

Aus dem
Institut für Biochemie und Molekularbiologie I des
Zentrums für Experimentelle Medizin des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

**Untersuchungen zu Calcium-mobilisierenden
Adenin-Nucleotiden in humanen T-Lymphocyten**

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften



am
Fachbereich Chemie
der
Universität Hamburg

vorgelegt von
Andreas Gasser
aus Krefeld/Nordrhein-Westfalen

2005

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Andreas Gamm

Hamburg, den 20. Oktober 2005

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom 01. September 2001 bis zum 31. August 2005 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. H. Guse am Zentrum für Experimentelle Medizin, Institut für Biochemie und Molekularbiologie I: Zelluläre Signaltransduktion, Universität Hamburg, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, durchgeführt.

1. Gutachter:

Prof. Dr. Chris Meier (Universität Hamburg, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Fachbereich Chemie)

2. Gutachter:

Prof. Dr. Andreas H. Guse (Universität Hamburg, Fakultät für Medizin)

Datum der mündlichen Prüfung: 09. Dezember 2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Funktion von T-Lymphocyten im Immunsystem	1
1.2. Aktivierung von T-Lymphocyten	2
1.3. Calcium und die Signaltransduktion von T-Lymphocyten	4
1.3.1. Durch Botenstoffe vermittelte Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern	6
1.3.1.1. <i>myo</i> -Inositol-1,4,5-trisphosphat	7
1.3.1.2. Cyclische Adenosin-Diphosphoribose	8
1.3.1.3. Nicotinsäure-Adenindinucleotid-2'-Phosphat	10
1.3.2. Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulär-Raum	12
1.3.2.1. Speicher-vermittelter Calcium-Einstrom	13
1.3.2.2. Speicher-unabhängiger Calcium-Einstrom	14
1.3.3. Effektorsysteme von Calcium	14
1.4. Ionenkanäle der TRP-Familie	16
1.4.1. Die Superfamilie der TRP-Ionenkanäle	16
1.4.2. Der Ionenkanal TRPM2	18
1.4.2.1. Aktivierung und Regulation von TRPM2	20
1.4.2.2. Physiologische Rolle von TRPM2	22
2. Problemstellung	24
3. Material und Methoden	26
3.1. Geräte und Materialien	26
3.2. Software	27
3.3. Medien, Chemikalien und Reagenzien-Kits	28
3.4. Puffer und Lösungen	30
3.5. Kultivierung von T-Lymphocyten der Linien Jurkat und BW5147	31
3.6. Derivatisierung von NAADP mit Chloroacetaldehyd	31
3.7. Extraktion von Nucleotiden aus T-Lymphocyten	32
3.7.1. NAADP-Extraktion aus Zellen	32
3.7.2. Festphasenextraktion zur Aufreinigung der NAADP-Extrakte	33
3.7.3. ADPR-Extraktion aus Zellen	33
3.7.4. Festphasenextraktion zur Aufreinigung von ADPR	34

3.8. HPLC-Techniken	34
3.8.1. Analytik von Etheno-NAADP	34
3.8.1.1. Gradienten-Elution	34
3.8.1.2. Isokratische Elution	35
3.8.2. Analytik von ADPR	36
3.8.3. Analytik der Umsetzung von NAADP durch ADP-Ribosylcyclase . . .	37
3.9. Zyklischer Enzym-Assay zur Quantifizierung von NAADP	38
3.9.1. Reinigung der verwendeten Enzyme	38
3.9.2. NADase-Verdau und Umsetzung von NAADP zu NADP	38
3.9.3. Amplifikations-Reaktion	39
3.10. RT-PCR von TRPM2	39
3.10.1. Analyse der Expression von TRPM2 durch RT-PCR	39
3.10.2. Klonierung und Sequenzierung	41
3.11. Calcium-Messungen in T-Lymphocyten	42
3.11.1. Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration in Gegenwart von extrazellulärem Calcium	42
3.11.2. Direkte Quantifizierung des Calcium-Einstroms	43
3.11.3. Indirekte Quantifizierung des Calcium-Einstroms	43
3.12. Zellzahl-Bestimmung bei Behandlung von T-Zellen mit Concanavalin A . . .	44
4. Ergebnisse	45
4.1. Entwicklung eines analytischen Systems zur Quantifizierung intrazellulärer NAADP-Konzentrationen	45
4.1.1. HPLC-basierte Analytik von NAADP	45
4.1.1.1. Derivatisierung von NAADP mit Chloroacetaldehyd	46
4.1.1.2. Optimierung der Derivatisierungsbedingungen	49
4.1.2. Entwicklung eines gekoppelten Enzym-Assays zur Quantifizierung ge- ringer NAADP-Mengen	52
4.1.2.1. Prinzip des NAADP-Assays	52
4.1.2.2. Etablierung der Amplifikations- und Indikator-Reaktion . . .	53
4.1.2.3. Umsetzung von NAADP zu NADP	54
4.1.2.4. Enzymatischer Abbau von NADP durch eine NAD-Glycohy- drolase aus <i>Neurospora crassa</i>	55
4.1.2.5. Untersuchungen zum Einfluß anderer Substanzen auf den Enzym-Assay	58
4.1.2.6. Extraktion von NAADP aus T-Lymphocyten	59
4.2. Untersuchungen zur Funktion des Ionenkanals TRPM2 und seines Agonisten ADPR bei der Erzeugung von Calcium-Signalen in T-Lymphocyten	61
4.2.1. Bestimmung intrazellulärer ADPR-Konzentrationen durch HPLC . . .	61

4.2.1.1.	Entwicklung eines HPLC-Verfahrens zur Quantifizierung von ADPR	62
4.2.1.2.	Extraktion von ADPR aus T-Lymphocyten	63
4.2.1.3.	Festphasenextraktion zur Aufreinigung der Zellextrakte	65
4.2.1.4.	Untersuchungen zum Abbau von NAD und ADPR während der Zellextraktion	68
4.2.2.	Änderung der zellulären ADPR-Konzentration bei Stimulation von T-Lymphocyten	69
4.2.3.	Analyse der Expression von TRPM2	71
4.2.4.	Differenzierung unterschiedlicher Calcium-Einstrom-Wege durch Inhibition mit Gadolinium	74
4.2.5.	Inhibition der ADPR-Bildung durch Cibacron Blue 3GA	76
4.2.6.	Pharmakologische Charakterisierung der am ConA-vermittelten Calcium-Einstrom beteiligten Signalsysteme	79
4.2.7.	Physiologische Relevanz des ADPR/TRPM2-Systems bei der Apoptose von T-Lymphocyten	81
5.	Diskussion der Ergebnisse	83
5.1.	Analytik von NAADP	83
5.1.1.	HPLC-basierte Analytik von NAADP	84
5.1.2.	Quantifizierung von NAADP mit einem Enzym-Assay	85
5.1.3.	Bestimmung intrazellulärer NAADP-Konzentrationen	88
5.2.	Funktion von ADPR als Calcium-mobilisierender Botenstoff in T-Zellen	91
5.2.1.	Quantifizierung intrazellulärer ADPR-Konzentrationen durch HPLC	92
5.2.2.	ConA-induzierte Bildung von ADPR	96
5.2.3.	Expression von TRPM2 in T-Lymphocyten	97
5.2.4.	Pharmakologische Charakterisierung der am ConA-vermittelten Calcium-Einstrom beteiligten Signalsysteme	99
5.2.5.	Physiologische Relevanz der ADPR/TRPM2-Systems	102
5.2.6.	Regulation des Calcium-Einstroms durch das ADPR/TRPM2-System	104
6.	Zusammenfassung	108
7.	Abstract	110
8.	Danksagung	112
9.	Literaturverzeichnis	113
A.	Anhänge	I
A.1.	Veröffentlichungen und Kongreßbeiträge	I
A.2.	Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge für besonders gefährliche Stoffe	III

Abkürzungen

[Ca ²⁺]	Konzentration zweiwertiger Calciumionen
[Ca ²⁺] _i	Konzentration zweiwertiger Calciumionen im Cytosol einer Zelle
1,N ⁶ -ε	1,N ⁶ -Etheno
2'-P-ADPR	2'-Phospho-Adenosin-Diphosphoribose
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ADPR	Adenosin-Diphosphoribose
ADPRC	ADP-Ribosylcyclase
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
A. U.	arbitrary units
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin
Ca/CaM	Ca ²⁺ -Calmodulin-Komplex
CAA	Chloroacetaldehyd
CaM	Calmodulin
CaMK	Ca/CaM-abhängige Proteinkinasen
cADPR	zyklische Adenosin-Diphosphoribose
cAMP	3',5'-zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	3',5'-zyklisches Guanosinmonophosphat
ConA	Concanavalin A
CRAC	Ca ²⁺ -release activated channel
DAG	sn-Diacylglycerol
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EC ₅₀	Konzentration mit halbmaximalem Effekt
ER	Endoplasmatisches Retikulum

ERK	extracellular-signal regulated kinase
<i>g</i>	Vielfaches der Erdbeschleunigung
G6P-DH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAP	GTPase aktivierendes Protein
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
IC ₅₀	Konzentration mit halbmaximalem inhibitorischem Effekt
<i>I</i> _{CRAC}	Calcium release activated Calcium current
<i>I</i> κ B	Inhibitor von NF κ B
IL	Interleukin
InsP ₃	<i>myo</i> -Inositol-1,4,5-trisphosphat
InsP ₃ -R	<i>myo</i> -Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
LAT	linker of activation in T cells
LB	Nährmedium nach Luria-Bertani
MAPK	mitogen activated protein kinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPKK-Kinase
MCS	multiple cloning site
MHC	major histocompatibility complex
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
NAADP	Nicotinsäure-Adenin-Dinukleotid-2'-Phosphat
NAD(P)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid(-2'-Phosphat)
NADase	NAD-Glycohydrolase
NF-AT _c	nuclear factor of activated T cells, cytoplasmatic component
NF-AT _n	nuclear factor of activated T cells, nuclear component
NF κ B	nukleärer Faktor κ B
NO	Stickstoffmonoxid
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PARG	Poly(ADP-Ribose)-Glycohydrolase
PCA	Perchlorsäure
PCR	Polymerase Chain Reaction
PH	Plekstrin-Homologie-Domäne
PHA	Phyto-Hämagglutinin
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PIP ₂	Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-trisphosphat

RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
Upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
Ry	Ryanodin
RyR	Ryanodin-Rezeptor(en)
SD	standard derivation
SERCA	sarcoplasmatic/endoplasmatic reticulum Ca^{2+} -ATPase
SEM	standard error of mean
SFM	Serum-freies Medium
SH2	Src-Homologie-Domäne 2
SLP-76	SH2 domain leukocyte protein of 76 kD
SOC	store operated channel(s)
SOCE	store operated Ca^{2+} entry
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBAHP	Tetrabutylammonium-Hydrogenphosphat
TCA	Trichloressigsäure
TCR	T-Zell-Rezeptor
TFA	Trifluoressigsäure
T_H -Zellen	T-Helfer-Zellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	transient receptor potential
TRPC	canonical transient receptor potential
TRPM	melastatin-related transient receptor potential
TRPV	vanilloid receptor-related transient receptor potential
U	unit
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
ZAP-70	ζ -assoziiertes Protein mit 70 kD

1. Einleitung

1.1. Funktion von T-Lymphocyten im Immunsystem

Alle multizellulären Organismen müssen sich im Laufe ihres Lebens gegen Krankheitserreger wie Bakterien, Viren und parasitäre Ein- und Vielzeller zur Wehr setzen. Daher hat sich im Verlauf der Evolution ein Immunsystem gebildet, bei dem es sich um ein komplexes Netzwerk aus Zellen und Biomolekülen handelt, das zwischen „eigen“ und „fremd“ sowie „harmlos“ und „gefährlich“ unterscheiden kann. Auf diese Weise erkennt das Immunsystem eingedrungene Pathogene und maligne transformierte körpereigene Zellen und zerstört diese (Janeway et al., 2001).

Das Immunsystem besteht aus zwei großen Bereichen: Der angeborenen Immunität und dem spezifischen, adaptiven Immunsystem. Die angeborene Immunität, die Antigene an konservierten Eigenschaften erkennt, besteht aus den Granulocyten, den Makrophagen und dem alternativen Weg des Komplementsystems. Dieser Teil des Immunsystems besitzt kein Gedächtnis, d. h. die Immunreaktion erfolgt bei wiederholter Infektion durch den gleichen Erreger in gleichbleibender Stärke und führt zu keiner anhaltenden Immunität. Die Phagocyten des angeborenen Immunsystems stellen trotzdem eine wichtige erste Verteidigungslinie gegen viele pathogene Mikroorganismen dar und sind besonders für die Abwehr bakterieller Infektionen essentiell (Janeway et al., 2001).

Das angeborene Immunsystem kann nur solche Pathogene erkennen, die konservierte Eigenschaften aufweisen. Daher hat die adaptive Immunantwort, die auf den Lymphocyten, einer Subpopulation der Leukocyten, basiert, eine herausragende Bedeutung. Diese Zellen können durch Antigen-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche körperfremde Strukturen erkennen. Die Gene, die für diese Rezeptoren codieren, werden im Verlauf der Entwicklung der Lymphocyten in einem komplexen, als somatische Rekombination bezeichneten Prozeß so aus Genfragmenten rearrangiert, daß jede lymphocytäre Zelle ihre eigene Spezifität erhält. Diese legt fest, durch welches Antigen die Zelle aktiviert werden kann. Im Verlauf der individuellen Entwicklung der Lymphocyten werden im Thymus während der sogenannten klonalen Deletion die Zellen durch Apoptose getötet, die für körpereigene Strukturen spezifisch sind. Auf diesem Prozeß beruht die Toleranz der verbleibenden Zellpopulation gegen körpereigene Antigene.

Eine Immunantwort kommt zustande durch die klonale Selektion und Expansion der für das Antigen spezifischen Zellen. Dazu müssen die Zellen durch Erkennung ihres Antigens aktiviert werden. Ein Teil des entstandenen Zellklons bleibt nach Ende der Immunreaktion als Gedächtniszellen zurück und kann bei wiederholter Infektion mit dem gleichen Patho-

gen schnell reaktiviert werden. Auf diese Weise wird eine mitunter lebenslang anhaltende Immunität erreicht (Janeway et al., 2001).

Adaptive Immunreaktionen zeichnen sich durch die Aktivierung von zwei miteinander verbundenen Wegen aus: B-Lymphocyten synthetisieren nach ihrer klonalen Expansion lösliche und membrangebundene Antikörper und bilden so die Grundlage der humoralen Immunität, die gegen Pathogene im Extrazellulärraum gerichtet ist. T-Lymphocyten stellen dagegen die zelluläre Immunität dar, die sich gegen intrazelluläre Pathogene sowie transformierte Zellen richtet. Es gibt zwei große Subpopulationen der T-Lymphocyten: Cytotoxische T-Lymphocyten, die durch das Oberflächenantigen CD8 gekennzeichnet sind, töten infizierte und transformierte Zellen. T-Helfer-(T_H)-Zellen, die das Oberflächenantigen CD4 aufweisen, aktivieren Makrophagen und B-Lymphocyten. CD4-positive T-Zellen können aufgrund der von ihnen gebildeten Cytokine weiter in die Subpopulationen der T_H1- und T_H2-Zellen differenziert werden (Janeway et al., 2001).

1.2. Aktivierung von T-Lymphocyten

Zur Aktivierung von T-Lymphocyten ist eine zeitlich und räumlich koordinierte Abfolge von Signalprozessen notwendig, an deren Ende die klonale Expansion der Zelle steht (Berridge, 1997). Dabei kommt es zur Aktivierung des auf der Oberfläche der Zellen vorhandenen T-Zell-Rezeptor-Komplexes (TCR-Komplex), der aus dem TCR selbst sowie den assoziierten CD3-Molekülen besteht. Der TCR wird aus je einer α - und β -Kette gebildet, deren Gene bei der somatischen Rekombination während der T-Zell-Entwicklung rekombiniert werden. Daher hat jeder TCR eine eigene Spezifität, die die Erkennung genau eines Antigens im Kontext mit einem Protein des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (MHC) ermöglicht. Das Antigen wird auf der Oberfläche antigen-präsentierender Zellen (APCs) als prozessiertes Peptidfragment, gebunden an ein MHC-Molekül, präsentiert. MHC-Proteine der Klasse I befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen, solche der Klasse II nur auf sogenannten professionell antigen-präsentierenden Zellen, d. h. Makrophagen, B-Lymphocyten und dendritischen Zellen.

Der TCR selbst hat nur einen kleinen cytoplasmatischen Anteil, weshalb die assoziierten Proteine des CD3-Komplexes essentiell für die Signaltransduktion durch den TCR sind. Nach Ligation des TCR durch den Komplex aus antigenem Peptid und MHC-Molekül kommt es schnell zu multiplen Tyrosin-Phosphorylierungen innerhalb konservierter Motive (ITAMs) der CD3-Proteine. Die Phosphorylierung der ITAM-Motive erfolgt durch Tyrosin-Kinasen der Src-Familie, wobei in T-Zellen insbesondere die Proteine p59^{fyn} und p56^{lck} beteiligt sind. Diese sind durch Myristoyl-Reste an die Plasmamembran gebunden und mit den als Co-Rezeptoren wirksamen Oberflächenantigenen CD4 und CD8 assoziiert. Diese binden bei Wechselwirkung des TCR mit dem Peptid-MHC-Komplex an den invarianten Teil des MHC-Proteins, so daß die Src-Kinasen in die räumliche Nähe des TCR-CD3-Komplexes gelangen und die ITAM-Motive phosphorylieren können. Die Src-Kinasen aktivieren sich zuvor durch

gegenseitige Autophosphorylierung in *trans* (Bolen, 1995). Die Aktivität der Src-Kinasen wird außerdem durch die Proteinphosphatase CD45 positiv (Okumura und Thomas, 1995) und durch die Kinase Csk negativ (Rudd et al., 1994) reguliert.

Nach erfolgter Phosphorylierung innerhalb der ITAM-Motive kommt es zur Rekrutierung Phospho-Tyrosin-bindender Proteine mit SH2-(Src Homologie 2)-Domänen zur Membran. Dabei handelt es sich um Tyrosin-Kinasen der Syk-Familie, in T-Zellen um das ZAP-70-Protein. Die Src-Kinasen aktivieren ZAP-70 durch Phosphorylierung, woraufhin dieses sich primär selbst phosphoryliert, so daß weitere Signalproteine zur Plasmamembran rekrutiert werden (z.B. FAK-related PTK, ras-GAP, Abl, Vav oder Cbl (Chan und Shaw, 1996)). ZAP-70 phosphoryliert auch die beiden Adapterproteine SLP-76 und LAT. Bei LAT handelt es sich um ein Transmembranprotein mit multiplen Tyrosin-Resten, nach deren Phosphorylierung Bindungsstellen für weitere Proteine entstehen. Dadurch kommt es zur Rekrutierung des Grb2/SOS-Komplexes, der regulatorischen p85-Untereinheit der PI3-Kinase sowie der Phospholipase C- γ (PLC- γ) zur Membran. Durch diese Vorgänge werden mehrere Signalwege in Gang gesetzt, die im folgenden kurz dargestellt werden:

1. Ca^{2+} -Ionen werden aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Dies geschieht einerseits durch Aktivierung von PLC- γ , die die beiden sekundären Botenstoffe *sn*-Diacylglycerol (DAG) und *myo*-Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP_3) erzeugt. Andererseits wird eine ADP-Ribosylcyclase aktiviert, die den Botenstoff zyklische Adenosin-Diphosphoribose (cADPR) produziert. Sowohl InsP_3 als auch cADPR lösen eine Ca^{2+} -Freisetzung aus.
2. Der Grb2/SOS-Komplex aktiviert das membrangebundene kleine G-Protein p21^{ras} , indem der Austausch von GDP durch GTP erleichtert wird. Die GTP-Form von p21^{ras} aktiviert eine Kaskade aus MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK), MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) und MAP-Kinase (MAPK), an deren Ende die Phosphorylierung und funktionelle Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 steht.
3. Die Rekrutierung der regulatorischen p85-Untereinheit der PI3-Kinase führt zur Aktivierung der katalytischen p110-Untereinheit des Enzyms. Dadurch wird das Substrat PIP_2 zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat phosphoryliert, an das Proteine mit einer Plekstrin-Homologie-(PH)-Domäne binden können. Zu diesen Proteinen gehört die Serin/Threonin-Kinase Akt, die nach der Rekrutierung zur Membran durch die Kinasen PDK1 und PDK2 aktiviert wird (Downward, 1998). Von Akt führen weitere Signalwege zum Bad-Protein, der Glycogen-Synthase-Kinase-3- β und zur Proteinkinase p70^{S6K} (Übersicht in Wagener (1999)).

Während der negativen Selektion im Thymus können nicht alle potentiell selbst-reaktiven T-Zellen eliminiert werden, weil antigene Peptide nicht präsentiert werden, die nur in spezialisierten Geweben außerhalb des Thymus hergestellt werden. Daher ist es für die Wahrung der Selbst-Toleranz notwendig, daß T-Zellen grundsätzlich nur durch zwei gleichzeitige Signale aktiviert werden können: Zusätzlich zur Stimulation des TCR-Komplexes durch das

Antigen im Kontext mit dem MHC-Protein ist ein zweites Signal notwendig, das nur von professionellen APCs bereitgestellt wird. Der wichtigste bekannte Co-Rezeptor auf T-Zellen ist das Oberflächenantigen CD28, dessen Liganden, die Glycoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), ausschließlich auf professionellen APCs vorhanden sind. Die Bindung der Liganden an CD28 führt zu einer Stabilisierung der mRNAs von Cytokinen und steigert die Aktivität von Transkriptionsfaktoren (Berridge, 1997).

Eine Integration der diversen an der T-Zell-Aktivierung beteiligten Signalwege erfolgt durch die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren. Daran sind insbesondere die Transkriptionsfaktoren NF-AT, AP-1, CREB und NF κ B beteiligt, die gemeinsam mit weiteren Proteinen an Gen-Promotoren binden und so die Genexpression regulieren. Schlüsselgene für die klonale Expansion von T-Lymphocyten sind das IL-2-Gen sowie das Gen der α -Kette des IL-2-Rezeptors, durch deren Genprodukte eine autokrine Signalschleife gebildet wird, die für die klonale Expansion notwendig ist (Janeway et al., 2001).

Die Vorgänge und Signalwege, die an der Aktivierung naiver T-Zellen beteiligt sind, sind in Abb. 1.1 (Seite 5) schematisch zusammengefaßt.

1.3. Calcium und die Signaltransduktion von T-Lymphocyten

Zur Aktivierung von T-Zellen durch Antigen-Kontakt oder durch Stimuli, die den TCR quervernetzen, ist die Erhöhung der intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) eine notwendige Voraussetzung (Guse, 1998; Lewis, 2001). Eine Untersuchung von Ca^{2+} -Signalen in intakten Zellen wurde erst möglich durch die Entwicklung membranpermeabler Ca^{2+} -sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe wie Fura-2/AM (Fura-2-pentakis-(acetoxymethyl)-ester), die in der Zelle durch Esterasen enzymatisch hydrolysiert werden und so den aktiven Fluoreszenzfarbstoff freisetzen, der nicht mehr durch die Membran aus der Zelle hinaus diffundieren kann (Williams et al., 1985).

Durch Stimulation von T-Zell-Populationen (z. B. bei der Messung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in einer Zellsuspension) mit Lektinen, Antikörpern gegen den TCR-Komplex (z. B. OKT3, der gegen den CD3-Komplex gerichtet ist) oder APCs kommt es zu einem biphasischen Ca^{2+} -Signal. Dabei tritt ein initialer Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von einem Basalwert von etwa 100 nM zu einem Peak von 300 nM bis 1 μM innerhalb der ersten Minute nach Stimulation auf. Diesem kurzzeitigen Peak folgt ein Abfall auf ein konstantes Plateau in Bereich von 150 – 300 nM, das für mehrere Stunden andauern kann (Premack und Gardner, 1992). Das schnelle, initiale Ca^{2+} -Signal kann nicht durch Chelatisierung extrazellulären Calciums, durch pharmakologische Blockade der Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran oder durch Depolarisation der Zellen inhibiert werden. Dies deutet darauf hin, daß der initiale Peak des Ca^{2+} -Signals durch Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern erzeugt wird. Die zweite, langanhaltende Plateau-Phase des Signals wird durch die genannten Faktoren vermindert und konnte daher dem Einstrom von Ca^{2+} aus dem extrazellulären Raum zugeordnet werden (Premack und Gardner, 1992; Guse, 1998).

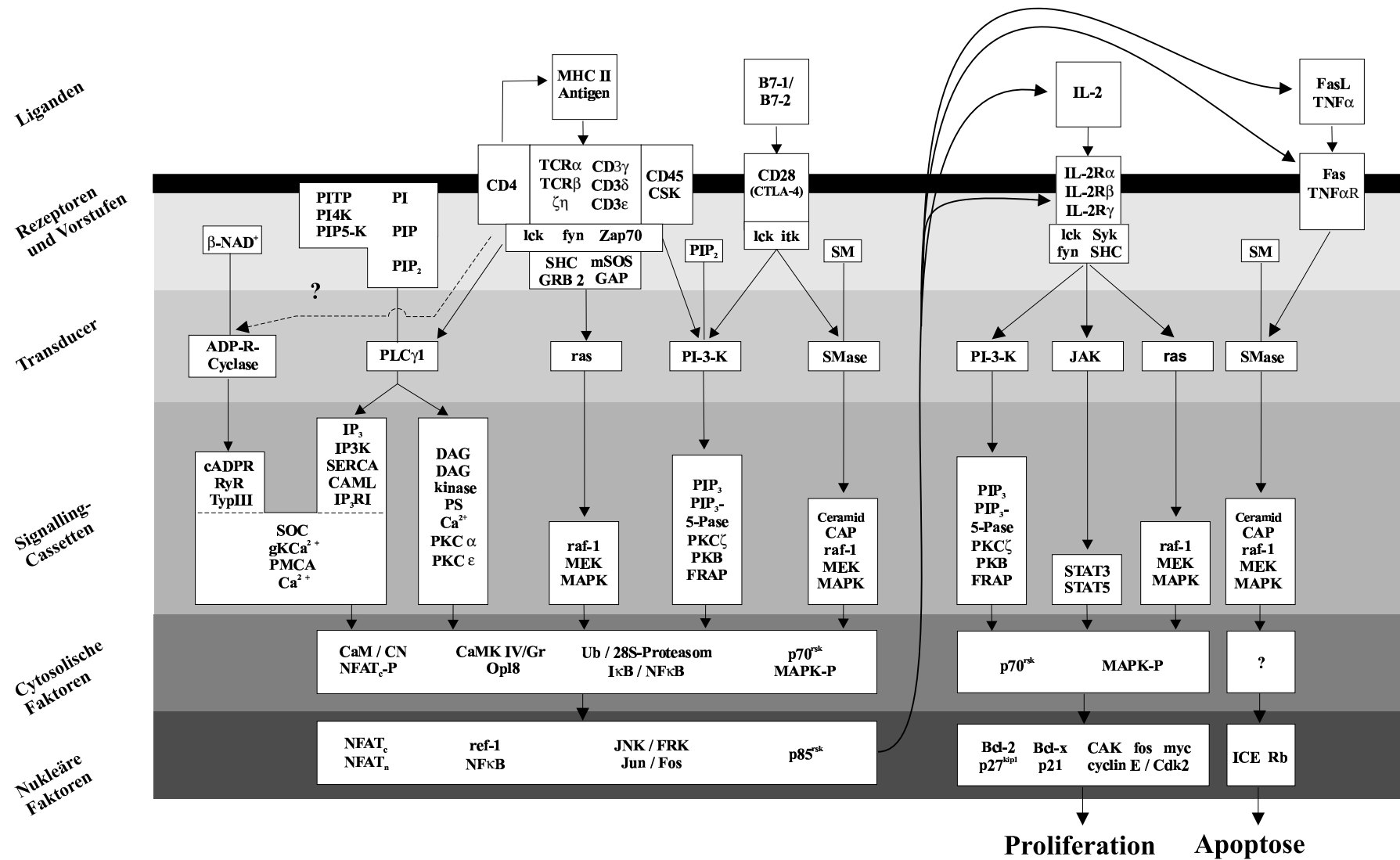


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Signaltransduktionskaskaden während der T-Zell-Aktivierung. Aus [Fliegert \(1999\)](#), verändert nach [Berridge \(1997\)](#). Legende siehe nächste Seite.

Legende zu Abb. 1.1: Die Darstellung der T-Zell-Aktivierung beginnt links oben mit der Ligation des TCR durch ein MHC II-gebundenes Antigen-Fragment und endet unten rechts mit Apoptose oder Proliferation der Zelle. Während der Aktivierung werden Informationen durch Signalwege weitergeleitet, die aus Rezeptoren, Vorläufern, Transducern, Signal-Kassetten und cytoplasmatischen und nukleären Effektoren bestehen. Um die Übersicht zu erleichtern, sind funktionell zusammengehörige Komponenten zu Gruppen zusammengefaßt und in Kästen dargestellt. Entnommen aus [Fliegert \(1999\)](#), verändert nach [Berridge \(1997\)](#). Abkürzungen: CAML, Ca^{2+} -Signal modulierter Cyclophilin-Ligand; CAK, Cdk-aktivierende Kinase; CAP, Ceramid-aktivierte Proteinkinase; CSK, C-terminale Src-Kinase; FRAP, FKBP12-Rapamycin assoziiertes Protein; FRK, Fos-regulierende Kinase; GAP, GTPase aktivierendes Protein; gKCa, Ca^{2+} -aktivierter Kaliumkanal; GRB-2, Wachstumsfaktor-Rezeptor gebundenes Protein 2; ICE, Interleukin 1b-converting enzyme; $\text{I}\kappa\text{B}$, Inhibitor von $\text{NF}\kappa\text{B}$; IL-2R, Interleukin-2 Rezeptor; JAK, Janus-Kinase; JNK, c-Jun N-terminale Kinase; MAPK, Mitogen-aktivierte Proteinkinase; MEK, MAPK/ERK-Kinase; mSOS, Säugerhomologes von Son of Sevenless; $\text{NF}\kappa\text{B}$, Nukleärer Faktor κB ; p70rsk, 70 kD ribosomale S6-Kinase; p85rsk, 85 kD ribosomale S6-Kinase; PITP, Phosphatidylinositol Transferprotein; PI, Phosphatidylinositol; PIP, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PI3K, Phosphatidylinositol 3-Kinase; PI4K, Phosphatidylinositol 4-Kinase; PIP5K, Phosphatidylinositol-4-phosphat 5-Kinase; PKB, Proteinkinase B; PKC, Proteinkinase C; PMCA, Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase; PS, Phosphatidylserin; Rb, Retinoblastoma-Protein; SHC, SH2-enhaltendes Protein; SHP, SH2-enhaltende Proteintyrosin-Phosphatase; SIP, SH2-enhaltende Inositolpolyphosphat 5-Phosphatase; SM, Sphingomyelin; SMase, Sphingomyelinase; STAT, Signaltransducer and activator of transcription; TNF, Tumornekrosefaktor; TNFR, Tumornekrosefaktor-Rezeptor; Ub, Ubiquitin.

Besonders interessant ist, daß bei der Untersuchung von Ca^{2+} -Signalen in Einzelzellen eine große Heterogenität gefunden wurde ([Wacholtz und Lipsky, 1993](#); [Wulfing et al., 1997](#); [Guse, 1998](#)): Einige Zellen zeigen ein ähnliches Signal wie das in Suspensionsmessungen gefundene, während andere Ca^{2+} -Oszillationen unterschiedlicher Frequenz erzeugen, nur einen einzelnen Peak ohne anschließendes Plateau aufweisen oder gar nicht reagieren. Erst bei simultaner Messung vieler Einzelzellen ergibt sich das für eine Zellpopulation beschriebene biphasische Signal. Folglich kann das Ca^{2+} -Signal nicht nur die Zustände „ein“ oder „aus“ annehmen, sondern enthält mehr Informationen. Durch Untersuchungen an primären, naiven T-Zellen, T-Zell-Klonen, T-Zell-Hybridomen und transformierten T-Zell-Linien wurde abgeleitet, daß Art und Stärke des Ca^{2+} -Signals unter anderem vom Typ und Differenzierungszustand der Zelle, ihrem Stadium im Zellzyklus sowie von der APC und vom präsentierten Antigen abhängen (Übersicht in [Lewis \(2001\)](#)). Das Ca^{2+} -Signal ist daher ein wesentlicher Teil der Informationen, die der Zelle in einem bestimmten immunologischen Kontext durch den TCR und die Co-Rezeptoren vermittelt werden, und löst Aktivierung, Anergie oder Apoptose der Zelle aus ([Berridge et al., 1998](#)).

1.3.1. Durch Botenstoffe vermittelte Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern

In Jurkat-T-Lymphocyten, die häufig als Modellsystem für die Signalwege in T-Lymphocyten dienen ([Abraham und Weiss, 2004](#)), sind durch pharmakologische Eigenschaften mindestens vier verschiedene intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher differenzierbar (schematische Darstellung in

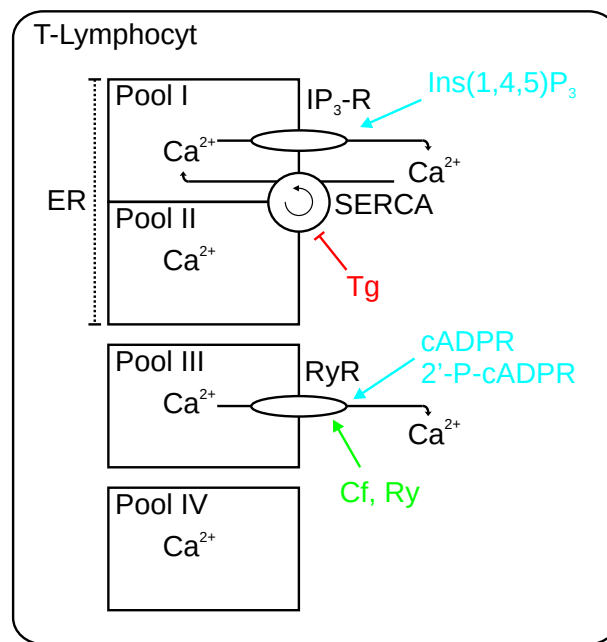


Abbildung 1.2: Ca^{2+} -Speicher in T-Lymphocyten; verändert nach Guse et al. (1997). Die Speicher I und II gehören zum Kompartiment des ER, da sie gegenüber Thapsigargin (Tg) sensitiv sind. Speicher I ist durch InsP_3 (Abschnitt 1.3.1.1) entleerbar. Speicher III ist sensitiv gegen die Pharmaka Ryanodin (Ry) und Coffein (Cf), sowie gegen die sekundären Botenstoffe cADPR (Abschnitt 1.3.1.2) und $2'$ -Phospho-cADPR. Agonisten sind grün dargestellt, Inhibitoren rot und sekundäre Botenstoffe blau.

Abb. 1.2): Ca^{2+} -Freisetzung aus Speicher I kann durch den sekundären Botenstoff InsP_3 ausgelöst werden (siehe Abschnitt 1.3.1.1). Die Speicher I und II sind sensitiv für Thapsigargin. Dabei handelt es sich um einen spezifischen Inhibitor (Übersicht in Treiman et al. (1998)) von Ca^{2+} -ATPasen des SERCA-Typs, die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert sind und zur Wiederaufnahme von Ca^{2+} aus dem Cytosol in die Speicher des ER dienen. In Gegenwart von Thapsigargin kommt es zu einer passiven Depletion der Speicher, da ständig ein Leckstrom durch die Ca^{2+} -Kanäle ins Cytosol auftritt. Die Speicher I und II werden zum ER-System gerechnet, da sie durch Thapsigargin entleerbar sind. Speicher III gehört hingegen nicht zum ER-Kompartiment und wurde ursprünglich durch seine Sensitivität für Coffein charakterisiert. Außerdem ist dieser Speicher durch den sekundären Botenstoff cADPR (siehe Abschnitt 1.3.1.2) sowie durch weitere Agonisten von Ryanodin-Rezeptoren (RyR) entleerbar. Daher ist davon auszugehen, daß Speicher III eine oder mehrere Isoformen des RyR besitzt. Das in Speicher IV vorhandene Ca^{2+} kann im Gegensatz zu den anderen Speichern ausschließlich passiv durch das Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin freigesetzt werden (Guse et al., 1993, 1997).

1.3.1.1. myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat

InsP_3 ist der am besten charakterisierte Botenstoff, der an der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern beteiligt ist. Durch Aktivierung von PLC- γ kommt es zur Spaltung

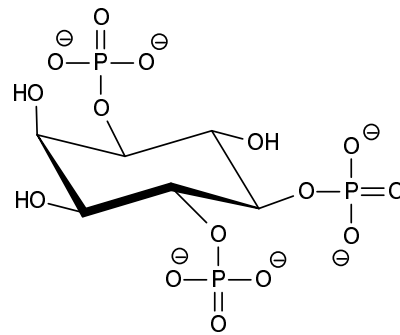


Abbildung 1.3: Struktur des Ca^{2+} -mobilisierenden Botenstoffes InsP_3 .

des Membran-Phospholipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in DAG und InsP_3 (Abb. 1.3).

InsP_3 gelangt durch Diffusion durch das Cytosol zu seinem Rezeptor ($\text{InsP}_3\text{-R}$) in der ER-Membran, wodurch die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER ausgelöst wird. Dieser Mechanismus wurde zuerst in permeabilisierten Drüsenzellen des endokrinen Pankreas beschrieben (Streb et al., 1983), aber inzwischen für viele andere Zellsysteme bestätigt, darunter auch T-Lymphocyten (Imboden und Stobo, 1985). Da mehrere InsP_3 -Moleküle an den tetrameren Rezeptor binden und dieser positiv durch Ca^{2+} reguliert wird, handelt es sich bei der Ca^{2+} -Freisetzung um einen hochgradig kooperativen Prozeß (Schrenzel et al., 1995). Alle drei Isoformen des $\text{InsP}_3\text{-R}$ werden in Jurkat-Zellen exprimiert und bilden Homo- und Heterotetramere (Meldolesi und Pozzan, 1998). Die drei Isoformen unterscheiden sich bezüglich ihrer Sensitivität gegen InsP_3 und ihrer Regulation durch Ca^{2+} (Lewis, 2001).

Das InsP_3 -Signal wird durch Metabolisierung des Botenstoffes rasch beendet: Die InsP_3 -3-Kinase wird durch Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexe (siehe Abschnitt 1.3.3) aktiviert und setzt InsP_3 zu *myo*-Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat um. Eine Beteiligung dieses Moleküls am langanhaltenden Ca^{2+} -Signal durch Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran wurde postuliert (Lückhoff und Clapham, 1992), ist in T-Lymphocyten aber umstritten (da Silva et al., 1994). InsP_3 wird außerdem durch eine 5-Phosphatase zu inaktivem *myo*-Inositol-1,4-bisphosphat abgebaut.

1.3.1.2. Cyclische Adenosin-Diphosphoribose

Durch Lee et al. (1989) wurde cyclische Adenosin-Diphosphoribose (cADPR, Abb. 1.4, Seite 9) als weiterer Ca^{2+} -mobilisierender Botenstoff beschrieben und die biologische Wirkung durch Galione et al. (1991) in intakten Seeigel-Eiern bestätigt. Seitdem wurde eine Ca^{2+} -freisetzende Wirkung von cADPR in einer Reihe weitere Zell-Systeme gezeigt, u. a. dem Einzeller *Euglena gracilis*, Pflanzenzellen, Säugetierzellen und humanen Zell-Linien (Übersichten in Lee (2004) und Guse (2004)).

cADPR wird durch Enzyme, die als ADP-Ribosylcyclasen (ADPRC) bezeichnet werden, unter Abspaltung von Nicotinamid aus NAD gebildet (Übersicht in Schuber und Lund

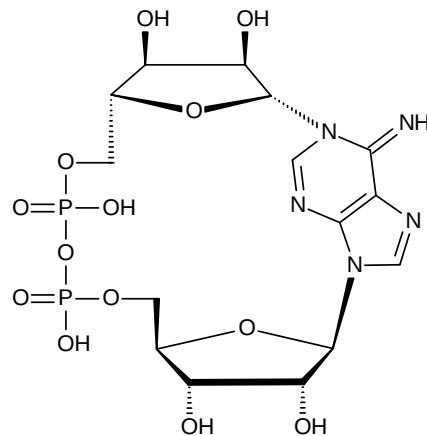


Abbildung 1.4: Struktur des Ca^{2+} -mobilisierenden Botenstoffes cADPR.

(2004)). Für einen sekundären Botenstoff ist außer einer intrazellulären Aktivität zur Erzeugung und Weiterleitung eines Signals (im Falle von cADPR durch die Ca^{2+} -Freisetzung) eine durch externe oder interne Stimuli ausgelöste Bildung und eine anschließende Metabolisierung zu fordern. Für mehrere Zellsysteme wurde eine Kopplung zwischen extrazellulärer Stimulation und intrazellulärer cADPR-Bildung bereits nachgewiesen (Übersicht in Guse (2004)): Die Stimulation von Muskelzellen aus dem Darm mit dem Hormon Cholecystokinin führte zu einer Erhöhung der intrazellulären ADPRC-Aktivität (Cancela, 2001). Auch in neuronalen NG108-15-Zellen wurde bei Stimulation purinerger Rezeptoren mit Carbachol eine Erhöhung der ADPRC-Enzymaktivität gefunden (Higashida et al., 1997). Ähnliche Ergebnisse wurden bei β -adrenerger Stimulation von Herzmuskel-Zellen erhalten (Higashida et al., 1999), wobei eine Kopplung durch cyclisches AMP und Proteinkinase A gezeigt wurde (Xie et al., 2005). Eine Erhöhung der intrazellulären cADPR-Konzentration wurde in PC12-Zellen nach Stimulation mit NO durch einen cGMP- und Proteinkinase G-abhängigen Signalweg gefunden (Clementi et al., 1996). Eine Zunahme der cADPR-Konzentration konnte auch in β -Pankreas-Zellen bei Stimulation mit Glucose (Takasawa et al., 1993), in neonatalen Herzmuskelzellen bei Stimulation mit Angiotensin II (Higashida et al., 2000) sowie in T-Lymphocyten bei Stimulation mit dem CD3-Antikörper OKT3 (Guse et al., 1999) gezeigt werden. In Jurkat T-Zellen wurde eine Kopplung der intrazellulären ADPRC an die Aktivierung des TCR durch Proteinkinasen nachgewiesen (Guse et al., 1999). Die Bedeutung der cADPR-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung kann pharmakologisch durch spezifische cADPR-Antagonisten oder -Agonisten untersucht werden (Übersicht zur Struktur-Wirkungsbeziehung von cADPR in Guse (2005)).

Der Mechanismus der Ca^{2+} -freisetzenden Wirkung von cADPR ist noch nicht vollständig geklärt. In den meisten untersuchten Zellsystemen deuten pharmakologische Daten auf eine Beteiligung der RyR hin, da Ca^{2+} und Coffein eine Sensitivierung für den Effekt bewirken, während RyR-Antagonisten wie Ruthenium Rot, Procain oder Mg^{2+} die cADPR-abhängige Freisetzung inhibieren (Übersicht in Lee (1997)). Auch RyR zeigen wie InsP_3 -R eine Sensiti-

vierung durch Ca^{2+} , so daß die Ca^{2+} -Freisetzung durch cADPR eine positive Rückkopplung aufweist. In T-Lymphocyten konnte eine Verminderung des langanhaltenden Ca^{2+} -Signals bei Repression der RyR-Expression gezeigt werden (Schwarzmann et al., 2002). Dabei ist noch unklar, ob die Wirkung von cADPR auf RyR direkt oder indirekt unter Beteiligung cADPR-bindender Proteine erfolgt.

1.3.1.3. Nicotinsäure-Adenindinucleotid-2'-Phosphat

Die Ca^{2+} -freisetzende Wirkung einer Kontamination in kommerziell erhältlichem NADP auf Homogenate aus Seeigeleiern wurde erstmals durch Clapper et al. (1987) beschrieben. Erst Jahre später wurde Nicotinsäure-Adenindinucleotid-2'-Phosphat (NAADP, Abb. 1.5) als wirksame Komponente identifiziert (Lee und Aarhus, 1995).

Chemisch unterscheidet sich NAADP von NADP nur durch den Austausch der Nicotinamid-Gruppe gegen Nicotinsäure. Durch Lee und Aarhus (1997) wurde im Seeigelei-System gezeigt, daß drei strukturelle Merkmale für die Ca^{2+} -freisetzende Wirkung von NAADP notwendig sind: (i) Die negative Ladung der Nicotinsäure-Gruppe, (ii) die Phosphat-Gruppe an der 2'-Position der Ribose und (iii) die Amino-Gruppe des Adenin-Systems. Da Veränderungen in den genannten Gruppen die Ca^{2+} -freisetzende Wirkung stark verminderten, wurde eine spezifische Bindung von NAADP an einen Rezeptor postuliert.

Inzwischen wurde eine durch NAADP ausgelöste Ca^{2+} -Freisetzung in mehreren Zell-Typen gezeigt, darunter Drüsenzellen des endokrinen Pankreas, Zellen des ZNS und humane T-Lymphocyten (Übersicht in Guse (2002); Galione und Ruas (2005); Yamasaki et al. (2005a)). Obwohl über die durch NAADP vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung bisher weit weniger bekannt ist als über das InsP_3 - oder cADPR-System, zeichnen sich bereits deutliche funktionelle Unterschiede zu den anderen Botenstoffen ab: NAADP löst eine Ca^{2+} -Freisetzung schon bei weitaus niedrigeren Konzentrationen als InsP_3 oder cADPR aus, da in einigen Zell-Systemen ein Ca^{2+} -mobilisierender Effekt ab Konzentrationen von 10–100 nM nachgewiesen werden konnte (Guse, 2002). Die Dosis-Wirkungskurve von NAADP verläuft in Säuger-

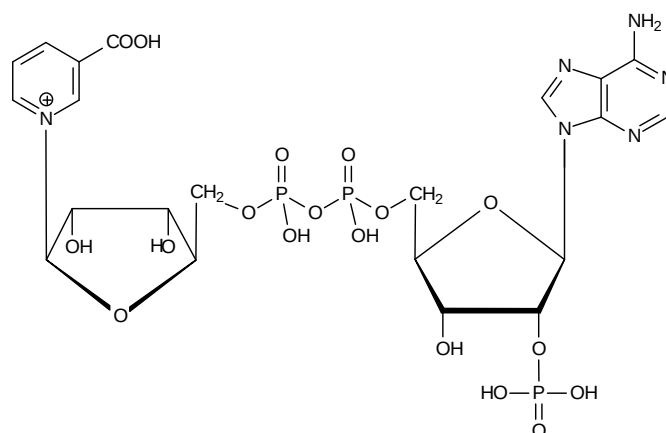


Abbildung 1.5: Struktur des Ca^{2+} -mobilisierenden Botenstoffes NAADP.

Zellen glockenförmig (Lee und Aarhus, 1995; Cancela et al., 1999; Berg et al., 2000), so daß hohe NAADP-Konzentrationen teils einen geringeren Ca^{2+} -freisetzenden Effekt zeigen als niedrigere.

Weitere wichtige Eigenschaften des NAADP-Systems sind seine Selbst-Desensitivierung und -Inaktivierung: NAADP-Konzentrationen unterhalb des Schwellenwerts für die Ca^{2+} -mobilisierende Wirkung können in Seeigeleiern die weitere Ca^{2+} -Freisetzung komplett und irreversibel blockieren (Aarhus et al., 1996). Desweiteren kann das NAADP-System durch hohe NAADP-Konzentrationen (im mikromolaren Bereich) ohne Freisetzung von Ca^{2+} desensitiviert werden (Aarhus et al., 1996). In T-Lymphocyten konnte durch Mikroinjektions-Experimente gezeigt werden, daß hohe, selbst-inaktivierende NAADP-Konzentrationen auch zur Inaktivierung sowohl des InsP_3 - als auch des cADPR-Systems führten. Darüber hinaus trat nach einer solchen Inaktivierung auch bei Stimulation des TCR/CD3-Komplexes kein Ca^{2+} -Signal mehr auf, weshalb das NAADP-System zur Erzeugung eines physiologischen Ca^{2+} -Signals durch TCR-Stimulation anscheinend essentiell ist (Berg et al., 2000).

Welcher Rezeptor die Ca^{2+} -freisetzende Wirkung von NAADP vermittelt, ist bis heute umstritten. In Seeigeleiern wurde ein pharmakologisch von InsP_3 -R und RyR zu differenzierender Ca^{2+} -Kanal beschrieben (Genazzani et al., 1997). Daraus wurde gefolgert, daß dort drei unabhängige Ca^{2+} -freisetzende Systeme vorhanden sind, die gegenseitig nicht desensitivierbar sind (Lee und Aarhus, 1995) und vermutlich durch drei unterschiedliche Rezeptoren vermittelt werden (Churchill und Galione, 2000). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Mitochondrien aus Gehirn-Zellen (Bak et al., 1999) und Herzwertgewebe (Bak et al., 2001) sowie in arteriellen Glattmuskel-Zellen (Boittin et al., 2002) gefunden. Dem widersprechende Ergebnisse stammen hingegen aus der Rekonstitution von RyR in künstlichen Lipidmembranen: Nach Mojzisova et al. (2001) wird der RyR Typ II und nach Hohenegger et al. (2002) der RyR Typ I durch NAADP aktiviert. Auch in T-Lymphocyten wird eine Wirkung von NAADP auf den RyR vermutet, weil durch den RyR-Inhibitor Ruthenium Rot sowohl globale (Langhorst et al., 2004) als auch subzelluläre (Dammermann und Guse, 2005) Ca^{2+} -Signale inhibiert werden konnten. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Repression der RyR-Expression erhalten (Langhorst et al., 2004; Dammermann und Guse, 2005). Dies deutet daraufhin, daß NAADP seine Ca^{2+} -freisetzende Wirkung in T-Zellen direkt oder indirekt durch den RyR ausübt, und Ca^{2+} aus dem gleichen zellulären Speicher wie cADPR freisetzt. Auch für einen Thapsigargin-sensitiven Speicher in der Kernhülle konnte eine durch den RyR vermittelte Freisetzung von Ca^{2+} durch NAADP gezeigt werden (Gerasimenko et al., 2003), ebenso wie bei der durch Insulin ausgelösten Ca^{2+} -Freisetzung in MIN6-Zellen (Mitchell et al., 2003).

Durch Churchill et al. (2002) wurde dagegen eine Beteiligung eines lysosomalen Zellkompartiments an der NAADP-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung beschrieben. Gleiche Ergebnisse wurden in β -Zellen des Pankreas erhalten (Masgrau et al., 2003). Daher ergeben sich mehrere mögliche Modelle zur Erklärung der NAADP-Effekte (Übersicht in Galione und Petersen (2005)): Nach dem „Ein Speicher“-Modell wirkt NAADP auf den RyR und löst so Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern aus. Nach dem „Zwei Speicher“-Modell

wirkt NAADP durch Ca^{2+} -Freisetzung aus lysosomalen Speichern, die einen vom RyR verschiedenen NAADP-Rezeptor besitzen. Durch den Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wird sekundär die Ca^{2+} -Freisetzung aus den RyR- und InsP_3 -R-abhängigen Speichern durch die positive Modulation dieser Rezeptoren durch Ca^{2+} gesteigert.

Die enzymatische Bildung von NAADP aus NADP ist durch ADPRCs möglich, wobei unphysiologische Reaktionsbedingungen wie ein niedriger pH -Wert und hohe Nicotinsäurekonzentrationen notwendig sind (Aarhus et al., 1995). In Zellextrakten aus Säugetierzellen konnte aber auch bei physiologischem pH -Wert eine NAADP-Bildung nachgewiesen werden (Chini und Dousa, 1995; Bak et al., 1999). Durch Untersuchungen an $\text{CD38}^{-/-}$ -Mäusen wurde gezeigt, daß das Ekto-Enzym CD38 an der Synthese von NAADP wahrscheinlich beteiligt ist (Chini et al., 2002). Der enzymatische Abbau von NAADP zu inaktivem NAAD findet vermutlich durch eine durch Ca^{2+} regulierte, für die 2'-Position spezifische Phosphatase statt (Berridge et al., 2002a).

Es gibt bereits einige Hinweise darauf, daß NAADP neben InsP_3 und cADPR eine Funktion als sekundärer Botenstoff hat (Übersicht in Rutter (2003)): Eine Ca^{2+} -freisetzende Wirkung wurde inzwischen in diversen Zell-Typen gezeigt, auch wenn der genaue Mechanismus (Freisetzung aus Lysosomen *versus* ER-Speichern) noch umstritten ist. Ein Anstieg der intrazellulären NAADP-Konzentration bei Stimulation konnte bereits in zwei Berichten gezeigt werden (Masgrau et al., 2003; Yamasaki et al., 2005b). Unklar ist hingegen noch, welche enzymatischen Wege zur Synthese und zum Abbau von NAADP in Zellen dienen und wie dieser Stoffwechsel reguliert wird. Auch die Rolle von NAADP bei der Weiterleitung komplexer Ca^{2+} -Signale wie Oszillationen und Wellen ist bisher erst ansatzweise charakterisiert (Churchill und Galione, 2000).

1.3.2. Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulär-Raum

Die Ca^{2+} -Signale in fast allen nicht-erregbaren Zellen bestehen aus zwei Anteilen: Einer schnellen Freisetzung aus intrazellulären Speichern und einem langanhaltenden Einstrom aus dem Extrazellulärraum (Übersicht in Venkatachalam et al. (2002)). Der Ca^{2+} -Einstrom hat eine wichtige Funktion, weil nur dadurch die zeitliche Beschränkung der Ca^{2+} -Freisetzung aufgehoben werden kann. Außerdem wird durch den Ca^{2+} -Einstrom eine Wiederauffüllung der intrazellulären Speicher ermöglicht.

Der durch Rezeptor-Aktivierung auslösbare Ca^{2+} -Einstrom läßt sich unterteilen in einen Speicher-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom, der durch die Depletion intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher ausgelöst wird, und einen von der Speicher-Entleerung unabhängigen Ca^{2+} -Einstrom. Der erstgenannte Prozeß ist eingehend charakterisiert, obwohl in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse zum molekularen Mechanismus zu finden sind und bisher kein allgemein anerkanntes Modell für diesen Speicher-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom formuliert werden konnte (Penner und Fleig, 2004). Über den Speicher-unabhängigen Ca^{2+} -Einstrom ist dagegen weit weniger bekannt: Hierzu gibt es nur Berichte in wenigen Zell-Typen, die auch nur teilweise auf andere Zellen übertragbar sind.

1.3.2.1. Speicher-vermittelter Calcium-Einstrom

Durch eine Abnahme der Ca^{2+} -Menge in intrazellulären Speichern wird ein Ca^{2+} -Einstrom ausgelöst, der so lange bestehend bleibt, bis die Speicher wieder aufgefüllt sind (Zitt et al., 2002). Die an diesem Vorgang beteiligten Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran werden zusammenfassend als SOC („store operated channels“, Speicher-abhängige Kanäle) bezeichnet (Clapham, 1995) und der durch sie getragene Ca^{2+} -Einstrom als SOCE („store operated Ca^{2+} entry“, Speicher-abhängiger Ca^{2+} -Einstrom). Die Depletion der intrazellulären Speicher muß dabei nicht notwendigerweise durch physiologische Ca^{2+} -freisetzende Botenstoffe wie InsP_3 oder cADPR erfolgen: Auch nach Behandlung mit dem SERCA-Inhibitor Thapsigargin, der eine passive Entleerung der Ca^{2+} -Speicher bewirkt, kommt es zur Aktivierung des Ca^{2+} -Einstroms. In bestimmten Zell-Typen, darunter Lymphocyten, konnte gezeigt werden, daß durch Speicher-Depletion ein hochgradig Ca^{2+} -spezifischer, nicht spannungsabhängiger, einwärts-gleichrichtender Strom aktiviert wird, der als I_{CRAC} („Calcium release activated Calcium current“) bezeichnet wurde (Hoth und Penner, 1992; Hoth, 1995). Dieser Strom ist durch eine sehr geringe Einzelkanal-Leitfähigkeit von 24 fS und eine rasche Inhibition durch eine Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gekennzeichnet (Zweifach und Lewis, 1995). I_{CRAC} -Ströme konnten bisher aus technischen Gründen nur in einer begrenzten Anzahl unterschiedlicher Zell-Typen nachgewiesen werden. Nach Zitt et al. (2002) ist aber die Annahme gerechtfertigt, daß I_{CRAC} in vielen, wenn nicht möglicherweise allen elektrisch nicht-erregbaren Zellen am SOCE beteiligt ist. Es gibt jedoch auch Berichte, daß die Aktivierung von I_{CRAC} nicht notwendigerweise eine Speicher-Depletion erfordert (Krause et al., 1999), und daß durch Speicher-Depletion auch Ströme aktiviert werden können, die sich von I_{CRAC} unterscheiden (Lückhoff und Clapham, 1994).

