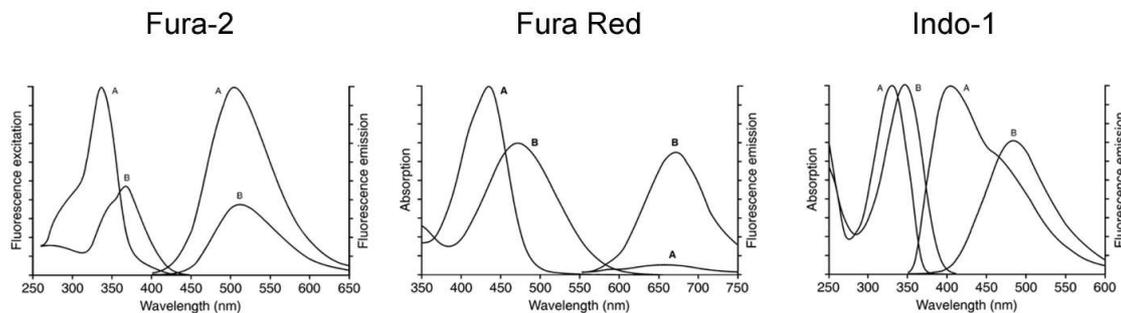
Wie im Ergebnisteil 4.1.1 beschrieben wurde Fibronectin als Beschichtung für die Versuche im Zweizellsystem verwendet. Die Beschichtung erfolgte wie oben angegeben. Nach neuen Herstellerangaben sollte auch eine Konzentration von 11 μg/ml Fibronectin in Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-freiem PBS ausreichen.

### Beschichtung für die Cardiomyozyten

Für die Cardiomyozyten wurde Laminin bis zu einer Endkonzentration von 0,01 mg/ml in  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS verdünnt. 200  $\mu\text{l}$  der Verdünnung wurden pro Vertiefung eingesetzt. Die Kammern wurden vor der Präparation der Cardiomyozyten vorbereitet und bis zur fertigen Präparation der Zellen im Brutschrank bei 37°C und 2%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Wurde die Präparation nicht selbst vorgenommen, wurden die Kammern mindestens zwei Stunden mit Laminin inkubiert. Anschließend wurde die Lamininlösung abgenommen und die Kammern unter der sterilen Werkbank trocknen gelassen.

### 3.5.2 Beladung der Zellen mit $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen

Für die Beladung der Zellen mit den  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven, ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoffen Fura-2, Fura Red und Indo-1 wurden die membrandurchgängigen Acetoxymethylester (AM) verwendet, um eine Aufnahme in die Zelle zu gewährleisten. Innerhalb der Zelle werden die Estergruppen durch zelleigene, unspezifische Esterasen abgespalten, wodurch eine Anreicherung des Farbstoffs im Cytosol ermöglicht wird und der Farbstoff sensitiv für  $\text{Ca}^{2+}$  wird. Fura-2 und Fura Red zeigen eine Verschiebung in ihrer Excitationswellenlänge bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung von 380 nm zu 340 nm beziehungsweise von 480 nm zu 420 nm, bei Indo-1 verschiebt sich hingegen das Emissionsmaximum von 485 nm zu 405 nm (3.1).



**Abbildung 3.1: Spektren für die Fluoreszenzfarbstoffe Fura-2, Fura Red und Indo-1.** Es sind jeweils Spektren der  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigten (A) und der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Form (B) der Fluoreszenzfarbstoffe bei einem pH von 7,2 dargestellt. Das Excitationsspektrum von Fura-2 wurde bei einer Emissionswellenlänge von 510 nm und das Emissionsspektrum bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm aufgenommen. Für Fura Red und Indo-1 ist jeweils das Absorptionsspektrum und das Emissionsspektrum abgebildet. Das Emissionsspektrum für Fura Red wurde bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und das Emissionsspektrum für Indo-1 bei einer Anregungswellenlänge von 338 nm aufgenommen. Die Spektren sind der Internetseite der Firma Invitrogen entnommen (Karlsruhe, [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).

Für die Beladung der T-Zellen wurden in der Regel 2 bis 5 Mio. Zellen eingesetzt. Nach der Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes erfolgten alle Schritte im Dunkeln. Die T-Zellen wurden in 500  $\mu\text{l}$  RPMI-Komplettmedium mit 12  $\mu\text{M}$  Fura-2 AM und 2 mM Probenicid aufgenommen und für 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Es wurden 2 ml vorgewärmtes Me-

dium zugegeben und die Zellen weitere 15 Minuten bei 37°C gehalten. Anschließend wurden die Zellen bei RT und 300 g für 8 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2,5 ml Ca<sup>2+</sup>-Messpuffer resuspendiert und die Zellen erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Konzentration von 4 \* 10<sup>6</sup> Zellen pro ml in Ca<sup>2+</sup>-Messpuffer aufgenommen und bis zum Beginn der Messung in einem Wasserbad bei 12 bis 15°C gehalten.

Für die parallelen Imagingversuche von T-Zellen und Astrozyten wurden auch die Astrozyten mit einem Fluoreszenzfarbstoff beladen. Für die Astrozyten wurde Fura Red verwendet. Die Beladung erfolgte direkt vor der Messung, nachdem die MHCII-Expression auf den Astrozyten bereits induziert worden war und die Astrozyten mit MBP inkubiert worden waren. Es wurden vier Vertiefungen eines *μ-Slides 8 well* parallel beladen. Dazu wurde Medium mit 4 μM Fura Red AM und 2 mM Probenicid angesetzt und je 300 μl pro Vertiefung pipettiert. Die Astrozyten wurden für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> mit dem Farbstoff inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und durch 300 μl Ca<sup>2+</sup>-Messpuffer ersetzt. Die Zellen standen nun für 20 Minuten, um die Deesterifizierung des Farbstoffs zu ermöglichen. Während dieser Zeit wurde noch einmal der Puffer ausgetauscht. Direkt vor dem Start der Messung wurde der Puffer der Zellen erneut gewechselt. Die übrigen drei Vertiefungen blieben bis zu ihrer Messung in Ca<sup>2+</sup>-Messpuffer.

Die ventrikulären Cardiomyozyten wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Indo-1 AM beladen, nachdem sie in Laminin-beschichtete *μ-Slides 8 well* ausgesät worden waren. Im Allgemeinen erfolgte die Beladung in 250 μl Medium pro Vertiefung mit einer Indo-1 AM-Konzentration von 4 μM für 45 Minuten bei RT. Anschließend wurde das Medium gegen 300 μl IonOptix ausgetauscht. Darin wurden die Zellen weitere 20 Minuten inkubiert. Während dieser Inkubationszeit und direkt vor der Messung wurde der Puffer gegen frisches IonOptix ausgetauscht. Da die Cardiomyozyten für die Inkubation mit BZ194 im Brutschrank gehalten werden mussten, erfolgte in diesem Fall eine 30-minütige Beladung bei 2% CO<sub>2</sub> und 37°C. Anschließend wurden die Zellen mit BZ194 inkubiert (siehe 3.5.4).

### 3.5.3 Digitales Ca<sup>2+</sup>-Imaging der T-Zellen

#### Vorbereitung für das Zweizellsystem

An Tag null wurden abends 7 \* 10<sup>5</sup> Astrozyten in einer 10 cm-Ø Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Morgen wurde das Medium gegen konditioniertes Medium, das 20% (v/v) eines Überstandes restimulierter T-Zellen enthielt, ausgetauscht. Dabei ist wichtig, dass der Überstand von T-Zellen entnommen wurde, die eine andere Spezifität aufweisen als die in dem geplanten Versuch verwendeten T-Zellen, da es sonst eventuell zu Kreuzkontaminationen mit dem Antigen kommen könnte. Der Überstand OVA-spezifischer, restimulierter T-Zellen für die Imagingexperimente von MBP-spezifischen T-Zellen wurde freundlicherweise

von der Arbeitsgruppe von Prof. Flügel (Universitätsklinikum Göttingen) zur Verfügung gestellt. Alternativ wurden an Tag eins morgens  $10 \times 10^5$  Astrozyten ausgesät und eine Stunde anwachsen gelassen, bevor das konditionierte Medium zugegeben wurde. Für eine optimale Induktion der MHCII-Expression auf der Oberfläche der Astrozyten mussten diese 48 Stunden mit dem Medium inkubiert werden. Für die Messungen wurden die Astrozyten an Tag zwei abends in Vertiefungen der  $\mu$ -Slides 8 well umgesetzt. Dafür wurde das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen wurden mit 5 ml  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen. Um die Astrozyten möglichst schonend vom Untergrund zu trennen und die Oberfläche nicht anzugreifen, wurde für die Ablösung lediglich 1 ml einer 2 mM EDTA-Lösung (in PBS) ohne Trypsin verwendet. Die Zellen wurden mit 2x 5 ml Medium abgelöst, in ein 50 ml-Röhrchen überführt und gut resuspendiert. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Astrozyten bei 300 g und 4 °C für acht Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden sie mit einer Endkonzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen pro ml in Medium, dem 20 % (v/v) frischer T-Zellüberstand (von Tag eins bei 4 °C aufbewahrt) zugesetzt wurde, aufgenommen. Je 300  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden in Fibronectin-beschichtete  $\mu$ -Slides 8 well pipettiert. Dabei wurden je vier der acht Vertiefungen dieser Kammern belegt. Am nächsten Morgen (Tag drei) wurde den Astrozyten der ersten Kammer das spezifische Antigen MBP in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  zugegeben und die Astrozyten zwei Stunden mit dem Antigen im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle erhielten die Astrozyten kein Antigen. Während dieser Zeit wurden die T-Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 beladen. Für jeden Versuchstag wurden neue T-Zellen aufgetaut. Die T-Zellen mussten sich für den Versuch im ruhenden Zustand befinden. Wenn die T-Zellen an Tag vier ihrer Restimulation eingefroren worden waren, wurden sie an Tag eins des Versuches aufgetaut; wurden sie an Tag sechs eingefroren, wurden sie an Tag zwei des Versuches aufgetaut. In der Regel wurden pro Versuchstag zwei Beladungen der T-Zellen mit Fura-2 AM durchgeführt.

Direkt vor der Messung wurden die Astrozyten zwei Mal mit 300  $\mu\text{l}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Messpuffer gewaschen und für die Messung ebenfalls in 300  $\mu\text{l}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Messpuffer gehalten. Die drei übrigen Vertiefungen der Kammern mit Astrozyten wurden bis zu ihrer Messung in Medium +/- MBP gehalten.

Falls die T-Zellen mit BZ194 vorinkubiert werden sollten, wurden die aufgetauten T-Zellen an Tag zwei des Versuches nachmittags zentrifugiert und in 5 ml TCM ohne Serum aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf zwei 6 cm- $\emptyset$  Zellkulturschalen verteilt und entweder mit BZ194 oder mit DMSO als Kontrolle inkubiert. Dafür wurde eine 400 mM Stocklösung an BZ194 in DMSO angesetzt und je 12,5  $\mu\text{l}$  dieser Stocklösung auf 2,5 ml T-Zellsuspension gegeben (Endkonzentration: 2 mM BZ194). Nach zweistündiger Inkubation im Brutschrank wurde dem Medium Pferdeserum bis zu einem Volumenanteil von 10 % (v/v) zugefügt. Anschließend wurden die T-Zellen weiter mit BZ194 über Nacht inkubiert bis zu ihrer Beladung am nächsten Tag. BZ194 wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Potter im Department

of Pharmacy and Pharmacology der Universität von Bath synthetisiert.

In dem Fall, dass auch das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in den Astrozyten gemessen werden sollte, mussten diese ebenfalls mit einem Fluoreszenzfarbstoff beladen werden. Die Beladung mit Fura Red erfolgte erst, nachdem die Astrozyten am Versuchstag mit dem Antigen MBP inkubiert worden waren. Während der Beladung war das Antigen nicht mehr im Medium vorhanden.

## Messung

Die Messung wurde bei 40-facher Vergrößerung und einem *Binning* von zwei durchgeführt. Es wurde der dichroische Filter bs400DCLP mit dem Emissionsfilter em510/40 verwendet (Analysetechnik, Tübingen). Zunächst wurde im Durchlicht die Zellschicht mit den Astrozyten fokussiert und ein geeignetes Zellfeld ausgewählt. Dann wurden etwa 80.000 T-Zellen zu den Astrozyten gegeben und sofort der Messautomator gestartet (siehe Abbildung 3.2).

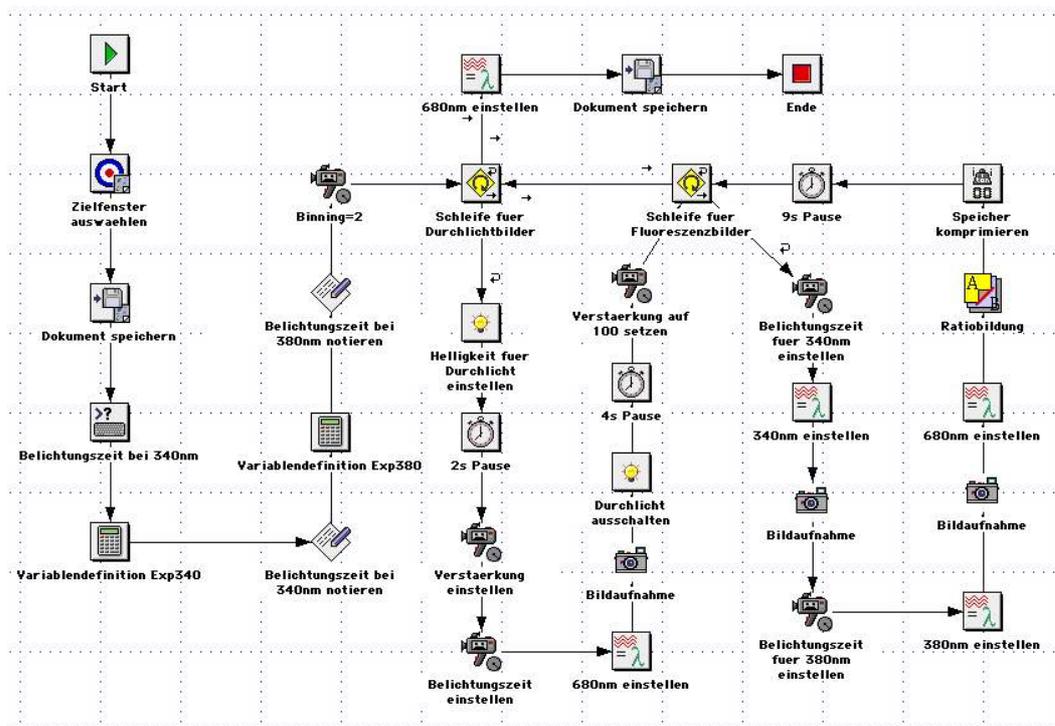
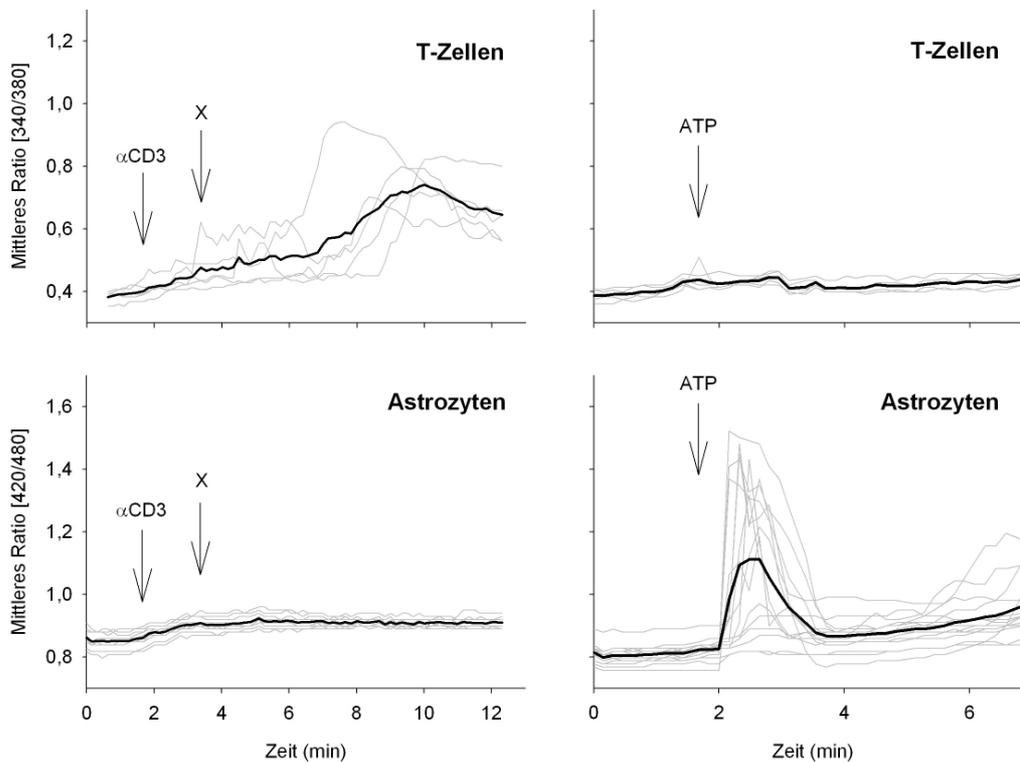


Abbildung 3.2: Messautomator für das  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging im Zweizellensystem.

Dieser Automator bestand aus zwei Schleifen. Zunächst wurde ein Durchlichtbild erstellt, anschließend wurden in einer zweiten Schleife ein Fluoreszenzbild bei 340 nm und eins bei 380 nm aufgenommen. Aus den Fluoreszenzbildern wurde sofort ein Ratiobild errechnet, so dass der Verlauf des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in den T-Zellen *live* mitverfolgt werden konnte. Die Schleife für die Fluoreszenzbilder wurde zehn Mal durchlaufen, bevor wieder ein Durchlichtbild aufgenommen wurde. Zwischen den Fluoreszenzbildern wurde eine zeitliche Verzögerung von

neun Sekunden eingebaut. Durch die Aufnahme von Durchlichtbildern konnte die Interaktion zwischen den T-Zellen und den Astrozyten verfolgt werden.

Falls auch das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal der Astrozyten verfolgt werden sollte, wurden in der Schleife für die Fluoreszenzbilder zusätzlich noch ein Fluoreszenzbild bei einer Anregung von 420 nm und eins bei 480 nm aufgenommen und ebenfalls das Ratio gebildet. Als dichroischer Filter wurde der Strahlenteiler 495DCXRUV (Analystechnik, Tübingen) verwendet. Die Emissionsfilter wurden in das, über Openlab zu steuernde Filterrad (Prior Scientific GmbH, Jena) eingesetzt und konnten so für die Messung der T-Zellen mit Fura-2 oder der Astrozyten mit Fura Red angewählt werden. Für Fura-2 wurde der Filter BrightLine HC520/35 und für Fura Red der Filter BrightLine HC655/40 (ebenfalls von Analystechnik, Heidelberg) verwendet. In der Abbildung 3.3 ist eine vorbereitende, parallele Messung der beiden Zelltypen dargestellt.



**Abbildung 3.3: Paralleles Imaging von T-Zellen und Astrozyten.** Astrozyten wurden mit Fura Red AM und T-Zellen mit Fura-2 AM beladen. Die T-Zellen wurden zu den Astrozyten gegeben und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beider Zelltypen parallel in der Zellsuspension gemessen. Es ist das mittlere Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei einer Anregung von 340 nm zu 380 nm (T-Zellen) beziehungsweise 420 nm zu 480 nm (Astrozyten) dargestellt. Im linken Teil der Abbildung erfolgte eine Stimulation mit  $\alpha\text{CD3}$  ( $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) mit anschließender Quervernetzung ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$   $\alpha\text{Maus-IgM}$ ) als Positivkontrolle für die T-Zellen und im rechten Teil der Abbildung eine Stimulation mit ATP ( $100 \mu\text{M}$ ) als Positivkontrolle für die Astrozyten. Die Verläufe der Einzelzellen sind in grau, die des Mittelwertes in schwarz abgebildet.

In diesem Fall war die MHCII-Expression auf den Astrozyten nicht induziert worden und es war auch kein MBP zugegeben worden. Es konnte beobachtet werden, dass unter Verwendung der angegebenen Filter mit unserem Messsystem ein ATP-induziertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal der Astrozyten beziehungsweise ein anti-CD3 induziertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in den T-Zellen beobachtet werden konnte.

Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging der T-Zellen auf unterschiedlichen Beschichtungen oder nach der Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 erfolgte mit derselben Messanordnung.

### Datenauswertung

Nach dem Abschluss der Messung wurden die Ratiobilder erneut berechnet. Da der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 während der Messung ausbleicht, muss der Schwellenwert für die Lichtintensität nachträglich angepasst werden. Lichtintensitäten unterhalb eines gewählten Schwellenwertes werden als Hintergrundrauschen gewertet und von dem Programm Openlab als schwarze Bildpunkte wiedergegeben. Die Anfangs- und Endwerte der Schwellenwerte wurden so gewählt, dass das Ratiobild der Zelle nahezu deckungsgleich mit dem Durchlichtbild der Zelle war. Anschließend wurden die neu erstellten Ratiobilder median gefiltert (3x3). Mit Hilfe dieses nicht linearen Rangordnungsfilters können Extremwerte in der Bildpunktverteilung eines Ratiobildes herausgefiltert und das Rauschen minimiert werden. Dabei werden die Bildpunkte zunächst nach ihrer Größe sortiert. Anschließend wird der Ratiowert eines Bildpunktes durch den Median aller Ratiowerte der Umgebungsbildpunkte ersetzt.

Zur Quantifizierung der Ratiobilder wurden sogenannte *Regions of interest* (ROIs) um die zu analysierende Zelle gelegt. Für jede ROI wurde ein mittlerer Ratiowert pro Ratiobild ausgegeben. Zur Berechnung der absoluten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aus den dimensionslosen Ratiowerten wurde folgende Formel verwendet (Grynkiewicz et al., 1985):

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \left( \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right) \left( \frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right)$$

$K_d$  : Dissoziationskonstante von Fura-2

$R_{min}$  : Ratiowert in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$

$R_{max}$  : Ratiowert bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Sättigung

$S_{f2}$  : Fluoreszenzintensität bei 380 nm in der Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$

$S_{b2}$  : Fluoreszenzintensität bei 380 nm bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Sättigung

Die Dissoziationskonstante von Fura-2 beträgt 224 nM (Takahashi et al., 1999). Für die Bestimmung des Ratiowertes in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  sowie bei Sättigung mit  $\text{Ca}^{2+}$  musste eine Kalibration durchgeführt werden. Um den maximalen Ratiowert zu bestimmen, wurden mit Fura-2 beladene T-Zellen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor Ionomycin inkubiert (finale Konzentration: 2,3  $\mu\text{M}$  für zwei bis maximal zehn Minuten). Durch dieses Kanal-bildende Ionophor wird die Zelle und damit Fura-2 mit  $\text{Ca}^{2+}$  gesättigt. Den minimalen Ratiowert erhält man durch

die Komplexierung des  $\text{Ca}^{2+}$  mit EGTA. Nach der Gabe von EGTA wurde zusätzlich noch Ionomycin gegeben, um sicherzugehen, dass jegliches  $\text{Ca}^{2+}$  gebunden ist (EGTA: 4 mM final (Stock: 200 mM mit pH 7,4); nach fünfminütiger Inkubation Gabe von Ionomycin: 4,8  $\mu\text{M}$  final; Messung nach weiterer fünfminütiger Inkubation). Die Messung der T-Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Dabei wurde darauf geachtet, dass vergleichbare Belichtungszeiten verwendet wurden. Zudem ist es notwendig, dass die Belichtungszeit für die Messung zur Bestimmung des minimalen und des maximalen Ratiowertes übereinstimmen. Pro Kalibration wurden etwa 30 Zellen ausgewertet. Eine Kalibration der T-Zellen wurde in regelmäßigen Abständen durchgeführt.

### Bestimmung des Formindex und der Motilität

Für die Bestimmung des Formindex und der Motilität wurden die Ratiobilder der Imagingdaten eingesetzt. Zunächst wurden die Bilder mit der Software Openlab für die weitere Bearbeitung in dem *Open source* Programm ImageJ 1.44a (<http://rsb.info.nih.gov/ij/disclaimer.html>) vorbereitet. Die zu untersuchende Zelle wurde ausgewählt und das Bild auf den Bereich der Zelle zugeschnitten (*Crop ROI*). Anschließend wurde das Bild median gefiltert (6x6). Um aus den farbkodierten Bildern Schwarzweißbilder zu erstellen, wurde die *Density slice*-Funktion von Openlab angewendet. Im HSI-Modus wurde die Sättigung auf 0 bis 225 und die Intensität auf 0 bis 254 eingestellt. Nach einer anschließenden Invertierung der Bilder erhielt man für jedes Ratiobild ein Schwarzweißbild. Die Bilder wurden als *Quick Time Movie* gespeichert und über die Funktion *Using quick time* in ImageJ importiert. Für die Analyse mussten die Bilder in 8-bit umgewandelt werden. Anschließend konnte über die Funktion *Analyze particles* die Zirkularität und der Schwerpunkt der Zelle für jedes Bild bestimmt werden. Der Kehrwert der Zirkularität ergibt den Formindex. Der Formindex ist definiert als:  $u^2/4\pi A$ . Dabei steht  $u$  für den Umfang und  $A$  für die Fläche der planaren Projektion der Zelle. Über den Schwerpunkt der Zelle konnte mit Hilfe des Satzes von Pythagoras die Strecke, die eine Zelle zwischen zwei Bildern zurückgelegt hatte, in Bildpunkten bestimmt werden. Mit Hilfe einer Kalibration konnte die Strecke in  $\mu\text{m}$  angegeben werden und mit dem Zeitabstand zwischen den Bildern, die Geschwindigkeit der Zelle berechnet werden.

### 3.5.4 Digitales $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging der Cardiomyozyten

#### Vorinkubation der Cardiomyozyten

Falls nach der Beladung der Cardiomyozyten mit Indo-1 AM eine Inkubation mit Inhibitoren etc. erfolgte, ist das im Ergebnisteil angegeben.

Für Isoprenalin (Sigma-Aldrich, München) wurde eine 800 nM Stocklösung in IonOptix angesetzt. 100  $\mu\text{l}$  dieser Stocklösung wurden direkt vor der Messung zu 300  $\mu\text{l}$  IonOptix auf die Zellen gegeben und fünf Minuten bei RT inkubiert. In einer Vertiefung, die mit Isoprenalin

behandelt worden war, wurden Messungen für maximal 15 Minuten durchgeführt.

BZ194 wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Potter im Department of Pharmacy and Pharmacology der Universität von Bath synthetisiert. Für eine Inkubation mit BZ194 wurden die Zellen nach der Beladung zunächst ein Mal mit IonOptix, das BDM enthielt, gewaschen. Anschließend wurden 0,63  $\mu\text{l}$  einer 400 mM beziehungsweise einer 200 mM Stocklösung von BZ194 in DMSO zu 250  $\mu\text{l}$  IonOptix inklusive BDM gegeben und auf die Zellen pipettiert. Das ergab eine finale BZ194-Konzentration von 1 mM beziehungsweise 0,5 mM. Als Kontrolle wurde 0,25 % (v/v) DMSO eingesetzt. Die Zellen wurden nun für eine Stunde bei 37°C und 2% CO<sub>2</sub> mit BZ194 inkubiert. Anschließend wurde jede der zwei Vertiefungen noch zwei Mal mit IonOptix, das kein BDM enthielt, gewaschen. Dabei wurde die erste, zu messende Vertiefung der Kammer sofort zwei Mal gewaschen. Die zweite, zu messende Vertiefung wurde erst ein Mal und dann direkt vor ihrer Messung ein zweites Mal gewaschen. Dies bedeutete, dass während der Messung kein BZ194 mehr in der Lösung war. Für die zweite Vertiefung galt das auch für die halbe Stunde vor der Messung. Deshalb wurde grundsätzlich darauf geachtet, dass Vertiefungen die mit BZ194 inkubiert worden waren, immer abwechselnd als erstes oder zweites gemessen wurden. Dies wurde auch bei den weiteren Inkubationen berücksichtigt.

8-pCPT (Biolog, Bremen) wurde 10 mM in ddH<sub>2</sub>O gelöst und 1:1000 in IonOptix für die Messung verdünnt. Es erfolgte eine Inkubation für fünf Minuten bei RT. Die Substanz blieb während der Messung auf den Zellen. Wie bei Isoprenalin wurden in einer Vertiefung, die mit 8-pCPT behandelt worden war, Messungen für maximal 15 Minuten durchgeführt. 6-Bnz-cAMP (Biolog, Bremen) wurde 150 mM in ddH<sub>2</sub>O gelöst und 1:500 in IonOptix für die Messung verdünnt. Die Zellen wurden während der Waschschrte nach der Beladung mit Indo-1 AM mit 6-Bnz-cAMP bei RT inkubiert, das heißt mindestens 20 Minuten. Falls die Vertiefung, die mit 6-Bnz-cAMP behandelt wurde, als zweites gemessen wurde, war die Inkubation dementsprechend länger, aber maximal 40 Minuten. Auch 6-Bnz-cAMP blieb während der Messung auf den Zellen.

KN-92 wurde sowohl von Sigma-Aldrich (München) bezogen, als auch freundlicherweise von Prof. Maier (Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt. KN-92 und KN-93 (Sigma-Aldrich, München) wurden jeweils 1 mM in DMSO gelöst. Es wurden Verdünnungen mit einer finalen Konzentration von 1 mM KN-92 oder KN-93 in IonOptix angesetzt. Als Kontrolle wurde eine 0,1 % (v/v) Lösung von DMSO in IonOptix verwendet. Die Zellen wurden während der Waschschrte nach der Beladung mit Indo-1 AM mit KN-92 oder KN-93 inkubiert, das heißt mindestens 20 Minuten. Falls die Vertiefung, die mit KN-92/KN-93 behandelt wurde, als zweites gemessen wurde, war die Inkubation dementsprechend länger, aber maximal 40 Minuten. Auch KN-92/KN-93 blieben während der Messung auf den Zellen.

Das *Autocamtide 2-related inhibitory peptide* (AIP) (membrangängig, Calbiochem, Darmstadt) wurde mit einer Konzentration von 0,258 mM in ddH<sub>2</sub>O gelöst und mit einer finalen

Konzentration von  $1\ \mu\text{M}$  in IonOptix in den Versuchen eingesetzt.

Bafilomycin A1 (*Streptomyces griseus*, Calbiochem, Darmstadt) wurde mit einer Konzentration von  $250\ \mu\text{M}$  in DMSO gelöst und für die Messung mit einer finalen Konzentration von  $1\ \mu\text{M}$  in IonOptix verdünnt. Als Kontrolle wurde eine 0,4% (v/v) Lösung von DMSO in IonOptix verwendet. Die Zellen wurden während der Waschschriffe nach der Beladung mit Indo-1 AM mit Bafilomycin A1 inkubiert, das heißt 20 Minuten. Während einer Inkubation mit Isoprenalin und während der Messung war Bafilomycin A1 nicht mehr anwesend.

## Messung

Die Messung der Herzzellen wurde mit dem in Abbildung 3.4 angegebenen Automator gesteuert. Während der Messung wurden drei unterschiedliche Bildschleifen durchlaufen.

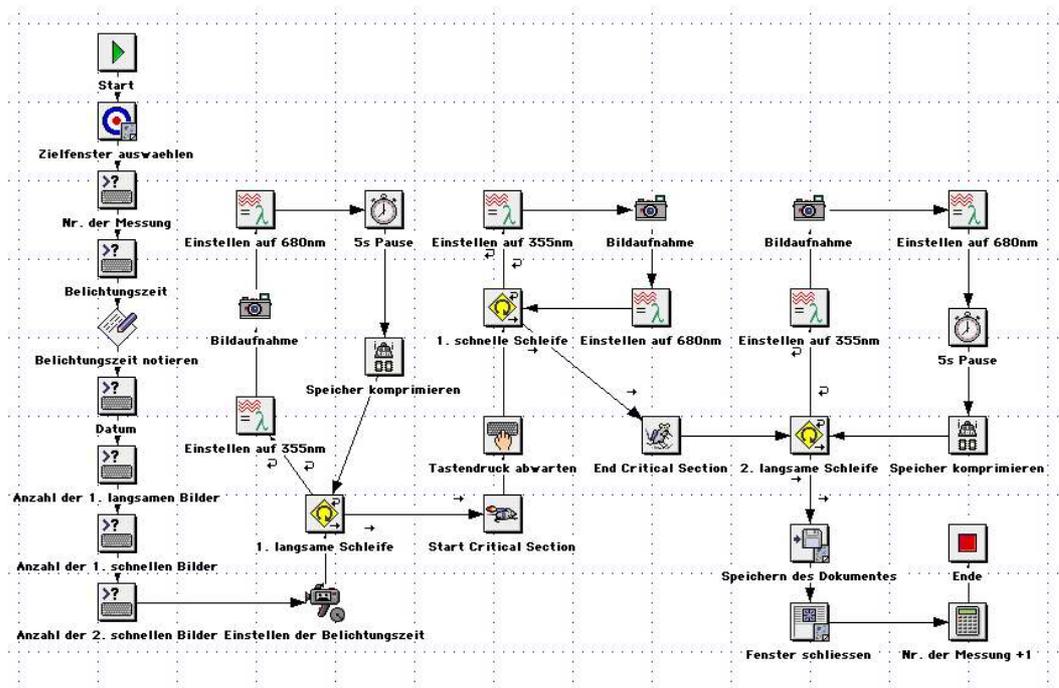


Abbildung 3.4: Messautomator für das  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging der Cardiomyozyten.

In der ersten, langsamen Schleife wurden zehn Fluoreszenzbilder in einem Abstand von fünf Sekunden aufgenommen. Während dieser Bildfolge wurden die Herzzellen nicht elektrisch stimuliert. Daran schloss sich eine schnelle Bildfolge, ohne zeitliche Verzögerung zwischen den einzelnen Bildern an. Der Abstand zwischen den Fluoreszenzbildern betrug etwa 50 ms. Während dieser ersten, schnellen Schleife wurden die Herzzellen gleichzeitig durch einen Feldstimulator (SD9 square pulse Stimulator, GRASS Technologies, Rodgau) elektrisch stimuliert. Dies wurde durch Platinelektroden ermöglicht, die in die Kammern ( $\mu$ -Slides 8 well) gesteckt wurden. Damit die elektrische Stimulation zeitgleich mit der schnellen Bildaufnahme einsetzte, startete letztere erst, nachdem eine beliebige Taste auf der Computertastatur gedrückt

worden war. Schließlich schloss sich noch eine zweite, langsame Bildaufnahme mit derselben zeitlichen Verzögerung wie die erste langsame Schleife an, in der die Herzzellen ebenfalls nicht elektrisch stimuliert wurden. Die elektrische Stimulation erfolgte alle zwei Sekunden mit einer Pulsdauer von 4 ms und einer Spannung von 30 Volt. Als dichroischer Filter wurde der Filter bs380DCLP (Analysetechnik, Tübingen) eingesetzt. Zwischen das Mikroskop und die Kamera wurde ein *DualView*-Modul (Optical Insights, Tucson, USA) geschaltet. Dieses Modul verfügt über einen Strahlenteiler und Emissionsfilter für Messungen mit Indo-1, um bei einer Belichtung von 355 nm zeitgleich die Emission bei 405 und 485 nm messen zu können. Die Kamera wurde auf ein *Binning* von acht eingestellt.

### Datenauswertung

Für die Auswertung musste jedes Fluoreszenzbild zunächst gesplittet werden, um die Aufnahme bei einer Emission von 405 nm von derjenigen bei 485 nm zu trennen. Anschließend wurde mit Hilfe eines Algorithmus das Streulicht, welches aus den Ebenen ober- und unterhalb der Fokusebene stammte, bestimmt und mathematisch entfernt. Diese, als Dekonvolution bezeichnete Bearbeitung der Bilder wurde nach dem *no neighbour*-Algorithmus durchgeführt. Der *Removal* wurde auf 0,55 und die Verstärkung auf 4 eingestellt. Wie für die T-Zellen wurden nun aus den dekonvolvierten Daten Ratiobilder (Aufnahme bei 405 nm/ Aufnahme bei 485 nm) erstellt (Ratiobereich: 0,1 bis 0,8 (Abweichungen sind gesondert angegeben)). Die Schwellenwerte wurden ebenfalls linear mit der Zeit angepasst. Anschließend wurden die Ratiobilder median gefiltert (3x3).

Indem nun eine ROI um die gesamte Zelle gelegt wurde, konnte das mittlere Ratio der gesamten Zelle bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen werden. Aus diesen zeitlichen Verläufen konnte die Anzahl der zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten pro Elektrostimulation sowie die Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks bei der Stimulation bestimmt werden. Da keine Kalibration der Zellen erfolgte, ist die Amplitude in Ratioeinheiten (R.E.) angegeben.  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten unter einem Ratiowert von 0,0082 wurden dabei als Schwankung betrachtet und nicht als  $\text{Ca}^{2+}$ -Peak gewertet. Zusätzlich wurde für jeden Peak der zeitliche Abfall bestimmt. Falls mehrere Peaks pro Stimulation auftraten, wurde der Abfall des letzten Peaks bestimmt, sofern dessen Amplitude wieder auf den Basalwert abfiel, bevor die nächste Stimulation einsetzte. Mit Hilfe der Software SigmaPlot 10.0 (Systat Software GmbH, Erkrath) wurde für jeden Abfall ein Kurvenausgleich durchgeführt, mit der Annahme, dass es sich um einen exponentiellen Abfall handelt. Dafür wurde folgende Formel verwendet:  $f = y_0 + a * \exp(-b * x)$ . Der Parameter  $b$  lieferte den Wert für die reziproke Zeitkonstante und somit ein Maß für die Schnelligkeit, mit der das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal abnahm.

### 3.5.5 Puffer und Lösungen

- $\text{Ca}^{2+}$ -Messpuffer: 140 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 20 mM HEPES; 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 5,5 mM Glucose; pH 7,4 (mit NaOH)
- *Coating buffer* für die Beschichtung mit  $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$ : 15 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 35 mM  $\text{NaHCO}_3$ ; pH 9,6 (mit HCl)
- EGTA: 200 mM EGTA in ddH<sub>2</sub>O; pH 7,4 (mit NaOH)
- Fura-2 AM: 1 mg/ml Fura-2 AM in wasserfreiem DMSO
- Fura Red AM: 1 mM Fura Red AM in wasserfreiem DMSO
- Indo-1 AM: 1 mg/ml Indo-1 AM in wasserfreiem DMSO
- Ionomycin: 1 mg/ml Ionomycin in DMSO
- IonOptix (Stock): 135 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 0,6 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1,2 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 10 mM HEPES (pH 7,46 mit NaOH); bei 4°C
- IonOptix (frisch): 20 mM Glucose; 1,25 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in IonOptix (Stock); pH 7,46 (mit NaOH)
- IonOptix-BDM (frisch): 20 mM Glucose; 1,25 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 10 mM BDM in IonOptix (Stock); pH 7,46 (mit NaOH)
- Isoprenalin: 800 nM Isoprenalin in IonOptix
- Probenicid: 500 mM Probenicid in DMSO
- RPMI-Komplettmedium: RPMI-Grundmedium mit Glutamax I und 25 mM HEPES; 7,5 % (v/v) NCS; 100 U/ml Penicillin; 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin

### 3.5.6 Geräte

- Imaging System mit Openlab Software Version 3.5.2, 4.0.2 und 4.0.4 (Improvision Systems, Tübingen), bestehend aus:
  - Fluoreszenzmikroskop DM IRE2 mit *Piezostepper* (Leica, Wetzlar)
  - Polychrom IV (TILL Photonics, München)
  - DualView (Optical Insights, Tucson, USA)
  - CCD-Kamera mit Camera Controller ORCA C4742-95-12ER (Hamamatsu, Herrsching)
  - Computer Macintosh G4 (Apple)
- SD9 *square pulse* Stimulator (GRASS Technologies, Rodgau)

## 3.6 Bestimmung der Interleukin(IL)-2-Konzentration in Zellkulturüberständen von T-Zellen

Für die Bestimmung der IL-2-Konzentration in Zellkulturüberständen von T<sub>MBP</sub>-Zellen wurde der IL-2 ELISA Kit der Firma Invitrogen (Karlsruhe), bestehend aus *CytoSet<sup>TM</sup> Buf-*

fer Set und Rat IL-2 CytoSet<sup>TM</sup>, verwendet. Eine 96-Well Mikrotiterplatte (ImmunoMaxi Sorp, Nunc, Langenselbold) wurde mit 100  $\mu$ l/Vertiefung eines monoklonalen Antikörpers (*Capture antibody*, finale Konzentration: 1,25  $\mu$ g/ml in *Coating buffer B*) für die nachzuweisende Substanz beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden für eine Stunde mit Puffer abgesättigt (*Assay buffer*, 300  $\mu$ l/Vertiefung). Daran schloss sich eine zweistündige Inkubation mit 100  $\mu$ l/Vertiefung der Probe beziehungsweise des Standards an. Der Standard wurde in sieben Verdünnungen von 1 ng/ml bis 15,6 pg/ml eingesetzt. Die Verdünnung erfolgte in TCM-Medium mit 1% (v/v) Pferdeserum. Die Proben befanden sich in TCM-Medium mit 1% (v/v) Rattenserum und wurden unverdünnt eingesetzt. Anschließend wurden 50  $\mu$ l des zweiten biotinylierten Antikörpers (*Detection antibody*, finale Konzentration: 125 ng/ml in *Assay Buffer*) in jede Vertiefung pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde nun bei RT für 1,5 Stunden inkubiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation mit 100  $\mu$ l/Vertiefung des an Streptavidin gekoppelten Enzyms Meerrettich-Peroxidase (finale Konzentration: 150 ng/ml in *Assay Buffer*). In einer anschließenden Nachweisreaktion wurden 100  $\mu$ l/Vertiefung der Substratlösung TMB (Tetramethylbenzidin) gegeben und ein bis zehn Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 100  $\mu$ l/Vertiefung der Stopplösung beendet. Dreimaliges Waschen mit je 400  $\mu$ l/Vertiefung des Waschpuffers nach jedem Inkubationsschritt gewährleistete die Entfernung von nicht gebundenen Substanzen. Demnach sollte der Substratumsatz direkt proportional zur Menge des eingesetzten Enzyms, also auch zur Menge der nachzuweisenden Substanz sein. Zur Konzentrationsbestimmung wurde wie beschrieben eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen der nachzuweisenden Substanz mitgeführt. Die Messungen wurden an einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm (MWG-Biotec, Ebersberg) durchgeführt.

### 3.7 Statistik

Für die Analyse wurden die Programme SigmaPlot 10.0 (Systat Software GmbH, Erkrath) und SPSS 15.0 (SPSS GmbH Software, München) verwendet. Die Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit Lena Herich vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie des UKE durchgeführt. Für die Abbildungen 4.7, 4.14 und 4.15 im Ergebnisteil 4.1 wurde ein t-Test durchgeführt. Bei Mehrfachtestungen wurde das Signifikanzniveau nach der Bonferroni-Korrektur angepasst. Das bedeutet, dass Werte nur dann als signifikant unterschiedlich betrachtet wurden, wenn die Signifikanz unterhalb von 0,05 geteilt durch die Anzahl der Tests lag. Im Ergebnisteil 4.2 wurden zwei verschiedene Tests verwendet. Da die Werte für die Peakanzahl nicht normalverteilt sind, wurde ein nicht-parametrischer Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Werte für die Amplitude und die reziproke Zeitkonstante wurden nach einem gemischten linearen Modell analysiert. Dabei wurde der Tag als zufälliger Effekt in dem Modell berücksichtigt. Isoprenalin, jegliche Inhibitoren und cAMP-Analoga wurden als

Faktoren in das Modell aufgenommen. Für Bafilomycin A1 und BZ194 wurde zusätzlich der jeweilige Inhibitor in Kombination mit Isoprenalin als Faktor berücksichtigt. Bei Mehrfachtestungen wurde auch hier das Signifikanzniveau nach der Bonferroni-Korrektur angepasst.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Bedeutung des NAADP-Signalweges für die Aktivierung primärer, MBP-spezifischer T-Zellen der Ratte im Zweizellsystem

Ein Teil dieser Dissertation wurde der Etablierung eines Zweizellsystems zur Aktivierung primärer, MBP-spezifischer T-Zellen der Ratte gewidmet. Bei einem Zweizellsystem werden die T-Zellen nicht durch Antikörper, sondern durch Antigen-präsentierende Zellen, die auf ihrer Oberfläche das antigene Peptid präsentieren, aktiviert. Anschließend wurde untersucht, welche Auswirkung die Inhibition des NAADP-Signalweges auf die Aktivierung der T-Zellen im Hinblick auf das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal hat. Als Antigen-präsentierende Zellen wurde die Astrozytenzelllinie F10 verwendet (Risau et al., 1990).

