

**Mechanismen der Signaltransduktion durch  
Calcium-Ionen in CD4<sup>+</sup> T-Lymphocyten der  
Ratte (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769)  
und des Menschen (*Homo sapiens*)**

**Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
im Department Biologie der Fakultät  
für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Werner Dammermann**

geboren am 20.06.1979 in Hamburg

Matrikelnummer 5201113



Hamburg, März 2007

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr Dr. A. H. GUSE  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. L. RENWRANTZ  
Tag der Disputation: 27. April 2007

Hamburg, den 11. April 2007



A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, cursive letters.

Professor Dr. Reinhard Lieberei  
Leiter des Departments Biologie

*Ευρηκα, ευρηκα!*  
*Heureka, Heureka!*  
Archimedes

*Οιδα ουκ ειδως.*  
*Ich weiß, dass ich nichts weiß.*  
Sokrates

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg wurde in der Zeit vom 01.10.2004 bis zum 31.12.2006 unter der Leitung von Herrn Prof. A.H. Guse (Fachbereich Medizin der Universität Hamburg) in der Arbeitsgruppe Calciumsignale des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie I: Zelluläre Signaltransduktion im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Martinistraße 52, 20246 Hamburg) durchgeführt.

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. A.H. Guse  
(Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie)

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. L. Renwrantz  
(Zoologisches Institut der Biologischen Fakultät)

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Calcium-Ion als wichtiger intrazellulärer Botenstoff.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Subzelluläre Ca<sup>2+</sup>-Signale als Schrittmacher und Vorläufer globaler, zellulärer Ca<sup>2+</sup>-Signale.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Ca<sup>2+</sup>-freisetzende, sekundäre Botenstoffe in Eukaryonten: IP<sub>3</sub>, cADPR und NAADP.....</b>	<b>6</b>
1.3.1 IP <sub>3</sub> : Ein PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> -Metabolit als Ca <sup>2+</sup> -freisetzender sekundärer Botenstoff.....	6
1.3.2 cADPR: Ein NAD-Metabolit als Ca <sup>2+</sup> -freisetzender sekundärer Botenstoff.....	7
1.3.3 NAADP: Ein weiterer NAD-Metabolit als Ca <sup>2+</sup> -freisetzender sekundärer Botenstoff.....	9
<b>1.4 Stellung von NAADP im Ca<sup>2+</sup>-Signalsystem von T-Lymphocyten .....</b>	<b>11</b>
<b>2 PROBLEMSTELLUNG.....</b>	<b>15</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Materialien .....</b>	<b>18</b>
3.1.1 Geräte .....	18
3.1.2 Medien, Puffer, Chemikalien.....	19
3.1.3 Primäre Zellen und Zelllinien .....	22
<b>3.2 Methoden .....</b>	<b>23</b>
3.2.1 Zellkultur .....	23
3.2.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen .....	25
3.2.3 Bestimmung intrazellulärer Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationen mit Hilfe des ratiometrischen Farbstoffs Fura-2 .....	25
3.2.4 Einschleusen des Farbstoffs Fura-2 AM in humane und Ratten T-Zellen sowie HeLa Karzinomzellen .....	27
3.2.5 Prinzip der Mikroinjektion in Jurkat T-Lymphocyten.....	28
3.2.6 Einsatz membran-permeabler NAADP-Antagonisten .....	30
3.2.7 Fluorimetrie .....	31
3.2.8 Digitales Ca <sup>2+</sup> -Imaging: Einzelzellmessungen intrazellulärer Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationen.....	31
3.2.9 Datenauswertung.....	33
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Subzelluläre und globale NAADP-vermittelte Ca<sup>2+</sup>-Signale in humanen T-Lymphocyten ..</b>	<b>39</b>
<b>4.2 BZ52 und BZ194: niedermolekulare NAADP-Antagonisten und ihr Einfluß auf die Ca<sup>2+</sup>-Signalsysteme in humanen und Ratten Memory T-Lymphocyten.....</b>	<b>51</b>
4.2.1 Die Wirkung der niedermolekularen NAADP-Antagonisten BZ52 und BZ194 auf das Ca <sup>2+</sup> -Signalsystem in humanen T-Zellen .....	51
4.2.2 Die Wirkung des niedermolekularen NAADP-Antagonisten BZ194 auf das Ca <sup>2+</sup> -Signalsystem in primären Ratten T-Zellen .....	58
<b>4.3 Ein synthetisches cADPR-Analogen als wirksamer Agonist in den Ca<sup>2+</sup>-Signalsystemen humaner T-Lymphocyten .....</b>	<b>63</b>
<b>4.4 Zwei natürlich vorkommende cADPR-Metabolite als wirksame Agonisten in den Ca<sup>2+</sup>-Signalsystemen humaner HeLa-Karzinomzellen .....</b>	<b>65</b>
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>73</b>
<b>5.1 NAADP als primärer Ca<sup>2+</sup>-freisetzender sekundärer Botenstoff in humanen T-Lymphocyten.....</b>	<b>73</b>
<b>5.2 Funktion und Potential niedermolekularer NAADP-Antagonisten in eukaryontischen Zellsystemen und Tiermodellen .....</b>	<b>83</b>
<b>5.3 Struktur-Wirkungsbeziehung und generelles Prinzip der Vereinfachung von P24 und weiteren cADPR-Analoga .....</b>	<b>95</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>100</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>103</b>

---

<b>8 DANKSAGUNG .....</b>	<b>116</b>
---------------------------	------------

## Abkürzungen

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Konzentration
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
AM	Acetoxymethyl-ester
ATP	Adenosintrisphosphat
BAPTA	1,2-Bis(2-Aminophenoxy)ethan-(N,N,N',N')-tetraacetat
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
cADPR	cyclische ADP-Ribose
CCD	<i>charged coupled device</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CICR	Ca <sup>2+</sup> -induzierte Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung ( <i>Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup>-release</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis
EGFP	Grün-fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein)
EGTA	Ethylenglykol-(N,N,N',N')-tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FCS	<i>foetal calf serum</i>
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositol(1,4,5)-trisphosphat
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
MBP	<i>Myelin basic protein</i>
MS	Massenspektrometrie
MS	Multiple Sklerose
n.A.	numerische Apertur
NAADP	Nikotinsäureadeninukleotidphosphat
NAD	Nikotinamideadeninukleotid
NADP	Nikotinamidadeninukleotidphosphat
NCS	<i>newborn calf serum</i>

---

PKA	Proteinkinase A
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROI	<i>Region of interest</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SERCA	<i>sarcoplasmic / endoplasmatic Ca<sup>2+</sup>-ATPase</i>
SOCC	<i>store-operated Ca<sup>2+</sup>-channels</i>
TCGF	<i>T cell growth factor</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (T cell receptor)
TRPM	<i>Transient receptor potential melastatin-like</i>
UV	Ultraviolett

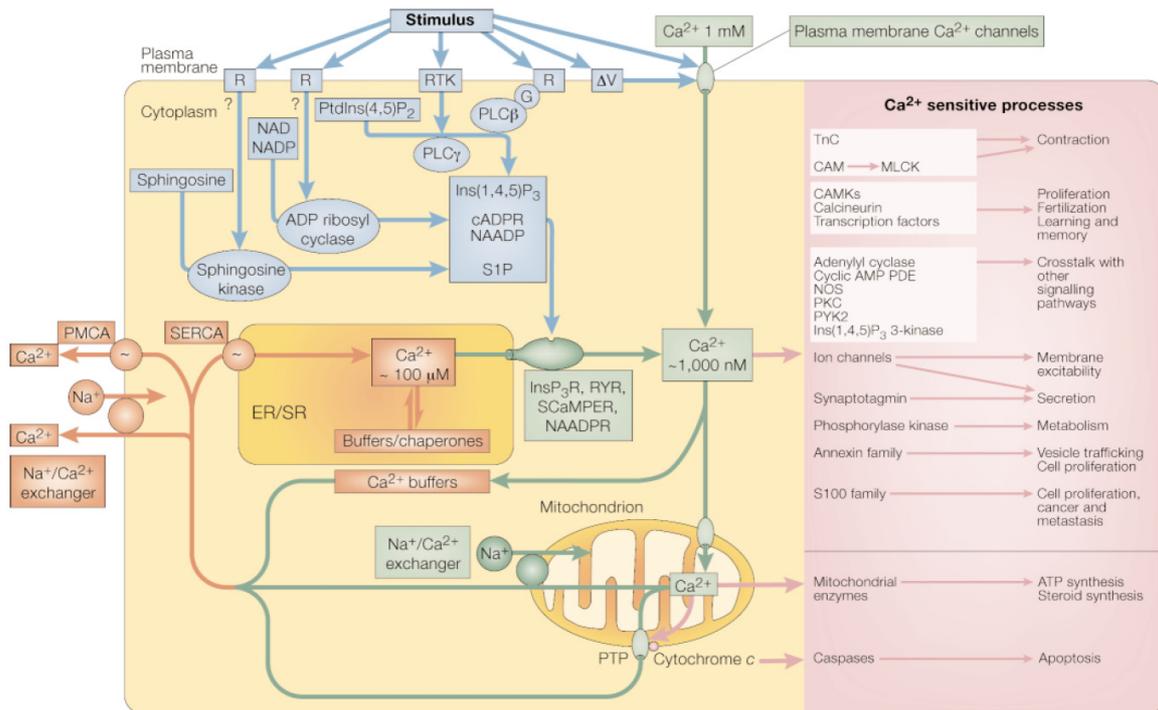
# 1 Einleitung

## 1.1 Das Calcium-Ion als wichtiger intrazellulärer Botenstoff

Das divalente Calcium-Kation ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ist trotz seiner unscheinbaren Grösse ein potentes Werkzeug, mit dem auf zellulärer Ebene viele wichtige Prozesse reguliert werden, wie die Kontraktion glatter und quergestreifter Muskulatur, die Exocytose synaptischer Vesikel in Neuronen, die Befruchtung von Eizellen sowie der programmierte Zelltod (Apoptose). Den räumlichen und zeitlichen Verlauf solcher zellulärer Prozesse bestimmen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale, die auf einen spezifischen physiologischen Stimulus hin entstehen. Damit  $\text{Ca}^{2+}$  als Signal die richtigen Ziele ansteuert, unterliegt seine intrazelluläre (d.h. cytosolische und nucleoplasmatische) Konzentration einer genauen Kontrolle. Die Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  im Cytosol liegt im Ruhezustand in der Regel zwischen 30 und 200 nM (Berridge et al., 2000; Carafoli, 2003). Um dieses cytosolische Konzentrationsniveau von  $\text{Ca}^{2+}$  halten zu können, existieren zahlreiche Proteine, die  $\text{Ca}^{2+}$  binden und/oder aus dem Cytosol transportieren. Die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird dadurch auf ein Ruheniveau erniedrigt. Die Abbildung 1.1 vermittelt einen ungefähren Überblick über Größe und Komplexität zellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsysteme in Eukaryonten.

Jene Proteine, die an  $\text{Ca}^{2+}$  binden oder mit ihm interagieren, lassen sich in zwei breite Klassen einteilen: einmal solche, die nur an  $\text{Ca}^{2+}$  binden, um seine Konzentration zu regulieren ( $\text{Ca}^{2+}$ -puffernde bzw. transportierende Proteine) und dann solche, die an  $\text{Ca}^{2+}$  binden, um sein Signal zu entschlüsseln ( $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren) (Carafoli, 2003).

Die Proteine, welche die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beeinflussen, finden sich im Cytosol, in den Organellen sowie in den unterschiedlichen Membranen einer Zelle. Pufferproteine, wie Calsequestrin im endo(sarco)plasmatischen Retikulum oder Parvalbumin im Cytosol, besitzen hierbei generell eine niedrige  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität. Ausgestattet mit sog. EF-Hand-Motiven binden sie  $\text{Ca}^{2+}$  koordinativ im Raum zwischen zwei helicalen und einer nicht-helicalen Domäne (Carafoli, 2003). Transportproteine hingegen liegen als Membranproteine ausschließlich in Form von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, ATPasen (Pumpen) und Antiportern vor. Sehr bekannte Beispiele für



**Abb. 1.1: Komplexität zellulärer Ca<sup>2+</sup>-Signalsysteme in Eukaryonten.** Um Ca<sup>2+</sup>-Signale unterschiedlicher Art zu generieren, verfügen eukaryontische Zellen über eine große Bandbreite zellulärer Mechanismen und Steuerungselemente. Eine Vielzahl von Oberflächenrezeptoren (R) reagiert auf physiologische Stimuli mit der Bildung Ca<sup>2+</sup>-mobilisierender Signale (blau); zu den Rezeptoren gehören u.a. G-Protein (G) gekoppelte Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK). Nach Stimulation entstehen hauptsächlich: Inositol-1,4,5-trisphosphat (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>), zyklische ADP-ribose (cADPR), Nikotinsäure-adenin-dinukleotidphosphat (NAADP) und Sphingosin-1-Phosphat (S1P). Mechanismen zur Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (grün) sind abhängig von spannungs- und ligandengesteuerten Ca<sup>2+</sup>-Kanälen in der Plasmamembran, dem Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> Rezeptor (InsP<sub>3</sub>R), dem Ryanodin Rezeptor (RyR) und dem Sphingolipidprotein zur Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER (SCaMPER). Die Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration hat immer unmittelbare Auswirkungen auf verschiedene Ca<sup>2+</sup>-Sensoren und daran angeschlossene Ca<sup>2+</sup>-abhängige Prozesse (violett). Um die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wieder auf das Ruhenniveau zu senken, muss überschüssiges Ca<sup>2+</sup> aus dem Cytosol gepumpt werden (rot). Diese Aufgabe übernehmen Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Antiporter und Ca<sup>2+</sup>-ATPasen in der Plasmamembran (PMCA) und im sarko-endoplasmatischen Retikulum (SERCA). Weitere verwendete Abkürzungen: PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PLC, Phospholipase C; NAD, Nikotinamid-adenin-dinukleotid; TnC, Troponin C; CAM, Calmodulin; MLCK, Myosin-Leichtketten-Kinase; CAMK, Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-abhängige Proteinkinase; cAMP-PDE, Phosphodiesterase für zyklisches Adenosin-monophosphat; NOS, Stickstoffmonoxid Synthase; PKC, Proteinkinase C; PYK2, Prolinreiche Kinase 2; [verändert nach (Berridge et al., 2000)]