Bisher ist noch unklar, auf welche Weise die Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher eine Öffnung der SOC-Kanäle auslöst. Dazu gibt es nach Zitt et al. (2002) drei Modellvorstellungen:

1. Nach dem Modell des Ca^{2+} -Einstrom-Faktors kommt es durch die Speicher-Entleerung zur Bildung eines Botenstoffes, der zur Plasmamembran diffundiert und dort die SOC-Kanäle aktiviert. Dieser konnte bisher nicht genau charakterisiert werden, hat aber vermutlich eine Masse von unter 500 g/mol und enthält eine Phosphat-Gruppe (Randriampita und Tsien, 1993; Parekh et al., 1993).
2. Nach Irvine (1990) besteht eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen den Ca^{2+} -Kanälen der intrazellulären Speicher und den SOC-Kanälen in der Plasmamembran, so daß eine Entleerung der intrazellulären Speicher durch Konformationsänderung die Aktivierung der Plasmamembran-Kanäle auslösen kann (vergleichbar zur direkten Kopplung zwischen RyR und Dihydropyridin-Rezeptor im Skelettmuskel).
3. Das Membran-Insertions-Modell sieht vor, daß SOC-Kanäle in intrazellulären Vesikeln vorliegen, die bei Entleerung der Ca^{2+} -Speicher mit der Plasmamembran fusionieren

und auf diese Weise einen Ca^{2+} -Einstrom durch die Plasmamembran auslösen (Yao et al., 1999; Patterson et al., 1999).

Obwohl es sich bei SOCE um ein generelles Phänomen handelt, das in vielen Zell-Typen auftritt, werden vermutlich in unterschiedlichen Zellen-Typen verschiedene Mechanismen und Kanäle benutzt. Daher gibt es wahrscheinlich auch mehrere Prinzipien zur Kopplung des Ca^{2+} -Einstroms an die Depletion intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher.

1.3.2.2. Speicher-unabhängiger Calcium-Einstrom

Ein Ca^{2+} -Einstrom kann nach Stimulation von Membran-Rezeptoren auch durch Mechanismen ausgelöst werden, die nicht auf Speicher-vermitteltem Ca^{2+} -Einstrom beruhen. Dies kann einerseits durch Liganden-aktivierte Ca^{2+} -Kanäle wie P_2X -Rezeptoren geschehen, die auf extrazelluläres ATP reagieren (MacKenzie et al., 1999). Andererseits wurden Ca^{2+} -permeable Kanäle beschrieben, deren Aktivierung nicht durch Entleerung intrazellulärer Speicher erfolgt, sondern die durch InsP_3 (Kuno und Gardner, 1987), *myo*-Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat (Lückhoff und Clapham, 1992), Ca^{2+} (von Tschärner et al., 1986) oder Arachidonsäure (Mignen und Shuttleworth, 2000) reguliert werden. Ein weiteres Beispiel ist der Kanal TRPM2 (siehe Abschnitt 1.4.2), der für Ca^{2+} permeabel ist und durch Adenosin-Diphosphoribose (ADPR) aktiviert wird (Perraud et al., 2001; Sano et al., 2001). Vereinzelt wurde auch eine Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen durch G-Proteine gefunden (Krautwurst et al., 1992).

Alle genannten Mechanismen sind aber bisher nur in wenigen Zellsystemen bestätigt worden. Es sind daher noch umfangreiche Untersuchungen notwendig, um nachzuweisen, daß neben der weit verbreiteten Aktivierung von SOC-Kanälen durch Speicher-Entleerung weitere Mechanismen an der Erzeugung von Ca^{2+} -Signalen bei physiologischer Stimulation beteiligt sind.

1.3.3. Effektorsysteme von Calcium

Ohne eine langanhaltende Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kann keine Aktivierung von T-Zellen stattfinden, da Ca^{2+} für eine verstärkte Expression von Cytokin-Genen und damit für die Proliferation essentiell ist (Acuto und Cantrell, 2000). T-Zellen verfügen über diverse intrazelluläre Effektorsysteme, die eine Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ registrieren und diese in zelluläre Reaktionen umsetzen können. Die wichtigsten dieser Systeme werden im folgenden kurz beschrieben.

Das ubiquitär exprimierte kleine Protein Calmodulin (CaM) ist einer der wichtigsten zellulären Ca^{2+} -Sensoren. Jedes CaM-Protein bindet kooperativ vier Ca^{2+} -Ionen, wodurch es zu einer starken Konformationsänderung kommt. Nach Bindung von Ca^{2+} geht der Ca/CaM-Komplex Wechselwirkungen mit einer Vielzahl an Proteinen ein, darunter Enzyme, Proteine des Cytoskeletts und Ionenkanäle, wodurch deren Aktivität moduliert wird. Es gibt auch Proteine, die CaM als regulatorische Untereinheit enthalten.

Für die Signalweiterleitung in T-Zellen ist insbesondere die Ca/CaM-abhängige Proteinphosphatase Calcineurin wichtig, deren Substrate Phospho-Serin- und Phospho-Tyrosin-Reste sind. Bei der T-Zell-Aktivierung dephosphoryliert Calcineurin nach seiner Aktivierung durch Ca/CaM den cytosolischen Anteil des nucleären Transkriptionsfaktors aktivierter T-Zellen (NF-AT_c), so daß dieser in den Kern transloziert. Dort bildet er einen Komplex mit der konstitutiv nucleären Komponente NF-AT_n, und aktiviert u. a. das IL-2 Gen (Janeway et al., 2001).

Weitere Effektoren des Ca²⁺-Signals sind CaM-abhängige Proteinkinasen (CaMK), von denen vier unterschiedliche Isoformen bekannt sind. CaMK II wird in vielen Geweben exprimiert und wirkt auf eine Vielzahl unterschiedlicher Substratproteine. In Abwesenheit von Ca/CaM ist CaMK II katalytisch inaktiv. Der EC₅₀-Wert für Ca²⁺ beträgt bei Sättigung mit CaM 0.5 – 1 µM (Premack und Gardner, 1992). Vor der Phosphorylierung von Zielproteinen kommt es zu einer Autophosphorylierung von CaMK II. Dadurch wird das Enzym in eine Form überführt, die von der Anwesenheit von Ca²⁺ und CaM unabhängig ist. Diese von Ca/CaM unabhängige Aktivität bleibt bestehen, bis Protein-Phosphatasen das Enzym dephosphorylieren, und stellt auf diese Weise eine Art „molekulares Gedächtnis“ für zurückliegende Erhöhungen von [Ca²⁺]_i dar (Premack und Gardner, 1992).

Ca/CaM-abhängige Proteine sind außerdem an der Reorganisation des Cytoskeletts beteiligt (z. B. Leichtketten-Myosinkinase). Die dynamische Änderung des Cytoskeletts ist eine notwendige Voraussetzung, damit T-Zellen ausreichend Kontakt mit APCs aufnehmen können, um eine Bindung des TCR an den MHC-Antigen-Komplex zu ermöglichen (Acuto und Cantrell, 2000). Die Erhöhung von [Ca²⁺]_i stellt *in vivo* ein Signal dar, das eine T-Zelle dazu veranlaßt, an einer APC zu stoppen und weitere Signale von dieser zu empfangen (Acuto und Cantrell, 2000). Dies ist der erste Schritt zur Ausbildung eines engen Kontaktes zwischen T-Zelle und APC, der als „immunologische Synapse“ bekannt ist (Shaw und Dustin, 1997).

Ein weiteres Effektorsystem stellen die Proteinkinasen C (PKC) dar, von denen diverse Isoformen bekannt sind. PKC wird durch das von der PLC-γ freigesetzte DAG gemeinsam mit Ca²⁺ und Phosphatidylserin aus dem inneren Blatt der Plasmamembran aktiviert. In T-Zellen wird durch PKC u. a. die inhibitorische Untereinheit IκB des Transkriptionsfaktors NFκB phosphoryliert, wodurch deren proteasomaler Abbau induziert wird. Dadurch wird ein Kernlokalisierungssignal von NFκB freigelegt, so daß der Transkriptionsfaktor in den Kern transloziert und die Expression u. a. des IL-2-Gens erhöht (Janeway et al., 2001).

Möglicherweise kommt es in T-Zellen zu einer Umsetzung der Ca²⁺-Signale, die sich in Amplitude und Frequenz unterscheiden können, in eine Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (Dolmetsch et al., 1998): Durch Ca²⁺-Oszillationen mit hoher Frequenz (>1 in 400 sec) kam es zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-AT und Oct-1, während NFκB auch noch bei einer niedrigeren Frequenz von einem Ca²⁺-Signal in 30 min aktiviert wurde. Daher werden anscheinend durch unterschiedliche Ca²⁺-Signale verschiedene Kombinationen an Transkriptionsfaktoren aktiviert. Diese modulieren die Transkription unterschiedlicher Gene, da sich deren Promotoren unterscheiden (z. B. sind NF-AT, Oct-1 und

NF κ B für die Expression von IL-2 nötig, während NF κ B zur Expression von IL-8 ausreichend ist). Auf diese Weise können definierte Ca²⁺-Signale einen bestimmten Satz an Genen transkriptionell aktivieren und damit unterschiedliche Zellfunktionen auslösen (Lewis, 2001).

1.4. Ionenkanäle der TRP-Familie

Kanäle der „transient receptor potential“-(TRP)-Familie wurden zuerst in *Drosophila melanogaster* beschrieben: In der Mutante *trp* tritt bei Belichtung des Komplexauges der Fliege im Gegensatz zum Wildtyp keine dauerhafte Depolarisation auf. Obwohl diese Mutante schon länger bekannt ist, wurde das betroffene Gen erst durch Montell und Rubin (1989) kloniert. Bei dem vom *trp*-Gen codierten Protein handelt es sich um einen für Ca²⁺ permeablen Ionenkanal, der durch Licht aktiviert wird (Hardie und Minke, 1992). Da in den *trp*-Fliegen der Ca²⁺-Einstrom nach Belichtung und damit die Hell-Adaptation ausbleibt, werden sie durch intensives Licht geblendet. Die Superfamilie der TRP-Kanäle, die in Säugetieren mehr als 20 Mitglieder umfaßt, definiert sich durch ihre Homologie zum Trp-Kanal in *Drosophila*. Anders als innerhalb anderer Ionenkanal-Familien sind die Liganden und die Kanal-Selektivitäten unterschiedlich (Clapham, 2003).

1.4.1. Die Superfamilie der TRP-Ionenkanäle

TRP-Ionenkanäle bilden eine Superfamilie, deren Kanäle für Ca²⁺ und/oder monovalente Kationen permeabel sind. Alle TRP-Kanäle bestehen aus Untereinheiten, die sechs membrandurchspannende hydrophobe Bereiche und cytosolische N- und C-Termini besitzen; dieses Strukturprinzip haben TRP-Kanäle mit spannungsabhängigen Kalium-Kanälen und Cyclo-Nucleotid-gesteuerten Kanälen gemeinsam (Clapham et al., 2001), weshalb TRP-Kanäle vermutlich ebenfalls tetramere Komplexe bilden, was auch experimentell bestätigt wurde (Kedei et al., 2001). Viele TRP-Kanäle werden ubiquitär exprimiert, weshalb in den meisten Zell-Typen mehrere TRP-Kanäle vorhanden sind. Außerdem gibt es meist mehrere Spleiß-Varianten der Kanäle.

Die TRP-Superfamilie wird in sechs Unterfamilien eingeteilt. Davon bilden die drei Familien der klassischen TRP-Kanäle (TRPC), der Melastatin-verwandten TRP-Kanäle (TRPM) und der Vanilloid-Rezeptor-verwandten TRP-Kanäle (TRPV) die größten (Abb. 1.6, Seite 17). Außerdem gibt es noch die Familien der Mucolipine (TRPML), der Polycystine (TRPP) und die TRPA-Gruppe, die nur das ANKTM1-Protein umfaßt (Übersicht in Clapham (2003)).

Die bisher bekannten Funktionen von TRP-Kanälen sind vielfältig (Clapham, 2003). Alle nehmen Reize auf einer zellulären Ebene wahr: In Hefe-Zellen beispielsweise dient ein TRP-Kanal zur Detektion von Hyperosmolarität und Nematoden verwenden TRP-Kanäle zur Chemosensorik. Mäuse nehmen mit dem TRPC2-Kanal Pheromone wahr, während bei Menschen TRP-Kanäle zur Wahrnehmung von Geschmackseindrücken (sauer, bitter und umami) sowie von Wärme, Hitze und Kälte dienen.

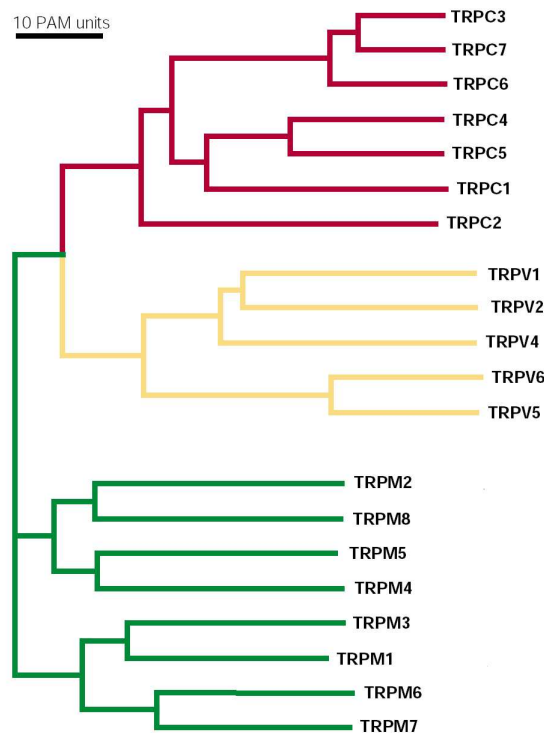


Abbildung 1.6: Phylogenetische Verwandtschaft der drei Hauptgruppen der Superfamilie der TRP-Kanäle, verändert nach Clapham et al. (2001). Die evolutionäre Verwandtschaft wird durch den Abstand der Verzweigungspunkte symbolisiert.

Die TRPC-Familie weist die höchste Homologie zum Trp-Kanal aus *Drosophila* auf. Einige ihrer Mitglieder werden durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert und üben daher wahrscheinlich Funktionen als Rezeptor-gesteuerte Kanäle aus. Möglicherweise handelt es sich bei einigen TRPC-Kanälen um speicher-regulierte Ca^{2+} -Kanäle (SOC, siehe Abschnitt 1.3.2.1, Montell (2001)). Solch eine Funktion ist jedoch umstritten und möglicherweise auch durch die Überexpression der Kanäle bedingt (Lievremont et al., 2004).

TRPV-Kanäle dienen allgemein als zelluläre Sensoren. Das am besten charakterisierte Beispiel ist der Kanal TRPV1, der durch eine Substanz aus Chili-Schoten aktiviert wird, aber *in vivo* wahrscheinlich auch zur Detektion von Hitze dient (Caterina et al., 1997).

Von den drei großen Gruppen der TRP-Superfamilie ist über die TRPM-Familie bisher am wenigsten bekannt. Trotzdem wurden bereits Funktionen dieser Kanäle in diversen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen festgestellt (Übersicht in Kraft und Harteneck (2005)). Die Besonderheit von TRPM-Kanälen besteht darin, daß einige (TRPM2, TRPM6 und TRPM7) sowohl eine Kanal- als auch eine intrazelluläre Enzym-Aktivität besitzen. Bei diesen TRP-Kanälen handelt es sich um die einzigen bekannten Beispiele solcher Proteine, die auch als „Chanzymes“ (für „channel enzymes“) bezeichnet werden (Scharenberg, 2005).

1.4.2. Der Ionenkanal TRPM2

Der TRPM2-Kanal besteht N-terminal aus einem nicht-selektiven Ionenkanal und C-terminal aus einer enzymatisch aktiven Untereinheit (schematisch dargestellt in Abb. 1.7). Wie alle anderen TRP-Ionenkanäle bildet auch TRPM2 Tetramere, wobei unklar ist, ob unter physiologischen Bedingungen Homo- oder Heterotetramere mit anderen TRPM-Kanälen vorliegen (Scharenberg, 2005).

Das TRPM2-Protein besteht aus 1503 Aminosäuren und hat eine vorhergesagte Masse von 171 kDa (Perraud et al., 2003a). Im N-terminalen Bereich von TRPM2 befindet sich eine TRPM-Homologie-Region, die in allen acht TRPM-Kanälen vorhanden, deren Funktion jedoch unbekannt ist. Daran schließen sich sechs Transmembranhelices an, wobei die Aminosäuren der Schleife zwischen den Helices fünf und sechs die Kanal-Pore des Tetramer-Komplexes bilden. Weiter C-terminal befindet sich ein wegen seiner vorhergesagten Struktur als „coiled coil region“ bezeichneter Bereich unbekannter Funktion, auf den die cytosolische

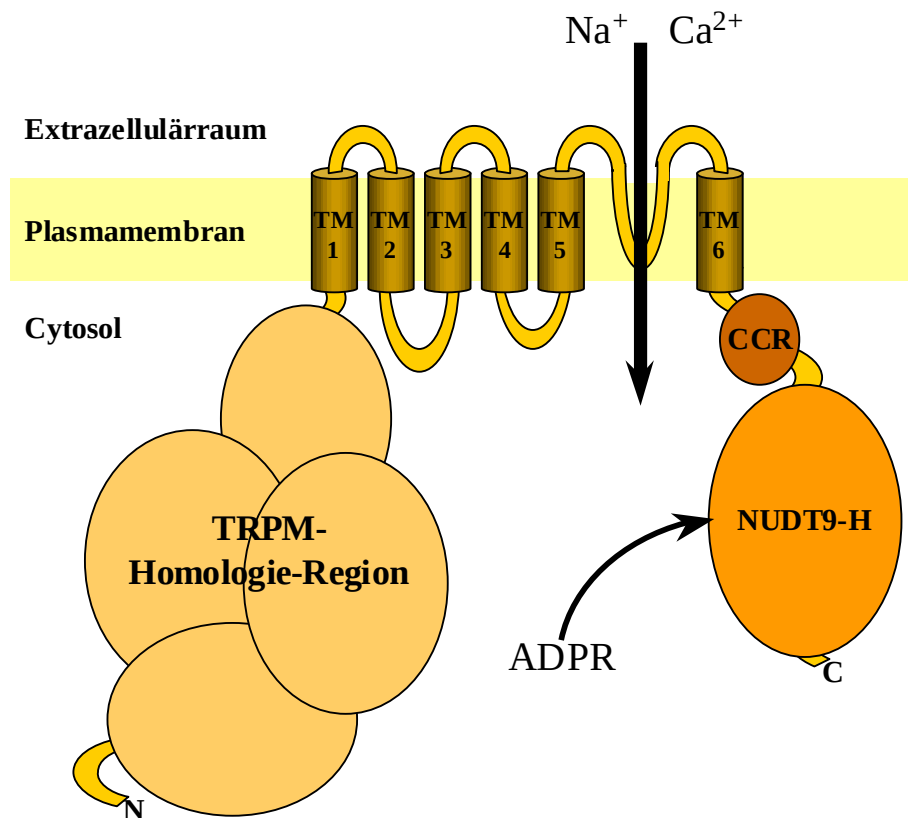


Abbildung 1.7: Schematischer Aufbau des Ionenkanals TRPM2 (verändert nach Meinke (2005)). TRPM2 enthält wie alle TRP-Kanäle sechs Transmembranhelices (TM 1–6), wobei zwischen TM 5 und TM 6 eine Schleife liegt, die die Kationen-permeable Pore bildet. Im cytosolischen N-terminalen Bereich befindet sich die TRPM-Homologie-Region, die allen Mitgliedern der TRPM-Familie gemeinsam ist, über deren Funktion aber nichts Genaues bekannt ist. Im cytosolischen C-terminalen Teil folgt auf TM 6 ein Bereich unbekannter Funktion, für den eine „coiled coil“-Struktur vorausgesagt wurde (CCR) und die NUDT9-Homologie-Region (NUDT9-H). An diese auch als „Nudix box“ bezeichnete Domäne bindet ADPR und löst dadurch eine Öffnung des Kanals aus, so daß Ca^{2+} - und Na^{+} -Ionen ins Cytosol strömen können.

NUDT9-Homologie-Region folgt (Perraud et al., 2003a). Diese weist eine hohe Homologie zu der mitochondrialen Adenosin-Diphosphoribose-Pyrophosphatase (ADPRase) NUDT9 auf (Perraud et al., 2003b). Eine Bindung von Adenosin-Diphosphoribose (ADPR) an diesen auch als „Nudix box“ bezeichneten Bereich von TRPM2 löst, vermutlich durch eine Konformationsänderung, die Öffnung des Kanals aus (Perraud et al., 2001). Die NUDT9-Homologie-Region von TRPM2 hat im Vergleich zum mitochondrialen Enzym nur eine sehr geringe enzymatische Aktivität (Perraud et al., 2001), die darüber hinaus zur Aktivierung des Kanals nicht notwendig ist (Perraud et al., 2005). Mutationen innerhalb der NUDT9-Homologie-Region können die Aktivierbarkeit von TRPM2 durch ADPR komplett aufheben (Kühn und Lückhoff, 2004).

Eine Expression von TRPM2 tritt im ZNS, dort besonders in Microglia-Zellen (Kraft et al., 2004), in Immunzellen und diversen anderen Geweben wie Knochenmark, Milz, Herz, Leber, Lunge, Pankreas und Prostata auf (Perraud et al., 2001; Sano et al., 2001; Hara et al., 2002). Neben der Vollängen-Form von TRPM2 (TRPM2-LF) sind fünf weitere Isoformen beschrieben worden, die in unterschiedlichen Zell-Typen exprimiert werden (schematische Darstellung in Abb. 1.8).

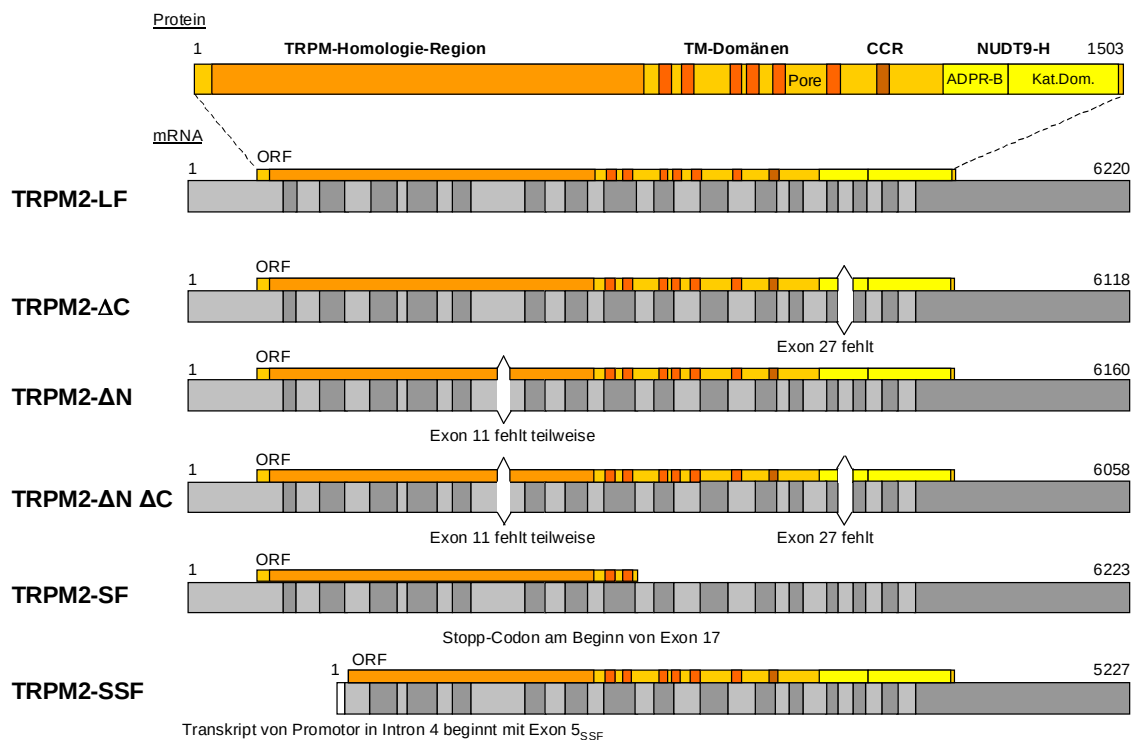


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der sechs bekannten Isoformen des Ionenkanals TRPM2, entnommen aus Meinke (2005). In grau sind die Strukturen der mRNAs dargestellt, wobei die unterschiedlich gefärbten Abschnitte die Exons repräsentieren. Darüber sind die offenen Leserahmen dargestellt, deren Farben mit denen der Protein-Regionen in der schematischen Darstellung des Proteins (ganz oben) übereinstimmen. Die TRPM-Homologie-Region ist in hellem Orange dargestellt, die Transmembranhelices sowie die „coiled coil region“ in dunklem Orange, und die NUDT9-Homologie-Region in gelb. Erläuterung siehe Text.

Durch [Wehage et al. \(2002\)](#) konnten in neutrophilen Granulocyten Transkripte nachgewiesen werden, in denen durch alternatives Spleißen Exon 27 oder ein Teil von Exon 11 fehlte oder beide Deletionen in Kombination auftraten. Entsprechend wurden diese Varianten als TRPM2- Δ N, TRPM2- Δ C und TRPM2- Δ N Δ C bezeichnet.

Bei der Isoform TRPM2-SF („short form“) kommt es am Übergang von Exon 16 zu Exon 17 durch alternatives Spleißen zur Entstehung eines Stopp-Codons, so daß ein C-terminal trunkiertes Protein resultiert ([Zhang et al., 2003](#)). TRPM2-SF bildet keinen funktionalen Kanal, weil ein Teil der Transmembranhelices fehlt, und hat darüber hinaus eine dominant-negative Wirkung auf die Vollängen-Form TRPM2-LF ([Zhang et al., 2003](#)).

Bei der von [Uemura et al. \(2005\)](#) beschriebenen SSF-Form handelt es sich nicht um eine Spleißvariante, sondern um eine mRNA, die durch Verwendung eines alternativen Promotors innerhalb des Introns vor Exon 5 entsteht. Diese Form wurde wegen ihrer Expression in menschlichem Striatum als TRPM2-SSF („striatum short form“) bezeichnet. Das erste Exon dieser Variante entspricht Exon 5 der anderen Isoformen, dem durch die Benutzung des alternativen Promotors noch ein kurzer Abschnitt des Introns vor Exon 5 vorangestellt ist; diese alternative Form von Exon 5 wird als Exon 5_{SSF} bezeichnet ([Uemura et al., 2005](#)).

1.4.2.1. Aktivierung und Regulation von TRPM2

Die Identifikation des „Nudix box“-Motivs im C-Terminus von TRPM2 hat zur Untersuchung bekannter Substrate von Enzymen mit diesem Motiv auf Aktivierung von TRPM2 geführt ([Perraud et al., 2001](#); [Sano et al., 2001](#)). Dabei wurde festgestellt, daß TRPM2 durch ADPR (Abb. 1.9) sowie möglicherweise auch durch NAD aktiviert werden kann. Außerdem wurde eine Aktivierung des Kanals durch oxidativen Streß (z. B. in Form von Wasserstoffperoxid) berichtet ([Hara et al., 2002](#)).

Der von TRPM2 getragene Strom wies in Patch Clamp-Messungen ein lineares Strom-Spannungsverhältnis mit einem Umkehrpotential von etwa 0 mV auf. Folglich handelt es sich um einen nicht-selektiven Kationenkanal ohne gleichrichtende Wirkung ([Perraud et al.,](#)

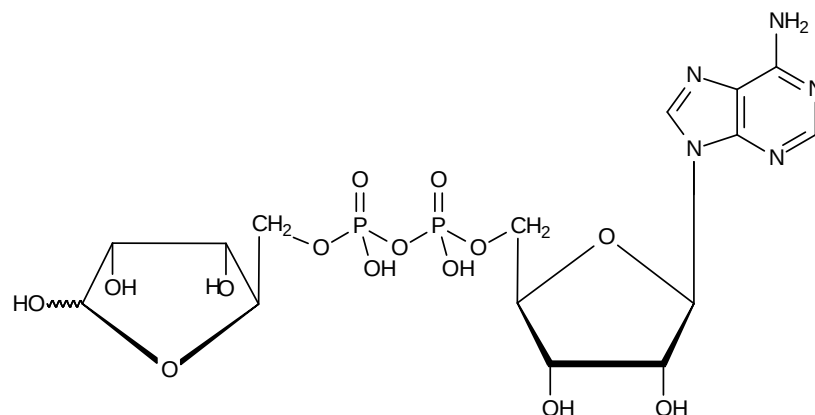


Abbildung 1.9: Struktur des TRPM2-Agonisten ADPR.

2001; Sano et al., 2001). Die ADPR-induzierte Aktivierung von TRPM2 kann durch erhöhte lokale cytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen verstärkt werden (McHugh et al., 2003), so daß eine positive Rückkopplung durch den Ca^{2+} -Einstrom auftreten kann.

Die Rolle von NAD bei der Aktivierung von TRPM2 ist hingegen umstritten (Scharenberg, 2005): Von einigen Gruppen konnte eine solche Aktivierung nachgewiesen werden (Sano et al., 2001; Hara et al., 2002), während dies in anderen Experimenten nicht bestätigt wurde (Perraud et al., 2001). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß ADPR ein direktes Degradationsprodukt von NAD darstellt. Da die Aktivierung von TRPM2 durch NAD deutlich höhere Konzentrationen als die ADPR-induzierte Aktivierung erforderte und eine viel langsamere Kinetik aufwies, war die Wirkung von NAD möglicherweise auf eine Kontamination durch ADPR zurückzuführen. Außerdem kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß es während der Messung der Ströme zu einer Hydrolyse von NAD zu ADPR in der Zelle kam.

Durch Wehage et al. (2002) wurde beschrieben, daß die TRPM2- Δ C-Form bei Überexpression in HEK-293-Zellen zwar durch oxidativen Streß, nicht jedoch durch ADPR aktivierbar war. Daraus folgerten die Autoren, daß oxidativer Streß direkt und nicht durch Bildung von ADPR auf den Kanal wirkt. Andererseits konnte durch Arbeiten von Perraud et al. (2005) gezeigt werden, daß bei cytosolischer Expression eines ADPR-abbauenden Enzyms keine Aktivierung von TRPM2 durch oxidativen Streß mehr ausgelöst werden konnte. Auch bei Blockade von Poly(ADPR)-Polymerasen, die möglicherweise an der Entstehung von ADPR aus NAD beteiligt sind, konnte oxidativer Streß TRPM2 nicht mehr aktivieren (Fonfria et al., 2004). Dies deutet daraufhin, daß oxidativer Streß die Bildung von freiem ADPR bewirkt, das sekundär die Aktivierung von TRPM2 vermittelt. Die Ergebnisse von Wehage et al. (2002) sind möglicherweise auch durch eine Arbeit von Kolisek et al. (2005) zu erklären, in der kürzlich eine aktivierende Wirkung von cADPR auf TRPM2 beschrieben wurde: cADPR aktivierte in Konzentrationen $> 100 \mu\text{M}$ den Kanal direkt, während cADPR-Konzentrationen $< 10 \mu\text{M}$ den Kanal für ADPR sensitivierten. Daher wurde postuliert, daß der Kanal außer der Bindungsstelle für ADPR in der „Nudix box“ über eine weitere, davon unabhängige Bindungsstelle für cADPR verfügt. Da oxidativer Streß nach Kumasaka et al. (1999) auch zur intrazellulären Bildung von cADPR führen kann, ist es möglich, daß in der Arbeit von Wehage et al. (2002) die TRPM2- Δ C-Form bei oxidativem Streß durch cADPR statt ADPR aktiviert wurde.

Nach Scharenberg (2005) ist ADPR der physiologisch entscheidende Stimulus zur Aktivierung von TRPM2. ADPR bindet dabei an eine Bindungstasche innerhalb der NUDT9-Homologie-Region, und löst die Öffnung von TRPM2 aus. Dieses Modell legt nahe, daß im Lauf der Evolution eine Fusion der Kanal- und Enzym-Domänen stattgefunden hat, um eine spezifische enzymatische Bindungsdomäne zur Detektion eines intrazellulären Ligandens zu nutzen.

1.4.2.2. Physiologische Rolle von TRPM2

Zur physiologischen Funktion von TRPM2 liegen bisher erst wenige Berichte vor. Diese lassen aber bereits erkennen, daß der Kanal eine Funktion beim Zelltod hat, der durch oxidativen Streß ausgelöst werden kann. Durch [Hara et al. \(2002\)](#) konnte erstmals gezeigt werden, daß die TRPM2-Expression Zellen empfindlich gegen oxidativen Streß macht. Da bekannt ist, daß oxidativer Streß die Bildung von ADPR auslöst ([Scharenberg, 2005](#)), verläuft dieser Prozeß vermutlich über die Bildung von ADPR, das die Aktivierung von TRPM2 auslöst, möglicherweise gemeinsam mit Ca^{2+} ([McHugh et al., 2003](#)) und cADPR ([Kolisek et al., 2005](#)) als Co-Stimuli. Zu diesen Ergebnissen paßt auch, daß durch eine dominant-negative TRPM2-Isoform die Suszeptibilität für oxidativen Streß reduziert werden konnte ([Zhang et al., 2003](#)). Ausgehend von diesen Befunden wurde durch [Ayub und Hallett \(2004\)](#) die Hypothese aufgestellt, daß es in Immunzellen nach Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu einer Umsetzung von NAD zu ADPR in den Mitochondrien kommt. ADPR wird daraufhin freigesetzt, aktiviert TRPM2, und löst so einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum aus. Eine Beteiligung von Poly(ADPR)-Polymerasen an diesem Prozeß wurde von [Fonfria et al. \(2004\)](#) postuliert. Durch Überexpression eines ADPR-abbauenden Enzyms im Cytosol konnte gezeigt werden, daß oxidativer Streß zur Akkumulation von mitochondrialem ADPR im Cytosol führte ([Perraud et al., 2005](#)). Eine Funktion von TRPM2 bei physiologischer Stimulation konnte aber bisher nur bei Verwendung von $\text{TNF-}\alpha$ ([Hara et al., 2002](#)) und dem an der Genese der Alzheimer-Erkrankung beteiligten amyloiden β -Peptid ([Fonfria et al., 2005](#)) gezeigt werden.

Mit dem Modell einer Beteiligung des ADPR/TRPM2-Systems am Zelltod steht im Einklang, daß Ca^{2+} -Ionen auf TRPM2 als Co-Stimulus wirken: [McHugh et al. \(2003\)](#) postulierten ein Modell, nach dem es nach Aktivierung des Kanals zu einer positiven Rückkopplung kommt. Der von TRPM2 vermittelte Ca^{2+} -Einstrom erhöht die lokale Ca^{2+} -Konzentration, was wiederum den Kanal stärker aktiviert. Auf diese Weise würde ein Signal entstehen, das von der Zelle nicht mehr aufgehoben werden kann. Ein solches irreversibles Signal ist für Prozesse, die den Tod der Zelle auslösen sollen, biologisch sinnvoll. In T-Zellen wurde nach Stimulation des TCR/CD3-Komplexes die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nachgewiesen ([Devadas et al., 2002](#)). Möglicherweise könnten auch solche Prozesse zur Aktivierung von TRPM2 in T-Lymphocyten beitragen.

Es gibt mehrere Berichte, die vermuten lassen, daß die Stimulation von T-Lymphocyten zur Aktivierung von TRPM2 führt: So kam es nach [Harootunian et al. \(1989\)](#) bei T-Zell-Stimulation zu einem Na^+ -Einstrom, dessen molekulare Ursache unklar blieb. Es wurde auch berichtet, daß es bei Stimulation des TCR zu einer Aktivierung mehrerer Einstrom-Wege für Ca^{2+} kam ([Chow et al., 1993](#)). In Drüsenzellen des Pankreas wurde ein nicht selektiver Kationen-Strom beschrieben, der durch Depletion intrazellulärer Speicher ausgelöst werden konnte und als I_{CRANC} („ Ca^{2+} release activated nonselective cation current“) bezeichnet wurde ([Krause et al., 1996](#)). Ein Strom mit gleichen Eigenschaften wurde von [Su et al. \(2001\)](#) auch in T-Lymphocyten gefunden. Möglicherweise ist das ADPR/TRPM2-System

für diese bisher molekular nicht charakterisierten Phänomene verantwortlich. Eine Verbindung zwischen dem I_{CRANC} -Strom und TRPM2 konnte in Jurkat-Zellen kürzlich durch [Su et al. \(2005\)](#) gezeigt werden, da die Repression der TRPM2-Expression eine Verminderung von I_{CRANC} bewirkte.

Mit Sicherheit sind noch umfangreichere Untersuchungen notwendig, um die Rolle von TRPM2 und seinem Effektor ADPR bei oxidativem Streß genauer zu charakterisieren. Auch Studien zur möglichen Rolle von TRPM2 als SOC, der einen von I_{CRAC} unterscheidbaren Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} in die Zelle auslöst, könnten zum weiteren Verständnis des komplexen Phänomens des Ca^{2+} -Einstroms in nicht-erregbare Zellen beitragen.

2. Problemstellung

Eine notwendige Voraussetzung zur Aktivierung von T-Lymphocyten ist eine langanhaltende Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Dies ist für die Proliferation dieser Zellen und damit für eine effiziente Immunantwort essentiell (Premack und Gardner, 1992). Die molekularen Vorgänge, die die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern und den Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum bewirken, sind bisher aber nur zum Teil bekannt.

Eine Rolle der beiden sekundären Botenstoffe InsP_3 und cADPR bei der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern nach Stimulation von T-Zellen durch den TCR/CD3-Komplex wurde bereits nachgewiesen (Übersicht in Guse (2002)). Hingegen ist über eine physiologische Funktion des Ca^{2+} -freisetzenden NADP-Derivats NAADP (Lee und Aarhus, 1995) in T-Lymphocyten bisher nur wenig bekannt. Nach Berg et al. (2000) blockiert eine Inaktivierung des NAADP-Systems die Ca^{2+} -Freisetzung durch InsP_3 und cADPR und hemmt darüber hinaus das Ca^{2+} -Signal nach TCR/CD3-Stimulation. Daher ist eine entscheidende Rolle von NAADP bei der T-Zell-Aktivierung zu vermuten.

Ein wichtige Grundlage zur Charakterisierung der Funktion von NAADP stellt eine Methode zur Messung der cytosolischen NAADP-Konzentration dar. Ein Assay zur Quantifizierung zellulärer NAADP-Konzentrationen muß hochsensitiv sein, da Konzentrationen im niedrigen nanomolaren Bereich zu erwarten sind (Berg et al., 2000; Patel et al., 2001; Cancela et al., 2003; Churamani et al., 2004). Um die notwendige Empfindlichkeit zu erreichen, sollte NAADP durch geeignete Derivatisierungs-Reagenzien in ein fluoreszierendes Produkt umgesetzt und anschließend durch HPLC mit Fluoreszenzdetektion quantifiziert werden. Alternativ sollte ein Enzym-Assay zur Detektion von NADP (Stephon et al., 1992) abgewandelt werden, um damit eine Quantifizierung von NAADP zu ermöglichen. Beide methodischen Ansätze sollten zunächst mit NAADP-Standards etabliert und danach mit einem zu entwickelnden Extraktionsprotokoll verknüpft werden. Mit dieser Methode sollten dann endogene NAADP-Mengen in T-Zellen quantifiziert werden, um eine Beteiligung von NAADP bei der Ca^{2+} -Freisetzung während der T-Zell-Aktivierung genauer zu untersuchen.

Der Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum ist eine notwendige Voraussetzung für eine langanhaltende Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Lewis, 2001). Welche Ionenkanäle für diesen Einstrom verantwortlich sind, ist bisher nicht eindeutig geklärt, obwohl nach Montell (2001) vermutlich Kanäle der TRP-Superfamilie beteiligt sind. Kürzlich wurde beschrieben, daß der Ca^{2+} -permeable Kationen-Kanal TRPM2 durch Bindung von ADPR an sein intrazelluläres „Nudix box“-Motiv aktiviert werden kann (Perraud et al., 2001; Sano et al., 2001). Eine Beteiligung des TRPM2-Agonisten ADPR am stimulationsabhängigen Ca^{2+} -Einstrom wurde daher zwar postuliert (Ayub und Hallett, 2004; Perraud

et al., 2004), aber bisher experimentell nicht gezeigt.

Deshalb sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Extraktionsprotokoll für ADPR aus T-Zellen und eine HPLC-basierte Technik zur ADPR-Quantifizierung etabliert werden, wobei als Ausgangspunkt eine Methode zur Messung von cADPR (da Silva et al., 1998a) dienen sollte. Um eine Beteiligung von ADPR bei der T-Zell-Aktivierung zu untersuchen, sollte festgestellt werden, ob sich die intrazelluläre ADPR-Konzentration bei Stimulation ändert, um so eine Beteiligung von TRPM2 am Ca^{2+} -Einstrom zu untersuchen. Ferner sollte der stimulationsabhängige Ca^{2+} -Einstrom pharmakologisch charakterisiert werden, um Erkenntnisse zur physiologischen Relevanz des ADPR/TRPM2-Systems für die Ca^{2+} -Homöostase in T-Lymphocyten zu erhalten.

3. Material und Methoden

3.1. Geräte und Materialien

- Sterile Werkbank (BDK, Sonnenbühl-Genkingen)
- CO₂-Inkubator (Heraeus, Hanau)
- CASY TT1-Zellzähler (Schärfe Systeme, Reutlingen)
- Zentrifuge Varifuge 3.OR (Heraeus, Hanau)
- Inversmikroskop (Leitz, Wetzlar)
- Hämocytometer mit Teilung nach Neubauer (Hellma, Mülheim)
- Zellkulturmaterialien aus Plastik (Greiner, Hamburg; Nunc, Wiesbaden; VWR, Hannover)
- Thermomixer 5643 (Eppendorf, Hamburg)
- Potter-Elvehjem-Homogenisator, 15 ml (Braun, Melsungen)
- Tischzentrifuge Biofuge Fresco (Heraeus, Hanau)
- Vortex-Mischer VF-2 (IKA-Labortechnik, Staufen)
- Gefriertrocknungs-Gerät 2040 (Snijders Scientific, Tillburg, Niederlande)
- Festphasen-Extraktionskartuschen, 3 ml, mit passenden Fritten (Supelco, Bellefort, USA)
- Ultraschall-Homogenator Sonoplus UW70 (Bandelin, Berlin)
- HPLC-System mit Hochdruck-Gradienten-Mischer (Kontron Instruments, Neufahrn), bestehend aus:
 - zwei HPLC-Pumpen 422
 - Mischkammer 494
 - Autosampler 360 zur automatischen Injektion von Proben
 - UV-Detektor 432
 - Fluoreszenz-Detektor FP-1520 (Jasco, Groß-Umstadt)

- HPLC-Probenfilter Minisart RC4, 0.2 μm (Satorius, Göttingen)
- C₁₈-HPLC-Säule Multohyp BDS C18, Partikelgröße 5 μm , 250 mm x 4.6 mm (Chromatographie-Service, Langerwehe)
- C₁₈-HPLC-Vorsäule Multohyp BDS C18, Partikelgröße 5 μm , 17 mm x 4.6 mm (Chromatographie-Service, Langerwehe)
- C₁₂-HPLC-Säule Synergi MAX RP 80A, Partikelgröße 4 μm , 250 mm x 4.6 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)
- SecurityGuard-Kartuschen-Halter mit MAX RP-Kartuschen (Phenomenex, Aschaffenburg)
- Autoklav 5075 ELV (Systec, Wetztenberg)
- Schwarze Mikrotiterplatten aus Polystyrol (Corning, New York, USA)
- Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Photometer Viktor 1420 (Wallac, Freiburg)
- Photometer Biophotometer (Eppendorf, Hamburg)
- PCR-Cycler Mastercycler Personal (Eppendorf, Hamburg)
- Gel-Elektrophorese-Apparatur GNA-100 (Pharmacia, Peapack, USA)
- UV-Transilluminator IL-350-M (Bachhofer, Reutlingen)
- Hitachi Fluoreszenz-Spektrophotometer F-2000 (Colora Meßtechnik, Lorch)

3.2. Software

- MT2-Datenaquisitions-System für HPLC (Kontron Instruments, Neufahrn)
- Hitachi F-2000 Intracellular Cation Measurement System (Colora Meßtechnik, Lorch)
- SigmaPlot, Version 8.0 (SPSS Science Software, Erkrath)
- SigmaStat, Version 2.0 (Jandel, Erkrath)
- ChemWindow, Version 5.0.1 (Bio-Rad, München)
- L^AT_EX 2_ε ([Knuth, 1991](#); [Lamport, 1994](#))

3.3. Medien, Chemikalien und Reagenzien-Kits

- Zellkultur-Medium RPMI 1640 mit Glutamax I (Invitrogen, Karlsruhe)
- Serum aus neugeborenen Kälbern (NCS), hitzeinaktiviert bei 56°C für 30 min (Biochrom, Berlin)
- nicht-essentielle Aminosäuren MEM, 100x Stamm-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe)
- PenStrep-Lösung, 10000 U/ml Penicillin G, 10000 µg/ml Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe)
- Trypanblau-Lösung, 0.4% (w/v) (Invitrogen, Karlsruhe)
- HEPES, 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (Biomol, Hamburg)
- DMSO, Dimethylsulfoxid (Sigma, Deisenhofen)
- CASYton-Lösung (Schärfe Systeme, Reutlingen)
- Cibacron Blue 3GA (Sigma, Deisenhofen)
- Concanavalin A, Typ IV aus *Canavalia ensiformis* (Sigma, Deisenhofen)
- NAADP, ADPR, NAD und andere Nucleotide, Nucleoside und Derivate (Sigma, Deisenhofen)
- Chloroacetaldehyd, ~45%ige Lösung in Wasser (Fluka, Neu-Ulm)
- Trichloressigsäure (Merck, Darmstadt)
- Diethylether (Merck, Darmstadt)
- Trifluoressigsäure (Merck, Darmstadt)
- Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Tris, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma, Deisenhofen)
- Methanol p. a. (Merck, Darmstadt)
- BSA, Rinder-Serum-Albumin Fraktion V (Sigma, Deisenhofen)
- Methanol LiChrosolv für HPLC (Merck, Darmstadt)
- TBAPH, Tetrabutylammonium-Hydrogenphosphat-Lösung, 1 M (Fluka, Neu-Ulm)
- ADP-Ribosylcyclase aus *Aplysia californica* (Sigma, Deisenhofen)
- Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma, Deisenhofen)

- Diaphorase aus *Clostridium kluyveri* (Sigma, Deisenhofen)
- NAD-Glycohydrolase (NADase) aus *Neurospora crassa* (Sigma, Deisenhofen)
- Flavin-Mononucleotid (Sigma, Deisenhofen)
- Resazurin (Sigma, Deisenhofen)
- Glucose-6-Phosphat (Sigma, Deisenhofen)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden)
- QiaShredder-Säulen (Qiagen, Hilden)
- RNase-free DNase-Kit zum DNase-Aufsäulenverdau (Qiagen, Hilden)
- Titan One-Tube RT-PCR-Kit (Roche, Mannheim)
- dNTP-Mix, je 20 mM (Amersham, Braunschweig)
- RNase-Inhibitor, 40 U/ μ l (Roche, Mannheim)
- SeaKem LE Agarose (FMC Bioproducts, Rockland, USA)
- Ethidiumbromid-Lösung, 10 mg/ml (Promega, München)
- 6x DNA Loading Dye Solution (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- 100 bp DNA Laddar Plus-Marker (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- High Pure PCR Purification Kit (Roche, Mannheim)
- 10x PCR-Puffer ohne Mg^{2+} (Gibco, Karlsruhe)
- $MgCl_2$ -Lösung, 25 mM (Gibco, Karlsruhe)
- ATP-Lösung, 2 mM (Gibco, Karlsruhe)
- Taq-DNA-Polymerase, 5 U/ μ l (Gibco, Karlsruhe)
- pGEM-T Easy Vector System-Kit mit T4-Ligase (Promega, München)
- Bakto-Tryptone (Becton Dickinson, Sparks, USA)
- Hefe-Extrakt (Life Technologies, Eggenstein)
- Ampicillin Natriumsalz (Applichem, Darmstadt)
- IPTG, Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (BioTech, St. Leon-Rot)
- X-Gal, 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (Peylab, Erlangen)

- Silica Spin-Kit für Minipreps (Whatmann, Göttingen)
- Big Dye Terminator Mix (Applied Biosystems, Langen)
- Half Term Polymerase-Puffer (PE Biosystems, Weiterstadt)
- Dye Ex 2.0-Kit zur Reinigung von Sequenzierungen (Qiagen, Hilden)
- Fura-2/AM, 4 mM in DMSO (Molecular Probes, Karlsruhe)
- PP2 (Calbiochem, Eggenstein)
- Thapsigargin (Calbiochem, Eggenstein)
- GdCl_3 (Sigma, Deisenhofen)

Alle nicht separat aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma, Merck, Fluka oder Calbiochem in der höchsten verfügbaren Qualität bezogen.

3.4. Puffer und Lösungen

- Citrat-Phosphat-Puffer: 62 mM Zitronensäure, 76 mM Na_2HPO_4 , pH4.0
- Extrazellulär-Puffer A: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 1 mM CaCl_2 , 1 mM NaH_2PO_4 , 5.5 mM Glucose, 20 mM HEPES, pH7.4 (NaOH)
- Extrazellulär-Puffer B: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.35 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM Glucose, 0.1% (w/v) BSA, 15 mM HEPES, pH7.4 (NaOH)
- Extrazellulär-Puffer C: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 10 mM Glucose, 0.1% (w/v) BSA, 15 mM HEPES, pH7.4 (NaOH)
- 150 mM TFA-Lösung: 2.9 ml TFA mit dest. Wasser auf 250 ml auffüllen
- HPLC-Puffer A1: 20 mM KH_2PO_4 , 5 mM TBAHP, pH6.0 (KOH), durch Filter mit einer Porenweite von $0.22\ \mu\text{m}$ filtrieren
- HPLC-Puffer A2: 20 mM KH_2PO_4 , 2 mM TBAHP, pH6.0 (KOH), durch Filter mit einer Porenweite von $0.22\ \mu\text{m}$ filtrieren
- HPLC-Puffer B1: 50% (v/v) HPLC-Puffer A1, 50% (v/v) Methanol LiChrosolv
- HPLC-Puffer B2: 50% (v/v) HPLC-Puffer A2, 50% (v/v) Methanol LiChrosolv
- 1x TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH8.1
- 1x TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH8.0

- SOC-Medium: 2% (w/v) Bakto-Trypton, 0.5% (w/v) Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose; sterilfiltrieren (0.2 µm)
- LB-Platten mit Ampicillin, IPTG und X-Gal: 1% (w/v) Bakto-Trypton, 0.5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) NaCl, 1.5% (w/v) Bitek-Agar; pH7.0 mit NaOH einstellen, autoklavieren und im Wasserbad auf 50°C abkühlen; dann 100 µg/ml Ampicillin, 0.5 mM IPTG (Stammlösung 100 mM in Wasser) und 80 µg/ml X-Gal (Stammlösung 50 mg/ml in DMF) zugeben und in Bakterialschalen gießen.
- LB-Medium mit Ampicillin: 1% (w/v) Bakto-Trypton, 0.5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) NaCl; pH7.0 mit NaOH einstellen, autoklavieren und nach Abkühlen 100 µg/ml Ampicillin zufügen.

3.5. Kultivierung von T-Lymphocyten der Linien Jurkat und BW5147

Jurkat-T-Lymphocyten des Subklons JMP ([Schneider et al., 1977](#)) wurden in RPMI 1640-Medium mit Glutamax I, versetzt mit 7.5% (v/v) NCS, 25 mM HEPES, pH7.4, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (komplettes RPMI-Medium) kultiviert. BW5147-Zellen wurden im gleichen Medium gehalten, das jedoch zusätzlich nicht essentielle Aminosäuren (1fach konzentriert) enthielt. Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden Aliquots der Zellsuspensionen mit Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:2 gemischt und die Dichte der vitalen Zellen mit einem Häemocytometer nach Neubauer ermittelt. Bei den Jurkat-Zellen wurde die Zelldichte mit vorgewärmtem Medium auf $0.3 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt, so daß die Suspension stets eine Dichte zwischen $0.3 \cdot 10^6$ und $1.2 \cdot 10^6$ Zellen/ml aufwies. Die BW5147-Zellen wurden jeden zweiten Tag mit vorgewärmtem Medium verdünnt, wobei die Zelldichte auf $0.1 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt wurde. Bei diesen Zellen betrug die maximale Dichte $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml.

Zelldichten wurden außerdem mit einem CASY TT1-Zellzähler bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension im Verhältnis 1:100 mit CASYton-Puffer verdünnt, gründlich durchmischt und automatisch gezählt. Dabei wurden nur Zellen im Größenbereich von 7.5 – 30.0 µm berücksichtigt. Durch die Verwendung des Gerätes war es außerdem möglich, das durchschnittliche Volumen der gezählten Zellen zu bestimmen.

3.6. Derivatisierung von NAADP mit Chloroacetaldehyd

Adenin-haltige Verbindungen lassen sich mit Chloroacetaldehyd zu fluoreszierenden Derivaten umsetzen ([Ohkura et al., 1994](#)). Als Standard zur Optimierung der Reaktionsbedingungen der Derivatisierung von NAADP mit Chloroacetaldehyd wurden 100 pmol NAADP pro Reaktionsansatz (1 ml) verwendet.

Die Ansätze enthielten jeweils:

NAADP-Lösung, 10 μ M	10 μ l
Citrat-Phosphat-Puffer, pH4.0	250 μ l
Chloroacetaldehyd-Lösung, 45%	10 μ l
dest. Wasser	730 μ l

Die Ansätze wurden in einem Thermomixer mit 1000 Upm unter Lichtschutz geschüttelt. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde der pH-Wert des Puffers im Bereich von 3.0 bis 5.0 in Schritten von 0.5 variiert indem zu dem in Abschnitt 3.4 angegebenen Citrat-Phosphat-Puffer entweder Zitronensäure oder Na₂HPO₄ zugefügt wurde, bis der gewünschte pH-Wert erreicht war. Die Temperatur der Reaktion wurde im Bereich von 60 bis 95°C variiert, und die Reaktions-Dauer von 20 bis 120 min. Nachdem die optimalen Reaktionsbedingungen ermittelt worden waren, wurden NAADP-Mengen von 2.5 pmol bis 10 nmol pro Ansatz (Zusammensetzung sonst wie oben angegeben) umgesetzt, um eine Eichkurve zu erstellen. Dabei wurde ein Puffer mit einem pH-Wert von 4.0 verwendet und die Reaktion unter Lichtschutz bei 90°C für 20 min durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden anschließend per RP-HPLC analysiert (siehe Abschnitt 3.8.1.2), wobei jeweils 100 μ l aus den Ansätzen aufgetrennt wurden.

3.7. Extraktion von Nucleotiden aus T-Lymphocyten

3.7.1. NAADP-Extraktion aus Zellen

Zur Extraktion von NAADP aus Jurkat-T-Lymphocyten wurden $1 \cdot 10^9$ Zellen durch Zentrifugation (550 g, 5 min, 23°C) pelletiert und in 50 ml Extrazellulär-Puffer A resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 25°C für 30 min inkubiert und danach erneut wie oben angegeben abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml eiskalter Trichloressigsäure-Lösung (20% (w/v) in Wasser) aufgenommen und in einen Potter-Elvehjem-Homogenisator (15 ml) überführt. Anschließend wurden die Zellen unter Eiskühlung bei 1500 Upm durch fünf Aufwärts- und Abwärts-Bewegungen lysiert. Das Homogenat wurde in zwei Hälften geteilt (Zwillingsproben) und alle Ansätze drei Mal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C wieder aufgetaut. Danach wurde eine der Hälften mit 15 pmol NAADP versetzt. Die Proben wurden 30 min in einem Eisbad inkubiert und für 2 min bei 488 g und 23°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in Mikroreaktionsgefäße überführt und bei maximaler Geschwindigkeit (13000 Upm) und 4°C in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Zur Entfernung der Trichloressigsäure wurden die Überstände vier Mal mit je 5 ml wassergesättigtem Diethylether extrahiert, wobei für eine Minute mit einem Vortex-Mischer gemischt wurde. Die Proben wurden dann eingefroren, zur Entfernung von Ether-Rückständen für 60 min an eine Gefriertrocknungs-Anlage angeschlossen und bis zur Festphasenextraktion (Abschnitt 3.7.2) bei -70°C gelagert.

3.7.2. Festphasenextraktion zur Aufreinigung der NAADP-Extrakte

Zur Vorbereitung der Festphasenextraktion wurden 20 ml Q-Sepharose FF vier Mal mit 20 ml Wasser, drei Mal mit 20 ml 150 mM Trifluoressigsäure-(TFA)-Lösung sowie vier Mal mit 5 mM Tris/HCl pH8.0 gewaschen. Anschließend wurde die Matrix in 20%iger (v/v) wäßriger Methanol-Lösung aufgeschlämmt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Nach dem Spülen der Extraktionskartuschen (Volumen 3 ml) mit Methanol und Wasser wurden zur Festphasenextraktion die Kartuschen mit 500 µl vorbereiteter Q-Sepharose FF gepackt und mit 5 ml 150 mM TFA-Lösung gespült. Anschließend wurden die Säulen mit 15 ml 10 mM Tris/HCl, pH8.0 equilibriert. Die neutralisierten NAADP-Extrakte wurden mit 10 mM Tris/HCl, pH8.0 auf ein Volumen von 14 ml aufgefüllt, und in Aliquots von 1 ml auf die Säulen aufgetragen. Anschließend wurden die Säulen mit 10 ml 10 mM Tris/HCl, pH8.0 sowie 600 µl 5 mM TFA-Lösung gespült. Die Elution erfolgte durch sukzessive Zugabe je 1.5 ml eiskalter TFA-Lösungen steigender Konzentration. Verwendet wurden Lösungen mit TFA-Konzentrationen von 5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 25 und 30 mM. Die Eluate wurden in je 3.5 ml Wasser unter Eiskühlung in Glasgefäßen aufgefangen, bei -20°C eingefroren und bis zur Trockne gefriergetrocknet. Anschließend wurden die Proben mit dem enzymatischen NAADP-Assay weiter untersucht (Abschnitt 3.9).