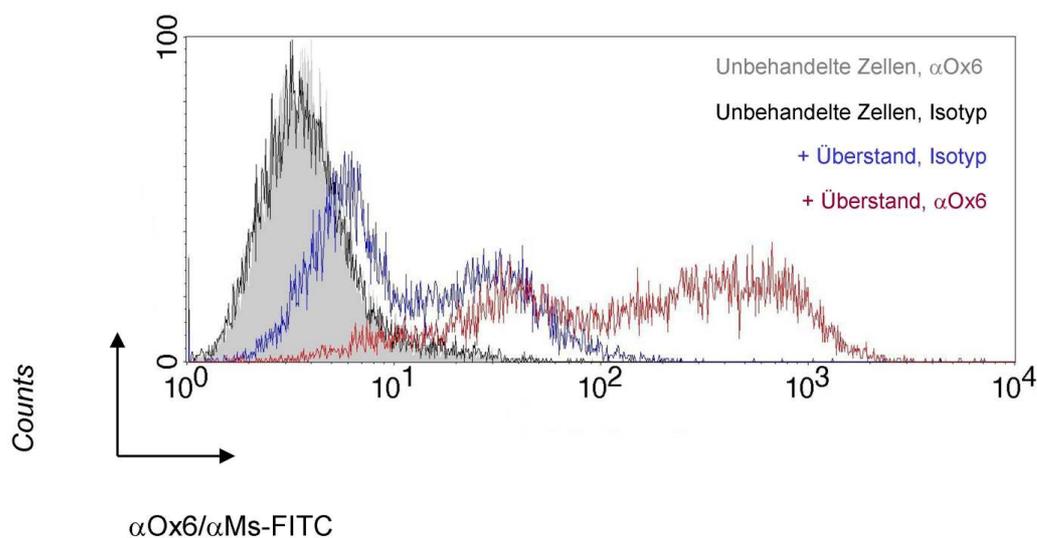
#### 4.1.1 Die Etablierung des Zweizellsystems

##### Induktion der MHCII-Expression auf der Oberfläche von F10 Astrozyten

Bei Astrozyten handelt es sich um nicht-professionelle Antigen-präsentierende Zellen, die erst nach einer Aktivierung in der Lage sind, Antigene zu prozessieren und auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Durch die Gabe von  $\text{IFN-}\gamma$  wird nicht nur die Expression von MHCII (Fontana et al., 1984; Fierz et al., 1985), sondern auch die der kostimulatorischen Moleküle B7.1 und B7.2 (Nikcevich et al., 1997) sowie verschiedener Cytokine wie IL-12 und IL-23 (Constantinescu et al., 2005) induziert. Ferner konnte gezeigt werden, dass Astrozyten T-Zellen in Kombination mit dem spezifischen Antigen zu einer starken Proliferation anregen können (Fontana et al., 1984).

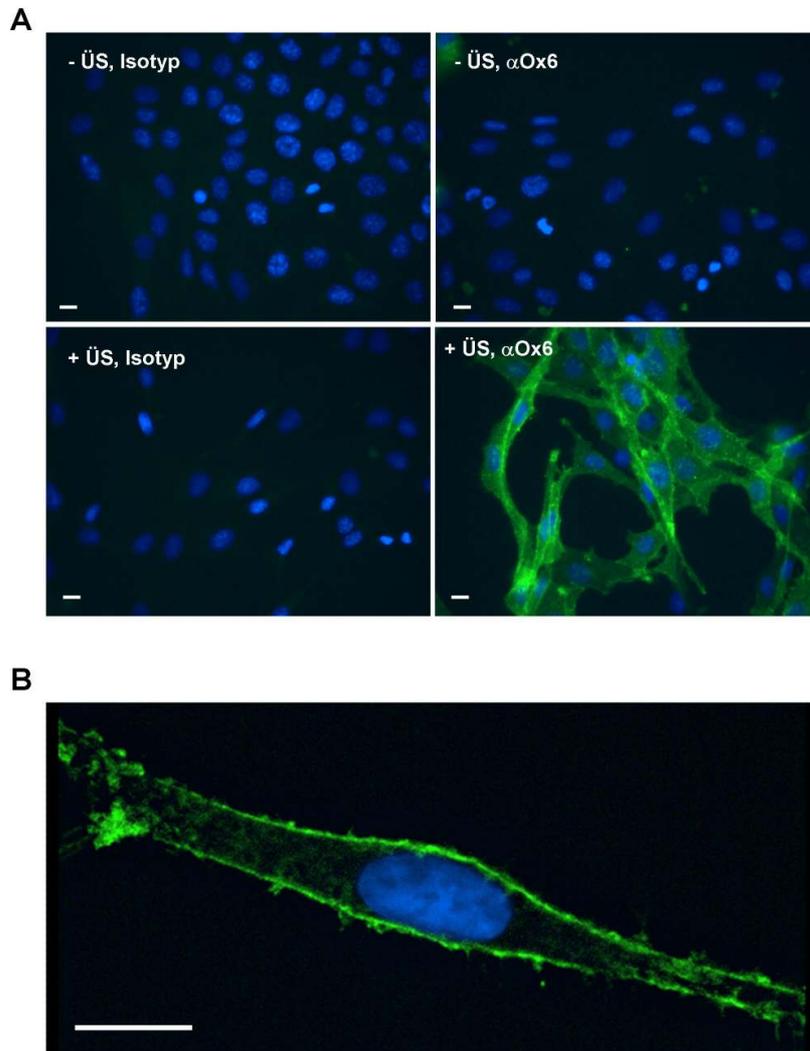
Um eine Expression von MHCII auf der Oberfläche der Astrozytenzelllinie F10 zu erreichen, wurden die Zellen zunächst mit einer Konzentration von 100 U/ml oder 250 U/ml  $\text{IFN-}\gamma$  für 24 oder 48 Stunden inkubiert. Nach einer 48-stündigen Inkubation konnte konzentrationsabhängig eine Expression von MHCII auf der Oberfläche der Astrozyten mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Die Expression von MHCII fiel jedoch sehr schwach aus. Eine niedrige MHCII-Expression könnte eine unzureichende Antigenpräsentation auf der Oberfläche der Astrozyten und somit eine schwache T-Zellaktivierung zur Folge haben. Deshalb wurde versucht, die MHCII-Expression weiter zu steigern. Dafür wurde Me-

diumüberstand restimulierter T-Zellen verwendet. Für eine Restimulation werden ruhende OVA- oder MBP-spezifische T-Zellen mit Hilfe von Thymozyten und dem spezifischen Antigen aktiviert. Antigen-stimulierte T-Zellen sezernieren innerhalb von zwei Tagen zahlreiche stimulierende Kofaktoren in das umgebende Medium (Weber et al., 1993; Meinel et al., 1995). Anschließend kann der Überstand der T-Zellen entnommen, filtriert und durch Einfrieren bei  $-80^{\circ}\text{C}$  konserviert werden. Für die Aktivierung der Astrozyten wurde konditioniertes Medium, das 20 % dieses Überstandes enthielt, hergestellt. Dann wurden die Astrozyten für 48 Stunden mit diesem Medium inkubiert und die MHCII-Expression im Durchflusszytometer analysiert (Abb. 4.1). Astrozyten, die konditioniertes Medium erhalten hatten, zeigten eine deutliche MHCII-Expression auf ihrer Oberfläche. Dabei ließen sich eine Population mit mittlerer und eine mit starker Expression unterscheiden. Zwar war im Vergleich zu unbehandelten Zellen auch bei der Isotypkontrolle eine Färbung mit dem Zweitantikörper zu beobachten, diese Färbung fiel jedoch wesentlich schwächer aus.



**Abbildung 4.1: Induktion der MHCII-Expression auf F10 Astrozyten - Analyse im Durchflusszytometer.** Die Astrozyten wurden für 48 Stunden mit konditioniertem Medium, das 20 % (v/v) eines Überstandes restimulierter, primärer T-Zellen der Ratte enthielt, inkubiert. Der Nachweis des MHCII-Proteins erfolgte über einen anti-Ox6 Antikörper (Sekundärantikörper:  $\alpha$ -Maus Fab'2 Fragment, FITC-markiert). Im Histogramm sind unbehandelte (grau hinterlegt) und mit T-Zellüberstand inkubierte Astrozyten (rot) sowie die entsprechenden Isotypkontrollen (schwarz für unbehandelte beziehungsweise blau für mit T-Zellüberstand inkubierte Astrozyten) dargestellt.

Zusätzlich zur Analyse im Durchflusszytometer wurde eine immunhistochemische Färbung der mit T-Zellüberstand behandelten Astrozyten durchgeführt. Neben der Anfärbung von MHCII auf der Zelloberfläche wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt und Fluoreszenzbilder bei 40- und 100-facher Vergrößerung aufgenommen (Abb. 4.2).



**Abbildung 4.2: Induktion der MHCII-Expression auf F10 Astrozyten - Immunfluoreszenz.**

Die Astrozyten wurden für 48 Stunden mit konditioniertem Medium, das 20 % (v/v) eines Überstandes restimulierter, primärer T-Zellen der Ratte enthielt, inkubiert. Der Nachweis des MHCII-Proteins erfolgte über einen anti-Ox6 Antikörper (Sekundäntikörper:  $\alpha$ -Maus Fab'2 Fragment, FITC-markiert (grün)) Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. A) Aufnahmen repräsentativer Zellfelder bei 40-facher Vergrößerung. (ÜS = T-Zellüberstand). B) Aufnahme einer mit T-Zellüberstand inkubierten und MHCII-angefärbten Astrozyte bei 100-facher Vergrößerung. Dabei wurden mit Hilfe eines *Piezosteppers* 40 Bilder pro Zelle mit einem Abstand von 500 nm aufgenommen, die anschließend dekonvolviert wurden (Algorithmus: Nächster Nachbar mit fünf Nachbarn; FITC-Färbung: *Removal* = 0,6; Verstärkung = 2,5; DAPI-Färbung: *Removal* = 0,5; Verstärkung = 1,5). Maßstab = 10  $\mu$ m.

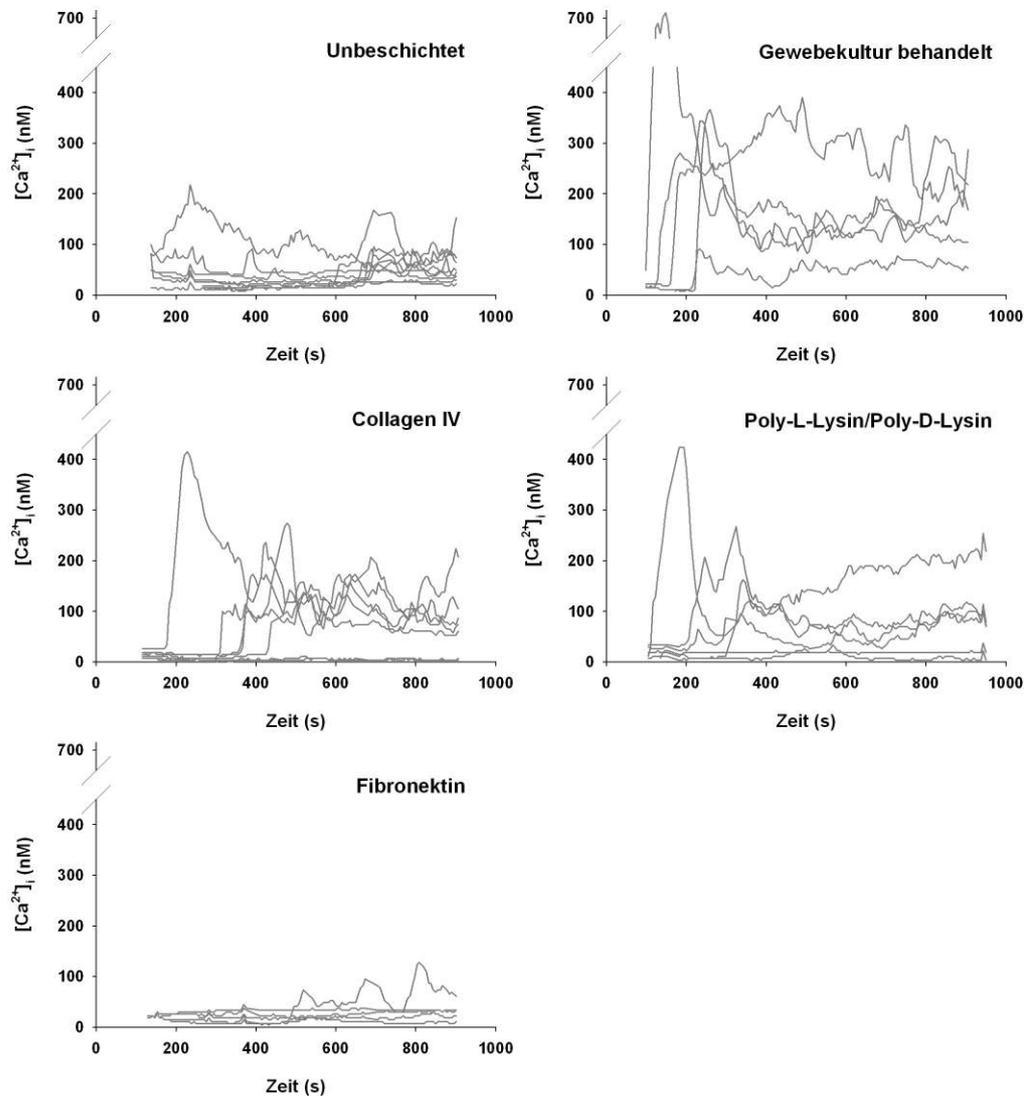
Bei 40-facher Vergrößerung ist eine deutliche Anfärbung der Astrozyten mit dem anti-Ox6-Antikörper, der gegen MHCII gerichtet ist, zu beobachten. In den Kontrollen tritt im Gegensatz zum Durchflusszytometer keine Färbung auf. Bei 100-facher Vergrößerung wurden mehrere Ebenen der Zelle mit Hilfe eines *Piezosteppers* aufgenommen. Eine sich anschließende Dekonvolution, bei der das Streulicht aus anderen Ebenen herausgerechnet wurde, ergab,

dass ausschließlich die Membran der Astrozyten angefärbt wurde. Beide Versuche zeigen, dass mit dem Überstand restimulierter T-Zellen eine deutliche MHCII-Expression in den Astrozyten erreicht wird. Ferner erfolgt die Expression eindeutig auf der Oberfläche der Astrozyten, wodurch eine Antigenpräsentation über MHCII zur Aktivierung der T-Zellen möglich sein sollte.

### Die Auswahl der Beschichtung für das Zweizellsystem

Bei der Auswahl der Beschichtung für das Zweizellsystem musste auf zwei Eigenschaften geachtet werden. Zum Einen sollte die Beschichtung das Wachstum der adhären Astrozytenzelllinie F10 erlauben. Dabei sollten Waschschriffe möglich sein, ohne dass sich die Zellen dabei von dem Untergrund lösen. Zum Anderen sollte die Beschichtung keine Aktivierung der T-Zellen bewirken, um sicher zu stellen, dass ein beobachtetes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal tatsächlich auf der Interaktion zwischen einer Astrozyte und einer T-Zelle beruht. Ferner würde eine Aktivierung der T-Zellen durch die Beschichtung womöglich dazu führen, dass die T-Zelle immobilisiert und eine Kontaktbildung mit Astrozyten erschwert würde.

Für die Untersuchung unterschiedlicher Beschichtungen wurden die Kammern der Firma ibidi  $\mu$ -Slides 8 well verwendet. Die Ergebnisse des Versuches sind in Abbildung 4.3 dargestellt. Bei unbeschichteten Kammern hatten die T-Zellen direkten Kontakt zur hydrophoben Plastikoberfläche. Dabei entstanden lediglich schwache  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale, allerdings hafteten die Astrozyten sehr schlecht auf diesem Untergrund. Eine wesentlich bessere Adhärenz wurde durch Gewebekultur behandelte Kammern erreicht, die allerdings eine starke und sofortige Aktivierung der T-Zellen induzierten. Auch Collagen IV- und Poly-L-Lysin/Poly-D-Lysin-beschichtete Kammern erzeugten nur unwesentlich schwächere  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in den T-Zellen. Zudem adhärten die T-Zellen sehr stark auf dem Untergrund. Die für die in der Abbildung gezeigte Messung verwendete, Lysin-beschichtete Kammer wurde direkt von ibidi bezogen. Außerdem wurden noch weitere Beschichtungen von poly-L-Lysin in Gewebekultur behandelten Kammern getestet (nicht abgebildet). Dabei wurde sowohl hochmolekulares (150-300 kD) als auch 30-70 kD schweres poly-L-Lysin mit einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet. In beiden Fällen wurden nach wie vor starke  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in den T-Zellen induziert. Da die T-Zellen besonders stark auf das hochmolekulare poly-L-Lysin reagierten, wurde lediglich die Konzentration für das 30-70 kD schwere poly-L-Lysin noch einmal 1:10 verdünnt. Dennoch kam es weiterhin zu einer vorzeitigen Aktivierung der T-Zellen. Schließlich wurden unbehandelte Kammern mit Fibronectin beschichtet und mit den T-Zellen getestet. Dabei wurden kaum  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in den T-Zellen beobachtet und im Gegensatz zu den anderen Beschichtungen konnte eine gesunde Zellmorphologie im Durchlicht festgestellt werden. Da die Beschichtung mit Fibronectin zudem ein Wachstum der Astrozyten ermöglichte, wurde dieser Untergrund für alle folgenden Versuche mit dem Zweizellsystem verwendet.

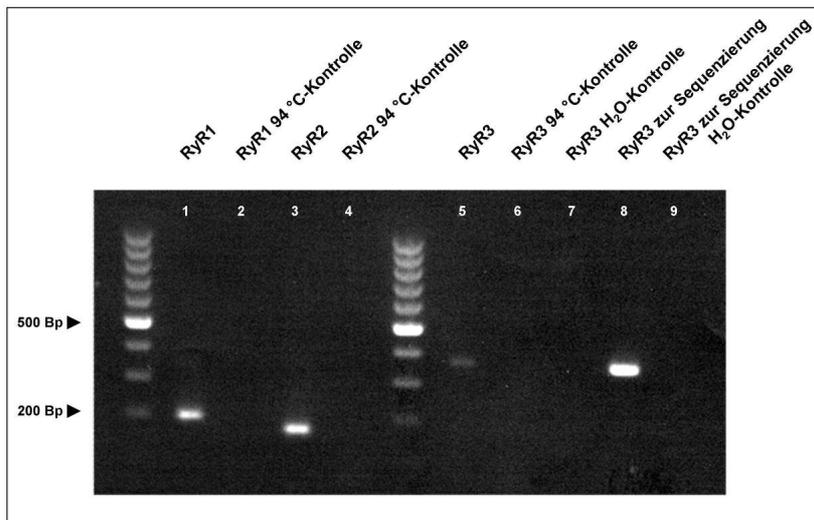


**Abbildung 4.3:  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale von T-Zellen auf unterschiedlichen Beschichtungen.** Die T-Zellen wurden mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM beladen und in Vertiefungen der Kammern  $\mu$ -Slides 8 well (ibidi) mit den angegebenen Beschichtungen pipettiert. Der Zeitpunkt Null markiert die Zugabe der T-Zellen. Es ist jeweils eine repräsentative von vier (Lysin), sechs (Unbeschichtet, Collagen IV, Fibronectin) beziehungsweise neun (Gewebekultur behandelt) Messungen dargestellt, wobei eine Kurve jeweils das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal einer Einzelzelle wiedergibt.

### Die Expression der drei Ryanodinrezeptor-Subtypen in primären T-Zellen der Ratte

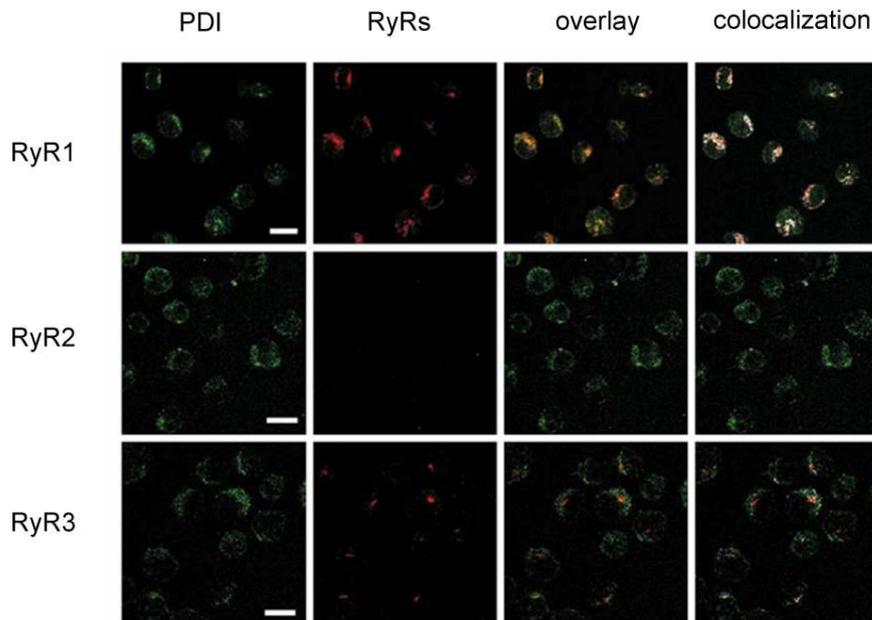
Die Einführung eines Zweizellsystems sollte der Untersuchung des NAADP-Signalweges dienen. In T-Zellen wird bisher davon ausgegangen, dass NAADP den Ryanodinrezeptor aktiviert und darüber einen Ausstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) bewirkt (Langhorst et al., 2004; Dammermann und Guse, 2005; Steen et al., 2007).

Deshalb wurde zunächst überprüft, ob die im Zweizellsystem verwendeten T-Zellen den Ryanodinrezeptor exprimieren. Es existieren drei Ryanodinrezeptor-Subtypen, deren Expression zunächst auf mRNA-Ebene analysiert wurde (Abbildung 4.4). Es stellte sich heraus, dass alle drei Ryanodinrezeptor-Subtypen in  $T_{MBP}$ -Zellen exprimiert werden. Die Bande für den Ryanodinrezeptor 3 war sehr schwach, jedoch zeigte sich in der anschließenden *nested* PCR neben der zu erwartenden eine zusätzliche unspezifische Bande. Deshalb wurde das Produkt aus der RT-PCR erneut amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte die Expression des Ryanodinrezeptors 3 (siehe Spalte 8 in Abbildung 4.4).



**Abbildung 4.4: Expression der drei RyR-Subtypen in primären T-Zellen der Ratte.** Unter Verwendung Subtyp-spezifischer Primer wurden mit einer RT-PCR und anschließender *nested* PCR (für RyR1 und RyR2) kurze Amplifikate der drei RyR-Subtypen hergestellt und auf einem 1,6%igen Agarosegel analysiert. Die Größe sollte 193 Bp, 168 Bp beziehungsweise 358 Bp für den RyR1, RyR2 beziehungsweise RyR3 betragen. Die entsprechenden Kontrollen sind mit aufgeführt. Des Weiteren wurde das Produkt des RyR3 aus der RT-PCR für eine anschließende Sequenzierung in größerer Menge amplifiziert (Spalte 8, Kontrolle: Spalte 9).

Nach der Analyse der Expression der Ryanodinrezeptor-Subtypen auf mRNA-Ebene sollte das Ergebnis auf Proteinebene überprüft werden. Dies erfolgte mittels Immunfluoreszenz am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried in der Arbeitsgruppe von Prof. Flügel (jetzt Universitätsklinikum Göttingen, Abbildung 4.5). Es konnte eine Expression des Ryanodinrezeptors 1 und des Ryanodinrezeptors 3 nachgewiesen werden, wobei die Expression des Subtyps 3 wesentlich schwächer ausfiel als die des Subtyps 1. Des Weiteren konnte eine Kolokalisation des Ryanodinrezeptors 1 mit einem Marker für das ER, der Phosphodisulfidomerase (PDI), gezeigt werden. Im Gegensatz zur Analyse auf mRNA-Ebene konnte auf Proteinebene keine Expression des Ryanodinrezeptors 2 in der Immunfluoreszenz beobachtet werden.

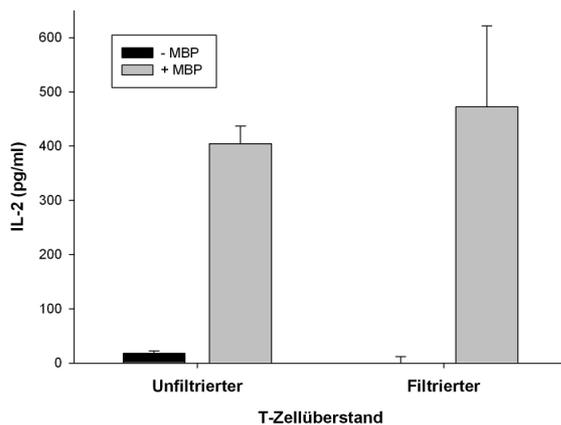


**Abbildung 4.5: Expression der drei RyR-Subtypen in primären T-Zellen der Ratte - Immunfluoreszenz.** Dieser Versuch wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Flügel (jetzt Universitätsklinikum Göttingen) am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried durchgeführt (Dammermann et al., 2009). Der Nachweis der RyR erfolgte über anti-RyR1, -RyR2 und -RyR3 Antikörper (Sekundärantikörper:  $\alpha$ -Kaninchen Serum, Cy3-markiert (rot)). Das ER wurde spezifisch mit einem Antikörper gegen die Proteindisulphidisomerase (PDI) angefärbt (Sekundärantikörper:  $\alpha$ -Maus Serum, Cy5-markiert (grün)). Die Aufnahmen erfolgten bei 40-facher Vergrößerung. Maßstab = 10  $\mu$ m.

#### Die IL-2 Ausschüttung von T-Zellen nach Stimulation mit MBP-inkubierten Astrozyten

Frühe Arbeiten belegen, dass es sich bei Astrozyten um induzierbare Antigen-präsentierende Zellen handelt, die in der Lage sind, T-Zellen zur Proliferation anzuregen (Fontana et al., 1984; Fierz et al., 1985). Dabei wurde auch gezeigt, dass aktivierte T-Zellen in der Lage sind, eine verstärkte Expression von MHCII auf der Oberfläche von Astrozyten zu induzieren. Wie bereits im oberen Teil beschrieben, konnte mit dem Mediumüberstand von aktivierten T-Zellen eine MHCII-Expression auf der Astrozytenzelllinie F10 bewirkt werden. Eine erfolgreiche Antigenpräsentation durch die Astrozyten sollte die T-Zellen aktivieren und ihre Proliferation anregen. Dies kann indirekt über die Ausschüttung des Cytokins Interleukin-2 (IL-2) durch die T-Zellen nachgewiesen werden, da IL-2 nach der Aktivierung der T-Zellen sezerniert wird und autokrin ihre Proliferation induziert. Ferner besteht ein essentielles Signal für die IL-2-Produktion in einem anhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in der T-Zelle. Ein Anstieg der IL-2-Konzentration lässt demnach auf ein vorangegangenes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal schließen, das wiederum Voraussetzung für die erfolgreiche Verwendung des Zweizellsystems ist. Wie bereits

beschrieben, wurden die Astrozyten mit konditioniertem Medium zur MHCII-Expression angeregt. Für das konditionierte Medium wurde der T-Zellüberstand sowohl filtriert als auch unfiltriert eingesetzt. Anschließend wurden die Astrozyten für 21 Stunden gemeinsam mit  $T_{MBP}$ -Zellen und dem spezifischen Antigen MBP kultiviert. Wie bei Fontana et al. (1984) beschrieben, konnte im Durchlicht eine Anhäufung von T-Zellen an den Astrozyten beobachtet werden. Der entnommene Mediumüberstand wurde anschließend auf sezerniertes IL-2 im ELISA untersucht (Abbildung 4.6). Sowohl mit filtriertem als auch mit unfiltriertem T-Zellüberstand konnte eine starke IL-2-Sekretion nachgewiesen werden. Die Vitalität der Astrozyten nach der Behandlung mit filtriertem T-Zellüberstand war jedoch wesentlich höher als mit unfiltriertem. Deshalb wurde in den folgenden Experimenten des Zweizellsystems, in denen aktivierte Astrozyten verwendet wurden, filtrierter T-Zellüberstand zur Induktion der MHCII-Expression eingesetzt.

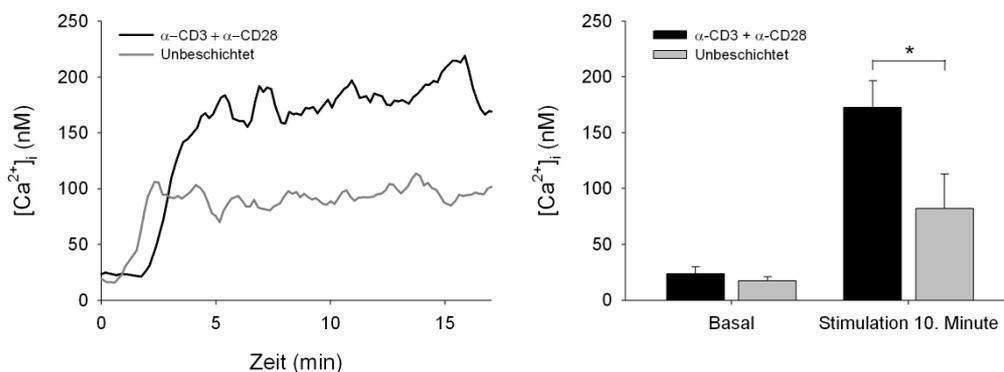


**Abbildung 4.6: IL-2 Ausschüttung von T-Zellen nach Stimulation mit MBP-inkubierten Astrozyten.** Zur Induktion der MHCII-Expression wurden die Astrozyten 48 Stunden mit konditioniertem Medium, das 25 % (v/v) eines Überstandes restimulierter, primärer T-Zellen der Ratte enthielt, inkubiert. Der Überstand wurde direkt eingesetzt oder vorab filtriert (siehe Abbildung).  $T_{MBP}$ -Zellen wurden mit dem Antigen MBP ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) zu den Astrozyten gegeben und 21 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und bis zur Analyse bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Die Bestimmung der ausgeschütteten IL-2 Menge erfolgte mittels ELISA. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt (+SD).

### **Ca<sup>2+</sup>-Signale in T-Zellen nach Stimulation mit Antikörpern gegen CD3 und CD28**

Neben der Aktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen können T-Zellen auch durch Antikörper, die gegen CD3 gerichtet sind, aktiviert werden. Für eine Kostimulation wird als zusätzlicher Antikörper anti-CD28 eingesetzt. Im Gegensatz zur Stimulation über Antigen-präsentierende Zellen erfolgt die Stimulation mit Antikörpern räumlich ungerichtet. Da sie jedoch ein deutliches  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in T-Zellen induzieren kann, diente sie als Anhaltspunkt, mit welchem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den T-Zellen zu rechnen sei.

Für die Analyse des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals nach einer Antikörperstimulation wurden die Kammern  $\mu$ -Slides 8 well der Firma ibidi mit anti-CD3 mAk und anti-CD28 mAk beschichtet. Die T-Zellen wurden in die Kammer gegeben und ihr  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal am Fluoreszenzmikroskop verfolgt (Abbildung 4.7). Bereits nach knapp zwei Minuten kam es zu einem starken Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von einem basalen Wert von 24 nM auf 173 nM zehn Minuten nach Beginn der Messung. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg war lang anhaltend und blieb über 15 Minuten bestehen. Als Kontrolle dienten unbeschichtete Kammern. Durch den Kontakt zu dem hydrophoben Untergrund der Kammern wurden ebenfalls kleine  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in den T-Zellen induziert (siehe auch Abbildung 4.3). Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration trat bereits nach knapp einer Minute und somit früher als auf der Antikörperbeschichtung ein. Innerhalb von zehn Minuten nach Beginn der Messung wurde mit einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 89 nM jedoch nur ein halb so großer Anstieg erreicht. Durch die spezifische Stimulation der Oberflächenmoleküle CD3 und CD28 mit Hilfe von Antikörpern konnte folglich ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal mit einem Anstieg von etwa 150 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in den T-Zellen induziert werden. Dieses ließ sich deutlich von einem unspezifischen, durch die Plastikoberfläche der Kammern induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal abgrenzen.

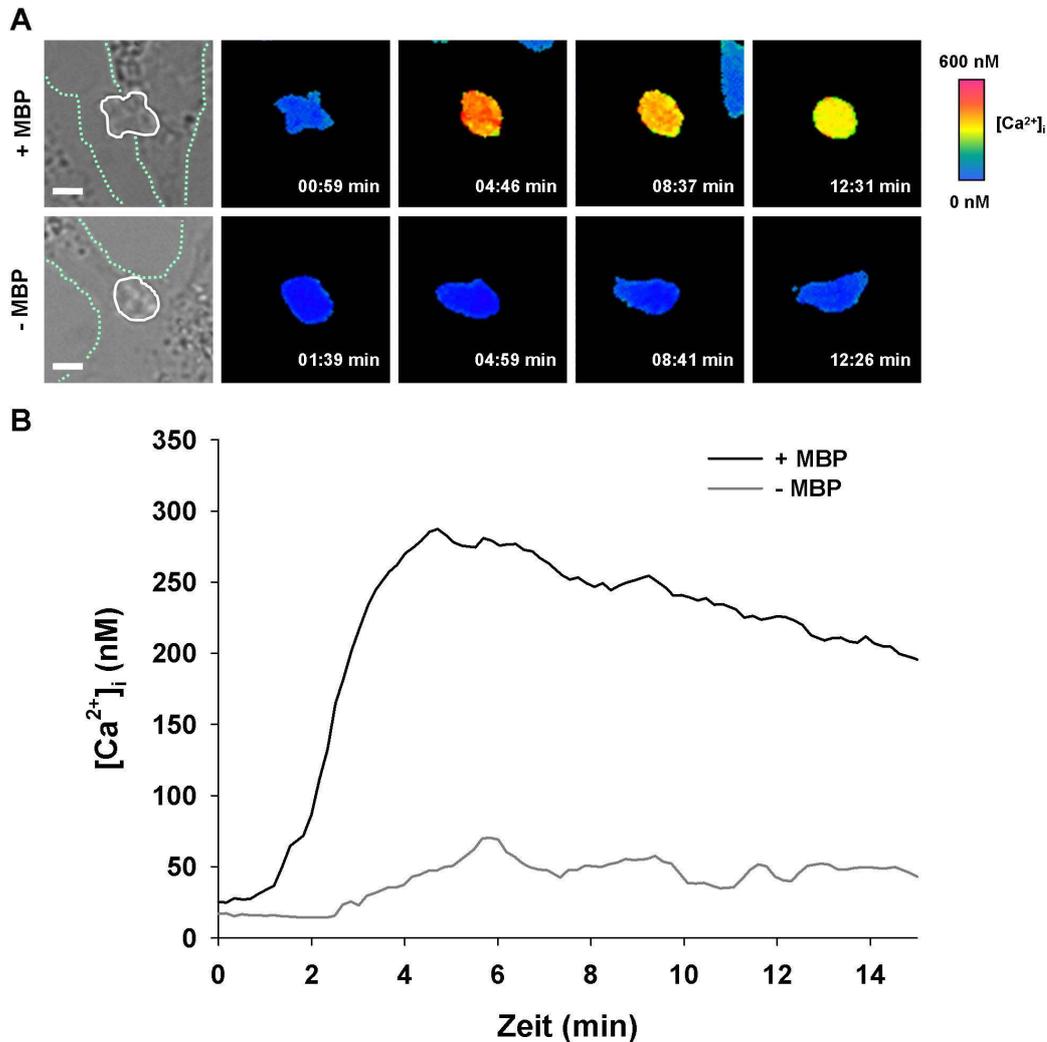


**Abbildung 4.7:  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in T-Zellen nach Stimulation mit Antikörpern gegen CD3 und CD28.** Die Vertiefungen der Kammern  $\mu$ -Slides 8 well (ibidi) wurden mit anti-CD3 und anti-CD28 ( $c = 5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  beschichtet.  $\text{T}_{\text{OVA}}$ -Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen und ihre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in der Zellsuspension gemessen. Im linken Teil der Abbildung sind die mittleren, globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale von sieben (Kontrolle: unbeschichtet) beziehungsweise 12 (anti-CD3/CD28-Beschichtung) T-Zellen dargestellt. Im rechten Teil der Abbildung ist jeweils die basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sowie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zehn Minuten nach Beginn der Messung dargestellt. \*  $P < 0,05$ .

### **$\text{Ca}^{2+}$ -Signale von $\text{T}_{\text{MBP}}$ -Zellen nach Stimulation mit MBP-inkubierten Astrozyten**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Astrozyten in der Lage sind,  $\text{T}_{\text{MBP}}$ -Zellen zu aktivieren, sollte dies auf der Ebene der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale analysiert werden. Dafür wurde erneut die MHCII-Expression auf den Astrozyten induziert und das spezifische Antigen MBP für

zwei Stunden zu den Zellen gegeben, um dessen Prozeption und Präsentation zu ermöglichen. Anschließend wurde ein Ausschnitt mit Astrozyten im Fluoreszenzmikroskop eingestellt, die  $T_{MBP}$ -Zellen dazugegeben und ihr  $Ca^{2+}$ -Signal gemessen (Abbildung 4.8).

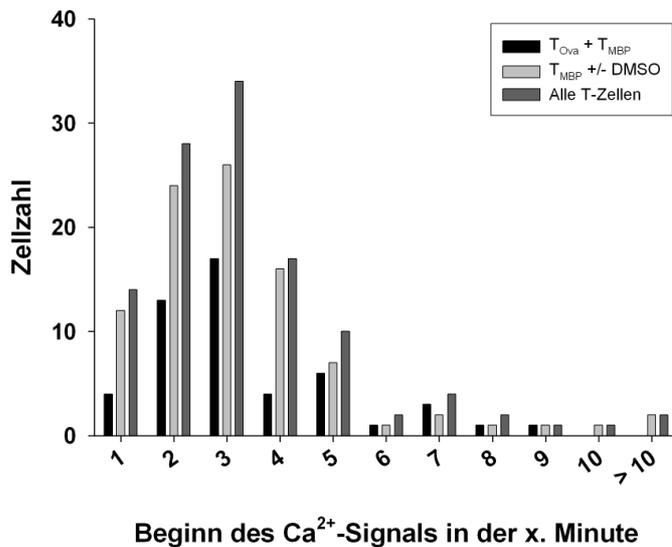


**Abbildung 4.8:  $Ca^{2+}$ -Signale von  $T_{MBP}$ -Zellen nach Stimulation mit MBP-inkubierten Astrozyten.** Zur Induktion der MHCII-Expression wurden die Astrozyten 48 Stunden mit konditioniertem Medium, das 20 % (v/v) eines Überstandes restimulierter, primärer T-Zellen der Ratte enthielt, inkubiert. Anschließend wurden sie zwei Stunden mit dem Antigen MBP inkubiert (10  $\mu$ g/ml; Kontrolle: ohne Antigen).  $T_{MBP}$ -Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen, zu den Astrozyten gegeben und ihre  $Ca^{2+}$ -Signale in der Zellsuspension gemessen. Der Zeitpunkt Null wurde als der erste Kontakt zwischen der T-Zelle und einer Astrozyte definiert. A) Es sind Durchlichtbilder und farbkodierte Bilder repräsentativer Einzelzellen dargestellt. Die Astrozyten beziehungsweise T-Zellen sind durch grüne beziehungsweise weiße Linien in den Durchlichtbildern hervorgehoben. Maßstab = 5  $\mu$ m. B) Es sind die mittleren, globalen  $Ca^{2+}$ -Signale von 12 (-MBP) beziehungsweise 29 (+MBP) T-Zellen dargestellt.

Als Kontrolle dienten Astrozyten, die nicht mit dem spezifischen Antigen inkubiert worden waren. In der Teilabbildung 4.8 A sind repräsentative Einzelzellen dargestellt. Im Durch-

lichtbild ist deutlich der Kontakt der jeweiligen T-Zelle mit der Astrozyte zu erkennen. Die T-Zellen konnten sowohl seitlich als auch von oben einen Kontakt zu den Astrozyten ausbilden. In der Gegenwart von MBP entwickelte sich innerhalb der ersten fünf Minuten nach Kontaktbeginn ein starkes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in der T-Zelle, das lang anhaltend war und innerhalb von sieben Minuten nur leicht zurückging. Des Weiteren ließ sich eine Formveränderung beobachten: Erschien die T-Zelle zu Beginn des Kontaktes noch unförmig, rundete sie sich im Verlauf des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals immer mehr ab, bis sie zum Ende der Messung hin eine vollständig runde Form annahm. In der Abwesenheit des spezifischen Antigens konnte nur eine schwache Erhöhung der basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beobachtet werden. Zudem behielt die T-Zelle ihre unregelmäßige Form. In der Teilabbildung 4.8B sind die Mittelwerte der gemessenen T-Zellen dargestellt. Im Mittel entwickelte sich das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in der Anwesenheit von MBP in der zweiten Minute nach Kontaktbeginn und erreichte sein Maximum von knapp 300 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach vier Minuten. Das Signal war lang anhaltend und lag nach weiteren zehn Minuten noch bei 200 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Im Gegensatz dazu entwickelte sich ohne das Antigen nur ein schwaches  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal, das zudem zeitlich verzögert auftrat. Das Zweizellensystem aus Astrozyten als Antigen-präsentierende Zellen und MBP-spezifischen T-Zellen wurde dementsprechend erfolgreich etabliert. Die  $T_{\text{MBP}}$ -Zellen reagierten mit einem starken  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nach der Kontaktbildung zu den Astrozyten, jedoch nur in der Anwesenheit ihres spezifischen Antigens MBP.

Im Folgenden wurde analysiert, wann das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nach dem Kontaktbeginn zu der Astrozyte einsetzte. In die Auswertung wurden nicht nur MBP-spezifische T-Zellen, sondern auch OVA-spezifische T-Zellen mit aufgenommen, sowie T-Zellen, die aus Versuchsgründen mit DMSO inkubiert worden waren. Die DMSO-Konzentration betrug dabei maximal 0,5 % (v/v) und die Inkubationsdauer maximal 16 Stunden. Des Weiteren wurden nur T-Zellen für die Auswertung verwendet, die mindestens ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal von 200 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aufwiesen. Es ergab sich, dass knapp 80 % der T-Zellen eine Reaktion dieser Amplitude zeigten. Die Verteilung des Beginns ihrer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale ist in Abbildung 4.9 dargestellt. Für alle Konditionen gilt, dass die meisten T-Zellen bereits in den ersten fünf Minuten nach ihrer Kontaktausbildung zu einer Astrozyte ein deutliches  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal entwickelten. Davon reagierte die Mehrheit der Zellen wiederum in der zweiten oder dritten Minute. Ab der sechsten Minute entwickelten sich hingegen kaum noch  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale über 200 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

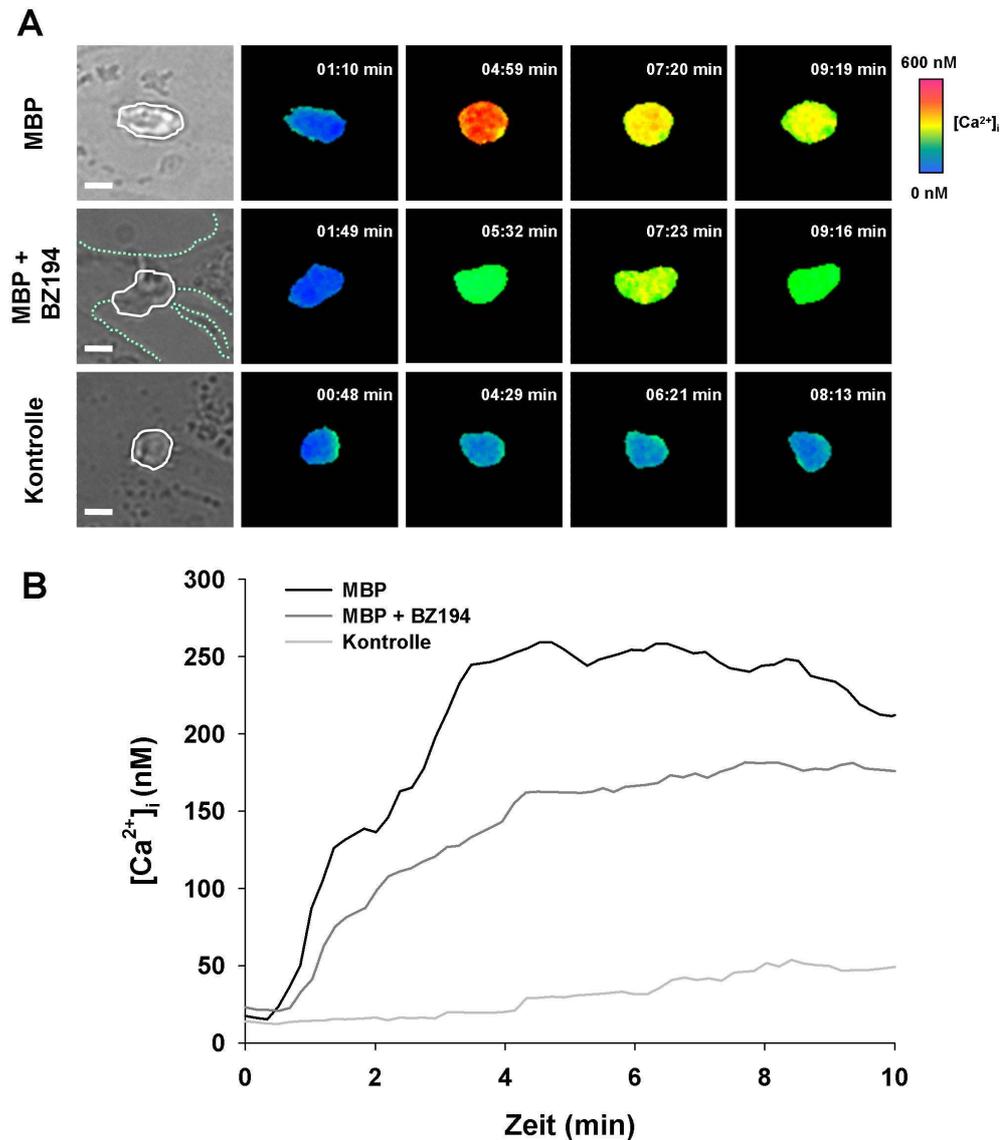


**Abbildung 4.9: Beginn des Ca<sup>2+</sup>-Signals von T-Zellen nach Stimulation mit Ag-inkubierten Astrozyten.** Zur Induktion der MHCII-Expression wurden die Astrozyten 48 Stunden mit konditioniertem Medium, das 20 % (v/v) eines Überstandes restimulierter, primärer T-Zellen der Ratte enthielt, inkubiert. Anschließend wurden sie zwei Stunden mit dem Antigen MBP oder OVA inkubiert (10 µg/ml; Kontrolle: ohne Antigen). T<sub>OVA</sub>- oder T<sub>MBP</sub>-Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen, zu den Astrozyten gegeben und ihre Ca<sup>2+</sup>-Signale in der Zellsuspension gemessen. Der Zeitpunkt Null wurde als der erste Kontakt zwischen der T-Zelle und einer Astrozyte definiert. Es wurde jeweils bestimmt, in welcher Minute die T-Zellen mit einem Ca<sup>2+</sup>-Signal beginnen, sobald sie einen Kontakt zu den Astrozyten ausgebildet haben. Die T-Zellen sind in der Darstellung in drei Gruppen eingeteilt: unbehandelte T<sub>OVA</sub>- und T<sub>MBP</sub>-Zellen, alle T<sub>MBP</sub>-Zellen (d.h. mit und ohne DMSO-Inkubation) sowie alle T<sub>OVA</sub>- und T<sub>MBP</sub>-Zellen. In die Abbildung wurden nur T-Zellen aufgenommen, die ein Ca<sup>2+</sup>-Signal über 200 nM gezeigt haben.