Ca<sup>2+</sup>-spezifische Pumpen sind SERCA (*sarcoendoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*) (Toyoshima and Nomura, 2002; Toyoshima et al., 2000) und PMCA (*plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase*) (Schatzmann, 1966); bekannte Antiporter sind beispielsweise NCX (*plasma membrane Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-exchanger*) (Baker et al., 1969; Reuter und Seitz, 1968) und MNCX (*mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-exchanger*) (Carafoli et al., 1974). Die bedeutendsten Ca<sup>2+</sup>-Kanäle finden sich in der Plasmamembran sowie im endo(sarco)plasmatischen Retikulum. In der Plasmamembran unterliegen diese Kanäle einer Kontrolle durch Liganden (z.B. TRPM2 oder P2X7) (Gasser et al., 2006;

Koch-Nolte et al., 2006; Scheuplein et al., 2003), das Membranpotential (Tsien et al., 1987) oder solch komplexe Prozesse wie die Entleerung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher (Takemura et al., 1989). Die beiden wichtigsten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle im endo(sarco)plasmatischen Retikulum sind der  $\text{IP}_3$ - und der Ryanodin-Rezeptor. In tetramerer Form vorliegend existieren für jeden Rezeptor drei Isoformen (Fill und Copello, 2002; Mikoshiba, 2003). Der  $\text{IP}_3$ -Rezeptor wird hauptsächlich durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden, sekundären Botenstoff  $\text{IP}_3$  reguliert (Berridge, 1993), der Ryanodin-Rezeptor direkt oder indirekt durch zwei weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende, sekundäre Botenstoffe, cADPR (Guse, 2000) und NAADP (Langhorst et al., 2004). Darüber hinaus wird die Öffnung dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zusätzlich durch  $\text{Ca}^{2+}$  selbst ermöglicht, dies entspricht einer calciuminduzierten Calcium-Freisetzung (*calcium-induced calcium-release*, CICR) (Endo et al., 1970). Die Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle in Abhängigkeit von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration liegt in Form einer typischen Glockenkurve vor (Bezprozvanny et al., 1991). Seine maximale Öffnungswahrscheinlichkeit erreicht der  $\text{IP}_3$ -Rezeptor bei einer freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von ca.  $0,2 \mu\text{M}$ , wobei die Werte zu beiden Seiten des Maximums rasch abfallen (Bezprozvanny et al., 1991). Der Ryanodin Rezeptor hat sein Aktivitätsmaximum zwischen 1 und  $100 \mu\text{M}$  (Bezprozvanny et al., 1991). Wenn man nun die Bandbreite physiologischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen berücksichtigt, stellt man fest, dass der  $\text{IP}_3$ -Rezeptor einer positiven und negativen  $\text{Ca}^{2+}$ -Rückkopplung unterliegt. Der Ryanodin Rezeptor jedoch fungiert nur als  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, d.h. Calcium vermag ihn zu öffnen, aber nicht zu schließen.

Neben den eben beschriebenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer- sowie Transportproteinen spielen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren eine Schlüsselrolle in  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegen. Der Großteil der Proteine dieser Klasse besitzt mehrere EF-Hand-Motive, mit denen  $\text{Ca}^{2+}$  gebunden werden kann. Die bekanntesten Vertreter sind hierbei Troponin C, der  $\text{Ca}^{2+}$ -Rezeptor in Myofibrillen (Ebashi und Kodama, 1965), und Calmodulin, ein ubiquitärer und multifunktionaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor. Besonders Calmodulin verdeutlicht die Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$  als universeller und dennoch komplexer sekundärer Botenstoff:  $\text{Ca}^{2+}$  induziert eine Konformationsänderung des Calmodulins, so dass sich dessen Hydrophobizität erhöht, die Gesamtstruktur aber weitgehend gleich bleibt (Carafoli, 2003). Calmodulin bindet dann an bestimmte Domänen seines Zielproteins und überträgt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalinformation.  $\text{Ca}^{2+}$ -freies Calmodulin (Apo-calmodulin) kann jedoch

auch an andere Proteine binden und so einen Einfluss in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  ausüben (Jurado et al., 1999). Beide Spielarten des gleichen Proteins modulieren die Funktion von Enzymen, Struktur- und Membranproteinen (Moore et al., 1999; Sencer et al., 2001).

Alle oben beschriebenen  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteine bestimmen die räumliche und zeitliche Dynamik eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals im Zusammenspiel mit den verschiedenen zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern [endo(sarco)plasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Lysosomen und Kernhülle]. Ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal beginnt in Form eines lokal begrenzten, elementaren Ereignisses in der Zelle, um sich dann global als Welle fortzupflanzen oder in Oszillationen variabler Frequenz wiederzukehren (Berridge et al., 1999; Berridge et al., 2000). Eine solche  $\text{Ca}^{2+}$ -Welle breitet sich autokatalytisch über  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus  $\text{IP}_3$ - und Ryanodin-Rezeptoren aus (Endo et al., 1970); sie ist jedoch zu Beginn auf eine elementare  $\text{Ca}^{2+}$ -Initialzündung aus eben diesen Rezeptoren angewiesen. Die Mechanismen hinter diesen elementaren Ereignissen sind bekannt als *puffs* und *sparks* und gründen auf der Produktion der sekundären Botenstoffe  $\text{IP}_3$  ( $\rightarrow$  *puffs*) bzw. *cADPR* ( $\rightarrow$  *sparks*; (Berridge et al., 1999). Der Ort, an dem solche lokalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale vornehmlich entstehen, ist das endo(sarco)plasmatische Retikulum, der am besten untersuchte  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher (Berridge, 2002). Die luminale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im endo(sarco)plasmatischen Reticulum beträgt rund 300  $\mu\text{M}$  (Berridge, 2002). Die spezifische Verteilung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen,  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und als Puffer dienenden  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteinen definiert Subdomänen innerhalb des eigentlich kontinuierlichen endo(sarco)plasmatischen Retikulums. Aus einigen Subdomänen kann auf einen bestimmten Stimulus hin  $\text{Ca}^{2+}$  ins Cytosol strömen, in anderen wiederum bleiben  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalaktivitäten aus und konstitutive Prozesse wie die Proteinfaltung können ungestört ablaufen (Papp et al., 2003).

Wenn man nun sämtliche wichtigen Komponenten betrachtet, die ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal formen, kristallisiert sich eine übergeordnete Bedeutung der zugehörigen sekundären Botenstoffe und der durch sie ausgelösten elementaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale heraus.

## 1.2 Subzelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Signale als Schrittmacher und Vorläufer globaler, zellulärer $\text{Ca}^{2+}$ -Signale

Die verschiedenen Phasen der Entwicklung eines zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals lassen sich einteilen in (i) eine basale Phase, (ii) eine Schrittmacher-Phase (*pacemaker phase*) und (iii) eine globale Phase (Bootman et al., 1997). Die entscheidenden elementaren Ereignisse laufen hierbei in der Schrittmacher-Phase ab: Subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale treten räumlich und zeitlich begrenzt im Cytosol auf, um bei Überschreitung einer spezifischen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in ein globales  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal überzugehen (Boittin et al., 2002). In Reaktion auf physiologische Stimuli bilden sich sekundäre Botenstoffe ( $\text{IP}_3$ , cADPR und NAADP), die auf  $\text{IP}_3$ - bzw. Ryanodin-Rezeptoren des endo(sarco)plasmatischen Retikulums wirken und so subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale auslösen. Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung wird dabei entweder aus einzelnen Kanälen oder aus Gruppen von Kanälen geformt (Bootman et al., 1997). Dieser Unterschied hat einen direkten Einfluss auf die Stärke und räumliche Ausbreitung eines subzellulären Signals (Bootman et al., 1997).

Tab. 1.1: Charakteristika subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale:

Subzelluläres $\text{Ca}^{2+}$ -Signal	$\text{Ca}^{2+}$ -Kanal	Signalamplitude [nM]	Durchmesser [ $\mu\text{m}$ ]
<i>Blip</i>	$\text{IP}_3$ -Rezeptor	< 40	< 1
<i>Puff</i>	$\text{IP}_3$ -Rezeptor	$\geq 50$	$\sim 6$
<i>Quark</i>	Ryanodin Rezeptor	$\sim 100$	< 1
<i>Spark</i>	Ryanodin Rezeptor	$\sim 250$	1 – 3

In Abhängigkeit davon, welcher Rezeptortyp bzw. sekundärer Botenstoff betrachtet wird, haben sich differenzierte Termini für ein subzelluläres  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal etabliert (Tab. 1.1) : Im Fall von  $\text{IP}_3$  und dem  $\text{IP}_3$ -Rezeptor bezeichnet man den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom eines Einzelkanals als *blip* und den einer ganzen Kanalgruppe als *puff* (Bootman et al., 1997). Für cADPR und den Ryanodin-Rezeptor gilt ein Einzelkanalereignis als *quark* (Lipp und Niggli, 1996) und ein Kanalgruppenereignis als *spark* (Tsugorka et al., 1995).

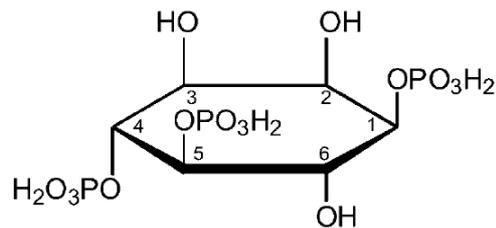
Eine so weitgehende differenzierte Charakterisierung subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale ist auf multiple Studien an verschiedenen Zellsystemen zurückzuführen.  $\text{IP}_3$ - bzw.  $\text{IP}_3$ -

Rezeptor-abhängige *blips* und *puffs* wurden an elektrisch nicht-erregbaren HeLa-Zellen beobachtet, in denen sie in Antwort auf eine physiologische Stimulation durch Histamin generiert wurden (Bootman et al., 1997) a; (Bootman et al., 1997) b) . Darüber hinaus zeigte sich, dass die *blip*- bzw. *puff*-assoziierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle eine gegenüber  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren der näheren Umgebung erhöhte  $\text{IP}_3$ -Sensitivität besaßen (Thomas et al., 2000). Weitere Beobachtungen von *puffs* gelangen an *Xenopus* Oocyten (Yao et al., 1995), einer Neuroblastomzelllinie, sowie 3T3-Fibroblasten (Tovey et al., 2001). cADPR- bzw. Ryanodin-Rezeptor-abhängige *quarks* und *sparks* traten ebenfalls nach physiologischer Stimulation in verschiedenen Zellsystemen auf, z.B. in Skelettmuskelzellen (Klein et al., 1996 ; Tsugorka et al., 1995), Herzmuskelzellen (Lipp und Niggli, 1996) sowie 3T3-Fibroblasten (Bruzzone et al., 2003). Neuere Untersuchungen an humanen T-Lymphocyten zeigten zwar elementare  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale auf, ermöglichten jedoch keine Unterscheidung zwischen  $\text{IP}_3$ -induzierten *puffs* und cADPR-induzierten *quarks* (Kunerth et al., 2004).

### **1.3 $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende, sekundäre Botenstoffe in Eukaryonten: $\text{IP}_3$ , cADPR und NAADP**

#### **1.3.1 $\text{IP}_3$ : Ein $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -Metabolit als $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzender sekundärer Botenstoff**

$\text{IP}_3$  ist der erste sekundäre Botenstoff mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Eigenschaften, der in Eukaryonten entdeckt und identifiziert werden konnte (Streb et al., 1983). Durch eine Reihe eleganter Experimente demonstrierte man, dass  $\text{IP}_3$  (Abb. 1.2) nach Stimulation G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCR), z. B. des Acetylcholinrezeptors, oder von Rezeptortyrosinkinasen aus der Spaltung des membranständigen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphats durch das Enzym Phospholipase C entsteht (Berridge et al., 2000; Bultynck et al., 2003; Streb et al., 1983).



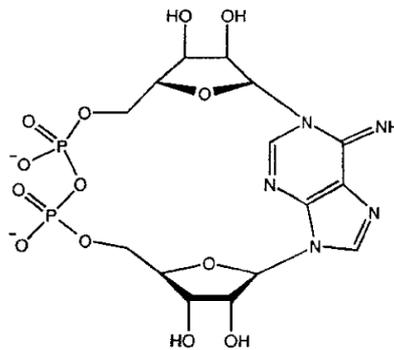
**Abb. 1.2: Struktur des  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden, sekundären Botenstoffs  $\text{IP}_3$ .** [verändert nach (Bultynck et al., 2003)]

In Folge dessen diffundiert wasserlösliches  $\text{IP}_3$  frei durch das Cytosol, bis es an die spezifischen  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren in der ER-Membran andockt.  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren lassen sich in drei Isotypen (1 bis 3) unterteilen und liegen in homo- bzw. heterotetramerer Form in der Membran des ER vor (Bultynck et al., 2003; Mikoshiba, 2003). Da jede Untereinheit eine Bindungsstelle für  $\text{IP}_3$  besitzt, induziert  $\text{IP}_3$  im Laufe eines kooperativen Prozess, an dem auch  $\text{Ca}^{2+}$  selbst durch Rückkopplung über CICR beteiligt ist, die Öffnung der  $\text{Ca}^{2+}$ -spezifischen Kanäle der Rezeptoren (Hamada et al., 2002). Es folgt die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Lumen des ER in das Cytosol. So werden unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Prozesse in Gang gesetzt, wie z.B. die Neurotransmitterfreisetzung aus Neuronen in synaptische Spalte oder die Muskelkontraktion nach Aktivierung der neuromuskulären Endplatte (Berridge et al., 2000). Die Kontrolle der  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren unterliegt jedoch nicht nur  $\text{IP}_3$  und  $\text{Ca}^{2+}$  allein, sondern zusätzlich einer Vielzahl akzessorischer Proteine, wie z.B. Calmodulin oder FKBP, die die Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle direkt mit beeinflussen (Bultynck et al., 2003). Auch der Grad der Phosphorylierung beeinflusst die Öffnungswahrscheinlichkeit des  $\text{IP}_3$ -Rezeptors (Patterson et al., 2004); eine Vielzahl von Kinasen und Phosphatasen reguliert das Ausmaß der Phosphorylierung, so z.B. die Proteinkinase A (PKA), die ERK-Kinase sowie die Proteinphosphatasen 1 und 2A (Patterson et al., 2004).

### 1.3.2 cADPR: Ein NAD-Metabolit als $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzender sekundärer Botenstoff

Nach der Entdeckung und Etablierung des Moleküls  $\text{IP}_3$  als  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzender Botenstoff in Eukaryonten 1983 (Streb et al., 1983) gelang einige Zeit später die

Entdeckung eines weiteren kleinen, organischen Moleküls mit  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierenden bzw. freisetzenden Eigenschaften in Seeigeleierhomogenaten (Clapper et al., 1987; Lee et al., 1989); cADPR besitzt eine zyklische Struktur und wird aus dem ubiquitären Redox-Metaboliten NAD synthetisiert (Abb. 1.3). Zur cADPR-Synthese aus NAD sind bisher nicht identifizierte, cytosolische NAD-Glykohydrolasen in der Lage, die hauptsächlich den Abbau von NAD zu ADPR katalysieren, aber in einer Nebenreaktion auch das Substrat zu cADPR zyklisieren können (Guse, 2000). Neben diesen löslichen Proteinen existieren auch noch membranständige Ektoenzyme, CD38 und CD157 (BST-1), die NAD zu ADPR und cADPR umsetzen (Guse, 2004).