3.7.3. ADPR-Extraktion aus Zellen

Die Zellen ($5 \cdot 10^7$ Jurkat-T-Lymphocyten oder $1 \cdot 10^8$ BW5147-Thymocyten) wurden durch Zentrifugation (550 g, 5 min, 23°C) pelletiert, in 5 ml Extrazellulär-Puffer A resuspendiert und für 30 min bei 25°C inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen erneut wie oben angegeben pelletiert und in 2 ml eiskalter Trichloressigsäure-Lösung (20% (w/v) in Wasser) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C lysiert. Danach erfolgte unter Eiskühlung eine kurze Behandlung für 20 sec mit einem Ultraschall-Homogenisator. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 550 g und 4°C für 5 min entfernt und die Überstände in zwei Hälften geteilt (Zwillingsproben), von denen eine mit 2.5 nmol ADPR versetzt wurde. Anschließend wurden die Proben für 30 min in einem Eisbad inkubiert und danach zwei Mal für 10 min bei 4°C mit maximaler Geschwindigkeit (13000 Upm) in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und drei Mal mit 5 ml wassergesättigtem Diethylether extrahiert, wobei jeweils eine Minute mit einem Vortex-Mischer gemischt wurde. Um Reste des Ethers zu entfernen, wurden die Proben eingefroren und für etwa 60 min ein Vakuum angelegt. Anschließend wurde die Extrakte bei -70°C gelagert. In einigen Experimenten wurden diese neutralisierten Extrakte direkt zur HPLC-Analyse verwendet. Normalerweise wurden die Proben aber durch Festphasen-Extraktion (siehe Abschnitt 3.7.4) gereinigt. In einigen Versuchen wurden artifizielle Proben verwendet (siehe Abschnitt 4.2.1.4). Dazu wurden 100 µl Rinder-Serumalbumin-(BSA)-Lösung (100 mg/ml in Wasser) mit 20 nmol ADPR und/oder 20 nmol NAD versetzt. Die Extraktion wurde auf die gleiche Weise durchgeführt

wie für die aus Zellen bestehenden Proben beschrieben.

3.7.4. Festphasenextraktion zur Aufreinigung von ADPR

Die Vorbereitung der Q-Sepharose und der Extraktionskartuschen für die Festphasenextraktion erfolgte wie in Abschnitt 3.7.2 beschrieben. Zur Festphasenextraktion von ADPR wurden die Kartuschen mit 250 μ l Q-Sepharose FF gepackt und mit 5 ml 150 mM TFA-Lösung gespült. Anschließend wurden die Säulen mit 15 ml 10 mM Tris/HCl, pH8.0 equilibriert. Die neutralisierten Zellextrakte wurden mit 14 ml 10 mM Tris/HCl, pH8.0 verdünnt, und in Aliquots von 2 ml auf die Säulen aufgetragen. Anschließend wurden die Säulen mit 30 ml 10 mM Tris/HCl, pH8.0 sowie 600 μ l 5 mM TFA-Lösung gespült. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 1 ml 20 mM TFA-Lösung in Aliquots von 100 μ l. Die Eluate wurden in Glasgefäßen aufgefangen, weil die Verwendung von Plastik-Gefäßen – vermutlich durch Komponenten, die aus dem Material gelöst wurden – zur Degradation der Proben führte. Die Proben wurden entweder wie in Abschnitt 3.8.2 beschrieben direkt per HPLC aufgetrennt oder für kurze Zeit bei -70°C gelagert.

3.8. HPLC-Techniken

3.8.1. Analytik von Etheno-NAADP

3.8.1.1. Gradienten-Elution

Die Analytik von 1, N^6 - ϵ -NAADP wurde mittels Reversed Phase (RP)-HPLC durchgeführt. Dazu wurde eine C_{18} -Säule (Multohyp BDS C18, Partikelgröße 5 μ m, 250 mm x 4.6 mm) verwendet, die durch eine Vorsäule (17 mm x 4.6 mm) aus dem gleichen Material geschützt wurde (beides Chromatographie Service, Langerwehe). Die Auftrennung der Proben erfolgte durch einen ansteigenden Methanol-Gradienten mit den Puffer A1 und B1 bei einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min. Von jeder Probe wurden nach Filtration durch Einmal-Filter (0.2 μ m) mit Hilfe eines Autosamplers 100 μ l in das HPLC-System injiziert. Zum Nachweis der 1, N^6 -Etheno-(1, N^6 - ϵ)-Derivate wurde ein Fluoreszenz-Detektor benutzt, der mit einer Excitations-Wellenlänge von 300 nm, einer Emission-Wellenlänge von 410 nm und einer Verstärkungs-Einstellung von 10 betrieben wurde. Die Quantifizierung von 1, N^6 - ϵ -Verbindungen erfolgte durch Integration der Flächen der Peaks mit der MT2-Software (Kontron). Für die Analytik von 1, N^6 - ϵ -NAADP wurde das HPLC-Programm [NAADP2.PGM](#) (Seite 35) verwendet.

```

Time Device      Function << Parameter 1 >> << Parameter 2 >> <<Parameter 3 >>
-----
0.00 P 422 A      P. Limit Lower:          0 Upper:          250
0.00 P 422 B      P. Limit Lower:          0 Upper:          250
0.00 Flow         Total    Value:          1.000 Step:
0.00 Flow         % B      Value:          30.0 Step:
0.00 DETECT 432   Waveleng Lambda:          270
0.00 Jasco 1520   EX-Wavel EX-Wavel:          300
0.00 SA 360       Set Volu Air Gap:          30 Samp Vol:          135 --> Loop:          15
0.10 DETECT 432   Paramete Range:          0.500 Res Time:          0.20
0.15 DETECT 432   Autozero
0.15 Jasco 1520   EM-Wavel EM-Wavel:          410
0.16 Jasco 1520   Gain      Gain:            10
0.17 Jasco 1520   Atten.    Atten.              1
0.20 Jasco 1520   Autozero
0.22 Acquis.On    Channel:            12 Average:          ON Step:
0.25 SA 360       Inject
1.50 Flow         % B      Value:          30.0 Step:
3.50 Flow         % B      Value:          30.0 Step:
5.50 Flow         % B      Value:          65.0 Step:
6.50 Flow         % B      Value:          65.0 Step:
9.00 Flow         % B      Value:          80.0 Step:
16.00 Flow        % B      Value:          80.0 Step:
18.00 Flow        % B      Value:          30.0 Step:
27.00 Acquis.Off
27.00 Flow        % B      Value:          30.0 Step:
27.00 End

```

HPLC-Programm 3.1: HPLC-Programm NAADP2.PGM zur Quantifizierung von 1, N^6 - ϵ -NAADP und zur Abtrennung von anderen 1, N^6 - ϵ -Derivaten. Durch die Befehle P 422 A bzw. P 442 B werden die Druck-Limits der HPLC-Pumpen A bzw. B festgelegt. Die Flow-Befehle regeln entweder die Gesamt-Flußrate, oder geben den prozentualen Gehalt an Puffer B2 vor. Durch die DETECT 432-Befehle wird die Detektions-Wellenlänge des UV-Detektor auf 270 nm festgelegt, es werden weitere Parameter dieses Detektors eingestellt oder ein Nullpunkts-Abgleich wird durchgeführt. Die Befehle SA 360 legen ein Injektionsvolumen des Autosamplers von 100 μ l fest oder lösen die Injektion aus. Die Jasco 1520-Befehle stellen die Excitations- bzw. Emissionswellenlänge des Fluoreszenz-Detektors auf 300 bzw. 410 nm, die Verstärkungseinstellung („Gain“) auf 10 und führen den Nullpunkts-Abgleich durch. Durch die Acquis.-Befehle wird die Datenaquisition auf Kanal 1 (UV-Detektion) und Kanal 2 (Fluoreszenz-Detektion) an- oder abgeschaltet. Der End-Befehl beendet schließlich den Programm-Ablauf.

3.8.1.2. Isokratische Elution

1, N^6 - ϵ -NAADP wurde auch unter isokratischen Bedingungen aufgetrennt, um einen Fluoreszenz-Hintergrund des Methanol-Gradienten bei hoher Empfindlichkeits-Einstellung des Detektors zu vermeiden. Dabei wurden die gleichen Säulen wie in Abschnitt 3.8.1.1 beschrieben eingesetzt, aber die Puffer A2 und B2 mit 2 mM TBAHP verwendet. Es wurde ein kontinuierlicher Gehalt von 52% Puffer B2 benutzt und am Ende jedes Laufes der Anteil von B2 auf 80% erhöht, um die Säule zu spülen. Der Fluoreszenz-Detektor wurde im Programm NAADP12.PGM (Seite 36) mit einer Verstärkungs-Einstellung von 1000 betrieben.

```

Time Device      Function << Parameter 1 >> << Parameter 2 >> <<Parameter 3 >>
-----
0.00 P 422 A      P. Limit Lower:          0 Upper:          250
0.00 P 422 B      P. Limit Lower:          0 Upper:          250
0.00 Flow         Total      Value:          1.000 Step:
0.00 Flow         % B        Value:          52.0 Step:
0.00 DETECT 432   Waveleng Lambda:         270
0.00 Jasco 1520   EX-Wavel EX-Wavel:         271
0.00 SA 360       Set Volu Air Gap:         30 Samp Vol:         135 --> Loop:         15
0.10 DETECT 432   Paramete Range:          0.500 Res Time:         0.20
0.15 DETECT 432   Autozero
0.15 Jasco 1520   EM-Wavel EM-Wavel:         404
0.16 Jasco 1520   Gain      Gain:          1000
0.17 Jasco 1520   Atten.    Atten.             1
0.18 Jasco 1520   Spalt 1   Spalt:             18
0.20 Jasco 1520   Autozero
0.22 Acquis.On    Channel:          2 Average:          ON Step:
0.25 SA 360       Inject
1.25 Jasco 1520   Autozero
1.50 Flow         % B        Value:          52.0 Step:
25.00 Acquis.Off
25.05 Flow         % B        Value:          52.0 Step:
26.00 Flow         % B        Value:          80.0 Step:
29.00 Flow         % B        Value:          80.0 Step:
39.50 Flow         % B        Value:          52.0 Step:
40.00 End

```

HPLC-Programm 3.2: Das isokratische Programm NAADP12.PGM zur Quantifizierung von 1, N^6 - ϵ -NAADP. Zur Erklärung der verwendeten Befehle siehe Legende zu HPLC-Programm NAADP2.PGM.

3.8.2. Analytik von ADPR

Grundlage für die Quantifizierung von ADPR in Zellextrakten war eine etablierte Methode zur Bestimmung von cADPR, bei der eine Kombination aus Anionenaustauscher-Chromatographie und RP-HPLC verwendet wurde (da Silva et al., 1998a). Zur Analytik von ADPR wurde eine RP-HPLC durchgeführt, wobei standardmäßig die gleiche Säule verwendet wurde wie in Abschnitt 3.8.1.1 beschrieben. Außerdem wurde eine C₁₂-Säule benutzt (Synergi MAX RP 80A C12, 250 mm x 4.6 mm, Partikelgröße 4 μ m), die durch eine SecurityGuard-Kartusche geschützt wurde (beides Phenomenex, Aschaffenburg). Die Auftrennung der Proben erfolgte mit den Puffern A1 und B1, wobei für beide Säulen-Typen ein ansteigender Methanol-Gradient verwendet wurde (in % Methanol): 0 min 15, 3.5 min 15, 5.5 min 32.5, 6.5 min 32.5, 9 min 40, 11 min 50, 16 min 50, 18 min 15, 27 min 15. Die Proben wurden vor der Injektion in das HPLC-System durch Einmal-Filter mit einer Porenweite von 0.2 μ m gereinigt. Aufgetrennt wurden jeweils 20 μ l der Eluate aus der Festphasen-Extraktion (siehe Abschnitt 3.7.4), die mit 80 μ l eines Gemisches aus 70% Puffer A1 und 30% Puffer B1 versetzt wurden. Die Detektion erfolgte durch einen UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 270 nm. Für die Analytik von ADPR wurde das HPLC-Programm HYP50AG.PGM verwen-

```

Time Device      Function << Parameter 1 >> << Parameter 2 >> <<Parameter 3 >>
-----
0.00 P 422 A      P. Limit Lower:          0 Upper:          300
0.00 P 422 B      P. Limit Lower:          0 Upper:          300
0.00 Flow         Total      Value:          1.000 Step:
0.00 Flow         % B       Value:          30.0 Step:
0.00 DETECT 432   Waveleng Lambda:          270
0.00 SA 360       Set Volu Air Gap:          30 Samp Vol:      135 --> Loop:      15
0.10 DETECT 432   Paramete Range:          0.500 Res Time:      0.20
0.15 DETECT 432   Autozero
0.20 Acquis.On    Channel:          1 Average:          ON Step:
0.25 SA 360       Inject
1.50 Flow         % B       Value:          30.0 Step:
3.50 Flow         % B       Value:          30.0 Step:
5.50 Flow         % B       Value:          65.0 Step:
6.50 Flow         % B       Value:          65.0 Step:
9.00 Flow         % B       Value:          80.0 Step:
11.00 Flow        % B       Value:          100.0 Step:
16.00 Flow        % B       Value:          100.0 Step:
18.00 Flow        % B       Value:          30.0 Step:
27.00 Acquisi.Off
27.00 Flow        % B       Value:          30.0 Step:
27.00 End

```

HPLC-Programm 3.3: Das Programm HYP50AG.PGM zur Quantifizierung von ADPR.

Zur Erklärung der verwendeten Befehle siehe Legende zu HPLC-Programm [NAADP2.PGM](#).

det. Die Quantifizierung der ADPR-Mengen und die Berechnung der Wiederfindung erfolgte durch Integration der Peak-Flächen und Vergleich mit einem ADPR-Standard bekannter Konzentration (hierzu wurden in der Regel 50 pmol ADPR verwendet).

Um den ADPR-Peak in den Zellextrakten weiter zu charakterisieren, wurde bei manchen Proben aus der Festphasen-Extraktion von Zellextrakten der Fluß der HPLC gestoppt, während sich der ADPR-Peak im UV-Detektor befand. Danach wurde die Wellenlänge von 210 nm bis 340 nm in Schritten von 10 nm erhöht, um ein UV-Spektrum des Peaks aufzunehmen. Diese Aufnahme der Spektren dauerte ca. 3 min. Die Absorption bei jeder gemessenen Wellenlänge wurde um die Absorption einer Pufferkontrolle bei der gleichen Wellenlänge korrigiert, und das erhaltene Spektrum mit einem auf die gleiche Weise erzeugten UV-Spektrum eines ADPR-Standards verglichen.

3.8.3. Analytik der Umsetzung von NAADP durch ADP-Ribosylcyclase

Zur Untersuchung, ob NAADP durch die ADP-Ribosylcyclase aus *Aplysia californica* zu NADP umgesetzt werden kann, wurden folgende Reaktionsansätze verwendet:

NAADP-Lösung, 10 mM	15 µl
Nicotinamid-Lösung, 200 mM	375 µl
Natriumacetat-Puffer, 100 mM, pH4.5	750 µl
ADP-Ribosylcyclase, 100 µg/ml in Wasser	15 µl
dest. Wasser	345 µl

Die Ansätze wurden unter Schütteln (600 Upm) bei Raumtemperatur oder 10°C inkubiert. Unmittelbar nach Start der Reaktion sowie alle 30 min wurden Aliquots von 200 µl aus den Reaktionsansätzen entnommen und die Reaktion durch Einfrieren bei -20°C gestoppt. Anschließend wurden die Proteine in den Proben durch Zugabe von 200 µl Aceton gefällt, die Ansätze für 10 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge mit maximaler Geschwindigkeit (13000 Upm) abzentrifugiert, und die Überstände in einer SpeedVac-Zentrifuge bis zur Trockne eingengt. Danach wurden die Proben in 200 µl HPLC-Puffer A1 aufgenommen und 100 µl davon wie in Abschnitt 3.8.1.1 per RP-HPLC mit dem Programm NAADP2.PGM aufgetrennt. Die NAADP- und NADP-Peaks wurden durch Vergleich mit Standards bekannter Konzentration identifiziert und quantifiziert.

3.9. Zyklischer Enzym-Assay zur Quantifizierung von NAADP

3.9.1. Reinigung der verwendeten Enzyme

Zur Reinigung der in der Amplifikations-Reaktion verwendeten Enzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) und Diaphorase wurden die gelösten Enzyme mit aktivierter Aktivkohle inkubiert. Dazu wurden je 100 µl der Enzymlösungen (G6P-DH 1 mg/ml, Diaphorase 12 mg/ml, beides in 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH8.0) mit 200 µl BSA-Lösung (5 mg/ml in Wasser) und 1.2 ml Aktivkohlesuspension (2%ig (w/v) in 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer, 150 mM NaCl, pH8.0) versetzt. Die Ansätze wurden bei 800 Upm für 60 min geschüttelt und anschließend zwei Mal in einer Eppendorf-Tischzentrifuge mit maximaler Geschwindigkeit (13000 Upm) abzentrifugiert, wobei die Pellets verworfen wurden. Die erhaltene Enzym-Lösung wurde direkt für die Amplifikations-Reaktion (Abschnitt 3.9.3) verwendet.

3.9.2. NADase-Verdau und Umsetzung von NAADP zu NADP

Zum NADase-Verdau wurden die gefriergetrockneten NAADP-Zellextrakte (Abschnitt 3.7.2) oder andere Proben in 1.5 ml 1 mM Tris/HCl, 2.5 mM MgCl₂, pH8.0 aufgenommen. Dabei wurden die Trocknungsrückstände der Fraktionen aus der Elution mit 10, 12.5 und 15 mM TFA gemeinsam in 1.5 ml Puffer aufgenommen, weil mit Standards eine Elution von NAADP in diesen Fraktionen gefunden worden war. Zu diesen Ansätzen wurden 10 µl NADase-Lösung (10 U/ml in 1 mM Tris/HCl, 2.5 mM MgCl₂, pH8.0) gegeben und die Proben bei 37°C für vier Stunden unter Schütteln (500 Upm) inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden die Ansätze danach für 20 min auf 95°C erhitzt und anschließend in einem Eisbad abgekühlt. Um das enthaltene NAADP in NADP umzusetzen, wurden je 200 µl der Ansätze in sechs Vertiefungen einer schwarzen Mikrotiterplatte (Corning) überführt. Zu dreien dieser Ansätze wurden je 11 µl einer wässrigen Lösung von 0.55 M Nicotinamid, 36 mM Natriumacetat, pH4.2 und 9.1 µg/ml ADP-Ribosylcyclase (aus *Aplysia californica*) gegeben. Die restlichen drei Ansätze wurden mit der gleichen Lösung versetzt, wobei aber die ADP-Ribosylcyclase durch

BSA ersetzt wurde. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit Parafilm versiegelt und für 60 min bei 23°C im Dunkeln inkubiert; danach wurde die Amplifikationsreaktion gestartet (Abschnitt 3.9.3).

3.9.3. Amplifikations-Reaktion

Nach Ende der Reaktion zur Umwandlung von NAADP zu NADP (Abschnitt 3.9.2) wurden in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 59 µl einer Reaktionsmischung folgender Zusammensetzung gegeben (alle Lösungen in Wasser):

Nicotinamid-Lösung, 1 M	1 µl
Natrium-Phosphat-Lösung, 500 mM, pH8.0	20 µl
Flavin-Mononucleotid-Lösung, 1 mM	1 µl
BSA-Lösung, 5 mg/ml	2 µl
Resazurin, 10 mM	0.1 µl
Glucose-6-Phosphat, 100 mM	5 µl
Enzym-Reinigungsansatz (Abschnitt 3.9.1)	29.9 µl

Nach Zugabe der Reaktionsmischung wurde sofort die Fluoreszenz in jeder Vertiefung mit einem Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Photometer gemessen. Dabei wurde eine Excitations-Wellenlänge von 544 nm und eine Emissions-Wellenlänge von 590 nm verwendet. Die Messung wurde als Dreifach-Messung durchgeführt und die Mittelwerte daraus berechnet. Die Mikrotiterplatte wurde dann mit Parafilm abgedichtet und für 12 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Fluoreszenz ein weiteres Mal gemessen.

Zur Auswertung wurden von den am Ende der Inkubation gemessenen Werten die Startwerte subtrahiert. Für jede Probe ergab sich so ein Wert für die in 12 Stunden aufgetretenen Fluoreszenz-Differenz. Um eine Korrektur der erhaltenen Fluoreszenzwerte um den durch NADP bedingten Hintergrund zu ermöglichen (siehe Abschnitt 4.1.2.4), wurden die Fluoreszenz-Differenzen *mit* ADP-Ribosylcyclase in der ersten Reaktion (siehe Abschnitt 3.9.2) um die Differenzwerte *ohne* das Enzym korrigiert. Auf diese Weise konnte für jede Probe der spezifische Fluoreszenz-Anstieg ermittelt werden, der durch NAADP, nicht aber durch NADP verursacht wurde. Aus den drei parallelen Messungen wurden anschließend die Mittelwerte berechnet.

3.10. RT-PCR von TRPM2

3.10.1. Analyse der Expression von TRPM2 durch RT-PCR

Um die Expression von TRPM2 in Jurkat T-Lymphocyten auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurde mit dem RNeasy Mini-Kit unter Verwendung von QiaShredder-Säulen und mit einem DNase-Aufsäulenverdau (alles Qiagen) nach Anweisung des Herstellers Gesamt-RNA aus Jurkat-Zellen isoliert und durch Messung der UV-Absorption (Biophotometer, Eppendorf) bei 260 nm quantifiziert. Da das Absorptionsverhalten von Nucleinsäuren stark vom

pH-Wert abhängt (Wilfinger et al., 1997) und Proteinkontaminationen bei alkalischem pH-Wert leichter zu detektieren sind, wurde die Konzentrationsbestimmung in 1x TE-Puffer bei einem pH-Wert von 8.0 durchgeführt. Mit der erhaltenen RNA wurden RT-PCRs in einem Ein-Schritt-Protokoll (d. h. ohne separate cDNA-Synthese) durchgeführt. Dazu wurde das Titan One Tube RT-PCR-Kit (Roche) verwendet. Pro Reaktion wurden 200 ng RNA eingesetzt. In Kontroll-Ansätzen wurde die Reverse Transkriptase vor der Reaktion durch Hitzebehandlung (2 min bei 94°C) inaktiviert, um so eine DNA-Kontamination auszuschließen. Die Reaktionsansätze der RT-PCR enthielten:

RNA-Lösung, 379 ng/ μ l	0.53 μ l
dNTP-Mix, jeweils 20 mM	0.5 μ l
Vorwärts-Primer, 20 μ M	2 μ l
Rückwärts-Primer, 20 μ M	2 μ l
DTT, 100 mM	2.5 μ l
RNase-Inhibitor, 40 U/ μ l	0.5 μ l
dest. Wasser	17 μ l

Für die Amplifikations-Reaktionen wurde entweder das Primerpaar PS-3/PS-5 (für eine Amplifikation im Bereich des Exons 11 der mRNA) oder das Primerpaar PS-1/PS-2 (für eine Amplifikation im Bereich des Exons 27 der mRNA) verwendet. Die Sequenzen der verwendeten Primer lauteten (Wehage et al., 2002):

Name	Orientierung	Sequenz (5'→3')	Position* (Exon)
PS-1	antisense	ACC AGC ACT TCC ACG ATC TTC	4552 – 4571 (29)
PS-2	sense	GTT CCT GAT CTA TGA CCC AC	4246 – 4265 (26)
PS-3	antisense	AAA TGA GAA GGT CAC GGA TG	2308 – 2327 (11)
PS-5	sense	TTC ATG GAT GAG TGG CAG TG	1862 – 1881 (10)

Das RT-PCR-Programm hatte folgenden Ablauf:

1x	57°C	30 min
	94°C	1 min
35x	50°C	1 min
	68°C	1.5 min
1x	68°C	7 min
Hold	4°C	

Zur Analyse wurden die Proben (10 μ l der Amplifikate) in einem 1.8%igen (w/v) Agarosegel in 1x TAE-Puffer mit 0.5 μ g/ml Ethidiumbromid aufgetrennt. Die Amplifikate wurden durch UV-Beleuchtung sichtbar gemacht und die Längen durch Vergleich mit DNA-Standards bestimmt.

*Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die cDNA der mRNA von TRPM2, Ensembl-Datenbank, Transkript ENST 00000300482 (www.ensembl.org).

3.10.2. Klonierung und Sequenzierung

Zur Klonierung der Amplifikate, die bei der in Abschnitt 3.10.1 beschriebenen RT-PCR erhalten wurden, wurden diese mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt und in 50 μ l 1 mM Tris/HCl, pH 8.5 eluiert. Danach wurden Adenosin-Reste an die 3'-Enden der PCR-Produkte angehängt, um die Klonierung in einen Vektor mit T-Überhängen an den 5'-Enden zu erleichtern. Für dieses sogenannte „A-tailing“ wurden folgende Reaktionsansätze verwendet:

gereinigtes Produkt aus der RT-PCR	6.4 μ l
10x PCR-Puffer ohne Mg ²⁺ (Gibco)	1 μ l
MgCl ₂ -Lösung, 25 mM (Gibco)	0.6 μ l
ATP-Lösung, 2 mM (Gibco)	1 μ l
Taq-DNA-Polymerase, 5 U/ μ l (Gibco)	1 μ l

Die Ansätze wurden für 30 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden die Amplifikate in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy (Promega) kloniert. Zur Ligation wurden folgende Ansätze benutzt:

Ansatz aus der A-tailing-Reaktion	3 μ l
2x Reaktionspuffer (Promega)	5 μ l
T4-Ligase, 3 U/ μ l (Promega)	1 μ l
pGEM-T Easy Vektor, 50 ng/ μ l	1 μ l

Die Ligationsreaktionen wurden für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die ligierten Vektoren in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (Stamm K12 XL1-blue) transfiziert. Dazu wurden Aliquots der Bakterien auf Eis aufgetaut und die Ligationsansätze vorsichtig komplett zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen einem Hitzeschock von 42°C für eine Minute ausgesetzt und sofort zwei Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 900 μ l SOC-Medium zugegeben und die Ansätze für 60 min bei 37°C geschüttelt (Thermomixer, 1000 Upm). Von diesen Ansätzen wurden 100 μ l auf LB-Platten mit Ampicillin, IPTG und X-Gal ausgestrichen und bei 37°C inkubiert.

Um die klonierten Amplifikate durch Sequenzierung zu charakterisieren, wurden zwei weiße Kolonien des N-terminalen Amplifikats und sechs weiße Kolonien der C-terminalen Amplifikate als Mini-Kulturen über Nacht in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin vermehrt. Daraus wurde die Vektor-DNA mit dem Silica Spin-Kit (Whatman) nach Angaben des Herstellers isoliert und mit 50 μ l 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 eluiert. Die erhaltene DNA wurde bei einer Verdünnung von 1:40 durch Messung der UV-Absorption bei 260 nm mit einem Eppendorf Biophotometer quantifiziert. Da das Absorptionsverhalten von Nucleinsäuren stark vom pH-Wert abhängt (Wilfinger et al., 1997) und Proteinkontaminationen bei alkalischem pH-Wert leichter zu detektieren sind, wurde die Konzentrationsbestimmung in 1x TE-Puffer bei einem pH-Wert von 8.0 durchgeführt. Zur Sequenzierung wurden die Klone TRPM2-N1, TRPM2-C1 und TRPM2-C8 ausgewählt. Für alle drei Konstrukte wurden Sequenzierungs-

primer verwendet, die zu Sequenzen aus dem Vektor GEM T-easy komplementär waren. Zur Sequenzierung wurden folgende Ansätze benutzt:

Big Dye Terminator Mix	3 μ l
Half Term Polymerase-Puffer	5 μ l
Sequenzierungsprimer, 15 mM	1 μ l
Plasmid-Lösung	entsprechend 800 ng
dest. Wasser	auffüllen auf 20 μ l

Die Sequenzen der zur Sequenzierung verwendeten Primer wurden mit dem Programm Primer3 ([Rozen und Skaletsky, 2000](#)) erstellt und lauteten:

Name	Sequenz (5'→3')
pGEM-T sense	GAC GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG
pGEM-T antisense	GCT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC

Folgendes Temperaturprogramm wurde für die Sequenzierung verwendet:

	95°C	10 sec
25x	50°C	5 sec
	60°C	4 min
Hold	4°C	

Die Sequenzieransätze wurden mit dem Dye Ex 2.0-Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt; dabei erfolgte eine Zentrifugation mit 2800 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge für drei Minuten. Die Proben wurden anschließend in einer SpeedVac-Zentrifuge getrocknet und im UKE-Servicelabor sequenziert.

3.11. Calcium-Messungen in T-Lymphocyten

3.11.1. Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration in Gegenwart von extrazellulärem Calcium

Jurkat T-Lymphocyten ($2.4 \cdot 10^7$) wurden pelletiert (alle folgenden Zentrifugationen für 4 min bei 138 g und 23°C), mit 10 ml Extrazellulär-Puffer B gewaschen und erneut pelletiert. Danach wurden die Zellen in 1 ml Extrazellulär-Puffer B resuspendiert und für 30 min mit 4 μ M Fura-2/AM bei 37°C unter Lichtschutz beladen. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen pelletiert, erneut mit 10 ml Extrazellulär-Puffer B gewaschen, abzentrifugiert und in 12 ml des gleichen Puffers aufgenommen. Bis zur Messung wurden die Zellen in Aliquots von 2 ml im Dunkeln aufbewahrt. Unmittelbar vor der Messung wurde ein Aliquot ($4 \cdot 10^6$ Zellen) pelletiert, mit 2 ml Extrazellulär-Puffer B gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 2 ml Extrazellulär-Puffer B resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine Quarzküvette

überführt, und $[Ca^{2+}]_i$ in einem Hitachi F-2000 Spektrofluorimeter bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Rühren gemessen. Die Fluoreszenzanregung erfolgte abwechselnd bei 340 und 380 nm und die Emission wurde bei 510 nm aufgenommen. 200 sec nach Beginn der Messung wurden die Zellen durch Zugabe von ConA (in Extrazellulär-Puffer B, Endkonzentration 100 μ g/ml) stimuliert. Die Kalibrierung von $[Ca^{2+}]_i$ wurde durch Zugabe von 0.1% Triton X-100 zur Bestimmung des maximalen Fluoreszenz-Ratios und 8 mM EGTA, 60 mM Tris/HCl, pH 7.4 zur Bestimmung des minimalen Fluoreszenz-Ratios durchgeführt. Die $[Ca^{2+}]_i$ -Werte wurden mit der Software F-2000 Intracellular Cation Measurement System (Hitachi) nach Gryniewicz et al. (1985) ermittelt.

3.11.2. Direkte Quantifizierung des Calcium-Einstroms

Um den Ca^{2+} -Einstrom direkt zu messen, wurde ein Protokoll verwendet, bei dem T-Lymphocyten in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} stimuliert werden und nach Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern Ca^{2+} in den Extrazellulärraum zugegeben wird (verändert nach Zhu et al. (1998)). Die Beladung der Zellen mit Fura-2 erfolgte auf die gleiche Weise wie in Abschnitt 3.11.1 beschrieben. Hier wurde vor Beginn jeder Messung ein Aliquot von $4 \cdot 10^6$ Zellen abzentrifugiert (alle folgenden Zentrifugationen für 4 min bei 138 g und 23°C), mit 2 ml des nominell Ca^{2+} -freien Extrazellulär-Puffers C gewaschen, erneut pelletiert und zur Messung in 2 ml Extrazellulär-Puffer C resuspendiert. In manchen Versuchen wurden die Zellen vor der Messung (in Extrazellulär-Puffer B) für 20 min mit 100 μ M 3GA, für 30 min mit 200 nM ara-F-NAD (Nicotinamid-2'-desoxy-2'-fluoroarabinosid-adenindinucleotid) inkubiert, oder 1 μ M PP2 (Calbiochem) wurde 5 min vor der Messung zugesetzt. Die Messung von $[Ca^{2+}]_i$ wurde wie in Abschnitt 3.11.1 beschrieben durchgeführt. Zur Messung des Einstroms von Ca^{2+} nach Stimulation mit ConA (in Extrazellulär-Puffer C, Endkonzentration 100 μ g/ml) oder Thapsigargin (in DMSO, Endkonzentration 100 nM) wurde 400 sec nach Stimulation $CaCl_2$ (in Wasser, Endkonzentration 1.35 mM) zugegeben. Bei einigen Versuchen wurden unterschiedliche Konzentrationen an $GdCl_3$ (in Wasser, Endkonzentration 10 nM bis 10 μ M) 100 sec vor der Zugabe von Ca^{2+} zugegeben. Die Kalibrierung wurde wie in Abschnitt 3.11.1 beschrieben durchgeführt. Zur Auswertung wurden die Differenzen in den $[Ca^{2+}]_i$ -Werten direkt vor der Zugabe von Ca^{2+} und 600 sec danach ermittelt.

3.11.3. Indirekte Quantifizierung des Calcium-Einstroms

Zur indirekten Bestimmung des Ca^{2+} -Einstroms durch Mangan-Quenching (Kass et al., 1990; Glennon et al., 1992; Shibuya und Douglas, 1992) wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.11.2 beschrieben mit Fura-2 beladen, mit dem nominell Ca^{2+} -freiem Extrazellulär-Puffer C gewaschen und im gleichen Puffer aufgenommen. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte am isosbestischen Punkt von Fura-2 (Gryniewicz et al., 1985) mit einer Excitation von 360 nm und einer Emission von 510 nm. Die Fura-2-Fluoreszenz nach Zugabe von 15 μ M $MnCl_2$ wurde

auf den Startwert der Fluoreszenz normiert (F/F_0) und die initiale Verminderung der Fluoreszenz zum Zeitpunkt der Mn^{2+} -Zugabe durch Regressionsanalysen ermittelt. Dazu wurde eine lineare Regression vor Zugabe von Mn^{2+} und eine exponentiell abfallende Regression nach Zugabe von Mn^{2+} durchgeführt (SigmaPlot). Abschließend wurden die Steigungen vor der Zugabe von Mn^{2+} von den initialen Steigungen nach Mn^{2+} -Zugabe subtrahiert.

3.12. Zellzahl-Bestimmung bei Behandlung von T-Zellen mit Concanavalin A

Zur Untersuchung der Wirkung von ConA auf T-Lymphocyten wurden Jurkat-Zellen gezählt, pelletiert (4 min, 138 g, 23°C) und mit einer Dichte von $1.5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in vorgewärmtem RPMI 1640-Medium ohne Zusätze (serumfreies Medium, SFM) resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 50 μ l in jede Vertiefung einer Rundboden-Mikrotiter-Platte für Suspensionskultur-Zellen gegeben, so daß jeweils $7.5 \cdot 10^4$ Zellen enthalten waren. Die Vertiefungen wurden dann mit 25 μ l 3GA-Lösungen unterschiedlicher Konzentration (90 – 900 μ M in SFM, Endkonzentration 30 – 300 μ M) versetzt und die Ansätze für 30 min im CO₂-Brutschrank inkubiert. Danach wurden jeweils 25 μ l ConA-Lösung (400 μ g/ml in SFM, Endkonzentration 100 μ g/ml) oder eine Vehikel-Kontrolle zugegeben. Nach weiteren 15 min Inkubation im CO₂-Brutschrank wurden in jede Vertiefung 25 μ l komplettes RPMI-Medium (siehe Abschnitt 3.5) gegeben. Drei Stunden nach Zugabe der ConA-Lösung wurden die Inhalte der Vertiefungen durch mehrmaliges Pipettieren gründlich durchmischt und die Zellzahlen mit dem CASY TT1-Zähler wie in Abschnitt 3.5 beschrieben bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1. Entwicklung eines analytischen Systems zur Quantifizierung intrazellulärer NAADP-Konzentrationen

NAADP wurde erstmals vor mehr als 10 Jahren als Botenstoff zur Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern in Homogenaten aus Seeigel-Eiern beschrieben (Clapper et al., 1987; Lee und Aarhus, 1995). Trotzdem ist bisher nur wenig bekannt über die in Zellen von Säugern vorliegenden NAADP-Konzentrationen oder eine eventuelle stimulationsabhängige Änderung. Ein natürliches Vorkommen von NAADP in tierischen Zellen wurde erstmals in Seeigeli-Spermien beschrieben, wobei eine überraschend hohe Konzentration im mikromolaren Bereich gefunden wurde (Billington et al., 2002). Dabei handelt es sich aber vermutlich um einen Sonderfall, weil nach den Dosis-Wirkungs-Beziehungen in anderen Zell-Typen (Übersicht in Patel et al. (2001) und Cancela et al. (2003)) deutlich geringere zelluläre NAADP-Konzentrationen zu erwarten sind. In T-Lymphocyten z. B. sind niedrige nanomolare Konzentrationen zur Erzeugung globaler Ca^{2+} -Signale ausreichend (Berg et al., 2000). Daher ist ein hochempfindliches Nachweis-Verfahren notwendig, um mit einer vertretbaren Menge an Zellen als Ausgangsmaterial NAADP direkt quantifizieren zu können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Strategien verfolgt, um einen Assay zur Quantifizierung nanomolarer NAADP-Konzentrationen zu entwickeln:

1. Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit durch Erzeugung fluoreszierender Derivate von NAADP. Diese sollten dann nach Auftrennung durch RP-HPLC mittels Fluoreszenz-Detektion quantifiziert werden.
2. Entwicklung eines mehrstufigen Enzym-Assays, bei dem NAADP zuerst zu NADP umgesetzt wird. Danach wird in einer zyklischen Reaktionsfolge unter Beteiligung von NADP als enzymatischem Co-Faktor ein fluoreszierendes Produkt gebildet, so daß es zu einer starken Amplifikation des Ausgangssignals kommt.

4.1.1. HPLC-basierte Analytik von NAADP

NAADP kann, wie für andere Nucleotide beschrieben (Werner, 1993), durch RP-HPLC unter Verwendung einer C_{18} -Säule aufgetrennt und durch seine UV-Absorption nachgewiesen werden. Analytische HPLC in Verbindung mit UV-Detektion hat für Nucleotide und deren Derivate typischerweise ein Detektionslimit im Bereich von 5 – 10 pmol (Werner, 1993; da Silva et al., 1998a). Zur Quantifizierung zellulärer NAADP-Mengen bei einer angenommenen

Konzentration in unteren nanomolaren Bereich ist bei der Verwendung von maximal 10^9 T-Lymphocyten (entspricht einem Volumen von 1 l Zellsuspension) aber ein Detektionslimit von 200 fmol notwendig. Aus diesem Grund wurde versucht, die Empfindlichkeit der Detektion durch Einführung einer fluoreszierenden Gruppe in das NAADP-Molekül zu erhöhen. Durch HPLC in Verbindung mit Fluoreszenz-Detektion ist der Nachweis von fmol-Mengen von Nucleotiden und anderen Verbindungen möglich (Ohkura et al., 1994). Dabei wurde auf zwei Arten versucht, fluoreszierende NAADP-Derivate zu erzeugen: (i) Durch Derivatisierung von NAADP mit Naphthalen-dicarboxaldehyd (NDA), und (ii) durch Derivatisierung von NAADP mit Chloroacetaldehyd (CAA). Mit dem erstgenannten Reagenz konnten keine fluoreszierenden NAADP-Derivate erzeugt werden (Daten nicht dargestellt). Dagegen war es durch Umsetzung von NAADP mit CAA möglich, eine $1,N^6$ -Etheno- $(1,N^6\text{-}\epsilon)$ -Gruppe (eine Ethenbrücke zwischen den Positionen 1 und N^6 des Adenin-Ringsystems, siehe Abb. 4.3, Seite 48) in das Molekül einzufügen und durch die entstandene Fluoreszenz die Nachweisempfindlichkeit deutlich zu steigern.

4.1.1.1. Derivatisierung von NAADP mit Chloroacetaldehyd

Zuerst wurde untersucht, ob sich $1,N^6\text{-}\epsilon$ -Derivate grundsätzlich per RP-HPLC auftrennen und durch Fluoreszenz-Detektion nachweisen lassen.

Abb. 4.1 stellt die Auftrennung von $1,N^6\text{-}\epsilon$ -derivatisierten Adenin-haltigen Nucleosiden und Nucleotiden per RP-HPLC mit einer C_{18} -Säule in Gegenwart eines Ionenpaar-Reagenzes dar. Als Laufpuffer wurde eine Kalium-Phosphat-Lösung mit einem pH-Wert von 6.0 verwendet, und die Elution erfolgte durch einen ansteigenden Methanol-Gradienten (dargestellt

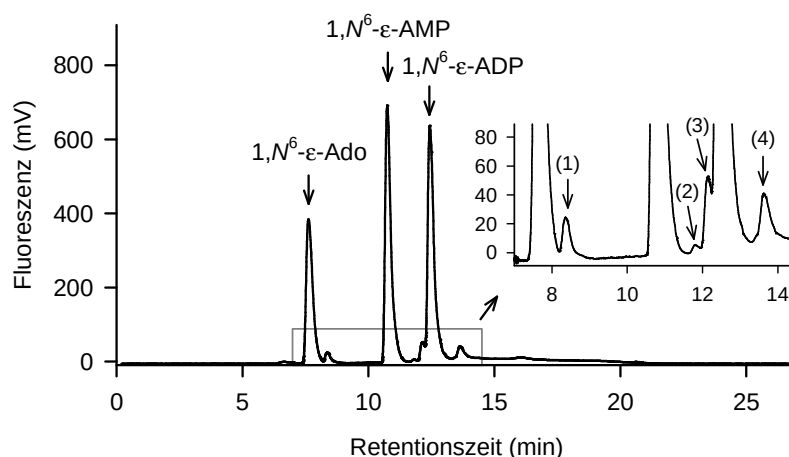


Abbildung 4.1: Auftrennung der $1,N^6\text{-}\epsilon$ -Derivate von Adenin-Nucleotiden und -Nucleosiden durch RP-HPLC. Jeweils 500 pmol $1,N^6\text{-}\epsilon$ -Adenosin ($1,N^6\text{-}\epsilon\text{-Ado}$), $1,N^6\text{-}\epsilon\text{-AMP}$, $1,N^6\text{-}\epsilon\text{-ADP}$, $1,N^6\text{-}\epsilon\text{-NAD}$ und $1,N^6\text{-}\epsilon\text{-NADP}$ wurden mittels RP-HPLC mit einer C_{18} -Säule (Multohyp BDS C18, $5\mu\text{m}$ Partikelgröße) mit dem Programm NAADP2.PGM aufgetrennt, wobei ein ansteigender Methanol-Gradient verwendet wurde (dargestellt Abb. 4.2). Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzmessung (Excitation 300 nm, Emission 410 nm). Bei den in der Vergrößerung dargestellten Peaks handelt es sich um (1) $1,N^6\text{-}\epsilon\text{-NAD}$, (2) $1,N^6\text{-}\epsilon\text{-ADPR}$, (3) $1,N^6\text{-}\epsilon\text{-NADP}$ und (4) $1,N^6\text{-}\epsilon\text{-2'}$ -Phospho-ADPR, die z. T. Verunreinigungen der verwendeten Standard-Substanzen darstellten.

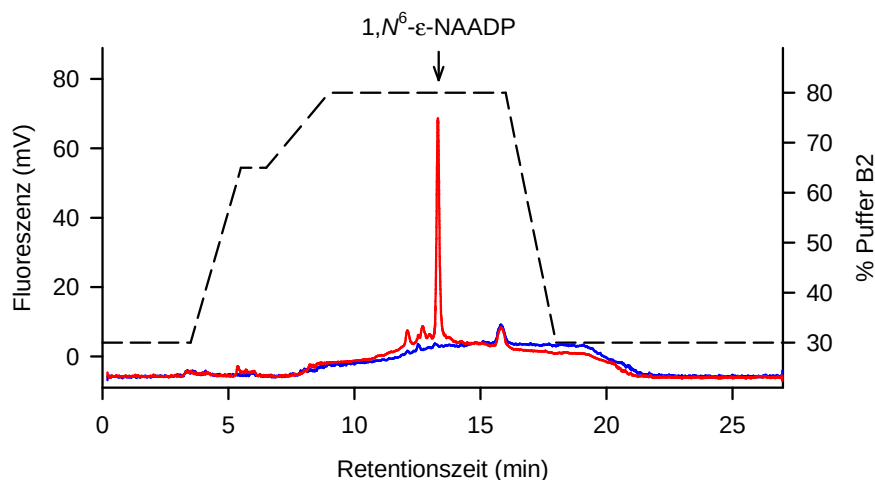


Abbildung 4.2: HPLC-Analyse von 1, N^6 - ϵ -NAADP. 1 nmol NAADP (rote Kurve) bzw. Wasser als Vehikel-Kontrolle (blaue Kurve) wurde mit Chloroacetaldehyd in Citrat-Phosphat-Puffer bei pH 4.0 und 80°C für 40 min in einem Volumen von 1 ml umgesetzt. Danach wurden jeweils 100 μ l des Reaktionsgemisches per RP-HPLC mit einer C_{18} -Säule (Multohyp BDS C18, 5 μ m Partikelgröße) mit dem Programm **NAADP2.PGM** aufgetrennt, wobei ein ansteigender Anteil an Puffer B2 verwendet wurde (gestrichelte Kurve). Die Detektion erfolgte durch Messung der Fluoreszenz (Excitation 300 nm, Emission 410 nm).

in Abb. 4.2). Aus dem in Abb. 4.1 abgebildeten Chromatogramm läßt sich erkennen, daß 1, N^6 - ϵ -Derivate mittels RP-HPLC trennbar waren, wobei die Fluoreszenz der Verbindungen zur Detektion verwendet werden konnte.

Nachdem festgestellt worden war, daß eine Auftrennung von 1, N^6 - ϵ -Derivaten mit dem in Abb. 4.1 dargestellten HPLC-System grundsätzlich möglich war, wurde untersucht, ob NAADP mit CAA unter den Bedingungen, die für die Derivatisierung anderer Adenin-haltiger Verbindungen beschrieben sind (Ohkura et al., 1994), zu einem fluoreszierenden Produkt reagiert. Abb. 4.2 zeigt, daß es bei der Inkubation von NAADP mit CAA bei einem sauren pH-Wert und bei einer Temperatur von 80°C zur Bildung eines fluoreszierenden Produktes kam, während bei einer Vehikelkontrolle ohne NAADP keine Fluoreszenz auftrat.

Bei der Inkubation von NAADP mit CAA hat daher offensichtlich die Reaktion stattgefunden, die in der Literatur (Ohkura et al., 1994) für die Derivatisierung von Adenin-Resten mit CAA beschrieben ist (siehe Abb. 4.3, Seite 48).

Bei der 1, N^6 - ϵ -Gruppe handelt es sich um ein relativ schwaches Fluorophor mit geringer Quantenausbeute (Leonard, 1993). Durch Derivatisierung von NAADP mit CAA ließen sich Mengen von 100 pmol (wie in Abb. 4.2 dargestellt) gut nachweisen, allerdings betrug das Detektionslimit unter diesen Bedingungen etwa 5 pmol, was für die Analytik zellulärer NAADP-Mengen nicht ausreichend war. Daher wurde nun die Empfindlichkeitseinstellung des Fluoreszenz-Detektors erhöht. Dabei kam es zu einem störenden Einfluß des Methanol-Gradientes, vermutlich durch Verunreinigungen im verwendeten Methanol. Um dieses Problem zu umgehen, wurde im folgenden versucht, ein HPLC-Programm mit isokratischer Elution, d. h. mit konstantem Methanol-Gehalt zu entwickeln. Desweiteren wur-

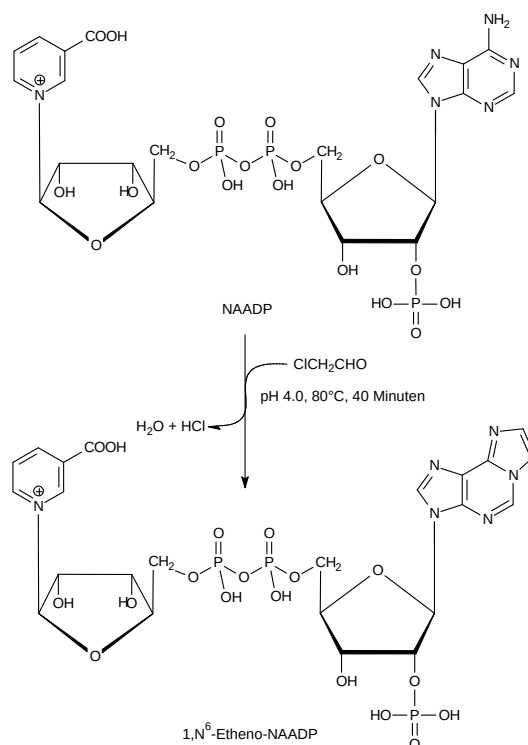


Abbildung 4.3: Reaktion von NAADP mit Chloroacetaldehyd zu 1, N⁶-ε-NAADP. Wie für andere Verbindungen mit Adenin-Resten beschrieben ([Ohkura et al., 1994](#)), entsteht durch Umsetzung von NAADP mit Chloroacetaldehyd bei saurem pH-Wert und hoher Temperatur 1, N⁶-ε-NAADP, das sich aufgrund seiner Fluoreszenz detektieren lässt.

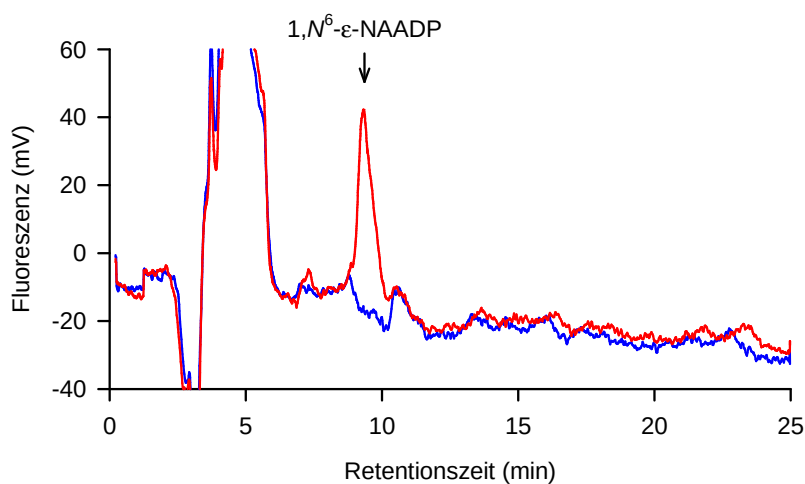


Abbildung 4.4: HPLC-Analyse von 1, N⁶-ε-NAADP unter isokratischen Bedingungen. 10 pmol NAADP (rote Kurve) bzw. Wasser als Vehikel-Kontrolle (blaue Kurve) wurden mit Chloroacetaldehyd in Citrat-Phosphat-Puffer bei pH 4.0 und 80°C für 40 min in einem Volumen von 1 ml umgesetzt. Danach wurden jeweils 100 µl des Reaktionsgemisches per RP-HPLC mit einer C₁₈-Säule (Multohyp BDS C18, 5 µm Partikelgröße) mit dem Programm **NAADP12.PGM** aufgetrennt, wobei ein konstantes Gemisch von 48% Puffer A1 und 52% Puffer B1 verwendet wurde. Die Detektion erfolgte durch Messung der Fluoreszenz (Excitation 271 nm, Emission 404 nm).

den die Wellenlängen für die Detektion der 1, N^6 - ϵ -Derivate durch Messungen mit einem Fluoreszenz-Photometer in den für die HPLC verwendeten Puffern optimiert. Um eine Elution des 1, N^6 - ϵ -NAADP sicherzustellen, wurde bei dem isokratischen HPLC-Programm **NAADP12.PGM** die Konzentration des Ionenpaar-Reagenzes TBAHP von 5 mM auf 2 mM reduziert. In Abb. 4.4 auf Seite 48 ist dargestellt, daß es unter diesen Bedingungen möglich war, NAADP-Mengen von 10 pmol mit CAA zu derivatisieren und 1 pmol aus diesen Ansätzen nachzuweisen.

4.1.1.2. Optimierung der Derivatisierungsbedingungen

Um die Empfindlichkeit des Nachweises von NAADP durch Umsetzung mit CAA weiter zu erhöhen, wurden die Reaktionsbedingungen für die Derivatisierungsreaktion optimiert, und zwar in der Reihenfolge pH-Wert, Temperatur und Dauer. Außerdem wurden zusätzlich zu der bisher verwendeten Puffer-Lösung aus Citrat und Natrium-Phosphat andere Puffer-Systeme (z. B. Natriumacetat) getestet, die sich aber als schlechter geeignet herausstellten.

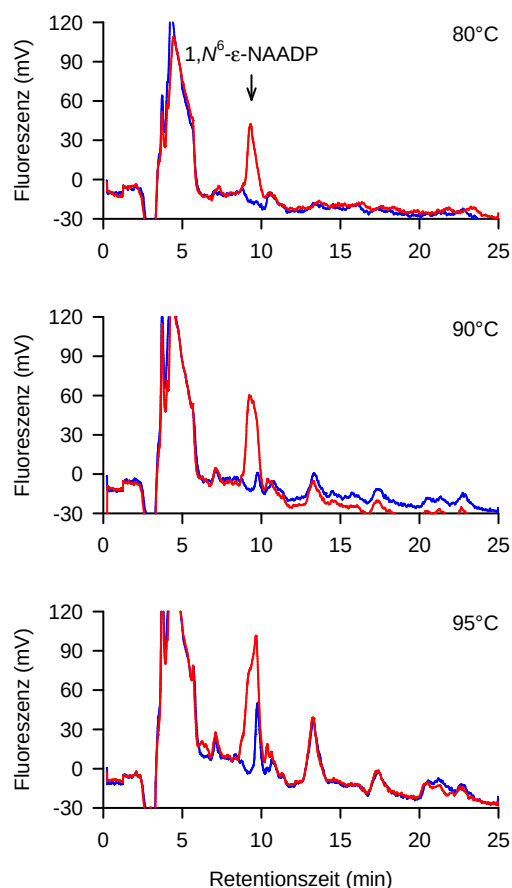


Abbildung 4.5: Temperatur-Optimierung der Derivatisierungsreaktion von NAADP mit Chloroacetaldehyd. 100 pmol NAADP wurden mit 10 μ l 45%iger CAA-Lösung in einem Reaktionsvolumen von 1 ml bei den angegebenen Temperaturen und einem pH-Wert von 4.0 für 40 min inkubiert. Jeweils 100 μ l der Reaktionsansätze wurden wie in der Legende zu Abb. 4.4 beschrieben durch RP-HPLC unter isokratischen Bedingungen aufgetrennt. Die roten Chromatogramme stellen die Reaktionen mit NAADP dar, die Vehikel-Kontrollen ohne NAADP sind blau dargestellt.

In Abb. 4.5 auf Seite 49 ist exemplarisch die Optimierung der Temperatur der Derivatisierungsreaktion dargestellt. Dabei wurde deutlich, daß es bei Erhöhung der Temperatur zu einer besseren Ausbeute der Reaktion kam (die Menge an 1, N^6 - ϵ -NAADP stieg an), daß aber andererseits auch vermehrt unspezifische Nebenprodukte entstanden (siehe Peaks mit Retentionszeiten von 13, 17.5 und 22 Minuten in Abb. 4.5).

Eine Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde nacheinander für die drei Parameter pH-Wert, Temperatur und Dauer durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 4.6 dargestellt. Als optimal wurde ein pH-Wert von 4.0, eine Temperatur von 90°C und eine Reaktionsdauer von 20 min gefunden, weil unter diesen Bedingungen einerseits die Ausbeute an gebildetem 1, N^6 - ϵ -NAADP befriedigend war, andererseits aber nur eine geringe Bildung unspezifischer Nebenprodukte stattfand.

Nach der Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Umsetzung von NAADP mit CAA wurde eine Kalibrierung durchgeführt, um das Detektionslimit dieser Nachweismethode für NAADP zu bestimmen. Dazu wurden unterschiedliche NAADP-Stoffmengen mit CAA umgesetzt, per isokratischer RP-HPLC (Programm **NAADP12.PGM**) mit Fluoreszenz-Messung detektiert, und die Flächen der 1, N^6 - ϵ -NAADP-Peaks quantifiziert.