#### 4.1.2 Die Antagonisierung des NAADP-Signalweges im Zweizellsystem mit dem spezifischen NAADP-Inhibitor BZ194

Nach der Etablierung des Zweizellsystems sollte die Bedeutung des NAADP-Signalweges in diesem Modell näher untersucht werden. Dazu stand ein spezifischer Inhibitor zur Verfügung, das BZ194. Diese niedermolekulare Substanz wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Potter im Department of Pharmacy and Pharmacology der Universität von Bath synthetisiert. In Mikroinjektionsexperimenten von Dr. Dammermann (ehemals Institut für Biochemie und Molekularbiologie I) war bereits gezeigt worden, dass BZ194 effektiv das NAADP-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Signal in Jurkat T-Lymphozyten blockieren kann (Dammermann et al., 2009). Dabei wurde jedoch nicht das IP<sub>3</sub>- oder das cADPR-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Signal beeinflusst. Es wurden weitere Experimente in primären T-Zellen der Ratte, die auch in dem Zweizellsystem eingesetzt wurden, durchgeführt. Für die Stimulation wurden anti-CD3-Antikörper verwendet, die anschließend mit einem Zweitantikörper vernetzt wurden. Auch hier konnte eine konzentrationsabhängige Reduktion des Ca<sup>2+</sup>-Signals demonstriert werden, wobei das Ca<sup>2+</sup>-Plateau

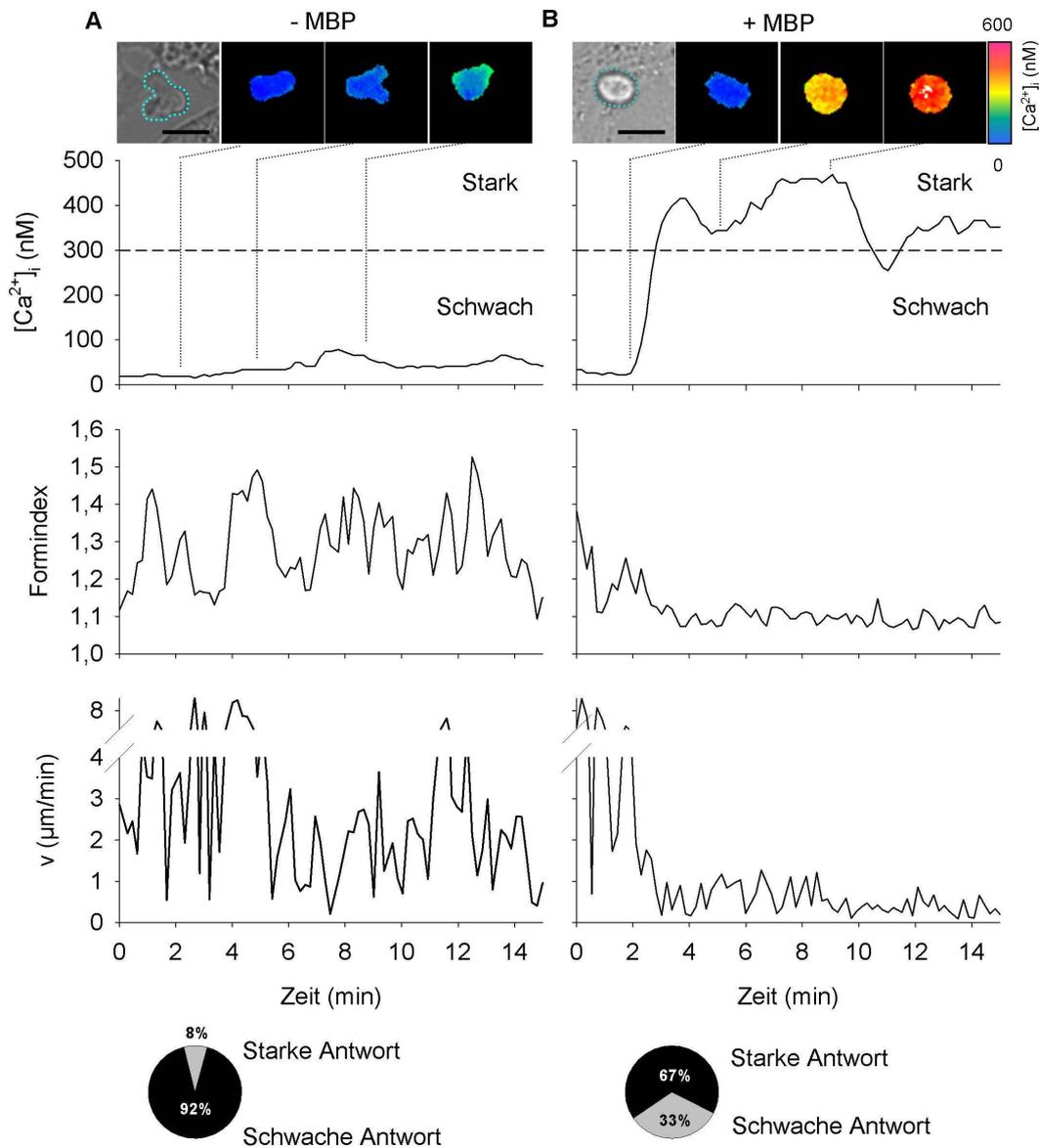
anfälliger gegenüber BZ194 war als der  $\text{Ca}^{2+}$ -Peak. In diesen Experimenten stellte sich auch heraus, dass BZ194 vermutlich lediglich eine moderate Membranpermeabilität aufweist und der größte Effekt nach einer 20-stündigen Inkubation mit dieser Substanz zu beobachten war. Für die Experimente im Zweizellsystem wurden die  $T_{\text{MBP}}$ -Zellen zwei Stunden in der Abwesenheit von Serum und weitere 16 Stunden in der Anwesenheit von Serum mit BZ194 inkubiert. Nach der sich anschließenden Beladung mit Fura-2 AM wurden die T-Zellen zu den Astrozyten gegeben, deren MHCII-Expression bereits induziert war und die mit dem Antigen MBP inkubiert worden waren. Am Fluoreszenzmikroskop wurden die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale der T-Zellen analysiert (Abbildung 4.10). In der Teilabbildung 4.10 A sind repräsentative Einzelzellen dargestellt. Wie in den vorangegangenen Experimenten zeigte die T-Zelle in der Anwesenheit von MBP ohne Inkubation mit BZ194 eine schnelle Signalentwicklung in den ersten fünf Minuten nach dem Beginn des Kontaktes zu der Astrozyte. Es war ebenfalls eine deutliche Abrundung der T-Zelle zu beobachten. Die T-Zelle ohne das spezifische Antigen wies erneut keinen nennenswerten Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf und zeigte keine Abrundung im Verlauf der Messung. Die ausgewählte T-Zelle nach der Inkubation mit BZ194 reagierte zwar noch mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal auf den Kontakt mit einer Antigen-präsentierenden Astrozyte. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort fiel jedoch wesentlich schwächer aus und die Abrundung der T-Zelle war auch deutlich geringer verglichen mit den Zellen ohne BZ194. Die Zusammenfassung der mittleren  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale ist in Teilabbildung 4.10 B dargestellt. Die Positivkontrolle mit MBP und die Negativkontrolle in der Abwesenheit des spezifischen Antigens verhielten sich wie erwartet. Mit MBP kam es zu einem deutlichen Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals bis auf 250 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  vier Minuten nach der Kontaktbildung zu den Astrozyten, der auch bis zum Ende der Messung anhielt. Ohne MBP waren erneut nur schwache  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale zu beobachten. Nach der Inkubation mit dem spezifischen NAADP-Inhibitor BZ194 entstand ein deutlich reduziertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal mit einem Anstieg auf nur noch 150 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in den ersten vier Minuten nach der Kontaktbildung zu den Astrozyten. Das Signal setzte schwach verzögert ein, war aber ebenfalls lang anhaltend. Es lässt sich festhalten, dass im Mittel mit BZ194 eine partielle Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in  $T_{\text{MBP}}$ -Zellen bei der Stimulation im Zweizellsystem erzielt werden kann. Im Folgenden wurden die Eigenschaften unterschiedlich starker  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten im Zweizellsystem näher charakterisiert und der Einfluss von BZ194 analysiert. Bei der Verfolgung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in den T-Zellen fiel auf, dass sich nicht nur die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach dem Kontakt zu Antigen-präsentierenden Astrozyten änderte, sondern damit einhergehend auch die Form und die Beweglichkeit der Zellen. T-Zellen mit einer starken  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort schienen sich anders zu verhalten als solche mit einer schwachen Antwort. Um dieses unterschiedliche Verhalten quantifizieren zu können, wurden neben dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal zwei weitere Eigenschaften der T-Zellen ausgewertet: die Veränderungen in der Form und die Motilität.



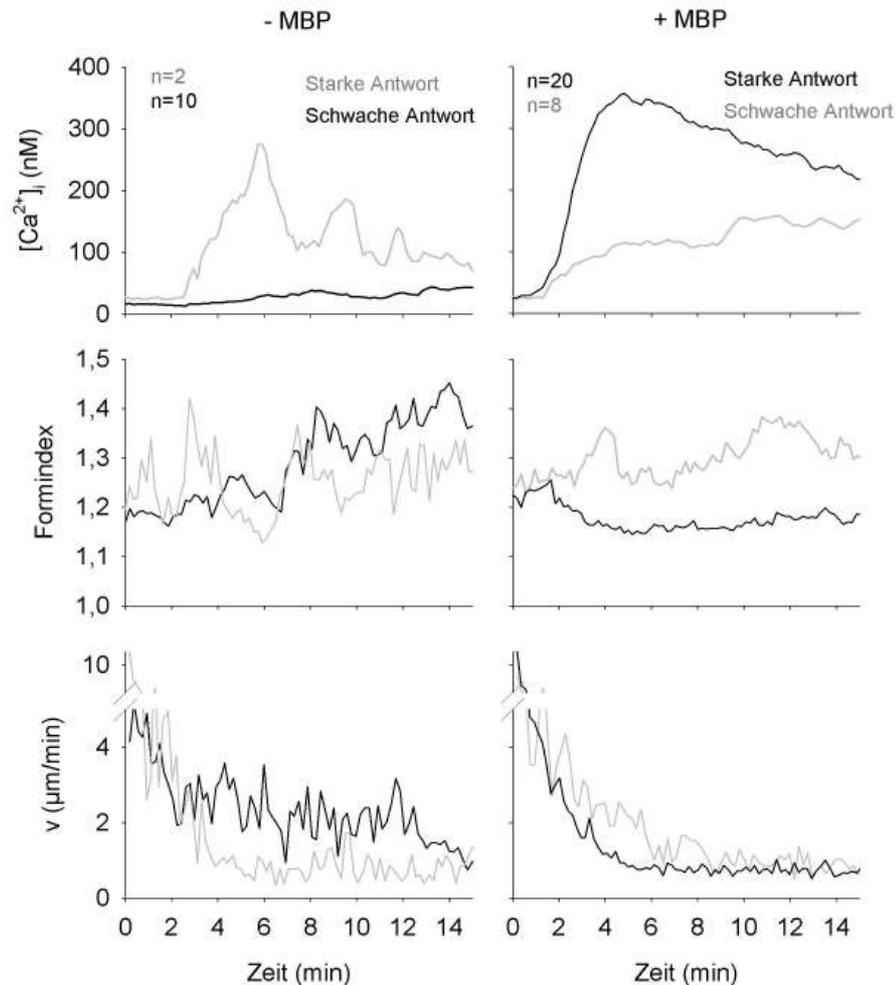
**Abbildung 4.10: Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals von  $T_{\text{MBP}}$ -Zellen durch den spezifischen NAADP-Antagonisten BZ194 in der Anwesenheit von MBP-inkubierten Astrozyten.** Astrozyten mit induzierter MHCII-Expression wurden zwei Stunden mit MBP inkubiert ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ).  $T_{\text{MBP}}$ -Zellen wurden mit BZ194 inkubiert ( $c = 2 \text{ mM}$  für zwei Stunden in der Abwesenheit von Serum, gefolgt von 16 Stunden in der Anwesenheit von Serum, MBP+BZ194) oder mit DMSO als Kontrolle behandelt (MBP). Als Negativkontrolle wurden die Astrozyten nicht mit MBP inkubiert (Kontrolle). Die T-Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen, zu den Astrozyten gegeben und ihre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in der Zellsuspension gemessen. Der Zeitpunkt Null wurde als der erste Kontakt zwischen der T-Zelle und einer Astrozyte definiert. A) Es sind Durchlichtbilder und farbkodierte Bilder repräsentativer Einzelzellen dargestellt. Die Astrozyten beziehungsweise T-Zellen sind durch grüne beziehungsweise weiße Linien in den Durchlichtbildern hervorgehoben. Maßstab =  $5 \mu\text{m}$ . B) Es sind die mittleren, globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale von 14 (Kontrolle), 30 (MBP) beziehungsweise 31 (MBP+BZ194) T-Zellen dargestellt.

Um ein Maß für die Formveränderungen einer T-Zelle zu erhalten, wurde der Formindex ver-

wendet. Dieser wurde bereits bei Donnadiou et al. (1994) beschrieben:  $\text{Formindex} = u^2/4\pi A$ . Dabei steht  $u$  für den Umfang und  $A$  für die Fläche der planaren Projektion der Zelle. Je weiter die planare Projektion der Zelle von einem Kreis abweicht, desto größer wird der Formindex. Nähert sich die planare Projektion der Zelle hingegen einer Kreisform an, geht der Formindex gegen eins. Für die Motilität wurde jeweils der Weg bestimmt, den eine T-Zelle zwischen zwei Fluoreszenzbildern zurückgelegt hatte und daraus ihre Geschwindigkeit berechnet. Zunächst wurden auf diese Art und Weise T-Zellen in der An- und der Abwesenheit des spezifischen Antigens MBP analysiert. Dabei ließen sich die T-Zellen in zwei Gruppen mit einer unterschiedlich starken  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort einteilen, für die in Abbildung 4.11 je ein Beispiel dargestellt ist. In der Abwesenheit von MBP zeigten die T-Zellen eine schwache  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort (Teilabbildung 4.11 A); das bedeutete, dass von 92% der T-Zellen in den ersten 15 Minuten nach der Kontaktbildung zu einer Astrozyte die cytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nicht über 300 nM anstieg. Diese T-Zellen wiesen einen gleichmäßig erhöhten Formindex auf und eine im Verlauf der Messung kaum abnehmende Motilität. Im Gegensatz dazu zeigten die T-Zellen in der Anwesenheit von MBP eine starke  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort (Teilabbildung 4.11 B), bei der 67% der T-Zellen ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal über 300 nM in den ersten 15 Minuten nach der Kontaktaufbildung aufwiesen. Die bereits in den farbkodierten Fluoreszenzbildern beobachtete Abrundung solcher T-Zellen spiegelte sich auch in dem Formindex wider. Zeitgleich mit dem Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sank der Formindex der Beispielszelle auf einen Wert von etwa 1,1 ab. Parallel dazu nahm auch die Motilität der T-Zelle ab, so dass diese sich zum Ende der Messung mit weniger als  $1 \mu\text{m}/\text{min}$  bewegte. Bei der Analyse aller gemessenen T-Zellen bestätigten sich die bei den einzelnen Zellen beobachteten Muster (Abbildung 4.12). Bei T-Zellen mit einer schwachen  $\text{Ca}^{2+}$ -Reaktion ließen sich während der gesamten Messung starke Formveränderungen beobachten. Zwar nahm die Motilität im Mittel etwas ab, blieb aber deutlich erhöht gegenüber T-Zellen mit einer starken  $\text{Ca}^{2+}$ -Reaktion. Bei Letzteren kam es während der Messung zu einer Immobilisierung, bei der die T-Zellen an der Astrozyte haften blieben. Des Weiteren war ein deutliches Absinken des Formindexes zu beobachten, womit die Abrundung der T-Zellen verdeutlicht wird. Beide Muster traten sowohl in der An- als auch in der Abwesenheit von MBP auf, unterschieden sich aber in ihrer Häufigkeit. Es lässt sich zusammenfassen, dass ohne das spezifische Antigen überwiegend schwache  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten in den T-Zellen entstehen, die mit einem hohen Formindex und einer starken Motilität einhergehen. Mit MBP kommt es vermehrt zu starken  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten mit einer Abnahme des Formindexes und einer Immobilisierung der T-Zellen.

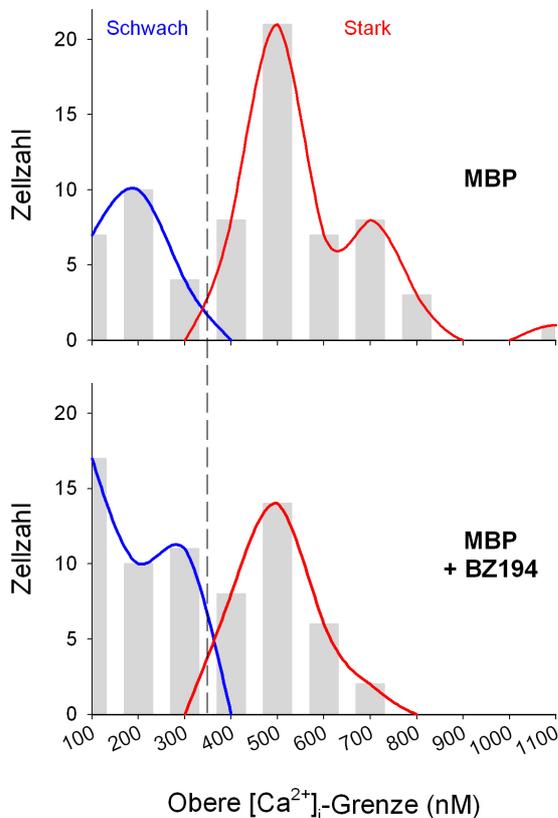


**Abbildung 4.11: Ca<sup>2+</sup>-Signale, Formveränderung und Beweglichkeit von MBP-aktivierten T-Zellen.** Astrozyten mit induzierter MHCII-Expression wurden zwei Stunden mit MBP inkubiert (10 µg/ml). T<sub>MBP</sub>-Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen, zu den Astrozyten gegeben und ihre Ca<sup>2+</sup>-Signale in der Zellsuspension gemessen (Abbildung B). Als Kontrolle wurden die Astrozyten nicht mit dem Antigen inkubiert (Abbildung A). Obere Abbildung: Es sind Durchlichtbilder und farbkodierte Bilder repräsentativer Einzelzellen dargestellt. Die T-Zellen sind durch grüne Linien in den Durchlichtbildern hervorgehoben. Maßstab = 10 µm. Mittlere Abbildung: Die Kurven zeigen das Ca<sup>2+</sup>-Signal, Formveränderungen (definiert durch den Formindex) sowie die Motilität der entsprechenden T-Zellen in den ersten 15 Minuten nach der Kontaktbildung zu der Astrozyte. Untere Abbildung: Anteil an T-Zellen, die ein Ca<sup>2+</sup>-Signal über (starke Antwort) oder unter (schwache Antwort) 300 nM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in den ersten zehn Minuten nach der Kontaktbildung zu einer Astrozyte aufweisen.



**Abbildung 4.12: Form- und Motilitätsmuster von MBP-aktivierten T-Zellen mit starker oder schwacher  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort.** Es sind die mittlere  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , der Formindex und die Motilität von  $T_{\text{MBP}}$ -Zellen nach dem Kontakt zu MBP-inkubierten (rechts) Astrozyten dargestellt. Die Kontrolle von T-Zellen mit Astrozyten ohne das spezifische Antigen ist links abgebildet. Schwarze Linien beziehen sich auf die Mehrheit der T-Zellen bei der jeweiligen Kondition (+/-MBP), graue Linien auf die Minderheit.

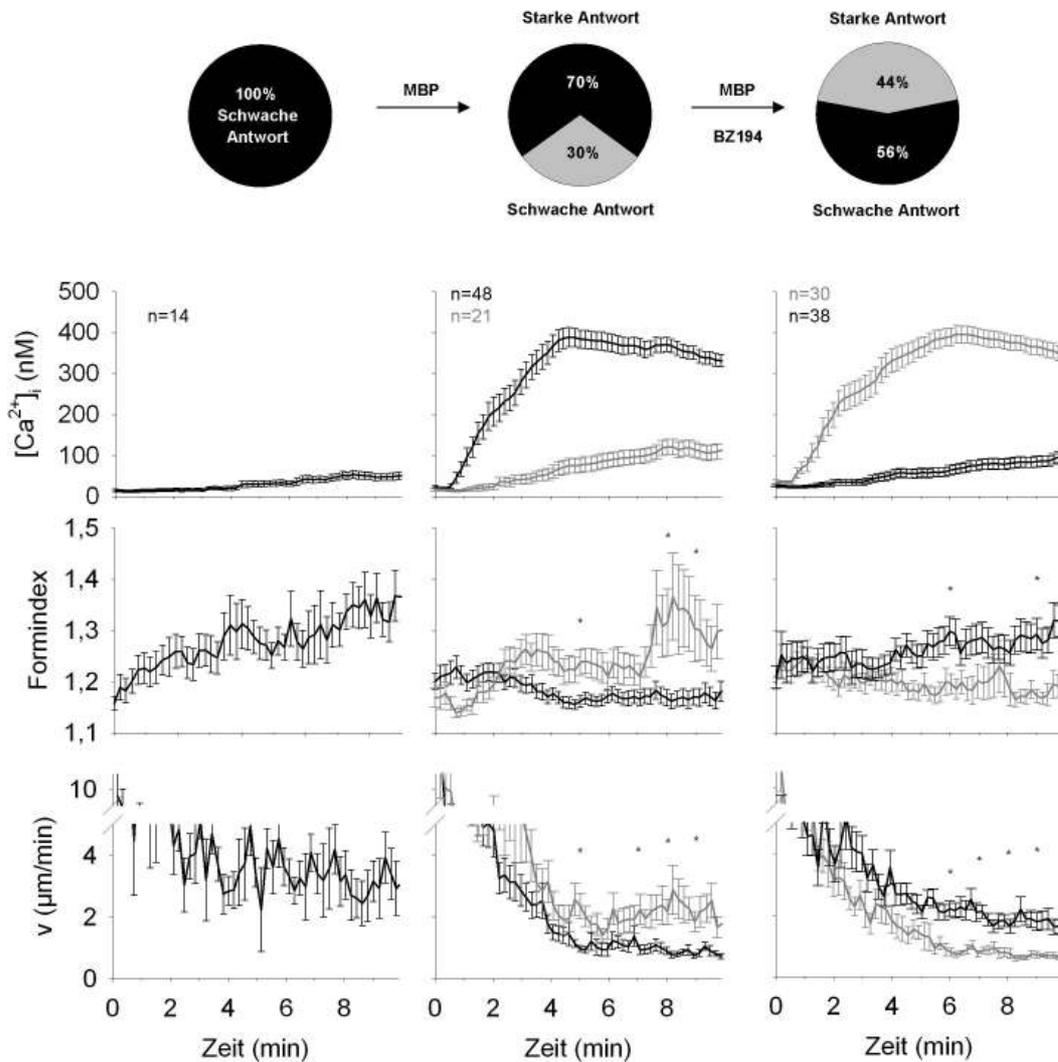
Mit dem spezifischen NAADP-Inhibitor BZ194 kam es zu einer deutlichen Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in  $T_{\text{MBP}}$ -Zellen. Es stellte sich nun die Frage, wie die Höhe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in BZ194-inkubierten T-Zellen verteilt ist und wie sich eine Inkubation mit BZ194 auf den Formindex und die Motilität der T-Zellen auswirkt. Zunächst wurde das maximale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal der T-Zellen bestimmt. Anschließend wurden die T-Zellen in Gruppen mit einem Abstand



**Abbildung 4.13: Beeinflussung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalhöhe durch den spezifischen NAADP-Inhibitor BZ194.** Die im Zweizellsystem vermessenen T-Zellen wurden hinsichtlich ihres maximalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals analysiert und in einem Abstand von  $100 \text{ nM } [\text{Ca}^{2+}]_i$  in Gruppen eingeteilt. In der Abbildung ist die Verteilung der T-Zellen über einen Konzentrationsbereich von null bis  $1100 \text{ nM } [\text{Ca}^{2+}]_i$  für MBP (oben) und MBP +  $2 \text{ mM BZ194}$  (unten) als Balkendiagramm (grau) dargestellt, wobei jeweils die obere Grenze des Konzentrationsbereiches auf der x-Achse markiert ist. Die blaue beziehungsweise rote Linie gibt die Verteilung der T-Zellen für eine schwache beziehungsweise eine starke  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort wieder. Die Grenze für eine starke oder eine schwache  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort wurde bei  $300 \text{ nM } [\text{Ca}^{2+}]_i$  gezogen (gestrichelte schwarze Linie).

von  $100 \text{ nM } [\text{Ca}^{2+}]_i$  eingeteilt und ihre Verteilung als Kurvendiagramm aufgetragen (Abbildung 4.13).

Wie bereits beschrieben ließen sich in der Anwesenheit von MBP deutlich zwei Gruppen mit  $300 \text{ nM } [\text{Ca}^{2+}]_i$  als Grenze voneinander unterscheiden. Über  $300 \text{ nM } [\text{Ca}^{2+}]_i$  reagierten die meisten T-Zellen mit einem Signal zwischen  $400$  und  $500 \text{ nM } [\text{Ca}^{2+}]_i$ . Diese Verteilung änderte sich, sobald die T-Zellen mit BZ194 inkubiert wurden. Zum einen reduzierte sich die Anzahl an T-Zellen mit einer starken  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort, wobei ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal über  $500 \text{ nM}$  kaum noch auftrat. Im Gegenzug stieg der Anteil an T-Zellen mit einer schwachen  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort, besonders in dem Konzentrationsbereich von null bis  $100 \text{ nM } [\text{Ca}^{2+}]_i$ . Eine Einteilung der T-Zellen in Zellen mit einer schwachen oder einer starken  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort ergab, dass sich der Anteil an T-Zellen mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal über  $300 \text{ nM}$  von  $70\%$  auf  $44\%$  nach einer Inkubation mit BZ194 reduzierte (Abbildung 4.14). Auch der Formindex und die Motilität wurden nach dieser Gruppenbildung ausgewertet. Es zeigte sich, dass eine Inkubation mit BZ194 nicht das Verhalten in diesen Gruppen veränderte. T-Zellen mit einer starken  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort hatten nach wie vor einen niedrigen Formindex und eine geringe Motilität, T-Zellen mit einer schwachen  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort hingegen einen größeren Formindex und eine erhöhte Motilität.



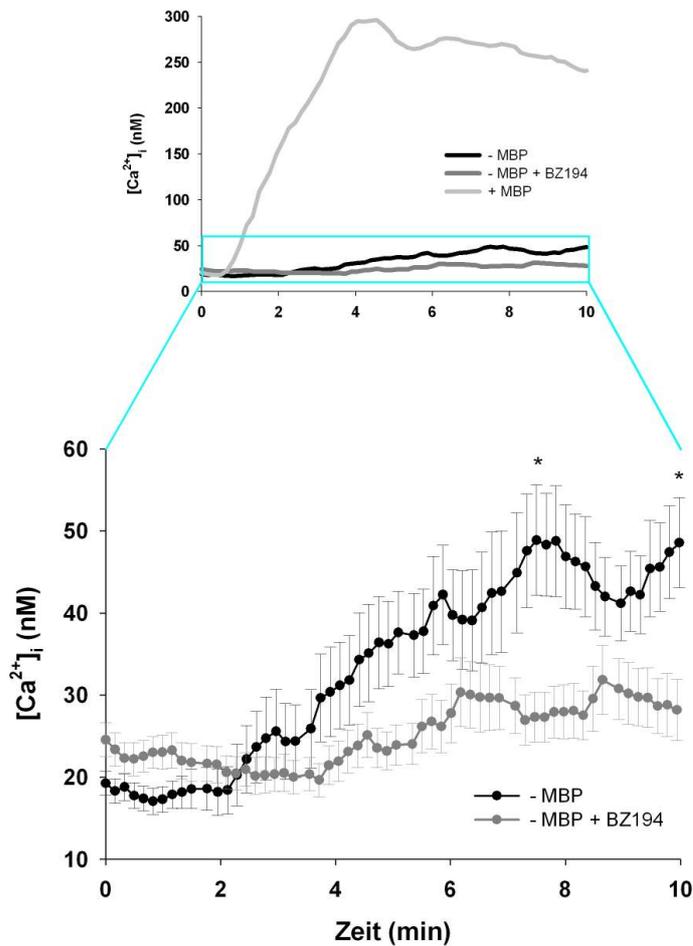
**Abbildung 4.14: Inhibition des Ca<sup>2+</sup>-Signals von T<sub>MBP</sub>-Zellen durch den spezifischen NAADP-Antagonisten BZ194 ohne Beeinflussung der Zellform und der Motilität.** Astrozyten mit induzierter MHCII-Expression wurden zwei Stunden mit MBP inkubiert (10 µg/ml). T<sub>MBP</sub>-Zellen wurden mit BZ194 inkubiert (c=2 mM für zwei Stunden in der Abwesenheit von Serum, gefolgt von 16 Stunden in der Anwesenheit von Serum, rechts) oder mit DMSO als Kontrolle behandelt (Mitte). Als Negativkontrolle wurden die Astrozyten nicht mit MBP inkubiert (links). Die T-Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen, zu den Astrozyten gegeben und ihre Ca<sup>2+</sup>-Signale in der Zellsuspension gemessen. Obere Abbildung: Anteil an T-Zellen, die ein Ca<sup>2+</sup>-Signal über (starke Antwort) oder unter (schwache Antwort) 300 nM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in den ersten zehn Minuten nach der Kontaktbildung zu einer Astrozyte aufweisen. Unten: Mittlere Verläufe (+/-SE) der T-Zellen für das Ca<sup>2+</sup>-Signal, Formveränderungen (definiert durch den Formindex) und die Motilität in den ersten zehn Minuten nach der Kontaktbildung zu einer Astrozyte. Die jeweilige Mehrheit der T-Zellen ist in schwarz, die Minderheit in grau dargestellt. Einzelne Zeitpunkte wurden auf Signifikanz überprüft. \* P<0,0083 (Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestung).

Die Unterscheidung beider Gruppen hinsichtlich des Formindexes und der Motilität war am Ende der Messung signifikant. Es lässt sich festhalten, dass BZ194 den Anteil an T-Zellen mit einem hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal reduziert, woraus im Mittel eine erhöhte Beweglichkeit der Gesamtheit der T-Zellen resultiert. Der Zusammenhang zwischen dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal, der Form und der Motilität auf Einzelzellebene wird durch BZ194 jedoch nicht beeinflusst.

Bisher wurde die Wirkung von BZ194 in T-Zellen untersucht, die Kontakt zu ihrem spezifischen Antigen MBP hatten. Es wurden jedoch auch schwache  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in  $T_{\text{MBP}}$ -Zellen in der Abwesenheit des Antigens beobachtet. Bereits 1998 wurde beschrieben, dass dendritische Zellen in der Abwesenheit des spezifischen Antigens  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in T-Zellen induzieren können (Delon et al., 1998). Um eine mögliche Beteiligung von NAADP bei der Entstehung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen in der Abwesenheit des spezifischen Antigens in  $T_{\text{MBP}}$ -Zellen zu untersuchen, wurden  $T_{\text{MBP}}$ -Zellen mit BZ194 inkubiert und zu Astrozyten gegeben, die zwar MHCII auf ihrer Oberfläche exprimierten, aber kein MBP-Peptid präsentierten. Während der Kontaktbildung zu den Astrozyten wurden die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in den T-Zellen analysiert (Abbildung 4.15). Im oberen Teil der Abbildung ist die Positivkontrolle mit MBP und ohne Inkubation mit BZ194 mit aufgetragen. Diese zeigte eine deutliche Signalentwicklung in den ersten vier Minuten nach der Kontaktausbildung zu den Astrozyten mit einem lang anhaltenden Anstieg auf knapp 300 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Zur besseren Übersicht sind die  $\text{Ca}^{2+}$ -Verläufe ohne Antigen in dem unteren Teil der Abbildung vergrößert dargestellt. Unbehandelte T-Zellen zeigten einen schwachen Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 20 nM auf etwa 45 nM. Im Gegensatz dazu stieg die cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in BZ194-behandelten T-Zellen um maximal 10 nM an. Die Werte der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration für unbehandelte und BZ194-inkubierte T-Zellen unterschieden sich am Ende der Messung signifikant. Folglich blockiert der spezifische NAADP-Inhibitor BZ194 die Entstehung von Antigen-unabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen in  $T_{\text{MBP}}$ -Zellen.

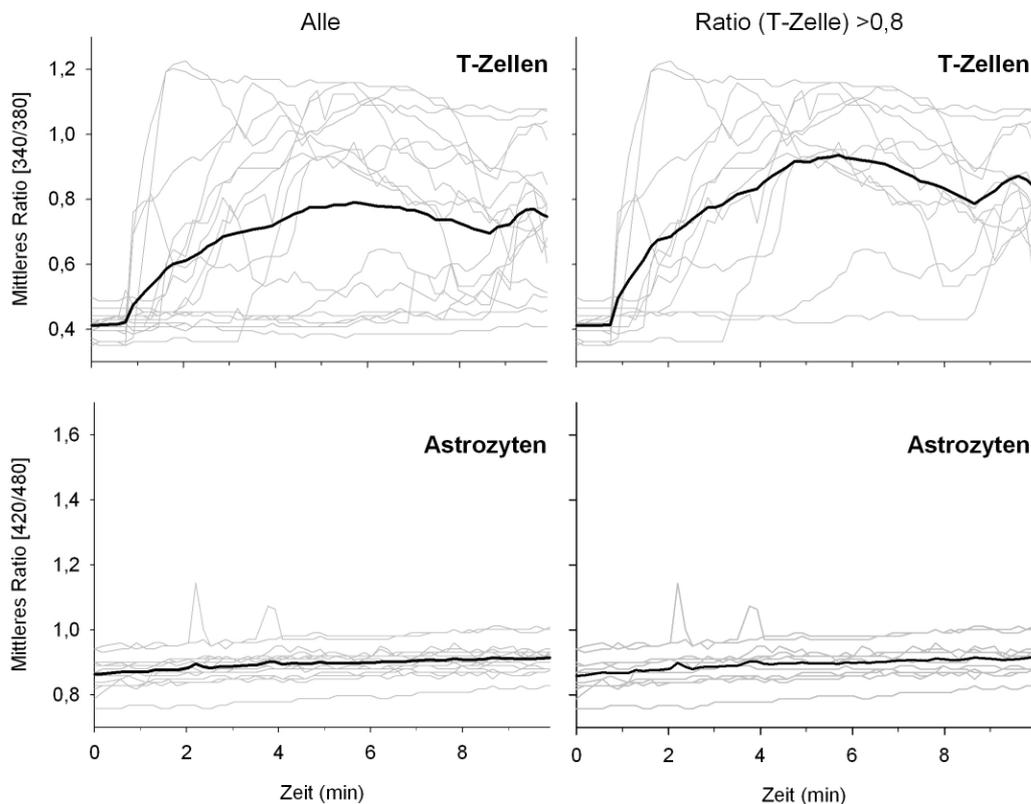
#### 4.1.3 Parallele Analyse der $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in $T_{\text{MBP}}$ -Zellen und Astrozyten im Zweizellensystem

Bisher wurden die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale von  $T_{\text{MBP}}$ -Zellen im Zweizellensystem analysiert. Es stellte sich nun die Frage, ob in Astrozyten als Antigen-präsentierende Zellen durch den Kontakt zu T-Zellen ebenfalls ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal ausgelöst werden kann. Von der Arbeitsgruppe von Prof. Trautmann (Paris, Frankreich) waren bereits  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beschrieben worden, die in dendritischen Zellen durch Zell-Zell-Interaktionen mit T-Zellen entstanden (Montes et al., 1999). Es handelte sich dabei um globale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale, die jedoch nur in 31 % der dendritischen Zellen, die einen Kontakt zu einer T-Zelle ausbildeten, auftraten. Es wurde vermutet, dass solche  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale einer verstärkten Chemokinsekretion der dendritischen Zellen und somit einem Anlocken weiterer T-Zellen dienen könnten. Für die gleichzeitige Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in T-Zellen und in Astrozyten wurde neben Fura-2 AM als weiterer  $\text{Ca}^{2+}$ -



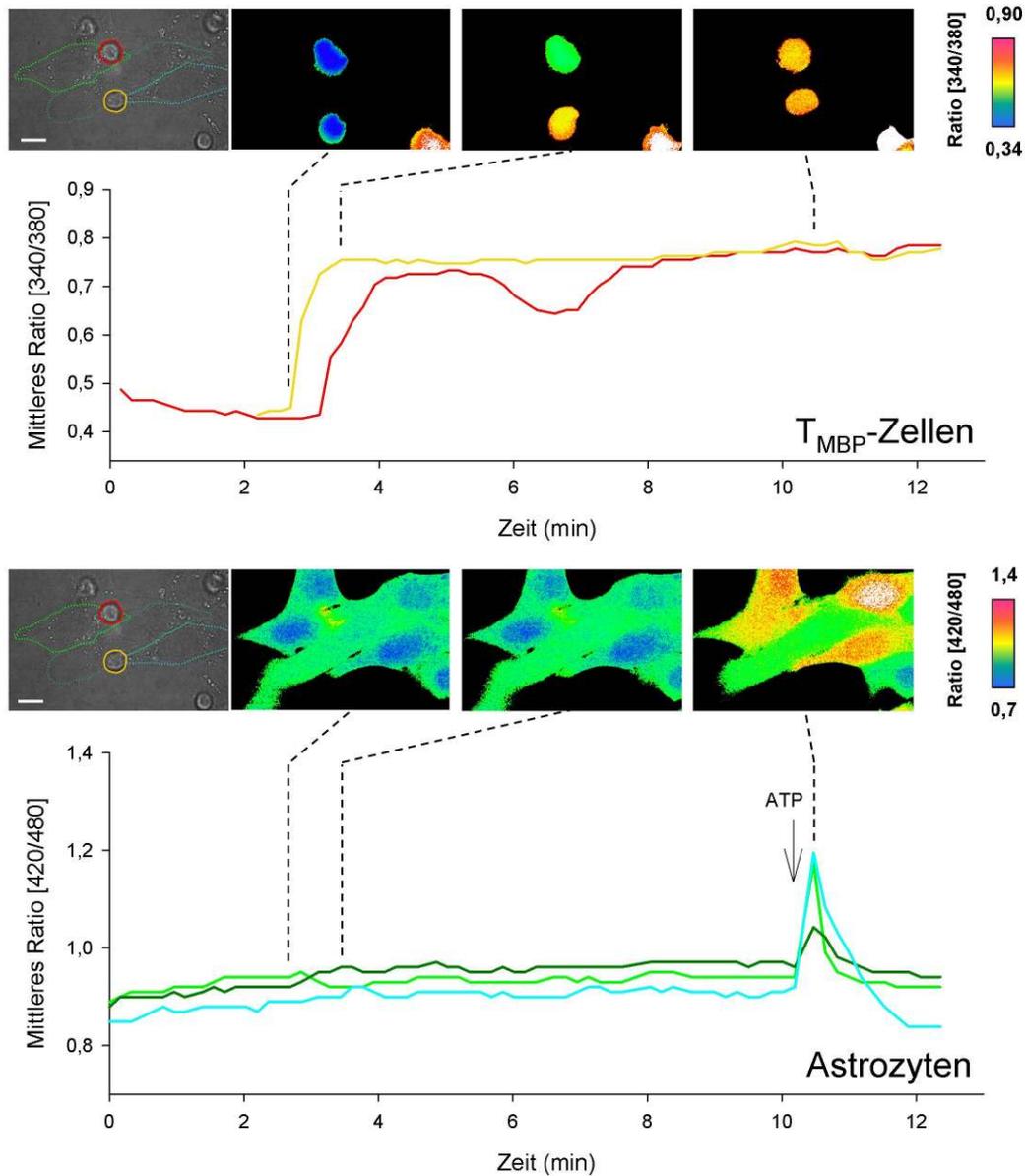
**Abbildung 4.15: Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals von  $T_{\text{MBP}}$ -Zellen durch den spezifischen NAADP-Antagonisten BZ194 in der Abwesenheit von MBP.** Astrozyten mit induzierter MHCII-Expression wurden mit Ausnahme der Positivkontrolle unbehandelt belassen, d.h. sie wurden nicht mit dem spezifischen Antigen inkubiert. Als Positivkontrolle erfolgte eine zweistündige Inkubation mit MBP ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ , +MBP).  $T_{\text{MBP}}$ -Zellen wurden mit BZ194 inkubiert ( $c=2 \text{ mM}$  für zwei Stunden in der Abwesenheit von Serum, gefolgt von 16 Stunden in der Anwesenheit von Serum, -MBP+BZ194) oder mit DMSO als Kontrolle behandelt (-MBP). Die T-Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen, zu den Astrozyten gegeben und ihre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in der Zellsuspension gemessen. Obere Abbildung: Es sind die mittleren, globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale von 36 (-MBP und -MBP+BZ194) beziehungsweise 35 (+MBP) T-Zellen dargestellt. Untere Abbildung: Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der blau markierte Bereich der oberen Abbildung vergrößert dargestellt (+/-SE). Einzelne Zeitpunkte wurden auf Signifikanz überprüft. \*  $P < 0,0071$  (Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestung).

sensitiver Fluoreszenzfarbstoff Fura Red AM eingesetzt. Da die T-Zellen sowohl von oben als auch von der Seite Kontakte zu den Astrozyten ausbilden können, hätte die Verwendung desselben Farbstoffes eine Unterscheidung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale unmöglich gemacht. Fura Red AM ist wie Fura-2 AM ein ratiometrischer Farbstoff, der bei 420 nm in der Calcium-gebundenen und bei 480 nm in der Calcium-freien Form angeregt wird. Durch die Auswahl der entsprechenden Filter wurde gewährleistet, dass es zu möglichst wenig Interferenzen zwischen dem Fluoreszenzsignal von Fura-2 AM und dem von Fura Red AM kam. In Vorversuchen wurde zunächst untersucht, ob das Messen eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in T-Zellen mit Fura-2 AM und in Astrozyten mit Fura Red AM mit dem ausgewählten Filtersystem möglich sei (siehe Material und Methoden, Abbildung 3.3). Außerdem wurde analysiert, in welchem Ausmaß sich die Fluoreszenzen beider Farbstoffe während der Messung beeinflussen. Zunächst ließ sich feststellen, dass für beide Farbstoffe mit hohen Belichtungszeiten gearbeitet werden musste. Dies ist vermutlich auf die Emissionsfilter zurückzuführen, die eine schmale Bandbreite aufwiesen, so dass nur ein Teil des Fluoreszenzlichtes durchgelassen wurde. Als Positivkontrolle wurden T-Zellen mit Antikörpern gegen CD3 und Astrozyten mit ATP stimuliert. Für beide Zelltypen konnten die Signale nach der Ratiobildung gut aufgelöst werden und ein Signal, das mit Fura-2 AM beobachtet wurde, schien nicht das Ratio von Fura Red AM zu beeinflussen noch umgekehrt. Es fiel jedoch auf, dass die Hintergrundfluoreszenz bei einer Anregung von 420 nm durch die mit Fura-2 AM beladenen T-Zellen erhöht wurde. Falls sich die T-Zelle auf einer Astrozyte befand, führte dies lokal zu einer Erhöhung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten bei 420 nm zu 480 nm. Irrtümlicherweise hätte man so auf ein lokales  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal geschlossen. Da jedoch die globale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Astrozyten aufgrund des beträchtlichen Größenunterschiedes zu den T-Zellen davon nicht beeinflusst wurde, wurde dieser Faktor zunächst vernachlässigt. Nach den erfolgreichen Vorversuchen sollten nun parallele Messungen der T-Zellen und der Astrozyten im Zweizellsystem am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt werden. Nach der Induktion der MHCII-Expression auf den Astrozyten und der Inkubation mit dem spezifischen Antigen, wurden die Astrozyten mit Fura Red AM beladen. Die  $\text{T}_{\text{MBP}}$ -Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen und zu den Astrozyten gegeben. Bei 40-facher Vergrößerung wurden von beiden Zelltypen parallel die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale analysiert (Abbildung 4.16). Im linken Teil der Abbildung sind alle Zellen dargestellt, die einen Kontakt von mindestens zehn Minuten zueinander aufwiesen. In den T-Zellen war im Mittel ein deutliches  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal zu erkennen, das von einem basalen Ratiowert von 0,4 auf knapp 0,8 in den ersten fünf Minuten nach Kontaktbeginn anstieg. Im Gegensatz dazu war in den Astrozyten keine Veränderung der basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu beobachten. 71 % der T-Zellen wiesen ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal mit einem Ratiowert über 0,8 auf. Diese wurden in der rechten Abbildung noch einmal gesondert mit den entsprechenden Astrozyten aufgetragen. Doch auch in Astrozyten, die einen Kontakt zu T-Zellen mit einer starken  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort ausbildeten, war kein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal zu erkennen.