**Abb. 1.3: Struktur des  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden, sekundären Botenstoffs cADPR.** [verändert nach (Guse, 2000)]

Auf die Entdeckung von cADPR folgende Untersuchungen offenbarten eine Vielzahl eukaryontischer Zelltypen, die auf die Anwesenheit von cADPR im Cytosol mit der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER antworten (Lee, 2001), so z.B. glatte und gestreifte Muskelzellen (Boittin et al., 2003), Neuronen (Zhang et al., 2005), Acinus- sowie beta-Zellen des Pankreas (Yamasaki et al., 2004) und verschiedene Leukocytentypen, darunter T- und B-Zellen und Makrophagen (Guse et al., 1999; Partida-Sanchez et al., 2004). Sobald cADPR im Cytosol synthetisiert worden ist, reagieren Ryanodin Rezeptoren auf dessen Anwesenheit mit der Öffnung ihrer  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Meszaros et al., 1993; Thomas et al., 2001). Es folgt eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER. In Folge dessen kommt es dann wie bei den  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren durch den CICR zur sukzessiven Aktivierung und Öffnung benachbarter  $\text{IP}_3$ - und Ryanodin Rezeptoren (Fill und Copello, 2002). Anders als im Falle der  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren aber konnte bisher keine Bindungsstelle für cADPR am Ryanodin Rezeptor entdeckt

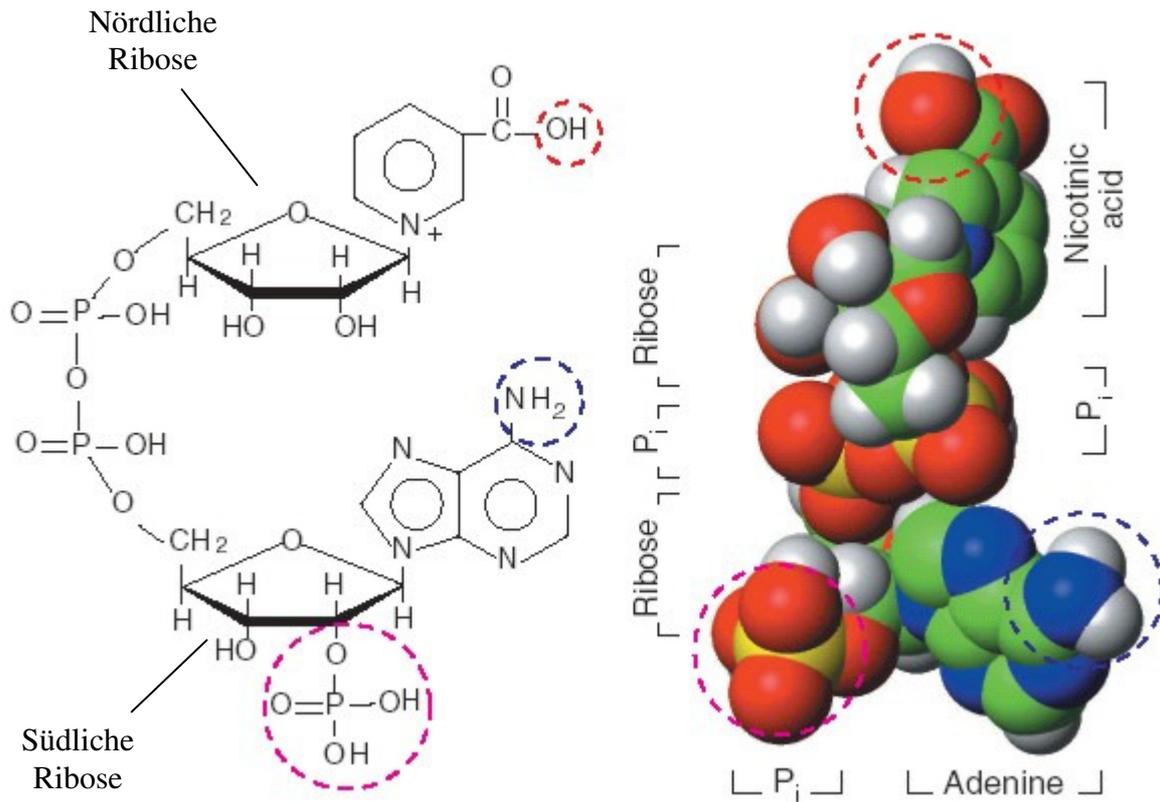
werden (Thomas et al., 2001). Vielmehr vermutet man, dass auch akzessorische Proteine für die cADPR-Bindung verantwortlich sein könnten und cADPR so indirekt auf die Öffnung dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals wirkt (Noguchi et al., 1997; Walseth et al., 1993). Es wurde gezeigt, dass sog. photoaffine cADPR-Analoga, die nach Bindung an ihren Rezeptor/Bindeprotein mittels UV-Bestrahlung mit diesem kovalent verknüpft worden waren, Proteine banden, die sich vom Ryanodin Rezeptor unterschieden (Walseth et al., 1993). Zusätzlich wurde noch entdeckt, dass sich cADPR an das Protein FKBP 12.6 binden konnte (Noguchi et al., 1997).

### **1.3.3 NAADP: Ein weiterer NAD-Metabolit als $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzender sekundärer Botenstoff**

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Moleküle  $\text{IP}_3$  und cADPR sind inzwischen weitgehend als sekundäre Botenstoffe anerkannt. In den letzten Jahren ist indessen noch ein dritter putativer, sekundärer Botenstoff für  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege ins Gespräch gekommen, das Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NAADP). Erste Hinweise auf diese Substanz erbrachten Experimente, in denen kommerziell erhältliche NADP-Präparationen zu einer sofortigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in Seeigelei-Homogenaten führten (Clapper et al., 1987). NADP als ubiquitärer Redox-Metabolit kam hierbei als Auslöser für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung nicht in Frage, so dass man auf eine Fremdsubstanz in der Probe schloss. Mittels hochaufreinigender HPLC-Techniken konnte eine Fraktion isoliert werden, die eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Aktivität besaß. Dennoch unterschieden sich die aufgereinigte Fraktion und die Ausgangsprobe in ihren Massen- sowie Kernresonanzspektren nur minimal. Mit einiger Verzögerung konnte die Molekularstruktur schließlich entschlüsselt und die  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Fremdsubstanz als NAADP identifiziert werden (Chini et al., 1995; Lee und Aarhus, 1995).

NAADP unterscheidet sich strukturell von NADP durch den Austausch der Nikotinamidgruppe gegen eine Nikotinsäuregruppe (Abb. 1.4).

Der Massenunterschied in Höhe nur einer atomaren Masseneinheit verdeutlicht daher auch die Schwierigkeiten auf dem Weg zur strukturellen Aufklärung. Die für die  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Aktivität im Seeigeleisystem essentiellen Strukturen entsprechen



**Abb. 1.4: Struktur von NAADP sowie essentieller funktioneller Gruppen:** NAADP besitzt im Gegensatz zu NADP statt einer Aminogruppe eine Hydroxylgruppe (roter Kreis). Für seine  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Aktivität ist NAADP auf die Phosphatgruppe der südlichen Ribose (rosa Kreis) sowie die Aminogruppe an Position 6 des Adeninrings angewiesen (blauer Kreis). [verändert nach Langhorst, 2003, Diplomarbeit]

der Nikotinsäuregruppe, der Phosphatgruppe an der südlichen Ribose sowie der Aminogruppe am Adeninring (Abb. 1.3; (Lee und Aarhus, 1997).

Parallel zur Entdeckung des NAADP gelang es, einen enzymatischen Weg für dessen Synthese und Abbau aufzuzeigen. Das Membranprotein CD38 erwies sich u.a. als ADP-Ribosylcyclase, die außerdem bei saurem pH durch Basenaustausch NADP zu NAADP umwandelt (Aarhus et al., 1995). In Geweben von Säugetieren ist CD38 scheinbar vornehmlich an der NAADP-Synthese beteiligt (Chini et al., 2002). Als problematisch erwiesen sich jedoch die Befunde, dass CD38 sein katalytisches Zentrum außerhalb des Cytosols auf luminaler bzw. extrazellulärer Seite besitzt (Zocchi et al., 1993) und das pH-Optimum für einen katalysierten Basenaustausch bei etwa pH 5 liegt (Aarhus et al., 1995). Synthese- und Wirkungsort sind damit unterschiedlich lokalisiert. Bis heute ist dieses topologische Paradoxon nicht vollständig geklärt (De Flora et al., 2000), es existieren jedoch einige Hinweise, wie

Zellen das Problem der CD38-katalysierten Synthese bewältigt haben. Im Rahmen dieser Untersuchungen konzentrierte man sich jedoch auf den sekundären Botenstoff cADPR und nicht NAADP. Zum einen wurde schon vermutet, dass es sich bei CD38 gleichzeitig um einen Transporter für seine eigenen Syntheseprodukte handeln könnte (Franco et al., 1998). Andererseits wurde die Existenz plasmamembran-ständiger, cADPR-spezifischer Nukleosidtransporter nachgewiesen, die in der Lage sind, extrazelluläres, CD38-synthetisiertes cADPR in das Cytosol zu befördern (Guida et al., 2002). Sein Substrat NAD wiederum könnte CD38 aus dem Cytosol über Connexin 43 Hemikanäle erhalten (Bruzzone et al., 2001). Überhaupt wurden auch Hinweise dafür gefunden, dass cADPR parakrin Calcium zu mobilisieren vermag (Franco et al., 2001). Interessanterweise wurde ein ähnlicher Wirkmechanismus kürzlich für NAADP offengelegt. NAADP induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Ratten Astrocyten, wenn es von außen appliziert wurde (Singaravelu und Deitmer, 2006). Außerdem wurde extrazelluläres NAADP von basophilen Ratten Zellen aktiv über die Plasmamembran in das Cytosol transportiert. Dieser Befund, sprach für eine parakrine oder autokrine Rolle von NAADP (Billington et al., 2006).

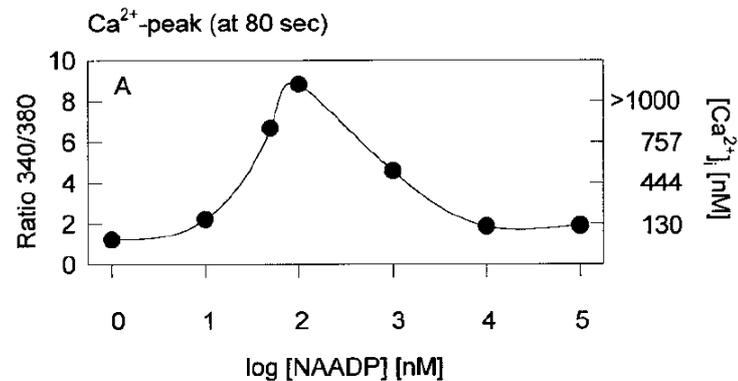
Der enzymatische Abbau von NAADP wurde für verschiedene tierische Gewebe nachgewiesen, beispielsweise in Gewebepräparationen der Ratte (Chini und Dousa, 1995). Für den NAADP-Abbau kam eine Vielzahl von Enzymen in Frage, so z.B. die alkalische Phosphatase sowie verschiedene Phosphomono- und diesterasen (Berridge et al., 2002; Chini und Dousa, 1995).

#### **1.4 Stellung von NAADP im $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystem von T-Lymphocyt**

NAADP ist in seiner Rolle als putativer sekundärer Botenstoff im Vergleich zu den etablierten sekundären Botenstoffen  $\text{IP}_3$  (Streb et al., 1983) und cADPR (Guse et al., 1999) sehr potent und vermag bereits in niedriger Konzentration  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen bzw. -wellen auszulösen. In einem Konzentrationsbereich zwischen 10 und 100 nM ist NAADP wirksam und löst in Zellen aus Evertibraten (z.B. im Seeigeli (Lee und Aarhus, 1995)) und Vertebraten (z.B. in T-Lymphocyt (Berg et al., 2000))  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale aus. Der Einsatz von  $\text{IP}_3$  und cADPR hingegen setzt Konzentrationen

zwischen 1 bis 100  $\mu\text{M}$  voraus, wenn eine prominente  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort ausgelöst werden soll (Guse et al., 1999).

T-Lymphocyten nehmen eine Schlüsselposition im humanen Immunsystem ein und sind Teil der sog. adaptiven Immunantwort. Vor allem evolutiv stark anpassungsfähigen Pathogenen, wie z.B. Viren und einigen Bakterien, gelingt es, den starren, genetisch verankerten und unspezifischen



**Abb. 1.5 Dosis-Wirkungskurve von NAADP in Jurkat T-Lymphocyten** (Berg et al., 2000).

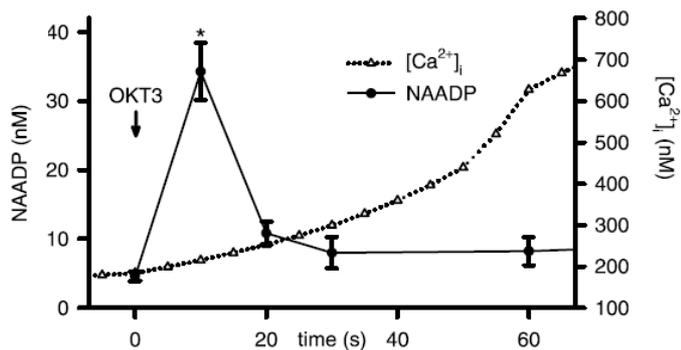
Abwehrmechanismen der angeborenen Immunantwort auszuweichen. Um diese Pathogene dennoch erfolgreich bekämpfen zu können, greifen Subpopulationen von T-Lymphocyten in den Abwehrkampf ein.  $\text{CD8}^+$ -T-Lymphocyten (cytotoxische T-Zellen) attackieren und lysieren virusbefallene Wirtszellen, während  $\text{CD4}^+$ -T-Lymphocyten (T-Helferzellen) als zentrale Informationsverteiler Komponenten der angeborenen Immunantwort (Makrophagen, Monocyten u.a.) pathogenspezifisch rekrutieren. Bevor sie einsatzbereit sind, müssen T-Lymphocyten nach Antigenerkennung über den TCR/CD3-Rezeptorkomplex proliferieren und differenzieren. Diese Prozesse beruhen auf einem ausgeweiteten zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystem, das teilweise mit Hilfe der etablierten, sekundären Botenstoffe  $\text{IP}_3$  und cADPR erklärt werden kann (Guse et al., 1999). Daneben spielt der putative sekundäre Botenstoff NAADP eine zunehmend größere Rolle (Berg et al., 2000).