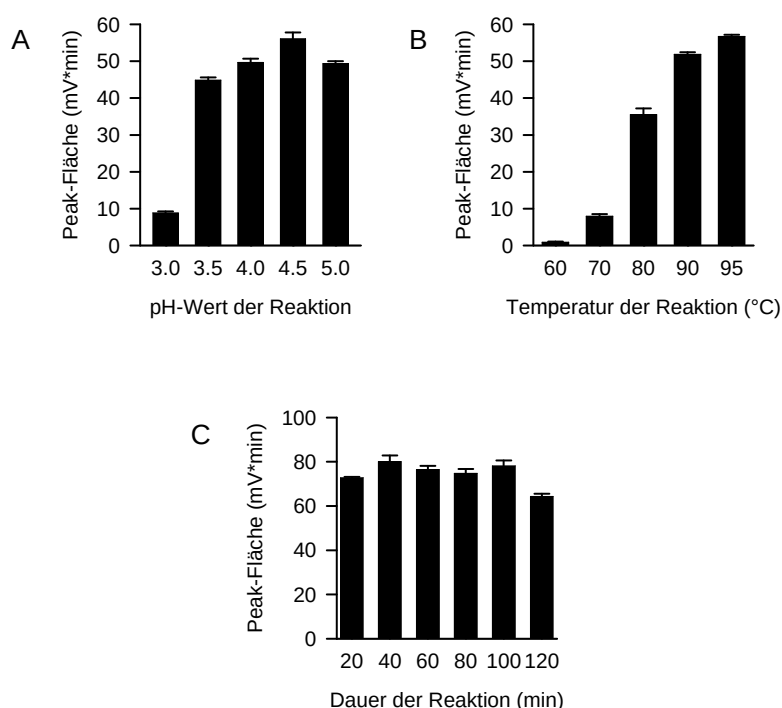


Abbildung 4.6: Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Derivatisierung von NAADP mit Chloroacetaldehyd. 100 pmol NAADP wurden mit 10 μ l 45%iger CAA-Lösung in einem Reaktionsvolumen von 1 ml umgesetzt. Nach Ende der Reaktion wurden 100 μ l der Ansätze per RP-HPLC unter isokratischen Bedingungen mit dem Programm **NAADP12.PGM** wie in Abb. 4.4 dargestellt aufgetrennt und die Flächen der 1, N^6 - ϵ -NAADP-Peaks durch Integration bestimmt ($n = 3$, Mittelwerte $\pm$ SEM). (A) Die Ansätze wurden bei unterschiedlichen pH-Werten für 40 min bei 80°C inkubiert. (B) Die Ansätze wurden bei unterschiedlichen Temperaturen für 40 min bei einem pH-Wert von 4.0 inkubiert. (C) Die Ansätze wurden für unterschiedlich lange Zeiten bei einem pH-Wert von 4.0 und 90°C inkubiert.

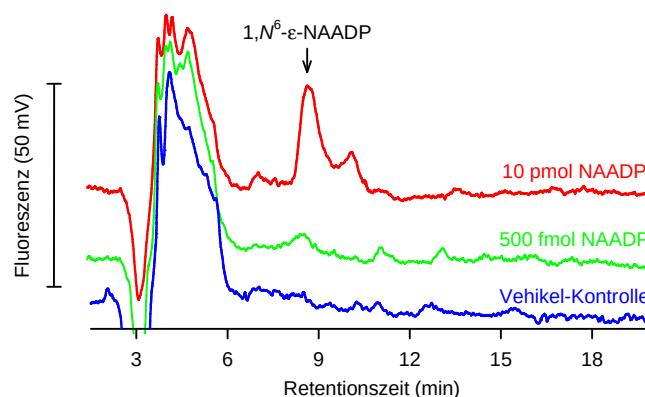


Abbildung 4.7: HPLC-Analysen zur Kalibrierung der NAADP-Derivatisierung mit Chloroacetaldehyd. Unterschiedliche Mengen NAADP wurden mit CAA nach den optimierten Derivatisierungsbedingungen in einem Volumen von 1 ml umgesetzt. 100 μ l der Reaktionsansätze wurden wie in der Legende zu Abb. 4.4 angegeben unter isokratischen Bedingungen per RP-HPLC aufgetrennt. Die angegebenen NAADP-Mengen beziehen sich auf 100 μ l Lösung aus den Derivatisierungsansätzen.

In Abb. 4.7 sind beispielhaft HPLC-Chromatogramme dargestellt, die bei Derivatisierung unterschiedlicher NAADP-Mengen mit CAA unter den optimierten Reaktionsbedingungen erhalten wurden. Es ist erkennbar, daß noch bei NAADP-Mengen von 500 fmol (grüne Kurve) ein Peak von 1,N⁶-ε-NAADP entstand, der in der Vehikelkontrolle (blaue Kurve) nicht vorhanden war.

Wie in Abb. 4.8 dargestellt ist, ergab sich eine lineare Beziehung zwischen der eingesetzten NAADP-Menge und der ermittelten Fläche der 1,N⁶-ε-NAADP-Peaks. Bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von ≥ 3 betrug das Detektionslimit 500 fmol.

Der Ansatz, zelluläre NAADP-Mengen durch Fluoreszenzderivatisierung und Analyse der Derivate durch RP-HPLC zu quantifizieren, wurde an dieser Stelle der Versuche beendet, weil keine ausreichende Empfindlichkeit zur Quantifizierung endogener NAADP-Mengen erreicht werden konnte.

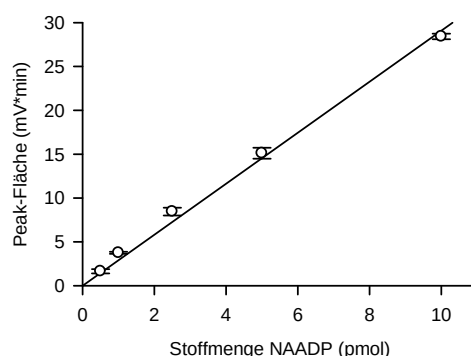


Abbildung 4.8: Kalibrierung der NAADP-Derivatisierung mit Chloroacetaldehyd. Unterschiedliche Mengen NAADP wurden mit CAA nach den optimierten Derivatisierungsbedingungen umgesetzt, wie in Abb. 4.7 dargestellt analysiert und die Flächen der 1,N⁶-ε-NAADP-Peaks integriert. Durch lineare Regressionsanalyse wurde eine Korrelation ($n = 3$, Mittelwerte $\pm$ SD, $R^2 = 0.9949$) zwischen der eingesetzten NAADP-Menge (in 100 μ l des Reaktionsansatzes enthalten) und der Peak-Fläche festgestellt.

4.1.2. Entwicklung eines gekoppelten Enzym-Assays zur Quantifizierung geringer NAADP-Mengen

Wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, genügte die durch Fluoreszenz-Derivatisierung erreichbare Empfindlichkeit offensichtlich nicht, um damit eine Quantifizierung zellulärer NAADP-Mengen bei Einsatz vertretbarer Zellmengen (d. h. maximal 10^9 T-Lymphocyten) durchzuführen. Daher wurde ein Enzym-Assay zum Nachweis von NAADP etabliert, bei dem es zur Bildung eines fluoreszierenden Produktes aus einem nicht fluoreszierenden Substrat in Abhängigkeit von der eingesetzten NAADP-Menge kam. Solche Assays wurden bereits in einfacherer Form zur Quantifizierung von NAD (Kato et al., 1973) sowie NADP (Stephon et al., 1992) beschrieben.

4.1.2.1. Prinzip des NAADP-Assays

Der zur Quantifizierung von NAADP entwickelte Assay besteht aus drei Teilreaktionen. Ein Schema der Reaktionen und der beteiligten Enzyme ist in Abb. 4.9 dargestellt.

Bei der ersten Reaktion wird NAADP durch die ADP-Ribosylcyclase aus *Aplysia californica* in Gegenwart eines hohen Überschusses an Nicotinamid und bei einem sauren pH-Wert zu NADP umgesetzt. Bei dieser Reaktion handelt es sich um die Umkehrung der enzymatischen Bildung von NAADP aus NADP (Aarhus et al., 1995). Das in dieser Reaktion gebildete

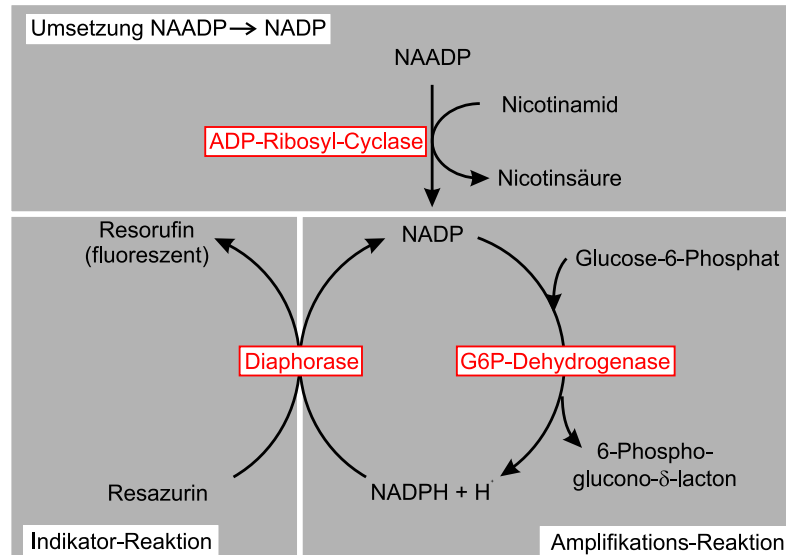


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung des Enzym-Assays zur Messung von NAADP.

In der ersten Reaktion des Assays (oberer Abschnitt) wird NAADP durch eine ADP-Ribosylcyclase aus *Aplysia californica* in Gegenwart eines hohen Überschusses an Nicotinamid zu NADP umgesetzt. Dieses durchläuft eine enzymatische Amplifikations-Reaktion, bei der das gebildete NADP zu NADPH reduziert und anschließend wieder zu NADP re-oxidiert wird (rechter Abschnitt). Unter Verbrauch von Glucose-6-Phosphat wird bei der Re-Oxidation von NADPH zu NADP in der Indikator-Reaktion (linker Abschnitt) der Farbstoff Resazurin zu Resorufin umgesetzt, dessen Fluoreszenz quantifiziert wird. Es kommt zu einer starken Amplifikation des Signals, weil ein Molekül NADP durch mehrfaches Durchlaufen des Kreislaufs viele Moleküle Resorufin erzeugen kann. Die drei beteiligten Enzyme sind in rot dargestellt.

NADP durchläuft danach einen enzymatischen Zyklus aus zwei Reaktionen (Amplifikations-Zyklus). In der ersten Reaktion wird NADP zu NADPH reduziert, wobei das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) Glucose-6-Phosphat zu 6-Phospho-glucono- δ -lacton oxidiert. Das dabei gebildete NADPH wird anschließend enzymatisch durch Diaphorase zu NADP re-oxidiert, wobei das Enzym gleichzeitig die Indikator-Reaktion katalysiert, bei der das nicht fluoreszierende Substrat Resazurin zum fluoreszierenden Farbstoff Resorufin reduziert wird. Durch den enzymatischen Kreislauf unter Regeneration von NADP kann ein Molekül NADP die Bildung vieler Moleküle Resorufin auslösen, so daß es zu einer starken Verstärkung des ursprünglichen Signals kommt.

Die Entwicklung des beschriebenen Assays gliederte sich in mehrere Schritte: Zuerst wurde die Amplifikations-Reaktion etabliert, wobei besonders die Reinheit der verwendeten Enzyme für einen geringen unspezifischen Hintergrund der Amplifikations-Reaktion entscheidend war. Danach wurde geprüft, ob sich die enzymatische Bildung von NAADP aus NADP durch die ADP-Ribosylcyclase unter geeigneten Reaktionsbedingungen umkehren läßt. Schließlich wurde eine Methode zur Extraktion und Reinigung von Nucleotiden aus Zellen entwickelt, und mit einer enzymatischen Behandlung zur Entfernung von endogenem NADP aus den Zellextrakten kombiniert.

4.1.2.2. Etablierung der Amplifikations- und Indikator-Reaktion

Zur Etablierung der Indikator- und der Amplifikationsreaktionen wurde ein Versuchsansatz verwendet, in dem außer den beiden Enzymen G6P-DH und Diaphorase Nicotinamid, Flavin-Mononucleotid, Glucose-6-Phosphat und BSA in Phosphatpuffer bei einem pH -Wert von 8.0 enthalten waren.

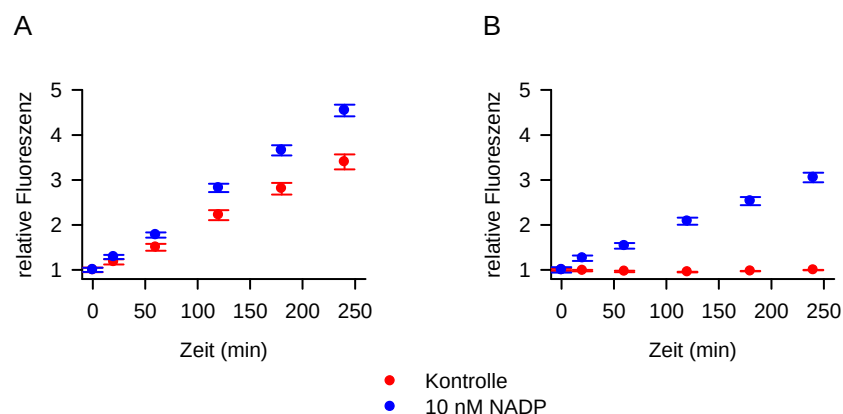


Abbildung 4.10: Anstieg der Fluoreszenz bei der Amplifikationsreaktion in Gegenwart von NADP. Reaktionsansätze der Amplifikationsreaktion wurden in Gegenwart von 10 nM NADP (blaue Symbole) oder in Abwesenheit von NADP (rote Symbole) bei 23°C inkubiert, und die Fluoreszenz (Excitation 544 nm, Emission 590 nm) zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. Dabei wurden entweder (A) nicht vorgereinigte Enzyme verwendet, oder (B) Enzyme nach Reinigung mit aktivierter Aktivkohle. Die Fluoreszenzwerte wurden jeweils auf die am Anfang gemessenen Werte normiert ($n = 3$, Mittelwerte $\pm$ SD). Man beachte, daß es bei Verwendung der nicht gereinigten Enzyme (A) auch in Abwesenheit von NADP zu einem deutlichen Anstieg in der Fluoreszenz kam, während bei Verwendung der gereinigten Enzyme keine Fluoreszenz-Zunahme in der Kontrolle auftrat.

In Abb. 4.10 auf Seite 53 sind zwei Versuche dargestellt, bei denen die Entwicklung der Fluoreszenz über die Zeit verfolgt wurde. Daraus ist ersichtlich, daß bei der Verwendung käuflicher Enzym-Präparationen, die vor dem Versuch nicht weiter gereinigt wurden, ein deutlicher Anstieg in der Fluoreszenz-Intensität auch in der Vehikel-Kontrolle in Abwesenheit von NADP auftrat (Abb. 4.10 A, rote Symbole). Deswegen wurden die Enzyme durch Behandlung mit aktivierter Aktivkohle in Gegenwart von BSA vorgereinigt, um so Kontaminationen in den Enzym-Lösungen zu entfernen, und der gleiche Versuch dann erneut durchgeführt (Abb. 4.10 B). Es ist ersichtlich, daß nach dieser Enzym-Reinigung in der Kontrolle ohne NADP kein Hintergrund-Anstieg mehr in der Fluoreszenz auftrat.

4.1.2.3. Umsetzung von NAADP zu NADP

Die Möglichkeit zur Umsetzung von NAADP zu NADP ist essentiell zur Etablierung eines Assays, der NAADP als NADP durch eine zyklische Enzym-Reaktion nachweisen soll. Es ist bekannt, daß die ADP-Ribosylcyclase aus *Aplysia californica* eine Basenaustauschreaktion katalysiert, bei der NADP bei niedrigem pH-Wert und in Gegenwart hoher Konzentrationen an Nicotinsäure zu NAADP umgesetzt wird (Aarhus et al., 1995). Ziel dieser Versuche war es zu testen, ob sich die bekannte enzymatische Reaktion der ADP-Ribosylcyclase unter geeigneten Reaktionsbedingungen umkehren läßt.

Dabei wurde NAADP mit einer hohen Konzentration Nicotinamid in Gegenwart der ADP-Ribosylcyclase in Natriumacetat-Puffer (pH-Wert 4.5) bei unterschiedlichen Temperaturen (10°C und Raumtemperatur) inkubiert. Alle 30 Minuten wurden Aliquots der Reaktionen entnommen, das Protein durch Aceton-Fällung entfernt, die Überstände per RP-HPLC aufgetrennt und die Menge an nicht umgesetztem NAADP quantifiziert. Hierbei ergab sich, daß es bei Raumtemperatur zu einer zeitabhängigen Umwandlung von NAADP zu NADP kam, während bei 10°C keine Verminderung der NAADP-Menge auftrat. Bei der Reaktion entstand außer NADP als Hauptprodukt auch eine kleine Menge eines Nebenproduktes, bei dem es sich vermutlich um 2'-Phospho-ADPR handelte (nicht dargestellt).

Nachdem durch diese Versuche gezeigt werden konnte, daß die ADP-Ribosylcyclase prinzipiell die Umsetzung von NAADP zu NADP katalysieren kann, wurde diese Reaktion mit dem zuvor etablierten Amplifikationszyklus gekoppelt. Dabei war es notwendig, die Reaktionsbedingungen der Umsetzung von NAADP zu NADP erneut umfangreich zu optimieren, wobei unter anderem verschiedene Puffer (MES, MOPS, PIPES, Tris/HCl und Natriumphosphat bei unterschiedlichen pH-Werten) getestet wurden. Außerdem wurden die Nicotinamid-Konzentration, die Menge an eingesetzter ADP-Ribosylcyclase, die Temperatur und die Inkubationsdauer optimiert (Daten nicht dargestellt). Bei diesen Versuchen wurden folgende Bedingungen als optimal für die Umsetzung von NAADP zu NADP gefunden: Zu den Proben mit einem Volumen von 200 µl wurden 11 µl einer Lösung mit 0.55 M Nicotinamid, 36 mM Natriumacetat, pH 4.2 und 9.1 µg/ml ADP-Ribosylcyclase gegeben, und die Ansätze für 60 min bei 23°C inkubiert.

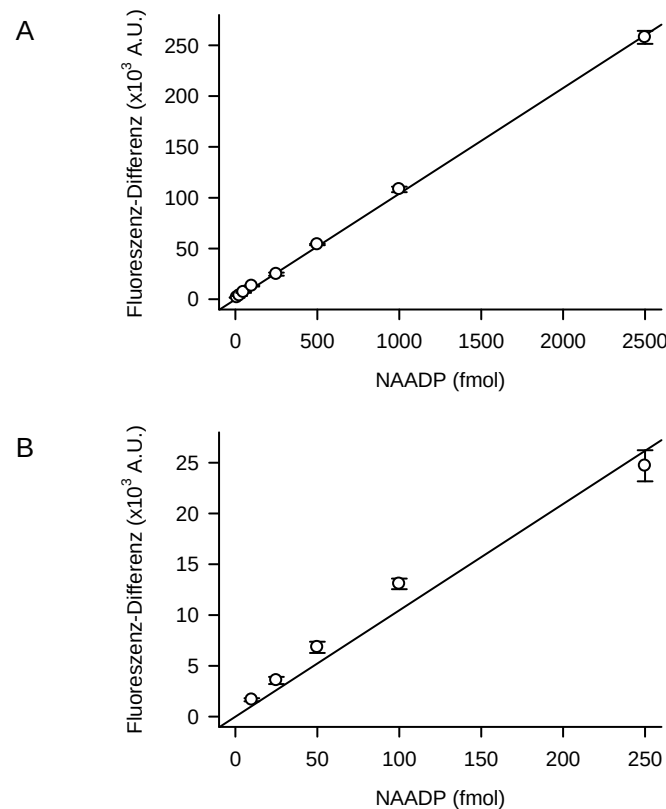


Abbildung 4.11: Kalibrierung des NAADP-Assays. Unterschiedliche Mengen NAADP (Angaben pro Vertiefung in einer Mikrotiterplatte) wurden mit dem enzymatischen NAADP-Assay analysiert. Die Reaktionsansätze wurden für 12 Stunden bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert, und die Differenz in der Fluoreszenz (Excitation 544 nm, Emission 590 nm) zwischen Ende und Start der Reaktion berechnet. Eine Regressionsanalyse zeigte eine lineare Korrelation zwischen der eingesetzten NAADP-Menge und der Fluoreszenz-Differenz ($n = 3$, Mittelwerte $\pm$ SD, $R^2 = 0.9993$). (A) Darstellung aller gemessenen Werte im Bereich von 10 fmol bis 2.5 pmol NAADP. (B) Vergrößerung der Werte im Bereich ≤ 250 fmol NAADP. Die abgebildeten Regressions-Geraden in (A) und (B) stimmen überein.

Nach Abschluß der Optimierung wurde eine Kalibrierung des enzymatischen Assays mit NAADP-Standards durchgeführt, die in Abb. 4.11 dargestellt ist. Dabei ergab sich eine lineare Korrelation zwischen der eingesetzten NAADP-Menge und der Zunahme der Fluoreszenz innerhalb von 12 Stunden nach dem Start der Amplifikationsreaktion. Das Detektionslimit betrug 25 fmol NAADP bei einem Signal/Rausch-Verhältnis ≥ 3 .

4.1.2.4. Enzymatischer Abbau von NADP durch eine NAD-Glycohydrolase aus *Neurospora crassa*

Um mit dem entwickelten enzymatischen Assay zelluläre NAADP-Konzentrationen quantifizieren zu können, ist es entscheidend, daß in den dazu verwendeten Proben kein NADP enthalten ist. Dieses würde durch den Assay auch detektiert werden und so die ermittelte Menge an NAADP fälschlicherweise erhöhen. Zur Entfernung von endogenem NADP wur-

de deshalb ein Verfahren entwickelt, bei dem eine aus dem Pilz *Neurospora crassa* isolierte NAD-Glycohydrolase (NADase) verwendet wurde. Diese ist nicht nur fähig, NAD zu ADPR und Nicotinamid zu hydrolysieren, sondern kann auch verwendet werden, um NADP zu 2'-Phospho-ADPR und Nicotinamid zu spalten (Abb. 4.12).

Die Gleichgewichtskonstante der in Abb. 4.12 dargestellten Reaktion ist nicht bekannt. Im ungünstigsten Fall war daher davon auszugehen, daß sich auch durch den enzymatischen Verdau NADP nicht vollständig aus dem Probenmaterial entfernen läßt. Deswegen wurde folgendes Verfahren angewendet, um die ermittelten Fluoreszenzwerte um diesen NADP-Hintergrund zu korrigieren: Alle Proben wurden nach dem oben beschriebenen NADase-Verdau entweder (i) *mit* ADP-Ribosylcyclase inkubiert, um so die Umwandlung von NAADP in NADP durchzuführen, oder (ii) in der gleichen Reaktionslösung aber *ohne* das Enzym. Anschließend wurde die enzymatische Amplifikationsreaktion ausgeführt und die Fluoreszenz in beiden Ansätze bestimmt (diese Messungen wurden immer als Triplikat-Messungen

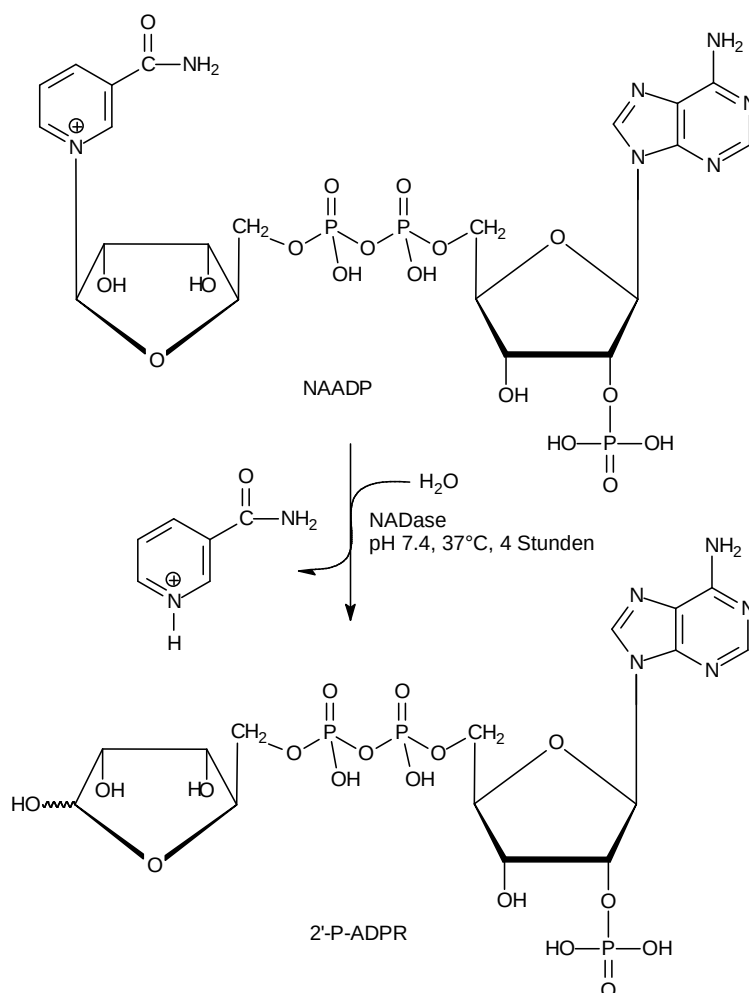


Abbildung 4.12: Abbau von NADP durch eine NAD-Glycohydrolase aus *Neurospora crassa*. Die N-glycosidische Bindung zwischen der Nicotinamid-Gruppe und der Ribose wird enzymatisch hydrolysiert, wobei unter Abspaltung von Nicotinamid 2'-Phospho-ADP-Ribose (2'-P-ADPR) entsteht.

durchgeführt). In Abwesenheit der ADP-Ribosylcyclase kann NAADP nicht zu NADP umgewandelt werden und somit auch kein Signal in der Amplifikations-Reaktion erzeugen. In diesen Ansätze wurde stattdessen die Menge an kontaminierendem NADP in der Probe gemessen. Daher wurde die Differenz in der Fluoreszenz (zwischen Ende der Reaktion nach 12 Stunden und dem Beginn der Reaktion) in den Ansätzen *mit* der ADP-Ribosylcyclase in der ersten Reaktion um die Fluoreszenz-Differenz der Ansätze *ohne* Enzym in der ersten Reaktion korrigiert. Auf diese Weise war es möglich, die spezifisch durch NAADP ausgelöste Erhöhung der Fluoreszenz vom Hintergrund durch NADP zu unterscheiden.

Ein Problem bei der Verwendung der NADase zur Entfernung des NADP-Hintergrundes bestand darin, daß das Enzym möglicherweise auch NAADP hätte verdauen können, was in dem Verlust eines Teils oder sogar des gesamten Fluoreszenz-Signals resultiert hätte. Um dies zu testen, wurde eine Kalibrierung des NAADP-Assays mit vorgeschaltetem NADase-Verdau mit NAADP-Standards durchgeführt. Dazu wurden NAADP-Mengen von 0 bis 500 fmol in An- und Abwesenheit der NADase in dem zum Verdau verwendeten Puffer inkubiert und danach mit allen Proben eine Hitzebehandlung zur Inaktivierung des Enzyms durchgeführt. Anschließend wurden die NAADP-Mengen mit dem Enzym-Assay quantifiziert. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 4.13 dargestellt. Dabei wurde gefunden, daß es zum Verlust eines Teils des Fluoreszenz-Signals kam (ca. 37%, bezogen auf den Endwert in Abb. 4.13), die Linearität der Kalibrierung aber trotzdem erhalten blieb. Daraus folgt, daß durch den NADase-Verdau NAADP nur in einem geringen Ausmaß abgebaut wird. Möglicherweise ist die Verminderung des Fluoreszenz-Signals auch darauf zurückzuführen, daß es bei der Inaktivierung der NADase durch die Hitzebehandlung zu einer Co-Präzipitation von NAADP mit dem denaturierten Enzym kam.

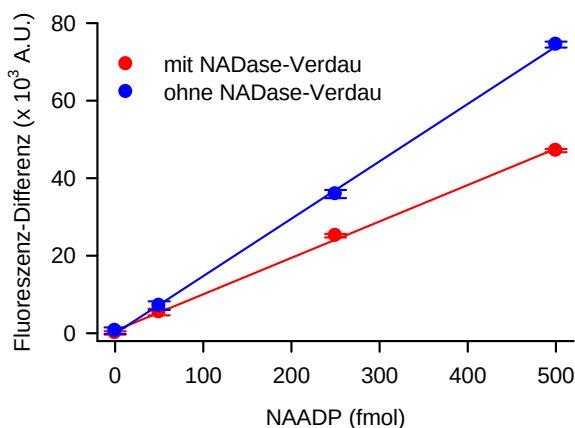


Abbildung 4.13: Kalibrierung des NAADP-Assays mit und ohne NADase-Verdau im Vergleich. Unterschiedliche NAADP-Mengen von 0 bis 500 fmol wurden in Gegenwart von NADase (rote Symbole) für 4 Stunden bei 37°C oder unter gleichen Bedingungen ohne Enzym (blaue Symbole) inkubiert; alle Proben wurden danach für 30 min auf 95°C erhitzt und anschließend für einen NAADP-Assay verwendet ($n = 3$, Mittelwerte $\pm$ SD). Unter beiden Bedingungen bestand eine lineare Korrelation ($R^2 = 0.9988$ für die rote Kurve und $R^2 = 0.9994$ für die blaue Kurve) zwischen eingesetzter NAADP-Menge und gemessener Fluoreszenz-Differenz.

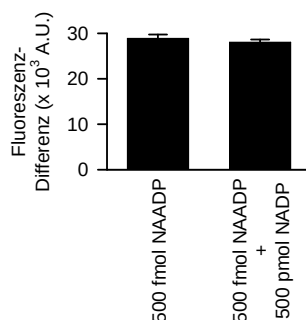


Abbildung 4.14: NAADP-Assay in Gegenwart eines 1000fachen NADP-Überschusses. 500 fmol NAADP oder eine Mischung aus 500 fmol NAADP und 500 pmol NADP wurden mit NADase wie in der Legende zu Abb. 4.13 beschrieben verdaut und anschließend mit dem NAADP-Assay quantifiziert ($n = 3$, Mittelwerte $\pm$ SD). Dabei wurden wie in Abschnitt 4.1.2.4 beschrieben die Werte mit ADP-Ribosylcyclase in der Umwandlungsreaktion von NAADP zu NADP um die Werte ohne ADP-Ribosylcyclase korrigiert.

Um die Effektivität des NADase-Verdaus zu testen, wurden Proben verwendet, die 500 fmol NAADP und 500 pmol NADP enthielten, d. h. einen 1000fachen Überschuß an NADP gegenüber NAADP. Diese Proben wurden mit der NADase verdaut und anschließend die NAADP-Mengen mit dem Enzym-Assay quantifiziert (Abb. 4.14).

Es kam dabei zu keiner Erhöhung des Fluoreszenz-Signals in den Proben mit NADP im Vergleich zu Kontrollwerten ohne NADP. Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, daß der NAADP-Assay bei Verwendung des NADase-Verdaus eine Quantifizierung von NAADP auch bei einem 1000fachen Überschuß an NADP ermöglicht. Ein möglicherweise auftretender geringer Rest an nicht abgebautem NADP stellte kein Problem dar, weil dieser Fehler durch die Korrektur der Werte mit ADP-Ribosylcyclase in der Umwandlungsreaktion von NAADP zu NADP um die Werte ohne ADP-Ribosylcyclase in dieser Reaktion ausgeglichen werden konnte.

4.1.2.5. Untersuchungen zum Einfluß anderer Substanzen auf den Enzym-Assay

Um eine eventuelle Störung des Enzym-Assays durch andere Substanzen zu testen, die bekanntermaßen in Zellen vorkommen, wurden ähnliche Versuche wie in Abschnitt 4.1.2.4 für NADP beschrieben durchgeführt.

Es wurden 19 Substanzen auf eine Interferenz mit dem NAADP-Assay getestet. Dazu wurden auch in diesem Fall 500 fmol NAADP mit einem 1000fachen Überschuß der zu testenden Substanz versetzt. Die Ansätze wurden mit NADase verdaut, gefolgt von der Basenaustausch- und den Amplifikationsreaktionen des NAADP-Assays. Anschließend wurden die NAADP-Mengen in den einzelnen Ansätzen quantifiziert und auf eine Kontrolle ohne Zusatz anderer Substanzen außer NAADP normiert (Abb. 4.15, Seite 59). Dabei wurde in keinem der Ansätze eine Veränderung des Fluoreszenz-Signals von mehr als 10% gegenüber der Kontrolle gefunden (Abb. 4.15). Deswegen kann man davon ausgehen, daß zumindest die

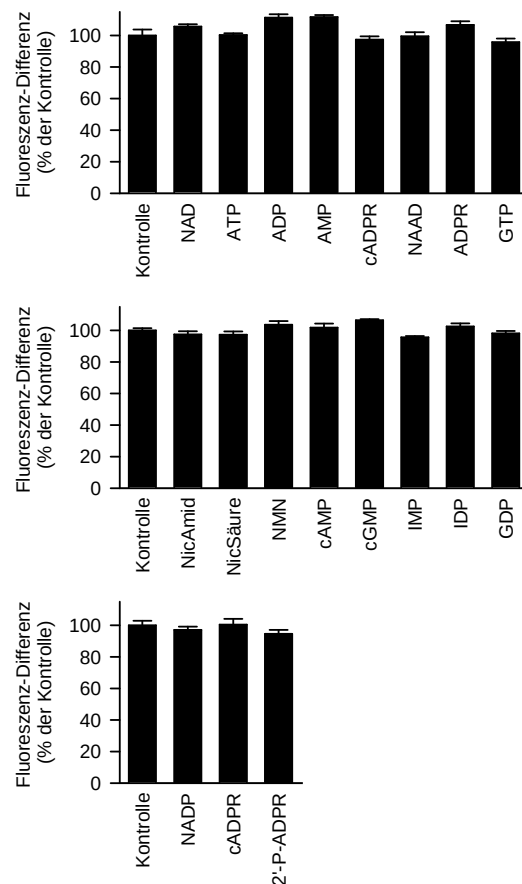


Abbildung 4.15: Test von diversen in der Zelle vorkommende Substanzen auf eine Interferenz mit dem enzymatischen NAADP-Assay. 19 bekannterweise in Zellen vorkommende Komponenten wurden auf eine Interferenz mit dem NAADP-Enzym-Assay getestet. Dazu wurden je 500 fmol NAADP mit einem 1000fachen Überschuß (500 pmol) der angegebenen Substanzen versetzt, mit NADase verdaut und anschließend per NAADP-Assay quantifiziert. Die gemessenen Fluoreszenz-Differenzen wurden auf Kontrollen normiert, die nur NAADP enthielten ($n = 3$, Mittelwerte $\pm$ SD). Keine der getesteten Substanzen veränderte bei einem 1000fachen Überschuß das NAADP-Signal um mehr als 10%. Abkürzungen: NAAD, Nicotinsäure-Adenindinucleotid; GTP, Guanosintriphosphat; NicAmid, Nicotinamid; NicSäure, Nicotinsäure; NMN, Nicotinamid-Mononucleotid; cAMP, 3',5'-zyklisches AMP; cGMP, 3',5'-zyklisches GMP; IMP, Inosinmonophosphat; IDP, Inosindiphosphat; GDP, Guanosintriphosphat; 2'-P-ADPR, 2'-Phospho-ADPR.

getesteten Substanzen den NAADP-Assay nicht derartig störten, daß es zu größeren Fehlen in der Quantifizierung von NAADP kam.

4.1.2.6. Extraktion von NAADP aus T-Lymphocyten

Zur Extraktion von NAADP aus T-Zellen wurde ein Verfahren entwickelt, das einen sauren Zellaufschluß verwendet (schematische Darstellung in Abb. 4.16, Seite 60). Dabei kommt es zu einer unmittelbaren Denaturierung der zellulären Proteine (Werner, 1993), so daß enzymatische Reaktionen sofort zum Stillstand kommen. Dies ist für die Quantifizierung von Botenstoffen entscheidend, weil sich ansonsten deren Konzentrationen während des Extrak-

tionsprozesses verändern könnten.

Zum Aufschluß der Zellen wurden diese in Trichloressigsäure in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator lysiert. Anschließend wurde der grobe Zelldebris abgetrennt und die Probe in zwei Hälften geteilt. Zu einer dieser Hälften wurde eine bekannte Menge NAADP zugesetzt, um später die Wiederfindung von NAADP während der Extraktionsprozedur berechnen zu können. Danach wurden die denaturierten Proteine pelletiert und der Überstand durch mehrmalige Extraktion mit Diethylether neutralisiert. Anschließend wurden die Proben verdünnt und durch Festphasenextraktion an einer stark sauren Anionenaustauscher-Matrix (Q-Sepharose) aufgereinigt. Die Elution der Matrix erfolgte durch Trifluoressigsäure-Lösungen steigender Konzentration. Die Eluate wurden anschließend verdünnt und durch Gefriertrocknung bis zur Trockne eingengt. Die Trocknungs-Rückstände wurden dann in dem Puffer für

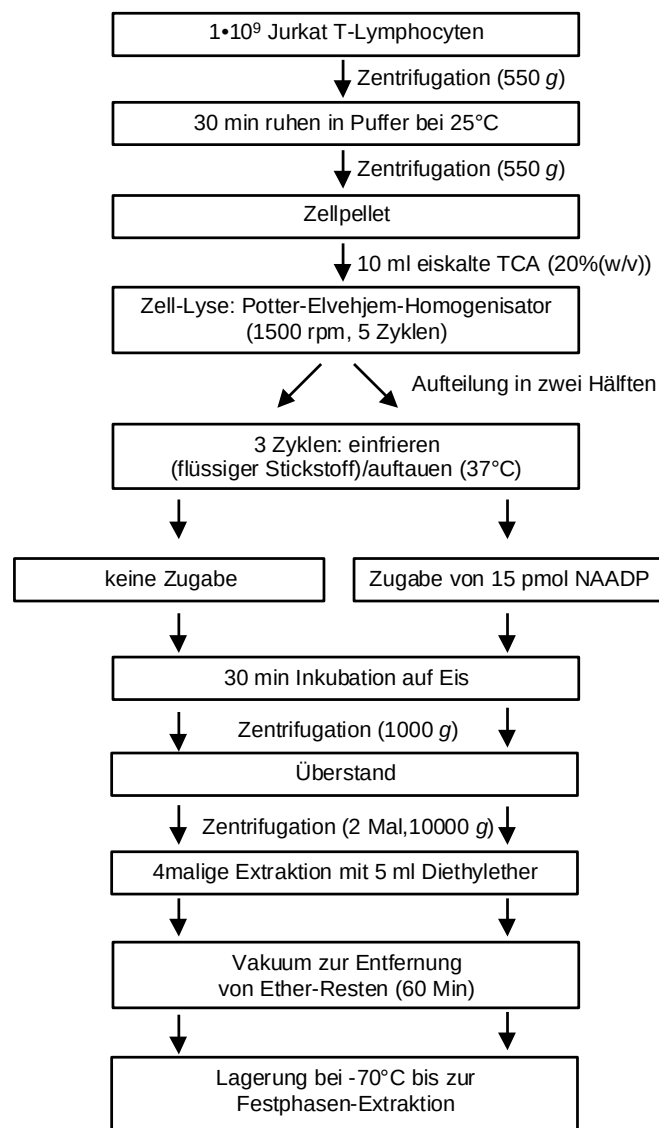


Abbildung 4.16: Schema des Protokolls zur Extraktion von endogenem NAADP aus Jurkat T-Lymphocyten.

den NADase-Verdau aufgenommen und für 4 Stunden mit NADase verdaut. Anschließend wurden die Basenaustausch- und Amplifikations-Reaktion des NAADP-Assays durchgeführt, um NAADP zu quantifizieren.

Mit dem entwickelten Extraktions-Protokoll wurden in Zusammenarbeit mit Dipl.-Biochem. Sören Bruhn NAADP-Konzentrationen in unstimulierten Jurkat-T-Zellen quantifiziert (Bruhn, 2005), wobei im Rahmen dieser Versuche fünf Bestimmungen basaler NAADP-Konzentrationen durchgeführt wurden. Die im Assay gemessenen NAADP-Mengen beliefen sich auf etwa 500 fmol pro Vertiefung in der Mikrotiterplatte. Unter Verwendung des mittleren Zellvolumens wurden intrazelluläre NAADP-Konzentrationen berechnet, wobei eine gleichmäßige Verteilung von NAADP innerhalb der Zelle angenommen wurde. Außerdem wurden feste Strukturen nicht berücksichtigt, die das Verteilungsvolumen für NAADP reduzieren würden. Unter diesen Annahmen ergab sich eine mittlere intrazelluläre NAADP-Konzentration von 6.6 ± 1.6 nM ($n = 4$, Mittelwert $\pm$ SEM) in nicht stimulierten Jurkat-T-Lymphocyten. Bei diesen Messungen betrug die mittlere Wiederfindung für NAADP $52 \pm 6\%$ ($n = 4$, Mittelwert $\pm$ SEM).

4.2. Untersuchungen zur Funktion des Ionenkanals TRPM2 und seines Agonisten ADPR bei der Erzeugung von Calcium-Signalen in T-Lymphocyten

An der Erzeugung zellulärer Ca^{2+} -Signale sind außer den gut charakterisierten sekundären Botenstoffen InsP_3 (Streb et al., 1983) und cADPR (Lee et al., 1989) möglicherweise noch weitere Nucleotid-Derivate beteiligt wie das in Abschnitt 4.1 untersuchte NAADP und das NAD-Derivat ADPR. Der Ionenkanal TRPM2 kann in Patch Clamp-Experimenten durch Infusion einer Lösung von ADPR in die Zelle aktiviert werden (Perraud et al., 2001; Sano et al., 2001; Hara et al., 2002), und ist unter anderem für Ca^{2+} -Ionen permeabel (siehe Abschnitt 1.4.2). Über eine Funktion von TRPM2 bei der Erzeugung zellulärer Ca^{2+} -Signale ist allerdings nur wenig bekannt (Perraud et al., 2004). Eine entscheidende Frage besteht darin, ob es zu einer Aktivierung von TRPM2 durch endogenes ADPR kommen kann. Bisher war außer in Erythrocyten (Guida et al., 1992) kein Verfahren verfügbar, um intrazelluläre ADPR-Konzentrationen zu bestimmen. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, ein HPLC-basiertes Verfahren zu etablieren, mit dem intrazelluläre ADPR-Mengen quantifizierbar sind.

4.2.1. Bestimmung intrazellulärer ADPR-Konzentrationen durch HPLC

HPLC unter Reversed-Phase-Bedingungen, d. h. Trennung an einer hydrophoben Festphase in Gegenwart eines Ionenpaar-Reagenzes, wird häufig zur Analyse von Biomolekülen verwendet (Werner, 1993). Auch für den Ca^{2+} -mobilisierenden Botenstoff cADPR ist eine HPLC-Methode beschrieben, um dessen intrazelluläre Konzentration zu bestimmen (da Silva et al., 1998a). Diese Methode wurde als Ausgangspunkt verwendet, um ein entsprechendes Verfahren für ADPR zu entwickeln.

4.2.1.1. Entwicklung eines HPLC-Verfahrens zur Quantifizierung von ADPR

Zuerst wurde eine HPLC-Methode etabliert, die eine leistungsfähige Auftrennung von in Zellen vorhandenen Nucleotiden und verwandten Verbindungen ermöglicht. Diese Versuche dienten dazu, mit Standard-Substanzen unter kontrollierten Bedingungen ein Verfahren zu entwickeln, mit dem ADPR von anderen Komponenten abtrennbar ist, die möglicherweise auch in Extrakten aus Zellen zu erwarten sind. Eine optimale Auftrennung wurde mit einer C₁₈-Säule in Gegenwart von 5 mM TBAHP als Ionenpaar-Reagenz und bei Verwendung eines Methanol-Gradientens erzielt (Abb. 4.17).

Aus Abb. 4.17 ist zu erkennen, daß ADPR von allen anderen 14 getesteten Substanzen bei Verwendung des HPLC-Programms **HYP50AG.PGM** vollständig abgetrennt wurde. Darüber hinaus konnten alle Substanzen mit Ausnahme der beiden Paare AMP/Nicotinsäure und 2'-Phospho-ADPR/NAADP voneinander getrennt werden.

Als nächstes wurden die Linearität der Kalibrierung und das Detektionslimit der Methode mit ADPR-Standards getestet. Dazu wurden Mengen zwischen 0 und 50 nmol ADPR aufgetrennt und die Flächen der Peaks quantifiziert. Die Bestimmung von ADPR durch seine UV-Absorption bei 270 nm war linear über den gesamten getesteten Bereich (Korrelationskoeffizient $R^2 = 0.99$, $n = 9$ für eine Kalibrierung mit sechs Werten). Um die Stabilität der Methode zu testen, wurde die Reproduzierbarkeit der Retentionszeit von ADPR bei wiederholten HPLC-Läufen bestimmt. Die Präzision der Retentionszeit betrug innerhalb eines Tages 11.41 ± 0.02 min ($n = 18$, Mittelwert $\pm$ SD) und innerhalb einer Woche 11.38 ± 0.08 min ($n = 54$, Mittelwert $\pm$ SD). Das Detektionslimit lag bei 5 pmol bei einem Signal/Rausch-Verhältnis ≥ 3 .

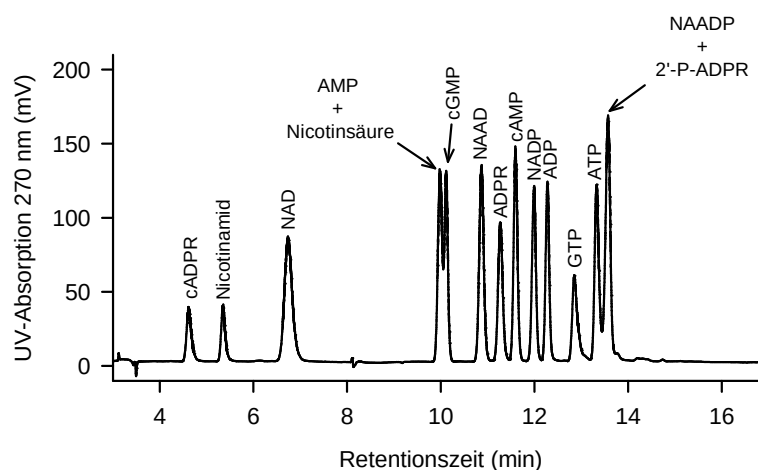


Abbildung 4.17: Abtrennung von ADPR von anderen Nucleotiden und Nucleotid-Derivaten durch RP-HPLC. Eine Mischung der angegebenen Substanzen (jeweils 500 pmol bis 1 nmol) wurde unter Verwendung einer C₁₈-Säule (Multohyp BDS C18, Partikelgröße 5 μ m) mit dem Programm **HYP50AG.PGM** aufgetrennt, wobei ein ansteigender Methanol-Gradient verwendet wurde. Die Detektion erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei 270 nm. Abkürzungen: cADPR, zyklische ADP-Ribose; NAAD, Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid; NAADP, Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid-2'-Phosphat; 2'-P-ADPR, 2'-Phospho-ADP-Ribose.

4.2.1.2. Extraktion von ADPR aus T-Lymphocyten

Nachdem die Analytik von ADPR per RP-HPLC etabliert worden war (Abschnitt 4.2.1.1), wurde eine Methode zur Extraktion von ADPR aus Zellen entwickelt (Abb. 4.18). In diesen Zellextrakten sollten danach die enthaltenen ADPR-Mengen mit der entwickelten HPLC-Methode bestimmt werden. Als Grundlage zur Extraktion von ADPR wurde das in Abb. 4.16 dargestellte Verfahren zur Extraktion von zellulärem NAADP verwendet. Auch zur Extraktion von ADPR wurden Jurkat-Zellen in Gegenwart von Trichloressigsäure lysiert, um eine sofortige Unterbrechung aller enzymatischen Reaktionen sicherzustellen (Werner, 1993). Dies ist insbesondere bei der Bestimmung von Botenstoffen von entscheidender Bedeutung, um eine Veränderung der Konzentration während der Exktraktion zu verhindern. Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden die Lysate in zwei Hälften geteilt, von der eine mit Standard-

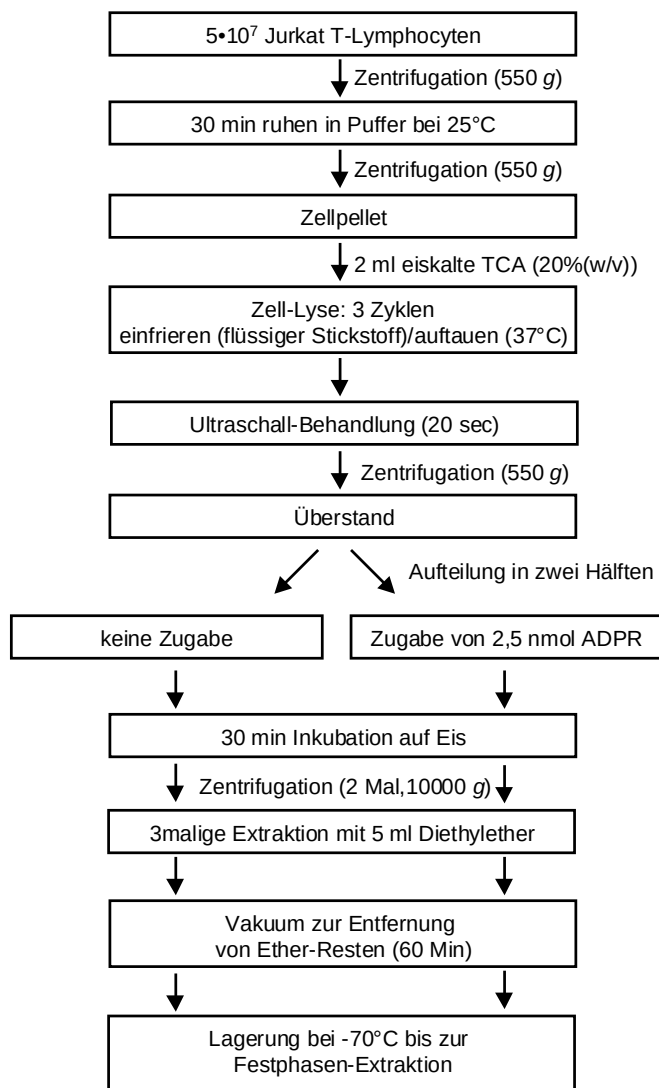


Abbildung 4.18: Schema des Protokolls zur Extraktion von endogenem ADPR aus Jurkat T-Lymphocyten.

ADPR versetzt wurde. Die ADPR-Mengen wurden danach per RP-HPLC für beide Hälften getrennt bestimmt. Aus der Differenz der beiden Ansätze konnte durch Vergleich mit der zugesetzten ADPR-Menge die Wiederfindung berechnet werden.

Eine direkte HPLC-Analyse der ungereinigten Zellextrakte nach Entfernung der Trichloresigsäure durch Extraktion mit Diethylether führte zu Chromatogrammen geringer Qualität (Abb. 4.19). Außerdem nahm bei wiederholter Analyse der gleichen Probe die Qualität der Trennung kontinuierlich ab, was am Auftreten asymmetrischer Peaks sowie einer Ver-

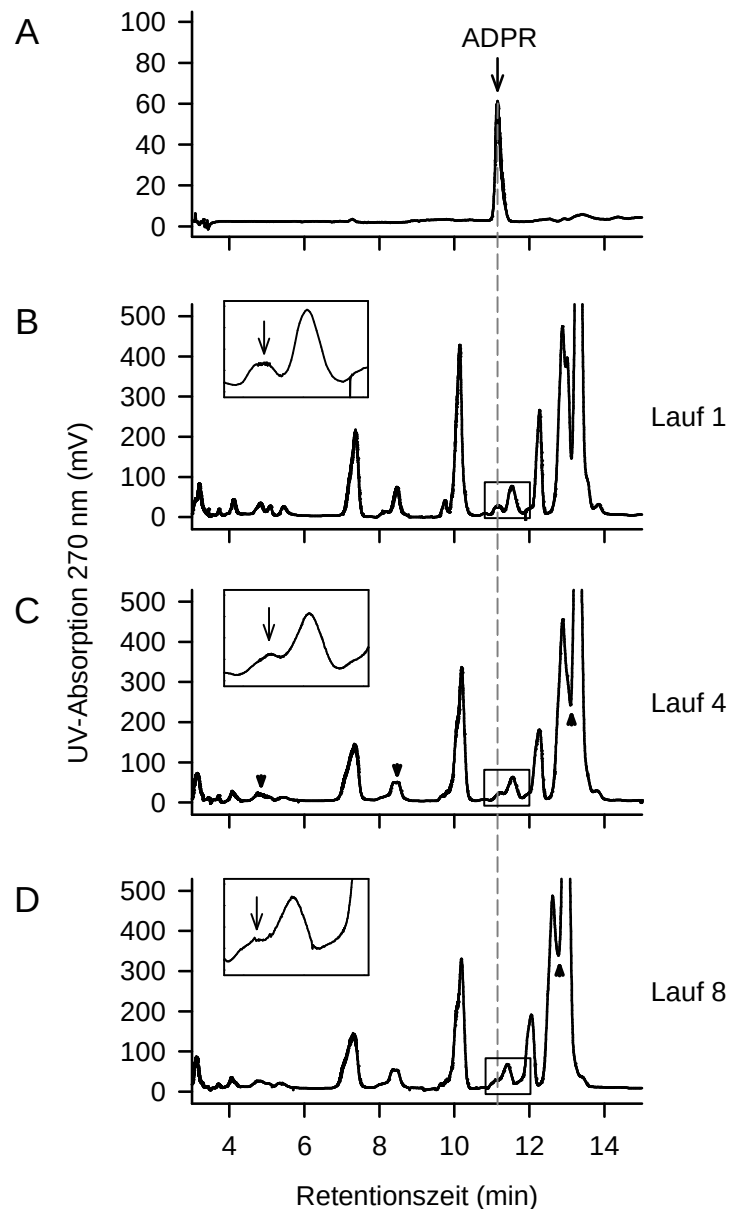


Abbildung 4.19: Nachlassen der chromatographischen Trennleistung bei Auftrennung nicht vorgereinigter Zellextrakte. (A) Ein ADPR-Standard (1 nmol) wurde wie in der Legende zu Abb. 4.17 beschrieben aufgetrennt. (B-D) $5 \cdot 10^7$ Jurkat-Zellen wurden mit 20%iger (w/v) TCA-Lösung extrahiert, die Probe durch dreimalige Extraktion mit Diethylether neutralisiert, und Aliquots dieses Extraktes (entsprechend $5 \cdot 10^6$ Zellen) wiederholt mittels RP-HPLC aufgetrennt. Die erste, vierte und achte Auftrennung mit der gleichen HPLC-Säule sind in (B-D) dargestellt. Die Vergrößerungen zeigen die ADPR-Peaks (Pfeile). Pfeilspitzen kennzeichnen die Abnahme der Trennleistung bei wiederholter Auftrennung der gleichen, nicht vorgereinigten Probe.

breiterung des ADPR-Peaks erkennbar war (Abb. 4.19 B-D). Ähnliche Probleme traten in allen Regionen der Chromatogramme auf (Pfeilspitzen in Abb. 4.19). Außerdem kam es durch Verstopfung der HPLC-Säulen zu einem massiven Anstieg des Gegendrucks, weshalb eine direkte Verwendung der neutralisierten Zellextrakte zur Bestimmung von ADPR nicht möglich war.

4.2.1.3. Festphasenextraktion zur Aufreinigung der Zellextrakte

Da die direkte HPLC-Analyse der neutralisierten Zellextrakte nicht möglich war, wurde eine zusätzliche Festphasenextraktion der Proben durchgeführt, um störende Komponenten zu entfernen. Dazu wurde als Matrix ein stark saurer Anionenaustauscher (Q-Sepharose) verwendet. Nach dem Auftragen der Proben wurde die Matrix gewaschen, um Kontaminationen zu entfernen, und anschließend in einem Stufenprotokoll mit TFA-Lösungen steigender Konzentration eluiert. Die TFA-Eluate wurden dann direkt per RP-HPLC analysiert. Die zusätzlich durchgeführte Festphasenextraktion löste dabei die Probleme des Verstopfens der HPLC-Säulen sowie die Verminderung der Trennungsleistung (siehe Abb. 4.20).

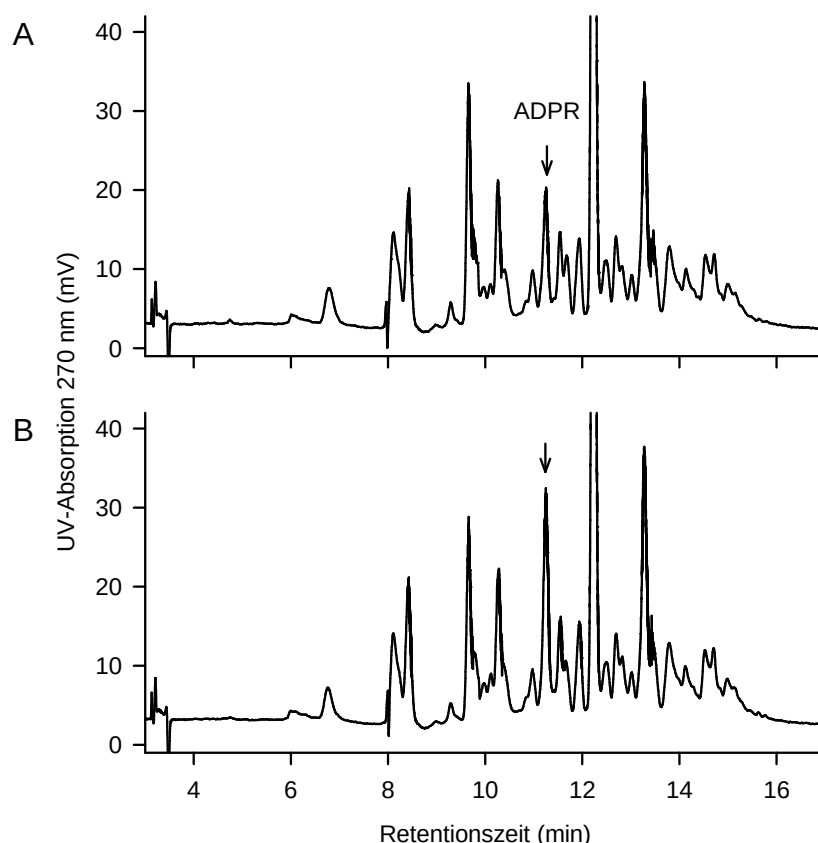


Abbildung 4.20: HPLC-Analyse von endogenem ADPR in Jurkat-Zellextrakten mit einer C₁₈-Säule. $5 \cdot 10^7$ Jurkat T-Lymphocyten wurden in 20%iger (w/v) TCA-Lösung durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen lysiert und die Extrakte in zwei Hälften geteilt. Zu einer der Hälften wurde 2.5 nmol ADPR zugesetzt, alle Proben durch Festphasenextraktion an Q-Sepharose gereinigt und mit 20 mM TFA-Lösung eluiert. Die Extrakte aus $2 \cdot 10^6$ Zellen, entweder mit (B) oder ohne (A) zugesetztes ADPR, wurden mittels RP-HPLC mit einer C₁₈-Säule (Multohyp BDS C18, Partikelgröße 5 μ m) wie in der Legende zu Abb. 4.17 beschrieben aufgetrennt. Die ADPR-Peaks sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die Analyse der Zwillingsproben mit und ohne Zusatz von exogenem ADPR ergab einen einzigen Peak, der bei Zugabe von ADPR zu Beginn der Extraktion zunahm (vergleiche Abb. 4.20, A und B). Dieser Peak co-eluierte mit einem ADPR-Standard (Pfeile in Abb. 4.20), was darauf hindeutet, daß es sich um ADPR handelte. Die Differenzen in den Peak-Flächen zwischen den Proben mit und ohne Zusatz von exogenem ADPR wurden verwendet, um die Wiederfindung für jedes Paar von Zwillingsproben zu berechnen. Die durchschnittliche Wiederfindung betrug dabei $92 \pm 15\%$ ($n = 26$, Mittelwert $\pm$ SD).