**Abbildung 4.16: Analyse des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals MBP-inkubierter Astrozyten in der Gegenwart von  $\text{T}_{\text{MBP}}$ -Zellen.** Astrozyten mit induzierter MHCII-Expression wurden zwei Stunden mit MBP inkubiert ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) und anschließend mit FuraRed AM beladen. Die T-Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen, zu den Astrozyten gegeben und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beider Zelltypen parallel in der Zellsuspension gemessen. Es ist das mittlere Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei einer Anregung von 340 nm zu 380 nm (T-Zellen) beziehungsweise 420 nm zu 480 nm (Astrozyten) dargestellt. Die Verläufe der Einzelzellen sind in grau, die des Mittelwertes in schwarz abgebildet. Es wurden nur T-Zellen und Astrozyten in die Auswertung aufgenommen, die einen Kontakt zueinander ausbilden. Der Zeitpunkt Null definiert den Kontaktbeginn. Links sind die  $\text{Ca}^{2+}$ -Verläufe für alle T-Zellen ( $n = 17$ ) und Astrozyten ( $n = 15$ ) dargestellt und rechts diejenigen, bei denen die T-Zellen ein mittleres Ratio von mindestens 0,8 aufweisen (T-Zellen:  $n = 12$ ; Astrozyten:  $n = 11$ ).

Um eine bessere räumliche Auflösung zu erzielen, wurden die gleichen Messungen anschließend bei 100-facher Vergrößerung durchgeführt. In acht voneinander unabhängigen Experimenten konnten jedoch erneut keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in den Astrozyten beobachtet werden. Die Abbildung 4.17 zeigt eine der Messungen als Beispiel. Zwei T-Zellen bildeten dabei Kontakte zu drei Astrozyten aus. In der oberen Hälfte der Abbildung sind die Verläufe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals für die T-Zellen dargestellt. Die gelb markierte T-Zelle kam später in das Zellfeld und bildete etwa zwei Minuten später als die rot markierte T-Zelle einen Kontakt zu den Astrozyten aus. Sie begann jedoch wesentlich früher mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal. Beide T-Zellen zeigten einen deutlichen Anstieg in der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von einem basalen Ratiowert von etwa 0,45 auf einen Ratiowert von etwa 0,75.



**Abbildung 4.17: Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal von MBP-inkubierten Astrozyten in Kontakt mit  $T_{\text{MBP}}$ -Zellen bei 100-facher Vergrößerung.** Astrozyten mit induzierter MHCII-Expression wurden zwei Stunden mit MBP inkubiert ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) und anschließend mit FuraRed AM beladen. Die T-Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen, zu den Astrozyten gegeben und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beider Zelltypen parallel in der Zellsuspension gemessen. In der Bilderreihe sind Durchlichtbilder und farb-kodierte Bilder der Zellen dargestellt. Die Zellen sind durch farbige Linien in den Durchlichtbildern hervorgehoben, die ihrer Farbe im Diagramm entsprechen. Maßstab =  $10 \mu\text{m}$ . Es ist das mittlere Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei einer Anregung von 340 nm zu 380 nm (T-Zellen) beziehungsweise 420 nm zu 480 nm (Astrozyten) dargestellt. Als Positivkontrolle wurden die Astrozyten am Ende der Messung mit ATP ( $100 \mu\text{M}$ ) stimuliert.

In der unteren Hälfte der Abbildung sind die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale der Astrozyten dargestellt. Alle drei Zellen zeigten keine Veränderung in ihrer globalen, basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, weder

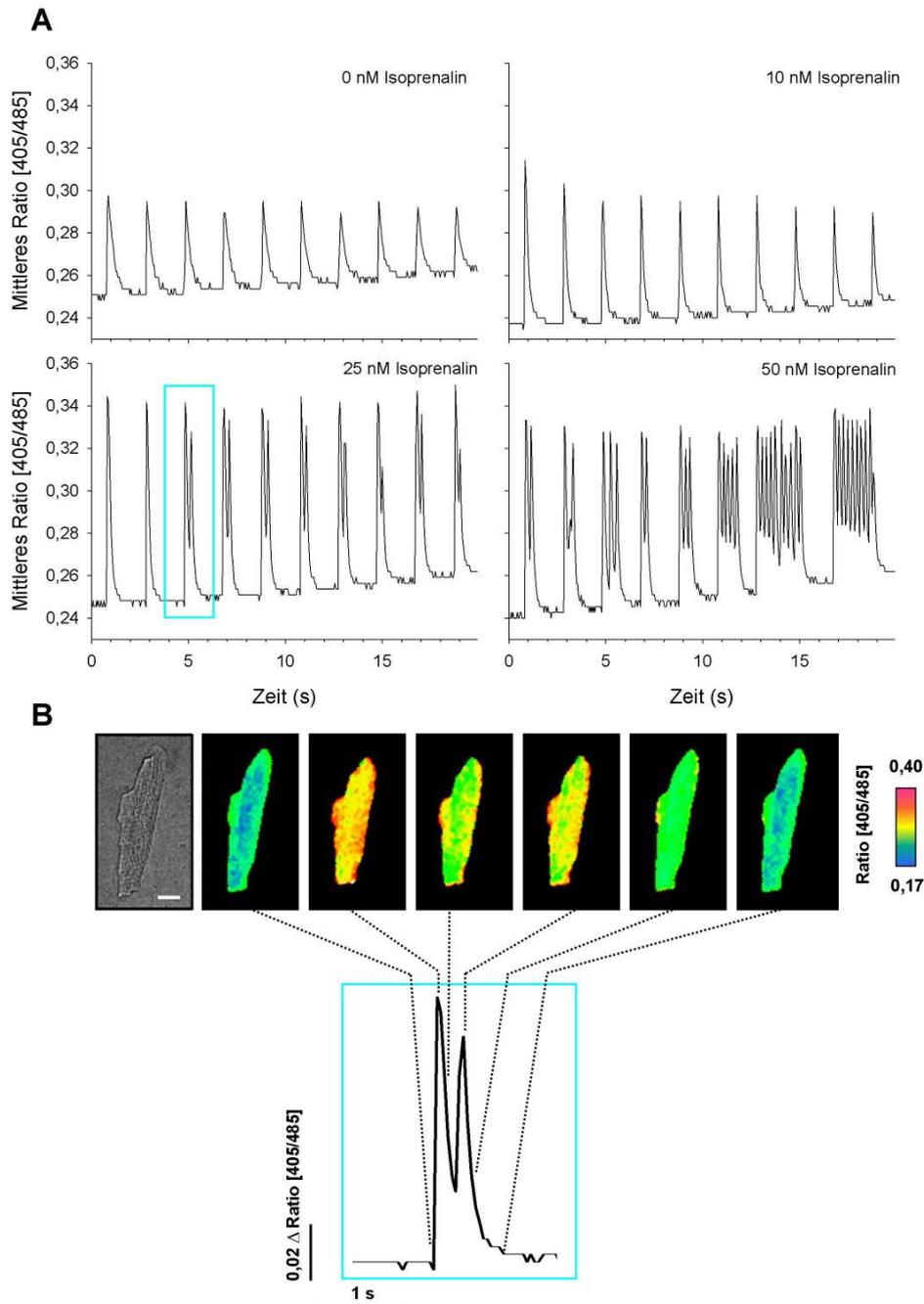
bei der Kontaktbildung mit den T-Zellen noch während der Signalentwicklung in den T-Zellen. Am Ende der Messung wurden die Astrozyten als Positivkontrolle mit  $100 \mu\text{M}$  ATP stimuliert, womit die Reaktivität der Zellen bestätigt wurde. Es lässt sich festhalten, dass in dem Zweizellsystem eine gleichzeitige Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale von T-Zellen und Astrozyten mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fura-2 AM und Fura Red AM möglich ist. Jedoch konnte kein Anstieg der globalen, cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Astrozyten nach dem Kontakt mit  $\text{T}_{\text{MBP}}$ -Zellen nachgewiesen werden.

## 4.2 Die Bedeutung von NAADP für die $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in Cardiomyozyten der Maus.

Der zweite Teil der Dissertation beschäftigte sich mit der Rolle von NAADP bei der Entstehung zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Cardiomyozyten der Maus. Dafür wurden Cardiomyozyten jeweils frisch präpariert und ihr  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal bei konstanter Stimulation unter verschiedenen Bedingungen am Fluoreszenzmikroskop gemessen.

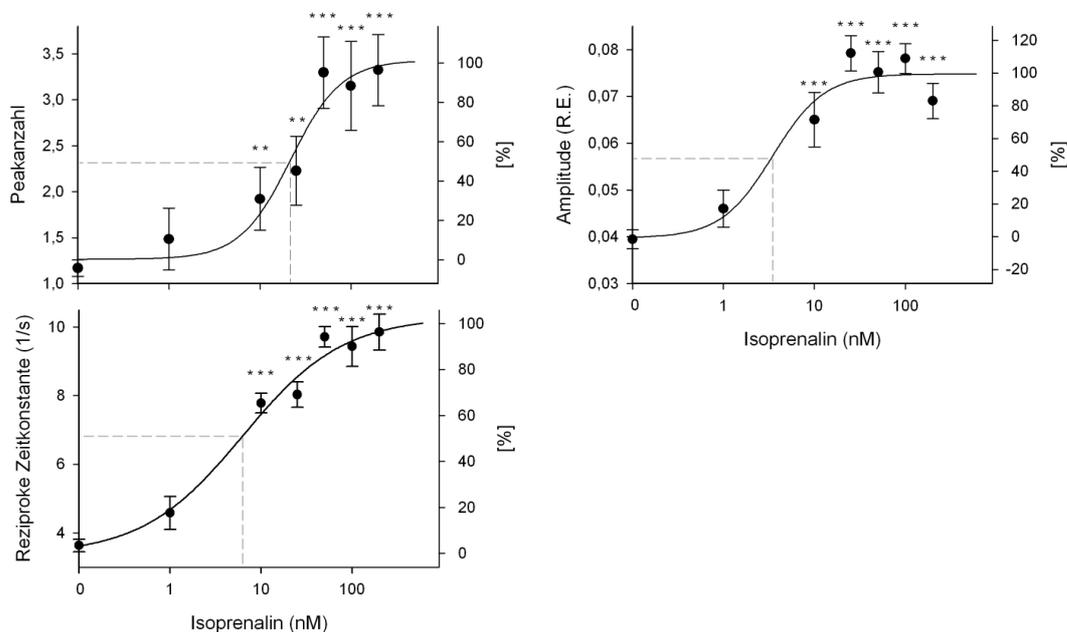
### 4.2.1 Der Einfluss von Isoprenalin auf das $\text{Ca}^{2+}$ -Signal von feldstimulierten Cardiomyozyten

Isoprenalin ist ein synthetisches Derivat des Noradrenalins und wird eingesetzt, um eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation in Herzzellen zu erreichen. Durch die Aktivierung von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren kommt es zur Bildung von cAMP und der Aktivierung der PKA, die wiederum zahlreiche Zielproteine phosphoryliert. Diese Zielproteine spielen eine wesentliche Rolle für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung und durch ihre Phosphorylierung kommt es zu dem positiv inotropen und lusitropen Effekt des Isoprenalins. Das bedeutet, dass die Kontraktionskraft der Herzzellen erhöht und ihre Relaxation beschleunigt ist. Zunächst wurde in murinen Cardiomyozyten bei konstanter Feldstimulation die Wirkung von Isoprenalin überprüft (Abbildung 4.18). Dazu wurden die Cardiomyozyten mit Indo-1 AM beladen und ihr  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal am Fluoreszenzmikroskop verfolgt. In der Teilabbildung 4.18 A sind die Kinetiken von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  für repräsentative Einzelzellen für verschiedene Konzentrationen von Isoprenalin dargestellt. Durch die Gabe von  $10 \text{ nM}$  Isoprenalin konnte die Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals im Vergleich zur Kontrolle deutlich gesteigert werden. Zudem war die Abnahme des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals und damit die Relaxation beschleunigt. Bei einer weiteren Erhöhung der Isoprenalinkonzentration auf  $25 \text{ nM}$  wurden nicht nur eine verstärkte Kontraktion und beschleunigte Relaxation, sondern auch zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten beobachtet, die zwischen den einzelnen Stimulationen auftraten. Die Anzahl dieser zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten nahm mit der Erhöhung der Isoprenalinkonzentration auf  $50 \text{ nM}$  weiter zu. In Teilabbildung 4.18 B ist eine Stimulation der Beispielizele aus Abbildung A für  $25 \text{ nM}$  Isoprenalin vergrößert dargestellt.



**Abbildung 4.18: Einfluss von Isoprenalin auf das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal von feldstimulierten Cardiomyozyten.** Die Cardiomyozyten wurden auf Laminin ausgesät, mit Indo-1 AM beladen und jeweils fünf Minuten vor dem Beginn der Messung mit den angegebenen Konzentrationen an Isoprenalin bei RT inkubiert. Während der Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in der Zellsuspension wurden die Cardiomyozyten mit  $0,5 \text{ s}^{-1}$  stimuliert. A) Es sind repräsentative Einzelzellen für die jeweilige Kondition angegeben. Als Maß für die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist das mittlere Verhältnis der Fluoreszenzintensität bei einer Emissionswellenlänge von 405 nm zu der Fluoreszenzintensität bei 485 nm dargestellt. B) Der blau markierte Bereich aus der Abbildung A wurde vergrößert dargestellt. Es sind ein Durchlichtbild der Zelle und farbkodierte Bilder zu verschiedenen Zeitpunkten (mit gestrichelter Linie markiert) dargestellt. Maßstab =  $20 \mu\text{m}$ .

Die hinzugefügten farbkodierten Bilder verdeutlichen die Entwicklung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in der Zelle sowie ihre Kontraktion. Nach der Beobachtung von zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in den Cardiomyozyten bei der Stimulation mit Isoprenalin wurden weitere Konzentrationen im Bereich von 1 bis 200 nM getestet. Für die Auswertung wurde nicht nur die Anzahl der zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten pro Stimulation, sondern auch die Amplitude des ersten  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks (angegeben in Ratioeinheiten (R.E.)) sowie die Abnahme des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals bestimmt. Die Abnahme des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals wird durch die reziproke Zeitkonstante wiedergegeben. Für jede Auswertung wurden Konzentrationswirkungskurven erstellt, die in Abbildung 4.19 dargestellt sind.



**Abbildung 4.19: Peakanzahl, Amplitude und Zeitkonstante in Abhängigkeit von der Isoprenalinkonzentration.** Für die angegebenen Isoprenalinkonzentrationen wurden die Peakanzahl pro Stimulation, die Amplitude des Peaks und die Abnahme des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals, wiedergegeben durch die reziproke Zeitkonstante, bestimmt. Die Kurvenanpassung erfolgte mittels eines 4-Parameter Hill-Plots (Mittelwert +SE). Die gestrichelte Linie markiert jeweils den  $\text{EC}_{50}$ . \*\*  $P < 0,005$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

Zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten traten ab einer Konzentration von 10 nM Isoprenalin signifikant gegenüber der Kontrolle auf. Ab einer Konzentration von 50 nM Isoprenalin war der Effekt bei einer mittleren Peakanzahl zwischen drei und dreieinhalb Peaks pro Stimulation gesättigt. Die Amplitude konnte mit Isoprenalin um über 100 % gesteigert werden. Die reziproke Zeitkonstante nahm mit Isoprenalin von  $3,4 \text{ s}^{-1}$  auf  $10,1 \text{ s}^{-1}$  zu. Es fiel auf, dass sich der  $\text{EC}_{50}$ -Wert für die Peakanzahl deutlich von den Werten für die Amplitude und die reziproke Zeitkonstante unterschied. Der  $\text{EC}_{50}$  für die Peakanzahl lag bei 22 nM Isoprenalin. Eine mittlere Peakanzahl von 1,9 pro Stimulation entsprach dabei 24 % des maximalen Effektes von Isoprenalin. Ein Anstieg der Amplitude sowie der reziproken Zeitkonstante war bereits bei einer nied-

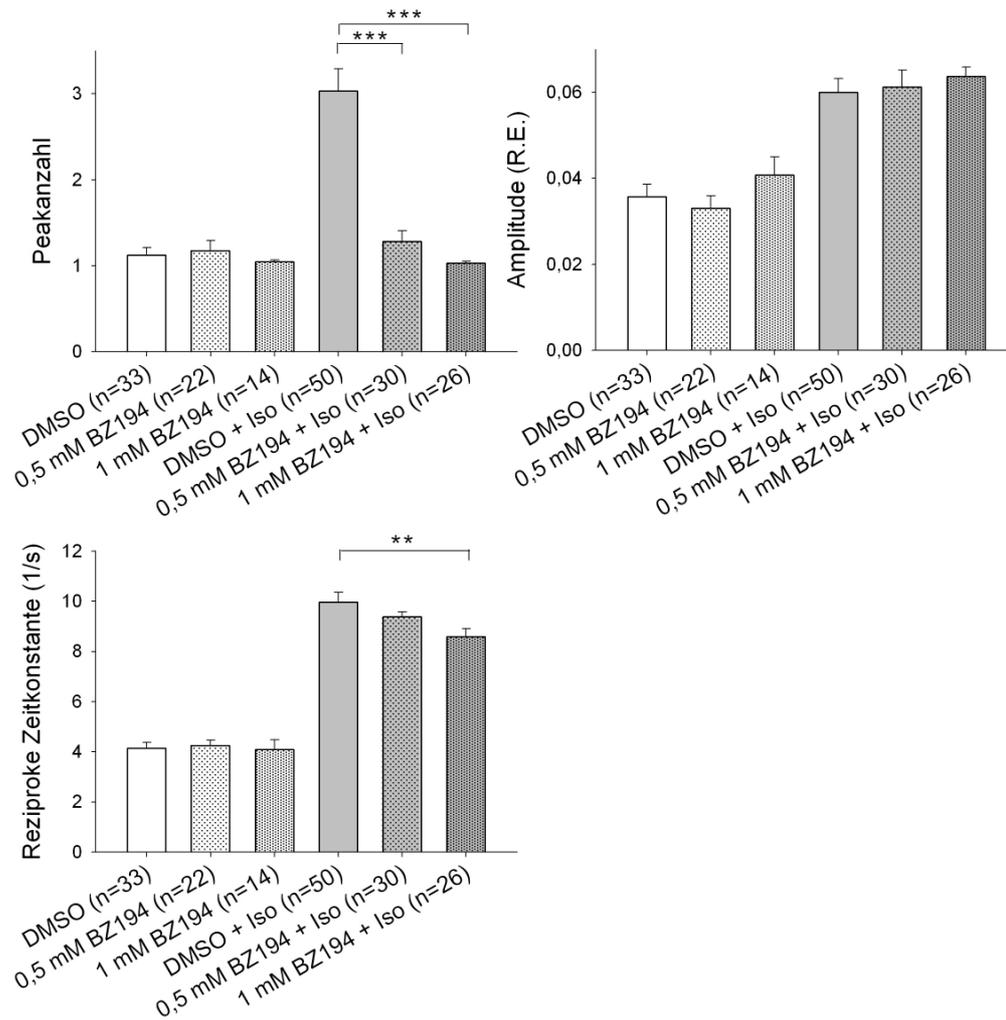
rigeren Isoprenalinkonzentration zu beobachten mit einem  $EC_{50}$  von 4 nM beziehungsweise 6 nM. So erreichte die Amplitude bei 10 nM Isoprenalin bereits 83 % des Maximalwertes und die reziproke Zeitkonstante 60 %. Es lässt sich festhalten, dass Isoprenalin nicht nur einen lusitropen und inotropen Effekt auf die murinen Cardiomyozyten ausübt, sondern bei höheren Konzentrationen auch in der Lage ist, zusätzliche  $Ca^{2+}$ -Transienten hervorzurufen.

#### 4.2.2 Der Einfluss des spezifischen NAADP-Inhibitors BZ194 auf die Anzahl zusätzlicher $Ca^{2+}$ -Transienten in Cardiomyozyten

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der  $Ca^{2+}$ -freisetzende sekundäre Botenstoff NAADP eine Rolle bei der Erzeugung zusätzlicher  $Ca^{2+}$ -Transienten nach der Stimulation mit Isoprenalin spielt. Dazu stand der spezifische NAADP-Inhibitor BZ194 zur Verfügung, der bereits erfolgreich in T-Zellen getestet worden war (Dammermann et al. (2009) und Teil 4.1.2 der vorliegenden Arbeit). Die Cardiomyozyten wurden mit zwei verschiedenen Konzentrationen an BZ194, 0,5 und 1 mM, für eine Stunde inkubiert und ihre  $Ca^{2+}$ -Signale bei konstanter Feldstimulation analysiert. Da BZ194 in DMSO gelöst wurde, wurden 0,25 % (v/v) DMSO als Kontrolle eingesetzt. Die Ergebnisse für die Peakanzahl, die Amplitude und die reziproke Zeitkonstante sind in Abbildung 4.20 dargestellt. Mit 0,5 mM BZ194 konnte eine deutliche Reduktion der zusätzlichen  $Ca^{2+}$ -Transienten in der Anwesenheit von Isoprenalin erzielt werden, die signifikant zur Isoprenalinkontrolle ohne BZ194 war. Dieser Effekt wurde durch die doppelte Konzentration an BZ194 noch gesteigert, so dass mit 1 mM BZ194 nur noch ein  $Ca^{2+}$ -Peak pro Stimulation wie unter Kontrollbedingungen ohne Isoprenalin auftrat. Beide Konzentrationen an BZ194 hatten keinen Effekt auf die  $Ca^{2+}$ -Amplitude. Allerdings kam es zu einer signifikanten Reduktion der reziproken Zeitkonstante mit 1 mM BZ194 in der Anwesenheit von Isoprenalin von  $10 s^{-1}$  auf  $8,5 s^{-1}$ .

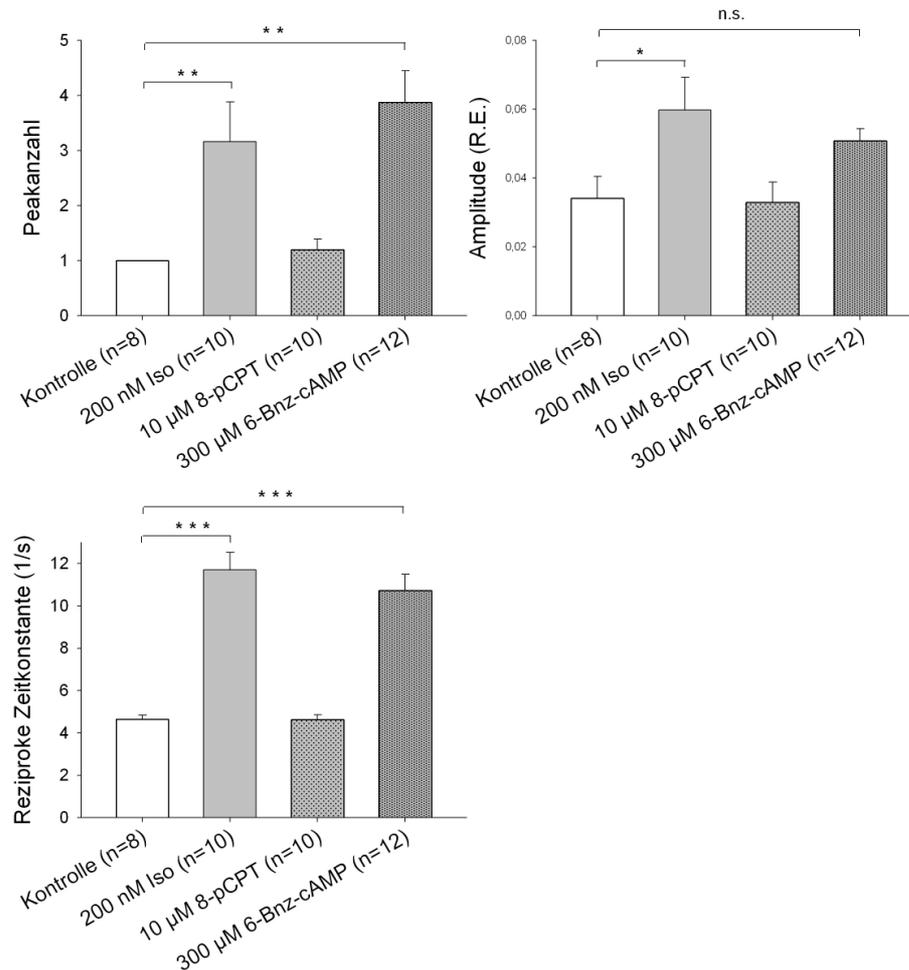
#### 4.2.3 Die Induktion zusätzlicher $Ca^{2+}$ -Transienten in Cardiomyozyten durch cAMP-Analoga

Zwar konnten mit dem NAADP-Antagonisten BZ194 zusätzliche  $Ca^{2+}$ -Transienten in Cardiomyozyten nach Stimulation mit Isoprenalin verhindert werden. Jedoch war zu diesem Zeitpunkt unklar, auf welchem Wege die zusätzlichen  $Ca^{2+}$ -Transienten entstehen und an welchem Punkt in dem Signalweg BZ194 eingreift. Es ist beschrieben, dass nach der  $\beta$ -adrenergen Stimulation durch die Bildung von cAMP die PKA und das *exchange protein activated by cAMP* (Epac) aktiviert werden. Der Aktivierung von Epac nachfolgend wird ein Signalweg postuliert, der über die Phospholipase C- $\epsilon$  die CaMKII aktiviert (Oestreich et al., 2007, 2009). Die CaMKII phosphoryliert überwiegend dieselben Zielproteine wie die PKA, jedoch an unterschiedlichen Aminosäureresten. Um die Aktivierung dieser beiden Signalwege unterscheiden zu können, wurden Analoga von cAMP eingesetzt, die bevorzugt die PKA oder Epac aktivieren.



**Abbildung 4.20: Reduktion der Anzahl zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Cardiomyozyten durch den spezifischen NAADP-Inhibitor BZ194.** Die Cardiomyozyten wurden auf Laminin ausgesät, mit Indo-1 AM beladen und mit der angegebenen Konzentration BZ194 für eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  und  $2\% \text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle wurden  $0,25\% \text{ (v/v)}$  DMSO eingesetzt. Gegebenenfalls wurden die Zellen vor Beginn der Messung mit  $200 \text{ nM}$  Isoprenalin bei RT inkubiert. Während der Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in der Zellsuspension wurden die Cardiomyozyten mit  $0,5 \text{ s}^{-1}$  stimuliert. Es ist jeweils der Mittelwert der Peakanzahl, der Amplitude und der reziproken Zeitkonstante  $\pm \text{SE}$  angegeben. \*\*  $P < 0,005$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

Für die Aktivierung der PKA wurde 6-Benzoyl-cAMP (6-Bnz-cAMP) und für die Aktivierung von Epac 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-pCPT) eingesetzt. 8-pCPT weist eine deutlich höhere Membranpermeabilität als das 6-Bnz-cAMP auf, so dass es in geringeren Konzentrationen und mit kürzerer Inkubationszeit verwendet wurde. Diese richteten sich nach bisherigen Veröffentlichungen (Oestreich et al., 2007, 2009). Es stellte sich heraus, dass nur das PKA-selektive cAMP-Analogen 6-Bnz-cAMP in der Lage war, zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in den Cardiomyozyten bei konstanter Feldstimulation hervorzurufen (Abbildung 4.21).



**Abbildung 4.21: Induktion von zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Cardiomyozyten durch cAMP-Analoga.** Die Cardiomyozyten wurden auf Laminin ausgesät und mit Indo-1 AM beladen. Für die Aktivierung von Epac wurden die Zellen fünf Minuten vor dem Beginn der Messung mit  $10 \mu\text{M}$  des cAMP-Analogons 8-pCPT inkubiert und für die Aktivierung von PKA 20 Minuten mit  $300 \mu\text{M}$  des cAMP-Analogons 6-Bnz-cAMP. Als Positivkontrolle wurden die Zellen fünf Minuten vor dem Beginn der Messung mit  $200 \text{ nM}$  Isoprenalin inkubiert. Alle Inkubationen erfolgten bei RT. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Während der Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in der Zellsuspension wurden die Cardiomyozyten mit  $0,5 \text{ s}^{-1}$  stimuliert. Es ist jeweils der Mittelwert der Peakanzahl, der Amplitude und der reziproken Zeitkonstante +SE angegeben. n.s.  $P > 0,05$ ; \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,005$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

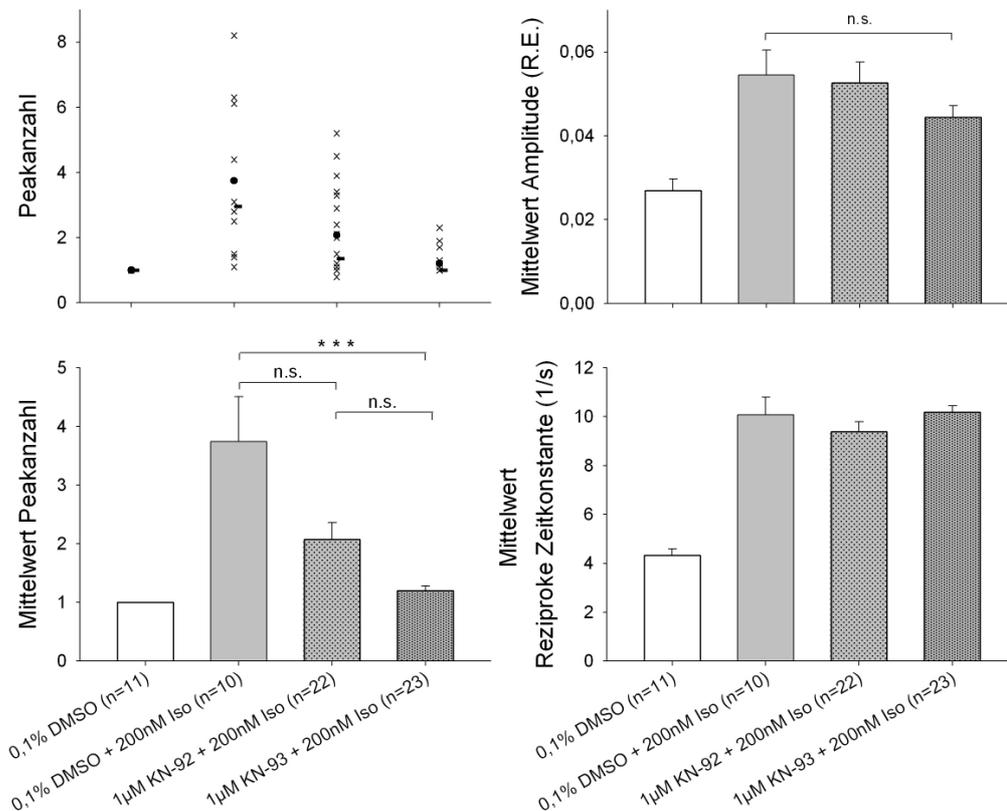
Der Mittelwert für die Peakanzahl lag zwischen drei und vier Peaks pro Stimulation. Er war damit vergleichbar zur Kontrolle mit  $200 \text{ nM}$  Isoprenalin mit etwa drei Peaks pro Stimulation und signifikant erhöht gegenüber der Negativkontrolle ohne Stimulation. Das Epac-selektive cAMP-Analoga 8-pCPT zeigte hingegen keinen Effekt auf die Anzahl der  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks pro Elektrostimulation. Der Effekt von 6-Bnz-cAMP auf die Amplitude und die reziproke Zeitkonstante war ebenfalls vergleichbar mit der Wirkung von  $200 \text{ nM}$  Isoprenalin. Beide induzierten

einen deutlichen Anstieg in der Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks um 76 % für Isoprenalin und 50 % für 6-Bnz-cAMP. Die Relaxation war deutlich beschleunigt gegenüber der Negativkontrolle, mit einem signifikanten Anstieg der reziproken Zeitkonstante von  $4,6 \text{ s}^{-1}$  für die Kontrolle auf  $11,7 \text{ s}^{-1}$  für Isoprenalin und  $10,7 \text{ s}^{-1}$  für 6-Bnz-cAMP. Auch hier zeigte 8-pCPT keine Wirkung und war vergleichbar mit der Negativkontrolle. Zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten konnten in murinen Cardiomyozyten demnach allein durch eine selektive Aktivierung des PKA-Signalweges induziert werden.

#### 4.2.4 Die Rolle der CaMKII für die Entstehung von zusätzlichen $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Cardiomyozyten

Die Aktivierung der CaMKII durch das Epac wird zwar kontrovers diskutiert, jedoch kann die CaMKII nach einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation auch PKA-abhängig aktiviert werden (Ferrero et al., 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass die CaMKII die Entwicklung von Arrhythmien bei Herzversagen begünstigen kann (Sag et al., 2009). Daher sollte untersucht werden, ob die CaMKII eine Rolle für die Entstehung zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in dem hier verwendeten System spielt. Zur Inhibition der Aktivität der CaMKII wurde der Inhibitor KN-93 eingesetzt. Als Kontrolle für KN-93 wurde das inaktive Analogon KN-92 verwendet. Die Cardiomyozyten wurden bei konstanter elektrischer Stimulation zusätzlich mit Isoprenalin stimuliert und ihre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale analysiert. In der Abbildung 4.22 sind die Mittelwerte für die Peakanzahl, die Amplitude und die reziproke Zeitkonstante dargestellt. In der Gegenwart von 200 nM Isoprenalin stieg der Mittelwert der Peakanzahl wie zuvor auf über drei Peaks pro Stimulation an. Im linken, oberen Teil der Abbildung kann beobachtet werden, dass die Einzelwerte für die Peakanzahl von einem bis zu über acht Peaks pro Stimulation breit gestreut waren. Durch die Inhibition der CaMKII mit dem Inhibitor KN-93 konnte die Entstehung zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten fast vollständig blockiert werden. Nur noch vier von 23 Zellen zeigten im Mittel mehr als 1,5 Peaks pro Stimulation. Allerdings wurde auch mit dem inaktiven Analogon KN-92 eine beträchtliche Reduktion zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten auf im Mittel zwei Peaks pro Stimulation erreicht. Auf die Amplitude und die reziproke Zeitkonstante hatten weder KN-93 noch KN-92 einen Einfluss.

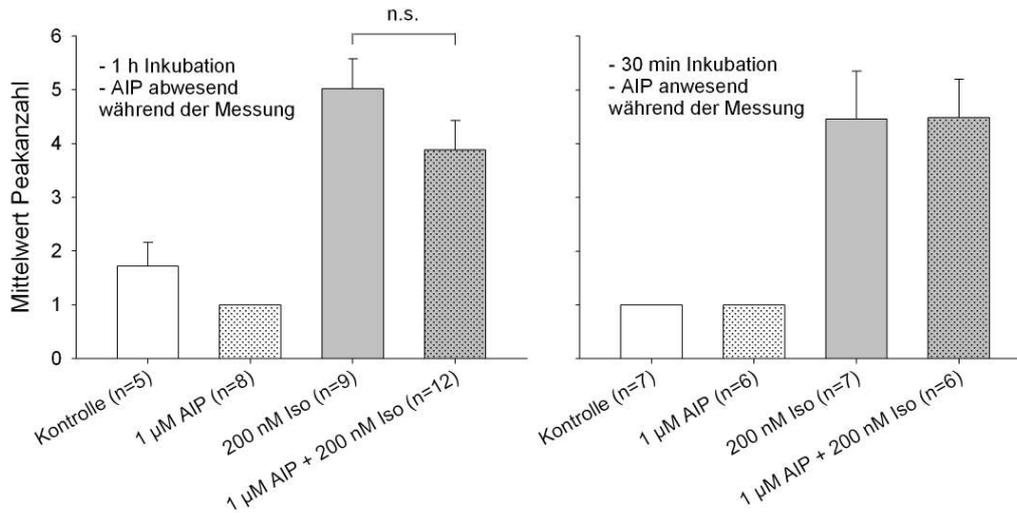
Um eine spezifischere Inhibition der CaMKII zu erreichen, wurde das *Autocamtide 2-related inhibitory peptide* (AIP) eingesetzt. Das AIP wurde in einer membrangängigen Version verwendet und mit zwei verschiedenen Inkubationszeiten getestet. Zunächst wurde nach einer Veröffentlichung eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur verwendet (Curran et al., 2007). Das AIP war während der direkt anschließend durchgeführten Messung abwesend. Um mögliche Auswascheffekte gering zu halten, wurden die Zellen maximal für eine halbe Stunde vermessen. Die Ergebnisse für die Peakanzahl sind im linken Teil der Abbildung 4.23 dargestellt.



**Abbildung 4.22: Inhibition von zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Cardiomyozyten durch den CaMKII-Inhibitor KN-93.** Die Cardiomyozyten wurden auf Laminin ausgesät und mit Indo-1 AM beladen. Für die Inhibition der CaMKII erfolgte eine 20-minütige Inkubation bei RT mit  $1\ \mu\text{M}$  KN-93. Als Kontrolle wurde  $1\ \mu\text{M}$  KN-92 eingesetzt, beziehungsweise 0,1% (v/v) DMSO als Negativkontrolle. Für eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation wurden die Zellen fünf Minuten vor dem Beginn der Messung mit 200 nM Isoprenalin bei RT inkubiert. Während der Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in der Zellsuspension wurden die Cardiomyozyten mit  $0,5\ \text{s}^{-1}$  stimuliert. Es ist jeweils der Mittelwert der Peakanzahl, der Amplitude und der reziproken Zeitkonstante +SE angegeben. Die linke, obere Abbildung gibt zusätzlich die Einzelwerte der Zellen (Kreuz), die Mittelwerte (Punkt) und die Mediane (waagerechter Strich) für die Peakanzahl wieder. n.s.  $P > 0,0083$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

Bei einer Stimulation mit 200 nM Isoprenalin ließ sich mit dem AIP nur eine leichte Reduktion der Anzahl zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten erzielen, die jedoch nicht signifikant war. Da die Qualität der Zellen durch die lange Inkubationszeit beeinträchtigt wurde und das AIP eine hohe Membranpermeabilität aufweisen sollte, wurde die Inkubationszeit anschließend auf 30 Minuten reduziert. Außerdem war das AIP während der Messung anwesend. Auch in diesem Experiment konnte durch die Inkubation mit dem AIP kein Effekt auf die Entstehung zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in der Anwesenheit von Isoprenalin nachgewiesen werden (rechtes Diagramm in Abbildung 4.23). Die spezifische Inhibition der CaMKII durch das AIP reicht demzufolge nicht aus, die Induktion zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten nach  $\beta$ -adrenerger

Stimulation zu unterdrücken.



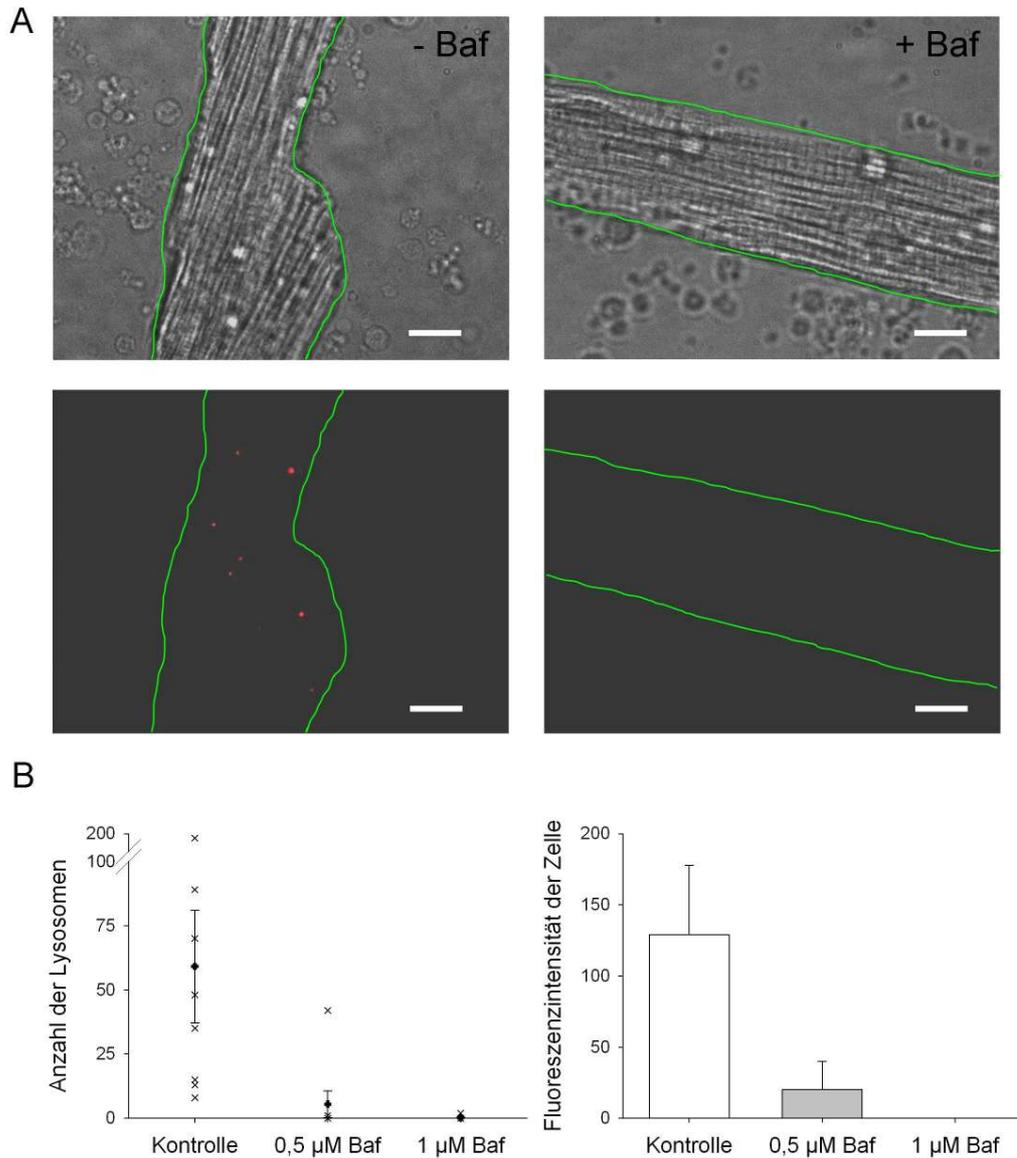
**Abbildung 4.23: Einfluss der CaMKII auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten von Cardiomyozyten.** Die Cardiomyozyten wurden auf Laminin ausgesät und mit Indo-1 AM beladen. Für die Inhibition der CaMKII wurden die Zellen mit  $1 \mu\text{M}$  des Peptids AIP wie angegeben bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen eingesetzt. Für eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation wurden die Zellen fünf Minuten vor dem Beginn der Messung mit  $200 \text{ nM}$  Isoprenalin bei RT inkubiert. Während der Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in der Zellsuspension wurden die Cardiomyozyten mit  $0,5 \text{ s}^{-1}$  stimuliert. Es ist jeweils der Mittelwert der Peakanzahl +SE angegeben. n.s.  $P > 0,05$ .