In  $\text{CD4}^+$ -T-Lymphocyten weist die NAADP-Dosis-Wirkungskurve einen glockenförmigen Verlauf, wie er auch für andere Säugetierzellen typisch ist (Abb. 1.5; (Berg et al., 2000) . Nach Mikroinjektion von 50 bis 100 nM NAADP steigt die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unmittelbar auf Werte über 1  $\mu\text{M}$  an, um dann in ein langanhaltendes, leicht erhöhtes  $\text{Ca}^{2+}$ -Plateau überzugehen. Konzentrationen zwischen 1 und 10 nM führen zu kleinen und unregelmäßigen, transienten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen (Berg et al., 2000). Auch in Konzentrationen, die über 100 nM hinausgehen,

löst NAADP lediglich kleine  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale aus. Ab  $10 \mu\text{M}$  wird das NAADP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystem sogar vollständig inaktiviert (Berg et al., 2000). Es ist bemerkenswert, dass diese Inaktivierung alle TCR/CD3-,  $\text{IP}_3$  sowie cADPR-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsysteme zum Erliegen bringt (Berg et al., 2000). Seine globale  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Wirkung entfaltet NAADP nur in Interaktion mit dem Ryanodin-Rezeptor; zusätzlich ist NAADP weitestgehend unabhängig von dem  $\text{IP}_3$ -Rezeptor (Langhorst et al., 2004).

Scheinbar nimmt das NAADP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystem eine Schlüsselstellung in der Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege in T-Lymphocyten ein. In diesem Zusammenhang ist es von besonderem Interesse, mehr über die elementaren, NAADP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ereignisse zu erfahren, die denen der sekundären Botenstoffe  $\text{IP}_3$  und cADPR vorausgehen.

Vor diesem Hintergrund konnte kürzlich gezeigt werden, dass NAADP in der Tat in T-Lymphocyten der erste sekundäre Botenstoff ist, dessen Konzentration nach TCR/CD3-Stimulation ansteigt (Gasser et al., 2006). Mit Hilfe eines neuartigen und sehr empfindlichen



**Abb. 1.6: Anstieg der intrazellulären NAADP-Konzentration nach TCR/CD3-Stimulation.** Die endogene NAADP-Konzentration stieg nach der Stimulation des TCR/CD3-Rezeptorkomplexes schnell an. Parallel dazu ist auch noch der Verlauf der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wiedergegeben. (verändert nach (Gasser et al., 2006)).

Nachweisverfahrens, das gänzlich auf radioaktive Reaktionspartner verzichtet, zeichnete sich für NAADP eine zweiphasiger Konzentrationsverlauf ab (Abb. 1.6). Schon einige Sekunden nach der physiologischen Stimulation über den TCR/CD3-Komplex stieg die intrazelluläre NAADP-Konzentration von ca. 5 nM um das siebenfache auf ca. 35 nM an, um dann fast wieder sofort auf das Ruhenniveau zurückzufallen. Erst nach weiteren fünf Minuten erhöhte sich die Konzentration wieder und hielt sich für einen längeren Zeitraum von mehr als 15 Minuten bei ca. 15 nM. Die Konzentration der beiden anderen sekundären Botenstoffe  $\text{IP}_3$  und cADPR stieg zwar auch nach Rezeptorstimulation an, aber erst im Anschluss an den Anstieg der NAADP-

---

Konzentration. Zuerst erhöhte sich die  $IP_3$ -Konzentration (Guse und Emmrich, 1991), um nach ihrem erneuten Absinken durch eine langanhaltende Erhöhung der cADPR-Konzentration abgelöst zu werden (Guse et al., 1999).

## 2 Problemstellung

Bis heute konnte gezeigt werden, dass die sekundären Botenstoffe cADPR und NAADP in humanen T-Lymphocyten eine fundamentale Rolle spielen (Berg et al., 2000; Guse et al., 1999). Beide Signalmoleküle stehen an der Spitze einer Hierarchie der wichtigsten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsysteme, die zu einer T-Zell-Aktivierung führen. Gerade in jüngeren Arbeiten ist es gelungen, die Abhängigkeit globaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale, die für die T-Zellaktivierung entscheidend sind, von cADPR (Guse et al., 1999) und NAADP (Berg et al., 2000; Gasser et al., 2006) sowie die direkte Abhängigkeit NAADP-vermittelter, globaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale von dem Ryanodin-Rezeptor zu demonstrieren (Langhorst et al., 2004).

Diese Ergebnisse eröffnen neue Perspektiven auf dem Feld der Immuntherapie. Eine genauere Kenntnis der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege könnte zum Design neuartiger, spezifischer Immunsuppressiva genutzt werden, um die Proliferation und Differenzierung von T-Lymphocyten zu steuern. Agonisten oder Antagonisten der cADPR- und NAADP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege ließen sich möglicherweise als Grundlage zur Etablierung neuartiger Therapien für Autoimmunerkrankungen, wie z.B. der Multiplen Sklerose, nutzen. Um diese Entwicklung noch weiter zu unterstützen, lohnt es sich, (i) bis an die Basis aller  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität in T-Lymphocyten vorzustoßen und die elementaren, NAADP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ereignisse zu untersuchen. Nach dem Gewinn neuer Erkenntnisse auf diesem Gebiet (ii) eröffnet sich mit der Synthese niedermolekularer NAADP-Analoga die Möglichkeit einer Suche nach potentiellen Antagonisten des NAADP- $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegs in T-Lymphocyten. In gleichem Maße wie für NAADP besteht auch im Falle von cADPR (iii) die Chance, durch die Verwendung natürlich vorkommender und synthetischer cADPR-Analoga in den cADPR- $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg der T-Lymphocyten und anderer Zelltypen einzugreifen.

Alle Experimente des ersten Teils der hier vorliegenden Arbeit hatten zum Ziel in humanen T-Lymphocyten NAADP-induzierte, subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in der sog. *pacemaker*-Phase (Schrittmacher-Phase) zu identifizieren, zu charakterisieren und zu untersuchen, ob eine Abhängigkeit von dem Ryanodin-Rezeptor besteht. Als Methoden dienten Mikroinjektion von NAADP und simultane Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit Hilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikators Fura-2 ( $\text{Ca}^{2+}$ -

*Imaging*). Nach der Etablierung der Messbarkeit NAADP-abhängiger, subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale sollte über Koinjektion oder Vorinkubation verschiedener Pharmaka die Rolle des Ryanodin Rezeptors untersucht werden. An diese pharmakologische Vorgehensweise wiederum schloss sich eine molekularbiologische Strategie an. In zwei T-Zelllinien mit reduzierter Ryanodin-Rezeptor-Expression sollte der Zusammenhang zwischen NAADP-abhängigen, subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen und Ryanodin-Rezeptor weiter untersucht werden.

Im zweiten Teil der hier vorliegenden Arbeit sollten zwei synthetische, niedermolekulare NAADP-Analoga, BZ52 und BZ194, auf ihre Wirksamkeit als Antagonisten des NAADP- $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegs in humanen und Ratten T-Lymphocyten untersucht werden. Zuerst wurden mit Hilfe von Mikroinjektionen und gleichzeitiger Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (s.o.) die Wirkungen beider Substanzen auf die  $\text{IP}_3$ -, cADPR- und NAADP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege in humanen T-Lymphocyten untersucht.

Im Anschluß daran wurde das potentiell membranpermeable NAADP-Analogon BZ194 in primären, MBP-spezifischen  $\text{CD4}^+$  Ratten *memory* T-Zellen eingesetzt, die der Induktion der EAE (Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis) dienen, einem MS-ähnlichen Krankheitsmodell in der Ratte. Es sollte der Einfluss von BZ194 auf die NAADP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalssysteme der Ratten T-Zellen untersucht werden. Als Methoden dienten u.a. die Stimulation der T-Zellen über den TCR/CD3-Komplex bei gleichzeitiger fluorimetrischer Bestimmung der globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit Hilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikators Fura-2.

Im Rahmen des dritten Teils wurde dann in Zusammenarbeit mit Xianfeng Xu (Universität Peking, China) die Wirkung des synthetischen cADPR-Analogons cADPRcE auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalssysteme in humanen T-Lymphocyten untersucht. Nach passiver Applikation der Substanz wurden die Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration fluorimetrisch und mittels *Ca<sup>2+</sup>-Imaging* auf Einzelzellebene verfolgt.

Schließlich beschäftigte sich der vierte und letzte Teil der Arbeit mit zwei natürlich vorkommenden cADPR-Metaboliten, P24 und Ap2A, und deren Wirkungsmechanismen in den  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalssystemen humaner HeLa Karzinomzellen. Beide Substanzen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Giovanna Basile (Universität Genua,

---

Italien) einzeln oder in Kombination passiv appliziert und simultan mittels  $Ca^{2+}$ -*Imaging* vermessen, um deren agonistische Wirkung auf die  $Ca^{2+}$ -Signalsysteme der HeLa Karzinomzellen, die kürzlich das erste Mal beschrieben wurde (Basile et al., 2005), genauer zu charakterisieren.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Geräte

##### Zellkultur:

Sterile Werkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus, Hanau
Variofuge 3.OR	Heraeus, Hanau
Inversmikroskop CK 2	Olympus, Hamburg
Casy 1 TT Zellzähler	Schärfe System, Reutlingen
Wasserbad Thermomix 4R	Braun, Melsungen

##### Ca<sup>2+</sup>-Fluorimetrie, Ca<sup>2+</sup>-*imaging* und Mikroinjektion:

Analysenwaage H 54	Mettler, Giessen
Waage Precisa 400 M	Pak Oerlikon, Zürich (Schweiz)
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Kendro, Osterode
Wasserbad	GFL, Hannover
Vortex	Heidolph, Heidelberg
Hitachi F-2000	Hitachi, Japan
Leica DM IRE2	Leica, Wetzlar
- Objektiv Leica HCX Apo (100x, n.A. = 1,3)	Leica, Wetzlar
- Dichroischer Spiegel 400 DCLP	AF Analystechnik, Tübingen
- Emissionsfilter D 510/40	AF Analystechnik, Tübingen
Polychrome IV	Till Photonics, Gräfelfing
Orbit D/A <i>controller</i>	Improvision, Heidelberg
CCD Kamera C4742-95-12ER	Hamamatsu, Japan
Orca ER <i>camera controller</i>	Hamamatsu, Japan
G4 <i>workstation</i>	Apple, Cork (Irland)
Software Openlab , 1.7.8, 3.0.9, 4.0.2	Improvision, Heidelberg

Micromanipulator 5171	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Transjector 5246	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Femtotips I und II	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
<i>Microloader</i>	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Suprasil, Quarzküvetten (10 mm)	Hellma, Mühlheim in Baden

### 3.1.2 Medien, Puffer, Chemikalien

#### Zellkultur:

##### Restimulationsmedium

- |  |                             |
|--|-----------------------------|
| - RPMI 1640 mit Glutamax I                               | Invitrogen/Gibco, Karlsruhe |
| - Penicillin/Streptomycin<br>(Endkonzentration 50 µg/ml) | Invitrogen/Gibco, Karlsruhe |
| - Nicht-essentielle Aminosäuren, 1 % (v/v)               | Invitrogen/Gibco, Karlsruhe |
| - Asparagin (Endkonz.: 0,036 g/l)                        | Sigma, München              |
| - Natrium-Pyruvat (Endkonz.: 1 mM)                       | Invitrogen/Gibco, Karlsruhe |
| - β-Mercaptoethanol, 0,004 ‰ (v/v)                       | Merck, Darmstadt            |
| - Rattenserum, 1 % (v/v)                                 | AG Flügel, MPI, Martinsried |

##### TCGF-Medium (*T cell growth factor*)

- |  |                             |
|--|-----------------------------|
| - RPMI 1640 mit Glutamax I                               | Invitrogen/Gibco, Karlsruhe |
| - Penicillin/Streptomycin<br>(Endkonzentration 50 µg/ml) | Invitrogen/Gibco, Karlsruhe |
| - Nicht-essentielle Aminosäuren, 1 % (v/v)               | Invitrogen/Gibco, Karlsruhe |
| - Asparagin (Endkonz.: 0,036 g/l)                        | Sigma, München              |
| - Natrium-Pyruvat (Endkonz.: 1 mM)                       | Invitrogen/Gibco, Karlsruhe |
| - β-Mercaptoethanol, 0,004 ‰ (v/v)                       | Merck, Darmstadt            |
| - Hochkonzentriertes IL2-Medium, 5 % (v/v)               | AG Flügel, MPI, Martinsried |
| - Pferdeserum, 10 % (v/v)                                | Invitrogen/Gibco, Karlsruhe |

## Einfriermedium

- RPMI 1640 mit Glutamax I Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
- DMSO, 10 % Sigma, München
- *Foetal calf serum* (FCS), 45 % (v/v) Biochrom, Berlin

## RPMI-Komplettmedium:

- RPMI 1640 mit Glutamax I Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
- *Newborn calf serum* (NCS), 7,5 % (v/v) Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
- Penicillin/Streptomycin Invitrogen/Gibco, Karlsruhe  
(Endkonzentration 50 µg/ml)
- HEPES, 1 M, pH = 7,4, sterilfiltriert Biomol, Hamburg  
(Endkonzentration 25 mM)

## RPMI Tet 2-Medium:

- RPMI 1640 mit Glutamax I Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
- *Foetal calf serum* (FCS), 10 % (v/v) Biochrom, Berlin  
(tetracyclinfrei, 30 min bei 56 °C inaktiviert)
- Penicillin/Streptomycin Invitrogen/Gibco, Karlsruhe  
(Endkonzentration 50 µg/ml)
- HEPES, 1 M, pH = 7,4, sterilfiltriert Biomol, Hamburg  
(Endkonzentration 25 mM)
- Natrium-Pyruvat (Endkonzentration 1 mM) Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
- G418 (Endkonzentration 400 µg/ml) Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
- Hygromycin B (Endkonz.: 50 µg/ml) Invitrogen/Gibco, Karlsruhe

## DMEM-Komplettmedium

- DMEM mit Glutamax I Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
- *Foetal calf serum* (FCS), 10 % (v/v) Biochrom, Berlin  
(tetracyclinfrei, 30 min bei 56 °C inaktiviert)
- Penicillin/Streptomycin Invitrogen/Gibco, Karlsruhe  
(Endkonzentration 50 µg/ml)