Um die Identität des mit ADPR co-eluierenden Peaks weiter zu untersuchen, wurden UV-Spektren dieses Peaks und eines ADPR-Standards aufgenommen und miteinander verglichen (Abb. 4.21). Die beiden gefundenen UV-Spektren im Bereich von 210 nm bis 340 nm stimmten weitgehend überein, was ein weiterer Hinweis darauf war, daß es sich bei dem in den Zellextrakten gefundenen Peak, der sich durch Zusatz von exogenem ADPR erhöhen ließ, tatsächlich um ADPR handelte.

Mit der entwickelten Methode wurden intrazelluläre ADPR-Konzentrationen in zwei T-Zell-Linien quantifiziert. Die endogenen ADPR-Mengen wurden aus den Hälften der Zwillingsproben bestimmt, die nicht mit ADPR versetzt worden waren. Die darin quantifizierten ADPR-Mengen wurden um die für die jeweilige Probe gefundene Wiederfindung korrigiert und anschließend unter Verwendung des Zellvolumens in intrazelluläre Konzentrationen umgerechnet. Das Zellvolumen wurde für jede Zellpräparation mit Hilfe eines automatischen Zellzählers bestimmt und betrug bei humanen Jurkat T-Zellen $1.588 \pm 0.136 \mu\text{l}$ für 10^6 Zellen ($n = 26$, Mittelwert $\pm$ SD). Die daraus berechnete mittlere intrazelluläre ADPR-Konzentration betrug $44 \pm 11 \mu\text{M}$ ($n = 26$, Mittelwert $\pm$ SD). Dabei wurde eine gleichmäßige Verteilung von ADPR innerhalb der Zelle angenommen, und feste Strukturen in der Zelle, die das Verteilungsvolumen für ADPR reduzieren würden, wurden nicht berücksichtigt.

Um die erhaltenen ADPR-Konzentrationen weiter zu verifizieren, wurde ein zweites HPLC-System etabliert, um die vorgereinigten Zellextrakte mit einer anderen HPLC-Säule aufzu-

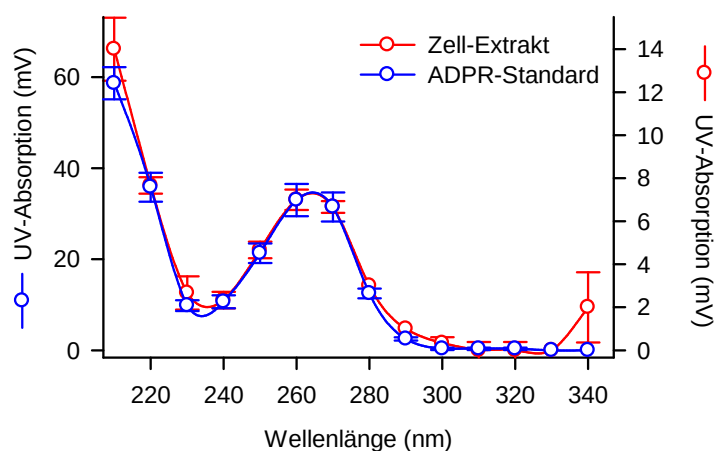


Abbildung 4.21: Vergleich der UV-Spektren des ADPR-Peaks aus Zellextrakten und eines ADPR-Standards. Die UV-Spektren eines ADPR-Standards (blaue Kurve) und des ADPR-Peaks aus Zellextrakten (rote Kurve) wurden zu dem in Abb. 4.20 durch die Pfeile markierten Zeitpunkt aufgenommen, und die Skalierung auf die UV-Absorption bei 270 nm angeglichen ($n = 3$, Mittelwerte $\pm$ SEM).

trennen. Dazu wurde ebenfalls eine RP-Säule verwendet, die aber eine C₁₂-Oberfläche hatte (Synergi MAX-RP 80A C12). Die Proben wurden auf die gleiche Weise wie für die C₁₈-Säule beschrieben analysiert. Bei diesen Versuchen wurden sowohl für die Wiederfindung als auch für die intrazelluläre ADPR-Konzentration ähnliche Werte wie mit der C₁₈-Säule gefunden. Auch dies deutete auf die Homogenität und Identität des ADPR-Peaks hin, weil es unwahrscheinlich ist, daß es bei zwei verschiedenen Säulen-Systemen zur Co-Elution einer anderen Substanz mit ADPR kommen würde. Repräsentative Chromatogramme sind in Abb. 4.22 dargestellt.

Intrazelluläre ADPR-Konzentrationen wurden auch in der murinen Thymocyten-Linie BW5147 unter Verwendung der C₁₈-Säule Multohyp BDS C18 bestimmt (Daten nicht dargestellt). Dabei wurde eine mittlere cytosolische ADPR-Konzentration von $73 \pm 11 \mu\text{M}$ gefunden ($n = 5$, Mittelwert $\pm$ SD). Die BW5147-Zellen waren deutlich kleiner als Jurkat T-Lymphocyten, das Zellvolumen betrug hier $0.754 \pm 0.028 \mu\text{l}$ für 10^6 Zellen ($n = 5$, Mittelwert $\pm$ SD). Bei diesen Experimenten wurde die mittlere Wiederfindung mit $68 \pm 13 \%$ ($n = 5$, Mittelwert $\pm$ SD) bestimmt.

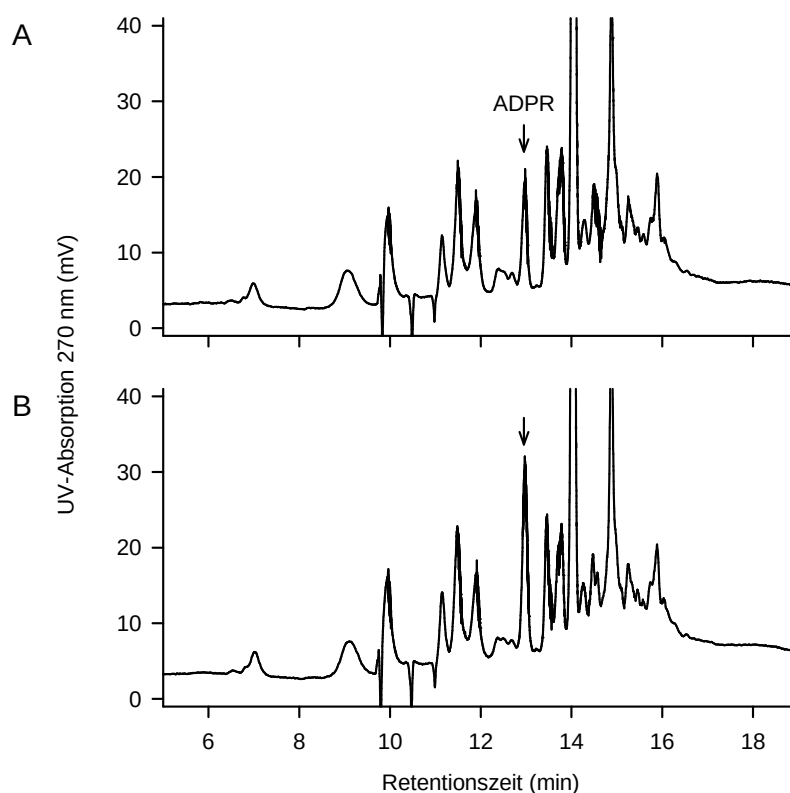


Abbildung 4.22: HPLC-Analyse von endogenem ADPR in Jurkat-Zellextrakten mit einer C₁₂-Säule. Endogenes ADPR wurde aus $5 \cdot 10^7$ Jurkat T-Lymphocyten wie in der Legende zu Abb. 4.20 beschrieben extrahiert und die Proben durch Festphasen-Extraktion gereinigt. Die Extrakte aus $2 \cdot 10^6$ Zellen, entweder mit (B) oder ohne (A) zugesetztes ADPR, wurden mittels RP-HPLC mit einer C₁₂-Säule (Synergi MAX-RP 80A C12, Partikelgröße $4 \mu\text{m}$) wie in der Legende zu Abb. 4.17 beschrieben aufgetrennt. Die ADPR-Peaks sind durch Pfeile gekennzeichnet.

4.2.1.4. Untersuchungen zum Abbau von NAD und ADPR während der Zellextraktion

Ein möglicher Abbau von NAD zu ADPR während des Extraktionsprotokolls könnte bei der Bestimmung von ADPR ein Problem darstellen, weil NAD-Konzentrationen im hohen mikromolaren Bereich in Zellen vorhanden sind (Jacobson und Jacobson, 1976). Diese Hydrolyse

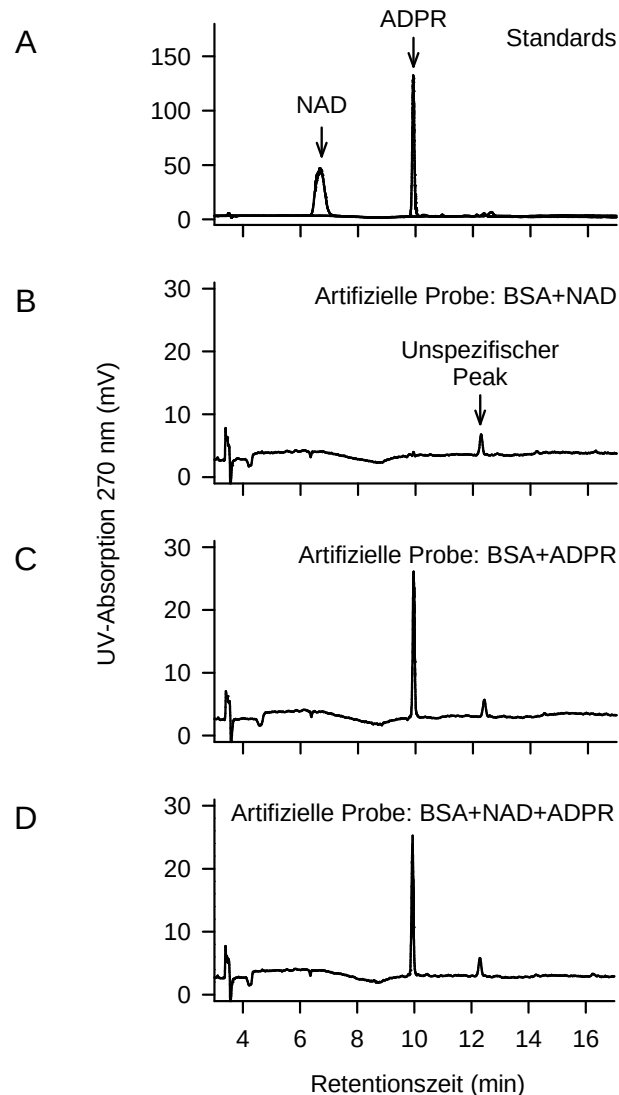


Abbildung 4.23: Untersuchung zur Hydrolyse von NAD zu ADPR bei der sauren Zellextraktion. (A) Jeweils 1 nmol NAD und ADPR wurden mittels RP-HPLC mit einer C₁₈-Säule wie in der Legende zu Abb. 4.17 beschrieben aufgetrennt. (B-D) Um zu untersuchen, ob es bei der sauren Extraktion von Zellen mit TCA-Lösung zu einem Zerfall von endogenem NAD zu ADPR kommt, wurden artifiizielle Proben aus BSA, NAD und/oder ADPR extrahiert und mittels Festphasenextraktion wie in der Legende zu Abb. 4.20 angegeben gereinigt. Die Eluate wurden dann durch RP-HPLC analysiert. (B) NAD wurde durch die Festphasen-Extraktion komplett entfernt und konnte in den Eluaten daher nicht nachgewiesen werden. Man beachte, daß die Menge an ADPR in der Probe, die ADPR und NAD enthielt (D) nicht erhöht war gegenüber der Probe, die nur ADPR enthielt (C). Damit kann eine Degradation von NAD zu freiem ADPR bei der Extraktion ausgeschlossen werden. Die leichte Veränderung der Retentionszeiten im Vergleich mit Abb. 4.17 ist auf die Verwendung einer neuen HPLC-Säule zurückzuführen.

von NAD zu ADPR könnte während der Extraktion der Zellen erfolgen, die in Gegenwart von Trichloressigsäure durchgeführt wurde. Um den möglichen Zerfall von NAD zu untersuchen, wurden artifizielle Proben verwendet, die aus BSA und bekannten Mengen an NAD, ADPR oder beiden Substanzen bestanden. Diese Proben wurden auf die gleiche Weise mit Trichloressigsäure extrahiert, durch Festphasen-Extraktion gereinigt und per HPLC analysiert wie die aus Zellen bestehenden Proben (Abb. 4.23, Seite 68).

Bei der Analyse der Ansätze, die nur NAD und BSA enthielten, wurde kein ADPR-Peak gefunden (Abb. 4.23 B), da das NAD während der Festphasen-Extraktion anscheinend komplett abgetrennt wurde. Wie zu erwarten war, wurde ein ADPR-Peak in den artifiziellen Proben gefunden, die aus ADPR und BSA bestanden (Abb. 4.23 C). In den Proben, die sowohl NAD als auch ADPR enthielten (Abb. 4.23 D), wurde im Vergleich mit den Ansätzen, die nur ADPR enthielten, keine Zunahme an ADPR gefunden. Damit konnte ein signifikanter Zerfall von NAD zu ADPR während der sauren Zellextraktion ausgeschlossen werden.

4.2.2. Änderung der zellulären ADPR-Konzentration bei Stimulation von T-Lymphocyten

Ein wichtiges Kennzeichen eines sekundären Botenstoffes besteht in der Änderung seiner Konzentration beim Ablauf von Signalvorgängen in Zellen. Um eine solche Konzentrationsänderung von ADPR in humanen T-Lymphocyten zu untersuchen, wurden Jurkat-Zellen mit dem pflanzlichen Lektin Concanavalin A (ConA) aus der Jackbohne *Canavalia ensiformis* stimuliert.

Bei Lektinen handelt es sich um Proteine, die an die Zucker-Ketten glycosylierter extrazellulärer Proteine binden. ConA zeigt eine Spezifität für terminale α -D-Mannosyl- und α -D-Glucosyl-Reste. Die Wirkung vieler Lektine auf Zellen hängt entscheidend von der Konzentration ab; ConA wirkt auf Immunzellen in niedrigen Konzentrationen proliferativ (Powell und Leon, 1970; Boldt et al., 1975), während es in hohen Konzentration Apoptose auslösen kann (Nagase et al., 1998; Suen et al., 2000).

Zelluläre ADPR-Konzentrationen wurden in Jurkat-Zellen quantifiziert, die entweder mit einer Vehikel-Kontrolle oder eine hohen Konzentration an ConA stimuliert wurden (repräsentative Chromatogramme in Abb. 4.24, Seite 70). Dabei wurde eine Erhöhung der intrazellulären ADPR-Konzentration bei ConA-Stimulation im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollen gefunden.

Danach wurden die ADPR-Konzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Stimulation mit ConA ermittelt (Abb. 4.25, Seite 70, offene Symbole). Dabei wurde ein statistisch signifikanter, ungefähr 1.5facher Anstieg der ADPR-Konzentration nach ConA-Stimulation gefunden. Ein Plateau war bereits nach einer Stimulationsdauer von einer Minute erreicht, und die ADPR-Konzentration blieb für mindestens 15 Minuten erhöht. Diese Kinetik wurde mit der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bei Stimulation der Zellen mit ConA verglichen (Abb. 4.25, durchgezogene Linie).

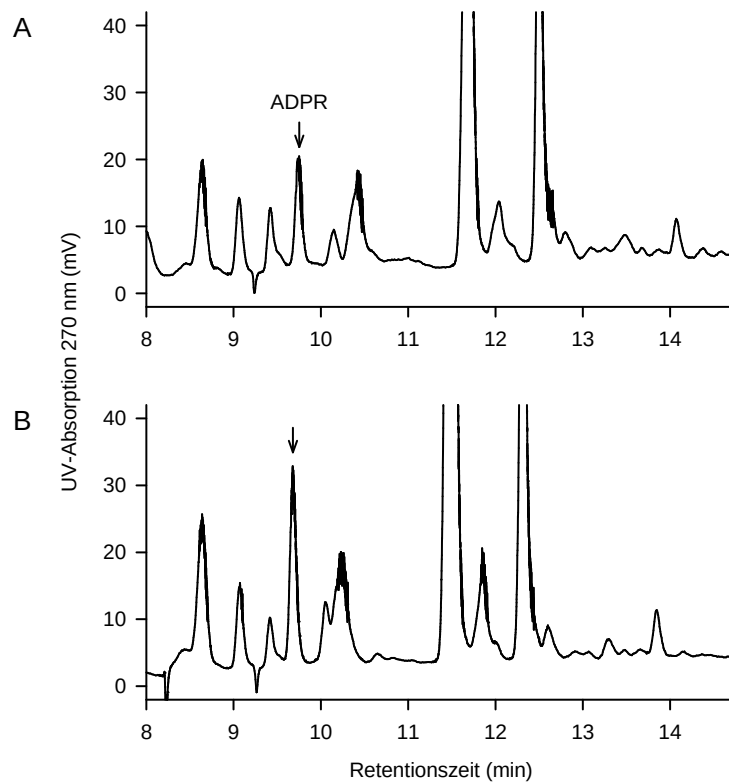


Abbildung 4.24: Anstieg der intrazellulären ADPR-Konzentration in Jurkat T-Lymphocyten bei Stimulation mit ConA. Jurkat T-Zellen wurden für 15 min mit einer Vehikel-Kontrolle (A) bzw. mit 100 µg/ml ConA (B) inkubiert. Danach wurde das endogene ADPR wie in der Legende zu Abb. 4.20 beschrieben extrahiert, mittels Festphasen-Extraktion aufgereinigt und durch RP-HPLC quantifiziert. Die Retentionszeit eines ADPR-Standards ist durch Pfeile markiert. Dargestellt sind die Hälften der Zwillingssproben ohne Zusatz von exogenem ADPR.

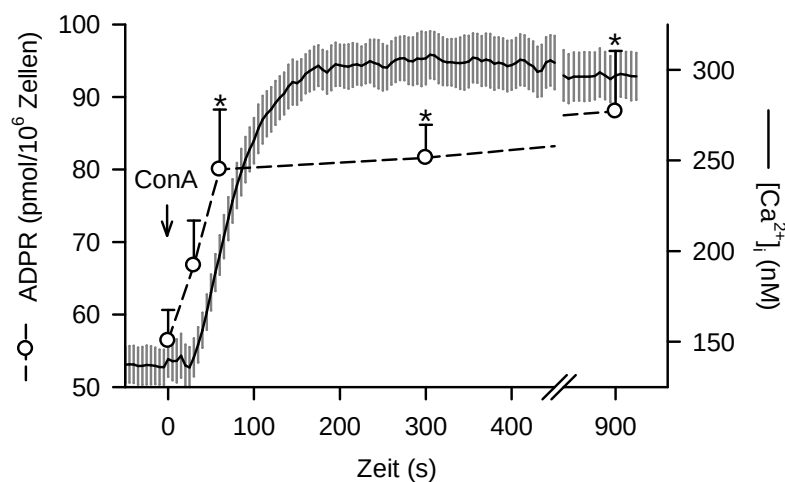


Abbildung 4.25: Kinetik der intrazellulären ADPR-Konzentration bei Stimulation mit ConA. ADPR-Mengen in Jurkat T-Lymphocyten wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Stimulation mit 100 µg/ml ConA wie in der Legende zu Abb. 4.24 beschrieben ermittelt (offene Kreise, gestrichelte Linie, Mittelwerte±SEM, $n = 8 - 13$, $*p < 0.05$ gegenüber dem Basalwert). Die Messung von $[Ca^{2+}]_i$ wurde in einer Suspension von mit Fura-2 beladenen Jurkat T-Zellen bei einer extrazellulären Calcium-Konzentration von 1.35 mM durchgeführt (durchgezogene Linie, Mittelwerte±SEM, $n = 9$).

Dabei ergab sich, daß die Erhöhung der ADPR-Konzentration dem Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ zeitlich eng vorausging, was einen Zusammenhang zwischen diesen beiden Vorgängen vermuten ließ.

4.2.3. Analyse der Expression von TRPM2

Als nächstes wurde untersucht, ob Jurkat T-Lymphocyten den durch ADPR aktivierbaren Ionenkanal TRPM2 (Perraud et al., 2001; Sano et al., 2001) exprimieren, was die molekulare Grundlage für den Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ durch die Erhöhung der ADPR-Konzentration sein könnte. Dazu wurde durch RT-PCR das Vorkommen der mRNA von TRPM2 analysiert (Abb. 4.26 A). Bei Verwendung von Primern, die innerhalb der Exons 10 bzw. 11 binden (linker Teil) wurde nur ein Amplifikat gefunden. Die in der Literatur beschriebene ΔN -Form von TRPM2 (Wehage et al., 2002) lag daher in Jurkat-Zellen nicht vor. Bei Verwendung von Primern, die gegen Sequenzen aus den Exons 26 bzw. 29 gerichtet waren (rechter Teil) wurden dagegen zwei Amplifikate gefunden. Dies deutet darauf hin, daß außer der nicht trunkierten Form von TRPM2 zusätzlich die ΔC -Isoform exprimiert wurde. Abb. 4.26 B

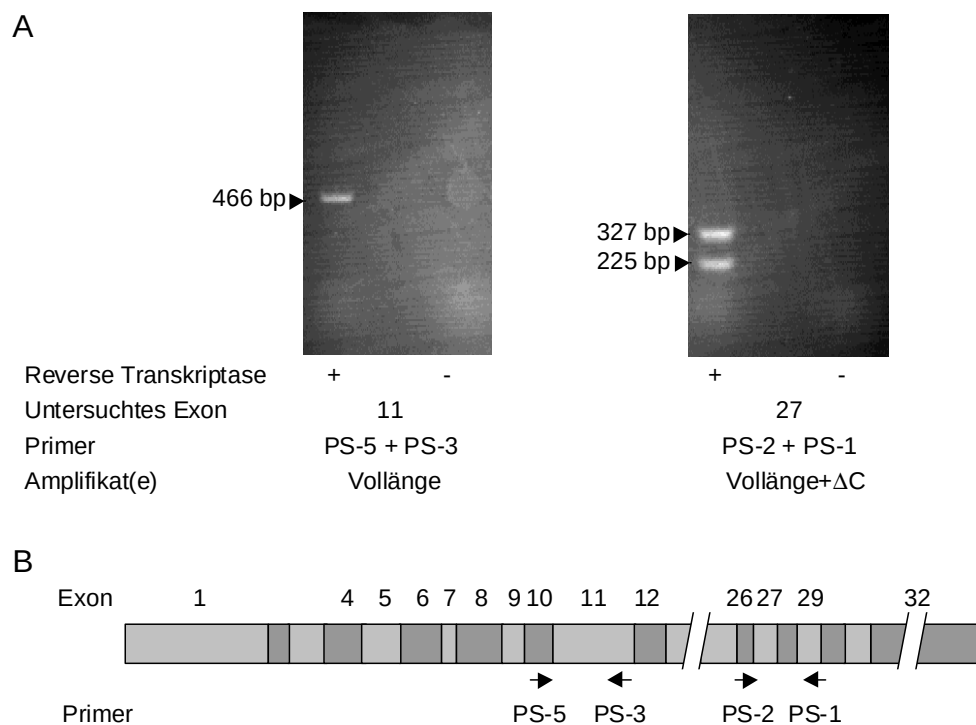


Abbildung 4.26: Expressionsanalyse von TRPM2 in Jurkat T-Lymphocyten. (A) TRPM2-Isoformen wurden durch RT-PCR in einem Ein-Schritt-Protokoll (Titan-Kit, Roche) untersucht. In Kontroll-Ansätzen (jeweils rechte Gel-Spur) wurde die Reverse Transkriptase durch Hitzebehandlung inaktiviert (RT -). Das 466 bp-Amplifikat (linker Teil) zeigt, daß im Bereich von Exon 11 nur die TRPM2-Vollängen-Form vorlag, während die ΔN -Isoform nicht gefunden wurde. Im Bereich von Exon 27 (rechter Teil) traten hingegen zwei Amplifikate von 327 bzw. 225 bp auf, was die Expression sowohl der nicht trunkierten Form von TRPM2 als auch der ΔC -Isoform in Jurkat-Zellen zeigte. (B) Schematische Darstellung der Exon-Struktur von TRPM2 sowie der für die in (A) dargestellten RT-PCR verwendeten Primer.

stellt schematisch die mRNA von TRPM2 und die verwendeten Primer dar.

Zur genaueren Auswertung der Expressions-Analyse wurden die in Abb. 4.26 abgebildeten Amplifikate in den Klonierungsvektor pGEM-T easy ligiert, in Bakterien vermehrt und die Vektoren isoliert. Die Inserts der erhaltenen Vektoren wurden sequenziert und mit der cDNA-Sequenz von TRPM2 verglichen. Abb. 4.27 stellt das Insert des Klons TRPM2-N1

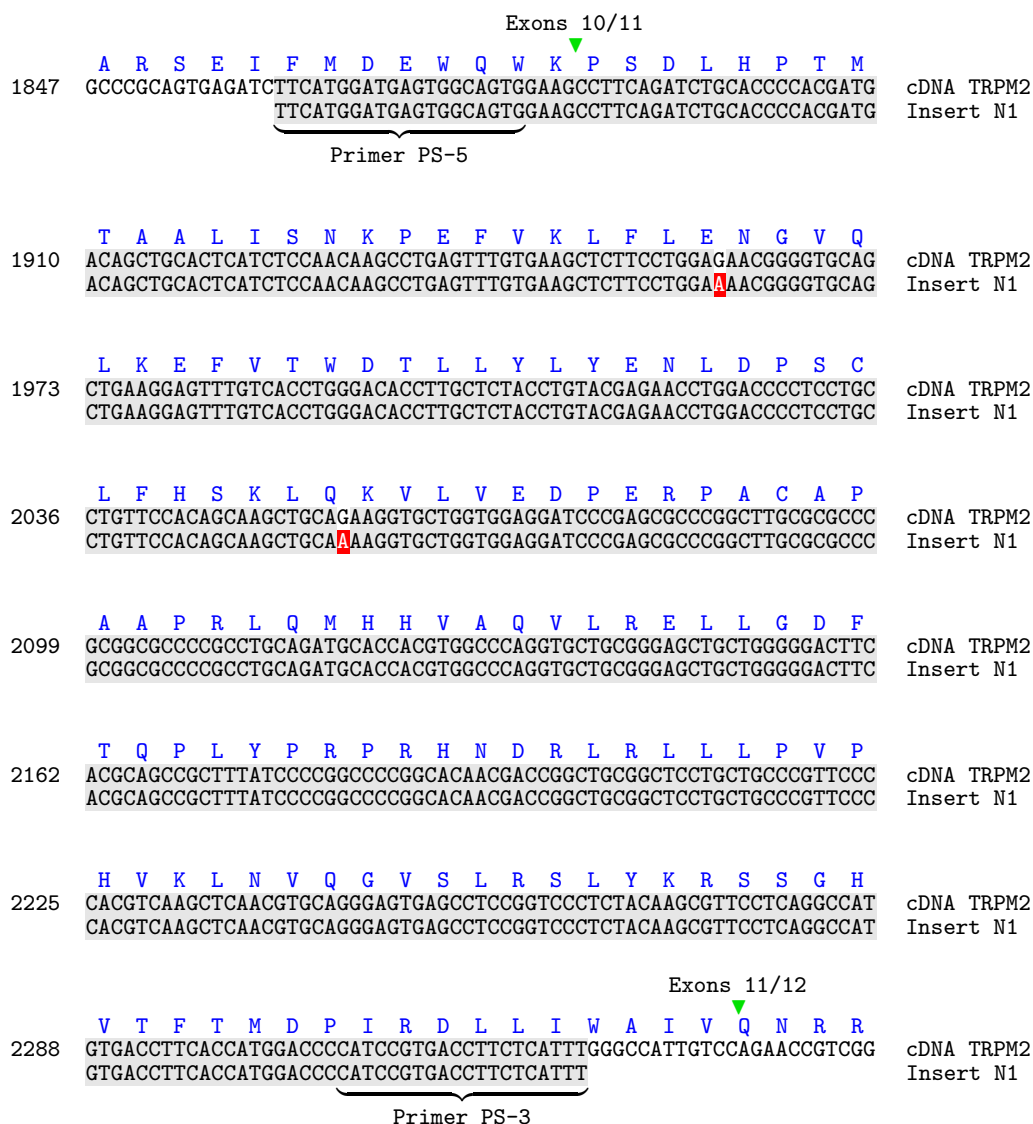


Abbildung 4.27: Alignment des Inserts des Klons TRPM2-N1 mit der cDNA-Sequenz von TRPM2. In schwarz ist ein Ausschnitt der TRPM2-cDNA sowie das Insert des Klons TRPM2-N1 dargestellt. Übereinstimmungen der Sequenzen sind grau hinterlegt, und Abweichungen des Inserts gegenüber der TRPM2-cDNA rot markiert. Die Grenzen zwischen den Exons von TRPM2 sind durch grüne Dreiecke markiert. Dargestellt sind außerdem in blau die von der TRPM2-cDNA codierte Proteinsequenz, sowie unterhalb der DNA-Sequenzen die Bindungsstellen der für die RT-PCR verwendeten Primer.

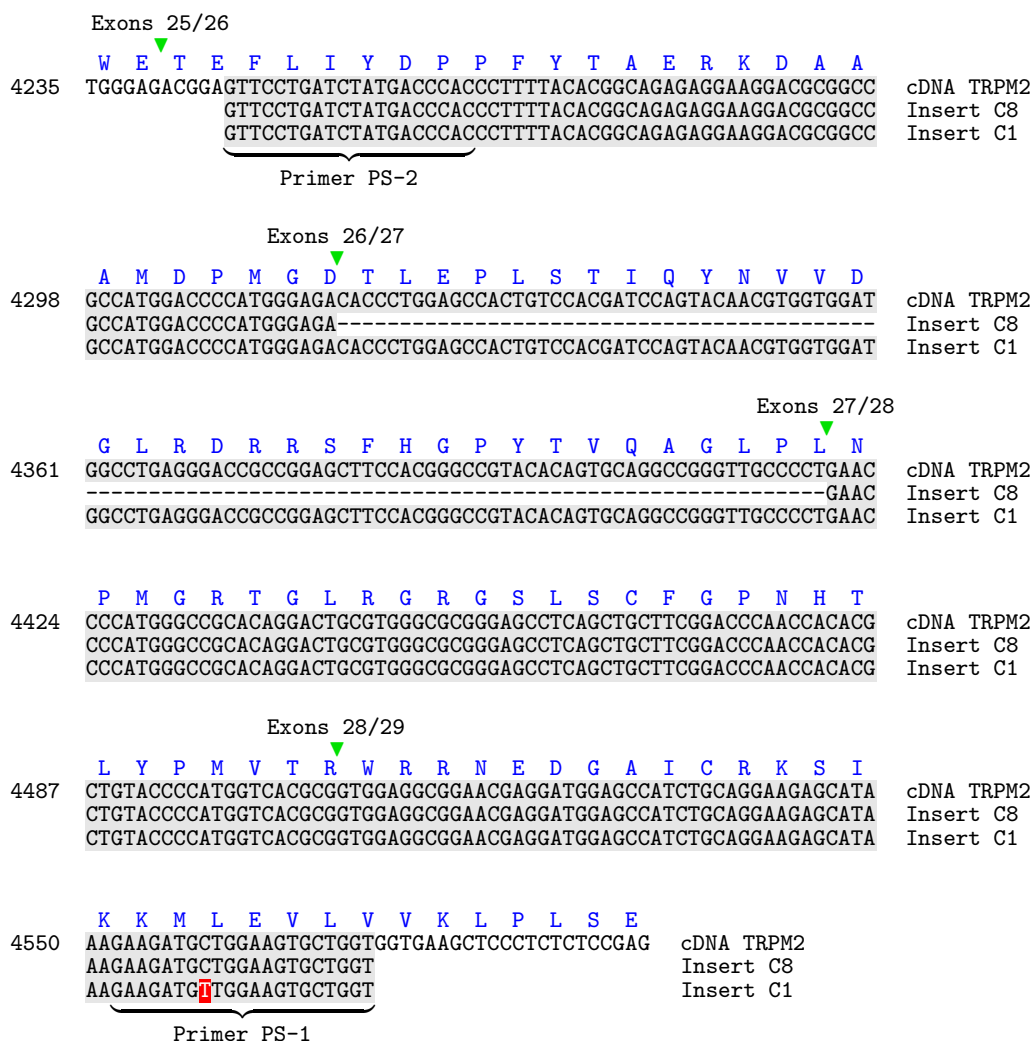


Abbildung 4.28: Alignment der Inserts der Klone TRPM2-C1 und TRPM2-C8 mit der cDNA-Sequenz von TRPM2. In schwarz ist ein Ausschnitt der TRPM2-cDNA sowie die Inserts der Klone TRPM2-C1 und TRPM2-C8 dargestellt. Übereinstimmungen der Sequenzen sind grau hinterlegt, und Abweichungen der Inserts gegenüber der TRPM2-cDNA rot markiert. Die Grenzen zwischen den Exons von TRPM2 sind durch grüne Dreiecke markiert. Dargestellt sind außerdem in blau die von der TRPM2-cDNA codierte Proteinsequenz, sowie unterhalb der DNA-Sequenzen die Bindungsstellen der für die RT-PCR verwendeten Primer.

und Abb. 4.28 auf Seite 73 die Inserts der Klone TRPM2-C1 und TRPM2-C8 als Alignment im Vergleich zur cDNA von TRPM2* dar.

Aus Abb. 4.27 ist ersichtlich, daß bei der Sequenzierung des klonierten N-terminalen Amplifikats aus TRPM2 zwei Mutationen gefunden wurden. Sowohl bei der Mutation G1960A als auch bei der Mutation G2056A handelte es sich aber um stille Mutationen, denn im ersten Fall wurde GAG durch GAA ersetzt, was beides für Glutamat codiert, während im zweiten

*Bei der dargestellten Sequenz der cDNA von TRPM2 handelt es sich um das Transkript ENST 00000300482 aus der Ensembl-Datenbank (www.ensembl.org).

Fall sowohl CAG als auch CAA für Glutamin codierten. Daher wurde die Proteinsequenz von TRPM2 durch die beiden gefundenen Mutationen nicht verändert.

Bei der Sequenzierung des Inserts der Klone TRPM2-C1 und TRPM2-C8 wurde nur bei dem Insert von Klon TRPM2-C1 eine Abweichung gegenüber der cDNA-Sequenz von TRPM2 gefunden (Abb. 4.28). Diese Mutation (C4559T) befand sich aber innerhalb der Sequenz des Primers PS-1. Daher ist es wahrscheinlich, daß die dort aufgetretene Veränderung auf Fehler in der Primer-Synthese zurückzuführen war. Dafür sprach auch, daß die Mutation im Klon TRPM2-C8 nicht auftrat. Wie erwartet unterschieden sich die Klone TRPM2-C1 und TRPM2-C8 voneinander durch das Fehlen des kompletten Exons 27. Dies bestätigt, daß in Jurkat-T-Zellen im Bereich von Exon 27 sowohl die Vollängen-Form als auch die ΔC -Isoform von TRPM2 (Wehage et al., 2002) vorliegen.

4.2.4. Differenzierung unterschiedlicher Calcium-Einstrom-Wege durch Inhibition mit Gadolinium

ConA ist insofern ein unspezifischer Reiz, da dieses Lektin zur Quervernetzung aller auf der Zelloberfläche vorhandenen Glycoproteine mit dem zum Lektin passenden Glycosylierungsmuster führt. Daher kommt es bei Stimulation mit ConA zur unspezifischen Aktivierung mehrerer Signalwege. Die ConA-vermittelte Aktivierung eines Stroms über die Plasmamembran, der als I_{CRAC} bezeichnet wird, ist bekannt (siehe Abschnitt 1.3.2.1, Lewis und Cahalan (1989); Hoth und Penner (1992); Hoth (1995)). Dieser Strom mit bisher unklarer molekularer Identität ist hoch selektiv für Ca^{2+} -Ionen, weist aber nur eine geringe Leitfähigkeit auf. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob es bei ConA-Stimulation zusätzlich zum Ca^{2+} -Einstrom durch I_{CRAC} zur Aktivierung eines weiteren Influxweges für Ca^{2+} unter Beteiligung von TRPM2 kommt.

Zu diesem Zweck wurde Gadolinium als selektiver Inhibitor verwendet. Gadolinium gehört chemisch zu den Lanthanoiden und wurde als wasserlösliches $GdCl_3$ eingesetzt. Gd^{3+} ist beschrieben als effektiver Inhibitor des durch I_{CRAC} vermittelten Ca^{2+} -Einstroms (Ross und Cahalan, 1995). In Abb. 4.29 auf Seite 75 ist das Meßprotokoll dargestellt, das zur Quantifizierung des Ca^{2+} -Einstroms verwendet wurde. Dabei wurden mit dem Ca^{2+} -Indikator Fura-2 beladenen Jurkat T-Zellen zunächst in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} stimuliert. Eine dabei auftretende Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ ist zurückzuführen auf Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (vermittelt durch die sekundären Botenstoffe $InsP_3$ (Imboden und Stobo, 1985), cADPR (Guse et al., 1999) und möglicherweise auch NAADP). 300sec nach der Stimulation wurden unterschiedliche Konzentrationen an Gd^{3+} zugegeben und weitere 100sec später wurde die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration auf 1.35 mM erhöht. Die dann auftretende Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ ist auf den Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulär-Raum zurückzuführen.

Aus Abb. 4.29 A ist zu erkennen, daß es erst bei Gd^{3+} -Konzentrationen $\geq 3 \mu M$ zu einer deutlichen Inhibition des durch ConA-Stimulation ausgelösten Rezeptor-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms im Vergleich zur nicht inhibierten Kontrolle kam. Als Positiv-Kontrolle für die Inhibition durch Gd^{3+} wurden die Zellen mit dem SERCA-Inhibitor Thapsigargin

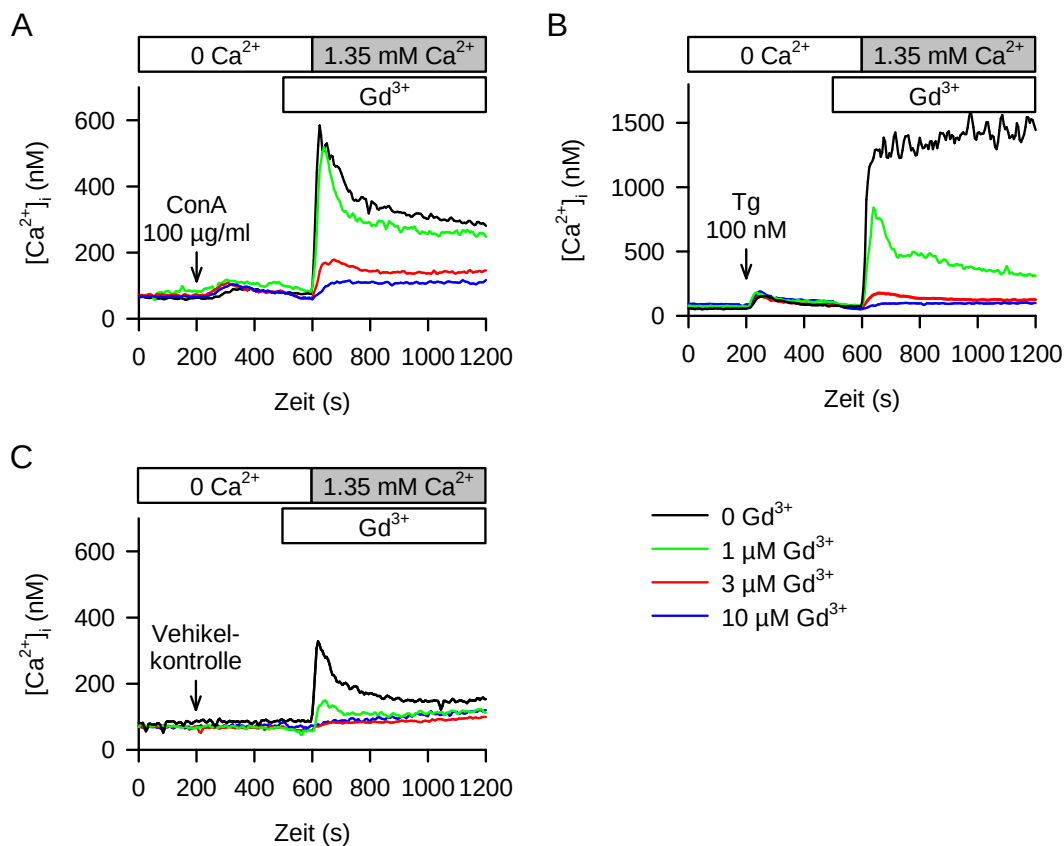


Abbildung 4.29: Inhibition des durch ConA oder Thapsigargin ausgelösten Ca^{2+} -Einstroms durch Gd^{3+} . $2 \cdot 10^6$ Jurkat T-Lymphocyten wurden mit Fura-2 beladen und nach 200 sec mit (A) 100 µg/ml ConA, (B) 100 nM Thapsigargin (Tg) oder (C) einer Vehikel-Kontrolle in nominell Ca^{2+} -freiem Puffer stimuliert (Pfeil). 500 sec nach Beginn der Messung wurden unterschiedliche Konzentrationen an $GdCl_3$ (siehe Legende) zugegeben, und die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bei 600 sec auf 1.35 mM eingestellt. Man beachte, daß es auch ohne Stimulation (C) zu einem Leck-Einstrom von Ca^{2+} kam.

(Abb. 4.29 B) stimuliert. In Anwesenheit von Thapsigargin kommt es einer passiven Depletion der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher und dadurch ausgelöst zu einem durch I_{CRAC} getragenen Speicher-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom (siehe Abschnitt 1.3.2.1). Es ist zu erkennen, daß bei Stimulation mit Thapsigargin schon Gd^{3+} -Konzentrationen ab 1 µM eine deutliche Inhibition des Ca^{2+} -Einstroms auslösten. Man beachte, daß es auch ohne Stimulation der Zellen (Abb. 4.29 C) zu einem Leck-Einstrom von Ca^{2+} kam.

Zur weiteren Auswertung wurden Dosis-Wirkungskurven der Reduktion des $[Ca^{2+}]_i$ -Plateaus durch Gd^{3+} bei Stimulation mit ConA oder Thapsigargin erstellt (Abb. 4.30, Seite 76). Dabei wurden die Differenzen von $[Ca^{2+}]_i$ vor und nach Zugabe von extrazellulärem Ca^{2+} ermittelt und um den Leck-Einstrom bei der gleichen Gd^{3+} -Konzentration korrigiert. Aus den Dosis-Wirkungskurven ist ersichtlich, daß sich die Inhibitionswirkung von Gd^{3+} zwischen den beiden Stimuli um etwa eine Größenordnung unterschied: Der durch Thapsigargin ausgelöste, Speicher-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom wurde schon bei deutlich geringeren Gd^{3+} -Konzentrationen ($IC_{50} \approx 60$ nM) inhibiert im Vergleich zum Rezeptor-vermittelten

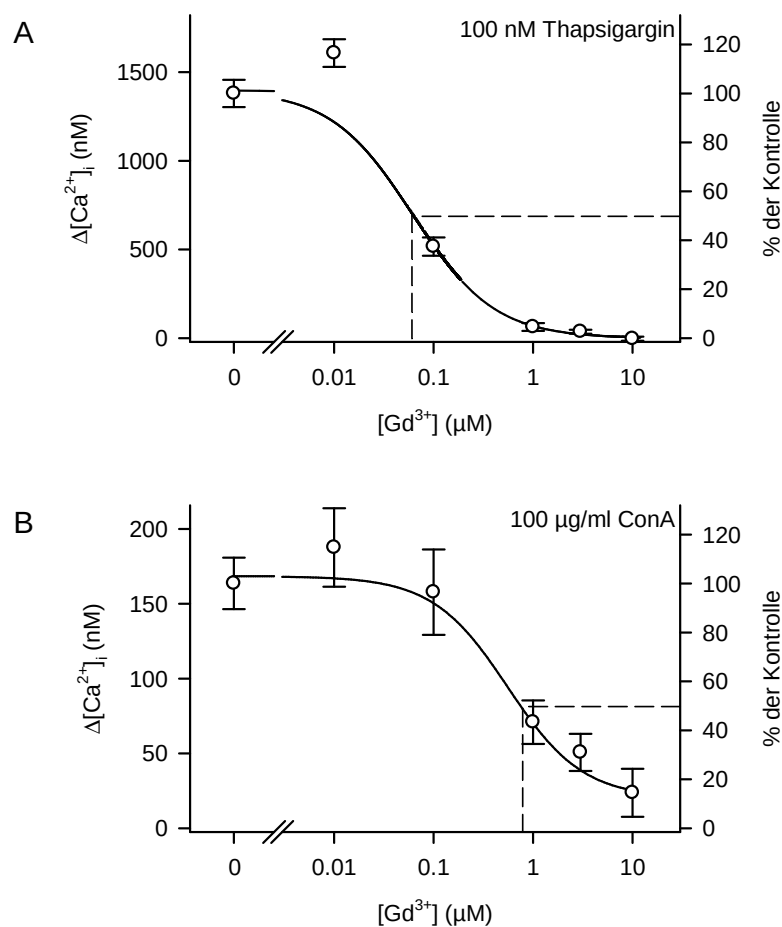


Abbildung 4.30: Dosis-Wirkungskurven für die Inhibition des Ca²⁺-Einstroms durch Gd³⁺ bei Stimulation mit Thapsigargin oder ConA. Jurkat-Zellen wurden wie in Abb. 4.29 dargestellt mit (A) 100 nM Thapsigargin oder (B) 100 µg/ml ConA stimuliert. In Anwesenheit unterschiedlicher Gd³⁺-Konzentrationen wurde dann extrazellulär 1.35 mM Ca²⁺ zugegeben, um den Ca²⁺-Einstrom zu quantifizieren. Zur Auswertung wurde jeweils die Differenz zwischen dem Plateau der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und dem Basalwert vor Ca²⁺-Zugabe berechnet und um den Wert einer Kontrolle ohne Stimulation bei der gleichen Gd³⁺-Konzentration korrigiert ($n = 5 - 16$, Mittelwerte $\pm$ SEM).

Ca²⁺-Einstrom nach ConA-Stimulation ($IC_{50} \approx 750$ nM).

4.2.5. Inhibition der ADPR-Bildung durch Cibacron Blue 3GA

Um den Zusammenhang zwischen Zellstimulation mit ConA, intrazellulärer Bildung von ADPR und Aktivierung des Ionenkanals TRPM2 weiter zu untersuchen, wurde ein pharmakologischer NAD-Glycohydrolase-(NADase)-Inhibitor verwendet. Bei dieser Substanz handelt es sich um Cibacron blue (3GA), das häufig gekoppelt an ein Polymer als Affinitätsmatrix zur Aufreinigung NAD-bindender Proteine verwendet wird (Dean und Watson, 1979; Subramanian, 1984). 3GA hat aber auch die Fähigkeit, als kompetitiver Inhibitor für Enzyme mit NAD-Glycohydrolase-Aktivität zu wirken (Yost und Anderson, 1981; Kim et al., 1993; Li et al., 2002). Die chemische Struktur von 3GA ist in Abb. 4.31 auf Seite 77 dargestellt.

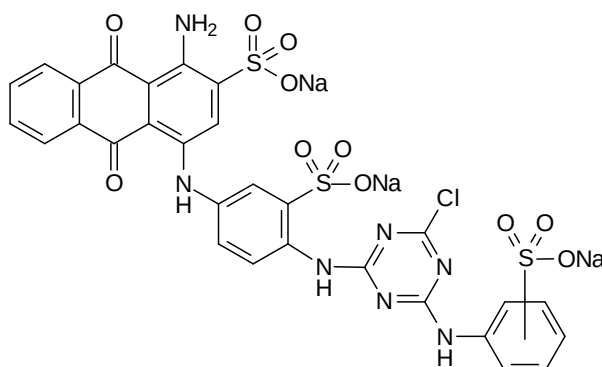


Abbildung 4.31: Struktur des kompetitiven NAD-Glycohydrolase-Inhibitors 3GA.

Um die zelluläre NAD-Glycohydrolase-Aktivität zu hemmen, wurden Jurkat T-Lymphocyten für 20 min in Gegenwart von 100 μM 3GA oder einer Vehikelkontrolle in Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben mit ConA oder einer Vehikelkontrolle stimuliert, ADPR aus den Zellen extrahiert und mittels RP-HPLC quantifiziert.

In Abb. 4.32 ist zu erkennen, daß es nach Vorinkubation der Jurkat-Zellen mit 3GA bei ConA-Stimulation nicht mehr zu einer Steigerung in der Konzentration von ADPR kam. Durch Behandlung mit dem NAD-Glycohydrolase-Inhibitor 3GA konnte die ADPR-Bildung blockiert werden (Abb. 4.32).

Nachdem gezeigt werden konnte, daß 3GA die ConA-induzierte Bildung von ADPR unterdrücken kann, wurde der Inhibitor verwendet, um zu untersuchen, ob es bei Inhibition der ADPR-Bildung zur Veränderung des Ca^{2+} -Signals bei ConA-Stimulation kommt. Dazu wurde ein ähnliches Protokoll verwendet wie in Abb. 4.29 beschrieben: Mit Fura-2 beladene Jurkat-Zellen wurden in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} stimuliert, und erst

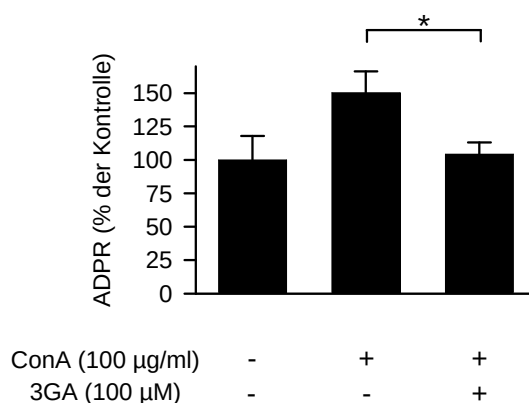


Abbildung 4.32: Inhibition der ConA-vermittelten ADPR-Bildung durch den NAD-Glycohydrolase-Inhibitor 3GA. Jurkat T-Lymphocyten wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von 100 μM 3GA für 20 min vorinkubiert, und danach mit ConA oder einer Vehikel-Kontrolle stimuliert. Die ADPR-Konzentrationen wurden durch HPLC-Analysen wie in der Legende zu Abb. 4.20 beschrieben quantifiziert, und auf die Kontrollen ohne Stimulation und ohne Vorinkubation mit 3GA normiert ($n = 7 - 12$, Mittelwerte $\pm$ SEM, $*p < 0.05$).

nach Ende der Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern wurde extrazellulär 1.35 mM Ca^{2+} zugegeben, um auf diese Weise den Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Freisetzung aus Speichern bzw. durch Einstrom aus dem Extrazellulärraum differenzieren zu können.

Bei Inhibition der ADPR-Bildung durch Vorinkubation mit 3GA kam es zu einer Vermin-

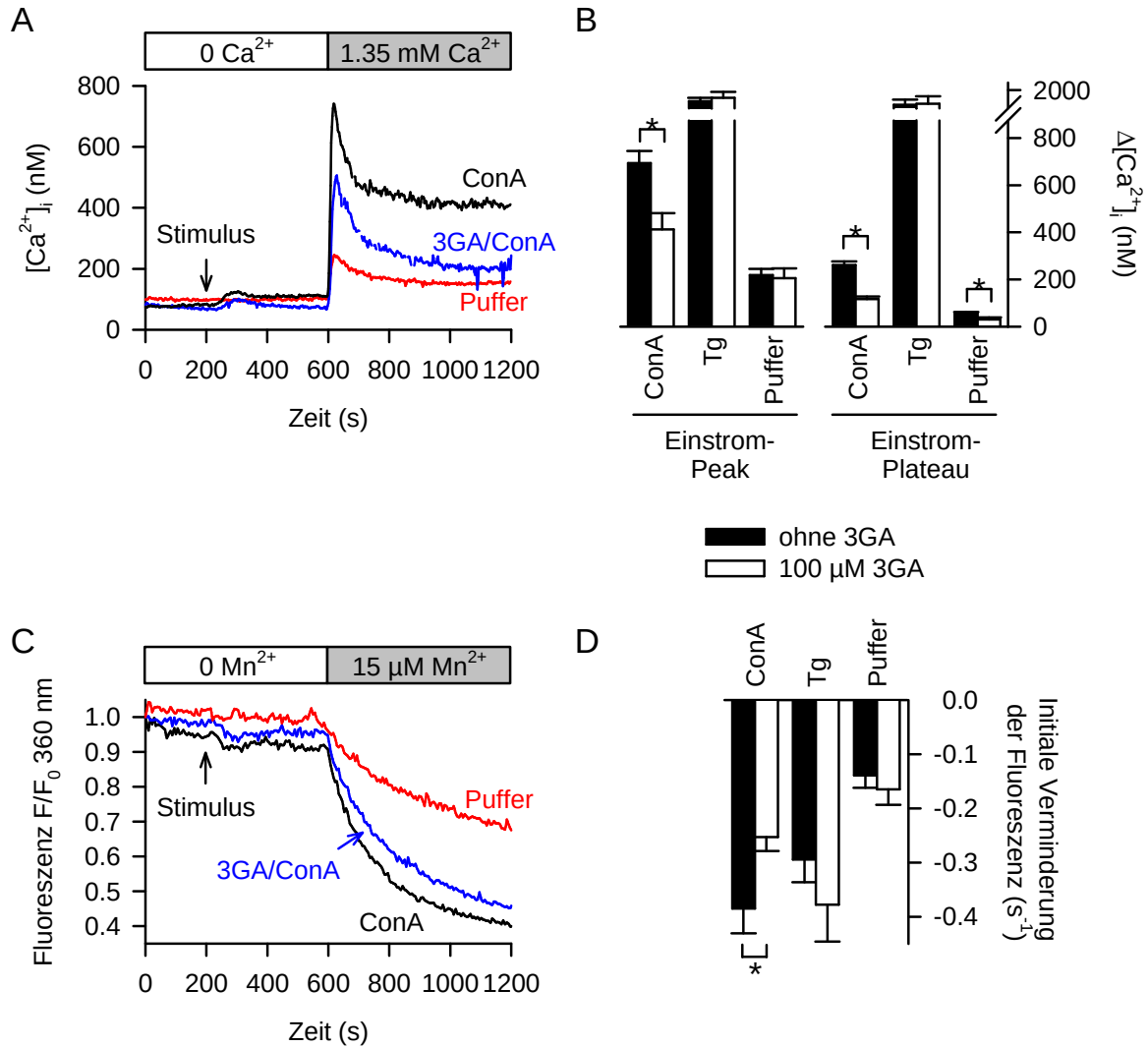


Abbildung 4.33: Verminderung des ConA-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms bei Inhibition der ADPR-Bildung mit 3GA. (A) $2 \cdot 10^6$ Jurkat T-Lymphocyten wurden mit Fura-2 beladen und wie in der Legende zu Abb. 4.32 angegeben mit oder ohne 3GA vorinkubiert. Bei 200sec wurden die Zellen mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ConA, 100 nM Thapsigargin (nicht dargestellt) oder einer Vehikel-Kontrolle in nominell Ca^{2+} -freiem Puffer stimuliert, und bei 600sec wurde extrazellulär 1.35 mM Ca^{2+} zugegeben. (B) Die Differenzen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration vor und nach Ca^{2+} -Zugabe wurden für den Peak und die Plateau-Phase der in (A) abgebildeten Messungen quantifiziert ($n = 3 - 20$, Mittelwerte $\pm$ SEM, $*p < 0.05$). (C) Jurkat-Zellen wurden wie in (A) mit Fura-2 beladen und mit oder ohne 3GA vorinkubiert. Bei 200sec erfolgte die Stimulation der Zellen mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ConA, 100 nM Thapsigargin (nicht dargestellt) oder einer Vehikel-Kontrolle in Abwesenheit von extrazellulären Ca^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen. Bei 600sec wurde extrazellulär 15 μM Mn^{2+} zugegeben, um die Abnahme der Fura-2-Fluoreszenz durch den Einstrom von Mn^{2+} zu messen. (D) Die initiale Verminderung der Fura-2-Fluoreszenz bei Mn^{2+} -Zugabe der Messungen in (C) wurde durch lineare bzw. exponentielle Regression vor bzw. nach Mn^{2+} -Zugabe bestimmt ($n = 6 - 19$, Mittelwerte $\pm$ SEM, $*p < 0.05$).

derung des durch ConA ausgelösten Ca^{2+} -Einstroms (Abb. 4.33). Davon waren sowohl die Peak- als auch die Plateau-Phase des Ca^{2+} -Einstroms betroffen (Abb. 4.33 A, B). Das durch ConA unter 3GA-Inhibition erzeugte Ca^{2+} -Signal war im beobachteten Zeitraum höher als der Leck-Einstrom (rote Kurve in Abb. 4.33 A). In Abb. 4.33 B sind die Differenzen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit und ohne Inhibition der ADPR-Bildung durch 3GA dargestellt. Als Kontrolle wurde eine Stimulation der Zellen mit Thapsigargin verwendet, um den Speicher-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom durch I_{CRAC} auszulösen. Wie aus Abb. 4.33 B ersichtlich ist, verminderte die Vorinkubation der Zellen mit 3GA den kapazitativen Ca^{2+} -Einstrom bei Stimulation mit Thapsigargin nicht. Dies belegte, daß die Wirkung von 3GA nicht auf eine unspezifische Inhibition des Ca^{2+} -Einstroms zurückzuführen war.