#### 4.2.5 Der Effekt von Bafilomycin A1 auf zusätzliche $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in murinen Cardiomyozyten

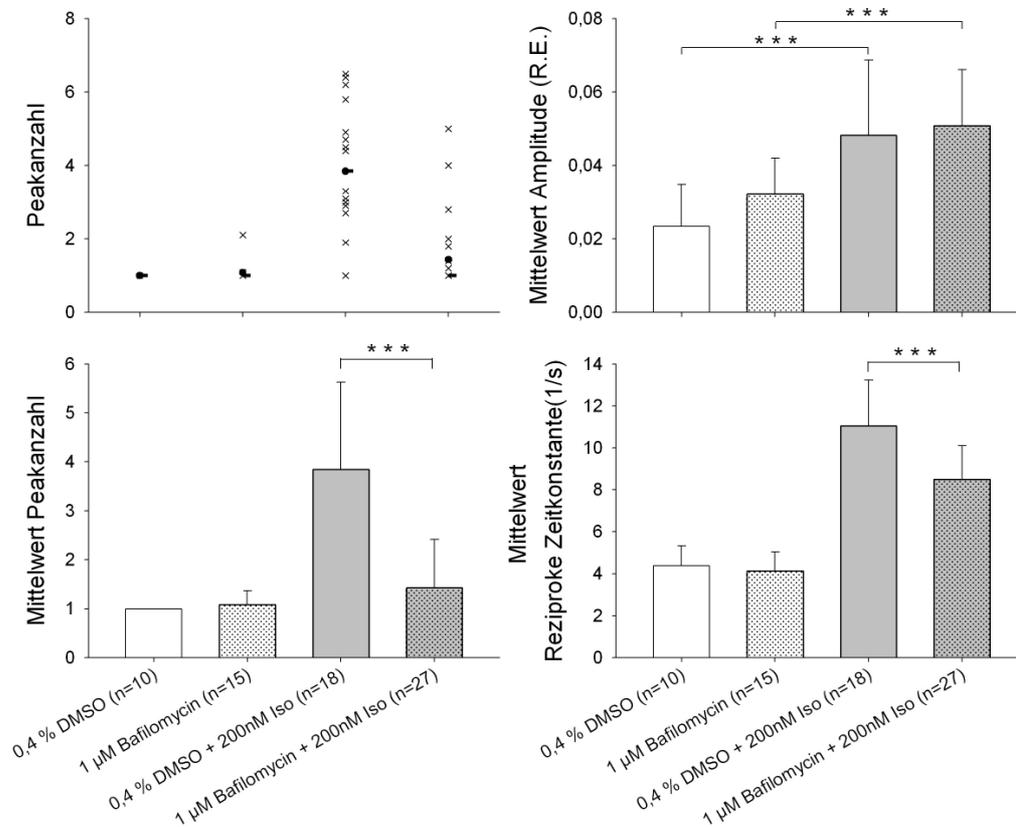
Neben dem sarcoplasmatischen Reticulum wurden Lysosomen als weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher in Cardiomyozyten beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass NAADP die  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude sowohl von globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen als auch von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks in Cardiomyozyten steigert und dieser Effekt durch Bafilomycin A1 inhibiert werden kann (Macgregor et al., 2007a). Bafilomycin A1 inhibiert die  $\text{H}^+$ -ATPase der Lysosomen, wodurch der Protonengradient und als Folge dessen auch der Calciumgradient zwischen den Lysosomen und dem Cytoplasma verloren gehen. Somit kann kein weiteres Calcium aus den Lysosomen freigesetzt werden. Außerdem wurde gezeigt, dass durch die Perfusion mit Isoprenalin die NAADP-Konzentration in den Cardiomyozyten erhöht wird. Es wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass NAADP  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch die Aktivierung eines bisher unbekanntes Kanals aus den Lysosomen freisetzt. Da zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten mit dem NAADP-spezifischen Inhibitor BZ194 blockiert werden konnten, sollte mit der Verwendung von Bafilomycin A1 getestet werden, ob die Lysosomen womöglich an der Entstehung dieser zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten beteiligt sein könnten. Zunächst wurde die Funktionalität von Bafilomycin A1 in Cardiomyozyten überprüft. Dafür

wurden Cardiomyozyten mit Bafilomycin A1 behandelt und anschließend die Lysosomen mit LysoTracker<sup>®</sup> Red angefärbt. Dieser Farbstoff ist eine schwache Base und häuft sich aus diesem Grund bevorzugt in sauren Vesikeln an. Steigt der pH-Wert in diesen Vesikeln durch die Zerstörung des Protonengradienten, zum Beispiel mit Bafilomycin A1, kommt es zu keiner Anfärbung der Lysosomen mehr. Nach der Färbung wurden bei 100-facher Vergrößerung Bilder von jeweils acht Zellen pro Bedingung am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Mit Hilfe eines *Piezosteppers* konnten mehrere Ebenen pro Zelle aufgenommen werden und eine anschließende Dekonvolution ermöglichte die Entfernung des Streulichtes (Abbildung 4.24). In der Teilabbildung 4.24 A ist jeweils eine Ebene von repräsentativen Einzelzellen für die Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  Bafilomycin A1 (rechts) oder mit DMSO als Kontrolle (links) dargestellt. Ohne Bafilomycin A1 waren über die gesamte Fläche der Zelle Lysosomen verteilt. Nach der Behandlung mit Bafilomycin A1 konnten hingegen keine Lysosomen mehr nachgewiesen werden. Es wurde eine quantitative Auswertung angeschlossen, bei der die Anzahl der Lysosomen und die Fluoreszenzintensität pro Zelle bestimmt wurden (Teilabbildung 4.24 B). Auch hier ließ sich feststellen, dass nach der Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  Bafilomycin A1 keine Lysosomen mehr detektiert werden konnten. Bei einer Halbierung der Konzentration auf 0,5  $\mu\text{M}$  wirkte Bafilomycin A1 noch bei sieben von acht Zellen.

Für die nachfolgenden Versuche wurden die Cardiomyozyten mit 1  $\mu\text{M}$  Bafilomycin A1 inkubiert. Es wurden die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale bei konstanter Elektrostimulation in der An- und Abwesenheit von Isoprenalin untersucht (Abbildung 4.25). Wie zuvor zeigten die Cardiomyozyten nach der Stimulation mit Isoprenalin vermehrt zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten mit einem Mittelwert von über drei Peaks pro Elektrostimulation. Die Vorinkubation mit Bafilomycin A1 blockierte die Entstehung zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten fast vollständig. Die Mehrheit der Zellen zeigte nur noch einen Peak pro Stimulation. Der Effekt von Bafilomycin A1 auf die Entstehung zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten war höchst signifikant. Die Amplitude wurde durch die Behandlung mit Bafilomycin A1 nicht beeinflusst. Allerdings zeigte sich in der Anwesenheit von Isoprenalin eine signifikante Reduktion der reziproken Zeitkonstante nach der Inkubation mit Bafilomycin A1 von 11  $\text{s}^{-1}$  auf 8,6  $\text{s}^{-1}$ . Durch die Inhibition der  $\text{H}^+$ -ATPase mit Bafilomycin A1 können folglich durch Isoprenalin-verursachte zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten verhindert werden.



**Abbildung 4.24: Effekt von Bafilomycin A1 auf die Lysosomen von Cardiomyozyten.** Die Cardiomyozyten wurden auf Laminin ausgesät und mit 0,5 oder 1  $\mu\text{M}$  Bafilomycin A1 für 20 Minuten bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurden 0,4% (v/v) DMSO verwendet. Zur Anfärbung der Lysosomen wurden die Zellen anschließend 20 Minuten mit 75 nM LysoTracker® Red bei RT inkubiert. Für jede Bedingung wurden Fluoreszenzbilder von acht Zellen bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Dabei wurden mit Hilfe eines *Piezosteppers* 150 Bilder pro Zelle mit einem Abstand von 200 nm aufgenommen, die anschließend dekonvolviert wurden (Algorithmus: Nächster Nachbar mit zehn Nachbarn; *Removal* = 0,66; *Verstärkung* = 2,45; *Offset* = -336). A) Es ist jeweils ein Durchlichtbild (oben) und ein Fluoreszenzbild (unten, eine Ebene der Zelle) einer repräsentativen Einzelzelle für die Kontrolle und die Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Bafilomycin A1 dargestellt. Maßstab = 10  $\mu\text{m}$ . B) Für die Auswertung wurden die 80 mittleren Aufnahmen der Fluoreszenzbilder zusammengefügt. Die linke Abbildung zeigt die Anzahl der Lysosomen pro Zelle (Kreuz) und den Mittelwert (Plus-Zeichen) +/-SE. Die rechte Abbildung stellt den Mittelwert der Fluoreszenzintensität pro Zelle +SE dar.



**Abbildung 4.25: Reduktion der Anzahl zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten durch Bafilomycin A1.** Die Cardiomyozyten wurden auf Laminin ausgesät und mit Indo-1 AM beladen. Für die Inhibition der lysosomalen  $\text{H}^{+}$ -ATPase wurden die Zellen für 20 Minuten mit  $1 \mu\text{M}$  Bafilomycin A1 bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurden 0,25% (v/v) DMSO verwendet. Für eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation wurden die Zellen fünf Minuten vor dem Beginn der Messung mit 200 nM Isoprenalin bei RT inkubiert. Während der Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in der Zellsuspension wurden die Cardiomyozyten mit  $0,5 \text{ s}^{-1}$  stimuliert. Es ist jeweils der Mittelwert der Peakanzahl, der Amplitude und der reziproken Zeitkonstante +SE angegeben. Die linke, obere Abbildung gibt zusätzlich die Einzelwerte der Zellen (Kreuz), die Mittelwerte (Punkt) und die Mediane (waagerechter Strich) für die Peakanzahl wieder. \*\*\*  $P < 0,001$ .

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in unserem Messsystem ab einer Konzentration von 10 nM Isoprenalin zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in murinen Cardiomyozyten induziert werden können. Der Aktivierung des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors nachfolgend können diese spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ereignisse durch eine spezifische Aktivierung des PKA-Signalweges entstehen. Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren für die  $\text{H}^{+}$ -ATPase der Lysosomen und des  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden sekundären Botenstoffes NAADP konnten zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten verhindert werden. Dies lässt auf eine Beteiligung von NAADP und den sauren Vesikeln an der Entstehung dieser proarrhythmischen Ereignisse schließen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Modellsysteme für die Analyse der $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung von T-Zellen und Cardiomyozyten auf Einzelzellebene

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Zellmodelle verwendet, um die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in T-Zellen und in ventrikulären Cardiomyozyten zu untersuchen. Die Modelle wurden derart gewählt, dass die *in vivo* Situation möglichst realitätsnah reflektiert wurde. Dabei konnte für die T-Zellen ein Zweizellsystem erfolgreich etabliert werden, in dem primäre, MBP-spezifische T-Zellen der Ratte mit Astrozyten als Antigen-präsentierende Zellen stimuliert wurden. Da die bisher in der Arbeitsgruppe durchgeführte Aktivierung mit Antikörpern erreicht worden war, konnte durch den Einsatz des Zweizellsystems eine physiologischere Art der Stimulation erreicht werden.

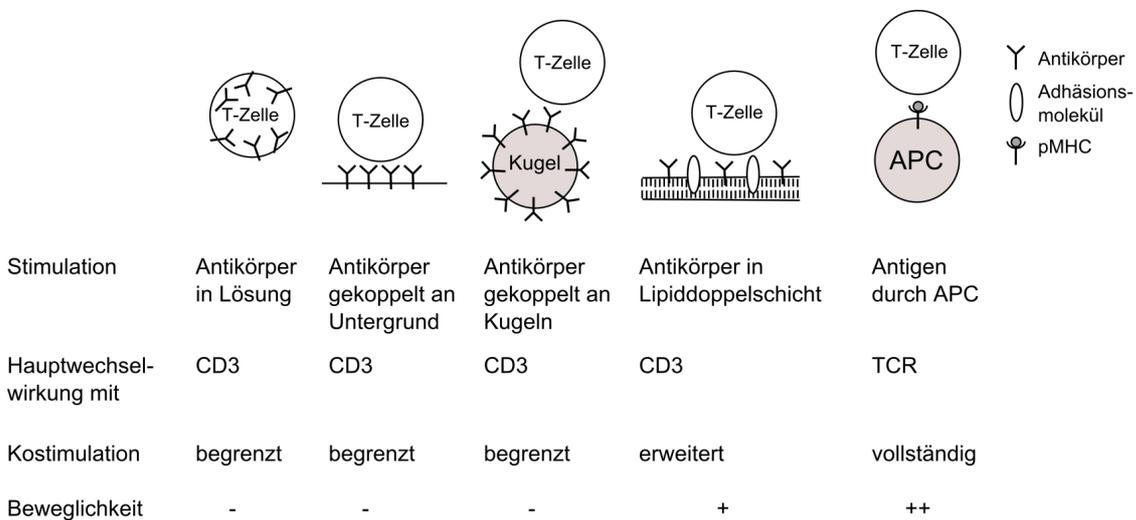
In Cardiomyozyten ließ sich das elektrisch stimulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Farbstoff Indo-1 auf Einzelzellebene verfolgen. Durch die  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin wurden zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten erzeugt, die durch die strenge Kopplung zwischen Anregung und Kontraktion einer Herzzelle auch zusätzliche Kontraktionen zur Folge hatten. Dieser proarrhythmische Effekt des Isoprenalins diente als Modell für Rhythmusstörungen im gesamten Organ. Im Folgenden sollen die gewählten Modelle mit bisherigen Analysen verglichen und ihre Relevanz für die Situation *in vivo* diskutiert werden.

#### 5.1.1 Das Zweizellsystem zur Aktivierung von T-Zellen

##### Die Aktivierung von T-Zellen *in vitro*

Für die Aktivierung von T-Zellen *in vitro* gibt es verschiedene Möglichkeiten. Weit verbreitet ist die Aktivierung mit Antikörpern, die sich gegen den CD3-Komplex, der mit dem TCR assoziiert ist, richten (Abbildung 5.1). Eine Kostimulation kann mit Antikörpern gegen CD28 erreicht werden. Der Vorteil dieser Methode ist sicherlich, dass sie einfach durchzuführen ist. Außerdem kann sie sowohl mit löslichen als auch mit immobilisierten Antikörpern stattfinden, so dass T-Zellen zum Beispiel am Fluorimeter, aber auch am Fluoreszenzmikroskop verfolgt werden können. Diese Methode hat jedoch auch einige Nachteile. Bei der Verwendung von Antikörpern in Lösung erfolgt die Aktivierung räumlich völlig ungerichtet, das heißt, auf der gesamten Oberfläche der T-Zelle können Antikörper binden. *In vivo* kommt es stattdessen zu einer Polarisierung der T-Zelle und zur Ausbildung einer Immunologischen

Synapse (Monks et al., 1998). Im Verlauf der Polarisierung finden zudem starke Umstrukturierungen statt, die die Form der T-Zelle verändern. Eine Kopplung des Antikörpers an eine Oberfläche erlaubt zwar die gerichtete Aktivierung der T-Zelle, jedoch ist dieses Modell starr. Die Moleküle können sich nicht wie in der Plasmamembran lateral bewegen. Ähnlich verhält es sich mit der Aktivierung über Lektine. Eine Verbesserung wird dadurch erreicht, dass Antikörper an Kugeln gekoppelt werden, wodurch die Form einer Zelle imitiert werden kann. Eine Weiterentwicklung war die Einführung von Lipiddoppelschichten, in die CD3-Antikörper und weitere kostimulatorische Moleküle eingebracht wurden (McConnell et al., 1986). Die Antikörper sind in der Membran beweglich und durch die hohe Flexibilität kann eine Polarisierung der T-Zelle erreicht werden. Allerdings werden in diesem Modell mögliche Reaktionen einer Antigen-präsentierenden Zelle außer Acht gelassen.



**Abbildung 5.1: Stimulationsmöglichkeiten für T-Zellen *in vitro*.** Bei der Stimulation von T-Zellen über Antikörper werden meist  $\alpha$ -CD3 Antikörper eingesetzt. Eine Kostimulation ist begrenzt möglich, indem Antikörper gegen CD28 hinzugefügt werden. Bei Kugeln werden häufig  $\alpha$ CD4 oder  $\alpha$ CD8 für eine verstärkte Wechselwirkung verwendet. Eine erweiterte Kostimulation wird in Lipiddoppelschichten erreicht, in die zusätzlich zu den Antikörpern zum Beispiel Adhäsionsmoleküle wie ICAM1 eingebracht werden können. Eine vollständige Kostimulation mit maximaler Beweglichkeit der Moleküle tritt jedoch nur bei der Verwendung von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) ein, die das Antigen im Komplex mit einem MHC-Molekül (pMHC) auf ihrer Oberfläche präsentieren. Nur in diesem Fall wird die Spezifität des T-Zellrezeptors (TCR) bei der Stimulation ausgenutzt.

Bei der Verwendung von Zweizellsystemen wird die experimentelle Aktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen ersetzt. Der große Vorteil dieser Methode ist, dass dabei die Antigen-spezifität des TCR ausgenutzt wird und die T-Zelle außerdem durch die Antigen-präsentierende Zelle alle stimulatorischen oder inhibitorischen Signale erhält, denen sie auch *in vivo* ausgesetzt wäre. In der vorliegenden Arbeit wurden MBP-spezifische T-Zellen verwendet, die eine Rolle bei der Entwicklung der EAE, einem Tiermodell für die Multiple Sklerose in der Ratte, spielen (siehe Ergebnisteil 4.1). Zudem wurden mit der Astrozytenzelllinie F10 Gliazellen des

ZNS als Antigen-präsentierende Zellen verwendet. Auf diese Weise wurde versucht, Aspekte des *in vivo* Modells EAE in unser *in vitro* Modell zu integrieren. Ferner konnte durch die Verwendung polyklonaler T-Zellen das gesamte Spektrum an T-Zellantworten auf Peptide des Proteins MBP analysiert werden. Falls die Antwort auf ein bestimmtes Antigen von Interesse ist, zum Beispiel bei einer Immunmodulation, können in einem Zweizellsystem auch T-Zellklone verwendet werden. So kann durch Veränderungen einzelner Aminosäuren im antigenen Peptid die T-Zellantwort gesteigert oder verringert werden und untersucht werden, welche Aminosäuren dominant in der Wechselwirkung mit dem TCR sind (Hemmer et al., 2000).

Die ersten Arbeiten zur Aktivierung von T-Zellen mit Antigen-präsentierenden Zellen stammen von der Arbeitsgruppe von Prof. Trautmann aus den 90er Jahren. Zunächst wurden murine Fibroblasten, die mit MHCII transfiziert worden waren, als Antigen-präsentierende Zellen zur Stimulation eines Diphtherietoxin-spezifischen T-Zellklons verwendet (Donnadieu et al., 1994). Die Interaktion der T-Zellen mit den "künstlichen" Antigen-präsentierenden Zellen ließ sich in drei Phasen einteilen: (i) Das Scannen der Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zelle durch die T-Zelle auf der Suche nach ihrem spezifischen Antigen. (ii) Die Immobilisierung und Abrundung der T-Zelle beim Signalbeginn. (iii) Das Ausbreiten der T-Zelle auf der Antigen-präsentierenden Zelle. Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort wurde in fünf bis 40 % der T-Zellen in der zweiten bis zehnten Minute nach dem Beginn der Interaktion mit einer Antigen-präsentierenden Zelle beobachtet. Es traten überwiegend  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen auf.

In späteren Arbeiten wurden dendritische Zellen und B-Zellen als professionelle Antigen-präsentierende Zellen verwendet (Delon et al., 1998; Montes et al., 1999). Es stellte sich heraus, dass dendritische Zellen wesentlich effektiver als B-Zellen naive T-Zellen aktivieren können (Delon et al., 1998). Maximal wurde mit dendritischen Zellen in 55 % der T-Zellen ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal über 200 nM erreicht, bei B-Zellen waren es nur 25 %. Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal ließ sich in eine Peak- und eine Plateauphase unterscheiden. Außerdem war die Verzögerung bis zum Einsetzen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals mit dendritischen Zellen zwei- bis viermal kürzer als mit B-Zellen und es wurde eine stärkere Proliferation der T-Zellen erreicht. Auch der Diphtherietoxin-spezifische T-Zellklon wurde mit dendritischen Zellen stimuliert (Montes et al., 1999). Dabei bildeten 68 % der T-Zellen in der Nähe von dendritischen Zellen eine Kontaktzone aus, von denen wiederum alle eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort zeigten. Diese bestand aus einem schnellen Anstieg, der häufig von Oszillationen gefolgt wurde. In diesem System wies der T-Zellklon eine erhöhte Motilität auf. Zwar blieben die T-Zellen in Kontakt mit der dendritischen Zelle, die ihr Signal ausgelöst hatte, aber dies verhinderte nicht die Kontaktbildung zu weiteren Dendritischen Zellen in der Nähe.

In einer weiteren Studie wurden ebenfalls B-Zellen als Antigen-präsentierende Zellen und ein T-Zellklon verwendet (Negulescu et al., 1996). Ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal konnte frühestens 25 Sekunden nach der Kontaktbildung zwischen der T-Zelle und der B-Zelle beobachtet werden. Das

Ca<sup>2+</sup>-Signal begann in der Regel mit einem Peak und ging dann in ein lang anhaltendes Plateau (30 % der Zellen) oder in eine Phase mit einzelnen Ca<sup>2+</sup>-Transienten (55 % der Zellen) über. Letztere war durch stärkere Formveränderungen der T-Zelle gekennzeichnet. In 15 % der Fälle zeigte die T-Zelle nur ein kurzes Signal und löste sich von der B-Zelle. Es wurde festgestellt, dass die halbmaximale Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zur Immobilisierung von T-Zellen bei 200 nM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> lag. Auch wenn sie ebenfalls ein Abstoppen und eine Abrundung der T-Zelle beobachteten, konnten sie nicht die von Donnadiu et al. (1994) beschriebene Ausbreitung der T-Zellen in der dritten Phase des Aktivierungsprozesses feststellen.

Ein Vergleich der bisher charakterisierten Zweizellsysteme mit dem in dieser Arbeit verwendeten System ergibt zunächst, dass die Aktivierung mit Astrozyten als Antigen-präsentierende Zellen sehr effektiv ist. Obwohl es sich dabei um nicht professionelle Antigen-präsentierende Zellen handelt, konnte eine hohe MHCII-Expression induziert und so eine starke Antigen-präsentation erreicht werden, so dass fast 80 % der T-Zellen ein Ca<sup>2+</sup>-Signal über 200 nM aufwiesen (siehe Abbildung 4.8). Astrozyten sind demnach nur unwesentlich schwächer als dendritische Zellen (Montes et al., 1999). Zudem war die Verzögerung bis zur Entstehung eines Ca<sup>2+</sup>-Signals mit im Mittel zwei bis drei Minuten sehr gering und konnte sogar in der ersten Minute nach der Kontaktbildung erfolgen, wie es auch bei Negulescu et al. (1996) beschrieben wurde (siehe Abbildung 4.9). Es ließen sich im wesentlichen zwei Phasen beobachten. In der ersten waren die T-Zellen auf der Suche nach ihrem Antigen. Diese Phase wurde, wie bei Donnadiu et al. (1994) beschrieben, von einer relativ hohen Motilität und starken Formveränderungen begleitet. Ab dem Beginn des Ca<sup>2+</sup>-Signals trat die T-Zelle in die zweite Phase ein, die durch eine Abrundung und eine Immobilisierung der T-Zelle gekennzeichnet wurde. Eine, wie bei Montes et al. (1999) erwähnte, geringe Motilität, die den Kontakt zu weiteren Astrozyten ermöglichte, ist aber auch hier nicht auszuschließen. Besonders, da es sich bei Astrozyten um adhärente Zellen handelt, die weniger als Einzelzellen, sondern vielmehr gehäuft oder als Zellrasen vorlagen. Wie bei Negulescu et al. (1996) ließ sich jedoch fast nie die dritte Phase der Ausbreitung der T-Zelle beobachten, die durch einen erneuten Anstieg des Formindex charakterisiert sein sollte. Vielmehr blieben T-Zellen mit einem starken Ca<sup>2+</sup>-Signal in den meisten Fällen während der Messung abgerundet. Allerdings kam es häufiger zu einer regelrechten Verschmelzung der T-Zelle mit der Astrozyte, bei der im Durchlicht die Umrisse beider Zellen kaum noch voneinander zu unterscheiden waren. Als Ca<sup>2+</sup>-Signal ließ sich häufiger ein Peak und ein lang anhaltendes Plateau wie bei Negulescu et al. (1996) und Delon et al. (1998) beobachten. Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen traten hingegen selten auf.

### Die Stimulation von T-Zellen in vivo

Obwohl das Zweizellsystem ein weitaus physiologischeres Modell als die Verwendung von Antikörpern oder Lipid Doppelschichten darstellt, hat auch dieses Modell seine Grenzen. Im Vergleich wird deutlich, wie sehr die Art des Ca<sup>2+</sup>-Signals und die morphologischen Veränderungen

der T-Zelle von der Wahl des Systems abhängen. Dabei ist entscheidend, welcher Art die Antigen-präsentierende Zelle ist, ob es sich bei den T-Zellen um naive T-Zellen oder um einen T-Zellklon handelt und wie stark das Antigen ist. Zudem wurde beobachtet, dass die Motilität von Lymphozyten in zweidimensionalen Systemen im Vergleich zu dreidimensionalen stark reduziert ist (Haston et al., 1982). Es ist daher von großem Interesse, das Verhalten der T-Zellen in ihrer natürlichen Umgebung im Organ oder besser noch im vollständigen Organismus zu untersuchen. 2003 wurde das erste intravitale Imaging von T-Zellen in Lymphknoten durchgeführt (Miller et al., 2003). Die T-Zellen bewegten sich hier mit einer mittleren Geschwindigkeit von  $11 \mu\text{m}/\text{min}$ . Wenig später wurde die Interaktion zwischen naiven T-Zellen und dendritischen Zellen im Lymphknoten untersucht (Mempel et al., 2004). Es wurde ein Drei-Schritt-Modell vorgeschlagen, bei dem T-Zellen zunächst lockere Kontakte mit dendritischen Zellen eingehen. Es schließt sich eine Phase mit stabilen Kontakten zwischen den T-Zellen und den dendritischen Zellen an, während der die T-Zellen Cytokine sezernieren. Schließlich lösen sich die T-Zellen von den Antigen-präsentierenden Zellen, gehen nur noch kurze Kontakte ein und proliferieren.

Bhakta et al. (2005) untersuchten die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Thymozyten in Thymusschnitten mit Hilfe von 2-Photonen Laserscanning Mikroskopie. Die Thymozyten zeigten eine hohe Motilität während der Suche nach ihrem Antigen. Im Schnitt bewegten sie sich mit einer Zufallsbewegung von  $3,5 \mu\text{m}/\text{min}$ . Nach der Antigenerkennung kam es hingegen zu lang anhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen mit Peakkonzentrationen von  $0,5$  bis  $1,5 \mu\text{M}$ , die bis zu zwei Stunden anhielten. Es kam zu starken Formveränderungen der T-Zellen und sie gingen in einen stationären Zustand über, der einen engen Kontakt mit den Stromazellen ermöglichte. Allerdings wurde hervorgehoben, dass die Thymozyten auch im stationären Zustand in der Lage waren, kontinuierlich ihre Form zu verändern und eine relativ konstante Position einnahmen. Die Aktivierung mit Thapsigargin (Tg) hingegen führte zu einem starken, anhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg, bei dem es zu einer kompletten Immobilisierung der Zellen kam. Bei der Analyse von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen in den Lymphknoten von Mäusen wurde ebenfalls gezeigt, dass ein Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration notwendig für das Abstoppen reifer T-Zellen nach der Erkennung ihres Antigens war (Skokos et al., 2007).

In einer weiteren Studie wurden die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale naiver  $\text{CD4}^+$  T-Zellen in isolierten Lymphknoten bei verschiedenen Konditionen untersucht (Wei et al., 2007). In der Abwesenheit des Antigens zeigten die T-Zellen lediglich einzelne  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und eine langsame Abnahme ihrer Geschwindigkeit. Nach der Zugabe des Antigens kam es zunächst zu einer weiteren Abnahme der Geschwindigkeit und zu einer höheren Frequenz der unregelmäßigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten. Die meisten T-Zellen wurden dann an der dendritischen Zelle festgehalten und zeigten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale auf einem erhöhten basalen Level mit überlagerten Peaks. Die Kontakte konnten für mehrere Stunden anhalten, waren aber dynamisch und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale blieben bestehen, auch wenn die T-Zellen sich von den dendritischen Zellen lösten. Allerdings wurde

nicht geklärt, ob tatsächlich sporadische Kontakte zu den dendritischen Zellen für ein lang anhaltendes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal ausreichen. Es wäre zum Beispiel auch möglich, dass die T-Zellen Kontakt zu Zellausläufern der dendritischen Zellen hatten, die mit dem verwendeten System nicht hinreichend aufgelöst werden konnten.

Die in unserem Zweizellsystem verwendeten T-Zellen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Flügel (Univeristätsklinikum Göttingen) generiert. In dieser Arbeitsgruppe wurde auch bereits die Motilität der T-Zellen *in vivo* analysiert. Um diese Zellen *in vivo* verfolgen zu können, wurden sie mit Hilfe retroviraler Transduktion GFP-markiert (Flügel et al., 1999). Da die 2-Photonen Laser Scanning Mikroskopie nicht dafür geeignet ist, Aufnahmen tief im Parenchym des ZNS durchzuführen, wurden Explantate von Ratten verwendet, die sich in der akuten Phase der EAE befanden (Kawakami et al., 2005). 65 % der  $\text{T}_{\text{MBP-GFP}}$ -Zellen bewegten sich mit mehr als  $10 \mu\text{m}/\text{min}$  durch das Parenchym. Es wurden maximale Geschwindigkeiten von  $25 \mu\text{m}/\text{min}$  beobachtet. Dies ist vergleichbar mit der Geschwindigkeit von T-Zellen in explantierten Lymphknoten (Miller et al., 2002). Die restlichen 35 % waren hingegen stationär und bewegten sich um einen festen Punkt. Es wurde vermutet, dass bewegliche T-Zellen auf der Suche nach ihrem Antigen waren und stationäre ihr Antigen bereits erkannt hatten.

Ein Vergleich des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zweizellsystems mit den beschriebenen *in vivo*-Studien zeigt, dass das Zweizellsystem aus  $\text{T}_{\text{MBP}}$ -Zellen und Astrozyten trotz der fehlenden dreidimensionalen Umgebung wesentliche Parallelen zu der Situation im Gesamtorganismus aufweist. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bewegten sich die T-Zellen ohne das Antigen mit einer höheren Geschwindigkeit als in der Anwesenheit des spezifischen Antigens (siehe Abbildung 4.11 und 4.12). Sobald durch die Erkennung des Antigens ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in den T-Zellen ausgelöst wurde, kam es in beiden Systemen zu einem Abstoppen der T-Zellen und einer starken Formveränderung. Ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal konnte bereits in der ersten Minute nach der Kontaktbildung zu der Astrozyte ausgelöst werden, was ebenfalls mit den *in vivo* Messungen übereinstimmt (Wei et al., 2007). Allerdings fällt auf, dass sich die T-Zellen in der Abwesenheit des Antigens im Mittel ebenfalls mit einer sehr niedrigen Geschwindigkeit von etwa  $2 \mu\text{m}/\text{min}$  bewegten, die deutlich unter denjenigen lag, die *in vivo* beobachtet wurden. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die *in vivo* Experimente zwischen  $35$  und  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt wurden, wohingegen in unseren Experimenten bei einer Raumtemperatur von  $20$  bis  $25^\circ\text{C}$  gearbeitet wurde. Zusätzlich wurden die Fura-2-beladenen T-Zellen vor dem Experiment in einem Wasserbad von  $12$  bis  $15^\circ\text{C}$  gehalten. Auf diese Weise waren sie länger vital. Die niedrigere Temperatur hat wahrscheinlich zu der reduzierten Motilität der T-Zellen beigetragen. Des Weiteren ist anzumerken, dass überwiegend lang anhaltende  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale, teilweise auch mit einem initialen Peak, beobachtet wurden. In den *in vivo* Experimenten wurden aber  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen oder unregelmäßige  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten auf einem erhöhten Plateau beschrieben. Hochfrequente  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen sollen zu einer verstärkten NFAT- und  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung und somit zu einer starken Aktivierung und Proliferation führen

(Dolmetsch et al., 1997, 1998). Allerdings wurden diese intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen der T-Zellen bei Dolmetsch et al. (1998) nicht durch eine physiologische Stimulation, sondern durch extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen mit Hilfe einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Klemme erzeugt. Dieselbe Technik wurde bei Tomida et al. (2003) angewendet. In dieser Veröffentlichung wurde beschrieben, dass eine Dephosphorylierung von NFAT einige Minuten nach dem Abklingen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals im Cytoplasma bestehen bleibt und auf diese Weise ein Gedächtnis angelegt werden kann. Hochfrequente, kurze  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale hätten demnach eine größere Effizienz in der Translokation von NFAT in den Kern als langanhaltende  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale, da mit einem niedrigeren Gesamt- $\text{Ca}^{2+}$ -Signal eine ebenso hohe Translokation von NFAT in den Kern erreicht werden könnte. Allerdings wurde von Quintana et al. (2005) postuliert, dass vielmehr die absolute Zeit, die die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über einem bestimmten Schwellenwert liegt, für die NFAT-Translokation eine Rolle spielt, unabhängig davon, ob es sich um Oszillationen oder ein lang anhaltendes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal handelt.  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen würden nur dann bevorzugt auftreten, wenn die Energie der Zelle begrenzt und somit die Effizienz des jeweiligen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in der Auslösung der NFAT-Translokation und somit der Gentranskription entscheidend wäre. Für diese Hypothese spricht auch, dass in unserem Zweizellsystem die IL-2 Konzentration 48 Stunden nach der Aktivierung der T-Zellen durch die Astrozyten deutlich anstieg. Das Cytokin IL-2 wirkt autokrin auf die T-Zellen und löst ihre Proliferation aus. In diesem Versuch wurden dieselben Antigenkonzentrationen wie für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen verwendet. Dies lässt darauf schließen, dass starke, lang anhaltende  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale eine ausreichende Aktivierung der T-Zellen bewirken können und Astrozyten im Zweizellsystem dazu geeignet sind, T-Zellen zur Proliferation anzuregen, wie es auch bereits beschrieben wurde (Fontana et al., 1984).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dem vorgestellten Zweizellsystem ein Modell etabliert wurde, mit dem T-Zellen effektiv *in vitro* aktiviert werden können. Es ermöglicht eine Beobachtung ihrer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in einem relativ definierten Zeitfenster und ist vergleichbar mit bereits etablierten Zweizellsystemen. Des Weiteren stimmt es in wesentlichen Punkten mit der Antigenerkennung von T-Zellen *in vivo* überein.

### Das $\text{Ca}^{2+}$ -Signal der Astrozyten im Zweizellsystem

Neben den Signalen von T-Zellen können im Zweizellsystem auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in der Antigen-präsentierenden Zelle verfolgt werden. Erstmals wurde dies von Montes et al. (1999) in dendritischen Zellen beschrieben. 31 % der dendritischen Zellen zeigten ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in Kontakt mit T-Zellen. Durch den parallelen Einsatz der  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Farbstoffe Fura-2 und Fura Red in den T-Zellen und den Astrozyten und die Auswahl spezieller Filter, konnten in unserem Zweizellsystem die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beider Zelltypen bei der Kontaktbildung verfolgt werden. Allerdings konnte in den Astrozyten kein globales  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nachgewiesen werden, unabhängig von einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in der T-Zelle (siehe Abbildung 4.16 und 4.17).

Zum einen handelt es sich hierbei um eine Zelllinie, die vielleicht nicht so leicht anspricht wie primäre Zellen. Zum anderen unterscheiden sich Astrozyten auch grundlegend von dendritischen Zellen. Sie sind keine professionell Antigen-präsentierenden Zellen und ihre Rolle im Verlauf einer Entzündungsreaktion im ZNS ist nur unvollständig geklärt. Es wäre denkbar, dass im Bereich der Kontaktstelle zwischen der T-Zelle und der Astrozyte lokal begrenzte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale entstehen. Allerdings kommt es zu leichten Interferenzen der Anregungs- und Emissionsspektren von Fura-2 und Fura Red. Bei der Anregung der  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Form von Fura Red wird auch noch leicht die  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Form von Fura-2 angeregt und erhöht auf diese Weise die Fluoreszenz von Fura Red bei einer Anregung mit 420 nm. Daraus resultiert lokal ein leicht erhöhtes Ratio der Astrozyte, wodurch die Auflösung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals mit niedriger Amplitude in diesem Bereich erschwert wird (siehe auch Abbildung 4.17: Die rot umrandete T-Zelle ist in den farbkodierten Bildern der Astrozyten mit erhöhtem Ratio erkennbar.). Außerdem könnte es zwar zu lokalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen im Bereich der Zellfortsätze der Astrozyten gekommen sein. Hier ist die Fluoreszenz von Fura Red jedoch zu schwach, um solche peripheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale zu beobachten. Globale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale ließen sich demnach mit unserem System verfolgen, für die Messung von lokalen Signalen müsste das System verbessert werden.

Mit Fura-2 und Fura Red wurden zwei Farbstoffe ausgewählt, die mit ihrem Anregungs- und Emissionsspektrum möglichst weit auseinander liegen und mit dem bestehenden Imagingsystem technisch vereinbar sind. Dies erfordert, dass für beide Farbstoffe derselbe dichroische Filter verwendet wird. Dennoch kam es zu leichten Interferenzen im Bereich der Anregungswellenlängen 380 nm und 420 nm. Um zunächst festzustellen, ob die Astrozyten lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nach dem Kontakt zu T-Zellen aufweisen, könnte man die T-Zellen nicht beladen. In dem Fall würde man sich jedoch nur auf das Abrunden und die Immobilisierung der T-Zelle verlassen, um auf ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in der T-Zelle zu schließen. Außerdem gingen jegliche Informationen über das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in der T-Zelle verloren. Würde man die T-Zellen und die Astrozyten mit dem jeweils anderen Farbstoff beladen, hätte man eventuell einen leichten Hintergrund durch die Fluoreszenz der T-Zelle bei einer Anregung von 380 nm in der Astrozyte. Dies ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Form von Fura-2. Eine Erhöhung der Fluoreszenz könnte zu einem erniedrigten Ratio der Astrozyte in diesem Bereich führen. Ferner wären Signale in den Zellfortsätzen nach wie vor nicht zu beobachten. Für eine Untersuchung lokaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale dürften sich die Fluoreszenzfarbstoffe in keiner Weise beeinflussen. Eine Möglichkeit wäre, statt Fura Red einen Farbstoff mit einer längerwelligen Anregung wie Calcium Green oder Calcium Orange zu verwenden. Der Nachteil dieser Farbstoffe ist, dass sie nicht ratiometrisch sind und somit die bestimmte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von der Farbstoffkonzentration abhängt. Es ist daher nicht möglich, die Intensitätswerte um eine eventuell ungleiche Beladung, Änderungen im Zellvolumen oder ein Bleichen des Farbstoffs zu korrigieren (Takahashi et al., 1999). Des Weiteren absorbieren diese Farbstoffe in dem Bereich des Spektrums, in

dem Fura-2 emittiert. Das bedeutet, dass unterschiedliche dichroische Filter verwendet werden müssten, die in unserem System nicht automatisch gewechselt werden können. Schließlich könnte man Fura Red mit Fluo3 kombinieren und beide Farbstoffe bei 488 nm anregen. Auch hierfür müsste der dichroische Filter während der Messung gewechselt werden, allerdings könnte man auf diese Weise eine ratiometrische Messung durchführen. Dabei würde man ausnutzen, dass die Fluoreszenz von Fura Red bei 488 nm absinkt. Da die Fluoreszenz von Fura Red aber wesentlich schwächer ist als die von Fluo3 und Fura Red eine sehr hohe Affinität zu  $\text{Ca}^{2+}$  aufweist, kann es durch die erforderlichen hohen Fura Red-Konzentrationen zum Puffern des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals, zur Einschränkung des messbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Bereichs und zu hohen Belichtungszeiten kommen (Floto et al., 1995).

### 5.1.2 Der proarrhythmische Effekt des Isoprenalins auf Einzelzellebene ventrikulärer Cardiomyozten

Bei der elektrischen Stimulation von ventrikulären Cardiomyozyten kommt es zur Aktivierung von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in der Plasmamembran der Zelle. Durch den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  werden nah gelegene RyR aktiviert, so dass es zu einem Ausstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR kommt. Das freie, cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$  kann an die Myofilamente der Myozyte binden und so die Kontraktion auslösen. Dieser, als Excitations-Kontraktions-Kopplung (EKK) beschriebene Prozess kann auf Einzelzellebene am Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Cardiomyozyten mit einem Feldstimulator elektrisch erregt und das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal zeitgleich mit dem Fluoreszenzfarbstoff Indo-1 verfolgt. Durch den Einsatz von Isoprenalin, einem Noradrenalin-Derivat, das den  $\beta$ -Adrenozeptor aktiviert, konnte die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung moduliert werden. Die  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin hat einen positiv inotropen sowie lusitropen Effekt, was eine erhöhte Kontraktionskraft und beschleunigte Relaxation bedeutet (Bers, 2002).  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt, über die die Adenylatcyclase aktiviert wird. Es kommt zur Bildung von cAMP, das wiederum die PKA aktiviert. Die PKA phosphoryliert den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, den RyR, Phospholamban, Troponin C und das Myosin-bindende Protein C. Die Lusitropie und die beschleunigte Abnahme des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals kommen hauptsächlich durch die Phosphorylierung von Phospholamban zustande (Li et al., 2000). Dieses hat nun eine verringerte Affinität zur SERCA, wodurch deren Aktivität erhöht wird und  $\text{Ca}^{2+}$  schneller in das SR zurückgepumpt werden kann. Der inotrope Effekt wird durch den höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal und die stärkere  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR vermittelt. Welche Rolle die Phosphorylierung des RyR spielt, wird kontrovers diskutiert, da sie schwer von dem Effekt der Phosphorylierung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals und einer erhöhten Beladung des SR abzugrenzen ist. Beide Effekte von Isoprenalin wurden in unserem System demonstriert (siehe Abbildung 4.18 und 4.19). Ab 10 nM Isoprenalin kam es zu einem deutlichen Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude sowie einer beschleunigten Abnahme des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals.

Allerdings wurde in unserem System nicht nur ein lusitroper und inotroper Effekt des Isoprenalins auf die Cardiomyozyten beobachtet. Vielmehr wurden ab einer Konzentration von 10 nM Isoprenalins zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten hervorgerufen, die zwischen den elektrischen Stimulationen auftraten (siehe Abbildung 4.19). Die Anzahl solcher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten konnte mit einem Erhöhen der Isoprenalins-Konzentration gesteigert werden und war bei 200 nM Isoprenalins maximal. Dieser proarrhythmische Effekt des Isoprenalins wurde bereits in zahlreichen anderen Studien beschrieben. Von Priori und Corr (1990) wurde der Einfluss einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation auf die Auslösung von *early after depolarisations* (EADs) und *delayed after depolarisations* (DADs) in ventrikulären Cardiomyozyten von Hunden untersucht. Isoprenalins erzeugte einzelne oder mehrere DADs in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-8}$  bis  $10^{-6}$  M. Außerdem wurden EADs in 80 % der Zellen bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  M und Stimulationsfrequenzen von 1 bis  $2\text{ s}^{-1}$  beobachtet. EADs und DADs können wiederum von frühen und späten zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten begleitet sein (January und Fozzard, 1988; January und Riddle, 1989). Dr. Siebrands (vormals Institut für Biochemie und Molekularbiologie I) konnte ebenfalls einen Anstieg von EADs und DADs nach der Stimulation mit 200 nM Isoprenalins in ventrikulären Cardiomyozyten der Maus beobachten (unveröffentlicht), die jedoch schwer voneinander zu unterscheiden waren. Freestone et al. (1999) untersuchten direkt den Effekt von  $\beta_4$ - und  $\beta_1$ -adrenerger Stimulation auf die Entstehung zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in ventrikulären, murinen Cardiomyozyten. Isoprenalins, das hauptsächlich auf den  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor wirkt, löste mit einer Konzentration von 100 nM sowohl frühe als auch späte zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten aus. In ventrikulären Cardiomyozyten von Meerschweinchen entstanden DADs und zusätzliche Kontraktionen mit 30 nM Isoprenalins, aber nicht mit 15 nM Isoprenalins. Die Isoprenalins-Konzentrationen in der vorliegenden Arbeit, die zu zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in den Cardiomyozyten führten, bewegen sich demnach in einem Konzentrationsbereich, der vergleichbar mit bisherigen Veröffentlichungen ist, die ähnliche Effekte des Isoprenalins beschreiben. Auffallend ist, dass in unserem System hauptsächlich frühe zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten beobachtet wurden. Durch zusätzliche frühe oder späte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten strömt  $\text{Ca}^{2+}$  während der diastolischen Phase aus dem SR, so dass schließlich weniger  $\text{Ca}^{2+}$  während der Systole zur Verfügung steht. Durch den Verlust von  $\text{Ca}^{2+}$  im SR wird wahrscheinlich der positiv inotrope Effekt des Isoprenalins begrenzt (Capogrossi et al., 1988). Dies lässt sich auch in unserem System beobachten: Es treten signifikant mehr zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten ab einer Konzentration von 10 nM Isoprenalins auf und der Effekt von Isoprenalins auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude ist bei dieser Konzentration schon fast gesättigt.

Schließlich stellt sich die Frage, wie gut zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten *in vitro* Arrhythmien *in vivo* widerspiegeln können. Dafür spricht vor allem, dass gezeigt wurde, dass auch in normalem Gewebe DADs durch adrenerge Stimulation *in vivo* hervorgerufen werden können (Priori et al., 1988). Außerdem wurde beschrieben, dass es zu einer Reduktion der Repolarisierungs-

zeit kam, die *in vitro* erst ab Konzentrationen über 100 nM Isoprenalin beobachtet werden konnte (Priori et al., 1988; Priori und Corr, 1990). Deshalb wurde angenommen, dass diese hohen Isoprenalinkonzentrationen eine maximale adrenerge Stimulation *in vivo* imitieren können und deshalb vermutlich physiologisch relevant sind.

Es bleibt anzumerken, dass zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und folglich auch spontane Kontraktionen in unserem System nur bei der Anregung  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe und/oder der Bestrahlung mit UV-Licht entstanden. Spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale konnten sowohl mit Indo-1 als auch mit Fluo-4 beobachtet werden. Wenn hingegen im Durchlicht gemessen wurde, kam es selbst bei einer Konzentration von 200 nM Isoprenalin nicht zur Entstehung von zusätzlichen Kontraktionen. Dieser Aspekt lässt darauf schließen, dass durch die Bestrahlung mit UV-Licht und/oder die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe eine zusätzliche Sensibilisierung der Cardiomyozyten statt fand, die sie empfänglicher für den arrhythmischen Effekt des Isoprenalins gemacht hat. Nichts desto trotz konnte eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit der Entstehung zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten von Isoprenalin festgestellt werden. Die UV-Bestrahlung der Zellen wurde bewusst in Kauf genommen, da der Fluoreszenzfarbstoff Indo-1 einen erheblichen Vorteil bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung bietet. Bei diesem ratiometrischen Farbstoff kommt es durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  zu einer Verschiebung des Maximums in der Emissionswellenlänge. Dies erlaubt die Anregung bei einer Wellenlänge und, durch den Einsatz eines *DualView*-Moduls, das das Signal durch zwei unterschiedliche Emissionsfilter vor der Kamera aufsplittet, die gleichzeitige Messung der Fluoreszenz der  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigten Form und der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Form von Indo-1. Dadurch erhöht sich die zeitliche Auflösung der Messung um den Faktor zwei und es tritt keine zeitliche Verzögerung zwischen den Einzelbildern, die für das spätere Ratiobild verwendet werden, auf. Dieser Aspekt war in der vorliegenden Arbeit ausschlaggebend für das  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging der Cardiomyozyten, da sich das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal der EKK im ms-Bereich entwickelt und wieder abfällt und daher keine verzögerte Bildaufnahme erlaubt.