Ca<sup>2+</sup>-Fluorimetrie, Ca<sup>2+</sup>-*imaging* und Mikroinjektion:

## Calcium-Messpuffer:

- 140 mM NaCl	Merck, Darmstadt
- 5 mM KCl	Merck, Darmstadt
- 1 mM MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
- 1 mM CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	Sigma, München
- 20 mM HEPES	Biomol, Hamburg
- 1 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
- 5,5 mM Glucose	Sigma, München

(auf pH = 7,4 mit NaOH eingestellt, filtriert durch Spritzenaufsatzfilter [Porengröße: 0,2 µm])

## Intrazellulärpuffer:

- 110 mM KCl	Merck, Darmstadt
- 10 mM NaCl	Merck, Darmstadt
- 2 mM MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
- 5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
- 20 mM HEPES	Biomol, Hamburg

(auf pH = 7,2 mit NaOH eingestellt, filtriert durch Spritzenaufsatzfilter [Porengröße: 0,2 µm])

Fura-2-AM, 1 mg/ml in DMSO → 1mM	Calbiochem, Bad Soden
Bovine serum albumin (BSA), 5 mg/ml in H <sub>2</sub> O bidest	Sigma, München
Poly-L-Lysin (<70 kDa), 0,1 mg/ml in H <sub>2</sub> O bidest	Sigma, München
Baysilone, mittelviskos	Bayer, Leverkusen
DMSO	Sigma, München
InsP <sub>3</sub> (IP <sub>3</sub> )	Biolog, Bremen
cADPR	Biolog, Bremen
NAADP	Sigma, München
Heparin	Sigma, München
Ruthenium Rot	Calbiochem, Bad Soden
Ryanodin	Calbiochem, Bad Soden
SKF 96365	Calbiochem, Bad Soden

---

Chelex	Sigma, München
Ionomycin	Calbiochem, Bad Soden
Tris-Base,	Sigma, München
EGTA	Sigma, München
MBP	AG Flügel, MPI, München
BZ52	AG Potter, Bath, Großbri- tannien
BZ194	AG Potter, Bath, Großbri- tannien
Tetanustoxin	Behringwerke, Marburg
Nikotinamid	Sigma, München
Nikotinsäure	Sigma, München
Thapsigargin	Calbiochem, Bad Soden
Murine Ak gg. Ratten CD3	Caltag Lab., Hamburg
Ziegen Ak gg. Maus IgM	Caltag Lab., Hamburg

### 3.1.3 Primäre Zellen und Zelllinien

Im Abschnitt 4.2.2 des Ergebnisteils wurden für die beschriebenen Versuche primäre, MBP-spezifische, CD4<sup>+</sup> Ratten *memory* T-Lymphocyten benutzt. Zur Verfügung gestellt wurden diese T-Zellen von der Arbeitsgruppe von PD Dr. A. Flügel, Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried.

Neben den Versuchen mit primären, MBP-spezifischen Ratten *memory* T-Zellen wurden immortalisierte Zelllinien von Jurkat T-Lymphocyten verwendet (Schneider et al., 1977). Die in den Abschnitten 4.1, 4.2.1 und 4.3 beschriebenen Versuche wurden an Zellen des Jurkat-Klons JMP durchgeführt. Parallel zu den Arbeiten am Wildtyp Jurkat-Klon wurden Teile der Versuche aus Abschnitt 4.1 mit Jurkat T-Zellen ausgeführt (Clontech, Heidelberg), die mit einem Tet On Expressionssystem modifiziert worden waren. Es standen drei verschiedene Subklone zur Verfügung; pTRE-EGFP#E2, pTRE-2-511#25 sowie pTRE-2-240#10 (Schwarzmann et al., 2002). Alle Subklone bestanden aus sog. *knock-down* Klonen, d.h. solche, die ein

stabil transfiziertes *antisense*-Konstrukt gegen ein bestimmtes Protein enthielten. Der erste Subklon pTRE-EGFP#E2, hier abgekürzt E2, stellte lediglich einen Kontrollklon mit einem *antisense*-Konstrukt gegen das in T-Zellen normalerweise nicht exprimierte Reporterprotein EGFP und sollte keinen Einfluss auf zelluläre Prozesse ausüben. Die beiden anderen Subklone, pTRE-2-511#25 sowie pTRE-2-240#10, hier abgekürzt 25 und 10, enthielten gegen den Ryanodin-Rezeptor gerichtete *antisense*-Konstrukte. Das 511 bp große Konstrukt in Klon 25 war mit 100 %-iger Homologie gegen den Ryanodin-Rezeptor Typ III gerichtet. Klon 10 hingegen war mit seinem 240 bp großen Konstrukt gegen alle Ryanodin-Rezeptor Typen (I, II und III) gerichtet. Die Homologie lag hier zwischen 80 und 100 %. Vorhergehende Arbeiten (Schwarzmann et al., 2002) hatten gezeigt, dass die beiden Subklone 25 und 10 ihre jeweils betroffenen Ryanodin-Rezeptor Typen nur noch sehr schwach exprimieren. Eine subtypspezifische Differenzierung des Expressionsniveaus der Ryanodin-Rezeptoren in den Klonen war allerdings bisher wegen fehlender Antikörper nicht möglich.

Die im Abschnitt 4.4 des Ergebnisteils aufgeführten Experimente wurden an HeLa Karzinomzellen durchgeführt, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. E. Zocchi (*University of Genova*, Italien) zur Verfügung gestellt wurden.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

Die primären, MBP-spezifischen Ratten *memory* T-Zellen, die man in Abschnitt 4.2.2 verwendete, wurden als Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert und bei Bedarf vor jedem Experiment aufgetaut. In unregelmäßigen Abständen mussten diese Vorräte ergänzt werden. Hierfür wurden ruhende Ratten T-Zellen einer Restimulationsprozedur unterworfen und so zur Proliferation angeregt (Ben-Nun et al., 1981; Flügel et al., 1999).

Zu Beginn dieser Prozedur vermengte man ruhende T-Lymphocyten und frisch isolierte, bestrahlte (5000 Rad) Ratten Thymocyten in einem bestimmten Verhältnis

in Restimulationsmedium ( $4 \cdot 10^6$  T-Zellen auf  $7 \cdot 10^7$  Thymocyten, Verhältnis  $\sim 1 : 10$ ). Die Thymocyten dienten als antigenpräsentierende Zellen (APC), um die T-Lymphocyten zu aktivieren und dann proliferieren zu lassen. Nach Zugabe des spezifischen Antigens (hier: MBP,  $10 \mu\text{g/ml}$  Endkonzentration) ließ man die Zellsuspension in Petrischalen für zwei Tage inkubieren. Diese sowie alle folgenden Kultivierungsschritte erfolgten in einem Inkubator bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und einem  $\text{CO}_2$ -Gehalt von  $5 \%$ . Nach zwei Tagen waren alle T-Zellen aktiviert und wurden in TCGF-Medium mit einer hohen Konzentration des Wachstumsfaktors IL2 überführt. Im Laufe zweier weiterer Tage konnten sich die aktivierten T-Zellen ungehindert vermehren, während die Thymocyten bereits abgestorben waren. Von Tag fünf bis Tag sieben des Restimulationszyklus schließlich gingen die T-Zellen wieder in den Ruhezustand über. Sie konnten jetzt direkt für Experimente mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen verwendet oder für zukünftige Arbeiten in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Ein einziger Restimulationszyklus erhöhte die T-Zellpopulation im Mittel um den Faktor zehn und es konnten bis zu sieben Zyklen mit frisch aus Ratten isolierten T-Zellen durchlaufen werden.

Alle Jurkat-Klone wurden in einem Inkubator bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und einem  $\text{CO}_2$ -Gehalt von  $5 \%$  kultiviert. Der Klon JMP wurde in RPMI-Komplettmedium kultiviert; die Subklone E2, 10 und 25 in RPMI Tet 2-Medium. Zur optimalen Vermehrung der Zellen bestimmte man alle zwei bis drei Tage die Zellzahl mittels Casy-Zellzähler oder Neubauer-Zählkammer und stellte die Zellzahl mit dem jeweiligen Medium auf  $\sim 0,4 \cdot 10^6$  Zellen/ml ein. Dadurch wurde gleichzeitig auch das Medium aufgefrischt. Bei einer ungefähren Vermehrungsrate von  $1,8$  in  $24 \text{ h}$  wurde garantiert, dass die Zellzahl nie über  $1,2 \cdot 10^6$  Zellen/ml anstieg. Anders als der Jurkat-Klon JMP unterlagen die Subklone E2, 10 sowie 25 durch den Zusatz von G418 im Medium einem permanenten Selektionsdruck.

Die HeLa Karzinomzellen wurden in DMEM-Komplettmedium und in einem Inkubator bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und einem  $\text{CO}_2$ -Gehalt von  $5 \%$  kultiviert. Um eine optimale Proliferation zu garantieren, wurden Kulturflaschen mit dicht gewachsenem Zellrasen trypsiniert, die HeLa Zellen noch gewaschen und dann im Verhältnis  $1 : 10$  verdünnt und mit frischem Medium auf neue Kulturflaschen verteilt.

### 3.2.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die primären, MBP-spezifischen Ratten *memory* T-Zellen wurden in *Cryotubes* in flüssigem Stickstoff gelagert. Um Zellen nach einem Restimulationszyklus für zukünftige Experimente zu konservieren, wurden stets  $1 - 1,5 \cdot 10^7$  Zellen je Aliquot in ca. 1,5 ml Einfriermedium für 48 Stunden bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  langsam eingefroren und dann in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurde ein Aliquot bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  in 70 %-igem Ethanol aufgetaut und die Zellen in 10 ml vorgewärmtes TCGF-Medium gegeben. Nach zweimaligem Waschen (1000 rpm, 10 min, Variofuge 3.OR) konnten die Zellen für Vorinkubationsversuche und / oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen weiterverwendet werden.

Die Zellen aller Jurkat-Klone wurden in *Cryotubes* in flüssigem Stickstoff gelagert. Bei Bedarf wurde ein *Cryotube* bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  in 70 %-igem Ethanol aufgetaut und die Zellen (Zellzahl:  $1 \cdot 10^7$ ) in 10 ml vorgewärmtes RPMI-Komplettmedium gegeben. Nach zweimaligem Waschen (1600 rpm, 4 min, Variofuge 3.OR) wurden die Zellen in 30 ml Medium (je nach Klon unterschiedlich, s. 3.2.1) aufgenommen und weiter kultiviert.

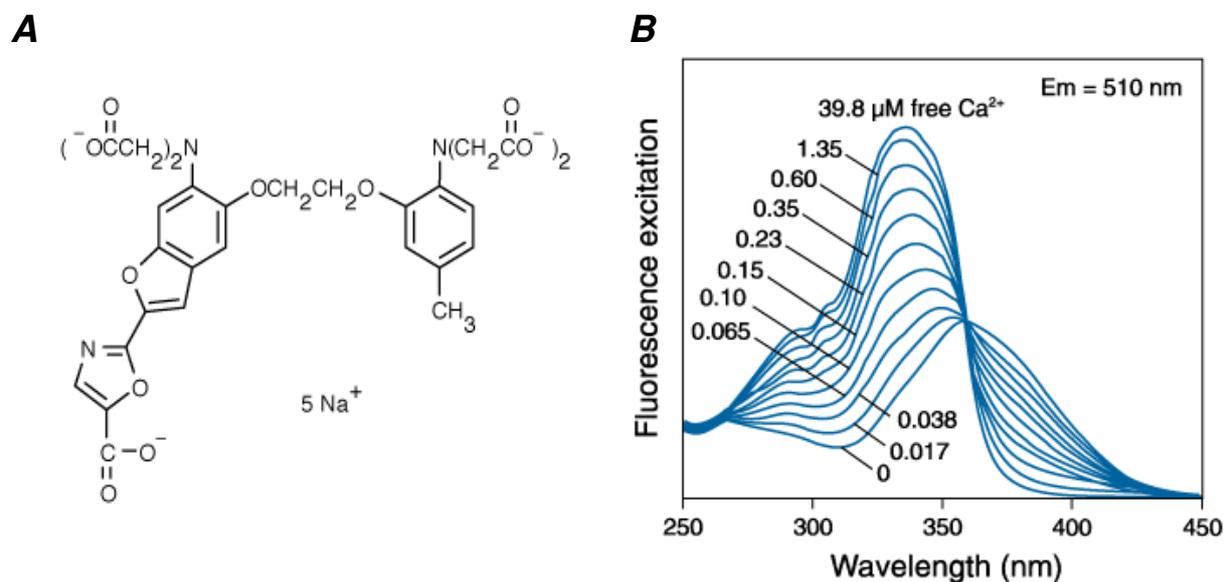
Die HeLa Karzinomzellen taute man auf dieselbe Art und Weise auf wie die Zellen der Jurkat-Klone, nur dass zum Aufwärmen stattdessen DMEM-Komplettmedium verwendet wurde.

### 3.2.3 Bestimmung intrazellulärer $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen mit Hilfe des ratiometrischen Farbstoffs Fura-2

Fura-2 ist ein sog. ratiometrischer,  $\text{Ca}^{2+}$ -spezifischer Fluoreszenzindikator, der es erlaubt, die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von Zellen zu bestimmen (Grynkiewicz et al., 1985). Es handelt sich hierbei um eine organische Synthese bzw. kovalente Verbindung des Calcium-Chelators BAPTA mit dem Fluorophor Stilben (Abb. 3.1 A). Die Fluoreszenzeigenschaften sind dergestalt, dass das Exzitationsmaximum von Fura-2 im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand bei 335 nm Wellenlänge und im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen

Zustand bei 363 nm liegt. Die Emissionsmaxima befinden sich mit 505 bzw. 512 nm dicht beieinander.

Es ist nun möglich, Fura-2 mit zwei verschiedenen Wellenlängen anzuregen (üblich sind 340 und 380 nm) und durch einen Vergleich der beiden Emissionsfluoreszenzintensitäten (zwischen 490 und 530 nm) den Anteil des  $\text{Ca}^{2+}$ -freien bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Indikators zu bestimmen. Bei steigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kommt es zu zwei gegenläufigen Bewegungen: im Fall der Anregung mit 340 nm steigt die Fluoreszenzintensität, bei Anregung mit 380 nm sinkt sie (Abb. 3.1 B). Bei Anregung mit 360 nm ist die Intensität unabhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (isosbestischer Punkt). Zur quantitativen Beurteilung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bildet man den Quotienten aus beiden Intensitäten ( $\text{Ratio}_{340/380}$ ). Dieser Wert ist innerhalb eines gewissen dynamischen Bereichs unabhängig von der Indikatorkonzentration, der Schichtdicke des Messfeldes sowie anderer Eigenschaften der Messgeräte. Es ist jedoch bei der Benutzung dieses Indikators zu berücksichtigen, dass



**Abb. 3.1: Struktur und Fluoreszenz-Exzitationsspektrum des  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikators Fura-2**

**(A)** Molekularstruktur des ratiometrischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikators Fura-2; Die BAPTA-Gruppe übernimmt die Chelatisierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kations, während die kovalent verknüpfte Stilben-Gruppe als Fluorophor dient.