Um Sekundär-Effekte der Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf den Ca^{2+} -Einstrom auszuschließen (z. B. die positive Regulation von TRPM2 durch Erhöhung der lokalen Ca^{2+} -Konzentration (McHugh et al., 2003) oder die durch Ca^{2+} induzierte Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (Rich und Langer, 1975)), wurde eine weitere Meßmethode verwendet, um den Ca^{2+} -Einstrom ohne Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu quantifizieren. Dabei wurde ausgenutzt, daß die Fluoreszenz von Fura-2 durch Bildung eines hoch-affinen Komplexes von Mn^{2+} mit Fura-2 drastisch vermindert werden kann (Quenching). Da Mn^{2+} für die meisten Ionenkanäle eine ähnliche Permeabilität wie Ca^{2+} besitzt (Kass et al., 1990; Glennon et al., 1992; Shibuya und Douglas, 1992), kann durch Verminderung der Fura-2-Fluoreszenz bei Mn^{2+} -Zugabe der Einstrom durch Ca^{2+} -Kanäle indirekt und ohne Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gemessen werden (Abb. 4.33 C). Durch den Einstrom von Mn^{2+} kommt es darüber hinaus nicht zur Aktivierung Ca^{2+} -bindender Proteine, so daß Sekundäreffekte durch die Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ weitgehend ausgeschlossen werden können. Als Maß für den Ca^{2+} -Einstrom diente bei diesen Messungen die initiale Verminderung der Fura-2-Fluoreszenz am isosbestischen Punkt unmittelbar nach Zugabe von Mn^{2+} . Dieser Wert wurde berechnet, indem eine lineare Regression *vor* und eine exponentielle Regression *nach* der Zugabe von Mn^{2+} durchgeführt wurden. Danach wurden die Steigungen beider Regressionen zum Zeitpunkt der Zugabe von Mn^{2+} bestimmt, und die Differenz aus beiden Steigungen ermittelt (Abb. 4.33 D). Hier ist zu erkennen, daß die Inhibition der ADPR-Bildung bei Stimulation mit ConA zu einer Verminderung des Ca^{2+} -Einstroms führte, während die Kontrolle bei Stimulation mit Thapsigargin durch 3GA-Vorinkubation nicht signifikant verändert wurde. Auch bei diesen Experimenten wurde deutlich, daß in Abwesenheit eines Stimulus ein Leckstrom von Mn^{2+} in die Zellen auftrat (rote Kurve in Abb. 4.33 C).

4.2.6. Pharmakologische Charakterisierung der am ConA-vermittelten Calcium-Einstrom beteiligten Signalsysteme

Um die am ConA-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom beteiligten Signalsysteme genauer zu charakterisieren, wurden $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen mit weiteren Inhibitoren durchgeführt. Dabei wurde deren Wirkung auf den durch ConA-Stimulation ausgelösten Ca^{2+} -Einstrom in Jurkat-Zellen untersucht. Verwendet wurde hierfür der kompetitive CD38-Inhibitor ara-F-NAD

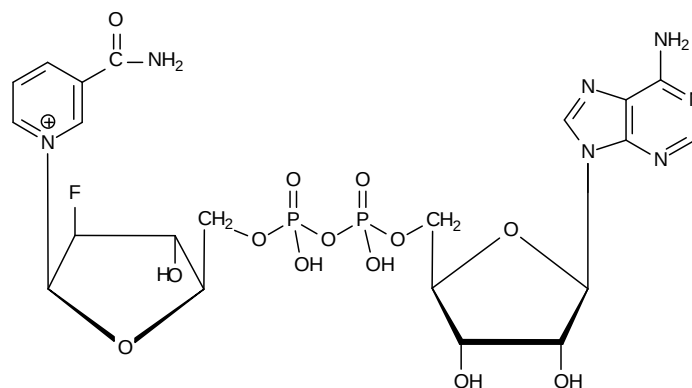


Abbildung 4.34: Struktur des kompetitiven CD38-Inhibitors ara-F-NAD.

(Nicotinamid-2'-deoxy-2'-fluoroarabinosid-adenin-dinucleotid, [Muller-Steffner et al. \(1992\)](#)), der schon in niedrigen Konzentrationen die Ekto-Enzymaktivität von CD38 komplett inhibiert. Die chemische Struktur von ara-F-NAD ist in Abb. 4.34 abgebildet.

Bei CD38 handelt es sich um ein Typ II-Transmembran-Protein ([Schuber und Lund, 2004](#)), das als enzymatische Aktivität hauptsächlich NADase-, aber zu einem geringen Anteil auch ADP-Ribosylcyclase-Aktivität besitzt. Das aktive Zentrum von CD38, das im N-terminalen Bereich liegt, befindet sich jedoch außerhalb der Zelle. Diese Tatsache ist als „topologische Paradoxon“ bekannt (Übersicht in [De Flora et al. \(2004\)](#)). Aus diesem Grund wird eine Beteiligung von CD38 an der Erzeugung intrazellulärer Ca^{2+} -mobilisierender Botenstoffe

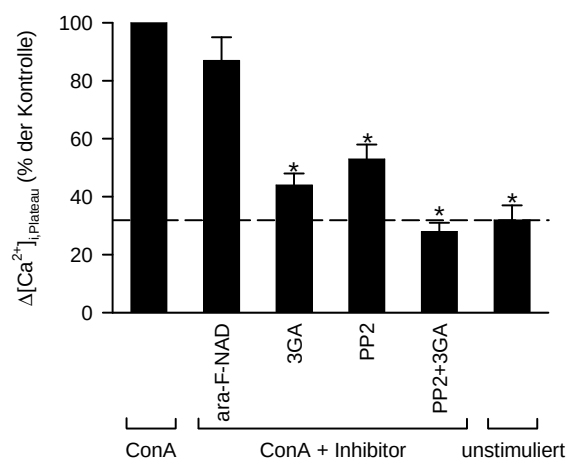


Abbildung 4.35: Effekte verschiedener Inhibitoren auf das ConA-vermittelte Ca^{2+} -Plateau. Jurkat T-Lymphocyten wurden mit Fura-2 beladen und danach mit ConA in nominell Ca^{2+} -freiem Puffer stimuliert. Der Ca^{2+} -Einstrom wurde durch Zugabe von extrazellulärem Ca^{2+} wie in der Legende zu Abb. 4.33 angegeben ermittelt und die Differenz zwischen Basal- und Plateau-Wert auf Tagesskontrollen ohne Inhibition normiert (linker Balken). Zur pharmakologischen Charakterisierung der beteiligten Signalwege wurden die Zellen mit dem CD38-Inhibitor ara-F-NAD (200 nM), dem NAD-Glycohydrolase-Inhibitor 3GA (100 μM) und/oder dem Tyrosin-Kinase-Inhibitor PP2 (1 μM) vorinkubiert. Man beachte, daß auch ohne Stimulation ein Leck-Einstrom von Ca^{2+} auftrat (rechter Balken, vgl. Abb. 4.29 C), der durch die gestrichelte Linie angedeutet ist ($n = 4 - 15$, Mittelwerte $\pm$ SEM, * $p < 0.05$ zur ConA-Kontrolle).

kontrovers diskutiert.

In Abb. 4.35 ist ersichtlich, daß eine Inhibition der extrazellulären CD38-Aktivität durch ara-F-NAD keinen Effekt auf das ConA-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Plateau hatte. Hingegen führte die Inhibition der ADPR-Bildung durch 3GA, wie schon in Abb. 4.33 dargestellt, zu einer Reduktion des $[Ca^{2+}]_i$ -Plateaus (Abb. 4.35). Außerdem wurde der Tyrosin-Kinase-Inhibitor PP2 (Hanke et al., 1996) verwendet, der spezifisch Tyrosin-Kinasen der Src-Familie inhibiert. Die Blockade der Src-Tyrosin-Kinasen (p59^{fyn} und p56^{lck} in T-Zellen) erzeugte ebenfalls eine signifikante Verminderung des $[Ca^{2+}]_i$ -Plateaus (Abb. 4.35). Die Inhibitions-Effekte von 3GA und PP2 waren additiv, weil bei gleichzeitiger Inhibition der NADase- und Tyrosin-Kinase-Aktivitäten das $[Ca^{2+}]_i$ -Plateau so drastisch vermindert wurde, daß der Plateau-Wert dem Leck-Einstrom von Ca^{2+} ohne Stimulation mit ConA entsprach (Abb. 4.35).

4.2.7. Physiologische Relevanz des ADPR/TRPM2-Systems bei der Apoptose von T-Lymphocyten

Um zu untersuchen, ob das ADPR/TRPM2-System in T-Lymphocyten auch eine physiologische Bedeutung hat, also eine den Ca^{2+} -Signalen nachgeschaltete Antwort hervorruft, wurde der durch ConA-Stimulation ausgelöste Zelltod in Jurkat-Zellen untersucht. Es ist bekannt, daß durch Behandlung mit hohen ConA-Konzentrationen in unterschiedlichen Zell-Typen Apoptose induziert werden kann (Nagase et al., 1998; Suen et al., 2000).

In Kontroll-Versuchen (Abb. 4.36 A) wurden Jurkat-Zellen ohne Zusätze, nach Vorin-

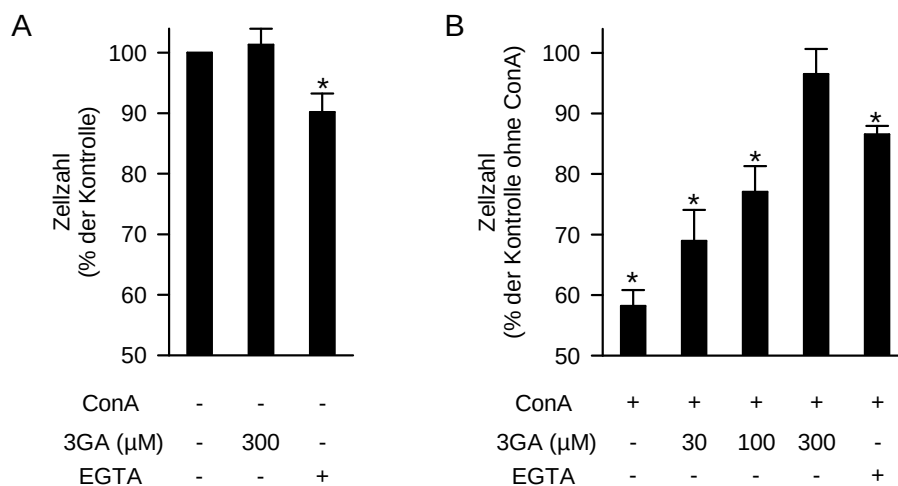


Abbildung 4.36: Verminderung des durch ConA ausgelösten Zelltodes bei Inhibition der ADPR-Bildung. (A) Jurkat T-Zellen wurden ohne Zusatz, mit 300 μM 3GA oder mit 1 mM EGTA für 3 Stunden inkubiert, danach mit einem CASY-Zellzähler automatisch gezählt und die Zellzahl auf Tageskontrollen ohne Zusätze normiert ($n = 3 - 5$, Mittelwerte $\pm$ SEM, $*p < 0.05$ zur Kontrolle ohne Zusatz). (B) Jurkat T-Zellen wurden zur Inhibition der ADPR-Bildung mit unterschiedlichen Konzentrationen 3GA vorinkubiert, oder 1 mM EGTA wurde zu den Ansätzen gegeben, um extrazelluläres Ca^{2+} zu komplexieren. Danach wurden die Zellen für 3 Stunden mit 100 μg/ml ConA inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen automatisch gezählt und auf Tageskontrollen mit gleichem Inhibitor, aber ohne ConA normiert ($n = 3 - 5$, Mittelwerte $\pm$ SEM, $*p < 0.05$ zur Kontrolle ohne ConA).

kubation mit 3GA oder in Gegenwart von EGTA zur Komplexierung der extrazellulären Ca^{2+} -Ionen für 3 Stunden inkubiert und anschließend die Zellzahlen bestimmt. Die Vorbehandlung mit 3GA hatte keinen Effekt auf die Zellzahl, während die Ca^{2+} -Depletion durch EGTA eine leichte Verminderung um etwa 10 % bewirkte.

Bei Behandlung von Jurkat-Zellen mit ConA für drei Stunden wurde eine Reduktion der Zellzahl auf etwas über die Hälfte gefunden (Abb. 4.36 B, linker Balken). Bei den in Abb. 4.36 B dargestellten Versuchen wurden die Zellzahlen bei Behandlung mit ConA jeweils auf Kontrollen mit den gleichen Zusätzen, aber ohne ConA-Stimulation normiert. Die durch ConA-Behandlung ausgelöste Zellzahl-Verminderung konnte dosisabhängig durch Inhibition der ADPR-Bildung mit 3GA reduziert werden. Dies zeigte, daß bei ConA-Stimulation der Ca^{2+} -Einstrom durch Aktivierung des ADPR/TRPM2-Systems für die Einleitung der Apoptose notwendig war. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden Jurkat-Zellen unter Zusatz von EGTA zur Komplexierung von extrazellulärem Ca^{2+} mit ConA behandelt. Auch hier kam es zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl-Verminderung im Vergleich zur Kontrolle in Gegenwart von Ca^{2+} .

5. Diskussion der Ergebnisse

5.1. Analytik von NAADP

Eine Funktion von NAADP als sekundärer Botenstoff zur Erzeugung zellulärer Ca^{2+} -Signale wird seit längerem diskutiert (Rutter, 2003; Cancela et al., 2003; Chini und De Toledo, 2002; Genazzani und Billington, 2002; Guse, 2002). Um nachzuweisen, daß es sich bei NAADP tatsächlich um einen sekundären Botenstoff handelt, sind nach Chini und De Toledo (2002) folgende Kriterien zu erfüllen:

- Zelluläre NAADP-Konzentrationen müssen bekannt sein.
- Der physiologische Synthese-Weg von NAADP muß charakterisiert worden sein.
- Eine Kopplung der intrazellulären NAADP-Konzentration an externe oder interne Stimuli muß gezeigt worden sein.
- Eine Korrelation zwischen einer erhöhten NAADP-Konzentration nach Stimulation und der Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern muß nachgewiesen worden sein.

Um eine mögliche Rolle von NAADP als sekundärer Botenstoff zu untersuchen, ist daher ein Verfahren zu seiner Quantifizierung unbedingt notwendig. Aufgrund der Dosis-Wirkungskurven für NAADP (Übersicht in Patel et al. (2001); Cancela et al. (2003); Berg et al. (2000)) und bereits publizierter NAADP-Konzentrationen in Säugetier-Zellen (Masgrau et al., 2003; Churamani et al., 2004) ist davon auszugehen, daß sich zelluläre NAADP-Konzentrationen im niedrigen nanomolaren Bereich bewegen. Aus diesem Grund ist eine sehr hohe Nachweisempfindlichkeit notwendig, um mit einer praktikablen Zellmenge NAADP direkt quantifizieren zu können.

Eine gebräuchliche Methode zur Bestimmung der Konzentrationen intrazellulärer Nucleotide ist RP-HPLC mit UV-Detektion (Übersicht in Werner (1993)). Beispiele dafür stellen die Quantifizierung zellulärer cADPR-Konzentrationen (da Silva et al., 1998a) sowie die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Methode zur Messung zellulärer ADPR-Konzentrationen (siehe Abschnitt 4.2.1) dar. Für die Analytik von NAADP sind solche Methoden jedoch nicht ausreichend empfindlich, da sie typischerweise ein Detektionslimit im Bereich von 5–10 pmol aufweisen (Werner, 1993; da Silva et al., 1998a). Zur Quantifizierung nanomolarer NAADP-Konzentrationen bei Verwendung von 10^9 Jurkat T-Lymphocyten (dies entspricht einem Volumen von etwa 1 l Zellkultursuspension, was aus praktischen Gründen die Obergrenze pro Experiment darstellt) ist aber ein Detektionslimit von nicht mehr als 100 fmol notwendig.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Strategien verfolgt, um eine Methode zur möglichst sensitiven Quantifizierung von NAADP zu entwickeln:

- Umsetzung von NAADP mit Chloroacetaldehyd zu fluoreszierendem 1, N^6 - ϵ -NAADP mit anschließender Auftrennung und Quantifizierung durch RP-HPLC.
- Quantifizierung von NAADP mit einem enzymatischen Assay, bei dem sich in Abhängigkeit der NAADP-Menge ein fluoreszierendes Produkt bildet.

Im folgenden werden diese beiden methodischen Ansätze nacheinander diskutiert und anschließend mit bisherigen Methoden zur Quantifizierung von NAADP verglichen.

5.1.1. HPLC-basierte Analytik von NAADP

Wie in Abschnitt 4.1.1.1 beschrieben, konnte eine HPLC-basierte Methode zur Quantifizierung von NAADP etabliert werden. Dabei wurde gefunden, daß (i) NAADP durch Derivatisierung mit Chloroacetaldehyd zu fluoreszierendem 1, N^6 - ϵ -NAADP umgesetzt werden kann und (ii) diese Methode die Quantifizierung von NAADP-Mengen bis 500 fmol erlaubt.

Chloroacetaldehyd (Ohkura et al., 1994) und Bromoacetaldehyd (Yoshioka et al., 1984) reagieren mit Adenin-Gruppen in Nucleotiden und Nucleosiden zu fluoreszierenden 1, N^6 - ϵ -Derivaten. Diese Derivate können durch RP-HPLC aufgetrennt und quantifiziert werden (Yoshioka et al., 1984; Yoshioka und Tamura, 1976). Als Vorsäulen-Derivatisierung wurden solche Verfahren zur Bestimmung von Adenin sowie der zugehörigen Nucleoside und Nucleotide in komplexen biologischen Proben verwendet (Levitt et al., 1984; Yoshioka et al., 1984). Dabei wurden Detektionslimits von 0.5 – 10 pmol erreicht (Ohkura et al., 1994). Bromoacetaldehyd hat gegenüber Chloroacetaldehyd den Vorteil einer höheren Reaktivität (Yoshioka et al., 1984), ist aber kommerziell nicht erhältlich.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß verschiedene 1, N^6 - ϵ -Derivate durch RP-HPLC mit einer C_{18} -Säule auftrennbar waren, und daß NAADP mit CAA zu 1, N^6 - ϵ -NAADP reagierte. Eine direkte Synthese von 1, N^6 - ϵ -NAADP aus NAADP ist bisher nicht beschrieben worden. Nach Lee und Aarhus (1998) läßt sich 1, N^6 - ϵ -NAADP aus 1, N^6 - ϵ -NADP enzymatisch mit ADP-Ribosylcyclase aus *Aplysia californica* durch Austausch der Nicotinamid-Gruppe gegen Nicotinsäure darstellen. 1, N^6 - ϵ -NAADP läßt sich möglicherweise als Fluoreszenz-Sonde zur Lokalisation intrazellulärer NAADP-Bindungsstellen verwenden, weil es sich bei 1, N^6 - ϵ -NAADP um einen NAADP-Agonisten handelt, der im Seeigel-System die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern auslösen kann (Lee und Aarhus, 1998).

Etheno-Derivate sind relativ schwache Fluorophore mit geringer Quantenausbeute (Leonard, 1993), was das erreichbare Detektionslimit begrenzte. Ein weiteres Problem bei der Derivatisierung von NAADP bestand darin, daß es im 1, N^6 - ϵ -NAADP-Molekül zu einem Quenching der Fluoreszenz der Etheno-Gruppe durch den Nicotinsäure-Rest kam. Dabei

handelte es sich um ein grundsätzliches Problem, das aus der Molekülstruktur von NAADP resultiert und zu einer Verminderung der Sensitivität der Detektion führte.

Aufgrund eines Fluoreszenz-Anstiegs bei Verwendung eines Methanol-Gradienten mußte eine isokratische HPLC-Methode entwickelt werden, um einen konstanten Fluoreszenz-Hintergrund zu gewährleisten. Eine Subtraktion des durch den Gradienten verursachten Fluoreszenz-Hintergrunds war nicht möglich, da dieser dazu nicht reproduzierbar genug war. Unter Verwendung optimierter Reaktionsbedingungen konnten mit der isokratischen HPLC-Methode 500 fmol NAADP in einem Probenvolumen von 100 μ l nachgewiesen werden, was am unteren Ende des in der Literatur genannten Bereichs von 0.5 – 10 pmol ([Ohkura et al., 1994](#)) lag. Eine Kalibrierung zeigte einen linearen Zusammenhang zwischen der eingesetzten NAADP-Menge und der Fläche der erhaltenen 1, N^6 - ϵ -NAADP-Peaks.

Obwohl die Strategie zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit für NAADP durch Fluoreszenzderivatisierung und anschließende RP-HPLC daher grundsätzlich erfolgreich war, konnte das angestrebte Detektionslimit von 100 fmol nicht erreicht werden. Bei der Verwendung von Zellextrakten war außerdem zu vermuten, daß es durch deren Komplexität zur Derivatisierung vieler Adenin-haltiger Verbindungen kommen würde. Eine mangelhafte Auftrennung dieser komplexen Proben war zu erwarten, da HPLC-Analytik unter isokratischen Bedingungen meist eine schlechtere Auftrennung im Vergleich zu einer Gradienten-Elution bietet ([Beinert et al., 1989](#)). Ein weiteres Problem bestand im inhärenten Fluoreszenz-Quenching von 1, N^6 - ϵ -NAADP: Die Detektion geringer 1, N^6 - ϵ -NAADP-Mengen wäre in Proben, die Verbindungen ohne intramolekulares Fluoreszenz-Quenching in ihren 1, N^6 - ϵ -Derivaten (z. B. ATP) enthalten, vermutlich sehr problematisch.

Aus den genannten Gründen wurde die Strategie zur Derivatisierung von NAADP mit CAA und anschließender RP-HPLC mit Fluoreszenz-Detektion nicht weiter verfolgt. Auch in der Literatur sind keine Verfahren beschrieben, in denen zelluläre NAADP-Mengen durch HPLC-Verfahren quantifiziert wurden. NAADP konnte zwar aus Zellextrakten durch HPLC mit einer Anionenaustauscher-Säule zur anschließenden Quantifizierung mit einem Bindungsassay (siehe Abschnitt [5.1.3](#)) vorgereinigt werden ([Churamani et al., 2004](#)). Die NAADP-Synthese durch die Basenaustauschreaktion aus NADP konnte ebenfalls mit dieser Methodik verfolgt werden ([Hohenegger et al., 2002](#)). Eine direkte HPLC-Analyse der in Zellextrakten vorkommenden NAADP-Mengen war aber bisher in keinem Fall möglich.

5.1.2. Quantifizierung von NAADP mit einem Enzym-Assay

Weil durch Vorsäulen-Derivatisierung und RP-HPLC keine ausreichende Empfindlichkeit zum Nachweis von NAADP erreicht werden konnte, wurde eine andere Nachweis-Methode etabliert, bei der durch zyklische Enzym-Reaktionen eine starke Amplifikation des ursprünglichen Signals erfolgte. Mit diesem Verfahren war es möglich, NAADP-Standards bis zu einem Detektionslimit von 25 fmol nachzuweisen, wobei ein linearer Zusammenhang zwischen dem quantifizierten Fluoreszenzsignal und der eingesetzten NAADP-Menge bestand. Außerdem konnte gezeigt werden, daß der etablierte Assay durch einen 1000fachen Überschuß

anderer Substanzen, die in Zellextrakten möglicherweise vorhanden sein könnten, nicht gestört wurde.

Schon seit längerer Zeit sind zyklische Enzym-Assays bekannt, mit denen sich Biomoleküle in geringen Mengen nachweisen lassen. So ist nach [Goldberg et al. \(1969\)](#) cGMP nach Umsetzung zu GTP durch eine zyklische Reaktionsfolge nachweisbar. NAD läßt sich durch einen zyklischen Assay unter Verwendung von Alkohol-Dehydrogenase und Diaphorase quantifizieren ([Kato et al., 1973](#)). Auch zur Detektion von NADP wurden zyklische Enzymreaktionen benutzt. Allgemein wurde dazu wie in der vorliegenden Arbeit eine Kombination von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Diaphorase als Amplifikationssystem verwendet. Von [Stephon et al. \(1992\)](#) wurde die Umsetzung von farblosen *p*-Iodonitrotetrazolium-Violett zum farbigen *p*-Iodonitrotetrazolium-Formazan als Indikator-Reaktion verwendet. Dabei wurde ein Detektionslimit von 600 fmol NADP erreicht ([Stephon et al., 1992](#)). Eine Verbesserung des Assay-Prinzips besteht in der Verwendung von Resazurin als Elektronenakzeptor in der Indikatorreaktion. Das nicht fluoreszierende Resazurin wird dabei durch Reduktion in das stark fluoreszierende Produkt Resorufin umgewandelt. Solche Amplifikationsreaktionen mit Resazurin als Elektronenakzeptor wurden zur Bestimmung von Ameisensäure ([Shahangian et al., 1984](#)) sowie zur Bestimmung von Carnitin ([Matsumoto et al., 1990](#)), beides aus humanem Serum, verwendet.

Zur Etablierung einer Methode für NAADP wurde auf die in der Literatur beschriebenen Enzym-Assays zur Detektion von NADP zurückgegriffen ([Stephon et al., 1992](#); [Wang et al., 1995](#); [Gibon und Larher, 1997](#)). Diese Verfahren wurden verbessert, indem statt der Bildung des farbigen *p*-Iodonitrotetrazolium-Formazans die Umsetzung von Resazurin zu Resorufin als Indikatorreaktion verwendet wurde, weil die Entstehung eines fluoreszierenden Moleküls leicht und sensitiv meßbar ist.

Um NAADP mit einem Enzym-Assay nachweisen zu können, der NADP detektiert, mußte NAADP zuvor in NADP umgewandelt werden. Bereits kurz nach der Identifikation von NAADP als Ca^{2+} -mobilisierende Substanz ([Lee und Aarhus, 1995](#)) wurde festgestellt, daß sowohl die ADP-Ribosylcyclase aus *Aplysia californica* als auch humanes CD38 die Umsetzung von NADP zu NAADP katalysieren können ([Aarhus et al., 1995](#)), wenn auch unter unphysiologischen Bedingungen (d. h. bei einem sauren pH-Wert und in Gegenwart hoher Konzentrationen an Nicotinsäure). Bisher war nicht bekannt, ob sich diese Enzym-Reaktion unter geeigneten Bedingungen auch umkehren läßt. In der vorliegenden Arbeit konnte dies durch HPLC-Analytik gezeigt werden.

Im folgenden wurde die Umwandlungsreaktion von NAADP zu NADP dem Enzym-Assay zum Nachweis von NADP vorgeschaltet. Durch diese Reaktionsfolge war es daher möglich, auf bereits etablierte Methoden zum Nachweis von NADP zurückzugreifen, diese durch Modifikation der Indikatorreaktion zu verbessern, und schließlich zur Quantifizierung von NAADP zu nutzen.

Während der Etablierung des NAADP-Enzym-Assays wurden durch Lee und Mitarbeiter zwei Methoden zur Quantifizierung von cADPR ([Graeff und Lee, 2002a](#)) und NAADP

(Graeff und Lee, 2002b) mit einem ähnlichen Verfahren publiziert. Dabei wurden in beiden Fällen zyklische Enzymreaktionen mit NAD/NADH als Substrat verwendet. Als Amplifikationsenzyme dienten dabei Alkohol-Dehydrogenase und Diaphorase, als Indikator-Reaktion wurde wie in der vorliegenden Arbeit die Bildung von Resorufin aus Resazurin genutzt. Zum Nachweis von cADPR (Graeff und Lee, 2002a) wurde dieses in Gegenwart von Nicotinamid durch die ADP-Ribosylcyclase aus *Aplysia californica* zu NAD umgesetzt, das dann durch die Amplifikationsreaktionen quantifiziert wurde. Dabei betrug das Detektionslimit für cADPR 50–100 fmol pro Reaktionsansatz (Graeff und Lee, 2002a). Die erreichte Empfindlichkeit war damit deutlich besser als die einer HPLC-basierten Nachweismethode für cADPR (da Silva et al., 1998a) und vergleichbar mit einer Radioimmunassay-Methode (Takahashi et al., 1995). Dies zeigt die Leistungsfähigkeit zyklischer Enzym-Assays, die Amplifikationsreaktionen verwenden.

Der von Graeff und Lee (2002b) entwickelte NAADP-Assay unterscheidet sich von dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen in mehreren Punkten: NAADP wurde nicht zu NADP umgesetzt und dann direkt quantifiziert, sondern zuerst durch eine Alkalische Phosphatase an der 2'-Position der Ribose in der Adenosin-Gruppe zu NAAD dephosphoryliert. Anschließend wurde das entstandene NAAD durch Nicotinamid-Mononucleotid-Adenylyltransferase (NMN-AT) in Gegenwart eines hohen Überschusses an Nicotinamid-Mononucleotid zu NAD konvertiert. Dieses wurde dann wie beim Enzym-Assay für cADPR (Graeff und Lee, 2002a) nachgewiesen. Das Detektionslimit der Methode betrug 300 fmol NAADP. Im Vergleich zu dem in dieser Arbeit beschriebenen NAADP-Assay hatte die Methode nach Graeff und Lee (2002b) mehrere Nachteile:

1. Für den Assay wurde das Enzym NMN-AT benötigt, das kommerziell nicht erhältlich ist und aus Schweine-Leber in einer aufwendigen Prozedur (Magni et al., 1997) aufgereinigt werden muß.
2. Zur Umsetzung von NAADP über NAAD zu NAD waren zwei enzymatische Reaktionen notwendig, die Inkubationszeiten über Nacht erforderten. Im Vergleich ist die Umsetzung von NAADP zu NADP mit nur einem Enzym und innerhalb von einer Stunde möglich.
3. Das Detektionslimit für NAADP lag um etwa eine Größenordnung über dem, das mit dem hier beschriebenen Assay erreicht wurde.

Ein Vorteil der Methode zur NAADP-Messung nach Graeff und Lee (2002b) bestand darin, daß mit diesem Assay auch die Bestimmung von Nicotinsäure im mikromolaren Konzentrationsbereich möglich war. Bisher war kein anderer enzymatischer Assay bekannt, der die Messung von Nicotinsäure ermöglichte.

Ein grundsätzliches Problem bei der Quantifizierung von Biomolekülen durch Enzym-Assays besteht in der Anwesenheit möglicherweise störender Substanzen in den Proben. Bei dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten NAADP-Assay war es entscheidend, daß

kein NADP in den Proben enthalten war. Dieses wäre durch die Amplifikationsreaktionen nachgewiesen worden und hätte so zu falsch positiven Signalen geführt. Aus diesem Grund wurde vor der Reaktion zur Umsetzung von NAADP zu NADP ein enzymatischer Verdau der Proben mit NADase durchgeführt. NAADP wird nach Graeff und Lee (2002b) durch NADasen nicht abgebaut. Dies konnte auch durch eigene Versuche bestätigt werden: Bei der Inkubation von NAADP-Standards mit NADase und anschließender Quantifizierung kam es zwar zu einem Verlust eines Teils des Signals im Vergleich zu Kontrollen. Vermutlich war dies aber eher darauf zurückzuführen, daß es bei der Hitzeinaktivierung zu einer Co-Präzipitation von NAADP mit dem denaturierten Enzym kam. Letzlich führte daher der NADase-Verdau bei der Quantifizierung von Standards zu einem gewissen Verlust der Empfindlichkeit.

Um sicherzustellen, daß geringe NADP-Kontaminationen, die nach dem NADase-Verdau noch vorhanden waren, die Meßergebnisse nicht verfälschten, wurden alle Reaktionen in An- und Abwesenheit der ADP-Ribosylcyclase in der Umwandlungsreaktion von NAADP zu NADP durchgeführt. Die aus den Ansätzen ohne Cyclase erhaltenen Fluoreszenzwerte stellten den NADP-Hintergrund dar und wurden zur Korrektur der mit Cyclase gemessenen Fluoreszenzwerte verwendet. Auf diese Weise konnte das spezifische NAADP-Signal ermittelt und vom NADP-Hintergrund unterschieden werden.

Um kontaminierende Substanzen zu entfernen, wurde von Graeff und Lee (2002b) eine Enzym-Mischung aus NADase und Apyrase verwendet. Es konnte gezeigt werden, daß 12 andere Nucleotide nicht mit der NAADP-Bestimmung interferierten (Graeff und Lee, 2002b). In ähnlichen Versuchen wurden in der vorliegenden Arbeit 19 Nucleotide und andere Substanzen auf eine Interferenz mit dem NAADP-Assay untersucht. Dabei wurde bei Verwendung eines 1000fachen Überschusses in keinem Fall eine Abweichung von mehr als 10% gegenüber den Kontrollen gefunden. Da durch die Vorreinigung der Zellextrakte aus Jurkat-Zellen durch Festphasenextraktion an einer Anionenaustauscher-Matrix andere Komponenten der Zellextrakte zusätzlich abgereichert wurden, war eine Interferenz durch störende Substanzen sehr unwahrscheinlich.

5.1.3. Bestimmung intrazellulärer NAADP-Konzentrationen

Die von Graeff und Lee (2002b) entwickelte Methode zur Messung von NAADP wurde nur mit NAADP-Standards durchgeführt, jedoch nicht mit Zellextrakten als Proben. Zur Quantifizierung von NAADP in Zellextrakten konnte bisher nur ein kompetitiver radioaktiver Bindungsassay mit Seeigelei-Homogenaten und [^{32}P]-NAADP durchgeführt werden (Billington et al., 2002; Churamani et al., 2004). Bei diesem Verfahren werden Bindungsstellen für NAADP in Seeigelei-Homogenaten (Billington und Genazzani, 2000) ausgenutzt, deren molekulare Identität bis heute ungeklärt ist. Der NAADP-Rezeptor in Seeigeleiern konnte zwar initial charakterisiert (Berridge et al., 2002b; Dickinson und Patel, 2003; Churamani et al., 2005), jedoch bisher nicht zur Homogenität aufgereinigt werden. Zur Bestimmung von NAADP-Konzentrationen wird bei dieser Methode die irreversible Bindung von NAADP an die NAADP-Bindungsstellen in den Seeigelei-Homogenaten (Billington und Genazzani, 2000)

ausgenutzt.

Mit dieser Methode wurde in aktivierten Spermien aus Seeigeln eine NAADP-Konzentration von $4\mu\text{M}$ bestimmt (Billington et al., 2002). Unter Verwendung der gleichen Methode konnten Masgrau et al. (2003) zeigen, daß Stimulation von β -Pankreas-Zellen mit Glucose zu einer Erhöhung der intrazellulären NAADP-Menge führte. Nach weiterer Verbesserung der Methode konnten durch Churamani et al. (2004) die Konzentrationen von NAADP in Erythrocyten (16 nM), Hepatocyten aus Ratten (4.5 nM) und *E. coli*-Zellen (2.5 nM) quantifiziert werden.

Im Vergleich mit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methode weist der kompetitive Bindungsassay deutliche Nachteile auf: Für die Durchführung werden Homogenate aus Seeigeleiern benötigt, die kommerziell nicht erhältlich sind. Ferner muß in einer aufwendigen Synthese $[^{32}\text{P}]$ -NAADP hergestellt werden, was anschließend eine umfangreiche, HPLC-basierte Reinigung erfordert (Galione et al., 2000). $[^{32}\text{P}]$ -NAADP ist außerdem wegen seiner radioaktiven Strahlung und der kurzen Halbwertszeit schwer zu handhaben.

Als Extraktionsmethode für NAADP aus Zellen wurde von Churamani et al. (2004) eine Lyse der Zellen in 10%iger Trichloressigsäure verwendet. Nach Entfernung der präzipitierten Proteine wurden die Proben durch Extraktion mit Diethylether neutralisiert und die Nucleotide durch Anionenaustauscher-Chromatographie aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit TFA-Lösungen steigender Konzentration, womit eine Wiederfindung von 88% erreicht wurde. Anschließend wurden die Proben gefriergetrocknet und mit NADase und Apyrase behandelt, um interferierende Substanzen zu entfernen. Dieses Verfahren ist im Prinzip mit dem in dieser Arbeit verwendeten Protokoll zur NAADP-Extraktion vergleichbar: Hierbei wurde ebenfalls eine Extraktion mit Trichloressigsäure, eine Neutralisation mit Diethylether und eine Festphasen-Extraktion mit einer Anionenaustauscher-Matrix und Trifluoressigsäure als Elutionsmittel durchgeführt. Der enzymatische Verdau vor dem zyklischen Enzym-Assay erfolgte hingegen nur durch NADase. Möglicherweise könnte das Protokoll dadurch verbessert werden, daß zusätzlich eine enzymatische Behandlung mit Apyrase durchgeführt wird.

Beide Meßverfahren erwiesen sich als sensitiv genug, um damit zelluläre NAADP-Konzentrationen im niedrigen nanomolaren Bereich quantifizieren zu können. Mit dem zyklischen NAADP-Assay können NAADP-Mengen von 25 fmol nachgewiesen werden, was einer Konzentration von 125 pM in der Probe entspricht. Die sigmoidale Eichkurve des Radioimmunoassays (Churamani et al., 2004) gestattet keine direkte Ermittlung eines Detektionslimits, weshalb die Empfindlichkeit nicht direkt mit der des NAADP-Assay vergleichbar ist. Durch den sigmoidalen Verlauf der Eichkurve ist eine Bestimmung von sehr hohen oder sehr niedrigen NAADP-Konzentrationen außerhalb des linearen Bereichs der Kurve von 100 pM bis 10 nM jedoch nur ungenau möglich. Ein grundsätzliches Problem eines Bindungsassays mit Zellhomogenaten besteht darin, daß eine metabolische Aktivität der Homogenate nicht ausgeschlossen werden kann. Daher ist es prinzipiell möglich, daß es während der Inkubation zur Bindung von NAADP an den Rezeptor zu einer Metabolisierung des NAADP kommt, was zu einer Verfälschung der Meßergebnisse führen würde.

Mit dem entwickelten Enzym-Assay wurden mehrere Bestimmungen basaler NAADP-Konzentrationen in unstimulierten Jurkat T-Lymphocyten durchgeführt. Dabei wurde eine mittlere intrazelluläre NAADP-Konzentration von 6.6 nM ermittelt. Dieser Wert lag im gleichen Bereich wie die in anderen eukaryontischen Zellen gefundenen Konzentrationen von 4.5 – 16 nM (Churamani et al., 2004), was die Eignung des entwickelten Assays zur Messung intrazellulärer NAADP-Konzentrationen zeigte. Mit dieser Methode war es daher erstmals möglich, die Konzentration von NAADP in Zellen ohne die Verwendung von Seeigle-Homogenaten und [^{32}P]-NAADP zu bestimmen.

Die Basal-Konzentration von NAADP in Jurkat T-Lymphocyten ist bisher mit keinem anderen Verfahren quantifiziert worden, weshalb ein Vergleich des in dieser Arbeit gefundenen Wertes nicht möglich ist. Aus Mikroinjektions-Experimenten mit den gleichen Zellen ist aber bekannt, daß eine Injektion von 50 – 100 nM NAADP zu einer raschen Erzeugung globaler Ca^{2+} -Signale durch Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speicher führte (Berg et al., 2000). Die Injektion von NAADP-Lösungen niedrigerer Konzentration (30 nM) löste hingegen zuerst subzelluläre Ca^{2+} -Signale aus, die verzögert auch in globale Signale übergingen (Dammermann und Guse, 2005). Aus diesen Daten folgt, daß der ermittelte NAADP-Basalwert von 6.6 nM unterhalb der Konzentrationen lag, die zelluläre Ca^{2+} -Signale hervorrufen können, und sich damit in einem biologisch sinnvollen Bereich befand.

Zur Berechnung der intrazellulären NAADP-Konzentration wurde das mit einem Zellzähler bestimmte durchschnittliche Zellvolumen verwendet. Dabei konnte nicht berücksichtigt werden, daß in der Zelle feste Strukturen vorhanden sind, so daß das Verteilungsvolumen für NAADP vermutlich kleiner als das Zellvolumen war. Außerdem war nicht auszuschließen, daß in der Zelle lokal höhere Konzentrationen an NAADP vorliegen. Solche lokalen Konzentrationsunterschiede sind aber mit den bisher zur Verfügung stehenden Techniken für NAADP nicht analysierbar.

Die ermittelte basale NAADP-Konzentration läßt nur schwer mit weiteren publizierten NAADP-Konzentrationen vergleichen, die auf die Proteinmengen der Proben normiert wurden. Von Masgrau et al. (2003) wurden NAADP-Mengen in β -Pankreas-Zellen der Maus vor und nach Stimulation mit Glucose bestimmt. Dabei wurde ein Basalwert von etwa 12 pmol/mg Protein ermittelt, und eine Verdopplung nach Stimulation für 10 min gefunden. In diesen Versuchen konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß zelluläre NAADP-Konzentrationen durch physiologische Stimulation ansteigen. In Acinus-Zellen des Pankreas der Maus wurde eine basale NAADP-Konzentration von etwa 0.5 pmol/mg Protein ermittelt, die bereits 5 sec nach Stimulation der Zellen mit Cholecystokinin auf das etwa 6fache anstieg (Yamasaki et al., 2005b). Danach fiel die NAADP-Konzentration innerhalb von einer Minute wieder auf den Basalwert ab. Stimulation der Zellen mit Acetylcholin hatte dagegen keine Erhöhung der NAADP-Konzentration zur Folge.

In ersten Versuchen wurden Änderungen der NAADP-Konzentration in Jurkat T-Lymphocyten nach Stimulation mit dem monoklonalen Antikörper OKT3 gemessen, der eine quasi-physiologische Aktivierung des T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplexes bewirkt. Dabei wurde eine

rasche Erhöhung der basalen NAADP-Konzentration bereits nach 20 sec gefunden, die für mindestens 20 min erhalten blieb (Sören Bruhn, Andreas H. Guse, persönliche Mitteilung). Wenn sich diese Werte in weiteren Versuchen bestätigen lassen, würde dies auf eine Funktion von NAADP bei der Erzeugung von Ca^{2+} -Signalen in T-Zellen hindeuten.

Die Ergebnisse von Masgrau et al. (2003) und Yamasaki et al. (2005b) sowie die ersten Versuche zur stimulationsabhängigen Konzentrationsänderung von NAADP in T-Lymphocyten deuten darauf hin, daß es sich bei NAADP um einen sekundären Botenstoff handeln könnte. Damit sind zwei der Kriterien nach Chini und De Toledo (2002) erfüllt: Zelluläre NAADP-Konzentration sind bekannt und meßbar, und eine stimulationsabhängige Erhöhung konnte gezeigt werden. Der physiologische Syntheseweg von NAADP ist dagegen noch nicht genau charakterisiert, obwohl eine Beteiligung von CD38 an der Synthese postuliert wurde (Chini et al., 2002), und am Abbau vermutlich eine durch Ca^{2+} regulierte, für die 2'-Position spezifische Phosphatase beteiligt ist (Berridge et al., 2002a). Um einen kausalen Zusammenhang zwischen stimulationsabhängiger NAADP-Bildung und Ca^{2+} -Freisetzung zu zeigen, wäre die Synthese von membranpermeablen NAADP-Antagonisten sehr nützlich. Mit Hilfe solcher Substanzen könnten Ca^{2+} -Signale in intakten Zellen unter Stimulationsbedingungen untersucht werden, die zu einer Erhöhung der NAADP-Konzentration führen, um so die Bedeutung des NAADP-Systems für die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern zu untersuchen. Zusammenfassend konnte durch die in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnisse die Vermutung erhärtet werden, daß es sich bei NAADP um einen Ca^{2+} -mobilisierenden Botenstoff handelt.

5.2. Funktion von ADPR als Calcium-mobilisierender Botenstoff in T-Zellen

In den letzten Jahren erlangte ADPR zunehmend Aufmerksamkeit als putativer Botenstoff, der verschiedene Plasmamembran-Ionenkanäle reguliert. Zuerst wurde eine modulatorische Wirkung von ADPR auf Ca^{2+} -aktivierte K^{+} -Kanäle in Glattmuskel-Zellen aus Coronar-Arterien gezeigt (Li et al., 1998). Später wurde ADPR als Agonist des Ionenkanals TRPM2 beschrieben (Perraud et al., 2001; Sano et al., 2001; Wehage et al., 2002). Zwar wird eine Beteiligung von TRPM2 an der Erzeugung intrazellulärer Ca^{2+} -Signale vermutet (Perraud et al., 2004; Ayub und Hallett, 2004), die physiologische Rolle seines Agonisten ADPR ist jedoch unklar. Zelluläre ADPR-Konzentrationen konnten bisher in Zellen, die TRPM2 exprimieren, nicht bestimmt werden. Daher war es entscheidend, eine Methode zu entwickeln, die die Quantifizierung von zellulärem ADPR erlaubt, um so einen Einblick in die physiologische Funktion dieses Moleküls zu erhalten und seine mögliche Rolle in der Generierung zellulärer Ca^{2+} -Signale zu untersuchen.

5.2.1. Quantifizierung intrazellulärer ADPR-Konzentrationen durch HPLC

In der vorliegenden Arbeit wurde eine HPLC-Methode entwickelt, die die Quantifizierung intrazellulärer ADPR-Konzentrationen erlaubt (Gasser und Guse, 2005). Nach Optimierung des Extraktionsprotokolls wurden basale ADPR-Konzentrationen von $44\ \mu\text{M}$ in humanen Jurkat-T-Lymphocyten und $73\ \mu\text{M}$ in murinen BW5147-Thymocyten ermittelt. Durch Versuche mit artifiziellen Proben konnte ausgeschlossen werden, daß es zu einem signifikanten Zerfall von NAD zu ADPR während der Extraktion kam. Die Identität und Homogenität des ADPR-Peaks wurde durch Auftrennung der Zellextrakte mit zwei unterschiedlichen HPLC-Säulen sowie durch Aufnahme eines UV-Spektrums gezeigt.

Bisher war keine Methode verfügbar, um zelluläre ADPR-Konzentrationen direkt zu messen. Die einzige Ausnahme stellt ein Verfahren zur Bestimmung von ADPR in Erythrocyten dar (Guida et al., 1992), das aus drei aufeinander folgenden Fraktionierungen von Extrakten aus roten Blutzellen besteht. Dieses Verfahren ist jedoch auf andere Zell-Typen nicht übertragbar, weil die hohe Konzentration von Hämoglobin in diesen Zellen eine spezielle Extraktion erforderte. Bei diesen Versuchen wurde nur eine sehr niedrige ADPR-Konzentration von $0.45\ \mu\text{M}$ gefunden (Guida et al., 1992).

Extrazelluläres ADPR kann nach Bobalova et al. (2002) durch Derivatisierung mit Chloroacetaldehyd zu 1, N^6 - ϵ -ADPR bestimmt werden. Dazu wurden alle Adenin-haltigen Nucleotide und Nucleoside im Zellkultur-Überstand von Mesenterial-Arterien nach elektrischer Stimulation derivatisiert und durch HPLC mit Fluoreszenz-Detektion analysiert. Obwohl mit dieser Methode ein sehr niedriges Detektionslimit von 10 fmol ADPR (Bobalova et al., 2002) erreicht werden konnte, war das Verfahren auf Zellextrakte wegen der Komplexität der Proben nicht anwendbar; im Gegensatz zu Zellextrakten enthielten die Zellkultur-Überstände nur sehr wenige Komponenten.

Zur Auftrennung von Biomolekülen in komplexen Proben wird häufig HPLC unter Umkehrphasen-(Reversed Phase)-Bedingungen (RP-HPLC) in der Gegenwart eines Ionenpaar-Reagenzes verwendet. Mit dieser Methodik ist z. B. die Analyse von Nucleotiden, Nucleosiden und Nucleobasen in biologischen Proben möglich (Übersicht in Werner (1993)). Unter RP-HPLC versteht man die Trennung von Analyten an einer unpolaren stationären Phase unter Verwendung einer polaren mobilen Phase (Beinert et al., 1989). Dabei dienen als stationäre Phase häufig poröse Kieselgele, die mit Alkylgruppen unterschiedlicher Länge beschichtet sind. Als mobile Phasen werden meist Puffer/Methanol-, Puffer/Acetonitril- oder Puffer/Dioxan-Systeme eingesetzt. Die Retention an einer RP-Kieselgel-Phase nimmt mit dem hydrophoben Charakter der Analyten zu. Daraus folgt, daß ionische Substanzen oft eine sehr geringe Retention zeigen und daher schlecht trennbar sind. Um dem abzuhelpen kann der mobilen Phase ein Ionenpaar-Reagenz zugesetzt werden, wobei man zur Auftrennung saurer Verbindungen häufig Tetraalkylammonium-Salze verwendet. Die negativ geladenen Probensubstanzen bilden mit den organischen Kationen des Ionenpaar-Reagenzes ein elektrisch neutrales Ionenpaar, das ähnlich wie eine ungeladene Substanz durch hydrophobe Wechselwirkung mit der Umkehrphase zurückgehalten wird. Die Retention der Proben wird

dabei durch den hydrophoben Charakter der Alkyl-Ketten des Ionenpaar-Reagenzes kontrolliert: Der unpolare Charakter und damit auch die Retention der gebildeten Ionenpaare nimmt mit steigender Länge der Alkylketten zu (Beinert et al., 1989).

Nucleobasen und ihre Derivate enthalten starke Chromophore, die eine Absorption im UV-Bereich von 240 – 270 nm aufweisen. Diese Eigenschaft wird häufig zur Detektion der Verbindungen verwendet, wobei mit HPLC-Techniken für die meisten Adenin-Derivate ein Detektionslimit von 5 – 10 pmol erreicht werden kann (Werner, 1993). Um eine Methode zur Quantifizierung von ADPR in Zellextrakten zu etablieren, wurde als Ausgangspunkt ein Protokoll zur Bestimmung des sekundären Botenstoffes cADPR (da Silva et al., 1998a) verwendet. Bei dieser Methode wurden Zellextrakte nacheinander mit zwei unterschiedlichen HPLC-Methoden aufgetrennt: Zuerst erfolgte eine Trennung mit einer Anionenaustauscher-Säule, die mit einem Trifluoressigsäure-Gradienten eluiert wurde. Die Fraktion, die cADPR enthielt, wurde gesammelt und durch Gefriertrocknung eingeeengt. Diese Fraktion wurde danach durch RP-HPLC in Gegenwart eines Ionenpaar-Reagenzes weiter aufgetrennt. cADPR konnte mit dieser Methode mit einem Detektionslimit von 10 pmol nachgewiesen und quantifiziert werden (da Silva et al., 1998a). Dieses Verfahren hatte durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Säulentypen einige Nachteile: Die Technik war durch das manuelle Sammeln der Fraktionen aus der Anionenaustauscher-Chromatographie zeit- und arbeitsaufwendig, und die Einengung der Fraktionen durch Gefriertrocknung stellte einen weiteren Zeitfaktor dar.

Der zweite Teil der cADPR-Bestimmung nach da Silva et al. (1998a) wurde als Ausgangspunkt verwendet, um mit einer Mischung aus diversen Nucleotiden und anderen in Zellextrakten erwarteten Substanzen eine optimale Abtrennung von ADPR zu erzielen. Dies konnte nach Optimierung des verwendeten Gradientens erreicht werden, da keine der 13 getesteten Substanzen mit ADPR co-eluierte.

Ein wesentlicher Punkt bei der Etablierung einer Methode zur Quantifizierung von ADPR war die Entwicklung eines Protokolls zur Extraktion aus Zellen. Dabei war entscheidend, daß metabolische Enzyme sofort zu Beginn der Extraktion inaktiviert wurden, weil sich durch die Aktivität dieser Enzyme die Konzentration von Metaboliten wie ADPR verändern könnte. Zur Extraktion intrazellulärer Nucleotide ist die Lyse der Zellen in Perchlorsäure oder Trichloressigsäure die Methode der Wahl (Werner, 1993). Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Reagenzien getestet. Bei Verwendung von Perchlorsäure wurden die Extrakte mit Kaliumhydroxid-Lösung neutralisiert. Dabei kam es allerdings zu starken Schwankungen in den Wiederfindungs-Raten, möglicherweise durch den Verlust von Nucleotiden durch Co-Präzipitation mit dem Niederschlag von Kaliumperchlorat bei der Neutralisation. Deswegen wurde die Extraktion von ADPR mit Trichloressigsäure mit anschließender Neutralisation durch Extraktion mit wassergesättigtem Diethylether (Simmonds und Harkness, 1981) durchgeführt. Eine ähnliche Extraktions- und HPLC-Methode wurde z. B. auch zur Bestimmung intrazellulärer Konzentrationen von Nucleosid-Triphosphaten verwendet (Huang et al., 2003); dabei wurden für die unterschiedlichen Substanzen Wiederfindungsraten von 82–121%

bestimmt, was in etwa der hier entwickelten Methode für ADPR entsprach (68 – 92%).

Obwohl mit Standard-Substanzen eine hervorragende Trennung bei Verwendung einer C₁₈-RP-Säule erreicht werden konnte, war es nicht möglich, die neutralisierten Zellextrakte direkt zur HPLC-Analytik zu verwenden, weil die Trennung der ungereinigten Zellextrakte nicht befriedigend war. Außerdem nahm die Trennleistung bei wiederholter Analyse der gleichen Probe von Lauf zu Lauf ab, und es kam zu einem deutlichen Anstieg des Gegendrucks der Säule. Dies deutete daraufhin, daß es durch Kontaminationen in den Proben zu einer Degradation der Säulenmatrix und/oder Verstopfung der Säule kam.

Um diese Probleme zu lösen wurden die Proben durch eine Festphasen-Extraktion an einer Anionenaustauscher-Matrix gereinigt. Grundsätzlich wurde das Prinzip aus der Methode zur cADPR-Bestimmung nach [da Silva et al. \(1998a\)](#) übernommen, aber dadurch vereinfacht, daß die erste HPLC-Trennung durch eine Festphasenextraktion mit einer Stufen-Elution ersetzt wurde. Eine Festphasenextraktion bietet grundsätzlich eine schlechtere Aufreinigungs-Wirkung im Vergleich zu einer HPLC-Methode; die erreichte Reinigung reichte jedoch aus, weil danach die direkte Auftrennung der Eluate per RP-HPLC möglich war. Ein weiteres Problem bei einer Festphasenextraktion besteht in der unspezifischen Adsorption von Probenbestandteilen an die Plastik-Oberflächen der verwendeten Gefäße. Dies stellt insbesondere bei der Analyse von Substanzen ein Problem dar, die wie cADPR ([da Silva et al., 1998a](#)) oder NAADP (siehe Abschnitt 4.1) nur in sehr geringen Konzentrationen in Zellen vorkommen. Bei der Bestimmung von ADPR war dies aber kein Problem, weil die erwarteten Konzentrationen deutlich höher lagen, was durch die Ergebnisse bestätigt wurde (in Jurkat T-Lymphocyten: 44 µM ADPR, 0.5 µM cADPR, 6.6 nM NAADP).

Mit der etablierten HPLC-Methode wurde ein Detektionslimit von 5 pmol ADPR erreicht. Die Retentionszeiten von ADPR-Standards waren stabil (Präzision innerhalb einer Woche 99%) und die Korrelation zwischen ADPR-Stoffmengen und Peak-Flächen war im getesteten Bereich bis 50 nmol ADPR linear. Da in 10⁶ T-Zellen ADPR-Mengen von mindestens 50 pmol vorhanden waren, war die Methode ausreichend sensitiv zur Quantifizierung von endogenem ADPR.

Ein wichtiger Punkt ist die Identität und Homogenität des ADPR-Peaks: Grundsätzlich kann durch HPLC-Analytik nicht die Gleichheit, sondern nur die Verschiedenartigkeit zweier Substanzen nachgewiesen werden. Daher ist es nur möglich, die Übereinstimmung zweier Substanzen durch den Vergleich ihrer Eigenschaften mit mehreren unterschiedlichen Trennverfahren zu testen. Um dies für den mit der C₁₈-Säule erhaltenen ADPR-Peak durchzuführen, wurde die gleiche Analytik mit einer C₁₂-Säule wiederholt, wobei ähnliche Ergebnisse für ADPR-Konzentration und Wiederfindung ermittelt wurden. Dies sprach dafür, daß es sich bei dem Peak um ADPR handelte, da die zweimalige Co-Elution einer Kontamination mit ADPR bei Verwendung von zwei unterschiedlichen Säulen unwahrscheinlich war. Ein weiteres Argument für die Reinheit des ADPR-Peaks stellte sein UV-Spektrum dar, das mit dem eines ADPR-Standards übereinstimmte. Zusammenfassend ist es daher sehr wahrscheinlich, daß es sich bei dem als ADPR betrachteten Peak tatsächlich um ADPR ohne

Kontaminationen handelte.