## 5.2 Die Antagonisierung des NAADP-Signalweges durch BZ194

Das Zweizellsystem zur Aktivierung der T-Zellen und das Arrhythmiemodell für ventrikuläre Cardiomyozyten sollten der Analyse des NAADP-Signalweges dienen. Dabei war von Interesse, in wie weit die Unterdrückung des NAADP-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung und schließlich die Aktivierung von T-Zellen beeinflussen würde. Da NAADP in Cardiomyozyten eher an der Modulation als an der Entstehung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals beteiligt zu sein scheint, stellte sich die Frage, ob die Antagonisierung von NAADP das Auftreten zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten unterbinden könnte. Mit BZ194 stand ein spezifischer NAADP-Antagonist zur Verfügung, der in beiden Zellsystemen erfolgreich eingesetzt werden konnte. Im Folgenden soll zunächst die Entwicklung bisher verwendeter NAADP-Antagonisten vor-

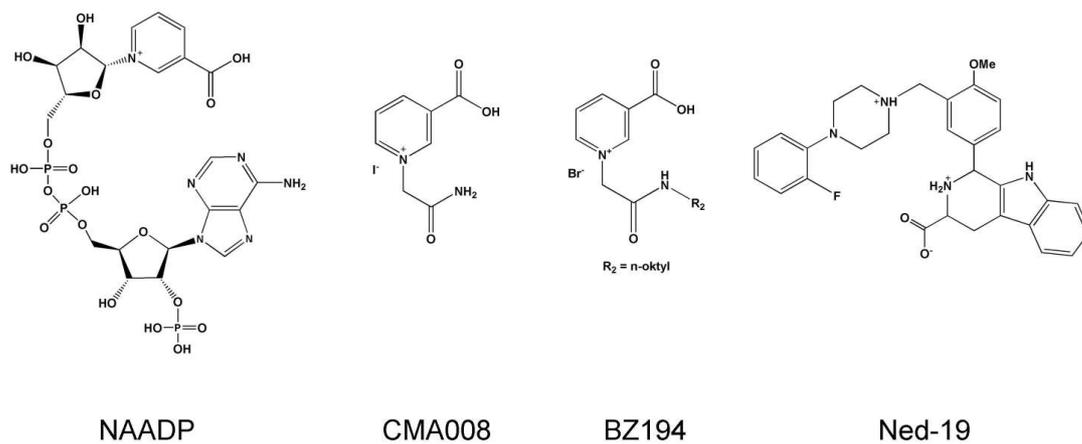
gestellt werden. Anschließend wird der Einsatz dieses Inhibitors in den gewählten Modellen diskutiert und welche Relevanz des NAADP-Signalweges sich aus den gewonnenen Ergebnissen für die Signalgebung beider Zelltypen ergibt.

### 5.2.1 Antagonisten des NAADP-Signalweges

Eine spezifische Hemmung des NAADP-Signalweges ist erforderlich, um die Rolle von NAADP bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in unterschiedlichen Zelltypen weiter zu untersuchen. Um den Effekt von NAADP inhibieren zu können, ist es wichtig die für die  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Wirkung von NAADP notwendigen Reste zu kennen. Lee und Aarhus (1997) konnten herausfinden, dass eine Veränderung der 3'-Carboxylgruppe am Pyridinring, sowie der 6-Aminogruppe des Adenins und des 2'-Phosphats der südlichen Ribose zu einer Herabsetzung der  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Wirkung von NAADP im Seeigeleisystem führen. Inhibitoren sollten aber nicht nur mit NAADP konkurrieren, sondern auch die Zellmembran durchdringen können, was NAADP aufgrund seiner Größe und der stark negativ geladenen Phosphatgruppen nicht möglich ist. Erste Analoga wurden deshalb bis auf den Pyridinring reduziert, wobei aber die Carboxylgruppe erhalten blieb (Dowden et al., 2006) (Abbildung 5.2). Dabei stellte sich besonders das Pyridinanalogen CMA008 mit einer inhibitorischen Konzentration von  $15 \mu\text{M}$  für die Reduktion des NAADP-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in Seeigeleihomogenaten als effektiv heraus. Auch die externe Applikation von CMA008 zeigte einen inhibitorischen Effekt. So konnten die NAADP-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in intakten Seeigeleiern und die Cholecystinin (CCK)-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen in Azinuszellen des Pankreas blockiert werden. CMA008 ähnelt in seiner Struktur BZ194, wobei letzteres einen längeren Alkylrest aufweist. Dennoch zeigte CMA008 keinen Effekt auf die Proliferation von  $\text{T}_{\text{MBP}}$ -Zellen (Dammermann et al., 2009). Bei Azinuszellen und T-Zellen handelt es sich jedoch um unterschiedliche Zelltypen, deren NAADP-Signalweg sich außerdem nach dem jetzigen Kenntnisstand in wesentlichen Punkten unterscheidet (siehe unten), so dass eine unterschiedliche Wirkung von CMA008 nicht erstaunlich ist. Vermutlich ermöglicht der unpolare Alkylrest von BZ194 eine bessere Aufnahme in T-Zellen. Da Co-Mikroinjektionen von Nikotinsäure mit NAADP in Jurkat T-Zellen das NAADP-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal hemmen konnten, erschienen Pyridinanaloga auch in T-Zellen ein sinnvoller Ansatz zur Modulation des NAADP-Signalweges. Nikotinsäure selbst als Inhibitor einzusetzen, ist aufgrund seiner Polarität nicht möglich. Außerdem würde es intrazellulär in den Biosyntheseweg für Nikotinsäureadeninindinukleotid (NAD) eingebunden werden. BZ194 zeigte bei Mikroinjektionen in T-Zellen mit einer  $\text{IC}_{50}$  im niederen mikromolaren Bereich einen vergleichbaren Effekt wie CMA008 in den Homogenaten des Seeigeleis.

Ein völlig anderer Ansatz zur Inhibition von NAADP wurde mit einem Liganden-basierten virtuellen Screening durchgeführt (Naylor et al., 2009). Dabei stellte sich Ned-19 als potenter Inhibitor heraus, der in seiner zweidimensionalen Struktur deutlich von NAADP abweicht,

NAADP jedoch in seiner dreidimensionalen Struktur sowie in der Verteilung der elektrostatischen Ladung stark ähnelt. Ned-19 konnte mit einer  $IC_{50}$  von  $2 \mu\text{M}$  das NAADP-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in Homogenaten von Seeigeleiern hemmen. Auch in intakten Seeigeleiern und  $\beta$ -Zellen des Pankreas zeigte Ned-19 mit einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  einen inhibitorischen Effekt auf das NAADP-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal. Des Weiteren konnten Glucose-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen in  $\beta$ -Zellen mit einer  $IC_{50}$  von  $32 \mu\text{M}$  unterdrückt werden. CMA008, Ned-19 und BZ194 zeigen demnach in unterschiedlichen Zelltypen einen vergleichbaren inhibitorischen Effekt auf die NAADP-Signalgebung. Ein Nachteil von Ned-19 ist seine Fluoreszenz mit einer Anregung im ultravioletten Bereich des elektromagnetischen Spektrums. Zwar wurde beschrieben, dass Ned-19 auf diese Weise in der Zelle lokalisiert werden könne (Naylor et al., 2009), jedoch trägt es auch zu einer hohen Hintergrundfluoreszenz bei. Diese könnte sich störend in  $\text{Ca}^{2+}$ -Imagingstudien zum Beispiel mit Fura-2 als Fluoreszenzfarbstoff auswirken, da es zu einer Überschneidung der Fluoreszenzspektren kommt.

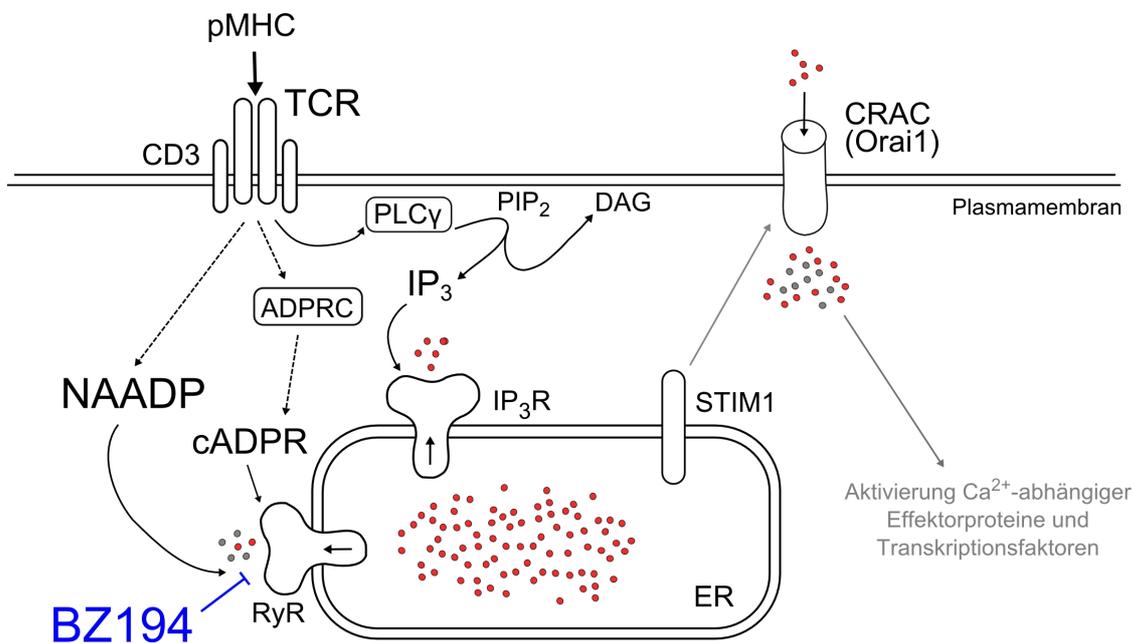


**Abbildung 5.2: NAADP und NAADP-Inhibitoren.** Der  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende sekundäre Botenstoff NAADP und bisher veröffentlichte spezifische NAADP-Inhibitoren: CMA008 (Dowden et al., 2006), BZ194 (Dammermann et al., 2009; Cordiglieri et al., 2010) und Ned-19 (Naylor et al., 2009; Rosen et al., 2009).

### 5.2.2 Die Antagonisierung des NAADP-Signalweges in autoreaktiven T-Zellen

Durch den spezifischen NAADP-Antagonisten BZ194 wurde das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal der  $T_{\text{MBP}}$ -Zellen im Zweizellsystem deutlich reduziert (siehe Abbildung 4.10). Eine genauere Analyse der Daten ergab, dass der Anteil an T-Zellen mit einer niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort erhöht wurde. Zeigten in der Kontrolle mit MBP 70 % der T-Zellen ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal über 300 nM, waren es in der Anwesenheit von BZ194 nur noch 44 % (siehe Abbildung 4.13 und 4.14). Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal scheint demnach nicht in allen Zellen vollständig unterdrückt zu werden. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass  $\text{IP}_3$  und cADPR nach wie vor in der Lage sind,  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER

freizusetzen. Es stellte sich daher die Frage, in wie weit das im Mittel reduzierte, NAADP-abhängige  $Ca^{2+}$ -Signal zeitlich nachgeordnete Signalwege beeinflussen würde. So zeigte sich, dass die Translokation von NFAT in den Kern mit BZ194 stark vermindert war (Dammermann et al., 2009). Dies ist sicherlich auf das geringere globale  $Ca^{2+}$ -Signal zurückzuführen, da nur ein lang anhaltender Anstieg der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration die  $Ca^{2+}$ /Calmodulin- und Calcineurin-abhängige Translokation von NFAT in den Kern ermöglicht (Timmerman et al., 1996). Daraus resultiert schließlich eine geringere Produktion des Cytokins IL-2, das hauptsächlich für die Proliferation der T-Zellen verantwortlich ist. Folglich war auch die Proliferation der  $T_{MBP}$ -Zellen nach der Stimulation mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 signifikant gehemmt. Durch die Gabe von Ionomycin, ein, die  $Ca^{2+}$ -Konzentration in der Zelle erhöhendes Ionophor, konnte der inhibierende Effekt aufgehoben werden. Dies macht deutlich, dass die geringere Proliferation letztendlich auf das verminderte  $Ca^{2+}$ -Signal und folglich die Inhibition des NAADP-Signalweges zurückzuführen ist. Auch an der Expression von  $IFN-\gamma$  und IL-17 scheint NAADP beteiligt zu sein, da stimulierte  $T_{MBP}$ -Zellen nach der Inhibition mit BZ194 geringere Mengen dieser Cytokine ausschütteten (Cordiglieri et al., 2010). Daraus ergibt sich das in Abbildung 5.3 dargestellte Modell, in dem die Inhibition der NAADP-induzierten  $Ca^{2+}$ -Signalgebung durch BZ194 zu einer verringerten  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER führt.



**Abbildung 5.3: Die Antagonisierung des NAADP-Signalweges in T-Zellen durch BZ194.** Der spezifische NAADP-Antagonist BZ194 verhindert die NAADP-vermittelte  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER nach der Aktivierung der T-Zelle durch die spezifische Antigen-Erkennung.  $IP_3$  und cADPR sind zwar noch in der Lage  $Ca^{2+}$  freizusetzen. Aus dem im Mittel verringerten  $Ca^{2+}$ -Ausstrom ergibt sich jedoch ein geringerer  $Ca^{2+}$ -Einstrom und somit ein geringerer Anstieg der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Dies führt schließlich zu einer schwächeren T-Zellaktivierung. Die, durch die Inhibition mit BZ194 wegfallenden Komponenten der T-Zellaktivierung sind symbolisch in grau dargestellt.

Dies hat wiederum einen geringeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über CRAC-Kanäle zur Folge. Der verminderte Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration resultiert in einer geringeren Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und mündet schließlich in der beobachteten, reduzierten Proliferation der T-Zellen.

Dass die Inhibition des NAADP-Signalweges weitreichende Folgen für die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen hat, unterstützt die beschriebene *Trigger*-Funktion von NAADP. Danach löst NAADP zunächst ein kleines  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal aus, das durch die beiden weiteren  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden sekundären Botenstoffe  $\text{IP}_3$  und cADPR verstärkt wird. Gestützt wird diese Hypothese vor allem durch Ergebnisse, die den zeitabhängigen Konzentrationsverlauf dieser drei Botenstoffe beschreiben (Guse et al., 1995, 1999; Gasser et al., 2006). Die Konzentration von NAADP steigt nach der Aktivierung von T-Zellen innerhalb von Sekunden vor derjenigen von  $\text{IP}_3$  und cADPR an und zeigt einen biphasischen Verlauf (Gasser et al., 2006). NAADP spielt danach sowohl für das initiale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal als auch für die folgenden fünf bis 20 Minuten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Plateaus eine Rolle.  $\text{IP}_3$  zeigt einen monophasischen Anstieg nach wenigen Minuten und cADPR einen langsamen Anstieg innerhalb von zehn Minuten, der bis zu 60 Minuten anhält (Guse et al., 1995, 1999). Die Verwendung von drei unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden sekundären Botenstoffen ermöglicht der Zelle eine strikte Regulation zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Dies erscheint vor allem für T-Zellen sinnvoll, da auf der Ebene der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung über die Proliferation der T-Zelle und das Ausüben von Effektorfunktionen oder Anergie und Zelltod entschieden wird.

Der RyR scheint der NAADP-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal in T-Zellen zu sein (Langhorst et al., 2004; Dammermann und Guse, 2005). Zunächst wurde deshalb überprüft, welche Isoformen des RyR in den  $T_{\text{MBP}}$ -Zellen vorkommen. Es konnte gezeigt werden, dass in den  $T_{\text{MBP}}$ -Zellen auf mRNA-Ebene alle drei Isoformen und auf Proteinebene im wesentlichen der RyR1 exprimiert werden. Bindungsstudien mit [ $^3\text{H}$ ]-markiertem Ryanodin an isoliertem RyR1 aus Skelettmuskel belegen, dass NAADP die Bindung von Ryanodin an den RyR1 steigern kann (Dammermann et al., 2009). Da Ryanodin an den RyR nur in der offenen Konformation binden kann, ist die Bindung gleichzeitig ein Maß für die Offenwahrscheinlichkeit und somit die Kanalaktivität des RyR (Pessah et al., 1986; Imagawa et al., 1987; Chu et al., 1990; Tanna et al., 2006). Die durch NAADP gesteigerte Bindung von Ryanodin konnte durch BZ194 blockiert werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die BZ194-vermittelte Reduktion des globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in  $T_{\text{MBP}}$ -Zellen durch die Aufhebung des aktivierenden Effektes von NAADP auf die Offenwahrscheinlichkeit des RyR1 zustande kommt.

Neben dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal wurde auch die Motilität und Form der  $T_{\text{MBP}}$ -Zellen im Zweizellsystem nach der Aktivierung mit Astrozyten untersucht. Wie beschrieben, ergeben sich charakteristische Muster für T-Zellen mit einer starken oder einer schwachen  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort (siehe Abbildung 4.12). Erstere gehen in einen stationären Zustand über und runden sich ab, letztere bleiben mobil und verändern kontinuierlich ihre Form. Der NAADP-Antagonist BZ194 hat

keinen Effekt auf diese Bewegungsmuster der T-Zellen. Er erhöht allein den Anteil an T-Zellen mit einem schwachen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal (siehe Abbildung 4.14). Daraus resultiert wiederum eine erhöhte Motilität der T-Zellen im Mittel. Zuvor wurde *in vitro* bereits gezeigt, dass Formveränderungen in T-Zellen eine Folge veränderter cytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen sind (Donnadieu et al., 1994). Diese Ergebnisse werden durch die Analyse der Motilität der  $\text{T}_{\text{MBP}}$ -Zellen *in situ* unterstützt (Kawakami et al., 2005; Cordiglieri et al., 2010). Intravitales Imaging in EAE-Läsionen zeigt dieselben charakteristischen Muster für  $\text{T}_{\text{MBP-GFP}}$ -Zellen: Stationäre Zellen (35 %), die sich im Prozess der Antigenerkennung befinden, bewegen sich nur leicht um einen festen Punkt; mobile Zellen (65 %) bewegen sich hingegen mit hoher Geschwindigkeit durch das ZNS (Kawakami et al., 2005; Bartholomäus et al., 2009). In EAE-Läsionen von BZ194 behandelten Tieren erhöht sich der Anteil an mobilen Zellen von 65 % auf über 80 % und die mittlere Geschwindigkeit steigt deutlich an (Cordiglieri et al., 2010). Die Analyse der Bewegungsmuster einzelner Zellen zeigt auch hier, dass BZ194 nicht die Bewegung mobiler T-Zellen verändert, sondern dass durch die Inkubation mit BZ194 der Anteil an mobilen Zellen und somit die mittlere Geschwindigkeit erhöht wird. Dass die Motilität der T-Zellen durch das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nach der Antigenerkennung bestimmt wird, ergeben zwei weitere Imaging-Studien. In diesen wurde gezeigt, dass das Abstoppen von Thymozyten während der positiven Selektion und von naiven T-Zellen nach der Antigenerkennung auf dendritischen Zellen von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen abhängt (Bhakta et al., 2005; Skokos et al., 2007).

Weitere Belege für die Rolle des NAADP-Signalweges bei der Entwicklung der EAE liefern *in vivo* Studien (Cordiglieri et al., 2010). BZ194 ist damit der einzige der beschriebenen NAADP-spezifischen Inhibitoren, der nicht allein für die weitere Untersuchung des NAADP-Signalweges verwendet wurde, sondern auch erstmalig in einem pathophysiologischen Tiermodell erfolgreich getestet werden konnte. In, mit BZ194 behandelten Tieren zeigt die EAE einen deutlich schwächeren Krankheitsverlauf: die Schwere der Symptome ist reduziert und es kommt zu einer geringeren Entzündung des ZNS. Zudem befinden sich weniger  $\text{T}_{\text{MBP-GFP}}$ -Zellen im ZNS, dafür aber vermehrt in der Milz, den Lymphknoten und dem Blut. Dies ist allerdings nicht auf ein verändertes migratorisches Verhalten der T-Zellen zurückzuführen. Vielmehr geraten sie in einen Zustand der Nichtansprechbarkeit, der aber reversibel ist. Dafür sprechen auch erhöhte Level der Anergiefaktoren *egr2* und *egr3* in BZ194-inkubierten  $\text{T}_{\text{MBP}}$ -Zellen. Kontrollexperimente belegen, dass BZ194 schnell ausgewaschen werden kann und zuvor BZ194-inkubierte T-Zellen danach wieder vollständig reaktiv sind. Zudem ist BZ194 sehr spezifisch, indem sein Effekt nicht von den Antigen-präsentierenden Zellen abhängt. Auch wenn es nicht endgültig ausgeschlossen werden kann, scheint BZ194 ebenfalls keinen Effekt auf neuronale Zellen oder Gliazellen zu haben (Cordiglieri et al., 2010). Auffällig ist, dass naive T-Zellen und langlebige Gedächtniszellen wesentlich schlechter auf BZ194 ansprechen als die Effektorzellen. Interessanterweise korreliert dieser Effekt mit der Expression des möglichen NAADP-Rezeptors *RyR1*, der in den Effektorzellen stärker exprimiert wird als in den ande-

ren Zellen. Die Inhibition des NAADP-Signalweges scheint folglich die Steuerung und Reaktivierung autoaggressiver T-Zellen in ihrem Zielorgan zu unterdrücken und unterstreicht die Bedeutsamkeit dieses Signalweges.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der NAADP-Signalweg nicht nur entscheidend für die Antigen-abhängige Aktivierung von T-Zellen ist, sondern auch an der Entstehung Antigen-unabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beteiligt zu sein scheint: BZ194-vorinkubierte  $\text{T}_{\text{MBP}}$ -Zellen zeigten nach der Stimulation mit Astrozyten im Zweizellsystem in der Abwesenheit von MBP ein signifikant verringertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal (siehe Abbildung 4.15). Die Untersuchung von MHCII-vermittelten Antigen-unabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen in naiven T-Zellen durch die Arbeitsgruppe von Prof. Trautmann ergab, dass diese wichtig für das langfristige Überleben der T-Zellen sein können (Revy et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass es neben schwachen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen zu einer Polarisierung der Proteinkinase  $\text{C}\theta$  und einem lokalen Anstieg der Tyrosinphosphorylierung kommt, was schließlich zu einer schwachen Proliferation der T-Zellen führt. Dabei sprechen  $\text{CD4}^+$  T-Zellen leichter an als  $\text{CD8}^+$  T-Zellen. Zeitgleich wurde veröffentlicht, dass bei der Interaktion von T-Zellen und dendritischen Zellen ohne das spezifische Antigen die Leukozyten-spezifische Tyrosinkinase (Lck) aktiviert wird, wobei die  $\zeta$ -Kette des TCR nur teilweise und das  $\zeta$ -Ketten assoziierte Protein (ZAP-70) gar nicht phosphoryliert werden (Kondo et al., 2001). Des Weiteren kommt es zu einer Antigen-unabhängigen Expression der Cytokine  $\text{IL-12R}\beta_2$  und  $\text{IFN-}\gamma$ . Neben einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung konnte 2003 gezeigt werden, dass gegen  $\text{CD4}$  gerichtete Peptide oder Wildtyp-MHCII über die Inhibition der Adenylatcyclase und der Aktivierung von cAMP-Phosphodiesterasen einen Anstieg der cAMP-Konzentration verhindern können (Zhou und König, 2003), womit  $\text{CD4}$  kostimulatorische Eigenschaften zugeschrieben werden. Eine neuere Arbeit zeigt, dass T-Zellen auch in der Abwesenheit von MHC-Molekülen in Kontakt mit dendritischen Zellen überleben können (Feuillet et al., 2005). Zudem sind das kostimulierende Molekül  $\text{CD28}$  und das Adhäsionsmolekül  $\text{LFA-1}$  beteiligt. Außerdem kann das Überleben der T-Zellen zellunabhängig durch die Cytokine  $\text{IL-4}$  und  $\text{IL-7}$  vermittelt werden. Untersuchungen in Antigen-spezifischen TCR-transgenen und polyklonalen  $\text{CD4}^+$  Gedächtniszellen belegen ebenfalls, dass die Homöostase der T-Zellen abhängig von den Cytokinen  $\text{IL-15}$  und  $\text{IL-7}$ , aber unabhängig von MHCII ist (Kondrack et al., 2003; Lenz et al., 2004; Purton et al., 2007). Daraus lässt sich schließen, dass die Reduktion der MHCII-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale durch die Inhibition des NAADP-Signalweges in den T-Zellen keineswegs zu einem verminderten Überleben der T-Zellen führen muss. Diese Schlussfolgerung wird durch die Tatsache unterstützt, dass nicht stimulierte  $\text{T}_{\text{MBP}}$ -Zellen eine 48-stündige Inkubation mit BZ194 tolerierten (Dammermann et al., 2009). Vielmehr scheint die reduzierte, Zell-Zell-Kontakt vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort der  $\text{T}_{\text{MBP}}$ -Zellen in der Abwesenheit des Antigens ebenso auf einen Zustand der Nichtansprechbarkeit hinzudeuten. Dieser Zustand ist reversibel und T-Zellen sind nach dem Auswaschen von BZ194 erneut in der Lage, auf ihr Antigen zu rea-

gieren (Dammermann et al., 2009). In der Veröffentlichung von Kondo et al. (2001) wurde ein Modell vorgeschlagen, bei dem die T-Zellen durch die Interaktion mit dendritischen Zellen sensibilisiert werden und deshalb schneller auf die Präsentation eines Antigenes ansprechen. Das wäre von Vorteil für die Entwicklung einer schützenden Immunantwort, könnte aber auch unerwünschte Autoimmunantworten begünstigen. Weitere Studien in naïven und Gedächtnis-T-Zellen sprechen ebenfalls dafür, dass das MHCII-vermittelte Signal die Sensitivität der T-Zellen erhöht (Kassiotis et al., 2002; Stefanová et al., 2002). Es wäre daher denkbar, dass durch die Inhibition des NAADP-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in der Abwesenheit des Antigenes eine Sensibilisierung der T-Zellen unterbunden würde und sie auf diese Weise schlechter auf das Antigen MBP ansprechen.

Gegenwärtige T-Zell-basierte Therapieansätze der Multiplen Sklerose versuchen die Migration der T-Zellen durch die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS zu verhindern oder eine Reaktivierung der T-Zellen zu unterbinden (Lopez-Diego und Weiner, 2008). Ein generelles Unterdrücken der T-Zellantwort kann jedoch zur Immunsuppression führen und Infektionen begünstigen. Zum Beispiel entwickelte sich durch den Einsatz eines VLA4-Antikörpers, der die Bindung an VCAM1 und somit die Wanderung der T-Zellen in das ZNS verhindern soll, in einigen Fällen eine schwere Viruserkrankung, die progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML) (Kleinschmidt-DeMasters und Tyler, 2005; Langer-Gould et al., 2005). Antigen-spezifische Therapien versuchen die Immunsuppression zu umgehen, indem T-Zellen durch synthetische Peptide oder veränderte Peptidliganden inaktiviert werden und daraus eine Antigen-spezifische Toleranz entsteht. Trotz der hohen Spezifität kann diese Therapie einen geringen Effekt aufweisen, da in diesem Fall nur ein antigener T-Zellrezeptor einer polyklonalen T-Zellpopulation angesprochen wird. Außerdem kann es sogar zu einer Verschlechterung der Autoimmunerkrankung oder zum Auftreten allergischer Reaktionen kommen.

Durch den Einsatz von BZ194 konnte im Tiermodell der Verlauf der EAE abgeschwächt und ihr Auftreten reduziert werden (Cordiglieri et al., 2010). Auch wenn aufgrund der fehlenden Antigen-spezifität von BZ194 ein möglicher immunsuppressiver Effekt berücksichtigt werden muss, bietet der NAADP-Antagonist einige Vorteile. Zunächst greift er durch die Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals sehr früh in die T-Zellaktivierung ein. Des Weiteren ist BZ194 sehr spezifisch, ohne die  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Wirkung der sekundären Botenstoffe  $\text{IP}_3$  und cADPR zu beeinträchtigen oder andere Zellen des Immunsystems zu beeinflussen (Dammermann et al., 2009; Cordiglieri et al., 2010). Schließlich zeigt BZ194 auch nach dem Einsetzen klinischer Symptome eine, wenn auch schwächere Wirkung. Die Inhibition des NAADP-Signalweges könnte deshalb ein viel versprechender Ansatz für die zukünftige Therapie von Autoimmunerkrankungen sein.

### 5.2.3 Die Bedeutung von NAADP für die $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in Cardiomyozyten der Maus

Die  $\beta$ -adrenerge Stimulation der Cardiomyozyten mit Isoprenalin führte zur Entstehung zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten während der elektrischen Stimulation. Erstaunlicherweise konnte dieser proarrhythmische Effekt durch die Antagonisierung von NAADP mittels 1 mM BZ194 vollständig unterdrückt werden (siehe Abbildung 4.20). Mit 0,5 mM BZ194 wurde bereits eine signifikante Reduktion zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten erreicht, ohne dass der Antagonist einen Effekt auf die Amplitude oder die reziproke Zeitkonstante gehabt hätte. Mit 1 mM BZ194 kam es in der Anwesenheit von 200 nM Isoprenalin zu einer signifikanten Reduktion der reziproken Zeitkonstante um 15 %. Eine erniedrigte reziproke Zeitkonstante bedeutet, dass es länger dauert, bis das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal wieder abklingt. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Wiederaufnahme des  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR behindert ist. Allerdings handelte es sich hier nur um einen leichten Effekt und die reziproke Zeitkonstante zeigte immer noch eine Steigerung um über 100 % im Vergleich zur Kontrolle ohne Isoprenalin. BZ194 ist ein spezifischer NAADP-Antagonist, der die NAADP-induzierte, gesteigerte Offenwahrscheinlichkeit des RyR1 vermindern kann (Dammermann et al., 2009). Allerdings konnte Prof. Hohenegger (Universität Wien) nahezu keinen Effekt von NAADP auf die Offenwahrscheinlichkeit des Subtyps 2 des RyR, der im Herzen exprimiert wird, nachweisen (unveröffentlichte persönliche Mitteilung von Prof. Hohenegger). Es stellte sich daher die Frage, auf welche Art und Weise das zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ , das die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten entstehen lässt, freigesetzt wird.

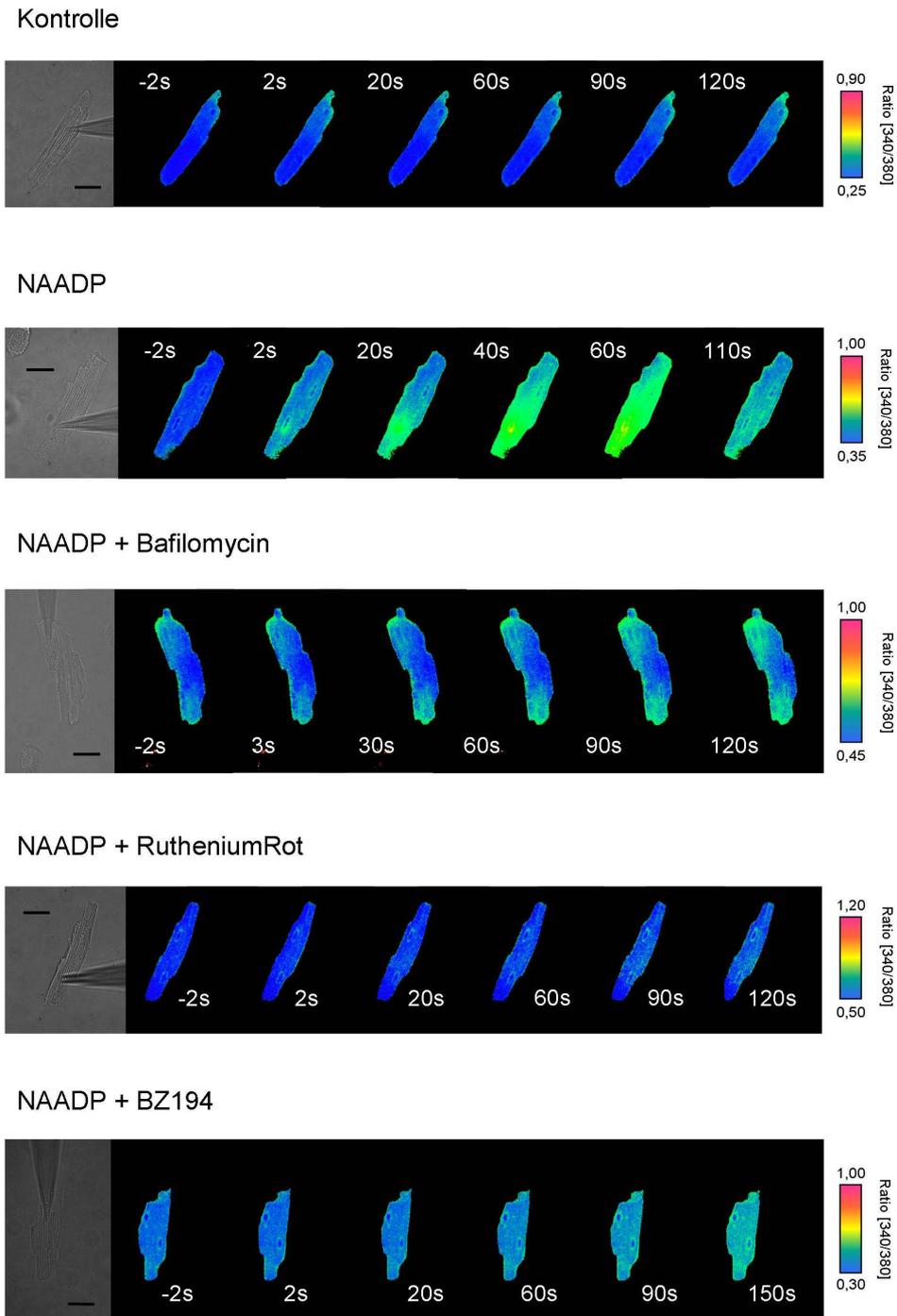
In der Literatur findet sich bisher eine Veröffentlichung, die einen Effekt von NAADP auf die EKK in Cardiomyozyten beschreibt. Darin steigert NAADP die Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in ventrikulären Cardiomyozyten von Meerschweinchen (Macgregor et al., 2007a). Dieser Effekt ist wahrscheinlich von einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation abhängig, da die Inkubation mit Isoprenalin erhöhte NAADP-Level ergab. Interessanterweise ist der NAADP-induzierte Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude sensitiv für Bafilomycin A1 und Ryanodin, was eine Beteiligung der Lysosomen und des SR bedeutet. Es wurden keine zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten beschrieben, allerdings wurden die Zellen nur mit 5 nM Isoprenalin stimuliert. Diese Konzentration liegt unter der Konzentration von 10 nM, bei der in unserem System vermehrt spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten auftraten. Macgregor et al. (2007a) postulieren, dass nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation gebildetes NAADP  $\text{Ca}^{2+}$  aus sauren Kompartimenten der Zelle freisetzt. Durch die Nähe zur SERCA kann das  $\text{Ca}^{2+}$  sofort in das SR aufgenommen werden und die Beladung des SR erhöhen. Auf diese Weise kann bei der nächsten Stimulation mehr  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR freigesetzt werden.

Der Einsatz von Bafilomycin A1 in unserem System hatte ebenfalls einen bedeutenden Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung der Cardiomyozyten. Durch diesen Inhibitor der  $\text{H}^+$ -ATPase der Lysosomen konnten die, durch Isoprenalin spontan hervorgerufenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten fast vollständig blockiert werden (siehe Abbildung 4.25). Es stellt sich die Frage, welchen Anteil die

Lysosomen als  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher an der globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung einer Zelle haben können. Bisher wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Lysosomen selten bestimmt. In Makrophagen und in Fibroblasten liegt sie zwischen 400 und 600  $\mu\text{M}$ , einer Größenordnung, die vergleichbar mit der des ER ist (Miyawaki et al., 1997; Christensen et al., 2002; Lloyd-Evans et al., 2008). Die Zerstörung des Protonengradienten der Lysosomen, zum Beispiel durch Bafilomycin A1, führt auch zum Verlust des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten und zu einem Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Christensen et al., 2002). Es wird daher angenommen, dass Lysosomen als  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher durchaus an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in Zellen beteiligt sein können (Churchill et al., 2002; Patel und Docampo, 2010).

Unter Verknüpfung der in dieser Arbeit erhobenen Daten und des vorgeschlagenen Modells von Macgregor et al. (2007a) ist es vorstellbar, dass eine starke  $\beta$ -adrenerge Stimulation wie in unserem System zu einer verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus lysosomalen Speichern durch NAADP und einer gesteigerten Beladung des SR führt. Dies könnte dann zusätzlich zur beschriebenen Amplitudenerhöhung zur Induktion zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten führen. Ebenfalls denkbar wäre, dass aus den Lysosomen freigesetztes  $\text{Ca}^{2+}$  als Co-Agonist den RyR sensitivieren würde und auf diese Weise vermehrt  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR ausströmen würde.

Infusionsexperimente mit NAADP in ventrikulären Cardiomyozyten der Maus von Dr. Siebrands (vormals Institut für Biochemie und Molekularbiologie I) unterstützen diese Hypothese und belegen erstmalig, dass NAADP direkt in der Lage ist, ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in ventrikulären Cardiomyozyten auszulösen (Abbildung 5.4, unveröffentlichte persönliche Mitteilung von Dr. Siebrands). In diesen Versuchen bewirkte infundiertes NAADP einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit einem Maximum bei knapp 40 nM NAADP. Der Effekt von NAADP konnte durch 0,5  $\mu\text{M}$  Bafilomycin A1 oder den RyR-Inhibitor 10  $\mu\text{M}$  Ruthenium Rot blockiert werden. Demzufolge sind die Lysosomen und das SR an dem NAADP-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg beteiligt. Des Weiteren konnte Dr. Siebrands zeigen, dass ein NAADP-induziertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal mit 10  $\mu\text{M}$  ko-infundiertem BZ194 verhindert werden kann. Dies unterstützt weiter die Spezifität von BZ194 für NAADP. Dass in den Infusionsexperimenten wesentlich niedrigere Konzentrationen an BZ194 verwendet werden konnten als bei der extrazellulären Applikation von BZ194 für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Imagingversuche unter elektrischer Stimulation, könnte auf eine lediglich moderate Membranpermeabilität der Substanz zurückzuführen sein. Zudem wäre die Aktivierung von Transportern, die BZ194 wieder aus der Zelle befördern, denkbar. Diese Annahme bestätigen auch die Versuche in den T-Zellen, bei denen eine mehrstündige Inkubation mit BZ194 nötig war, um einen Effekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung zu haben (Dammermann et al., 2009). Der Zelltyp und die Art der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale scheinen dabei eine wesentliche Rolle zu spielen. In Cardiomyozyten konnte bereits nach einstündiger Inkubation mit BZ194 fast alle zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten blockiert werden, für einen maximalen Effekt in T-Zellen war hingegen eine 20-stündige Inkubation nötig.



**Abbildung 5.4: Induktion eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in ventrikulären Cardiomyozyten durch infundiertes NAADP.** Erhebung der Daten durch Dr. Cornelia Siebrands (ehemals Institut für Biochemie und Molekularbiologie I). Cardiomyozyten wurden mit Fura-2 AM beladen und ihr  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal am Fluoreszenzmikroskop nach der Infusion von 30 nM NAADP oder Intrazellulärpuffer als Kontrolle gemessen. Für die Inhibitionsexperimente wurden die Zellen entweder 20 Minuten mit 0,5  $\mu\text{M}$  Bafilomycin A1 vorinkubiert oder 10  $\mu\text{M}$  Ruthenium Rot beziehungsweise 10  $\mu\text{M}$  BZ194 mit NAADP ko-infundiert. Es sind Durchlichtbilder und farbkodierte Bilder repräsentativer Einzelzellen dargestellt. Unterschiedliche Bereiche für das Ratio (340/380) wurden aufgrund technischer Veränderungen des Systems gewählt. Maßstab = 30  $\mu\text{m}$ .

Sofern NAADP in der Lage sein sollte,  $\text{Ca}^{2+}$  aus den Lysosomen der Cardiomyozyten freizusetzen, wären neben dem RyR weitere Kanäle an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung beteiligt. Vor kurzem wurden *Two-pore channels* (TPCs) als neue NAADP-sensitive Ionenkanäle identifiziert, die in der Membran von sauren Vesikeln lokalisiert sind (Brailoiu et al., 2009; Calcraft et al., 2009; Zong et al., 2009). TPCs kommen in drei Isoformen vor und gehören zur Superfamilie der Spannungs-gesteuerten Ionenkanäle (Ishibashi et al., 2000; Anderson und Greenberg, 2001). Im Menschen existieren die Isoformen TPC1 und TPC2, wobei hauptsächlich TPC2 in den Lysosomen exprimiert wird (Brailoiu et al., 2009; Calcraft et al., 2009). Für TPC1 und TPC2 wurde die Expression auf mRNA-Ebene im Herzen der Maus beschrieben (Zong et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von TPC1 und TPC2 auf mRNA-Ebene in ventrikulären Cardiomyozyten der Maus nachgewiesen werden (nicht abgebildet), so dass sie als NAADP-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in unserem System in Betracht kommen. Neueste Studien wurden vornehmlich mit TPC2 durchgeführt. In *Patch-Clamp* Messungen von Lysosomen, die aus TPC2-überexprimierenden HEK293-Zellen gewonnen wurden, konnte eine Abhängigkeit des NAADP-induzierten Stroms von der luminalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und dem pH-Wert festgestellt werden (Schieder et al., 2010). Diese Ergebnisse konnten im wesentlichen in Messungen der Offenwahrscheinlichkeit rekombinanter TPC2-Kanäle, die in künstliche Lipiddoppelschichten eingebracht worden waren, bestätigt werden (Pitt et al., 2010). Die Reaktion von TPC2 auf nanomolare Konzentrationen von NAADP wird hierbei durch die luminalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und den luminalen pH-Wert bestimmt. Bei einem Abfall der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $200 \mu\text{M}$  auf  $10 \mu\text{M}$  und einem Anstieg des pH-Wertes von 4,8 auf 7,2 sinkt die Offenwahrscheinlichkeit des TPC2-Kanals und die Bindung zu NAADP wird irreversibel. Dies würde ermöglichen, dass NAADP erst von dem Kanal dissoziieren könnte, wenn sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher wieder regeneriert haben und die Auslösung eines neuen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals möglich wäre. Allerdings wurde für TPC2 eine geringe Offenwahrscheinlichkeit sowie eine geringe Leitfähigkeit für  $\text{Ca}^{2+}$  im Vergleich zum RyR und  $\text{IP}_3\text{R}$  beobachtet (Ehrlich und Watras, 1988; Tinker und Williams, 1992; Bezprozvanny und Ehrlich, 1994; Pitt et al., 2010). Ein geringer NAADP-induzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom über TPC2 unter physiologischen Bedingungen könnte die notwendige Amplifikation der lysosomalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale über CICF durch die Nähe zu RyR und  $\text{IP}_3\text{R}$  am SR erklären (Kinnear et al., 2004, 2008; Calcraft et al., 2009). Der oben bereits erwähnte NAADP-Inhibitor Ned-19 konnte die Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit durch NAADP mit einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  inhibieren (Pitt et al., 2010). Bei niedrigeren Konzentrationen steigerte er jedoch ebenfalls die Offenwahrscheinlichkeit des TPC2 und erzeugte zusammen mit NAADP sogar einen kumulativen Effekt. Ned-19 wurde in dieser Veröffentlichung als nicht kompetitiver NAADP-Inhibitor bestätigt.

Weniger Anhaltspunkte gibt es für eine Beteiligung des lysosomalen TRP-ML1-Kanals am NAADP-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal. Einzelkanalmessungen an aufgereinigten Lysosomen aus der Leber und den Koronararterien in künstlichen Lipiddoppelschichten zeigten eine NAADP-

konzentrationsabhängige Kanalaktivität, die durch einen gegen TRP-ML1 gerichteten Antikörper blockiert werden konnte (Zhang und Li, 2007; Zhang et al., 2009a). In intakten Myozyten der Koronararterien konnte durch Endothelin-1 ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal erzeugt werden, das durch eine verringerte Expression des TRP-ML1 mit Hilfe der RNA-Interferenz reduziert wurde (Zhang et al., 2009a).

### **Die Beteiligung weiterer Signalkomponenten an der Entstehung zusätzlicher $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten**

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass NAADP die Entstehung zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten über Lysosomen nach einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation vermittelt. Die weiteren Untersuchungen sollten Hinweise auf die Verknüpfung zwischen einer Aktivierung des  $\beta$ -Adrenozeptors und dem Auftreten zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten liefern.

Es ist bekannt, dass Isoprenalin zur Bildung von cAMP führt und auf diese Weise die PKA aktiviert (Bers, 2002). Des Weiteren wurde die Aktivierung von Epac beschrieben, das zur Aktivierung der CaMKII führen kann (Oestreich et al., 2007, 2009). Durch die Verwendung von cAMP-Analoga, die bevorzugt die PKA oder Epac aktivieren, konnte gezeigt werden, dass allein die Aktivierung der PKA ausreicht, um in unserem System zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten zu erzeugen (siehe Abbildung 4.21). Falls NAADP beteiligt sein sollte, müsste es demnach zeitlich nachgeordnet nach der Aktivierung der PKA gebildet werden.