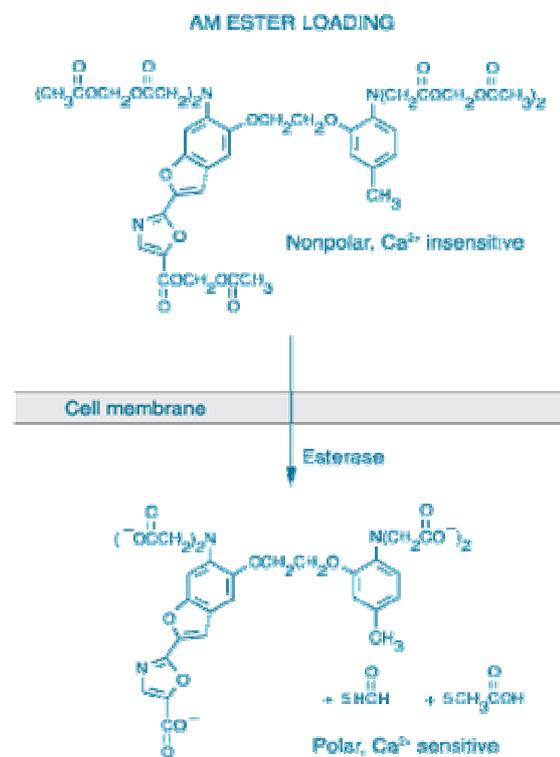
**(B)** Das Fluoreszenz-Exzitationsspektrum zeigt die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität bei 510 nm von der Anregungswellenlänge bei variierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen

(Abbildung verändert nach [Haugland, 2002, Molecular Probes])

energiereiche Wellenlängen aus dem nahen UV-Bereich verwendet werden. Wenn Zellen mit einem solchen UV-Licht bestrahlt werden, kann es zu UV-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen (Knight et al., 2003; Mendez und Penner, 1998; Schieven et al., 1993) sowie Zellschäden kommen (Grapengiesser, 1993). Desweiteren bleicht der Indikator abhängig von Zeit und Stärke der Messung aus.

### 3.2.4 Einschleusen des Farbstoffs Fura-2 AM in humane und Ratten T-Zellen sowie HeLa Karzinomzellen

Fura-2 ist aufgrund seiner Größe und Polarität nicht membrangängig und kann die Zellmembran daher nur in modifizierter Form überwinden. Fura-2 AM (Abb. 3.2) ist dagegen derart verändert, dass man damit Zellen passiv beladen kann. Seine fünf Carboxylgruppen sind mit Acetoxymethyl-estergruppen (= AM) geschützt, so dass sich seine Hydrophobizität stark erhöht und es nicht an  $\text{Ca}^{2+}$  binden kann. Es gelangt über Diffusion in die Zelle und wird dort durch unspezifische Esterasen gespalten. Da Fura-2 AM bei physiologischem pH aufgrund der jetzt entschützten Säuregruppen negativ geladen ist, kann es die Zelle nicht mehr verlassen. Diese fortwährende Gleichgewichtsverschiebung führt zu einer Anreicherung von aktivem Fura-2 in der Zelle (Tsien, 1981). Neben freiem Fura-2 konzentrieren sich aber auch Essigsäure und toxisches Formaldehyd in der Zelle (Grynkiewicz et al., 1985).



**Abb. 3.2: Prinzip der Einschleusung von Fura-2 AM in Zellen (Haugland, 2002, Molecular Probes)**

Zellen lassen sich passiv mit dem membranimpermeanten  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Fura-2 beladen, wenn dessen Carboxylgruppen mit Acetoxymethylgruppen verestert wurden.

Das folgende Beladungsprotokoll dieser Arbeit galt für Zellen aller Jurkat-Klone und primäre Ratten T-Lymphocyten.  $1 \cdot 10^7$  Zellen wurden pelletiert (1000 - 1600 rpm, 4 - 8 min, Variofuge 3.OR) und in 1 ml 37 °C warmem RPMI-Komplettmedium aufgenommen. Danach arbeitete man nur noch unter Lichtausschluss, um einem Ausbleichen des Indikators vorzubeugen. Es wurden 4 µl einer 1 mM Fura-2-AM-Lösung zugegeben (Endkonzentration 4 µM) und die Zellen für 15 min bei 37 °C inkubiert. Diese Zeit diente zur ausreichenden Diffusion des Fura-2-AM in die Zellen. Nach einer 1 : 5 Verdünnung mit 37 °C warmem RPMI-Komplettmedium inkubierte man die Zellen ein weiteres Mal für 15 min bei gleicher Temperatur, damit das Fura-2-AM vollständig deesterifiziert werden konnte. Zum Schluss wusch man die Zellen einmal mit sterilfiltriertem  $\text{Ca}^{2+}$ -Messpuffer (1000 – 1600 rpm, 4 – 8 min, Variofuge 3.OR) und nahm sie in 5 ml sterilfiltriertem  $\text{Ca}^{2+}$ -Messpuffer auf. Bis zur Messung blieben die Zellen bei Raumtemperatur weiter unter Lichtausschluss gelagert.

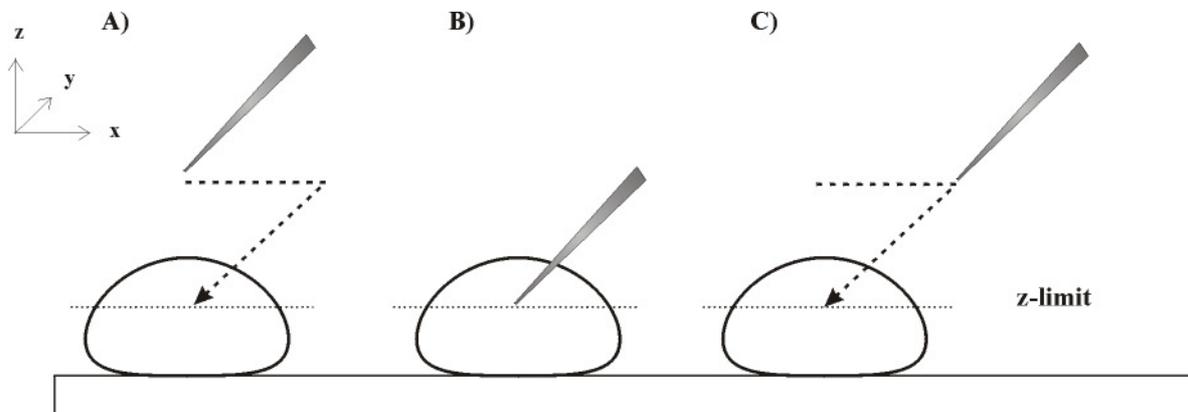
Die HeLa Karzinomzellen sind ein adhärenter Zelltyp (McNeil et al., 1984) und mussten deshalb auf anderem Wege als Suspensionszellen mit Fura 2 AM beladen werden. Bevor am jeweiligen Tag die  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen mit diesen Zellen beginnen konnten, ließ man zuvor die Zellen über Nacht in sog. *8 well chamber slides* in Gegenwart von 250 µl DMEM-Komplettmedium anwachsen. Am nächsten Tag ersetzte man in allen Kammern das alte Medium durch frisches. Jetzt konnten die einzelnen Kammern nacheinander mit Fura 2 AM beladen werden. Hierfür wurden die Zellen mit 1 µl einer 1 mM Fura 2 AM Lösung versetzt (Endkonzentration 4 µM) und unter Lichtausschluss für 30 Minuten bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$ -Gehalt im Inkubator belassen. Nach Ablauf dieser 30 Minuten war ausreichend Fura 2 AM in die Zellen diffundiert und im Cytosol deesterifiziert worden. Abschließend wusch man die Zellen zweimal mit sterilfiltriertem  $\text{Ca}^{2+}$ -Messpuffer und füllte die Kammer auf 100 µl mit demselben Puffer auf. Jede Zellkammer wurde nach der Beladung sofort vermessen und weitere Kammern parallel zu den  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen sukzessive beladen.

### 3.2.5 Prinzip der Mikroinjektion in Jurkat T-Lymphocyten

Jurkat T-Lymphocyten sind Suspensionszellen und müssen für eine erfolgreiche Mikroinjektion adhären auf einer Oberfläche fixiert werden. Diese Adhärenz sollte

jedoch in keinem Fall zu einer Zellaktivierung mit nachfolgenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen führen. Um dies zu verhindern, wurden Deckgläschen (21 \* 56 mm, Schichtdicke 0,13 bis 0,17 mm) nacheinander mit einer BSA-Lösung und einer Poly-L-Lysin-Lösung behandelt. Zuerst bestrich man ein Deckgläschen gleichmässig mit 5  $\mu\text{l}$  einer BSA-Lösung (5 mg/ml in bidest.  $\text{H}_2\text{O}$ ), so dass nach der anschließenden Trocknung die polare Glasoberfläche durch eine Proteinschicht maskiert war. Es folgten weitere 5  $\mu\text{l}$  einer Poly-L-Lysin-Lösung (0,1 mg/ml in bidest.  $\text{H}_2\text{O}$ ), um eine Anheftung der Zellen zu gewährleisten (Guse et al., 1997). Nach Trocknung der letzten Schicht wurde mit Hilfe eines Gummiringes (Durchmesser 1 cm) eine Messkammer hergestellt, indem man den Ring mit Silikonfett (Baysilone) auf der Glasoberfläche befestigte. Diese Kammer wurde dann nacheinander mit 60  $\mu\text{l}$  sterilfiltriertem  $\text{Ca}^{2+}$ -Messpuffer und 40  $\mu\text{l}$  Zellsuspension befüllt. Unter Lichtausschluss ließ man den Zellen sieben Minuten Zeit, sich durch Pseudopodien an die beschichtete Glasoberfläche zu heften.

Vor jeder Mikroinjektion wurden die nötigen Reagenzien in der gewünschten Konzentration in sterilfiltriertem Intrazellulärpuffer aufgenommen und mit Chelex behandelt. Dies stellte sicher, dass etwaige  $\text{Ca}^{2+}$ -Spuren aus der Lösung entfernt wurden.



**Abb. 3.3:Prinzip der semiautomatischen Mikroinjektion**

**(A)** Nach Einstellung des sog. *z-limits* (angedeutet durch die gepunktete Linie) am Mikromanipulator wird die Kapillare an eine Stelle genau über der Zellmitte bewegt. **(B)** Mit Auslösung der Injektion schnell die Kapillare ein Stück in Richtung der x-Achse, um dann im Winkel von 45 ° in die Zelle einzudringen (angedeutet durch die gestrichelte Linie). **(C)** Dort entlässt die Kapillare ihre Injektionslösung und verlässt die Zelle wieder auf dem gleichen Weg. Das garantiert ein minimales, mechanisches Verletzungsrisiko der Zelle (nach Langhorst, 2003, Diplomarbeit).

Zur Mikroinjektion dienten Injektionskapillaren vom Typ Femtotip I und II. Diese Kapillaren wurden mit sehr fein ausgezogenen Pipettenspitzen, sog. *microloadern*, mit 3,5 µl der jeweiligen Reagenzienlösung beladen. Mit diesen Kapillaren mikroinjizierte man dann Zellen im semiautomatischen Modus (Micromanipulator 5171 und Transjector 5246; s. 3.1.1, Abb. 3.3). Die Menge an eingebrachter Lösung belief sich in der Regel auf ca. 1 % des Zellvolumens (Guse et al., 1997).

Die Injektionsparameter hierfür unterschieden sich bei den verschiedenen Jurkat-Klonen. Für JMP waren die Parameter: Injektionsdruck 60 hPa, Kompensationsdruck 30 hPa, Injektionszeit 0,5 s, Eintrittsgeschwindigkeit der Kapillarenspitze 700 µm/s und Injektionswinkel 45°. Für die kleineren Tet On-Subklone E2, 10 und 25 senkte man die Parameter: Injektionsdruck 40 hPa, Kompensationsdruck 25 hPa, Injektionszeit 0,3 s, Eintrittsgeschwindigkeit der Kapillarenspitze 700 µm/s sowie Injektionswinkel 45°.

### 3.2.6 Einsatz membran-permeabler NAADP-Antagonisten

Die Arbeitsgruppe um Dr. Bo Zhang und Prof. Barry V.L. Potter (Bath, Großbritannien) synthetisierte eine Reihe potentieller NAADP-Antagonisten, die sich in ihrer Struktur stark an Nikotinsäure anlehnen. Zwei dieser NAADP-Antagonisten, BZ52 und BZ194, stellte man uns im Rahmen einer laufenden Kooperation freundlicherweise zur Verfügung (Abb. 4.9; Ergebnisse).

Der potentielle Antagonist BZ52 war nicht membranpermeabel und konnte nur mit Hilfe der Mikroinjektionsmethode an Jurkat T-Zellen getestet werden (s. Abschnitt 4.2.1, Ergebnisse). BZ194 hingegen war sowohl in Mikroinjektionsexperimenten an Jurkat T-Zellen als auch nach extrazellulärer Anwendung an primären Ratten T-Zellen wirksam (s. Abschnitt 4.2.1 und 4.2.2, Ergebnisse).

Um BZ194 an primären Ratten T-Zellen zu testen, wurden  $0,5 - 1 \cdot 10^7$  Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen BZ194 in TCGF-Medium vorinkubiert. Die Zeiträume für die Vorinkubation variierten und lagen je nach Experiment zwischen zwei und 24 Stunden. Außerdem inkubierte man die Zellen anfangs immer für zwei Stunden in TCGF-Medium ohne Serum. Das Serum wurde erst im Anschluß an diese

zwei Stunden hinzugefügt. So sollte garantiert werden, dass eine maximale Menge BZ194 in die Zellen diffundierte und nicht durch Serumproteine mit Nukleotidbindungsstellen abgefangen wurde. Nach der Inkubation konnten die Zellen für die folgenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen mit Fura 2 beladen werden (s. 3.2.4).