Für die Bestimmung von ADPR in Zellextrakten wäre es problematisch, wenn es während der Extraktion durch Hydrolyse der *N*-glycosidischen Bindung zwischen der Nicotinamid-Gruppe und dem C1-Atom der Ribose zur Bildung von ADPR kommen würde, weil in Zellen eine relativ hohe Konzentration an freiem NAD vorliegt (Jacobson und Jacobson, 1976). Der saure Aufschluß von Zellen in Gegenwart von Perchlorsäure oder Trichloressigsäure stellt zwar eine allgemein anerkannte Methode dar, um hydrolyse-empfindliche Moleküle wie Nucleosid-Triphosphate zu extrahieren (Werner, 1993; Huang et al., 2003). Um einen Zerfall von NAD zu ADPR aber sicher auszuschließen, wurden Extraktionen mit artifiziellen Proben durchgeführt, die aus BSA als Protein sowie bekannten Mengen an NAD und/oder ADPR bestanden. Dabei waren die gemessenen ADPR-Mengen in den Proben, die zusätzlich NAD enthielten, nicht größer als in Kontrollen ohne NAD, womit ein signifikanter Zerfall von NAD zu ADPR während der Extraktion ausschlossen werden konnte.

Um intrazelluläre Nucleotide zu quantifizieren gibt es verschiedene methodische Ansätze: Erstens die Trennung durch RP-HPLC in Gegenwart eines Ionenpaar-Reagenzes (wie hier beschrieben), zweitens zyklische Enzym-Assays, und drittens Hochleistungs-Kapillarelektrophorese (HPCE). Zyklische Enzym-Assays sind für NAD (Kato et al., 1973), NADP (Stephon et al., 1992) und cGMP (Goldberg et al., 1969) seit längerem bekannt, und wurden kürzlich auch für zelluläres cADPR (Graeff und Lee, 2002a) sowie für NAADP-Standards (Graeff und Lee, 2002b) verwendet. In Abschnitt 4.1.2 ist außerdem ein Enzym-Assay zur Quantifizierung von zellulärem NAADP beschrieben. Solch eine Methode konnte jedoch für ADPR nicht etabliert werden, weil eine enzymatische Umsetzung von ADPR zu NAD, das mit einem zyklischen Enzym-Assay leicht quantifizierbar wäre (Kato et al., 1973), wegen des Reaktionsmechanismus von NAD-Glycohydrolasen (Cakir-Kiefer et al., 2000) nicht möglich ist. Der größte Vorteil solcher Enzym-Assays, nämlich ihre hohe Sensitivität, wurde zur Analytik von ADPR jedoch auch nicht benötigt, weil die ADPR-Menge einer relativ geringen Zellzahl bereits über dem Detektionslimit der HPLC-Methode lag.

HPCE erlaubt eine sehr schnelle Trennung von Nucleotiden und verwandten Verbindungen (Geldart und Brown, 1998; Fu et al., 2003), benötigt aber spezielle Geräte und weist eine relativ geringe Sensitivität auf. Außerdem ist zur Bestimmung von ADPR bisher keine solche Methode verfügbar. Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Detektionsempfindlichkeit der HPCE wäre die Derivatisierung von ADPR mit Chloroacetaldehyd und anschließende Analytik der Proben durch HPCE mit Fluoreszenz-Detektion.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen ADPR-Konzentrationen lagen deutlich über der Konzentration von $0.1 \mu\text{M}$, ab der es zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit von Ca^{2+} -abhängigen K^{+} -Kanälen in Glattmuskelzellen aus Coronar-Arterien kam (Li et al., 1998, 2002). Falls die ADPR-Konzentration in diesen Zellen der in Lymphocyten entspricht, würde ADPR durch ständige Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit als konstitutiver Aktivator dieser Kanäle wirken. Hingegen sind die zur Aktivierung von TRPM2 benötigten ADPR-Konzentrationen mit mehr als $60 \mu\text{M}$ ($\text{EC}_{50} = 90 \mu\text{M}$) deutlich

höher (Perraud et al., 2001; Sano et al., 2001; Wehage et al., 2002). Die gefundenen ADPR-Konzentrationen in nicht aktivierten Lymphocyten lagen unterhalb dieser Schwelle bzw. im unteren Bereich der Dosis-Wirkungskurve. Daher kann man davon ausgehen, daß im Ruhezustand der Zellen die meisten TRPM2-Kanäle in einem geschlossenen Zustand vorliegen. Eine basale ADPR-Konzentration knapp unterhalb der Aktivierungs-Schwelle von TRPM2-Kanälen würde es den Zellen erlauben, eine schnelle Aktivierung vieler Kanäle durch eine geringe Erhöhung der ADPR-Konzentration zu erreichen. Dies wäre von Vorteil für schnelle Signalprozesse, wie z. B. die mit TRPM2 in Verbindung gebrachten Vorgänge der Apoptose und der Reaktion auf oxidativen Streß (Hara et al., 2002; Fonfria et al., 2004, 2005; Perraud et al., 2005).

Die einzige bekannte ADPR-Konzentration in einem anderen Zelltyp stellt der von Guida et al. (1992) bestimmte Wert von $0.45 \mu\text{M}$ in Erythrocyten dar. Dieser läßt sich allerdings nur schlecht mit dem Wert in T-Lymphocyten vergleichen, weil es sich bei Erythrocyten um kernlose Zellen handelt, die keine aktiven Signalsysteme mehr besitzen; außerdem ist nicht bekannt, ob in Erythrocyten TRPM2 exprimiert wird. Daher ist es unwahrscheinlich, daß ADPR in diesen Zellen eine Funktion als Signalmolekül zukommt, was den Unterschied in der ADPR-Konzentration im Vergleich zu T-Zellen erklären könnte.

5.2.2. ConA-induzierte Bildung von ADPR

Nach Etablierung der HPLC-Methode zur Quantifizierung von ADPR wurden die zellulären ADPR-Konzentrationen in T-Lymphocyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Stimulation mit einer hohen Konzentration des Lektins ConA quantifiziert. Dabei wurde ein rascher Anstieg auf ungefähr das 1.5fache des Basalwertes gefunden, der für mindestens 20 min erhalten blieb. Bei Vergleich der Kinetik der ADPR-Konzentration mit der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung fiel auf, daß der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg der Zunahme der ADPR-Mengen zeitlich eng folgte. Deshalb wurde vermutet, daß ein Zusammenhang zwischen den beiden Vorgängen bestehen könnte.

Eine Funktion von ADPR als Ca^{2+} -mobilisierender Botenstoff wurde bereits mehrfach postuliert (Perraud et al., 2003a, 2004). Das entscheidende Kriterium zum Nachweis, daß es sich bei ADPR wirklich um einen sekundären Botenstoff handelt, besteht aber darin, eine stimulationsabhängige Änderung seiner Konzentration zu zeigen. Solche Daten sind in der Literatur bisher nicht vorhanden. Ein indirekter Hinweis auf eine Funktion von ADPR als Botenstoff ergibt sich aus einer Arbeit von Fonfria et al. (2004): Hier wurde gezeigt, daß Inhibition von Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARPs) den durch oxidativen Streß vermittelten Ca^{2+} -Einstrom verminderte. Daraus folgerten die Autoren, daß eine Stimulation von Zellen mit Wasserstoffperoxid durch einen Prozeß, an dem PARPs beteiligt waren, zu einer Akkumulation von ADPR im Cytosol und dadurch zur Aktivierung von TRPM2 führte. Ähnliche Ergebnisse wurden von Perraud et al. (2005) veröffentlicht. Sie konnten zeigen, daß die ADPR-bindende Domäne im C-terminalen Nudix-Box-Motiv von TRPM2 (siehe Abschnitt 1.4.2) notwendig war, damit TRPM2 durch oxidativen Streß aktiviert werden konnte. Außerdem konnte die Aktivierung von TRPM2 durch cytosolische Überexpressi-

on von Enzymen mit ADPR-Hydrolase-Aktivität sowie durch Behandlung der Zellen mit NADase-Inhibitoren vermindert werden. Daraus wurde ein Modell abgeleitet, nach dem es durch oxidativen Streß zur Bildung von ADPR in Mitochondrien kommt, das danach ins Cytosol gelangt und zur Aktivierung von TRPM2 führt (Perraud et al., 2005). Ein ähnliches Modell wurde auch von Ayub und Hallett (2004) postuliert: Danach führt eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ zur Produktion von ADPR in Mitochondrien, das anschließend ins Cytosol freigesetzt wird und dadurch TRPM2 aktiviert.

Trotz der vorhandenen Modellvorstellungen fehlte bisher der entscheidende Beweis für die Funktion von ADPR als sekundärer Botenstoff, der zur Aktivierung von TRPM2 und damit zum Ca^{2+} -Einstrom führt: Eine stimulationsabhängige Bildung von ADPR konnte erstmals in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Diese Erkenntnis stellt damit einen wesentlichen Schritt zur Etablierung von ADPR als sekundären Botenstoff dar.

TRPM2 kann außer der direkten Aktivierung durch ADPR durch eine Erhöhung der lokalen Ca^{2+} -Konzentration co-aktiviert werden (McHugh et al., 2003). Kürzlich wurde gezeigt, daß auch cADPR als Co-Aktivator für TRPM2 wirken kann und die Sensitivität des Kanals für ADPR erhöht (Kolisek et al., 2005). Daher stellt die gefundene stimulationsabhängige Erhöhung der ADPR-Konzentration um den Faktor 1.5 vermutlich eine stärkere Aktivierung dar, als aus den ersten Berichten zur Aktivierung von TRPM2 durch ADPR (Perraud et al., 2001; Sano et al., 2001) zu vermuten war: Durch die Stimulation von T-Zellen mit ConA kommt es zur einer schnellen Bildung von $InsP_3$ (Behl et al., 1987) und wahrscheinlich auch von cADPR (Guse et al., 1999), wodurch die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern ausgelöst wird (Behl et al., 1987; Guse et al., 1995). Auf diese Weise führt nach der Zell-Aktivierung der gleichzeitige Anstieg der Konzentrationen von ADPR, cADPR und Ca^{2+} zu einer gemeinsamen Aktivierung von TRPM2. Nach der Öffnung von TRPM2 entsteht durch den Einstrom von Ca^{2+} eine weitere Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$, so daß auch nach Ende der $InsP_3$ - und cADPR-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung eine Co-Stimulation durch Ca^{2+} auftritt. Die Co-Aktivierung von TRPM2 durch den Ca^{2+} -Einstrom bewirkt schließlich eine positive Rückkopplung des Systems. Daher ist die notwendige Voraussetzung zur Aktivierung von TRPM2 vermutlich die Erhöhung der ADPR-Konzentration, die nach Überschreitung eines Schwellenwertes gemeinsam mit den Co-Stimuli Ca^{2+} und cADPR eine irreversible Aktivierung des Kanals auslöst. Die lokalen ADPR-Konzentrationen könnten außerdem über den ermittelten globalen Konzentrationen liegen, weil die Biosynthese von ADPR möglicherweise nur an bestimmten Stellen in der Zelle stattfindet, z. B. in der Nachbarschaft von Signalprotein-Komplexen in der Plasmamembran. Solche lokalen ADPR-Konzentration sind aber mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht bestimmbar und daher spekulativ.

5.2.3. Expression von TRPM2 in T-Lymphocyten

Insgesamt sind in der Literatur sechs Transkripte beschrieben, die aus dem TRPM2-Gen mit der chromosomalen Lokalisation 21q22.3 transkribiert werden (siehe Abb. 1.8): Außer der Vollängen-Form wurden eine ΔC -Form, bei der Exon 27 fehlte, und eine ΔN -Form, bei

der ein Teil von Exon 11 fehlte, beschrieben (Wehage et al., 2002). Die beiden deletierten Varianten traten auch kombiniert als $\Delta N\Delta C$ -Form auf. Ferner wurden eine als TRPM2-SF bezeichnete, dominant negativ wirksame, C-terminal trunkierte Form (Zhang et al., 2003), und eine als SSF-TRPM2 bezeichnete, funktionale, N-terminal trunkierte Form (Uemura et al., 2005) gefunden.

Aus der mRNA von Jurkat-Zellen wurden bei RT-PCR-Experimenten im Bereich der Exons 11 und 27 Amplifikate erhalten, die im N-terminalen Bereich nur für die Vollängen-Form codierten, während im Bereich von Exon 27 zwei Amplifikate entstanden, die sowohl für die Vollängen-Form als auch die ΔC -Isoform codierten. Durch diese Versuche konnte daher auf Ebene der mRNA die parallele Expression der Vollängen-Form und der ΔC -Isoform gezeigt werden. Eine Expression der ΔN -Variante konnte in Jurkat-Zellen nicht festgestellt werden; auch in der Literatur wurde nur in einem einzigen Bericht die Expression der ΔN -Form beschrieben, und zwar in neutrophilen Granulocyten (Wehage et al., 2002). Nach Perraud et al. (2003a) handelte es sich dabei möglicherweise um ein Klonierungsartefakt. Zum Zeitpunkt der Experimente waren in der Literatur außer der Vollängen-Form nur die Varianten ΔN , ΔC und $\Delta N\Delta C$ bekannt. Durch Meinke (2005) wurde kürzlich gefunden, daß Jurkat-Zellen zusätzlich zu den oben genannten Formen auch die SSF-Isoform von TRPM2 exprimierten, die bisher nur in humanen Striatum-Zellen nachgewiesen wurde (Uemura et al., 2005). Die Expression der unterschiedlichen TRPM2-Isoformen konnte außerdem auf Ebene der Proteine in Western-Blot-Experimenten gezeigt werden (Meinke, 2005).

Die Ergebnisse der RT-PCR-Experimente sind auch mit einer zusätzlichen Expression der C-terminal trunkierten, nicht funktionalen Isoform TRPMP2-S (Zhang et al., 2003) vereinbar. Bei dieser Form kommt es durch Fehl-Spleißen zur Erzeugung eines Stopp-Codons hinter Exon 16. Die Expression dieser TRPM2-Form wäre durch 3'-RACE-Versuche analysierbar, z. B. ausgehend von den gegen Exon 11 gerichteten Primern. Eine Untersuchung der Expression dieser Form wäre insbesondere deshalb interessant, weil diese durch die Western-Blot-Experimente von Meinke (2005) nicht nachweisbar war, da der dabei verwendete Antikörper gegen ein in TRPM2-S nicht vorhandenes Epitop gerichtet war.

In den erhaltenen Amplifikaten wurden durch Sequenzierung und Vergleich mit der Datenbank-Sequenz von TRPM2 drei Mutationen festgestellt. Diese waren jedoch entweder still, weil nur die dritte Base eines Codons ausgetauscht war, wobei es nicht zur Veränderung der codierten Aminosäure kam, oder befanden sich innerhalb der Primersequenzen, d. h. entstanden durch fehlerhafte Synthese der Primer. Desweiteren könnte es sich bei den aufgetretenen Mutation um Artefakte durch die PCR-Amplifikation gehandelt haben.

In der Literatur ist die Expression von TRPM2 in diversen Geweben beschrieben. Nach Perraud et al. (2001) wird TRPM2 unter anderem in Knochenmark, Milz, Herz, Leukocyten, Leber, Lunge, Nieren, Prostata, Hoden und Skelettmuskel exprimiert. Außerdem wurde eine Expression in der monocytären Zell-Linie U937 (Sano et al., 2001) sowie in neutrophilen Granulocyten (Heiner et al., 2003), Microglia-Zellen (Kraft et al., 2004), Jurkat T-Zellen (Zhang et al., 2003) und in der Insulinoma-Zell-Linie CRI-G1 (Inamura et al., 2003) gezeigt.

Insofern war die Feststellung nicht überraschend, daß TRPM2 auch in der verwendeten Jurkat-Linie JMP exprimiert wurde. Unerwartet war hingegen das Ergebnis, daß die SSF-Isoform, die bisher nur in Striatum-Zellen gefunden wurde (Uemura et al., 2005), in Jurkat-Zellen exprimiert wurde (Meinke, 2005). Ob es sich dabei um eine Eigenart der Jurkat-Zell-Linie handelte, und inwiefern diese Expression auch in primären humanen T-Zellen auftritt, ist noch zu untersuchen.

Die Funktionalität der exprimierten TRPM2-Proteine in Jurkat-Zellen konnte durch Patch Clamp-Experimente demonstriert werden (Fliegert, 2005). Dabei wurde in Übereinstimmung mit Perraud et al. (2001) und Sano et al. (2001) bei einem physiologischen Membranpotential ein durch ADPR aktivierbarer, einwärts gerichteter Kationen-Strom gefunden. Dieser wies eine lineare Strom-Spannungs-Kurve auf, die mit der von TRPM2 übereinstimmte (Fliegert, 2005). Da TRPM2 der einzige bekannte Ionenkanal ist, der durch ADPR aktivierbar ist, konnte durch diese Experimente in Verbindung mit den RT-PCR-Analysen und den Western-Blot-Versuchen die Expression und Funktionalität von TRPM2 in Jurkat-Zellen gezeigt werden.

5.2.4. Pharmakologische Charakterisierung der am ConA-vermittelten Calcium-Einstrom beteiligten Signalsysteme

Der durch hohe ConA-Konzentrationen induzierte Ca^{2+} -Einstrom wurde auf Inhibition durch verschiedene Substanzen getestet. Dabei wurde gefunden, daß der Ca^{2+} -Einstrom (i) eine relativ geringe Empfindlichkeit gegen Gd^{3+} besaß, (ii) durch den NAD-Glycohydrolase-Inhibitor 3GA vermindert wurde und (iii) der Ekto-CD38-Inhibitor ara-F-NAD keinen Einfluß auf den Ca^{2+} -Einstrom hatte.

Wie in Abschnitt 1.3.2 beschrieben, kommt es in vielen Zell-Typen durch Depletion intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher zu einem Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum (Übersicht in Penner und Fleig (2004)). Die molekularen Grundlagen dieses zuerst von Putney (1986) als „kapazitativer Ca^{2+} -Einstrom“ und später von Clapham (1995) als „Speicher-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom“ bezeichneten Phänomens sind bis heute nicht komplett geklärt. In Mastzellen konnte durch Patch Clamp-Messungen ein durch Depletion der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher auslösbarer Strom über die Plasmamembran charakterisiert werden, der als I_{CRAC} bezeichnet wurde (Hoth und Penner, 1992). Ein vergleichbarer Strom wurde auch in T-Lymphocyten nachgewiesen (Hoth, 1995). Der bisher unbekannte Kanal, der Ursache des I_{CRAC} -Strom ist, zeichnet sich durch folgende Eigenschaften aus (Penner und Fleig, 2004): (i) Extrem hohe Selektivität für Ca^{2+} unter physiologischen Ionenverhältnissen, (ii) einwärts-gerichtete Wirkung, (iii) sehr geringe Einzelkanal-Leitfähigkeit, (iv) Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung (Hoth und Penner, 1993; Zweifach und Lewis, 1995) und (v) Inhibition durch geringe Gd^{3+} -Konzentrationen (Ross und Cahalan, 1995). Es wurde zwar vermutet, daß I_{CRAC} durch ein Mitglied der TRP-Kanal-Familie getragen wird (Birnbaumer et al., 1996), aber die molekulare Identität des Kanals ist bis heute unklar, und eine Beteiligung von TRP-Kanälen ist ebenfalls umstritten (Penner und Fleig, 2004).

Seit längerem ist bekannt, daß die Stimulation von T-Zellen durch Lektine (Lewis und Cahalan, 1989) oder durch Quervernetzung des TCR/CD3-Komplexes (Partiseti et al., 1994) zur Aktivierung eines Ca^{2+} -Einstroms führte, der die Charakteristika des I_{CRAC} -Stroms besaß. Als Mechanismus wurde vermutet, daß es durch die Aktivierung von Membranrezeptoren zur Bildung von InsP_3 durch die Phospholipase C- γ (PLC- γ) kam. Die durch InsP_3 ausgelöste Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern führte durch die Depletion dieser Speicher dann zur Aktivierung des klassischen I_{CRAC} -Stroms.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es durch Stimulation von Jurkat-T-Lymphocyten mit hohen ConA-Konzentrationen zusätzlich zu dem bekannten I_{CRAC} zur Aktivierung eines weiteren, durch TRPM2 verursachten Ca^{2+} -Einstroms kam. Dabei wurden mehrere Inhibitoren verwendet, um die durch ConA aktivierten Ca^{2+} -Einstrom-Wege pharmakologisch zu differenzieren: Zuerst wurde die Sensitivität des durch ConA oder Thapsigargin ausgelösten Ca^{2+} -Einstroms gegen Gd^{3+} untersucht. Der SERCA-Inhibitor Thapsigargin (Übersicht in Treiman et al. (1998)) diente dabei dazu, indirekt durch passive Depletion der InsP_3 -abhängigen intrazellulären Ca^{2+} -Speicher den Ca^{2+} -Einstrom durch I_{CRAC} auszulösen (Premack et al., 1994). Dabei ergab sich für Stimulation mit Thapsigargin ein IC_{50} -Wert von etwa 60 nM Gd^{3+} , der gut mit dem von Ross und Cahalan (1995) ermittelten Wert von 28 nM zur Inhibition des I_{CRAC} -vermittelten Ca^{2+} -Plateaus in Thymocyten übereinstimmte. Im Gegensatz dazu wurde für das durch hohe ConA-Konzentrationen ausgelöste Ca^{2+} -Plateau ein IC_{50} -Wert von ca. $0.75 \mu\text{M}$ gefunden, d. h. der ConA-induzierte Ca^{2+} -Einstrom war um mehr als eine Größenordnung weniger sensitiv gegen Gd^{3+} als der klassische I_{CRAC} . Dies deutete daraufhin, daß die Stimulation der Zellen mit ConA zur Aktivierung eines von I_{CRAC} verschiedenen Kanals führte, der zum Ca^{2+} -Einstrom beitrug. Nach Lewis und Cahalan (1989) ist bekannt, daß nach Stimulation von T-Zellen mit niedrigen Lektin-Konzentrationen ein Ca^{2+} -Einstrom durch I_{CRAC} ausgelöst wird. Daher ist zu vermuten, daß bei Verwendung hoher ConA-Konzentrationen ebenfalls I_{CRAC} aktiviert wird, es aber zusätzlich zu einem Ca^{2+} -Einstrom durch mindestens einen weiteren Kanal kommt, bei dem es sich um TRPM2 handeln könnte. Für diese Vermutung sprach auch, daß der ADPR-induzierbare Strom durch TRPM2 durch $10 \mu\text{M}$ Gd^{3+} nicht inhibiert werden konnte (Xu et al., 2005). Aus diesen Ergebnissen ergab sich in Verbindung mit den Daten zum Anstieg der ADPR-Konzentration folgende Arbeitshypothese: Nach Stimulation von Jurkat-Zellen mit hohen ConA-Konzentrationen kam es zur intrazellulären Bildung von ADPR, das TRPM2 aktivierte und damit einen Ca^{2+} -Einstrom auslöste, sowie parallel zur Aktivierung eines durch I_{CRAC} vermittelten Ca^{2+} -Einstroms durch Bildung von InsP_3 sowie cADPR und dadurch ausgelöste Depletion intrazellulärer Speicher.

Um den Anteil des ADPR/TRPM2-Systems am Ca^{2+} -Einstrom nach ConA-Stimulation weiter zu untersuchen, wurde der Inhibitor Cibacron Blue (3GA) verwendet. Dabei handelt es sich um eine Substanz, die ursprünglich an ein Polymer gekoppelt zur Affinitätschromatographie von NAD-bindenden Proteinen verwendet wurde (Dean und Watson, 1979; Subramanian, 1984). Durch Yost und Anderson (1981), Kim et al. (1993) und Li et al. (2002) konnte

gezeigt werden, daß 3GA auch als hochpotenter kompetitiver Inhibitor ($IC_{50} \approx 50 \text{ nM}$) von NAD-Glycohydrolasen wirkt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß bei Vorinkubation von Jurkat-Zellen die ConA-induzierte ADPR-Bildung vollständig blockiert wurde. Daher wurde der Ca^{2+} -Einstrom in Jurkat-Zellen bei ConA-Stimulation mit und ohne Inhibition der ADPR-Bildung verglichen. Die Blockierung der ADPR-Bildung führte zu einer signifikanten Verminderung sowohl der Peak- als auch der Plateau-Phase des durch ConA ausgelösten Ca^{2+} -Einstroms. Dagegen wurde der durch Thapsigargin induzierte, I_{CRAC} -vermittelte Ca^{2+} -Einstrom durch die Inhibition der ADPR-Bildung nicht vermindert. Diese Ergebnisse bestätigten das oben dargestellte Modell, wonach die Stimulation mit hohen ConA-Konzentrationen zwei Ca^{2+} -Einstrom-Wege aktiviert, von denen einer durch das ADPR/TRPM2-System und der andere durch den I_{CRAC} -Kanal getragen wird. Ähnliche Ergebnisse wurden auch erhalten, wenn der Ca^{2+} -Einstrom indirekt als Mn^{2+} -Einstrom quantifiziert wurde (Kass et al., 1990; Glennon et al., 1992; Shibuya und Douglas, 1992). Der Vorteil dieser Technik bestand darin, daß Sekundäreffekte der Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ durch den Ca^{2+} -Einstrom ausgeschlossen werden konnten. Auch hier konnte der ConA-induzierte Einstrom durch Inhibition der ADPR-Bildung reduziert werden, während der durch Thapsigargin induzierte Einstrom durch I_{CRAC} unverändert blieb. Ein Problem bei Verwendung von 3GA als Inhibitor bestand in seiner pleiotropen Wirkung: Außer als kompetitiver NADase-Inhibitor wirkt 3GA als potenter Antagonist von purinergen P_2Y -Rezeptoren (Burnstock und Warland, 1987; Surprenant, 1996). Diese Tatsache war in den durchgeführten Versuchen aber nicht problematisch, weil Jurkat-Zellen keine P_2Y -Rezeptoren exprimieren (Budagian et al., 2003). Vereinzelt wurde außerdem eine reversible Inhibition von Phospholipase A_2 (Barden et al., 1980; Szabo et al., 1995) und von PI3-Kinase (Claes et al., 2004) berichtet, allerdings mit weit höheren IC_{50} -Konzentrationen als zur Inhibition der NADase nötig.

Durch die Versuche mit 3GA konnte gezeigt werden, daß das ConA-induzierte Ca^{2+} -Signale durch Blockade von NADasen signifikant reduziert werden konnte. Die einzigen bekannten Enzyme mit NADase-Aktivität in humanen Zellen sind die Oberflächen-Antigene CD38 und CD157 (Übersicht in Metha und Malavasi (2000)). Bei CD38 handelt es sich um ein Typ II-Transmembran-Protein mit kleinem intrazellulären Teil, während CD157 mit einem GPI-Anker in der Membran verankert ist und sich daher komplett außerhalb der Zelle befindet. Bei beiden Enzymen ist das aktive Zentrum im Extrazellulärraum lokalisiert, weshalb für ihre Beteiligung an der Erzeugung intrazellulärer Ca^{2+} -mobilisierender Botenstoffe ein Transport der Substrate und Produkte durch die Zellmembran notwendig ist (Franco et al., 1998; Zocchi et al., 1998). Diese eigentümliche Lokalisation von CD38 ist auch als „topologische Paradoxon“ bekannt (Übersicht in De Flora et al. (2004)). Um eine Beteiligung von CD38 am ConA-induzierten Ca^{2+} -Einstrom zu untersuchen, wurde der nicht membranpermeable, kompetitive CD38-Inhibitor ara-F-NAD (Muller-Steffner et al., 1992) verwendet. Da sich bei Inhibition der CD38-Aktivität keine Verminderung des ConA-induzierten Ca^{2+} -Einstroms ergab, konnte eine Funktion von Ekto-CD38 für das ADPR/TRPM2-System ausgeschlossen werden. Da ara-F-NAD zur Inhibition von CD38

extrazellulär zu den Zellen gegeben wurde, kann aus diesen Experimenten eine Beteiligung von intrazellulär lokalisiertem CD38 nicht ausgeschlossen werden. In der Literatur gibt es Berichte über eine Lokalisation von CD38 in der Kernhülle (Gerasimenko et al., 1995; Khoo und Chang, 2002), in Mitochondrien (Ziegler et al., 1997; Liang et al., 1999) und in intrazellulären Vesikeln (Yamada et al., 1997; Zocchi et al., 1999); bei allen Formen befindet sich das aktive Zentrum aber topologisch außerhalb der Zelle. Eine Beteiligung dieser CD38-Formen an der Erzeugung intrazellulärer Botenstoffe ist daher umstritten (da Silva et al., 1998b; De Flora et al., 2004).

Weitere Versuche wurden mit dem Inhibitor PP2 (Hanke et al., 1996) durchgeführt, der spezifisch für Tyrosinkinasen der Src-Familie ist. In T-Lymphocyten werden durch PP2 die Proteine p56^{lck} und p59^{fyn} inhibiert (Hanke et al., 1996). Eine Hemmung dieser Kinasen bewirkte ebenfalls eine Reduktion des Ca²⁺-Signals bei Stimulation mit hohen ConA-Konzentrationen. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da es nach Aktivierung von Oberflächenrezeptoren auf T-Zellen unter Beteiligung von Tyrosin-Kinasen der Src-Familie zur Aktivierung von Signalwegen kommt (siehe Abschnitt 1.2), die zur Synthese von InsP₃ und damit zur Aktivierung von I_{CRAC} führen. Dieser Effekt war additiv zur Inhibition durch 3GA, da bei gleichzeitiger Inhibition mit beiden Substanzen der Ca²⁺-Einstrom auf Kontrollwerte reduziert werden konnte. Durch Inhibition mit PP2 wird daher der I_{CRAC}-Anteil des Ca²⁺-Signals nach ConA-Stimulation ausgeschaltet. Möglicherweise kommt es jedoch auch zu einer Reduktion des durch das ADPR/TRPM2-System bewirkten Signals, weil nicht ausgeschlossen werden kann, daß auch zur Aktivierung der ADPR-Synthese Tyrosin-Kinasen notwendig sind.

Neben der direkten Bildung von ADPR aus NAD durch NAD-Glycohydrolasen ist ein weiterer Syntheseweg für ADPR in Zellen beschreiben: Durch Fonfria et al. (2004) wurde gezeigt, daß die Aktivierung von TRPM2 nach Applikation von oxidativem Streß durch Inhibitoren von Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARPs) vermindert werden kann. Daraus folgerten die Autoren, daß es durch oxidativen Streß zur Aktivierung von PARPs kommt, die NAD spalten und ADPR-Monomere auf nucleäre Proteine übertragen (Virag und Szabo, 2002). Freies ADPR kann danach durch die Aktivität von Poly(ADP-Ribose)-Glycohydrolasen (PARGs) und ADP-Ribosyl-Proteinlyasen entstehen (Virag und Szabo, 2002). Im Vergleich zu T-Zellen ist wahrscheinlich, daß es in den verwendeten TRPM2-überexprimierenden HEK-293-Zellen zur Aktivierung anderer Signalwege kommt, zumal die verwendeten Stimuli (Quervernetzung von Oberflächen-Rezeptoren durch ConA *versus* extrazellulärer Applikation von Wasserstoffperoxid zur Erzeugung von oxidativem Streß) unterschiedlich waren.

5.2.5. Physiologische Relevanz der ADPR/TRPM2-Systems

Bei dem durch Aktivierung von TRPM2 durch ADPR ausgelösten Strom durch die Plasmamembran handelt es sich bei physiologischen Ionenkonzentrationen ganz überwiegend um den Fluß von Na⁺-Ionen in das Innere der Zelle. Dies konnte durch Versuche gezeigt werden, bei denen nach TRPM2-Aktivierung Na⁺-Ionen komplett durch organische Kationen

(*N*-Methyl-D-glucamin, NMDG) ersetzt wurden, für die TRPM2 wegen ihrer Größe nicht permeabel ist (Wehage et al., 2002). Unter diesen Bedingungen wurde der von TRPM2 getragene Strom fast auf den Nullwert reduziert, konnte allerdings durch Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf 10 mM zu einem geringen Teil wiederhergestellt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob durch Aktivierung von TRPM2 überhaupt ausreichend Ca^{2+} -Ionen in die Zelle strömen können, um dort eine signifikante Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu bewirken.

Durch Mikroinjektion von ADPR in Jurkat T-Zellen unter gleichzeitiger Einzelzell-Messung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konnte gezeigt werden, daß es durch Erhöhung der intrazellulären ADPR-Konzentration zu einem Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum kam, der eine deutliche Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bewirkte (Matthias F. Langhorst, Andreas H. Guse, persönliche Mitteilung). In Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} kam es dagegen nicht zu einem Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$, was zeigte, daß ADPR-induzierte Ca^{2+} -Signale durch Ca^{2+} -Einstrom und nicht durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern erstanden. Da nach Bastide et al. (2002) auch eine direkte Wirkung von ADPR auf Ryanodin-Rezeptoren möglich schien, wurden die Versuche auch unter Co-Injektion einer hohen Ryandin-Konzentration durchgeführt, die zu einer Inaktivierung der Ryandin-Rezeptoren führte. Dabei wurde keine deutliche Verminderung des Ca^{2+} -Signals gefunden. Durch diese Versuche konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß durch Aktivierung von TRPM2 durch ADPR unter physiologischen Bedingungen ausreichend Ca^{2+} -Ionen in die Zelle gelangen, um eine signifikante Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu bewirken.

Um die Frage zu untersuchen, ob der durch ADPR-Bildung und TRPM2-Aktivierung ausgelöste Ca^{2+} -Einstrom eine Relevanz für die durch die T-Zell-Aktivierung ausgelösten Prozesse besitzt, wurde die Induktion der Apoptose in T-Zellen durch ConA untersucht. Aus der Literatur ist bekannt, daß Stimulation mit hohen ConA-Konzentrationen ($> 30 \mu\text{g/ml}$) in diversen Zell-Typen Apoptose induzieren kann (Nagase et al., 1998; Suen et al., 2000), woran Tyrosin-Kinasen und/oder Cytochrom c beteiligt sind. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unklar. Durch die vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, daß es in Jurkat-Zellen bei Stimulation mit derartig hohen ConA-Konzentrationen zur intrazellulären Bildung von ADPR und dadurch zur Aktivierung von TRPM2 kommt. Durch Zählung der Zellen nach Stimulation mit ConA wurde gefunden, daß es bereits drei Stunden später zu einer deutlichen Verminderung der Zellzahl um 40 – 45% kam. Durch Inhibition der ADPR-Bildung mit 3GA konnte diese Verminderung dosis-abhängig blockiert werden. Dies deutete daraufhin, daß die Bildung von ADPR mit nachfolgender Aktivierung von TRPM2, die zum Einstrom von Ca^{2+} und Na^+ aus dem Extrazellulärraum führte, für den Prozeß der ConA-vermittelten Apoptose notwendig war. Dies konnte durch Kontrollexperimente bestätigt werden, bei denen nicht die ADPR-Bildung, sondern der Ca^{2+} -Einstrom durch Komplexierung des extrazellulären Ca^{2+} blockiert wurde: Hier kam es ebenfalls zu einer Verminderung des Zelltodes. Daraus ergab sich, daß es nach ConA-Stimulation durch das ADPR/TRPM2-System zu einem massiven und langanhaltenden Ca^{2+} -Einstrom kam, der in den Zellen das Apoptose-Programm

auslöste.

In der Literatur sind bereits einige Berichte über die physiologische Relevanz von TRPM2 für zelluläre Vorgänge vorhanden: [Hara et al. \(2002\)](#) konnten zeigen, daß HEK-293-Zellen durch die Expression von TRPM2 empfindlicher für oxidativen Streß wurden, der eine Auslösung des Zelltods bewirkte. Ferner wurde dort in der nativ TRPM2-exprimierenden Insulinoma-Zell-Linie CRI-G1 eine Beteiligung von TRPM2 am TNF α -induzierten Zelltod gezeigt. Nach [Zhang et al. \(2003\)](#) konnte die Suszeptibilität gegen den durch oxidativen Streß induzierten Zelltod durch Expression der negativ dominanten TRPM2-S-Isoform reduziert werden. Auch [Fonfria et al. \(2004\)](#) postulierten eine Funktion von TRPM2 bei der Reaktion auf oxidativen Streß, wobei durch diesen eine Aktivierung von PARPs stattfand, die an der Bildung von ADPR beteiligt waren. Die Freisetzung von freiem ADPR aus NAD als Reaktion auf oxidativen Streß erfolgte vermutlich aus Mitochondrien ([Perraud et al., 2005](#)). Auch für die Cytotoxizität des amyloiden β -Peptides, das an der Genese der Alzheimer-Erkrankung beteiligt ist, wurde eine Beteiligung von TRPM2 gefunden ([Fonfria et al., 2005](#)). Zusammenfassend wird eine Funktion von TRPM2 als zellulärer Sensor für oxidativen Streß postuliert, durch dessen Aktivierung ein massiver Einstrom von Na $^+$ und Ca $^{2+}$ in die Zelle ausgelöst wird. Dadurch wird einerseits eine Depolarisation der Zellmembran und andererseits eine Ca $^{2+}$ -Überladung bewirkt, was in den Zellen das Apoptose-Programm in Gang setzt und so zum Zelltod führt. Diese Hypothese konnte durch die eigenen Versuche zur ConA-induzierten T-Zell-Apoptose bestätigt werden, weil auch hierbei eine Inhibition der ADPR-Bildung oder des Ca $^{2+}$ -Einstroms die Zellzahlverminderung blockierte.

5.2.6. Regulation des Calcium-Einstroms durch das ADPR/TRPM2-System

Nach den oben dargestellten Ergebnissen ist das ADPR/TRPM2-System ein wichtiger Regulator des Ca $^{2+}$ -Einstroms in T-Lymphocyten. Demnach sind am Einstrom von Ca $^{2+}$ mehrere Kanäle beteiligt: Der bisher unbekannte Kanal, der den durch Speicher-Depletion induzierbaren Ca $^{2+}$ -Strom I_{CRAC} trägt, und der Kanal TRPM2, der durch ADPR als Agonist sowie durch die Co-Stimuli cADPR und Ca $^{2+}$ reguliert wird.

Eine genaue Steuerung von $[Ca^{2+}]_i$ ist entscheidend, um zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Motilität oder Zelltod zu regulieren (Übersicht in [Bootman et al. \(2001\)](#)). Daher können Zellen durch Aktivierung unterschiedlicher Ca $^{2+}$ -Einstrom-Wege verschiedene Arten von Ca $^{2+}$ -Signalen erzeugen, und so diverse Zellfunktionen aktivieren ([Berridge et al., 2003](#)). Es ist schon länger bekannt, daß eine Stimulation von T-Lymphocyten mit niedrigen Konzentrationen von Lektinen wie z. B. ConA eine proliferative Wirkung auf T-Zellen hat ([Powell und Leon, 1970](#); [Boldt et al., 1975](#)). Eine schematische Darstellung der dabei ablaufenden Prozesse ist in Abb. 5.1 auf Seite 105 dargestellt.

Bei dieser Stimulation kommt es durch Quervernetzung von Oberflächenproteinen zur Aktivierung von Signalwegen, die zuerst Ca $^{2+}$ aus intrazellulären Speichern freisetzen: Durch Aktivierung von Tyrosin-Kinasen (siehe Abschnitt 1.2) wird die Phospholipase C- γ aktiviert, die die Entstehung von InsP $_3$ katalysiert. Dieses bindet an seinen Rezeptor und setzt

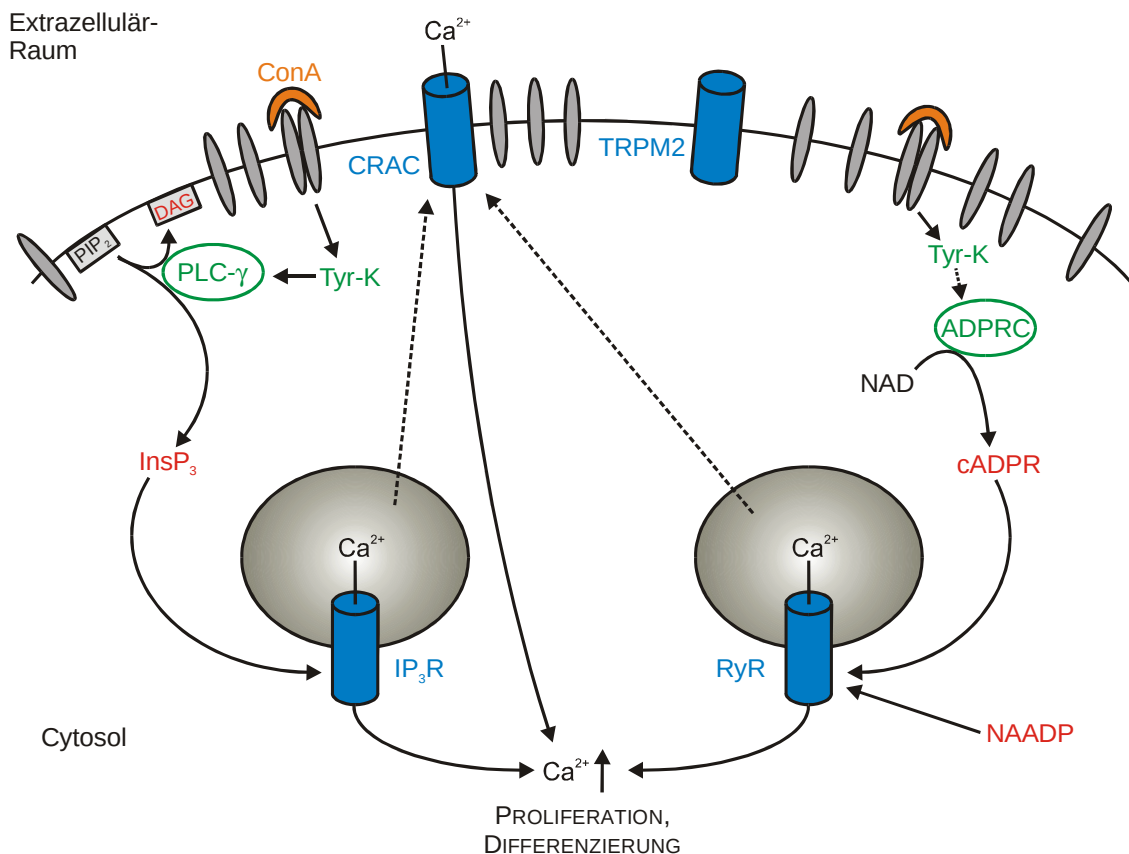


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Signalwege bei Stimulation von T-Lymphocyten mit geringen Lektin-Konzentrationen. Durch die Quervernetzung von Oberflächenrezeptoren (grau) durch ConA (orange) kommt es zur Aktivierung von Phospholipase C- γ , die Phosphatidyl-Inositol(4,5)-bisphosphat (PIP_2) in Diacylglycerol (DAG) und InsP_3 spaltet. Letzteres löst eine Ca^{2+} -Freisetzung durch den InsP_3 -Rezeptor aus. Eine ADP-Ribosylcyclase (ADPRC) setzt NAD zu cADPR um, das direkt oder indirekt Ca^{2+} -Freisetzung durch Ryanodin-Rezeptoren (RyR) auslöst. Durch die Depletion der intrazellulären Speicher wird der CRAC-Kanal aktiviert, der einen selektiven Einstrom von Ca^{2+} bewirkt. An der Erzeugung der Ca^{2+} -Signale ist möglicherweise auch NAADP durch Freisetzung aus RyR-abhängigen Speichern (Dammermann und Guse, 2005) beteiligt. Stimulation mit geringen Lektin-Konzentrationen wirkt durch die Ca^{2+} -abhängige Gen-Expression proliferativ auf T-Zellen. Das ADPR/TRPM2-System ist in dieser Situation vermutlich nicht aktiviert. Kanäle sind in blau, Botenstoffe in rot und Enzyme in grün dargestellt.

auf diese Weise Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern frei. Analog wird in einem ebenfalls Tyrosin-Kinase-abhängigen Prozeß (Guse et al., 1999) ein bislang nicht identifiziertes cytosolisches Enzym aktiviert, das als ADP-Ribosylcyclase (ADPRC) bezeichnet wird. Dieses setzt NAD zu dem sekundären Botenstoff cADPR um, der direkt oder indirekt an Ryanodin-Rezeptoren bindet, und auf diese Weise ebenfalls Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern freisetzt. Die Depletion der Ca^{2+} -speichernden Vesikel aktiviert durch einen bisher unbekannten Prozeß (siehe Abschnitt 1.3.2.1) den Einstrom von Ca^{2+} durch den CRAC-Kanal. Durch diesen strömt selektiv Ca^{2+} ein, was eine langanhaltende Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bewirkt. Diese ist notwendig, um die Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin zu aktivieren, die den Transkriptionsfaktor NF-AT dephosphoryliert, wodurch dessen Translokation in den Kern ermöglicht wird. Dadurch kommt es zur Expression von Genen, deren Produkte für die

Proliferation notwendig sind (darunter IL-2 und die α -Kette des IL-2-Rezeptors).

Den Prozessen, die eine Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auslösen, wirken andere Systeme entgegen, die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erniedrigen (Übersicht in [Berridge et al. \(2003\)](#)). Darunter sind Ca^{2+} -ATPasen der SERCA-Familie, die Ca^{2+} in die intrazellulären Speicher zurückpumpen, und Ca^{2+} -ATPasen der PMCA-Familie, die Ca^{2+} in den Extrazellulärraum pumpen. Außerdem wird $[\text{Ca}^{2+}]_i$ negativ reguliert durch Ca^{2+} -bindende Proteine, sowie durch die Aufnahme von Ca^{2+} in Mitochondrien. Der Ca^{2+} -Einstrom durch CRAC wird außerdem dadurch begrenzt, daß dieser Kanal durch einen Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ negativ reguliert wird. Ferner bewirkt der Ca^{2+} -Einstrom durch die Plasmamembran eine Depolarisation der Zellmembran. Daher nimmt die Antriebskraft für den Ca^{2+} -Einstrom mit der Zeit ab und kommt zum Erliegen, sofern nicht Prozesse aktiv sind, die eine Repolarisation ermöglichen. Dazu gehören insbesondere Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle in der Plasmamembran, die durch den Ausstrom von K^+ -Ionen eine Hyperpolarisation bewirken. Es ist bekannt, daß eine lang anhaltende Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eine notwendige Voraussetzung für Proliferation und Differenzierung von T-Lymphocyten ist ([Guse, 1998](#)).

Nach den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen besteht folgende Modellvorstellung von der Beteiligung der ADPR/TRPM2-Systems bei den durch Stimulation mit hohen Lektinkonzentrationen ausgelösten Prozessen (Abb. 5.2, Seite 107): Bei dieser massiven Stimulation kommt es nach Synthese von ADPR durch die ADPRC zusätzlich zu den in Abb. 5.1 dargestellten Prozessen zu einer irreversiblen Aktivierung von TRPM2, wodurch ein massiver Einstrom von Ca^{2+} und Na^+ ausgelöst wird. Dabei tritt eine positive Rückkopplung auf, weil TRPM2 durch Ca^{2+} und cADPR co-aktiviert wird. Der starke Ca^{2+} -Einstrom und die Depolarisation lösen schließlich den Zelltod aus.

Von [Harootunian et al. \(1989\)](#) wurde nach Stimulation von Jurkat T-Lymphocyten mit Phyto-Hämagglutinin (PHA) ein Na^+ -Einstrom in die Zellen beschrieben. Obwohl TRPM2 damals noch nicht bekannt war und die molekulare Ursache dieses Na^+ -Stroms nicht zugeordnet werden konnte, könnte es sich durchaus um einen durch das ADPR/TRPM2-System verursachten Prozeß handeln. Eine weitere Komponente des TRPM2-Signalsystems ist möglicherweise die Bildung reaktiver Sauerstoff-Species (ROS) nach T-Zell-Aktivierung. Durch Stimulation des T-Zell-Rezeptors kam es zur Bildung von ROS, die sowohl proliferativ als auch apoptotisch wirkten ([Devadas et al., 2002](#)). An der apoptotischen Wirkung könnte TRPM2 wegen seiner Aktivierbarkeit durch oxidativen Streß (siehe Abschnitt 1.4.2) beteiligt sein.

Damit kommt insbesondere der ADPRC als Enzym, das sowohl den Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoff cADPR als auch den Ca^{2+} -Einstrom auslösenden TRPM2-Agonisten ADPR bildet, eine ungewöhnliche Funktion zu: Da alle bisher bekannten Enzyme mit NAD-Glycolydhrolase-Aktivität auch als ADP-Ribosylcyclasen agieren können ([Cakir-Kiefer et al., 2000](#); [Schuber und Lund, 2004](#)), ist dieses bisher unbekannte Enzym möglicherweise der entscheidende Regulator für das Schicksal von Immunzellen: Bei physiologischer Stimulation, die im Experiment durch niedrige Lektin-Konzentration nachgestellt werden kann, bildet das En-

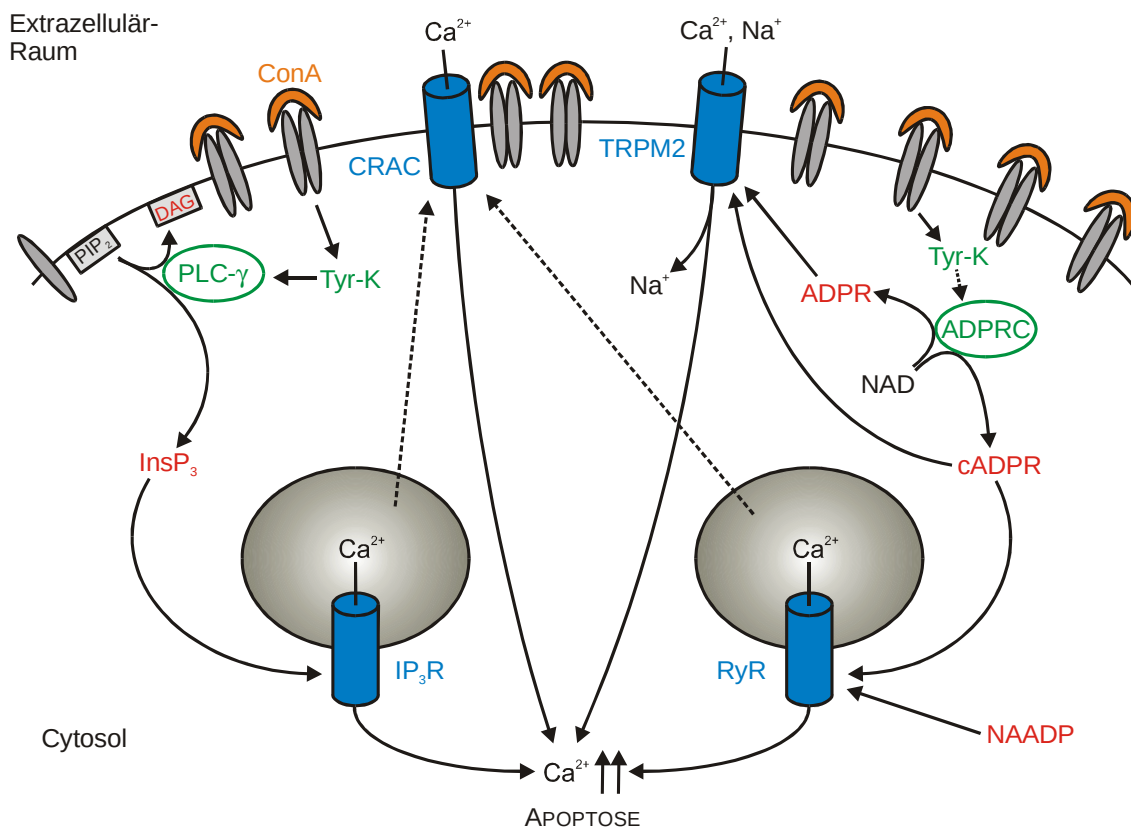


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der Signalwege bei Stimulation von T-Lymphocyten mit hohen Lektin-Konzentrationen. Durch sehr starke Quervernetzung von Oberflächenrezeptoren kommt es zur zusätzlich zu den in Abb. 5.2 dargestellten Prozessen zur Bildung von ADPR durch die ADPRC. Dieses aktiviert gemeinsam mit cADPR und Ca²⁺ den Kanal TRPM2, der einen Einstrom von Ca²⁺ und Na⁺ auslöst. TRPM2 wird durch Ca²⁺ positiv reguliert, so daß es zu einer positiven Rückkopplung kommt. Durch die massive Depolarisation und die sprunghafte Erhöhung von [Ca²⁺]_i („Ca²⁺ overload“) wird in den Zellen der Zelltod ausgelöst.

zism hauptsächlich cADPR und bewirkt damit Ca²⁺-Freisetzung und sekundär einen Ca²⁺-Einstrom durch CRAC-Kanäle. Dadurch entsteht im Gleichgewicht mit den [Ca²⁺]_i negativ regulierenden Prozessen (Inaktivierung von I_{CRAC} , Membrandepolarisation, Pufferproteine, Mitochondrien, SERCAs und PMCAs) eine langanhaltende, mäßige Erhöhung von [Ca²⁺]_i, die der Zelle die Transkription der für die Proliferation notwendigen Gene erlaubt. Dagegen kommt es bei sehr starker Stimulation, im Experiment durch hohe Lektin-Konzentrationen, zu einer Änderung der Aktivität der ADPRC: Es werden große Mengen ADPR hergestellt, die gemeinsam mit cADPR und Ca²⁺ TRPM2 irreversibel aktivieren, und so durch massive Ca²⁺-Überladung und starke Depolarisation die Zelle in den Zelltod treiben. Eine interessante Parallele zu diesem Modell tritt auch *in vivo* bei Immunzellen auf: Durch massive Stimulation von T-Zellen in einem physiologischen Kontext, d. h. durch antigen-präsentierende Zellen, kann in T-Lymphocyten Apoptose ausgelöst werden (Strasser und Bouillet, 2003). Es ist daher zu vermuten, daß auch an diesen Prozessen das ADPR/TRPM2-System beteiligt sein könnte.

6. Zusammenfassung

Die Adenin-haltigen Nucleotide NAADP und ADPR lösen die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern bzw. den Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum aus (Guse, 2002; Perraud et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Funktion der beiden putativen Botenstoffe bei der Erzeugung von Ca^{2+} -Signalen in T-Lymphocyten untersucht.

NAADP ist als RyR-Agonist (Mojzisova et al., 2001; Hohenegger et al., 2002) vermutlich an der Erzeugung des initialen Ca^{2+} -Signals nach Stimulation beteiligt (Berg et al., 2000; Langhorst et al., 2004; Dammermann und Guse, 2005). Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Verfahren etabliert, um intrazelluläre NAADP-Konzentrationen zu bestimmen.

Durch HPLC-Analytik mit Vorsäulen-Fluoreszenzderivatisierung war eine Quantifizierung von NAADP mit einem Detektionslimit von 500 fmol möglich. Dieses Verfahren war zwar zur Bestimmung zellulärer NAADP-Mengen nicht ausreichend empfindlich, aber es konnte durch diese Experimente erstmals gezeigt werden, daß sich NAADP mit Chloroacetaldehyd direkt zu fluoreszierendem 1,*N*⁶-Etheno-NAADP umsetzen läßt.

Als alternative Methode zur Quantifizierung von NAADP wurde ein mehrstufiger Enzym-Assay entwickelt. Dieser hat den Vorteil, daß durch zwei gekoppelte enzymatische Reaktionen eine starke Amplifikation des Ausgangssignals erreicht werden kann. Mit dieser Methode waren NAADP-Mengen mit einem Detektionslimit von 25 fmol quantifizierbar. In Zellen endogen vorkommende andere Nucleotide zeigten bei einem 1000fachen Überschuß keine Interferenz mit dem Enzym-Assay. Zur Entfernung von endogenem NADP, das den Assay stören würde, konnte ein enzymatischer Verdau mit einer NAD-Glycohydrolase etabliert werden. Außerdem wurde eine Technik zur Extraktion von NAADP aus T-Lymphocyten entwickelt, bei der störende Substanzen durch eine Festphasenextraktion entfernt wurden. Mit dem entwickelten Verfahren konnten basale NAADP-Konzentrationen in humanen T-Lymphocyten bestimmt werden. Die intrazelluläre NAADP-Konzentration betrug $6.6 \pm 1.6 \text{ nM}$ ($n = 4$, Mittelwert $\pm$ SEM) und lag damit unterhalb der Konzentration, die in T-Zellen eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern auslöst (Berg et al., 2000).

TRPM2 ist ein für Ca^{2+} - und Na^{+} -Ionen permeabler Kanal aus der TRP-Superfamilie, der durch ADPR aktiviert wird und für den eine Beteiligung am Ca^{2+} -Einstrom postuliert wurde (Ayub und Hallett, 2004; Perraud et al., 2004). Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher eine HPLC-basierte Methode entwickelt, die erstmalig die Quantifizierung des TRPM2-Agonisten ADPR erlaubte (Gasser und Guse, 2005). Durch zwei unterschiedliche HPLC-Verfahren sowie die Bestimmung des UV-Spektrums wurden die Identität und Reinheit des ADPR-Peaks gezeigt. Mit der Methode wurde in humanen T-Lymphocyten eine basale ADPR-Konzentration von $44 \pm 11 \mu\text{M}$ ($n = 26$, Mittelwert $\pm$ SD) bestimmt, die bei Stimulation der

Zellen mit einer hohen Konzentration des Lektins ConA auf etwa das 1.5fache anstieg. Diese Erhöhung der ADPR-Konzentration führte, vermutlich unter Beteiligung von Ca^{2+} (McHugh et al., 2003) und cADPR (Kolisek et al., 2005) als Co-Stimuli, zur Aktivierung von TRPM2.