Dennoch konnte an diesem Punkt eine Beteiligung der CaMKII nicht ausgeschlossen werden, da diese nach der  $\beta$ -adrenergen Stimulation auch PKA-abhängig aktiviert werden kann. Die Aktivität der CaMKII ist abhängig von der Frequenz und Größe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen (De Koninck und Schulman, 1998). Beides wird nach der  $\beta$ -adrenergen Stimulation erhöht (Grimm und Brown, 2010). Wird ein Anstieg der freien cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle nach einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation verhindert, kommt es auch nicht zur CaMKII-abhängigen Phosphorylierung von Phospholamban an Thr17 (Kuschel et al., 1999; Bartel et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Ser16 durch die PKA nach einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation in perfundierten Herzen der Ratte der Phosphorylierung an Thr17 durch die CaMKII vorausgeht (Kuschel et al., 1999). Des Weiteren ist die Phosphorylierung von Thr17 an Phospholamban und von Ser2815 am RyR2 durch die CaMKII von der PKA abhängig (Said et al., 2002; Ferrero et al., 2007). Es wird daher angenommen, dass die PKA die Aktivierung der CaMKII durch einen PKA-abhängigen Anstieg der freien cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bewirkt (Grimm und Brown, 2010).

Einige Veröffentlichungen belegen, dass die CaMKII relevant für die Entwicklung von Arrhythmien sein kann. Nach der Stimulation mit Isoprenalin kam es in ventrikulären Cardiomyozyten von Kaninchen zu einem verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck aus dem SR, das durch die CaMKII, aber nicht durch die PKA vermittelt wurde (Curran et al., 2007). Ein gesteigerter  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom

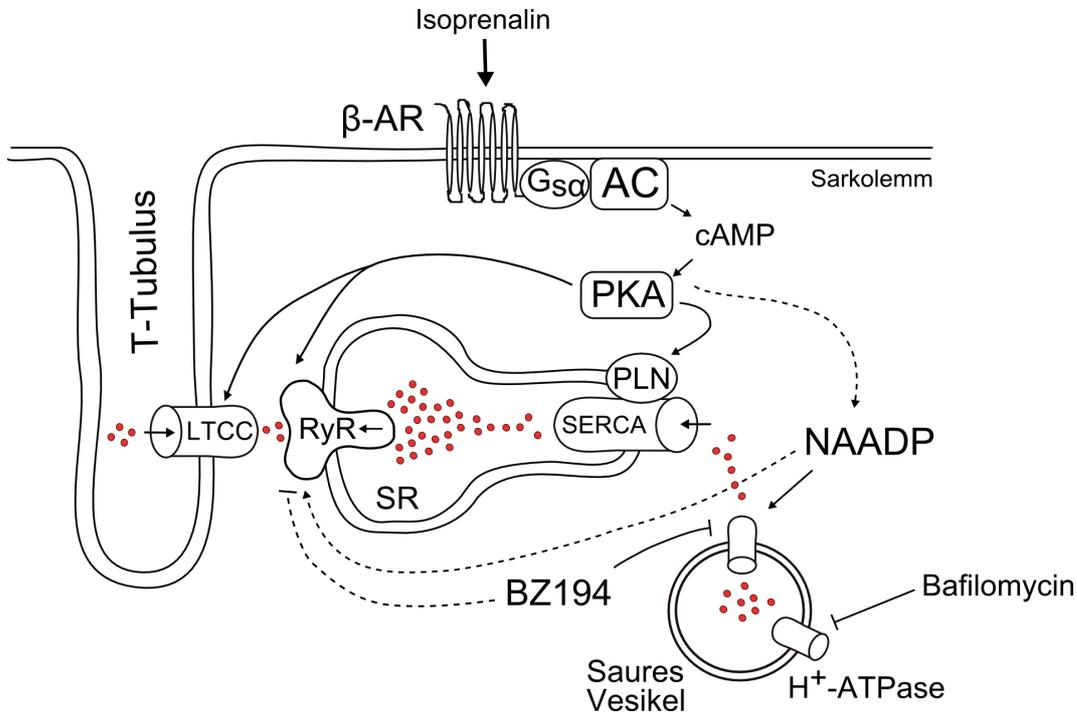
aus dem SR während der Diastole kann zur Entwicklung von Arrhythmien beitragen. Ferner konnte gezeigt werden, dass Arrhythmien, die nach einer Acidose entstehen, von der Aktivität der CaMKII abhängen (Said et al., 2008). Sag et al. (2009) haben herausgefunden, dass die CaMKII zur Entstehung von Arrhythmien in (CaMKII) $\delta_C$ -transgenen Mäusen beiträgt. Diese Mäuse haben im Vergleich zu Tieren des Wildtyps ein erhöhtes Auftreten von EADs unter normalen Bedingungen und zeigen vermehrt DADs nach der Stimulation mit Isoprenalin. Isoprenalin erhöht auch das Auftreten von unstimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ereignissen und kann Arrhythmien *in vivo* auslösen. Alle diese Ereignisse konnten jedoch durch die Inhibition der CaMKII reduziert oder sogar vollständig verhindert werden.

Die Inhibition der CaMKII mit dem Inhibitor KN-93 konnte die Entstehung von zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in unserem System verhindern, ohne einen Effekt auf die Amplitude oder die reziproke Zeitkonstante zu haben (siehe Abbildung 4.22). Allerdings wurden die zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten auch durch das gegenüber der CaMKII inaktive Analogon KN-92 unterdrückt. Einige Veröffentlichungen beschreiben unspezifische Effekte für KN-92 und KN-93 (Deschênes et al., 2002; Gao et al., 2006; Rezazadeh et al., 2006). Vor allem relevant für unser System ist, dass beide Substanzen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Gao et al., 2006) und  $\text{K}_V$ -Kanäle (Rezazadeh et al., 2006) beeinträchtigen können, die an der Entstehung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms und des  $\text{I}_{\text{Kur}}$ -Stroms beteiligt sind (Nerbonne und Kass, 2005). Es wäre also denkbar, dass dadurch der Verlauf des Aktionspotentials verändert wird und dies wiederum die Entstehung zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten vermindert.

Aus diesem Grund wurde zusätzlich das CaMKII-spezifische inhibitorische Peptid AIP eingesetzt, für das bisher keine unspezifischen Effekte beschrieben wurden. Da es jedoch in unserem System keinen inhibitorischen Effekt gezeigt hat (siehe Abbildung 4.23), wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die Entstehung zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in unserem System hauptsächlich auf die Aktivität der PKA zurückzuführen ist und die CaMKII vermutlich eine geringe Rolle spielt.

Nach den gewonnenen Ergebnissen kann ein Modell entworfen werden, nach dem NAADP vermutlich PKA-abhängig nach der Stimulation mit Isoprenalin gebildet wird (Abbildung 5.5). Dies wird durch die Ergebnisse von Macgregor et al. (2007a) unterstützt. Allerdings sollte nicht die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass auch eine gleichbleibende NAADP-Konzentration eine Sensitivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Systems bewirken könnte, die sich additiv auf den Effekt einer Stimulation mit Isoprenalin auswirken würde. NAADP kann lysosomale,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Ionenkanäle, bei denen es sich um TPCs handeln könnte, aktivieren. Ausströmendes  $\text{Ca}^{2+}$  kann in das benachbarte SR aufgenommen werden und dort die  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung erhöhen. Dadurch würde die Entstehung spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten begünstigt werden. Zusätzlich wäre auch eine direkte Wirkung des  $\text{Ca}^{2+}$  als Co-Agonist auf den RyR denkbar. Eine Sensibilisierung des RyR durch NAADP würde einen weiteren Ausstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR begünstigen. Nach den Daten von Prof. Hohenegger (Universität Wien)

scheint NAADP allerdings keinen nennenswerten Effekt auf den RyR2 zu haben.



**Abbildung 5.5: Modell der Entstehung zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in murinen Cardiomyozyten nach der Stimulation mit Isoprenalin.** Isoprenalin aktiviert den  $\beta$ -adrenergen Rezeptor. Dieser ist an das G-Protein  $G_{s\alpha}$  gekoppelt, worüber es zur Aktivierung der Adenylatcyclase kommt. Die Adenylatcyclase bildet cAMP, das die PKA aktiviert. Durch die PKA könnte es zur Bildung von NAADP kommen. NAADP aktiviert wiederum  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in den sauren Vesikeln. Ausströmendes  $\text{Ca}^{2+}$  wird durch die benachbarte SERCA in das SR aufgenommen. Dadurch erhöht sich die Beladung des SR, dessen Überbeladung zur Entstehung spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten führt. Die PKA phosphoryliert außerdem den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal (LTCC), den RyR und das Phospholamban (PLN), wodurch die Kontraktion verstärkt und die Relaxation beschleunigt wird. Eine zusätzliche Wirkung von NAADP auf den RyR erscheint nach dem jetzigen Kenntnisstand eher unwahrscheinlich. Die NAADP-vermittelten Effekte können durch den NAADP-spezifischen Antagonisten BZ194 inhibiert werden. Bafilomycin A1 blockiert die vaskuläre  $\text{H}^{+}$ -ATPase, wodurch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient zwischen den sauren Vesikeln und dem Cytoplasma aufgehoben wird. Der Verlust des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten verhindert, dass  $\text{Ca}^{2+}$  aus den sauren Vesikeln freigesetzt werden kann und verhindert so die Entstehung zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten.

### 5.3 Der NAADP-Signalweg in unterschiedlichen Zellmodellen

Bei den Untersuchungen des NAADP-Signalweges hat sich herausgestellt, dass in Abhängigkeit vom Zelltyp unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher und Rezeptoren an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch NAADP beteiligt sind. Die vorliegende Arbeit bestätigt bisherige Ergebnisse, die eine unterschiedliche Wirkungsweise für NAADP in Herzzellen und in T-Zellen beschreiben. Es wird kontrovers diskutiert, ob saure  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher oder das SR/ER sensitiv für NAADP sind. Damit einhergehend stellt sich die Frage, ob der RyR am SR/ER oder Kanäle in der Membran

der sauren Vesikel wie zum Beispiel TPCs auf NAADP reagieren. Immer mehr Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass NAADP tatsächlich auf unterschiedliche Rezeptoren wirken kann, womit unterschiedliche Mechanismen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung abhängig vom zellulären System verbunden sind.

Es ist offensichtlich, dass T-Zellen und Cardiomyozyten völlig verschiedene Funktionen im Organismus übernehmen, woraus eine jeweils andere Anforderung an die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in den Zellen resultiert. Herzzellen müssen kontinuierlich 60- bis 70-mal in der Minute kontrahieren, was bedeutet, dass die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in kürzester Zeit ansteigt, aber das  $\text{Ca}^{2+}$  auch ebenso effektiv wieder aus der Zelle befördert werden muss. Überschüssiges  $\text{Ca}^{2+}$  kann in Herzzellen schnell zu arrhythmischen Ereignissen führen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in T-Zellen spielt sich hingegen in einem völlig anderen Zeitrahmen ab. Eine adaptive Immunantwort, für deren erfolgreichen Verlauf die Antigen-spezifischen T-Zellen stark proliferieren müssen, dauert mehrere Tage an. Für ihre Aktivierung und Vermehrung muss das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in den T-Zellen über mehrere Stunden erhöht sein. Des Weiteren kann die Art des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals über den weiteren Verbleib der T-Zelle entscheiden - Aktivierung, Apoptose oder Anergie - und somit eine entscheidende Rolle bei der Entstehung autoreaktiver Immunantworten spielen.

Studien zur NAADP-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in T-Zellen wurden hauptsächlich in der T-Zelllinie Jurkat in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Dabei scheint NAADP den RyR am ER zu aktivieren und somit auf denselben  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher wie  $\text{IP}_3$  und cADPR zu wirken. Mit Ruthenium Rot, einem Inhibitor des RyR, konnte das NAADP-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in Mikroinjektionen reduziert werden (Langhorst et al., 2004). Eine verminderte Expression des RyR durch den Einsatz von *antisense*-RNAs konnte ebenfalls NAADP-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale hemmen. In hochauflösendem  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging konnten zudem durch NAADP ausgelöste lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale mit einer Amplitude von 30 bis 100 nM identifiziert werden (Dammermann und Guse, 2005). Diese konnten ebenfalls mit Ruthenium Rot und Ryanodin oder durch die Verwendung von *antisense*-RNAs gegen den RyR unterdrückt werden. Ein intaktes ER scheint notwendig für das NAADP-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal zu sein, da die Inkubation mit Tg eine weitere Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER durch NAADP weitgehend verhindert (Steen et al., 2007). Hingegen zeigte der Einsatz von Bafilomycin A1, wodurch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient zwischen lysosomalen Speichern und dem Cytoplasma zerstört wird, keinen Effekt. Die kürzlich veröffentlichten [ $^3\text{H}$ ]-Ryanodin-Bindungsstudien an isolierten RyR des Subtyps 1 belegen, dass NAADP die Offenwahrscheinlichkeit des RyR erhöhen kann (Dammermann et al., 2009). BZ194 blockiert diesen Effekt und der erfolgreiche Einsatz dieses NAADP-spezifischen Inhibitors in primären T-Zellen unterstützt die Hypothese, dass NAADP  $\text{Ca}^{2+}$  über den RyR1 freisetzt.

Untersuchungen in glatten und gestreiften Muskelzellen deuten hingegen eher auf eine Beteiligung lysosomaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher hin. In den glatten Muskelzellen der Herzkranzgefäße

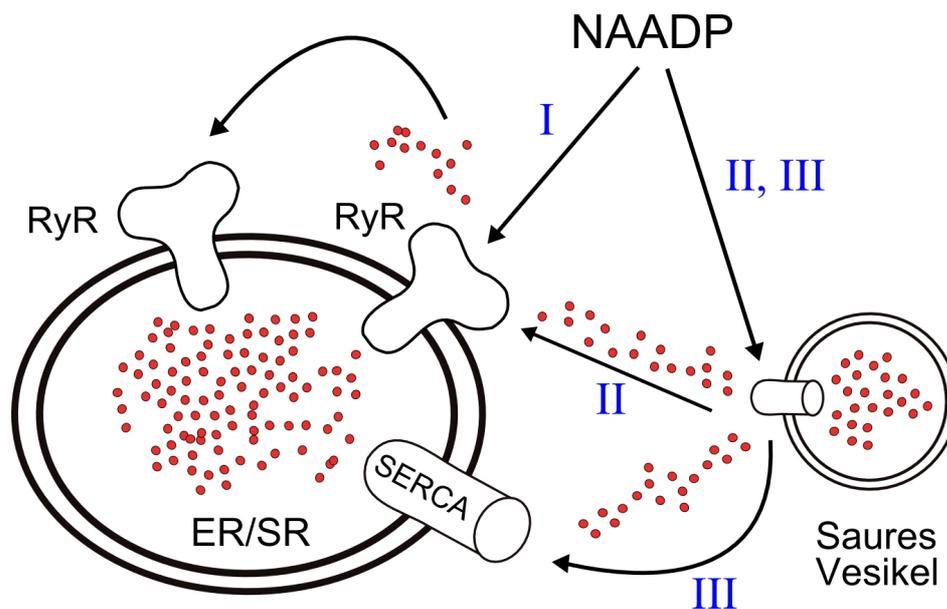
konnte durch Endothelin-1 ein Anstieg der NAADP-Konzentration gemessen und ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal beobachtet werden (Zhang et al., 2006). Letzteres konnte nur teilweise mit Ryanodin, aber vollständig mit Bafilomycin A1 blockiert werden. In glatten Muskelzellen der Pulmonararterien induzierte NAADP lokal begrenzte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale, die ein globales  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal und daran anschließende Kontraktionen auslösten (Boittin et al., 2002). Die Inkubation mit Tg oder Ryanodin konnte nur die globalen, nicht aber die lokalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale verhindern. Des Weiteren gibt es eine Arbeit in ventrikulären Cardiomyozyten, die oben bereits beschrieben wurde (Macgregor et al., 2007a). NAADP steigerte in diesen Versuchen die Amplitude von globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen und von  $\text{Ca}^{2+}$ -Spikes. Obwohl Ryanodin zusammen mit Tg die Amplitude globaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale wieder senkte, reichte allein die Inkubation mit Bafilomycin A1 aus, um den NAADP-vermittelten Effekt auf die Amplitude zu unterdrücken. Nur die Veröffentlichung von Mojzisoová et al. (2001) beschreibt eine direkte Wirkung von NAADP auf die Offenwahrscheinlichkeit des RyR2 von Hunden. Allerdings wurde auch beschrieben, dass NAADP keinen Effekt auf eine der drei Isoformen des RyR hat (Copello et al., 2001; Pitt et al., 2010), was auch den Bindungsstudien sowie den Einzelkanalstudien von Prof. Hohenegger am RyR1 widerspricht (Hohenegger et al., 2002; Dammermann et al., 2009).

Auch in Zellen des Pankreas wurden sowohl Hinweise auf die Beteiligung des RyR als auch lysosomaler Speicher am NAADP-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal gefunden. Photoaktiviertes NAADP kann  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen in Azinuszellen induzieren, die durch die Zerstörung der Lysosomen durch GPN blockiert werden (Yamasaki et al., 2004). Des Weiteren kann NAADP  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in der  $\beta$ -Zelllinie MIN6 auslösen, die durch Bafilomycin A1, nicht aber durch Tg gehemmt werden können (Mitchell et al., 2003; Yamasaki et al., 2004). Demgegenüber stehen Studien in Azinuszellen, die davon ausgehen, dass NAADP  $\text{Ca}^{2+}$  sowohl aus lysosomalen Speichern als auch aus dem ER und der Kernhülle freisetzen kann (Gerasimenko et al., 2003b, 2006).

Weitere Studien in PC12-Zellen und Astrozyten unterstützen die Hypothese, dass ein intaktes SR für die vollständige Wirkung von NAADP notwendig ist, jedoch die Inhibition der Lysosomen allein ausreicht, um den  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Effekt von NAADP vollständig zu unterdrücken (Heidemann et al., 2005; Brailoiu et al., 2006).

Ohne sich zunächst auf den Zelltyp festzulegen, kommen drei verschiedene Szenarien für den NAADP-Signalweg in Frage (Abbildung 5.6). (I) NAADP wirkt direkt auf den RyR am ER/SR und löst so ein *Trigger*-Signal aus, dass über CICF von dem  $\text{IP}_3\text{R}$  und dem RyR verstärkt wird. (II) NAADP aktiviert  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Membran lysosomaler Vesikel. Ausströmendes  $\text{Ca}^{2+}$  dient ebenfalls als *Trigger* und aktiviert  $\text{IP}_3\text{R}$  und RyR über CICF. (III) NAADP wirkt wiederum auf lysosomale  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher; das  $\text{Ca}^{2+}$  wird jedoch durch räumliche Nähe zur SERCA sofort in das ER/SR aufgenommen und erhöht so die Beladung dieser Speicher. Das Szenario III wurde von Macgregor et al. (2007a) in ventrikulären Cardiomyozyten vorgeschlagen, in denen eine erhöhte Beladung des SR nach der Photoly-

se von NAADP nachgewiesen wurde. Unsere Daten unterstützen dieses Modell, da sowohl der NAADP-spezifische Inhibitor BZ194 als auch Bafilomycin A1 die Entstehung zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in diesen Zellen unterdrücken. Dennoch kann natürlich nicht eine direkte Wirkung des  $\text{Ca}^{2+}$  auf den RyR wie in Szenario II ausgeschlossen werden. Dafür spricht auch, dass Lysosomen und das SR in der Zelle Kontaktstellen zueinander ausbilden können und auf diese Weise eine *Trigger-Zone* für das NAADP-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal schaffen (Kinnear et al., 2004, 2008). Für T-Zellen gibt es im Gegensatz zu allen anderen Zelltypen bis jetzt keine Hinweise auf eine Beteiligung lysosomaler Speicher an der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  durch NAADP. Die bisherigen Daten lassen deshalb derzeit auf das Modell I schließen. Da der RyR über CICF aktiviert werden kann, ist es schwer, einen direkten und einen indirekten Effekt auf diesen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal zu unterscheiden. Durch die unterschiedliche Wirkungsweise von NAADP in verschiedenen Zellmodellen werden unterschiedliche Kontrollmechanismen ermöglicht. Da in T-Zellen drei  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende sekundäre Botenstoffe auf denselben  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher wirken, ist eine strenge zeitliche Kontrolle der Botenstoffe nötig. In Herzzellen erfolgt die Kontrolle hingegen auf räumlicher Ebene, indem wahrscheinlich unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher in die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung einbezogen werden.



**Abbildung 5.6: Modell für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch NAADP.** NAADP kann auf den RyR (I) oder saure Vesikel (II,III) wirken und auf diese Weise  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER/SR oder den sauren Vesikeln freisetzen.  $\text{Ca}^{2+}$  aus den sauren Vesikeln kann entweder direkt auf den RyR wirken (II) und über CICF weiteres  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER/SR freisetzen, oder über die SERCA in das ER/SR aufgenommen werden (III) und so die Beladung dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichers erhöhen. Freigesetztes  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER/SR kann ebenfalls weitere RyR aktivieren.

Unabhängig davon, welcher  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher auf NAADP reagiert, scheint NAADP in allen Modellen eine wichtige Funktion als  $\text{Ca}^{2+}$ -*Trigger* inne zu haben. Dafür spricht, dass NAADP

innerhalb von Sekunden nach der Aktivierung von Zellen gebildet werden kann (Gasser et al., 2006; Soares et al., 2007) und dass es kleine, lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale vor der Entstehung eines globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals auslösen kann (Boittin et al., 2002; Dammermann und Guse, 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte zum einen die Bedeutung von NAADP für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in T-Zellen unterstrichen werden. Zum anderen lieferten die Analysen in ventrikulären Cardiomyozyten Hinweise auf eine Beteiligung von NAADP an der Modulation des elektrisch stimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals. Mit BZ194 stand ein spezifischer NAADP-Antagonist zur Verfügung, mit dem es möglich war, in den gewählten Zellsystemen den Beitrag von NAADP an der Antigen-spezifischen Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen sowie der Isoprenalalin-vermittelten Entstehung arrhythmischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten zu untersuchen. Durch die weiterführenden *in vivo* Versuche in Ratten mit einer EAE wird deutlich, dass eine Inhibition des NAADP-Signalweges zu einem stark abgemilderten Krankheitsverlauf dieser T-Zell-vermittelten Autoimmunreaktion führt (Cordiglieri et al., 2010). Ein früher Eingriff in die Aktivierung von T-Zellen durch die Intervention mit der NAADP-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung scheint daher ein sinnvoller Ansatz für die Unterdrückung einer unerwünschten T-Zellaktivierung zu sein. Bisher unbekannt war, dass NAADP in Cardiomyozyten nicht nur zu einer Steigerung der Amplitude während der elektrischen Stimulation führen kann (Macgregor et al., 2007a), sondern auch zu der Entstehung zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten beizutragen scheint. Diese arrhythmischen Ereignisse auf zellulärer Ebene waren mit BZ194 vollständig unterdrückbar und geben Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von NAADP an Rhythmusstörungen im Gesamtorgan Herz.

## 6 Zusammenfassung

$\text{Ca}^{2+}$  ist ein universeller sekundärer Botenstoff, der eine entscheidende Rolle bei der Signalgebung der verschiedensten Zelltypen spielt. Die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern erfolgt über die sekundären Botenstoffe NAADP,  $\text{IP}_3$  und cADPR. Die Besonderheit von NAADP ist, dass es bereits in nanomolaren Konzentrationen wirksam ist und eine *Trigger*-Funktion für die Entwicklung des globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals einer Zelle einnehmen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung von NAADP für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in zwei unterschiedlichen pathophysiologischen Zellmodellen für T-Zellen und Cardiomyozyten untersucht.

Zunächst wurde ein neues System zur Aktivierung und zur Bestimmung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in T-Zellen *in vitro* erfolgreich etabliert. Dabei wurde die gängige Stimulation über Antikörper durch die Aktivierung mit Antigen-präsentierenden Zellen ersetzt. Der Zell-Zell-Kontakt ermöglicht das Ausbilden einer Immunologischen Synapse, in der es zur definierten räumlichen Anordnung der an der Signalgebung beteiligten Proteine kommt. Das Modell ist an die Multiple Sklerose, eine Autoimmunerkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS), angelehnt. Für das sogenannte Zweizellsystem wurden primäre MBP-spezifische T-Zellen der Ratte und eine Astrozytenzelllinie als Antigen-präsentierende Zellen verwendet. MBP-spezifische T-Zellen können durch den Transfer ins Tier eine Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) auslösen, ein bekanntes Tiermodell für die Multiple Sklerose in der Ratte. Astrozyten sind als vorherrschende Gliazellen des ZNS nicht-professionelle Antigen-präsentierende Zellen, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sein können.

Es konnte gezeigt werden, dass die T-Zellen in der Anwesenheit des spezifischen Antigens innerhalb weniger Minuten ein starkes, lang anhaltendes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal entwickeln. Im Verlauf des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals kam es zur Abrundung der T-Zellen und zu einer festen Kontaktausbildung mit den Astrozyten, wodurch die T-Zellen immobilisiert wurden. In der Abwesenheit des Antigens traten hingegen nur schwache und zeitlich stark verzögerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale auf, während derer die T-Zellen mobil blieben. Eine gleichzeitige Untersuchung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in den Astrozyten ergab, dass sich in diesen während der Kontaktbildung zur T-Zelle keine globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale entwickelten. Durch den Einsatz des spezifischen NAADP-Antagonisten BZ194 konnte das mittlere, globale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in den T-Zellen deutlich reduziert werden. Dies führte im Mittel zu einer erhöhten Motilität der Zellen. Außerdem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass NAADP auch bei der Entstehung Antigen-unabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beteiligt sein könnte und so eine Sensitivierung von T-Zellen ermöglicht, um ein leichteres Ansprechen auf das

spezifische Antigen zu erlauben. In der Arbeitsgruppe von Prof. Flügel (Universitätsklinikum Göttingen) mit BZ194 durchgeführte *in vitro*- und *in vivo*-Studien belegen, dass die Unterdrückung des NAADP-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals eine verminderte T-Zellaktivierung und Proliferation, sowie eine erhebliche Abschwächung der klinischen Symptome der EAE zur Folge hatte.

In ventrikulären Cardiomyozyten sorgt das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal für die Verknüpfung der elektrischen Erregung der Zelle mit der Kontraktion. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung kann durch die Stimulation des  $\beta$ -Adrenozeptors mit Isoprenalin moduliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal muriner, ventrikulärer Cardiomyozyten während der elektrischen Stimulation analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass es in der Gegenwart von Isoprenalin zur Entstehung zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten kam, woraus arrhythmische Kontraktionen entstanden. Für die folgenden Versuche dienten diese zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten als vereinfachtes Modell für Rhythmusstörungen im Herzen. Die Ergebnisse belegen, dass der proarrhythmische Effekt des Isoprenalins wahrscheinlich über die Proteinkinase A vermittelt wird. Bemerkenswerterweise konnte durch den Einsatz von BZ194 die Bildung zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten verhindert und somit eine Beteiligung von NAADP aufgezeigt werden. Die weiteren Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass NAADP  $\text{Ca}^{2+}$  aus lysosomalen Speichern freisetzt. Dies könnte zu einer Überladung des sarcoplasmatischen Retikulums mit  $\text{Ca}^{2+}$  und schließlich zur Entstehung zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten führen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass NAADP nicht nur entscheidend für die Aktivierung von T-Zellen ist, sondern auch an der Entstehung arrhythmischer Ereignisse in Cardiomyozyten beteiligt zu sein scheint. Die Inhibition der NAADP-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung konnte die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen verhindern und das Auftreten zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in ventrikulären Cardiomyozyten unterbinden. Der NAADP-Signalweg stellt somit ein viel versprechendes Ziel für zukünftige pharmakologische Interventionen dar.

## 7 Abstract

$\text{Ca}^{2+}$  is a universal second messenger, playing an important role for signaling in a variety of different cell types.  $\text{Ca}^{2+}$  is released from intracellular stores by the second messengers NAADP,  $\text{IP}_3$  and cADPR. A special feature of NAADP is its effective concentration in the low nanomolar range and its function as trigger for the development of global  $\text{Ca}^{2+}$  signals inside the cell. In the present work the role of NAADP for  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in two different pathophysiological cell models for T cells and cardiomyocytes was analyzed.

First, a new system for activation and determination of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in T cells *in vitro* was successfully established. In this system the common stimulation with antibodies was replaced by the activation with antigen-presenting cells. Cell-cell contact allows the formation of an immunological synapse, which leads to a defined spatial arrangement of proteins participating in signaling. The model follows multiple sclerosis (MS), an autoimmune disease of the central nervous system (CNS). For the so-called two cell system primary MBP-specific T cells of the rat and an astrocyte cell line as antigen-presenting cells were used. Transferred into animals, MBP-specific T cells are able to induce an Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) - a prominent animal model for MS in the rat. Astrocytes, the prevalent glia cells in the CNS, are non professional antigen-presenting cells and participate in inflammation.

It was shown, that T cells develop a strong, long lasting  $\text{Ca}^{2+}$  signal in a few minutes in the presence of the specific antigen. During  $\text{Ca}^{2+}$  signaling T cells rounded up and made stable contacts with the astrocytes, which led to immobilization of the T cells. In the absence of the antigen only weak and delayed  $\text{Ca}^{2+}$  signals appeared, and the T cells stayed mobile. A simultaneous analysis of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in astrocytes showed no global  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in these cells during contact to T cells. Incubation with the specific NAADP-antagonist BZ194 considerably reduced the mean global  $\text{Ca}^{2+}$  signal in T cells. In average, this led to a higher motility of the cells. Additionally, the results indicate a participation of NAADP in the development of antigen-independent  $\text{Ca}^{2+}$  signals, which may allow sensitization of T cells and therefore an easier response to the specific antigen. *In vitro* and *in vivo* studies with BZ194, conducted by the group of Prof. A. Flügel, showed, that suppression of the NAADP-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signal results in a reduced T cell activation and proliferation as well as an attenuation of clinical symptoms of EAE.

In ventricular cardiomyocytes  $\text{Ca}^{2+}$  signaling is the link between electrical excitation and contraction of the cell.  $\text{Ca}^{2+}$  signaling can be modulated by stimulating the  $\beta$ -adrenoceptor with isoprenaline. In the present work the  $\text{Ca}^{2+}$  signal of murine, ventricular cardiomyocytes

was analyzed during electrical stimulation. In the presence of isoprenalin additional  $\text{Ca}^{2+}$  transients were observed, leading to arrhythmogenic contractions. In following experiments these additional  $\text{Ca}^{2+}$  transients were used as a model for arrhythmia in the heart. The proarrhythmic effect of isoprenalin is most probably mediated by protein kinase A. Notably, administration of BZ194 blocked the appearance of additional  $\text{Ca}^{2+}$  transients and demonstrated a participation of NAADP. Further results indicate, that NAADP releases  $\text{Ca}^{2+}$  from lysosomal stores. This might lead to a  $\text{Ca}^{2+}$  overload of the sarcoplasmic reticulum and finally to the appearance of additional  $\text{Ca}^{2+}$  transients.

The present work shows that NAADP is not only crucial for activation of T cells, but may also participate in the development of arrhythmic events in cardiomyocytes. Inhibiting NAADP-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signaling prevented the activation of autoreactive T cells and reduced the number of additional  $\text{Ca}^{2+}$  transients in ventricular cardiomyocytes. The NAADP signaling pathway is therefore a promising target for pharmacological interventions in the future.

## Literaturverzeichnis

- Aarhus, R., Dickey, D.M., Graeff, R.M., Gee, K.R., Walseth, T.F. und Lee, H.C. (1996). Activation and inactivation of  $\text{Ca}^{2+}$  release by NAADP<sup>+</sup>. *J Biol Chem*, 271(15): 8513–6.
- Aarhus, R., Graeff, R.M., Dickey, D.M., Walseth, T.F. und Lee, H.C. (1995). ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J Biol Chem*, 270(51): 30327–33.
- Anderson, P.A. und Greenberg, R.M. (2001). Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 129(1): 17–28.
- Bacher, I., Zidar, A., Kratzel, M. und Hohenegger, M. (2004). Channelling of substrate promiscuity of the skeletal-muscle ADP-ribosyl cyclase isoform. *Biochem J*, 381(Pt 1): 147–54.
- Bartel, S., Vetter, D., Schlegel, W.P., Wallukat, G., Krause, E.G. und Karczewski, P. (2000). Phosphorylation of phospholamban at threonine-17 in the absence and presence of beta-adrenergic stimulation in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 32(12): 2173–85.
- Bartholomäus, I., Kawakami, N., Odoardi, F., Schläger, C., Miljkovic, D., Ellwart, J.W., Klinkert, W.E.F., Flügel-Koch, C., Issekutz, T.B., Wekerle, H. und Flügel, A. (2009). Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature*, 462(7269): 94–8.
- Bassani, J.W., Bassani, R.A. und Bers, D.M. (1994). Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol*, 476(2): 279–93.
- Ben-Nun, A., Wekerle, H. und Cohen, I.R. (1981). The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol*, 11(3): 195–9.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J. und Wheeler, D.L. (2005). GenBank. *Nucleic Acids Res*, 33(Database issue): D34–8.
- Berridge, G., Cramer, R., Galione, A. und Patel, S. (2002). Metabolism of the novel  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing messenger nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate via a 2'-specific  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phosphatase. *Biochem J*, 365(Pt 1): 295–301.

- Berridge, M.J., Heslop, J.P., Irvine, R.F. und Brown, K.D. (1984). Inositol trisphosphate formation and calcium mobilization in Swiss 3T3 cells in response to platelet-derived growth factor. *Biochem J*, 222(1): 195–201.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. und Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(7): 517–29.
- Bers, D.M. (2001). *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*. Kluwer Academic, Dordrecht, Niederlande, 2. Auflage.
- Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868): 198–205.
- Bers, D.M. (2008). Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol*, 70: 23–49.
- Bezprozvanny, I. und Ehrlich, B.E. (1994). Inositol (1,4,5)-trisphosphate (InsP<sub>3</sub>)-gated Ca channels from cerebellum: conduction properties for divalent cations and regulation by intraluminal calcium. *J Gen Physiol*, 104(5): 821–56.
- Bezprozvanny, I., Watras, J. und Ehrlich, B.E. (1991). Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*, 351(6329): 751–4.
- Bhakta, N.R., Oh, D.Y. und Lewis, R.S. (2005). Calcium oscillations regulate thymocyte motility during positive selection in the three-dimensional thymic environment. *Nat Immunol*, 6(2): 143–51.
- Biden, T.J., Prentki, M., Irvine, R.F., Berridge, M.J. und Wollheim, C.B. (1984). Inositol 1,4,5-trisphosphate mobilizes intracellular Ca<sup>2+</sup> from permeabilized insulin-secreting cells. *Biochem J*, 223(2): 467–73.
- Boittin, F.X., Dipp, M., Kinnear, N.P., Galione, A. und Evans, A.M. (2003). Vasodilation by the calcium-mobilizing messenger cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem*, 278(11): 9602–8.
- Boittin, F.X., Galione, A. und Evans, A.M. (2002). Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate mediates Ca<sup>2+</sup> signals and contraction in arterial smooth muscle via a two-pool mechanism. *Circ Res*, 91(12): 1168–75.
- Bootman, M.D. und Berridge, M.J. (1996). Subcellular Ca<sup>2+</sup> signals underlying waves and graded responses in HeLa cells. *Curr Biol*, 6(7): 855–65.
- Bootman, M.D., Berridge, M.J. und Lipp, P. (1997). Cooking with calcium: the recipes for composing global signals from elementary events. *Cell*, 91(3): 367–73.

- Bradley, K.N., Currie, S., MacMillan, D., Muir, T.C. und McCarron, J.G. (2003). Cyclic ADP-ribose increases  $\text{Ca}^{2+}$  removal in smooth muscle. *J Cell Sci*, 116(Pt 21): 4291–306.
- Brailoiu, E., Churamani, D., Cai, X., Schrlau, M.G., Brailoiu, G.C., Gao, X., Hooper, R., Boulware, M.J., Dun, N.J., Marchant, J.S. und Patel, S. (2009). Essential requirement for two-pore channel 1 in NAADP-mediated calcium signaling. *J Cell Biol*, 186(2): 201–9.
- Brailoiu, E., Churamani, D., Pandey, V., Brailoiu, G.C., Tuluc, F., Patel, S. und Dun, N.J. (2006). Messenger-specific role for nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate in neuronal differentiation. *J Biol Chem*, 281(23): 15923–8.
- Brailoiu, E., Hooper, R., Cai, X., Brailoiu, G.C., Keebler, M.V., Dun, N.J., Marchant, J.S. und Patel, S. (2010). An ancestral deuterostome family of two-pore channels mediates nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate-dependent calcium release from acidic organelles. *J Biol Chem*, 285(5): 2897–901.
- Brown, J.E., Rubin, L.J., Ghalayini, A.J., Tarver, A.P., Irvine, R.F., Berridge, M.J. und Anderson, R.E. (1984). myo-Inositol polyphosphate may be a messenger for visual excitation in *Limulus* photoreceptors. *Nature*, 311(5982): 160–3.
- Bruhn, S. (2008). *NAADP, CD38 und  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalling: Komplexes Wechselspiel bei der Aktivierung von T-Lymphozyten*. Dissertation, Universität Hamburg.
- Burgess, G.M., Godfrey, P.P., McKinney, J.S., Berridge, M.J., Irvine, R.F. und Putney, J.W.J. (1984). The second messenger linking receptor activation to internal Ca release in liver. *Nature*, 309(5963): 63–6.
- Calcraft, P.J., Ruas, M., Pan, Z., Cheng, X., Arredouani, A., Hao, X., Tang, J., Rietdorf, K., Teboul, L., Chuang, K.T., Lin, P., Xiao, R., Wang, C., Zhu, Y., Lin, Y., Wyatt, C.N., Parrington, J., Ma, J., Evans, A.M., Galione, A. und Zhu, M.X. (2009). NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature*, 459(7246): 596–600.
- Cancela, J.M., Churchill, G.C. und Galione, A. (1999). Coordination of agonist-induced  $\text{Ca}^{2+}$ -signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. *Nature*, 398(6722): 74–6.
- Cancela, J.M., Gerasimenko, O.V., Gerasimenko, J.V., Tepikin, A.V. und Petersen, O.H. (2000). Two different but converging messenger pathways to intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release: the roles of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, cyclic ADP-ribose and inositol trisphosphate. *EMBO J*, 19(11): 2549–57.
- Capogrossi, M.C., Stern, M.D., Spurgeon, H.A. und Lakatta, E.G. (1988). Spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum limits  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent twitch potentiation in individual cardiac myocytes. A mechanism for maximum inotropy in the myocardium. *J Gen Physiol*, 91(1): 133–55.

- Ceni, C., Muller-Steffner, H., Lund, F., Pochon, N., Schweitzer, A., De Waard, M., Schuber, F., Villaz, M. und Moutin, M.J. (2003). Evidence for an intracellular ADP-ribosyl cyclase/NAD<sup>+</sup>-glycohydrolase in brain from CD38-deficient mice. *J Biol Chem*, 278(42): 40670–8.
- Chini, E.N., Beers, K.W. und Dousa, T.P. (1995). Nicotinate adenine dinucleotide phosphate (NAADP) triggers a specific calcium release system in sea urchin eggs. *J Biol Chem*, 270(7): 3216–23.
- Christensen, K.A., Myers, J.T. und Swanson, J.A. (2002). pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *J Cell Sci*, 115(Pt 3): 599–607.
- Chu, A., Díaz-Muñoz, M., Hawkes, M.J., Brush, K. und Hamilton, S.L. (1990). Ryanodine as a probe for the functional state of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium release channel. *Mol Pharmacol*, 37(5): 735–41.
- Churamani, D., Boulware, M.J., Ramakrishnan, L., Geach, T.J., Martin, A.C.R., Vacquier, V.D., Marchant, J.S., Dale, L. und Patel, S. (2008). Molecular characterization of a novel cell surface ADP-ribosyl cyclase from the sea urchin. *Cell Signal*, 20(12): 2347–55.
- Churamani, D., Carrey, E.A., Dickinson, G.D. und Patel, S. (2004). Determination of cellular nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate (NAADP) levels. *Biochem J*, 380(Pt 2): 449–54.
- Churchill, G.C., Okada, Y., Thomas, J.M., Genazzani, A.A., Patel, S. und Galione, A. (2002). NAADP mobilizes Ca<sup>2+</sup> from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell*, 111(5): 703–8.
- Clapper, D.L., Walseth, T.F., Dargie, P.J. und Lee, H.C. (1987). Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J Biol Chem*, 262(20): 9561–8.
- Constantinescu, C.S., Tani, M., Ransohoff, R.M., Wysocka, M., Hilliard, B., Fujioka, T., Murphy, S., Tighe, P.J., Das Sarma, J., Trinchieri, G. und Rostami, A. (2005). Astrocytes as antigen-presenting cells: expression of IL-12/IL-23. *J Neurochem*, 95(2): 331–40.
- Copello, J.A., Qi, Y., Jeyakumar, L.H., Ogunbunmi, E. und Fleischer, S. (2001). Lack of effect of cADP-ribose and NAADP on the activity of skeletal muscle and heart ryanodine receptors. *Cell Calcium*, 30(4): 269–84.
- Cordiglieri, C., Odoardi, F., Zhang, B., Nebel, M., Kawakami, N., Klinkert, W.E.F., Lodygin, D., Lühder, F., Breunig, E., Schild, D., Ulaganathan, V.K., Dornmair, K., Dammermann, W., Potter, B.V.L., Guse, A.H. und Flügel, A. (2010). Nicotinic acid adenine dinucleotide

- phosphate-mediated calcium signalling in effector T cells regulates autoimmunity of the central nervous system. *Brain*, 133(Pt 7): 1930–43.
- Cui, Y., Galione, A. und Terrar, D.A. (1999). Effects of photoreleased cADP-ribose on calcium transients and calcium sparks in myocytes isolated from guinea-pig and rat ventricle. *Biochem J*, 342 ( Pt 2): 269–73.
- Curran, J., Hinton, M.J., Ríos, E., Bers, D.M. und Shannon, T.R. (2007). Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Circ Res*, 100(3): 391–8.
- Dammermann, W. und Guse, A.H. (2005). Functional ryanodine receptor expression is required for NAADP-mediated local  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in T-lymphocytes. *J Biol Chem*, 280(22): 21394–9.
- Dammermann, W., Zhang, B., Nebel, M., Cordiglieri, C., Odoardi, F., Kirchberger, T., Kawakami, N., Dowden, J., Schmid, F., Dornmair, K., Hohenegger, M., Flügel, A., Guse, A.H. und Potter, B.V.L. (2009). NAADP-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signaling via type 1 ryanodine receptor in T cells revealed by a synthetic NAADP antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(26): 10678–83.
- De Koninck, P. und Schulman, H. (1998). Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. *Science*, 279(5348): 227–30.
- Delon, J., Bercovici, N., Raposo, G., Liblau, R. und Trautmann, A. (1998). Antigen-dependent and -independent  $\text{Ca}^{2+}$  responses triggered in T cells by dendritic cells compared with B cells. *J Exp Med*, 188(8): 1473–84.
- Deschênes, I., Neyroud, N., DiSilvestre, D., Marbán, E., Yue, D.T. und Tomaselli, G.F. (2002). Isoform-specific modulation of voltage-gated  $\text{Na}^+$  channels by calmodulin. *Circ Res*, 90(4): E49–57.
- Dhein, S. und Stark, G. (2008). *Antiarrhythmika und antiarrhythmische Therapie*, Band 20. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Diehn, M., Alizadeh, A.A., Rando, O.J., Liu, C.L., Stankunas, K., Botstein, D., Crabtree, G.R. und Brown, P.O. (2002). Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(18): 11796–801.
- Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., Goodnow, C.C. und Healy, J.I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by  $\text{Ca}^{2+}$  response amplitude and duration. *Nature*, 386(6627): 855–8.

- Dolmetsch, R.E., Xu, K. und Lewis, R.S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*, 392(6679): 933–6.
- Donnadieu, E., Bismuth, G. und Trautmann, A. (1994). Antigen recognition by helper T cells elicits a sequence of distinct changes of their shape and intracellular calcium. *Curr Biol*, 4(7): 584–95.
- Dowden, J., Berridge, G., Moreau, C., Yamasaki, M., Churchill, G.C., Potter, B.V.L. und Galione, A. (2006). Cell-permeant small-molecule modulators of NAADP-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release. *Chem Biol*, 13(6): 659–65.
- Durlu-Kandilci, N.T., Ruas, M., Cheng, K.T., Brading, A., Parrington, J. und Galione, A. (2010). TPC2 proteins mediate NAADP and agonist-evoked contractions of smooth muscle. *J Biol Chem*.
- Ehrlich, B.E. und Watras, J. (1988). Inositol 1,4,5-trisphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Nature*, 336(6199): 583–6.
- Eisner, D.A., Choi, H.S., Díaz, M.E., O’Neill, S.C. und Trafford, A.W. (2000). Integrative analysis of calcium cycling in cardiac muscle. *Circ Res*, 87(12): 1087–94.
- Fabiato, A. (1985). Rapid ionic modifications during the aequorin-detected calcium transient in a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol*, 85(2): 189–246.
- Fein, A., Payne, R., Corson, D.W., Berridge, M.J. und Irvine, R.F. (1984). Photoreceptor excitation and adaptation by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature*, 311(5982): 157–60.
- Feng, J.M., Hu, Y.K., Xie, L.H., Colwell, C.S., Shao, X.M., Sun, X.P., Chen, B., Tang, H. und Campagnoni, A.T. (2006). Golli protein negatively regulates store depletion-induced calcium influx in T cells. *Immunity*, 24(6): 717–27.
- Ferrero, P., Said, M., Sánchez, G., Vittone, L., Valverde, C., Donoso, P., Mattiazzi, A. und Mundiña-Weilenmann, C. (2007).  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin kinase II increases ryanodine binding and  $\text{Ca}^{2+}$ -induced sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release kinetics during beta-adrenergic stimulation. *J Mol Cell Cardiol*, 43(3): 281–91.
- Feske, S. (2007). Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol*, 7(9): 690–702.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M. und Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441(7090): 179–85.
- Feske, S., Okamura, H., Hogan, P.G. und Rao, A. (2003).  $\text{Ca}^{2+}$ /calcineurin signalling in cells of the immune system. *Biochem Biophys Res Commun*, 311(4): 1117–32.