### 3.2.7 Fluorimetrie

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen an primären, MBP-spezifischen Ratten *memory* T-Zellen wurden mit Hilfe eines Fluorimeters (F-2000, Hitachi, Japan) durchgeführt. Hierfür belud man die Zellen zuerst mit Fura 2 AM (s. 3.2.4). Die ratiometrische Bestimmung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgte mit einer Zellsuspension in einer Quarzküvette bei Raumtemperatur. Die Anregungswellenlängen waren, wie für Fura 2 üblich, auf 340 und 380 nm eingestellt und die Fluoreszenzintensitäten wurden bei einer Emissionswellenlänge von 495 nm erfasst. Jede Messung kalibrierte man zum Schluss durch die Zugabe von Triton X-100 (10 % v/v Stocklösung; 1 % v/v Endkonzentration), um einen maximalen Ratiowert zu erhalten, und die Zugabe von Tris/EGTA (75 mM und 10 mM Endkonzentration), um einen minimalen Ratiowert zu erhalten.

### 3.2.8 Digitales $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging: Einzelzellmessungen intrazellulärer $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen

Die Einzelzellmessungen wurden an einem computergestützten, digitalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Imagingsystem durchgeführt. Lichtleiter übertrugen monochromatisches Licht (wahlweise 340 und 380 nm; Polychrom IV, Till Photonics) aus einer Xenon-Bogenlampe durch einen Kondensator hindurch in den Strahlengang eines inversen Fluoreszenzmikroskops (Leica DM IRE2). Ein dichroischer Spiegel (400 DCLP, AF Analysetechnik) leitete den Strahl weiter über ein 100x-Objektiv (Leica HCX Apo 100x, n.A. 1,3) auf die Zellprobe. Das Fluoreszenzlicht, das die Probe verließ, wurde durch das Objektiv und einen 400 nm *long-pass* dichroischen Filter hindurch über den seitlichen Ausgang (*Port*) des Mikroskops zur Kamera geleitet. Ein Emissionsfilter selektierte nach dem dichroischen Fluoreszenzlicht zwischen 490 und 530 nm Wellenlänge und lenkte es auf eine Digitalkamera mit CCD-Chip (Hamamatsu C4742-95-12ER). Die Kamera war auf den 8-bit Modus (256

Graustufen) und ein *binning* von 2 (4 → 1 Pixelkonvertierung und Aufsummierung der gemessenen Intensitäten) eingestellt. Dies verringerte zwar die räumliche Auflösung, konnte jedoch die Expositionszeiten der Proben gegenüber dem UV-Licht zwecks Schonung reduzieren. Die räumliche Auflösung betrug letztlich 640 \* 512 Pixel auf einem Kamerafeld von 82,7 \* 66 µm bei 100x-Vergrößerung (Objektiv 100x).

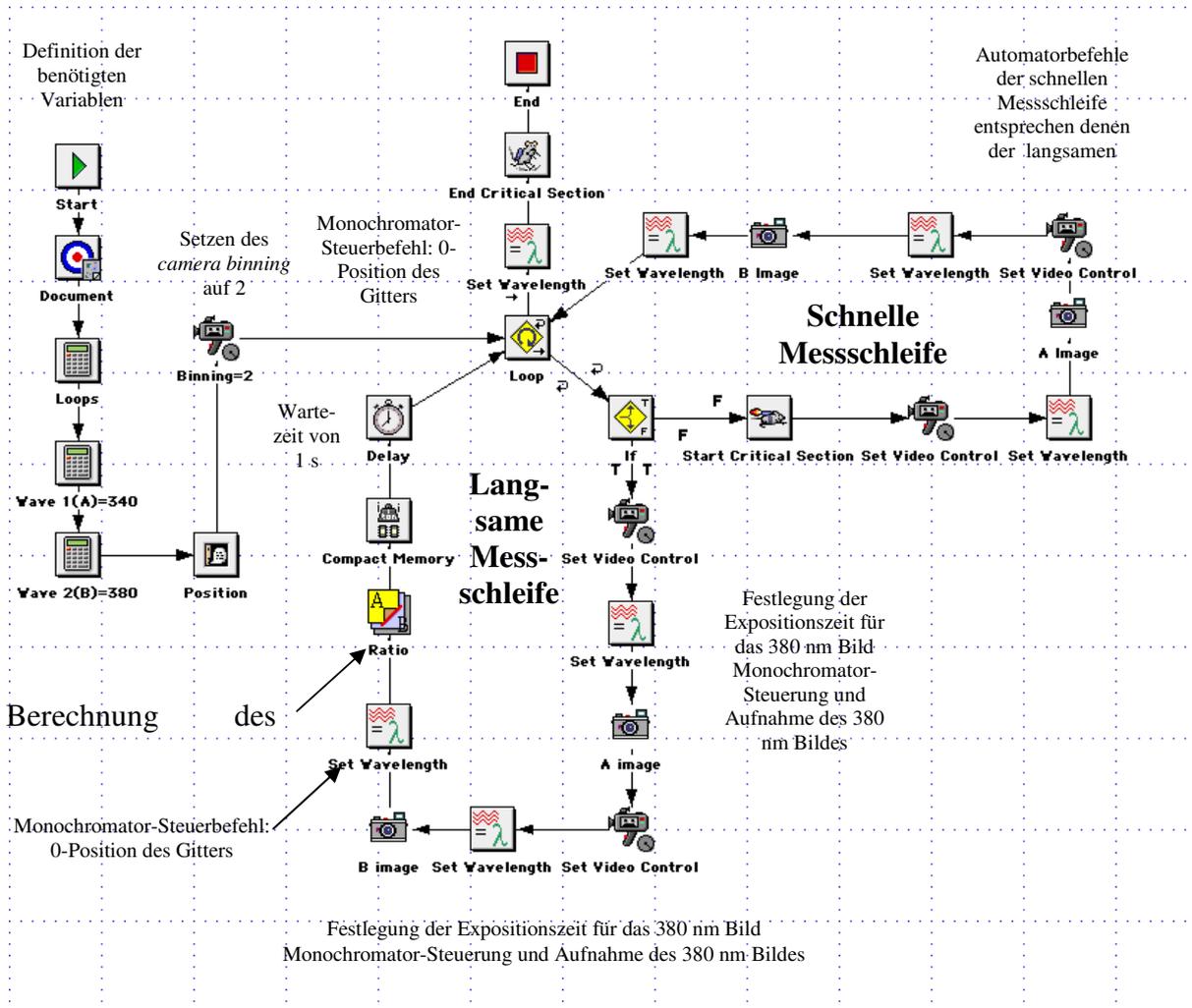


Abb. 3.4: Openlab-Automator zur Steuerung der  $Ca^{2+}$ -Imaging Experimente

Die Messungen wurden computergestützt durch einen Apple G4-Computer durchgeführt; die Software Openlab (Versionen 3.0.9 und 4.0.2) von Improvisation kontrollierte Monochromator, Mikroskop und Kamera. Zur Software gehörten sog. programmierbare Automatoren, mit denen alle nötigen Variablen definiert und die jeweils zu durchlaufenden Aufgaben festgelegt werden konnten. Für die Messungen an allen Jurkat-Klonen sowie den HeLa Karzinomzellen wurden zwei Automatoren verwendet; der erste fand in allen Experimenten der Abschnitte 4.1 und 4.4 Verwendung und verfügte sowohl über eine langsame als auch eine schnelle

Messschleife, die nach Definition aller nötigen Variablen hintereinander durchlaufen wurden (Abb. 3.4). Der zweite Automator wurde für die Experimente mit Jurkat T-Zellen in den Abschnitten 4.2 und 4.3 verwendet, verfügte aber über keine schnelle Messschleife. In jeder Messschleife wurde zunächst ein Bild bei 340 nm und darauf folgend ein Bild bei 380 nm Wellenlänge aufgenommen. Die entsprechenden Expositionszeiten betragen hierfür 12 und 4 msec. Für die Zeit zwischen der Aufnahme beider Bilder und dem Beginn eines neuen Messzyklus wurde das Monochromatorgitter in eine Nullposition gebracht. Hierdurch konnte das Anregungslicht blockiert werden, um die Probe zu schonen. Die Belichtungszeit bei 340 nm wurde aufgrund der geringeren Durchlässigkeit der Optik für UV-Licht kürzerer Wellenlängen größer gewählt.

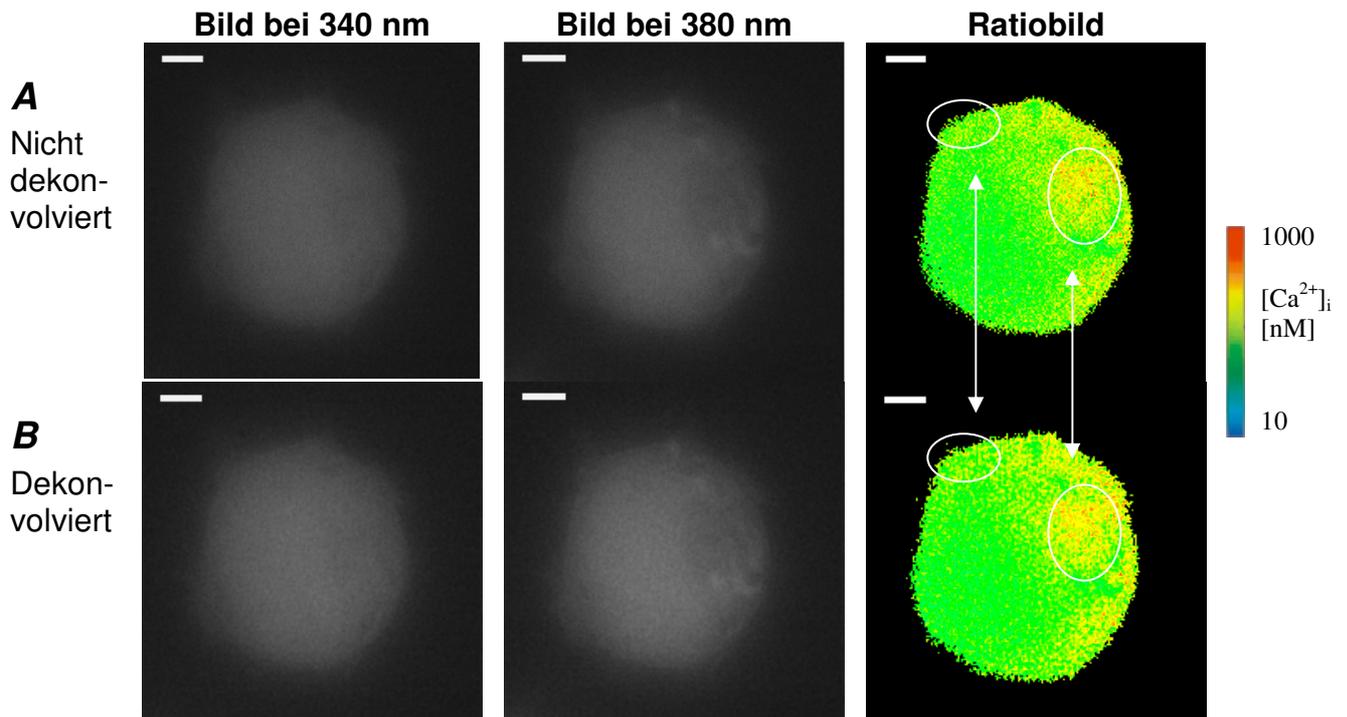
In der langsamen Messschleife wurden nach Akquisition der Einzelbilder Ratiobilder berechnet, um festzustellen, ob sich die jeweilige Einzelzelle in einem Ruhezustand befindet und somit für eine Mikroinjektion bzw. extrazelluläre Substanzzugabe in Frage kam. Sobald die langsame Messschleife durchlaufen war, startete die schnelle; nach einer gestoppten Zeit von unterschiedlicher Dauer wurde die Mikroinjektion ausgelöst bzw. die Substanz außen zugegeben. Die schnelle Messschleife berechnete keine Ratiobilder. Während der Laufzeit (*critical section*) stand die gesamte Rechnerkapazität zur Datenakquisition zur Verfügung. Ein Zyklus der schnellen Schleife dauerte ca. 160 bis 350 Millisekunden. Dadurch konnte eine zeitliche Auflösung von ca. drei bis sieben Bildern pro Sekunde erreicht werden. Um nach Ende jeder Messung mit Mikroinjektion noch einmal das Gelingen der Mikroinjektion zu überprüfen, wurde im Durchlicht die Zelle ein zweites Mal mikroinjiziert und die erforderliche Höhe des *z-limit* festgestellt.

### 3.2.9 Datenauswertung

Mit dem Abschluss einer Messung mussten die Rohdaten weiter bearbeitet werden. Zunächst dekonvolvierte man einen Datensatz von Bildern nach dem sog. *no neighbour*-Algorithmus. Da für die Bildaufnahme kein konfokales Lasermikroskop zur Verfügung stand, nutzte man diesen Algorithmus um *in silico* die Rohbilder in konfokale Bilder umzuwandeln. Nach der *point spread*-Funktion wurde für jedes Bild

das Streulicht, welches aus den Ebenen ober- und unterhalb der Fokusebene stammte, bestimmt und dann mathematisch entfernt. Eine repräsentative Gegenüberstellung nicht dekonvolvierter bzw. dekonvolvierter Rohdaten mit daraus errechneten Ratiobildern verdeutlicht das Prinzip (Abb. 3.5).

Mit Abschluss der Dekonvolution standen wiederum Automatoren zur Verfügung, die aus den dekonvolvierten Rohdaten Ratiobilder berechneten. Da während der Messungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Fura-2 durchgängig weiter ausbleich, arbeitete der verwendete Automator (Abb. 3.5) mit variablen *thresholds* (Schwellenwerten) für die gemessenen Lichtintensitäten (Bruzzone et al., 2003; Kunerth et al., 2004). Der *threshold* ist ein Mass für die Lichtintensität des Hintergrundrauschens und gibt an, ab welcher Intensität ein Pixel von dem Programm als schwarz gewertet werden soll.



**Abb. 3.5: Dekonvolution von Rohbildern nach der *point spread*-Funktion**

Die dargestellten Bilder stellen Aufnahmen einer Zelle des Jurkat-Klons JMP dar, die ca. 200 msec zuvor mit 100 nM NAADP mikroinjiziert worden ist. Das sich aufbauende, globale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal ist deutlich sichtbar. Die Ratiobilder entstanden aus je einem Bild bei 340 nm sowie einem Bild bei 380 nm. Der Effekt einer Dekonvolution wird bei einem Vergleich beider Ratiobilder deutlich (**A**, nicht dekonvolviert; **B**, dekonvolviert). Die lokal auftretenden, subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale gewinnen an Kontrast (durch Kreise markiert). Die Parameter für die Dekonvolution waren: *removal* = 0,7, *gain* = 4,0. Die Balken entsprechen einer Länge von 3  $\mu\text{m}$ .