Durch RT-PCR-Analysen wurde bestätigt, daß Jurkat T-Lymphocyten mehrere TRPM2-Isoformen exprimieren. Die pharmakologische Charakterisierung des durch Stimulation ausgelösten Ca^{2+} -Einstroms ergab, daß zusätzlich zu dem bekannten Ca^{2+} -Einstrom durch den CRAC-Kanal (Lewis und Cahalan, 1989; Hoth, 1995) mindestens eine weitere Komponente auftrat, die durch Hemmung der ADPR-Bildung blockiert werden konnte. Eine Beteiligung der Src-Kinasen p59^{fyn} und p56^{lck} konnte mit dem Kinase-Inhibitor PP2 gezeigt werden, während eine Rolle des Ekto-Enzyms CD38 für die Erzeugung des Ca^{2+} -Signals ausgeschlossen wurde. Die physiologische Relevanz des ADPR/TRPM2-Systems wurde durch Untersuchungen zur Induktion der Apoptose durch hohe ConA-Konzentrationen nachgewiesen.

Zusammenfassend konnten mit dem entwickelten Verfahren intrazelluläre NAADP-Konzentrationen quantifiziert und damit eine wichtige Grundlage für die eingehende Untersuchung der Rolle dieses Nucleotids bei der Ca^{2+} -Freisetzung in T-Lymphocyten geschaffen werden. Für ADPR wurde eine Funktion als sekundärer Botenstoff nachgewiesen, der nach Stimulation zur Aktivierung von TRPM2 führt, dadurch einen Einstrom von Ca^{2+} und Na^{+} bewirkt und so den Zelltod auslösen kann. Beide Teilprojekte dienten dazu, die bisherigen Modellvorstellungen zur Erzeugung von Ca^{2+} -Signalen weiter auszubauen, um molekulare Ziele für die Entwicklung von Pharmaka zu identifizieren, die gezielt in diese Signalprozesse eingreifen könnten.

7. Abstract

Both the nucleotides nicotinic acid-adenine dinucleotide 2'-phosphate (NAADP) and adenosine diphosphoribose (ADPR) are involved in the generation of Ca^{2+} signals by release of Ca^{2+} from intracellular stores or by activating Ca^{2+} influx from the extracellular space, respectively (Guse, 2002; Perraud et al., 2004). Thus, objective of the current study was to investigate the functions of NAADP and ADPR for Ca^{2+} signalling in human T lymphocytes.

NAADP is involved in the initial Ca^{2+} signal after stimulation, possibly by releasing Ca^{2+} from intracellular stores (Mojzisova et al., 2001; Hohenegger et al., 2002). Thus, two methods were developed to determine intracellular NAADP concentrations.

Quantification of NAADP using HPLC analysis with pre-column derivatization and fluorescence detection resulted in a detection limit of 500 fmol. However, although this method was not sufficiently sensitive to determine intracellular NAADP concentration, a direct derivatization of NAADP with chloroacetaldehyde yielding fluorescent 1, N^6 -etheno-NAADP was conducted for the first time.

An enzyme assay consisting of multiple steps was developed as an alternative approach to quantify NAADP. This assay takes advantage of a strong amplification by two coupled enzymatic reactions, allowing the detection of 25 fmol NAADP. Other endogenous nucleotides did not interfere with the assay when tested in a 1000fold excess. NADP, however, interfered with the assay; thus, an enzymatic cleavage reaction using a NAD glycohydrolase was established. The enzyme assay was combined with a protocol for extraction of endogenous NAADP, and solid phase extraction to remove interfering compounds. Using this method, basal NAADP levels of 6.6 ± 1.6 nM ($n = 4$, mean $\pm$ SEM) were determined in human T-lymphocytes, which is below the threshold concentration for Ca^{2+} release from intracellular stores (Berg et al., 2000).

ADPR acts as an intracellular agonist of the Ca^{2+} and Na^+ permeable cation channel TRPM2, which belongs to the TRP superfamily of ion channels. A role of TRPM2 in Ca^{2+} influx and response to oxidative stress was postulated (Ayub und Hallett, 2004; Perraud et al., 2004), but direct evidence for a messenger function of ADPR is yet missing. To quantify endogenous ADPR levels, a HPLC method was developed (Gasser und Guse, 2005) based on a protocol for the determination of cADPR (da Silva et al., 1998a). Purity and homogeneity of the ADPR peak were demonstrated by two different HPLC columns and the UV fingerprint. The basal ADPR concentration amounted to 44 ± 11 μM ($n = 26$, mean $\pm$ SD) in human T-lymphocytes, and increased about 1.5fold upon stimulation of the cells with the lectin ConA. This increase in ADPR levels activated TRPM2, probably in concert with the co-stimuli Ca^{2+} (McHugh et al., 2003) and cADPR (Kolisek et al., 2005).

The expression of different TRPM2 isoforms in Jurkat cells was confirmed by RT-PCR. Stimulation of T cells with ConA resulted in a sustained Ca^{2+} influx, which consisted of at least of two components: besides the classical I_{CRAC} (Lewis und Cahalan, 1989; Hoth, 1995), a second Ca^{2+} influx pathway was characterized. The latter was active at elevated ADPR concentrations, as demonstrated by inhibition of endogenous ADPR formation by cibacron blue 3GA. An involvement of the tyrosine kinases p59^{fyn} and p56^{lck} in the ConA-induced Ca^{2+} influx was demonstrated using the tyrosine kinase inhibitor PP2, whereas a major role of the CD38 ecto-enzyme was ruled out. A physiological relevance of the ADPR/TRPM2 system was revealed by inhibition of ConA-induced apoptosis upon block of ADPR formation.

In the current study, two methods were developed to analyze the functions of adenine derived Ca^{2+} -mobilizing compounds: The development of an assay for the determination of cellular NAADP levels is an important step towards confirming a messenger function of this molecule. The TRPM2 agonist ADPR acts as a second messenger, since the cellular concentration increased upon stimulation of human T-lymphocytes. This results in gating of TRPM2 by ADPR, activating an influx of Ca^{2+} and Na^{+} and finally leading to cell death. These findings may improve the current models of Ca^{2+} signalling in human T cells, thereby revealing new drug targets for pharmacological manipulation of Ca homeostasis.

8. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas H. Guse für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung sämtlicher technischer und finanzieller Mittel sowie die kompetenten und zahlreichen Anregungen. Bedanken möchte ich mich weiterhin für seine stete Diskussionsbereitschaft und die motivierende, engagierte Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Chris Meier danke ich für die bereitwillige Übernahme der Betreuung der Arbeit am Fachbereich Chemie.

Herrn Prof. Dr. Norman Oppenheimer danke ich für die freundliche Überlassung von ara-F-NAD.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung, insbesondere bei Ralf Fliegert, Svenja Kunerth und Karin Weber, möchte ich mich für die immerwährende Bereitschaft zur Diskussion wissenschaftlicher und experimenteller Probleme, die ausgesprochen hilfsbereite und nette Unterstützung und nicht zuletzt für das ausgezeichnete, motivierende Arbeitsklima bedanken.

Ferner sei meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums sowie der Fritz-ter-Meer-Stiftung, Leverkusen, für die finanzielle Unterstützung gedankt.

9. Literaturverzeichnis

- Aarhus, R., D. Dickey, R. Graeff, K. Gee, T. Walseth und H. Lee, Activation and inactivation of Ca^{2+} release by NAADP^+ . *J Biol Chem*, **271** (15), 8513–6 (1996).
- Aarhus, R., R. Graeff, D. Dickey, T. Walseth und H. Lee, ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J Biol Chem*, **270** (51), 30327–33 (1995).
- Abraham, R. und A. Weiss, Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat Rev Immunol*, **4** (4), 301–8 (2004).
- Acuto, O. und D. Cantrell, T cell activation and the cytoskeleton. *Annu Rev Immunol*, **18**, 165–84 (2000).
- Ayub, K. und M. Hallett, The mitochondrial ADPR link between Ca^{2+} store release and Ca^{2+} influx channel opening in immune cells. *FASEB J*, **18** (12), 1335–8 (2004).
- Bak, J., R. Billington, G. Timar, A. Dutton und A. Genazzani, NAADP receptors are present and functional in the heart. *Curr Biol*, **11** (12), 987–90 (2001).
- Bak, J., P. White, G. Timar, L. Missiaen, A. Genazzani und A. Galione, Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate triggers Ca^{2+} release from brain microsomes. *Curr Biol*, **9** (14), 751–4 (1999).
- Barden, R., P. Darke, R. Deems und E. Dennis, Interaction of phospholipase A2 from cobra venom with Cibacron Blue F3GA. *Biochemistry*, **19** (8), 1621–5 (1980).
- Bastide, B., K. Snoeckx und Y. Mounier, ADP-ribose stimulates the calcium release channel RyR1 in skeletal muscle of rat. *Biochem Biophys Res Commun*, **296** (5), 1267–71 (2002).
- Behl, B., M. Goppelt-Strube, B. Schwinzer, K. Wiebe und K. Resch, Phospholipid-metabolism of a stimulated murine T cell clone. *Biochem Biophys Res Commun*, **144** (3), 1303–12 (1987).
- Beinert, W. D., K. Bischoff, K.-S. Boos, F. Eisenbeiss, J. Emmert, R. Galensa, W. Gau, K. Harzer, H. He, M. Hamburger, H. Hostettmann, W. Jost, H. Müller, E. Oelrich, K. Reichert, M. Schoeneshöfer, R. Spatz, E. Weber und H. Winkler, *Handbuch der HPLC, Teil 1* (GIT Verlag, Darmstadt, 1989).

- Berg, I., B. Potter, G. Mayr und A. Guse, Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP⁺) is an essential regulator of T-lymphocyte Ca²⁺-signaling. *J Cell Biol*, **150** (3), 581–8 (2000).
- Berridge, G., R. Cramer, A. Galione und S. Patel, Metabolism of the novel Ca²⁺-mobilizing messenger nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate via a 2'-specific Ca²⁺-dependent phosphatase. *Biochem J*, **365** (1), 295–301 (2002a).
- Berridge, G., G. Dickinson, J. Parrington, A. Galione und S. Patel, Solubilization of receptors for the novel Ca²⁺-mobilizing messenger, nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *J Biol Chem*, **277** (46), 43717–23 (2002b).
- Berridge, M., Lymphocyte activation in health and disease. *Crit Rev Immunol*, **17** (2), 155–78 (1997).
- Berridge, M., M. Bootman und P. Lipp, Calcium—a life and death signal. *Nature*, **395** (6703), 645–8 (1998).
- Berridge, M., M. Bootman und H. Roderick, Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4** (7), 517–29 (2003).
- Billington, R. und A. Genazzani, Characterization of NAADP⁺ binding in sea urchin eggs. *Biochem Biophys Res Commun*, **276** (1), 112–6 (2000).
- Billington, R., A. Ho und A. Genazzani, Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) is present at micromolar concentrations in sea urchin spermatozoa. *J Physiol*, **544** (1), 107–12 (2002).
- Birnbaumer, L., X. Zhu, M. Jiang, G. Boulay, M. Peyton, B. Vannier, D. Brown, D. Platano, H. Sadeghi, E. Stefani und M. Birnbaumer, On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93** (26), 15195–202 (1996).
- Bobalova, J., P. Bobal und V. Mutafova-Yambolieva, High-performance liquid chromatographic technique for detection of a fluorescent analogue of ADP-ribose in isolated blood vessel preparations. *Anal Biochem*, **305** (2), 269–76 (2002).
- Boittin, F., A. Galione und A. Evans, Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate mediates Ca²⁺ signals and contraction in arterial smooth muscle via a two-pool mechanism. *Circ Res*, **91** (12), 1168–75 (2002).
- Boldt, D., R. MacDermott und E. Jorolan, Interaction of plant lectins with purified human lymphocyte populations: binding characteristics and kinetics of proliferation. *J Immunol*, **114** (5), 1532–6 (1975).

- Bolen, J., Protein tyrosine kinases in the initiation of antigen receptor signaling. *Curr Opin Immunol*, **7** (3), 306–11 (1995).
- Bootman, M., T. Collins, C. Peppiatt, L. Prothero, L. MacKenzie, P. De Smet, M. Travers, S. Tovey, J. Seo, M. Berridge, F. Ciccolini und P. Lipp, Calcium signalling—an overview. *Semin Cell Dev Biol*, **12** (1), 3–10 (2001).
- Bruhn, S., *Bestimmung zellulärer NAADP-Konzentrationen durch einen enzymatischen Assay*. Diplomarbeit, Universität Hamburg (2005).
- Budagian, V., E. Bulanova, L. Brovko, Z. Orinska, R. Fayad, R. Paus und S. Bulfone-Paus, Signaling through P2X7 receptor in human T cells involves p56lck, MAP kinases, and transcription factors AP-1 and NF-kappa B. *J Biol Chem*, **278** (3), 1549–60 (2003).
- Burnstock, G. und J. Warland, P2-purinoceptors of two subtypes in the rabbit mesenteric artery: reactive blue 2 selectively inhibits responses mediated via the P2y- but not the P2x-purinoceptor. *Br J Pharmacol*, **90** (2), 383–91 (1987).
- Cakir-Kiefer, C., H. Muller-Steffner und F. Schubert, Unifying mechanism for Aplysia ADP-ribosyl cyclase and CD38/NAD⁺ glycohydrolases. *Biochem J*, **349** (1), 203–10 (2000).
- Cancela, J., Specific Ca²⁺ signaling evoked by cholecystokinin and acetylcholine: the roles of NAADP, cADPR, and IP3. *Annu Rev Physiol*, **63**, 99–117 (2001).
- Cancela, J., G. Charpentier und O. Petersen, Co-ordination of Ca²⁺ signalling in mammalian cells by the new Ca²⁺-releasing messenger NAADP. *Pflügers Arch*, **446** (3), 322–7 (2003).
- Cancela, J., G. Churchill und A. Galione, Coordination of agonist-induced Ca²⁺-signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. *Nature*, **398** (6722), 74–6 (1999).
- Caterina, M., M. Schumacher, M. Tominaga, T. Rosen, J. Levine und D. Julius, The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389** (6653), 816–24 (1997).
- Chan, A. und A. Shaw, Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Curr Opin Immunol*, **8** (3), 394–401 (1996).
- Chini, E., C. Chini, I. Kato, S. Takasawa und H. Okamoto, CD38 is the major enzyme responsible for synthesis of nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate in mammalian tissues. *Biochem J*, **362** (1), 125–30 (2002).
- Chini, E. und F. De Toledo, Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate: a new intracellular second messenger? *Am J Physiol Cell Physiol*, **282** (6), C1191–8 (2002).
- Chini, E. und T. Dousa, Enzymatic synthesis and degradation of nicotinate adenine dinucleotide phosphate (NAADP), a Ca²⁺-releasing agonist, in rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, **209** (1), 167–74 (1995).

- Chow, S., G. Kass und S. Orrenius, Two independently regulated Ca^{2+} entry mechanisms coexist in Jurkat T cells during T cell receptor antigen activation. *Biochem J*, **293** (2), 395–8 (1993).
- Churamani, D., E. Carrey, G. Dickinson und S. Patel, Determination of cellular nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate (NAADP) levels. *Biochem J*, **380** (2), 449–54 (2004).
- Churamani, D., G. Dickinson und S. Patel, NAADP binding to its target protein in sea urchin eggs requires phospholipids. *Biochem J*, **386** (3), 497–504 (2005).
- Churchill, G. und A. Galione, Spatial control of Ca^{2+} signaling by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate diffusion and gradients. *J Biol Chem*, **275** (49), 38687–92 (2000).
- Churchill, G., Y. Okada, J. Thomas, A. Genazzani, S. Patel und A. Galione, NAADP mobilizes Ca^{2+} from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell*, **111** (5), 703–8 (2002).
- Claes, P., K. Van Kolen, D. Roymans, D. Blero, K. Vissenberg, C. Erneux, J. Verbelen, E. Es-mans und H. Slegers, Reactive blue 2 inhibition of cyclic AMP-dependent differentiation of rat C6 glioma cells by purinergic receptor-independent inactivation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem Pharmacol*, **67** (8), 1489–98 (2004).
- Clapham, D., Intracellular calcium. Replenishing the stores. *Nature*, **375** (6533), 634–5 (1995).
- Clapham, D., TRP channels as cellular sensors. *Nature*, **426** (6966), 517–24 (2003).
- Clapham, D., L. Runnels und C. Strübing, The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*, **2** (6), 387–96 (2001).
- Clapper, D., T. Walseth, P. Dargie und H. Lee, Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J Biol Chem*, **262** (20), 9561–8 (1987).
- Clementi, E., M. Riccio, C. Sciorati, G. Nistico und J. Meldolesi, The type 2 ryanodine receptor of neurosecretory PC12 cells is activated by cyclic ADP-ribose. Role of the nitric oxide/cGMP pathway. *J Biol Chem*, **271** (30), 17739–45 (1996).
- da Silva, C., F. Emmrich und A. Guse, Adriamycin inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase activity in vitro and blocks formation of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate in stimulated Jurkat T-lymphocytes. Does inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate play a role in Ca^{2+} -entry? *J Biol Chem*, **269** (17), 12521–6 (1994).
- da Silva, C., B. Potter, G. Mayr und A. Guse, Quantification of intracellular levels of cyclic ADP-ribose by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **707** (1-2), 43–50 (1998a).

- da Silva, C., K. Schweitzer, P. Heyer, F. Malavasi, G. Mayr und A. Guse, Ectocellular CD38-catalyzed synthesis and intracellular Ca^{2+} -signalling activity of cyclic ADP-ribose in T-lymphocytes are not functionally related. *FEBS Lett*, **439** (3), 291–6 (1998b).
- Dammermann, W. und A. Guse, Functional ryanodine receptor expression is required for NAADP-mediated local Ca^{2+} signaling in T-lymphocytes. *J Biol Chem*, **280** (22), 21394–9 (2005).
- De Flora, A., E. Zocchi, L. Guida, L. Franco und S. Bruzzone, Autocrine and paracrine calcium signaling by the CD38/ NAD^+ /cyclic ADP-ribose system. *Ann N Y Acad Sci*, **1028**, 176–91 (2004).
- Dean, P. und D. Watson, Protein purification using immobilised triazine dyes. *J Chromatogr*, **165** (3), 301–19 (1979).
- Devadas, S., L. Zaritskaya, S. Rhee, L. Oberley und M. Williams, Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression. *J Exp Med*, **195** (1), 59–70 (2002).
- Dickinson, G. und S. Patel, Modulation of NAADP (nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate) receptors by K^+ ions: evidence for multiple NAADP receptor conformations. *Biochem J*, **375** (3), 805–12 (2003).
- Dolmetsch, R., K. Xu und R. Lewis, Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*, **392** (6679), 933–6 (1998).
- Downward, J., Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol*, **10** (2), 262–7 (1998).
- Fliegert, R., *Untersuchungen zur Wirkung von Nucleotidanaloga auf den cADPR/ Ca^{2+} -Signalweg in T-Lymphocyten*. Diplomarbeit, Universität Hamburg (1999).
- Fliegert, R., *Die Lokalisation des Ionenkanals TRPM4 und seine Bedeutung für Membranpotential und Calcium-Signale*. Dissertation, Universität Hamburg (2005).
- Fonfria, E., I. Marshall, C. Benham, I. Boyfield, J. Brown, K. Hill, J. Hughes, S. Skaper und S. McNulty, TRPM2 channel opening in response to oxidative stress is dependent on activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Br J Pharmacol*, **143** (1), 186–92 (2004).
- Fonfria, E., I. Marshall, I. Boyfield, S. Skaper, J. Hughes, D. Owen, W. Zhang, B. Miller, C. Benham und S. McNulty, Amyloid beta-peptide(1-42) and hydrogen peroxide-induced toxicity are mediated by TRPM2 in rat primary striatal cultures. *J Neurochem* (2005).
- Franco, L., L. Guida, S. Bruzzone, E. Zocchi, C. Usai und A. De Flora, The transmembrane glycoprotein CD38 is a catalytically active transporter responsible for generation and influx

- of the second messenger cyclic ADP-ribose across membranes. *FASEB J*, **12** (14), 1507–20 (1998).
- Fu, H., X. Huang, W. Jin und H. Zou, The separation of biomolecules using capillary electrophoresis. *Curr Opin Biotechnol*, **14** (1), 96–100 (2003).
- Galione, A., J.-M. Cancela, G. C. Churchill, A. A. Genazzani, C. Lad, J. Thomas, H. Wilson und D. A. Treddar, *Methods in Calcium Signalling* (CRC Press, Boca Raton, 2000).
- Galione, A., H. Lee und W. Busa, Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science*, **253** (5024), 1143–6 (1991).
- Galione, A. und O. Petersen, The NAADP Receptor: New Receptors or New Regulation? *Mol Interv*, **5** (2), 73–9 (2005).
- Galione, A. und M. Ruas, NAADP receptors. *Cell Calcium*, **38** (3-4), 273–80 (2005).
- Gasser, A. und A. Guse, 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 (2005).
- Geldart, S. und P. Brown, Analysis of nucleotides by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, **828** (1-2), 317–36 (1998).
- Genazzani, A. und R. Billington, NAADP: an atypical Ca^{2+} -release messenger? *Trends Pharmacol Sci*, **23** (4), 165–7 (2002).
- Genazzani, A., M. Mezna, D. Dickey, F. Michelangeli, T. Walseth und A. Galione, Pharmacological properties of the Ca^{2+} -release mechanism sensitive to NAADP in the sea urchin egg. *Br J Pharmacol*, **121** (7), 1489–95 (1997).
- Gerasimenko, J., Y. Maruyama, K. Yano, N. Dolman, A. Tepikin, O. Petersen und O. Gerasimenko, NAADP mobilizes Ca^{2+} from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors. *J Cell Biol*, **163** (2), 271–82 (2003).
- Gerasimenko, O., J. Gerasimenko, A. Tepikin und O. Petersen, ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca^{2+} from the nuclear envelope. *Cell*, **80** (3), 439–44 (1995).
- Gibon, Y. und F. Larher, Cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotides: NaCl precipitation and ethanol solubilization of the reduced tetrazolium. *Anal Biochem*, **251** (2), 153–7 (1997).
- Glennon, M., G. Bird, C. Kwan und J. Putney, Jr, Actions of vasopressin and the Ca^{2+} -ATPase inhibitor, thapsigargin, on Ca^{2+} signaling in hepatocytes. *J Biol Chem*, **267** (12), 8230–3 (1992).

- Goldberg, N., S. Dietz und A. O'Toole, Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in mammalian tissues and urine. *J Biol Chem*, **244** (16), 4458–66 (1969).
- Graeff, R. und H. Lee, A novel cycling assay for cellular cADP-ribose with nanomolar sensitivity. *Biochem J*, **361** (2), 379–84 (2002a).
- Graeff, R. und H. Lee, A novel cycling assay for nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate with nanomolar sensitivity. *Biochem J*, **367** (1), 163–8 (2002b).
- Grynkiewicz, G., M. Poenie und R. Tsien, A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, **260** (6), 3440–50 (1985).
- Guida, L., E. Zocchi, L. Franco, U. Benatti und A. De Flora, Presence and turnover of adenosine diphosphate ribose in human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **188** (1), 402–8 (1992).
- Guse, A., Ca^{2+} signaling in T-lymphocytes. *Crit Rev Immunol*, **18** (5), 419–48 (1998).
- Guse, A., Cyclic ADP-ribose (cADPR) and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP): novel regulators of Ca^{2+} -signaling and cell function. *Curr Mol Med*, **2** (3), 273–82 (2002).
- Guse, A., Biochemistry, biology, and pharmacology of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Curr Med Chem*, **11** (7), 847–55 (2004).
- Guse, A., Second messenger function and the structure-activity relationship of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *FEBS J*, **272** (18), 4590–7 (2005).
- Guse, A., C. da Silva, I. Berg, A. Skapenko, K. Weber, P. Heyer, M. Hohenegger, G. Ashamu, H. Schulze-Koops, B. Potter und G. Mayr, Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature*, **398** (6722), 70–3 (1999).
- Guse, A., C. da Silva, F. Emmrich, G. Ashamu, B. Potter und G. Mayr, Characterization of cyclic adenosine diphosphate-ribose-induced Ca^{2+} release in T lymphocyte cell lines. *J Immunol*, **155** (7), 3353–9 (1995).
- Guse, A., C. da Silva, B. Potter und G. Mayr, Ca^{2+} -signalling in human T-lymphocytes. Potential roles for cyclic ADP-ribose and 2'-phospho-cyclic ADP-ribose. *Adv Exp Med Biol*, **419**, 431–6 (1997).
- Guse, A., E. Roth und F. Emmrich, Intracellular Ca^{2+} pools in Jurkat T-lymphocytes. *Biochem J*, **291** (2), 447–51 (1993).
- Hanke, J., J. Gardner, R. Dow, P. Changelian, W. Brissette, E. Weringer, B. Pollok und P. Connelly, Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem*, **271** (2), 695–701 (1996).

- Hara, Y., M. Wakamori, M. Ishii, E. Maeno, M. Nishida, T. Yoshida, H. Yamada, S. Shimizu, E. Mori, J. Kudoh, N. Shimizu, H. Kurose, Y. Okada, K. Imoto und Y. Mori, LTRPC2 Ca^{2+} -permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell*, **9** (1), 163–73 (2002).
- Hardie, R. und B. Minke, The trp gene is essential for a light-activated Ca^{2+} channel in Drosophila photoreceptors. *Neuron*, **8** (4), 643–51 (1992).
- Harootunian, A., J. Kao, B. Eckert und R. Tsien, Fluorescence ratio imaging of cytosolic free Na^{+} in individual fibroblasts and lymphocytes. *J Biol Chem*, **264** (32), 19458–67 (1989).
- Heiner, I., J. Eisfeld, C. Halaszovich, E. Wehage, E. Jüngling, C. Zitt und A. Lückhoff, Expression profile of the transient receptor potential (TRP) family in neutrophil granulocytes: evidence for currents through long TRP channel 2 induced by ADP-ribose and NAD. *Biochem J*, **371** (3), 1045–53 (2003).
- Higashida, H., A. Egorova, C. Higashida, Z. Zhong, S. Yokoyama, M. Noda und J. Zhang, Sympathetic potentiation of cyclic ADP-ribose formation in rat cardiac myocytes. *J Biol Chem*, **274** (47), 33348–54 (1999).
- Higashida, H., S. Yokoyama, M. Hashii, M. Taketo, M. Higashida, T. Takayasu, T. Ohshima, S. Takasawa, H. Okamoto und M. Noda, Muscarinic receptor-mediated dual regulation of ADP-ribosyl cyclase in NG108-15 neuronal cell membranes. *J Biol Chem*, **272** (50), 31272–7 (1997).
- Higashida, H., J. Zhang, M. Hashii, M. Shintaku, C. Higashida und Y. Takeda, Angiotensin II stimulates cyclic ADP-ribose formation in neonatal rat cardiac myocytes. *Biochem J*, **352** (1), 197–202 (2000).
- Hohenegger, M., J. Suko, R. Gscheidlinger, H. Drobny und A. Zidar, Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate activates the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochem J*, **367** (2), 423–31 (2002).
- Hoth, M., Calcium and barium permeation through calcium release-activated calcium (CRAC) channels. *Pflügers Arch*, **430** (3), 315–22 (1995).
- Hoth, M. und R. Penner, Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, **355** (6358), 353–6 (1992).
- Hoth, M. und R. Penner, Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol*, **465**, 359–86 (1993).
- Huang, D., Y. Zhang und X. Chen, Analysis of intracellular nucleoside triphosphate levels in normal and tumor cell lines by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **784** (1), 101–9 (2003).

- Imboden, J. und J. Stobo, Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores. *J Exp Med*, **161** (3), 446–56 (1985).
- Inamura, K., Y. Sano, S. Mochizuki, H. Yokoi, A. Miyake, K. Nozawa, C. Kitada, H. Matsushime und K. Furuichi, Response to ADP-ribose by activation of TRPM2 in the CRI-G1 insulinoma cell line. *J Membr Biol*, **191** (3), 201–7 (2003).
- Irvine, R., 'Quantal' Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates—a possible mechanism. *FEBS Lett*, **263** (1), 5–9 (1990).
- Jacobson, E. und M. Jacobson, Pyridine nucleotide levels as a function of growth in normal and transformed 3T3 cells. *Arch Biochem Biophys*, **175** (2), 627–34 (1976).
- Janeway, C., P. Travers, M. Walport und M. Shlomchik, *Immunobiology: The immune system in health and disease* (Churchill Livingstone, 2001), 5 Auflage.
- Kass, G., J. Llopis, S. Chow, S. Duddy und S. Orrenius, Receptor-operated calcium influx in rat hepatocytes. Identification and characterization using manganese. *J Biol Chem*, **265** (29), 17486–92 (1990).
- Kato, T., S. Berger, J. Carter und O. Lowry, An enzymatic cycling method for nicotinamide-adenine dinucleotide with malic and alcohol dehydrogenases. *Anal Biochem*, **53** (1), 86–97 (1973).
- Keddi, N., T. Szabo, J. Lile, J. Treanor, Z. Olah, M. Iadarola und P. Blumberg, Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem*, **276** (30), 28613–9 (2001).
- Khoo, K. und C. Chang, Identification and characterization of nuclear CD38 in the rat spleen. *Int J Biochem Cell Biol*, **34** (1), 43–54 (2002).
- Kim, U., M. Han, B. Park, H. Kim und N. An, Function of NAD glycohydrolase in ADP-ribose uptake from NAD by human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, **1178** (2), 121–6 (1993).
- Knuth, D. E., *Computers and Typesetting* (Addison Wesley Longman, Reading, 1991).
- Kolisek, M., A. Beck, A. Fleig und R. Penner, Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell*, **18** (1), 61–9 (2005).
- Kraft, R., C. Grimm, K. Grosse, A. Hoffmann, S. Sauerbruch, H. Kettenmann, G. Schultz und C. Harteneck, Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol Cell Physiol*, **286** (1), C129–37 (2004).

- Kraft, R. und C. Harteneck, The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflugers Arch*, **451** (1), 204–11 (2005).
- Krause, E., F. Pfeiffer, A. Schmid und I. Schulz, Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium conducting nonselective cation current in mouse pancreatic acinar cells. *J Biol Chem*, **271** (51), 32523–8 (1996).
- Krause, E., A. Schmid, A. Gonzalez und I. Schulz, Low cytoplasmic $[Ca^{2+}]$ activates I_{CRAC} independently of global Ca^{2+} store depletion in RBL-1 cells. *J Biol Chem*, **274** (52), 36957–62 (1999).
- Krautwurst, D., R. Seifert, J. Hescheler und G. Schultz, Formyl peptides and ATP stimulate Ca^{2+} and Na^{+} inward currents through non-selective cation channels via G-proteins in dibutyryl cyclic AMP-differentiated HL-60 cells. Involvement of Ca^{2+} and Na^{+} in the activation of beta-glucuronidase release and superoxide production. *Biochem J*, **288** (3), 1025–35 (1992).
- Kumasaka, S., H. Shoji und E. Okabe, Novel mechanisms involved in superoxide anion radical-triggered Ca^{2+} release from cardiac sarcoplasmic reticulum linked to cyclic ADP-ribose stimulation. *Antioxid Redox Signal*, **1** (1), 55–69 (1999).
- Kuno, M. und P. Gardner, Ion channels activated by inositol 1,4,5-trisphosphate in plasma membrane of human T-lymphocytes. *Nature*, **326** (6110), 301–4 (1987).
- Kühn, F. und A. Lückhoff, Sites of the NUDT9-H domain critical for ADP-ribose activation of the cation channel TRPM2. *J Biol Chem*, **279** (45), 46431–7 (2004).
- Lamport, L., *L^AT_EX – A Document Preparation System* (Addison Wesley Longmann, Reading, 1994), 2. Auflage.
- Langhorst, M., N. Schwarzmann und A. Guse, Ca^{2+} release via ryanodine receptors and Ca^{2+} entry: major mechanisms in NAADP-mediated Ca^{2+} signaling in T-lymphocytes. *Cell Signal*, **16** (11), 1283–9 (2004).
- Lee, H., Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol Rev*, **77** (4), 1133–64 (1997).
- Lee, H., Multiplicity of Ca^{2+} messengers and Ca^{2+} stores: a perspective from cyclic ADP-ribose and NAADP. *Curr Mol Med*, **4** (3), 227–37 (2004).
- Lee, H. und R. Aarhus, A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem*, **270** (5), 2152–7 (1995).
- Lee, H. und R. Aarhus, Structural determinants of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate important for its calcium-mobilizing activity. *J Biol Chem*, **272** (33), 20378–83 (1997).

- Lee, H. und R. Aarhus, Fluorescent analogs of NAADP with calcium mobilizing activity. *Biochim Biophys Acta*, **1425** (1), 263–71 (1998).
- Lee, H., T. Walseth, G. Bratt, R. Hayes und D. Clapper, Structural determination of a cyclic metabolite of NAD⁺ with intracellular Ca²⁺-mobilizing activity. *J Biol Chem*, **264** (3), 1608–15 (1989).
- Leonard, N., Etheno-Bridged Nucleotides in Enzyme Reactions and Protein Binding. *Chemtracts Biochem Mol Biol*, **4** (251), 16463 (1993).
- Levitt, B., R. Head und D. Westfall, High-pressure liquid chromatographic-fluorometric detection of adenosine and adenine nucleotides: application to endogenous content and electrically induced release of adenyl purines in guinea pig vas deferens. *Anal Biochem*, **137** (1), 93–100 (1984).
- Lewis, R., Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, **19**, 497–521 (2001).
- Lewis, R. und M. Cahalan, Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca²⁺ and transmembrane Ca²⁺ current in human leukemic T cells. *Cell Regul*, **1** (1), 99–112 (1989).
- Li, P., D. Zhang, Z. Ge und W. Campbell, Role of ADP-ribose in 11,12-EET-induced activation of K_{Ca} channels in coronary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **282** (4), H1229–36 (2002).
- Li, P., A. Zou und W. Campbell, Regulation of K_{Ca} channel activity by cyclic ADP-ribose and ADP-ribose in coronary arterial smooth muscle. *Am J Physiol*, **275** (3), H1002–10 (1998).
- Liang, M., E. Chini, J. Cheng und T. Dousa, Synthesis of NAADP and cADPR in mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, **371** (2), 317–25 (1999).
- Lievremont, J., G. Bird und J. Putney, Jr, Canonical transient receptor potential TRPC7 can function as both a receptor- and store-operated channel in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **287** (6), C1709–16 (2004).
- Lückhoff, A. und D. Clapham, Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca²⁺-permeable channel. *Nature*, **355** (6358), 356–8 (1992).
- Lückhoff, A. und D. Clapham, Calcium channels activated by depletion of internal calcium stores in A431 cells. *Biophys J*, **67** (1), 177–82 (1994).
- MacKenzie, A., A. Surprenant und R. North, Functional and molecular diversity of purinergic ion channel receptors. *Ann N Y Acad Sci*, **868**, 716–29 (1999).
- Magni, G., M. Emanuelli, A. Amici, N. Raffaelli und S. Ruggieri, Purification of human nicotinamide-mononucleotide adenylyltransferase. *Methods Enzymol*, **280**, 241–7 (1997).

- Masgrau, R., G. Churchill, A. Morgan, S. Ashcroft und A. Galione, NAADP: a new second messenger for glucose-induced Ca^{2+} responses in clonal pancreatic beta cells. *Curr Biol*, **13** (3), 247–51 (2003).
- Matsumoto, K., Y. Yamada, M. Takahashi, T. Todoroki, K. Mizoguchi, H. Misaki und H. Yuki, Fluorometric determination of carnitine in serum with immobilized carnitine dehydrogenase and diaphorase. *Clin Chem*, **36** (12), 2072–6 (1990).
- McHugh, D., R. Flemming, S. Xu, A. Perraud und D. Beech, Critical intracellular Ca^{2+} dependence of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel activation. *J Biol Chem*, **278** (13), 11002–6 (2003).
- Meinke, S., *Untersuchungen zur Funktion des Ionenkanals TRPM2 in T-Lymphocyten*. Diplomarbeit, Universität Hamburg (2005).
- Meldolesi, J. und T. Pozzan, The heterogeneity of ER Ca^{2+} stores has a key role in nonmuscle cell signaling and function. *J Cell Biol*, **142** (6), 1395–8 (1998).
- Metha, K. und F. Malavasi, *Human CD38 and Related Molecules*, Band 75 von *Chemical Immunology* (Karger, Basel, 2000).
- Mignen, O. und T. Shuttleworth, I_{ARC} , a novel arachidonate-regulated, noncapacitative Ca^{2+} entry channel. *J Biol Chem*, **275** (13), 9114–9 (2000).
- Mitchell, K., F. Lai und G. Rutter, Ryanodine receptor type I and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate receptors mediate Ca^{2+} release from insulin-containing vesicles in living pancreatic beta-cells (MIN6). *J Biol Chem*, **278** (13), 11057–64 (2003).
- Mojzisova, A., O. Krizanova, L. Zacikova, V. Kominkova und K. Ondrias, Effect of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate on ryanodine calcium release channel in heart. *Pflugers Arch*, **441** (5), 674–7 (2001).
- Montell, C., Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*, **2001** (90), RE1 (2001).
- Montell, C. und G. Rubin, Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, **2** (4), 1313–23 (1989).
- Muller-Steffner, H., O. Malver, L. Hosie, N. Oppenheimer und F. Schubert, Slow-binding inhibition of NAD^{+} glycohydrolase by arabino analogues of beta-NAD. *J Biol Chem*, **267** (14), 9606–11 (1992).
- Nagase, F., T. Abo, K. Hiramatsu, S. Suzuki, J. Du und I. Nakashima, Induction of apoptosis and tyrosine phosphorylation of cellular proteins in T cells and non-T cells by stimulation with concanavalin A. *Microbiol Immunol*, **42** (8), 567–74 (1998).

- Ohkura, Y., M. Kai und H. Nohta, Fluorogenic reactions for biomedical chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl*, **659** (1-2), 85–107 (1994).
- Okumura, M. und M. Thomas, Regulation of immune function by protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Immunol*, **7** (3), 312–9 (1995).
- Parekh, A., H. Terlau und W. Stuhmer, Depletion of InsP3 stores activates a Ca^{2+} and K^{+} current by means of a phosphatase and a diffusible messenger. *Nature*, **364** (6440), 814–8 (1993).
- Partiseti, M., F. Le Deist, C. Hivroz, A. Fischer, H. Korn und D. Choquet, The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency. *J Biol Chem*, **269** (51), 32327–35 (1994).
- Patel, S., G. Churchill und A. Galione, Coordination of Ca^{2+} signalling by NAADP. *Trends Biochem Sci*, **26** (8), 482–9 (2001).
- Patterson, R., D. van Rossum und D. Gill, Store-operated Ca^{2+} entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell*, **98** (4), 487–99 (1999).
- Penner, R. und A. Fleig, Store-operated calcium entry: a tough nut to CRAC. *Sci STKE*, **2004** (243), 38–40 (2004).
- Perraud, A., A. Fleig, C. Dunn, L. Bagley, P. Launay, C. Schmitz, A. Stokes, Q. Zhu, M. Bessman, R. Penner, J. Kinet und A. Scharenberg, ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature*, **411** (6837), 595–9 (2001).
- Perraud, A., H. Knowles und C. Schmitz, Novel aspects of signaling and ion-homeostasis regulation in immunocytes. The TRPM ion channels and their potential role in modulating the immune response. *Mol Immunol*, **41** (6-7), 657–73 (2004).
- Perraud, A., C. Schmitz und A. Scharenberg, TRPM2 Ca^{2+} permeable cation channels: from gene to biological function. *Cell Calcium*, **33** (5-6), 519–31 (2003a).
- Perraud, A., B. Shen, C. Dunn, K. Rippe, M. Smith, M. Bessman, B. Stoddard und A. Scharenberg, NUDT9, a member of the Nudix hydrolase family, is an evolutionarily conserved mitochondrial ADP-ribose pyrophosphatase. *J Biol Chem*, **278** (3), 1794–801 (2003b).
- Perraud, A., C. Takanishi, B. Shen, S. Kang, M. Smith, C. Schmitz, H. Knowles, D. Ferraris, W. Li, J. Zhang, B. Stoddard und A. Scharenberg, Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J Biol Chem*, **280** (7), 6138–48 (2005).

- Powell, A. und M. Leon, Reversible interaction of human lymphocytes with the mitogen concanavalin A. *Exp Cell Res*, **62** (2), 315–25 (1970).
- Premack, B. und P. Gardner, Signal transduction by T-cell receptors: mobilization of Ca and regulation of Ca-dependent effector molecules. *Am J Physiol*, **263** (6), C1119–40 (1992).
- Premack, B., T. McDonald und P. Gardner, Activation of Ca^{2+} current in Jurkat T cells following the depletion of Ca^{2+} stores by microsomal Ca^{2+} -ATPase inhibitors. *J Immunol*, **152** (11), 5226–40 (1994).
- Putney, J., Jr, A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, **7** (1), 1–12 (1986).
- Randriamampita, C. und R. Tsien, Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature*, **364** (6440), 809–14 (1993).
- Rich, T. und G. Langer, A comparison of excitation-contraction coupling in heart and skeletal muscle: an examination of 'calcium-induced calcium-release'. *J Mol Cell Cardiol*, **7** (10), 747–65 (1975).
- Ross, P. und M. Cahalan, Ca^{2+} influx pathways mediated by swelling or stores depletion in mouse thymocytes. *J Gen Physiol*, **106** (3), 415–44 (1995).
- Rozen, S. und H. Skaletsky, Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, **132**, 365–86 (2000).
- Rudd, C., O. Janssen, Y. Cai, A. da Silva, M. Raab und K. Prasad, Two-step TCR zeta/CD3-CD4 and CD28 signaling in T cells: SH2/SH3 domains, protein-tyrosine and lipid kinases. *Immunol Today*, **15** (5), 225–34 (1994).
- Rutter, G., Calcium signalling: NAADP comes out of the shadows. *Biochem J*, **373** (2), 3–4 (2003).
- Sano, Y., K. Inamura, A. Miyake, S. Mochizuki, H. Yokoi, H. Matsushime und K. Furuichi, Immunocyte Ca^{2+} influx system mediated by LTRPC2. *Science*, **293** (5533), 1327–30 (2001).
- Scharenberg, A., TRPM2 and TRPM7: channel/enzyme fusions to generate novel intracellular sensors. *Pflugers Arch*, **451** (1), 220–227 (2005).
- Schneider, U., H. Schwenk und G. Bornkamm, Characterization of EBV-genome negative 'null' and 'T' cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*, **19** (5), 621–6 (1977).
- Schrenzel, J., N. Demareux, M. Foti, C. Van Delden, J. Jacquet, G. Mayr, D. Lew und K. Krause, Highly cooperative Ca^{2+} elevations in response to $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ microperfusion through a patch-clamp pipette. *Biophys J*, **69** (6), 2378–91 (1995).

- Schuber, F. und F. Lund, Structure and enzymology of ADP-ribosyl cyclases: conserved enzymes that produce multiple calcium mobilizing metabolites. *Curr Mol Med*, **4** (3), 249–61 (2004).
- Schwarzmann, N., S. Kunerth, K. Weber, G. Mayr und A. Guse, Knock-down of the type 3 ryanodine receptor impairs sustained Ca^{2+} signaling via the T cell receptor/CD3 complex. *J Biol Chem*, **277** (52), 50636–42 (2002).
- Shahangian, S., K. Ash und D. Rollins, An enzymatic method for the analysis of formate in human plasma. *J Anal Toxicol*, **8** (6), 273–6 (1984).
- Shaw, A. und M. Dustin, Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity*, **6** (4), 361–9 (1997).
- Shibuya, I. und W. Douglas, Calcium channels in rat melanotrophs are permeable to manganese, cobalt, cadmium, and lanthanum, but not to nickel: evidence provided by fluorescence changes in fura-2-loaded cells. *Endocrinology*, **131** (4), 1936–41 (1992).
- Simmonds, R. und R. Harkness, High-performance liquid chromatographic methods for base and nucleoside analysis in extracellular fluids and in cells. *J Chromatogr*, **226** (2), 369–81 (1981).
- Stephon, R., R. Niedbala, K. Schray und N. Heindel, An enzymatic cycling procedure for beta-NADP⁺ generated by 3'-phosphodiesterase, 2':3'-cyclic nucleotide. *Anal Biochem*, **202** (1), 6–9 (1992).
- Strasser, A. und P. Bouillet, The control of apoptosis in lymphocyte selection. *Immunol Rev*, **193**, 82–92 (2003).
- Streb, H., R. Irvine, M. Berridge und I. Schulz, Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*, **306** (5938), 67–9 (1983).
- Su, Z., P. Csutora, D. Hunton, R. Shoemaker, R. Marchase und J. Blalock, A store-operated nonselective cation channel in lymphocytes is activated directly by Ca^{2+} influx factor and diacylglycerol. *Am J Physiol Cell Physiol*, **280** (5), C1284–92 (2001).
- Su, Z., X. Guo, D. Barker, R. Shoemaker, R. Marchase und J. Blalock, A store-operated nonselective cation channel in human lymphocytes. *Cell Mol Neurobiol*, **25** (3-4), 625–47 (2005).
- Subramanian, S., Dye-ligand affinity chromatography: the interaction of Cibacron Blue F3GA with proteins and enzymes. *CRC Crit Rev Biochem*, **16** (2), 169–205 (1984).
- Suen, Y., K. Fung, Y. Choy, C. Lee, C. Chan und S. Kong, Concanavalin A induced apoptosis in murine macrophage PU5-1.8 cells through clustering of mitochondria and release of cytochrome c. *Apoptosis*, **5** (4), 369–77 (2000).

- Surprenant, A., Functional properties of native and cloned P2X receptors. *Ciba Found Symp*, **198**, 208–19 (1996).
- Szabo, M., T. Teague und B. McIntyre, Regulation of lymphocyte pseudopodia formation by triggering the integrin $\alpha 4/\beta 1$. *J Immunol*, **154** (5), 2112–24 (1995).
- Takahashi, K., I. Kukimoto, K. Tokita, K. Inageda, S. Inoue, K. Kontani, S. Hoshino, H. Nishina, Y. Kanaho und T. Katada, Accumulation of cyclic ADP-ribose measured by a specific radioimmunoassay in differentiated human leukemic HL-60 cells with all-trans-retinoic acid. *FEBS Lett*, **371** (2), 204–8 (1995).
- Takasawa, S., K. Nata, H. Yonekura und H. Okamoto, Cyclic ADP-ribose in insulin secretion from pancreatic beta cells. *Science*, **259** (5093), 370–3 (1993).
- Treiman, M., C. Caspersen und S. Christensen, A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *Trends Pharmacol Sci*, **19** (4), 131–5 (1998).
- Uemura, T., J. Kudoh, S. Noda, S. Kanba und N. Shimizu, Characterization of human and mouse TRPM2 genes: identification of a novel N-terminal truncated protein specifically expressed in human striatum. *Biochem Biophys Res Commun*, **328** (4), 1232–43 (2005).
- Venkatachalam, K., D. van Rossum, R. Patterson, H. Ma und D. Gill, The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nat Cell Biol*, **4** (11), E263–72 (2002).
- Virag, L. und C. Szabo, The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev*, **54** (3), 375–429 (2002).
- von Tscharner, V., B. Prod'homme, M. Baggiolini und H. Reuter, Ion channels in human neutrophils activated by a rise in free cytosolic calcium concentration. *Nature*, **324** (6095), 369–72 (1986).
- Wacholtz, M. und P. Lipsky, Anti-CD3-stimulated Ca^{2+} signal in individual human peripheral T cells. Activation correlates with a sustained increase in intracellular Ca^{2+} . *J Immunol*, **150** (12), 5338–49 (1993).
- Wagener, C., *Molekular Onkologie. Entstehung und Progression maligner Tumoren* (Thieme, Stuttgart, 1999), 2 Auflage.
- Wang, W., N. Inoue, T. Nakayama, M. Ishii und T. Kato, An assay method for nitric oxide synthase in crude samples by determining product NADP. *Anal Biochem*, **227** (2), 274–80 (1995).
- Wehage, E., J. Eisfeld, I. Heiner, E. Jüngling, C. Zitt und A. Lückhoff, Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem*, **277** (26), 23150–6 (2002).

- Werner, A., Reversed-phase and ion-pair separations of nucleotides, nucleosides and nucleobases: analysis of biological samples in health and disease. *J Chromatogr*, **618** (1-2), 3–14 (1993).
- Wilfinger, W., K. Mackey und P. Chomczynski, Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, **22** (3), 474–81 (1997).
- Williams, D., K. Fogarty, R. Tsien und F. Fay, Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using Fura-2. *Nature*, **318** (6046), 558–61 (1985).
- Wulfig, C., J. Rabinowitz, C. Beeson, M. Sjaastad, H. McConnell und M. Davis, Kinetics and extent of T cell activation as measured with the calcium signal. *J Exp Med*, **185** (10), 1815–25 (1997).
- Xie, G., S. Rah, S. Kim, T. Nam, K. Ha, S. Chae, M. Im und U. Kim, ADP-ribosyl cyclase couples to cyclic AMP signaling in the cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **330** (4), 1290–8 (2005).
- Xu, S., F. Zeng, G. Boulay, C. Grimm, C. Harteneck und D. Beech, Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential, extracellular and voltage-dependent effect. *Br J Pharmacol*, **145** (4), 405–14 (2005).
- Yamada, M., M. Mizuguchi, N. Otsuka, K. Ikeda und H. Takahashi, Ultrastructural localization of CD38 immunoreactivity in rat brain. *Brain Res*, **756** (1-2), 52–60 (1997).
- Yamasaki, M., G. Churchill und A. Galione, Calcium signalling by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP). *FEBS J*, **272** (18), 4598–606 (2005a).
- Yamasaki, M., J. Thomas, G. Churchill, C. Garnham, A. Lewis, J. Cancela, S. Patel und A. Galione, Role of NAADP and cADPR in the induction and maintenance of agonist-evoked Ca^{2+} spiking in mouse pancreatic acinar cells. *Curr Biol*, **15** (9), 874–8 (2005b).
- Yao, Y., A. Ferrer-Montiel, M. Montal und R. Tsien, Activation of store-operated Ca^{2+} current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell*, **98** (4), 475–85 (1999).
- Yoshioka, M., K. Nishidate, H. Iizuka, A. Nakamura, M. El-Merzabani, Z. Tamura und T. Miyazaki, Sensitive fluorimetry of adenine-containing compounds with high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, **309** (1), 63–71 (1984).
- Yoshioka, M. und Z. Tamura, Fluorimetric determination of adenine and adenosine and its nucleotides by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, **123** (1), 220–4 (1976).

- Yost, D. und B. Anderson, Purification and properties of the soluble NAD glycohydrolase from *Bungarus fasciatus* venom. *J Biol Chem*, **256** (8), 3647–53 (1981).
- Zhang, W., X. Chu, Q. Tong, J. Cheung, K. Conrad, K. Masker und B. Miller, A novel TRPM2 isoform inhibits calcium influx and susceptibility to cell death. *J Biol Chem*, **278** (18), 16222–9 (2003).
- Zhu, X., M. Jiang und L. Birnbaumer, Receptor-activated Ca^{2+} influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. Evidence for a non-capacitative Ca^{2+} entry. *J Biol Chem*, **273** (1), 133–42 (1998).
- Ziegler, M., D. Jorcke und M. Schweiger, Identification of bovine liver mitochondrial NAD^+ glycohydrolase as ADP-ribosyl cyclase. *Biochem J*, **326** (2), 401–5 (1997).
- Zitt, C., C. Halaszovich und A. Lückhoff, The TRP family of cation channels: probing and advancing the concepts on receptor-activated calcium entry. *Prog Neurobiol*, **66** (4), 243–64 (2002).
- Zocchi, E., A. Daga, C. Usai, L. Franco, L. Guida, S. Bruzzone, A. Costa, C. Marchetti und A. De Flora, Expression of CD38 increases intracellular calcium concentration and reduces doubling time in HeLa and 3T3 cells. *J Biol Chem*, **273** (14), 8017–24 (1998).
- Zocchi, E., C. Usai, L. Guida, L. Franco, S. Bruzzone, M. Passalacqua und A. De Flora, Ligand-induced internalization of CD38 results in intracellular Ca^{2+} mobilization: role of NAD^+ transport across cell membranes. *FASEB J*, **13** (2), 273–83 (1999).
- Zweifach, A. und R. Lewis, Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (I_{CRAC}) due to local calcium feedback. *J Gen Physiol*, **105** (2), 209–26 (1995).

A. Anhänge

A.1. Veröffentlichungen und Kongreßbeiträge

Veröffentlichungen:

- A. Gasser und A. H. Guse, Determination of intracellular concentrations of the TRPM2 agonist ADP-ribose by reversed-phase HPLC. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **821** (2), 181-187 (2005).
- A. Gasser, G. Glassmeier, R. Fliegert, M. F. Langhorst, S. Meinke, D. Hein, S. Krüger, K. Weber, I. Heiner, N. Oppenheimer, J. R. Schwarz und A. H. Guse, Activation of T cell calcium influx by the second messenger ADP-ribose. *J Biol Chem*, epub ahead of print, doi:10.1074/jbc.M506525200 (2005).

Poster-Beiträge zu Kongressen:

- A. Gasser, I. Heiner, A. Lückhoff und A. H. Guse, Determination of endogenous concentrations of the TRP-channel agonist ADP-ribose, VIIIth International Dahlem Symposium on Cellular Signal Recognition and Transduction, 18.–21. Juni 2003, Berlin.
- A. Gasser, G. W. Mayr und A. H. Guse, Determination of the Ca^{2+} -mobilizing compound NAADP, Special FEBS Meeting On Signal Transduction, 3.–8. Juli 2003, Brüssel.
- A. Gasser, I. Heiner, M. F. Langhorst, R. Fliegert, S. Krüger, J. Eisfeld, A. Lückhoff, G. Glassmeier, J. R. Schwarz und A. H. Guse, The TRPM2 agonist ADP-ribose acts as second messenger in human T-lymphocytes and granulocytes, 25th Symposium at Rauischholzhausen Castle: TRP Channels as New Pharmacological Targets, 10.–12. Juni 2004, Rauischholzhausen.
- A. Gasser, I. Heiner, M. F. Langhorst, R. Fliegert, S. Krüger, J. Eisfeld, A. Lückhoff, G. Glassmeier, J. R. Schwarz und A. H. Guse, The TRPM2 agonist ADP-ribose acts as second messenger in human T-lymphocytes and granulocytes, 8th meeting of the European Calcium Society, 28.–31. Juli 2004, European Calcium Society, Cambridge, UK.
- A. Gasser, M. F. Langhorst, R. Fliegert, S. Krüger, G. Glassmeier, J. R. Schwarz und A. H. Guse, Calcium und das Schicksal von Immunzellen, 2. Hamburger Studententagung, 3. Mai 2005, Helmut-Schmidt-Universität, Hamburg.

-
- S. Partida-Sánchez, R. Fliegert, A. Gasser, H. Bhagat, T. F. Walseth, A. H. Guse und F. E. Lund, ADP-Ribose regulates Calcium influx and chemotaxis via TRPM2 channels in murine neutrophils and dendritic cells, Keystone Meeting Chemokines and Chemokine Receptors, 15.–20. Januar 2006, Snowbird, USA.
 - G. Glassmeier, A. Gasser, R. Fliegert, M. F. Langhorst, S. Meinke, D. Hein, K. Weber, N. Oppenheimer, J. R. Schwarz und A. H. Guse, Activation of T Cell Calcium influx through TRPM2 channels by the second messenger ADP-ribose, Joint Meeting of The German Society of Physiology and The Federation of European Physiological Societies, 26.–29. März 2006, München.

A.2. Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge für besonders gefährliche Stoffe

Im folgenden werden Gefahrensymbole, Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge für besonders gefährliche Stoffe oder solche, die in der vorliegenden Arbeit in größeren Mengen verwendet wurden, aufgelistet.

Substanz	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Ampicillin	Xn	36/37/38-42/43	22-26-36/37
Calcium(II)-chlorid	Xi	36	22-24
Chloroacetaldehyd	T+, N	24/25-26-34-40-50	26-28-36/37/39-45-61
Cibacron Blue 3GA	Xi	36/37/38	26-36
Diethylether	Xn, F+	12-19-22-66-67	9-16-29-33
Dimethylformamid	T	61-20/21-36	53-45
Dimethylsulfoxid	Xi	36/37/38	23-26-36
Ethidiumbromid	T+	22-26-36/37/38-40	26-28.2-36/37-45
EDTA	Xn	22	
Gadolinium(III)-chlorid	Xi	36/37/38	26-36
HEPES	Xn	22	
Kaliumhydroxid	C	22-35	26-36/37/39-45
Mangan(II)-chlorid	Xn	22	
Methanol	F, T	11-23/24/25-39	7-16-36/37-45
Natriumhydroxid	C	35	26-37/39-45
Resazurin	Xi	36/37/38	26-37
Salzsäure	C	34-37	26-36/37/39-45
Thapsigargin		26/27/28-36/37/38-40-41	36-45
Trichloressigsäure	C, N	35-50/53	26-36/37/39-45-60-61
Trifluoressigsäure	C	20-35-52/53	26-36/37/39-45
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Xi	36/38	24-25
Triton X-100	Xn	22-41	24-26-39