- Feuillet, V., Lucas, B., Di Santo, J.P., Bismuth, G. und Trautmann, A. (2005). Multiple survival signals are delivered by dendritic cells to naive CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol*, 35(9): 2563–72.
- Fierz, W., Endler, B., Reske, K., Wekerle, H. und Fontana, A. (1985). Astrocytes as antigen-presenting cells. I. Induction of Ia antigen expression on astrocytes by T cells via immune interferon and its effect on antigen presentation. *J Immunol*, 134(6): 3785–93.
- Finch, E.A., Turner, T.J. und Goldin, S.M. (1991). Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Science*, 252(5004): 443–6.
- Floto, R.A., Mahaut-Smith, M.P., Somasundaram, B. und Allen, J.M. (1995). IgG-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations in differentiated U937 cells; a study using laser scanning confocal microscopy and co-loaded fluo-3 and fura-red fluorescent probes. *Cell Calcium*, 18(5): 377–89.
- Flügel, A., Willem, M., Berkowicz, T. und Wekerle, H. (1999). Gene transfer into CD4<sup>+</sup> T lymphocytes: green fluorescent protein-engineered, encephalitogenic T cells illuminate brain autoimmune responses. *Nat Med*, 5(7): 843–7.
- Fontana, A., Fierz, W. und Wekerle, H. (1984). Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines. *Nature*, 307(5948): 273–6.
- Freestone, N.S., Heubach, J.F., Wettwer, E., Ravens, U., Brown, D. und Kaumann, A.J. (1999).  $\beta_4$ -adrenoceptors are more effective than  $\beta_1$ -adrenoceptors in mediating arrhythmic Ca<sup>2+</sup> transients in mouse ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 360(4): 445–56.
- Fruen, B.R., Mickelson, J.R., Shomer, N.H., Velez, P. und Louis, C.F. (1994). Cyclic ADP-ribose does not affect cardiac or skeletal muscle ryanodine receptors. *FEBS Lett*, 352(2): 123–6.
- Galione, A. und Churchill, G.C. (2000). Cyclic ADP ribose as a calcium-mobilizing messenger. *Sci STKE*, 2000(41): pe1.
- Gallagher, S. und Desjardins, P. (2006). *Quantitation of DNA and RNA with absorbtion and fluorescence spectroscopy*. Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons.
- Gao, L., Blair, L.A.C. und Marshall, J. (2006). CaMKII-independent effects of KN93 and its inactive analog KN92: reversible inhibition of L-type calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun*, 345(4): 1606–10.
- Gasser, A., Bruhn, S. und Guse, A.H. (2006). Second messenger function of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate revealed by an improved enzymatic cycling assay. *J Biol Chem*, 281(25): 16906–13.

- Gasser, A. und Guse, A.H. (2005). Determination of intracellular concentrations of the TRPM2 agonist ADP-ribose by reversed-phase HPLC. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 821(2): 181–7.
- Genazzani, A.A., Empson, R.M. und Galione, A. (1996). Unique inactivation properties of NAADP-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  release. *J Biol Chem*, 271(20): 11599–602.
- Gerasimenko, J., Maruyama, Y., Tepikin, A., Petersen, O.H. und Gerasimenko, O. (2003a). Calcium signalling in and around the nuclear envelope. *Biochem Soc Trans*, 31(Pt 1): 76–8.
- Gerasimenko, J.V., Maruyama, Y., Yano, K., Dolman, N.J., Tepikin, A.V., Petersen, O.H. und Gerasimenko, O.V. (2003b). NAADP mobilizes  $\text{Ca}^{2+}$  from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors. *J Cell Biol*, 163(2): 271–82.
- Gerasimenko, J.V., Sherwood, M., Tepikin, A.V., Petersen, O.H. und Gerasimenko, O.V. (2006). NAADP, cADPR and  $\text{IP}_3$  all release  $\text{Ca}^{2+}$  from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area. *J Cell Sci*, 119(Pt 2): 226–38.
- Graeff, R., Liu, Q., Kriksunov, I.A., Hao, Q. und Lee, H.C. (2006). Acidic residues at the active sites of CD38 and ADP-ribosyl cyclase determine nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) synthesis and hydrolysis activities. *J Biol Chem*, 281(39): 28951–7.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M. und Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, 285(5425): 221–7.
- Grimm, M. und Brown, J.H. (2010).  $\beta$ -Adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. *J Mol Cell Cardiol*, 48(2): 322–30.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. und Tsien, R.Y. (1985). A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260(6): 3440–50.
- Guo, X., Laflamme, M.A. und Becker, P.L. (1996). Cyclic ADP-ribose does not regulate sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release in intact cardiac myocytes. *Circ Res*, 79(1): 147–51.
- Guse, A.H. (1999). Cyclic ADP-ribose: a novel  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilising second messenger. *Cell Signal*, 11(5): 309–16.
- Guse, A.H., Berg, I., da Silva, C.P., Potter, B.V. und Mayr, G.W. (1997).  $\text{Ca}^{2+}$  entry induced by cyclic ADP-ribose in intact T-lymphocytes. *J Biol Chem*, 272(13): 8546–50.
- Guse, A.H., Goldwisch, A., Weber, K. und Mayr, G.W. (1995). Non-radioactive, isomer-specific inositol phosphate mass determinations: high-performance liquid chromatography-micro-metal-dye detection strongly improves speed and sensitivity of analyses from cells and micro-enzyme assays. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 672(2): 189–98.

- Guse, A.H., Roth, E. und Emmrich, F. (1993). Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pools in Jurkat T-lymphocytes. *Biochem J*, 291 ( Pt 2): 447–51.
- Guse, A.H., da Silva, C.P., Berg, I., Skapenko, A.L., Weber, K., Heyer, P., Hohenegger, M., Ashamu, G.A., Schulze-Koops, H., Potter, B.V. und Mayr, G.W. (1999). Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature*, 398(6722): 70–3.
- Guse, A.H. und Lee, H.C. (2008). NAADP: a universal  $\text{Ca}^{2+}$  trigger. *Sci Signal*, 1(44): re10.
- Gwack, Y., Sharma, S., Nardone, J., Tanasa, B., Iuga, A., Srikanth, S., Okamura, H., Bolton, D., Feske, S., Hogan, P.G. und Rao, A. (2006). A genome-wide Drosophila RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature*, 441(7093): 646–50.
- Györke, S. und Fill, M. (1993). Ryanodine receptor adaptation: control mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in heart. *Science*, 260(5109): 807–9.
- Hafler, D.A., Slavik, J.M., Anderson, D.E., O'Connor, K.C., De Jager, P. und Baecher-Allan, C. (2005). Multiple sclerosis. *Immunol Rev*, 204: 208–31.
- Haston, W.S., Shields, J.M. und Wilkinson, P.C. (1982). Lymphocyte locomotion and attachment on two-dimensional surfaces and in three-dimensional matrices. *J Cell Biol*, 92(3): 747–52.
- Heidemann, A.C., Schipke, C.G. und Kettenmann, H. (2005). Extracellular application of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate induces  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in astrocytes in situ. *J Biol Chem*, 280(42): 35630–40.
- Hemmer, B., Pinilla, C., Gran, B., Vergelli, M., Ling, N., Conlon, P., McFarland, H.F., Houghten, R. und Martin, R. (2000). Contribution of individual amino acids within MHC molecule or antigenic peptide to TCR ligand potency. *J Immunol*, 164(2): 861–71.
- Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J. und Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev*, 17(18): 2205–32.
- Hohenegger, M., Suko, J., Gscheidlinger, R., Drobny, H. und Zidar, A. (2002). Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate activates the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochem J*, 367(Pt 2): 423–31.
- Huang, G.N., Zeng, W., Kim, J.Y., Yuan, J.P., Han, L., Muallem, S. und Worley, P.F. (2006). STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol*, 8(9): 1003–10.
- Huppa, J.B. und Davis, M.M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol*, 3(12): 973–83.

- Huppa, J.B., Gleimer, M., Sumen, C. und Davis, M.M. (2003). Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. *Nat Immunol*, 4(8): 749–55.
- Iino, M. (1990). Biphasic  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci. *J Gen Physiol*, 95(6): 1103–22.
- Iino, S., Cui, Y., Galione, A. und Terrar, D.A. (1997). Actions of cADP-ribose and its antagonists on contraction in guinea pig isolated ventricular myocytes. Influence of temperature. *Circ Res*, 81(5): 879–84.
- Imagawa, T., Smith, J.S., Coronado, R. und Campbell, K.P. (1987). Purified ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum is the  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable pore of the calcium release channel. *J Biol Chem*, 262(34): 16636–43.
- Ishibashi, K., Suzuki, M. und Imai, M. (2000). Molecular cloning of a novel form (two-repeat) protein related to voltage-gated sodium and calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun*, 270(2): 370–6.
- January, C.T. und Fozzard, H.A. (1988). Delayed afterdepolarizations in heart muscle: mechanisms and relevance. *Pharmacol Rev*, 40(3): 219–27.
- January, C.T. und Riddle, J.M. (1989). Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current. *Circ Res*, 64(5): 977–90.
- Kaftan, E., Marks, A.R. und Ehrlich, B.E. (1996). Effects of rapamycin on ryanodine receptor/ $\text{Ca}^{2+}$ -release channels from cardiac muscle. *Circ Res*, 78(6): 990–7.
- Karin, M. und Gallagher, E. (2005). From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life*, 57(4-5): 283–95.
- Kassiotis, G., Garcia, S., Simpson, E. und Stockinger, B. (2002). Impairment of immunological memory in the absence of MHC despite survival of memory T cells. *Nat Immunol*, 3(3): 244–50.
- Katzav, S. (2004). Vav1: an oncogene that regulates specific transcriptional activation of T cells. *Blood*, 103(7): 2443–51.
- Kawakami, N., Nägerl, U.V., Odoardi, F., Bonhoeffer, T., Wekerle, H. und Flügel, A. (2005). Live imaging of effector cell trafficking and autoantigen recognition within the unfolding autoimmune encephalomyelitis lesion. *J Exp Med*, 201(11): 1805–14.
- Kim, B.J., Park, K.H., Yim, C.Y., Takasawa, S., Okamoto, H., Im, M.J. und Kim, U.H. (2008). Generation of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and cyclic ADP-ribose

- by glucagon-like peptide-1 evokes  $\text{Ca}^{2+}$  signal that is essential for insulin secretion in mouse pancreatic islets. *Diabetes*, 57(4): 868–78.
- Kinnear, N.P., Boittin, F.X., Thomas, J.M., Galione, A. und Evans, A.M. (2004). Lysosome-sarcoplasmic reticulum junctions. A trigger zone for calcium signaling by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and endothelin-1. *J Biol Chem*, 279(52): 54319–26.
- Kinnear, N.P., Wyatt, C.N., Clark, J.H., Calcraft, P.J., Fleischer, S., Jeyakumar, L.H., Nixon, G.F. und Evans, A.M. (2008). Lysosomes co-localize with ryanodine receptor subtype 3 to form a trigger zone for calcium signalling by NAADP in rat pulmonary arterial smooth muscle. *Cell Calcium*, 44(2): 190–201.
- Kleinschmidt-DeMasters, B.K. und Tyler, K.L. (2005). Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 353(4): 369–74.
- Kockskämper, J., Seidlmayer, L., Walther, S., Hellenkamp, K., Maier, L.S. und Pieske, B. (2008). Endothelin-1 enhances nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  transients in atrial myocytes through  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -dependent  $\text{Ca}^{2+}$  release from perinuclear  $\text{Ca}^{2+}$  stores. *J Cell Sci*, 121(Pt 2): 186–95.
- Kolisek, M., Beck, A., Fleig, A. und Penner, R. (2005). Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell*, 18(1): 61–9.
- Kondo, T., Cortese, I., Markovic-Plese, S., Wandinger, K.P., Carter, C., Brown, M., Leitman, S. und Martin, R. (2001). Dendritic cells signal T cells in the absence of exogenous antigen. *Nat Immunol*, 2(10): 932–8.
- Kondrack, R.M., Harbertson, J., Tan, J.T., McBreen, M.E., Surh, C.D. und Bradley, L.M. (2003). Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med*, 198(12): 1797–806.
- Kuschel, M., Karczewski, P., Hempel, P., Schlegel, W.P., Krause, E.G. und Bartel, S. (1999). Ser16 prevails over Thr17 phospholamban phosphorylation in the  $\beta$ -adrenergic regulation of cardiac relaxation. *Am J Physiol*, 276(5 Pt 2): H1625–33.
- Langer-Gould, A., Atlas, S.W., Green, A.J., Bollen, A.W. und Pelletier, D. (2005). Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *N Engl J Med*, 353(4): 375–81.
- Langhorst, M.F., Schwarzmann, N. und Guse, A.H. (2004).  $\text{Ca}^{2+}$  release via ryanodine receptors and  $\text{Ca}^{2+}$  entry: major mechanisms in NAADP-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in T-lymphocytes. *Cell Signal*, 16(11): 1283–9.

- Lee, H.C. (2001). Physiological functions of cyclic ADP-ribose and NAADP as calcium messengers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41: 317–45.
- Lee, H.C. und Aarhus, R. (1995). A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem*, 270(5): 2152–7.
- Lee, H.C. und Aarhus, R. (1997). Structural determinants of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate important for its calcium-mobilizing activity. *J Biol Chem*, 272(33): 20378–83.
- Lee, H.C. und Aarhus, R. (2000). Functional visualization of the separate but interacting calcium stores sensitive to NAADP and cyclic ADP-ribose. *J Cell Sci*, 113 Pt 24: 4413–20.
- Lee, H.C., Aarhus, R., Graeff, R., Gurnack, M.E. und Walseth, T.F. (1994). Cyclic ADP-ribose activation of the ryanodine receptor is mediated by calmodulin. *Nature*, 370(6487): 307–9.
- Lee, H.C., Walseth, T.F., Bratt, G.T., Hayes, R.N. und Clapper, D.L. (1989). Structural determination of a cyclic metabolite of NAD<sup>+</sup> with intracellular Ca<sup>2+</sup>-mobilizing activity. *J Biol Chem*, 264(3): 1608–15.
- Lee, K.H., Dinner, A.R., Tu, C., Campi, G., Raychaudhuri, S., Varma, R., Sims, T.N., Burack, W.R., Wu, H., Wang, J., Kanagawa, O., Markiewicz, M., Allen, P.M., Dustin, M.L., Chakraborty, A.K. und Shaw, A.S. (2003). The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science*, 302(5648): 1218–22.
- Lenz, D.C., Kurz, S.K., Lemmens, E., Schoenberger, S.P., Sprent, J., Oldstone, M.B.A. und Homann, D. (2004). IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4<sup>+</sup>T cell memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(25): 9357–62.
- Lerner, F., Niere, M., Ludwig, A. und Ziegler, M. (2001). Structural and functional characterization of human NAD kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 288(1): 69–74.
- Li, L., Desantiago, J., Chu, G., Kranias, E.G. und Bers, D.M. (2000). Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278(3): H769–79.
- Li, P.L., Tang, W.X., Valdivia, H.H., Zou, A.P. und Campbell, W.B. (2001). cADP-ribose activates reconstituted ryanodine receptors from coronary arterial smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280(1): H208–15.
- Limmroth, V. und Sindern, E. (2004). *Multiple Sklerose*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E.J. und Meyer, T. (2005). STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol*, 15(13): 1235–41.

- Lipp, P., Laine, M., Tovey, S.C., Burrell, K.M., Berridge, M.J., Li, W. und Bootman, M.D. (2000). Functional InsP<sub>3</sub> receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Curr Biol*, 10(15): 939–42.
- Lloyd-Evans, E., Morgan, A.J., He, X., Smith, D.A., Elliot-Smith, E., Sillence, D.J., Churchill, G.C., Schuchman, E.H., Galione, A. und Platt, F.M. (2008). Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat Med*, 14(11): 1247–55.
- Lopez-Diego, R.S. und Weiner, H.L. (2008). Novel therapeutic strategies for multiple sclerosis—a multifaceted adversary. *Nat Rev Drug Discov*, 7(11): 909–25.
- Lukyanenko, V., Györke, I., Wiesner, T.F. und Györke, S. (2001). Potentiation of Ca<sup>2+</sup> release by cADP-ribose in the heart is mediated by enhanced SR Ca<sup>2+</sup> uptake into the sarcoplasmic reticulum. *Circ Res*, 89(7): 614–22.
- Macgregor, A., Yamasaki, M., Rakovic, S., Sanders, L., Parkesh, R., Churchill, G.C., Galione, A. und Terrar, D.A. (2007a). NAADP controls cross-talk between distinct Ca<sup>2+</sup> stores in the heart. *J Biol Chem*, 282(20): 15302–11.
- Macgregor, A.T., Rakovic, S., Galione, A. und Terrar, D.A. (2007b). Dual effects of cyclic ADP-ribose on sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release and storage in cardiac myocytes isolated from guinea-pig and rat ventricle. *Cell Calcium*, 41(6): 537–46.
- Macián, F., López-Rodríguez, C. und Rao, A. (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene*, 20(19): 2476–89.
- Mackenzie, L., Bootman, M.D., Laine, M., Berridge, M.J., Thuring, J., Holmes, A., Li, W.H. und Lipp, P. (2002). The role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in Ca<sup>2+</sup> signalling and the generation of arrhythmias in rat atrial myocytes. *J Physiol*, 541(Pt 2): 395–409.
- Masgrau, R., Churchill, G.C., Morgan, A.J., Ashcroft, S.J.H. und Galione, A. (2003). NAADP: a new second messenger for glucose-induced Ca<sup>2+</sup> responses in clonal pancreatic beta cells. *Curr Biol*, 13(3): 247–51.
- McConnell, H.M., Watts, T.H., Weis, R.M. und Brian, A.A. (1986). Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune system. *Biochim Biophys Acta*, 864(1): 95–106.
- Meinl, E., t Hart, B.A., Bontrop, R.E., Hoch, R.M., Iglesias, A., de Waal Malefyt, R., Fickenscher, H., Müller-Fleckenstein, I., Fleckenstein, B., Wekerle, H. und et al. (1995). Activation of a myelin basic protein-specific human T cell clone by antigen-presenting cells from rhesus monkeys. *Int Immunol*, 7(9): 1489–95.

- Mempel, T.R., Henrickson, S.E. und Von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*, 427(6970): 154–9.
- Miller, M.J., Wei, S.H., Cahalan, M.D. und Parker, I. (2003). Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital two-photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(5): 2604–9.
- Miller, M.J., Wei, S.H., Parker, I. und Cahalan, M.D. (2002). Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science*, 296(5574): 1869–73.
- Missiaen, L., Taylor, C.W. und Berridge, M.J. (1991). Spontaneous calcium release from inositol trisphosphate-sensitive calcium stores. *Nature*, 352(6332): 241–4.
- Mitchell, K.J., Lai, F.A. und Rutter, G.A. (2003). Ryanodine receptor type I and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate receptors mediate  $\text{Ca}^{2+}$  release from insulin-containing vesicles in living pancreatic beta-cells (MIN6). *J Biol Chem*, 278(13): 11057–64.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M. und Tsien, R.Y. (1997). Fluorescent indicators for  $\text{Ca}^{2+}$  based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388(6645): 882–7.
- Mojzisoová, A., Krizanová, O., Záciková, L., Komínková, V. und Ondrias, K. (2001). Effect of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate on ryanodine calcium release channel in heart. *Pflugers Arch*, 441(5): 674–7.
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N. und Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, 395(6697): 82–6.
- Monks, C.R., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A. und Kupfer, A. (1997). Selective modulation of protein kinase C- $\theta$  during T-cell activation. *Nature*, 385(6611): 83–6.
- Montes, M., McIlroy, D., Hosmalin, A. und Trautmann, A. (1999). Calcium responses elicited in human T cells and dendritic cells by cell-cell interaction and soluble ligands. *Int Immunol*, 11(4): 561–8.
- Moschella, M.C. und Marks, A.R. (1993). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression in cardiac myocytes. *J Cell Biol*, 120(5): 1137–46.
- Mészáros, L.G., Bak, J. und Chu, A. (1993). Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Nature*, 364(6432): 76–9.
- Naylor, E., Arredouani, A., Vasudevan, S.R., Lewis, A.M., Parkesh, R., Mizote, A., Rosen, D., Thomas, J.M., Izumi, M., Ganesan, A., Galione, A. und Churchill, G.C. (2009). Identification of a chemical probe for NAADP by virtual screening. *Nat Chem Biol*, 5(4): 220–6.

- Negulescu, P.A., Krasieva, T.B., Khan, A., Kerschbaum, H.H. und Cahalan, M.D. (1996). Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity*, 4(5): 421–30.
- Nerbonne, J.M. und Kass, R.S. (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*, 85(4): 1205–53.
- Nikceвич, K.M., Gordon, K.B., Tan, L., Hurst, S.D., Kroepfl, J.F., Gardinier, M., Barrett, T.A. und Miller, S.D. (1997). IFN- $\gamma$ -activated primary murine astrocytes express B7 costimulatory molecules and prime naive antigen-specific T cells. *J Immunol*, 158(2): 614–21.
- Noguchi, N., Takasawa, S., Nata, K., Tohgo, A., Kato, I., Ikehata, F., Yonekura, H. und Okamoto, H. (1997). Cyclic ADP-ribose binds to FK506-binding protein 12.6 to release Ca<sup>2+</sup> from islet microsomes. *J Biol Chem*, 272(6): 3133–6.
- Oestreich, E.A., Malik, S., Goonasekera, S.A., Blaxall, B.C., Kelley, G.G., Dirksen, R.T. und Smrcka, A.V. (2009). Epac and phospholipase C $\epsilon$  regulate Ca<sup>2+</sup> release in the heart by activation of protein kinase C $\epsilon$  and calcium-calmodulin kinase II. *J Biol Chem*, 284(3): 1514–22.
- Oestreich, E.A., Wang, H., Malik, S., Kaproth-Joslin, K.A., Blaxall, B.C., Kelley, G.G., Dirksen, R.T. und Smrcka, A.V. (2007). Epac-mediated activation of phospholipase C $\epsilon$  plays a critical role in  $\beta$ -adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca<sup>2+</sup> mobilization in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 282(8): 5488–95.
- Oh-Hora, M., Yamashita, M., Hogan, P.G., Sharma, S., Lamperti, E., Chung, W., Prakriya, M., Feske, S. und Rao, A. (2008). Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nat Immunol*, 9(4): 432–43.
- Okamura, H., Aramburu, J., García-Rodríguez, C., Viola, J.P., Raghavan, A., Tahiliani, M., Zhang, X., Qin, J., Hogan, P.G. und Rao, A. (2000). Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell*, 6(3): 539–50.
- Okamura, H., Garcia-Rodriguez, C., Martinson, H., Qin, J., Virshup, D.M. und Rao, A. (2004). A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. *Mol Cell Biol*, 24(10): 4184–95.
- Partida-Sánchez, S., Cockayne, D.A., Monard, S., Jacobson, E.L., Oppenheimer, N., Garvy, B., Kusser, K., Goodrich, S., Howard, M., Harmsen, A., Randall, T.D. und Lund, F.E. (2001). Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat Med*, 7(11): 1209–16.

- Partida-Sánchez, S., Iribarren, P., Moreno-García, M.E., Gao, J.L., Murphy, P.M., Oppenheimer, N., Wang, J.M. und Lund, F.E. (2004). Chemotaxis and calcium responses of phagocytes to formyl peptide receptor ligands is differentially regulated by cyclic ADP ribose. *J Immunol*, 172(3): 1896–906.
- Patel, S. und Docampo, R. (2010). Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *Trends Cell Biol*, 20(5): 277–86.
- Perez, P.J., Ramos-Franco, J., Fill, M. und Mignery, G.A. (1997). Identification and functional reconstitution of the type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 272(38): 23961–9.
- Perez-Terzic, C.M., Chini, E.N., Shen, S.S., Dousa, T.P. und Clapham, D.E. (1995).  $\text{Ca}^{2+}$  release triggered by nicotinate adenine dinucleotide phosphate in intact sea urchin eggs. *Biochem J*, 312 ( Pt 3): 955–9.
- Pessah, I.N., Francini, A.O., Scales, D.J., Waterhouse, A.L. und Casida, J.E. (1986). Calcium-ryanodine receptor complex. Solubilization and partial characterization from skeletal muscle junctional sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Biol Chem*, 261(19): 8643–8.
- Peterson, B.Z., DeMaria, C.D., Adelman, J.P. und Yue, D.T. (1999). Calmodulin is the  $\text{Ca}^{2+}$  sensor for  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron*, 22(3): 549–58.
- Pitt, S.J., Funnell, T., Sitsapesan, M., Venturi, E., Rietdorf, K., Ruas, M., Ganesan, A., Gosain, R., Churchill, G.C., Zhu, M.X., Parrington, J., Galione, A. und Sitsapesan, R. (2010). TPC2 is a novel NAADP-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -release channel, operating as a dual sensor of luminal pH and  $\text{Ca}^{2+}$ . *J Biol Chem*.
- Prakash, Y.S., Kannan, M.S., Walseth, T.F. und Sieck, G.C. (2000). cADP ribose and  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  regulation in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279(4): H1482–9.
- Prentki, M., Biden, T.J., Janjic, D., Irvine, R.F., Berridge, M.J. und Wollheim, C.B. (1984). Rapid mobilization of  $\text{Ca}^{2+}$  from rat insulinoma microsomes by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*, 309(5968): 562–4.
- Priori, S.G. und Corr, P.B. (1990). Mechanisms underlying early and delayed afterdepolarizations induced by catecholamines. *Am J Physiol*, 258(6 Pt 2): H1796–805.
- Priori, S.G., Mantica, M. und Schwartz, P.J. (1988). Delayed afterdepolarizations elicited in vivo by left stellate ganglion stimulation. *Circulation*, 78(1): 178–85.
- Proven, A., Roderick, H.L., Conway, S.J., Berridge, M.J., Horton, J.K., Capper, S.J. und Bootman, M.D. (2006). Inositol 1,4,5-trisphosphate supports the arrhythmogenic action of endothelin-1 on ventricular cardiac myocytes. *J Cell Sci*, 119(Pt 16): 3363–75.

- Purton, J.F., Tan, J.T., Rubinstein, M.P., Kim, D.M., Sprent, J. und Surh, C.D. (2007). Antiviral CD4<sup>+</sup> memory T cells are IL-15 dependent. *J Exp Med*, 204(4): 951–61.
- Quintana, A., Griesemer, D., Schwarz, E.C. und Hoth, M. (2005). Calcium-dependent activation of T-lymphocytes. *Pflugers Arch*, 450(1): 1–12.
- Rakovic, S., Cui, Y., Iino, S., Galione, A., Ashamu, G.A., Potter, B.V. und Terrar, D.A. (1999). An antagonist of cADP-ribose inhibits arrhythmogenic oscillations of intracellular Ca<sup>2+</sup> in heart cells. *J Biol Chem*, 274(25): 17820–7.
- Rakovic, S., Galione, A., Ashamu, G.A., Potter, B.V. und Terrar, D.A. (1996). A specific cyclic ADP-ribose antagonist inhibits cardiac excitation-contraction coupling. *Curr Biol*, 6(8): 989–96.
- Rao, A., Luo, C. und Hogan, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*, 15: 707–47.
- Revy, P., Sospedra, M., Barbour, B. und Trautmann, A. (2001). Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat Immunol*, 2(10): 925–31.
- Rezazadeh, S., Claydon, T.W. und Fedida, D. (2006). KN-93 (2-[N-(2-hydroxyethyl)]-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine), a calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor, is a direct extracellular blocker of voltage-gated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther*, 317(1): 292–9.
- Risau, W., Engelhardt, B. und Wekerle, H. (1990). Immune function of the blood-brain barrier: incomplete presentation of protein (auto-)antigens by rat brain microvascular endothelium in vitro. *J Cell Biol*, 110(5): 1757–66.
- Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, A.V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J.A., Wagner, S.L., Cahalan, M.D., Velicelebi, G. und Stauderman, K.A. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J Cell Biol*, 169(3): 435–45.
- Rosen, D., Lewis, A.M., Mizote, A., Thomas, J.M., Aley, P.K., Vasudevan, S.R., Parkesh, R., Galione, A., Izumi, M., Ganesan, A. und Churchill, G.C. (2009). Analogues of the nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) antagonist Ned-19 indicate two binding sites on the NAADP receptor. *J Biol Chem*, 284(50): 34930–4.
- Rozen, S. und Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132: 365–86.

- Sag, C.M., Wadsack, D.P., Khabbazzadeh, S., Abesser, M., Grefe, C., Neumann, K., Opiela, M.K., Backs, J., Olson, E.N., Brown, J.H., Neef, S., Maier, S.K.G. und Maier, L.S. (2009). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Heart Fail*, 2(6): 664–75.
- Said, M., Becerra, R., Palomeque, J., Rinaldi, G., Kaetzel, M.A., Diaz-Sylvester, P.L., Copello, J.A., Dedman, J.R., Mundiña-Weilenmann, C., Vittone, L. und Mattiazzi, A. (2008). Increased intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and SR  $\text{Ca}^{2+}$  load contribute to arrhythmias after acidosis in rat heart. Role of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295(4): H1669–83.
- Said, M., Mundiña-Weilenmann, C., Vittone, L. und Mattiazzi, A. (2002). The relative relevance of phosphorylation of the Thr(17) residue of phospholamban is different at different levels of  $\beta$ -adrenergic stimulation. *Pflugers Arch*, 444(6): 801–9.
- Savignac, M., Mellström, B. und Naranjo, J.R. (2007). Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. *Pflugers Arch*, 454(4): 523–33.
- Schieder, M., Roetzer, K., Brueggemann, A., Biel, M. und Wahl-Schott, C.A. (2010). Characterization of two pore channel 2 (TPCN2) -mediated  $\text{Ca}^{2+}$  currents in isolated lysosomes. *J Biol Chem*.
- Schiefer, A., Meissner, G. und Isenberg, G. (1995).  $\text{Ca}^{2+}$  activation and  $\text{Ca}^{2+}$  inactivation of canine reconstituted cardiac sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -release channels. *J Physiol*, 489 ( Pt 2): 337–48.
- Schuber, F. und Lund, F.E. (2004). Structure and enzymology of ADP-ribosyl cyclases: conserved enzymes that produce multiple calcium mobilizing metabolites. *Curr Mol Med*, 4(3): 249–61.
- Schulze-Luehrmann, J. und Ghosh, S. (2006). Antigen-receptor signaling to nuclear factor  $\kappa$  B. *Immunity*, 25(5): 701–15.
- Scriven, D.R., Dan, P. und Moore, E.D. (2000). Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J*, 79(5): 2682–91.
- Sham, J.S., Song, L.S., Chen, Y., Deng, L.H., Stern, M.D., Lakatta, E.G. und Cheng, H. (1998). Termination of  $\text{Ca}^{2+}$  release by a local inactivation of ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(25): 15096–101.
- Sipido, K.R., Callewaert, G. und Carmeliet, E. (1995). Inhibition and rapid recovery of  $\text{Ca}^{2+}$  current during  $\text{Ca}^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res*, 76(1): 102–9.

- Sitsapesan, R., McGarry, S.J. und Williams, A.J. (1995a). Cyclic ADP-ribose, the ryanodine receptor and  $\text{Ca}^{2+}$  release. *Trends Pharmacol Sci*, 16(11): 386–91.
- Sitsapesan, R., Montgomery, R.A. und Williams, A.J. (1995b). New insights into the gating mechanisms of cardiac ryanodine receptors revealed by rapid changes in ligand concentration. *Circ Res*, 77(4): 765–72.
- Skokos, D., Shakhar, G., Varma, R., Waite, J.C., Cameron, T.O., Lindquist, R.L., Schwickert, T., Nussenzweig, M.C. und Dustin, M.L. (2007). Peptide-MHC potency governs dynamic interactions between T cells and dendritic cells in lymph nodes. *Nat Immunol*, 8(8): 835–44.
- Soares, S., Thompson, M., White, T., Isbell, A., Yamasaki, M., Prakash, Y., Lund, F.E., Galione, A. und Chini, E.N. (2007). NAADP as a second messenger: neither CD38 nor base-exchange reaction are necessary for in vivo generation of NAADP in myometrial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292(1): C227–39.
- Steen, M., Kirchberger, T. und Guse, A.H. (2007). NAADP mobilizes calcium from the endoplasmic reticular  $\text{Ca}^{2+}$  store in T-lymphocytes. *J Biol Chem*, 282(26): 18864–71.
- Stefanová, I., Dorfman, J.R. und Germain, R.N. (2002). Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature*, 420(6914): 429–34.
- Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J. und Schulz, I. (1983). Release of  $\text{Ca}^{2+}$  from a non-mitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*, 306(5938): 67–9.
- Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J.D. und Herman, B. (1999). Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev*, 79(4): 1089–125.
- Takasawa, S., Ishida, A., Nata, K., Nakagawa, K., Noguchi, N., Tohgo, A., Kato, I., Yonekura, H., Fujisawa, H. und Okamoto, H. (1995). Requirement of calmodulin-dependent protein kinase II in cyclic ADP-ribose-mediated intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization. *J Biol Chem*, 270(51): 30257–9.
- Tanaka, Y. und Tashjian, A.H.J. (1995). Calmodulin is a selective mediator of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release via the ryanodine receptor-like  $\text{Ca}^{2+}$  channel triggered by cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(8): 3244–8.
- Tang, W.X., Chen, Y.F., Zou, A.P., Campbell, W.B. und Li, P.L. (2002). Role of FKBP12.6 in cADPR-induced activation of reconstituted ryanodine receptors from arterial smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282(4): H1304–10.
- Tanna, B., Welch, W., Ruest, L., Sutko, J.L. und Williams, A.J. (2006). The interaction of an impermeant cation with the sheep cardiac RyR channel alters ryanoid association. *Mol Pharmacol*, 69(6): 1990–7.

- Teggatz, E.G., Zhang, G., Zhang, A.Y., Yi, F., Li, N., Zou, A.P. und Li, P.L. (2005). Role of cyclic ADP-ribose in  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release and vasoconstriction in small renal arteries. *Microvasc Res*, 70(1-2): 65–75.
- Timmerman, L.A., Clipstone, N.A., Ho, S.N., Northrop, J.P. und Crabtree, G.R. (1996). Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of  $\text{Ca}^{2+}$  signals and immunosuppression. *Nature*, 383(6603): 837–40.
- Tinker, A. und Williams, A.J. (1992). Divalent cation conduction in the ryanodine receptor channel of sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol*, 100(3): 479–93.
- Tomida, T., Hirose, K., Takizawa, A., Shibasaki, F. und Iino, M. (2003). NFAT functions as a working memory of  $\text{Ca}^{2+}$  signals in decoding  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation. *EMBO J*, 22(15): 3825–32.
- Valdivia, H.H., Kaplan, J.H., Ellis-Davies, G.C. und Lederer, W.J. (1995). Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by  $\text{Mg}^{2+}$  and phosphorylation. *Science*, 267(5206): 1997–2000.
- Vaughan Williams, E. (1970). *Classification of antiarrhythmic drugs*. Astra, Södertälje, Schweden. In: Cardiac arrhythmias, pp.449-472. Sandoe, E., Flensted-Jensen, E., Olsen, KH. (eds.).
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D.L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R. und Kinet, J.P. (2006). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Science*, 312(5777): 1220–3.
- Várnai, P., Tóth, B., Tóth, D.J., Hunyady, L. und Balla, T. (2007). Visualization and manipulation of plasma membrane-endoplasmic reticulum contact sites indicates the presence of additional molecular components within the STIM1-Orai1 Complex. *J Biol Chem*, 282(40): 29678–90.
- Walsh, C.M., Doherty, M.K., Tepikin, A.V. und Burgoyne, R.D. (2010). Evidence for an interaction between Golli and STIM1 in store-operated calcium entry. *Biochem J*.
- Wang, Y.X., Zheng, Y.M., Mei, Q.B., Wang, Q.S., Collier, M.L., Fleischer, S., Xin, H.B. und Kotlikoff, M.I. (2004). FKBP12.6 and cADPR regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  release in smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286(3): C538–46.
- Weber, F., Meinl, E., Drexler, K., Czlonkowska, A., Huber, S., Fickenscher, H., Müller-Fleckenstein, I., Fleckenstein, B., Wekerle, H. und Hohlfeld, R. (1993). Transformation of human T-cell clones by Herpesvirus saimiri: intact antigen recognition by autonomously growing myelin basic protein-specific T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(23): 11049–53.

- Wei, S.H., Safrina, O., Yu, Y., Garrod, K.R., Cahalan, M.D. und Parker, I. (2007).  $\text{Ca}^{2+}$  signals in  $\text{CD4}^+$  T cells during early contacts with antigen-bearing dendritic cells in lymph node. *J Immunol*, 179(3): 1586–94.
- Wilfinger, W.W., Mackey, K. und Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. Technischer Bericht 3, Molecular Research Center, Cincinnati, OH 45212, USA. billw@mrcgene.com.
- Yamasaki, M., Masgrau, R., Morgan, A.J., Churchill, G.C., Patel, S., Ashcroft, S.J.H. und Galione, A. (2004). Organelle selection determines agonist-specific  $\text{Ca}^{2+}$  signals in pancreatic acinar and beta cells. *J Biol Chem*, 279(8): 7234–40.
- Yamasaki, M., Thomas, J.M., Churchill, G.C., Garnham, C., Lewis, A.M., Cancela, J.M., Patel, S. und Galione, A. (2005). Role of NAADP and cADPR in the induction and maintenance of agonist-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  spiking in mouse pancreatic acinar cells. *Curr Biol*, 15(9): 874–8.
- Yao, Y., Choi, J. und Parker, I. (1995). Quantal puffs of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  evoked by inositol trisphosphate in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*, 482 ( Pt 3): 533–53.
- Zhang, F., Jin, S., Yi, F. und Li, P.L. (2009a). TRP-ML1 functions as a lysosomal NAADP-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  release channel in coronary arterial myocytes. *J Cell Mol Med*, 13(9B): 3174–85.
- Zhang, F. und Li, P.L. (2007). Reconstitution and characterization of a nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  release channel from liver lysosomes of rats. *J Biol Chem*, 282(35): 25259–69.
- Zhang, F., Zhang, G., Zhang, A.Y., Koeberl, M.J., Wallander, E. und Li, P.L. (2006). Production of NAADP and its role in  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization associated with lysosomes in coronary arterial myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291(1): H274–82.
- Zhang, S.L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J.A., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Stauderman, K.A. und Cahalan, M.D. (2005). STIM1 is a  $\text{Ca}^{2+}$  sensor that activates CRAC channels and migrates from the  $\text{Ca}^{2+}$  store to the plasma membrane. *Nature*, 437(7060): 902–5.
- Zhang, X., Tallini, Y.N., Chen, Z., Gan, L., Wei, B., Doran, R., Miao, L., Xin, H.B., Kotlikoff, M.I. und Ji, G. (2009b). Dissociation of FKBP12.6 from ryanodine receptor type 2 is regulated by cyclic ADP-ribose but not beta-adrenergic stimulation in mouse cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 84(2): 253–62.
- Zhou, W. und König, R. (2003). T cell receptor-independent CD4 signalling: CD4-MHC class II interactions regulate intracellular calcium and cyclic AMP. *Cell Signal*, 15(8): 751–62.

- Zong, X., Schieder, M., Cuny, H., Fenske, S., Gruner, C., Rötzer, K., Griesbeck, O., Harz, H., Biel, M. und Wahl-Schott, C. (2009). The two-pore channel TPCN2 mediates NAADP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -release from lysosomal stores. *Pflügers Arch*, 458(5): 891–9.
- Zühlke, R.D., Pitt, G.S., Deisseroth, K., Tsien, R.W. und Reuter, H. (1999). Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature*, 399(6732): 159–62.

## Veröffentlichungen

Dammermann, W.\*, Zhang, B.\*, **Nebel, M.\***, Cordiglieri, C.\*, Odoardi, F., Kirchberger, T., Kawakami, N., Dowden, J., Schmid, F., Dornmair, K., Hohenegger, M., Flügel, A.\*, Guse, A.H.\* und Potter, B.V.L.\* (2009). NAADP-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling via type 1 ryanodine receptor in T cells revealed by a synthetic NAADP antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(26): 10678-83.

Kirchberger, T., Moreau, C., Wagner, G.K., Fliegert, R., Siebrands, C.C., **Nebel, M.**, Schmid, F., Harneit, A., Odoardi, F., Flügel, A., Potter, B.V.L. und Guse, A.H. (2009). 8-Bromocyclic inosine diphosphoribose: towards a selective cyclic ADP-ribose agonist. *Biochem J*, 422(1): 139-49.

Cordiglieri, C., Odoardi, F., Zhang, B., **Nebel, M.**, Kawakami, N., Klinkert, W.E.F., Lodygin, D., Lühder, F., Breunig, E., Schild, D., Ulaganathan, V.K., Dornmair, K., Dammermann, W., Potter, B.V.L., Guse, A.H. und Flügel, A. (2010). Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate-mediated calcium signalling in effector T cells regulates autoimmunity of the central nervous system. *Brain*, 133(Pt 7): 1930-43.

\* gleichberechtigte Autorenschaft

## Abstracts und/oder Posterpräsentationen

Dammermann, W., Cordiglieri, C., Zhang, B., Schmid, F., **Nebel, M.**, Odoardi, F., Kawakami, N., Potter, B.V.L., Flügel, A. und Guse, A.H. (2007). The NAADP/calcium signaling pathway: a major signal transducer in proliferation and cytokine production of CD4<sup>+</sup> effector T cells. Posterpräsentation bei der *Tagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e.V. (GBM)* in Hamburg vom 16.-19. September 2007.

**Nebel, M.**, Schmid, F., Zhang, B., Cordiglieri, C., Odoardi, F., Laing, S., Koch-Nolte, F., Potter, B.V.L., Flügel, A. und Guse, A.H. (2008). Global and local calcium signaling upon APC T cell interaction. Posterpräsentation beim *NAD meeting* in Hamburg vom 14.-17. September 2008 und dem *10th Symposium on Calcium-Binding Proteins in Normal and Transformed Cells (Meeting of the European Calcium Society)* in Leuven/Belgien vom 17.-20. September 2008.

**Nebel, M.**, Fliegert, R., Zhang, B., Flügel, A., Potter, B.V.L. und Guse, A.H. (2009). Calcium signaling triggered by NAADP in T cells determines cell shape and motility during immunological synapse formation. Akzeptiert als Vortrag beim *5th Leukocyte Signal Transduction Workshop* auf Kreta/Griechenland vom 13.-18. Juni 2009.

**Nebel, M.**, Fliegert, R., Zhang, B., Odoardi, F., Herich, L., Flügel, A., Potter, B.V.L. und Guse, A.H. (2009). Calcium signaling triggered by NAADP in T cells determines cell shape and motility during immunological synapse formation. Posterpräsentation beim *11th Symposium on Calcium-Binding Proteins in Normal and Transformed Cells (Meeting of the European Calcium Society)* in Warschau/Polen vom 6.-9. September 2010.

# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Andreas H. Guse für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine stetige Motivation und Begeisterungsfähigkeit sowie die konstruktive Kritik bei der Korrektur dieser Arbeit.

PD Dr. H. Lüthen danke ich für die Übernahme der Betreuung seitens des Fachbereichs Biologie.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Flügel, insbesondere Dr. F. Odoardi, Dr. C. Cordiglieri und Dr. N. Kawakami möchte ich für die Einweisung in die Kultur primärer T-Zellen sowie jegliche Unterstützung bei der Etablierung des Zweizellsystems danken.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. B.V.L. Potter sowie Dr. B. Zhang und Dr. S. Bartlett von der University of Bath für die Bereitstellung des NAADP-Antagonisten BZ194.

Prof. Dr. T. Eschenhagen und der Arbeitsgruppe von Dr. L. Carrier danke ich für die Unterstützung beim Herzzellprojekt, insbesondere Elisabeth Krämer für die zahlreichen Präparationen von Cardiomyozyten und die Bereitstellung der cDNA sowie Dr. S. Schlossarek für die Organisation.

Dr. V. Rudolph und Bianca Mattheß danke ich ebenfalls für die Präparation primärer Cardiomyozyten.

Bei Sabrina Laing und Dr. N. Schwarz aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Koch-Nolte möchte ich mich für die Durchführung der Messungen am Durchflusszytometer bedanken.

Lena Herich danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Allen früheren und jetzigen Kollegen, insbesondere Ralf Fliegert, Angelika Harneit, Kathrin Jung, Tanja Kirchberger, Frederike Schmid, Cornelia Siebrands und Karin Weber, möchte ich für ihre große Hilfsbereitschaft, die zahlreichen anregenden Diskussionen und das nette und stets motivierende Arbeitsklima danken.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für ihre liebevolle Unterstützung.