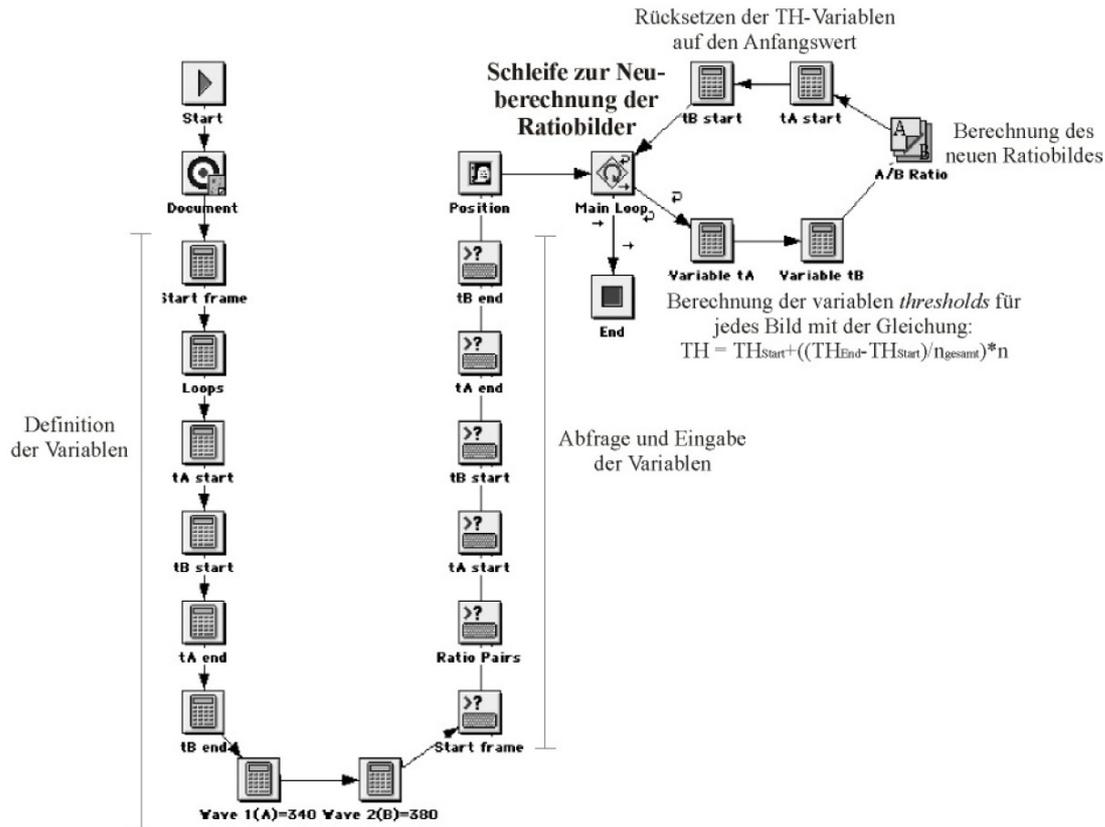
Indem man den *threshold* nun linear mit der Zeit und dem Bilderverlauf der Rohdaten ansteigen lässt, vermeidet man bei zeitlich später liegenden Ratiobildern, dass Pixel im Randbereich der Zelle im Ratio-Bild als schwarz gesetzt werden und damit

verschwinden. Anfangs- und Endwert der *thresholds* wählte man in dieser Arbeit deshalb so, dass die entsprechenden Ratiobilder nahezu deckungsgleich mit dem Durchlichtbild der Zelle waren.

Alle erstellten Ratiobilder wurden zusätzlich median gefiltert (Einstellung: 3x3). Mit Hilfe dieses nichtlinearen Filters aus der Klasse der Rangordnungsfiler wurden häufig auftretende Kontrastsprünge in der Pixelverteilung neu erstellter Ratiobilder ausgeglichen. Das Filterprogramm sortierte zuerst alle Pixel in der Nähe eines zentralen Pixels der Größe nach, wobei der zentrale Pixel mitberücksichtigt wurde. Der Mittelwert dieser Liste wurde durch das Filterprogramm ausgegeben und ersetzte den zentralen Pixel.

Außerdem wurden Ratiobereiche festgelegt, innerhalb derer die Ratiobilder bestimmte Ratiowerte in definierten Falschfarben (Regenbogenskala) darstellten. Diese waren für die Abbildungen in Abschnitt 4.1: 0,3 bis 1,5 für globale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale (abhängig von dem Jurkatklon: ca. 10 bis 1500 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) und 0,4 bis 0,9 für subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale der „Schrittmacher“-Phase (abhängig von dem Jurkatklon: ca. 10 bis 500 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Für die Abbildungen in Abschnitt 4.3 reichte der Ratiobereich von 0,6 bis 0,9 (ca. 0 bis 300 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ).

Zur Quantifizierung der Ratiobilder wurden sog. ROIs (*regions of interest*) festgelegt, innerhalb derer die Ratiowerte der Pixel gemittelt und gegen die Zeit aufgetragen wurden. Je nach eingestelltem Ratiobereich wurden die ROIs unterschiedlich gesetzt. Zur Quantifizierung globaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale umfasste eine einzelne ROI die gesamte Zelle; für die subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beinhalteten drei ROIs (je 1 x 1 bzw. 2 x 2  $\mu\text{m}$ ) Bereiche der Plasmamembran, des Cytosols sowie des Zellkerns.



**Abbildung 3.6: Openlab-Automator zur Neuberechnung der Ratio-Bilder mit variablen thresholds.** Während der Messung bleicht der Fluoreszenzfarbstoff langsam aus. Durch variable thresholds kann das Absinken der Fluoreszenzintensität zum Teil ausgeglichen werden, dadurch wird ein Informationsverlust, gerade in den Randbereichen der Zelle vermieden.

Um nun die quantitativen, aber dimensionslosen Ratiowerte in absolute  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen umrechnen zu können, verwendete man folgende Formel (Grynkiewicz et al., 1985) :

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \left( \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right) * \beta$$

$K_d$ : Dissoziationskonstante von Fura-2;  $R$ : gemessenes Ratio;  $R_{min}$ : Ratio in Abwesenheit von  $Ca^{2+}$ ;  $R_{max}$ : Ratio bei  $Ca^{2+}$ -Sättigung;  $\beta$ : Quotient der Fluoreszenzintensitäten bei 380 nm Wellenlänge in Abwesenheit von  $Ca^{2+}$  und unter  $Ca^{2+}$ -Sättigung

Neben den Ratiowerten der Messung benötigte man die Dissoziationskonstante des  $Ca^{2+}$ -Indikators Fura-2 (224 nM, [Haugland, 2002] sowie die minimalen und maximalen Ratiowerte. Die beiden letztgenannten ließen sich mit einer klonspezifischen Kalibrierung der ratiometrischen  $Ca^{2+}$ -Messungen bestimmen.

Hierfür inkubierte man Fura-2 beladene Zellen eines Jurkat-Klons mit Ionomycin (Endkonzentration 2  $\mu\text{M}$ ; Behandlung und Messung der Zellen grundsätzlich wie unter 3.2.4 und 3.2.6). Dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor sättigte die Zellen und damit auch den Indikator mit  $\text{Ca}^{2+}$  ab, so dass der maximale Ratiowert bestimmt werden konnte. Der minimale Ratiowert ergab sich mit Zugabe eines Überschusses Tris/EGTA (60 mM/8 mM) und der damit verbundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatisierung. Es wurden jeweils mehrere, unabhängige klonspezifische Bestimmungen der minimalen und maximalen Ratiowerte durchgeführt. Daraus ergaben sich folgende klonspezifische Formeln:

$$\text{JMP:} \quad [\text{Ca}^{2+}]_i = 224 \text{ nM} * \left( \frac{R - 0,492}{1,55 - R} \right) * 4 \quad (\text{Abschnitt 4.1})$$

und

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = 224 \text{ nM} * \left( \frac{R - 1,065}{4,114 - R} \right) * 4 \quad (\text{Abschnitt 4.2.1 und 4.3})$$

$$\text{E2:} \quad [\text{Ca}^{2+}]_i = 224 \text{ nM} * \left( \frac{R - 0,4}{1,55 - R} \right) * 1,7$$

$$10: \quad [\text{Ca}^{2+}]_i = 224 \text{ nM} * \left( \frac{R - 0,433}{1,41 - R} \right) * 2,2$$

$$25: \quad [\text{Ca}^{2+}]_i = 224 \text{ nM} * \left( \frac{R - 0,433}{1,41 - R} \right) * 2,2$$

$$\text{HeLa Wildtyp} \quad [\text{Ca}^{2+}]_i = 224 \text{ nM} * \left( \frac{R - 0,635}{1,492 - R} \right) * 1,97$$

Für den Jurkat-Subklon JMP wurden insgesamt zwei unterschiedliche Formeln verwendet, um die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration berechnen zu können. Die Ursache hierfür lag in einem zwischenzeitlich erfolgten Umbau des Geräteaufbaus am Mikroskop. Es wurde ein optisches, sog. *Dual-View-Modul* (Optical Insights, Tucson (Arizona), USA) mit dem seitlichen Ausgang des Mikroskops verbunden und der CCD-Kamera vorgeschaltet. Obwohl das Modul, das über einen Strahlenteiler für Messungen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluorophor Indo 1 verfügte, vor jeder Messung ausgekoppelt wurde, machte die Verlängerung des Lichtwegs eine erneuerte Kalibrierung der Jurkat T-Zellen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluorophor Fura 2 erforderlich. Die vorherige Kalibrierung ließ sich nicht mehr auf die neuen Ratiowerte anwenden und musste angepasst werden.

Es wurde vorab schon beschrieben (s. 3.2.7), dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen mit primären Ratten T-Lymphocyten in Abschnitt 4.2.2 an einem Fluorimeter (F-2000, Hitachi, Japan) durchgeführt wurden. Steuerung und Auswertung kontrollierte man rechnergestützt mit Hilfe des Programms F-2000 (Hitachi, Japan). Sobald die jeweilige  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung abschließend kalibriert werden konnte (s. 3.2.7), berechnete die Software nach derselben Formel aus (Grynkiewicz et al., 1985) (s.o.) die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

## 4 Ergebnisse

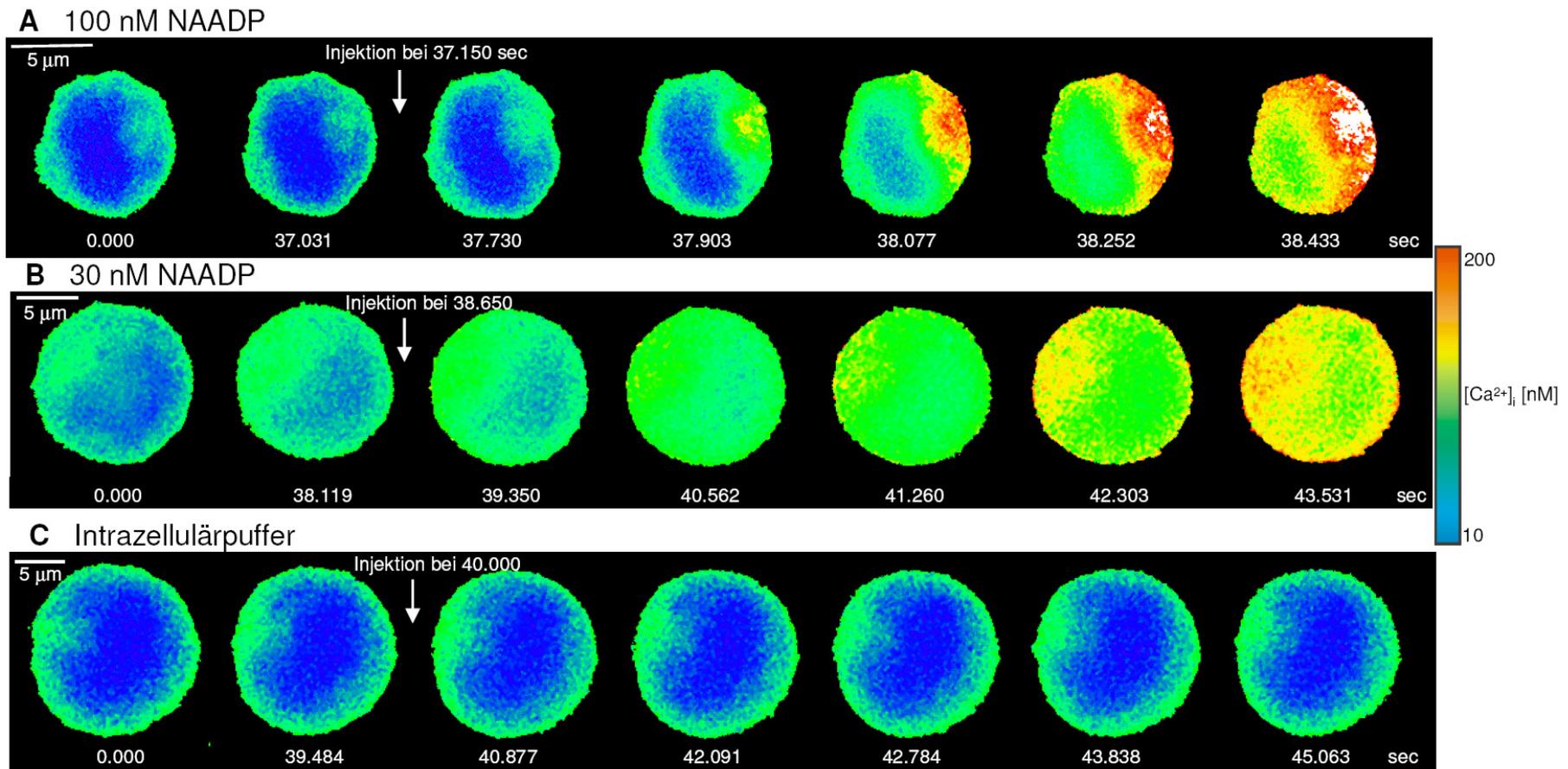
Im ersten Abschnitt (4.1) des folgenden Ergebnisteils werden die Experimente aufgeführt und erläutert, in denen die Rolle und Funktion subzellulärer und globaler NAADP-vermittelter  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in humanen T-Lymphocyten untersucht wurde. Im zweiten Abschnitt (4.2) wird der Einfluss zweier NAADP-Antagonisten, BZ52 und BZ194, auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsysteme in humanen T-Lymphocyten und Ratten *Memory* T-Lymphocyten erklärt.

Anschließend stellt der dritte Abschnitt (4.3) die Wirkungsweise eines neuartigen, synthetischen cADPR-Analogons als effektiven Agonisten in den  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystemen humaner T-Lymphocyten dar. Im letzten Abschnitt (4.4) geht es schließlich um die Untersuchung der Rolle zweier natürlich vorkommender cADPR-Metabolite, P24 und Ap2A, in den  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystemen humaner HeLa Karzinomzellen.

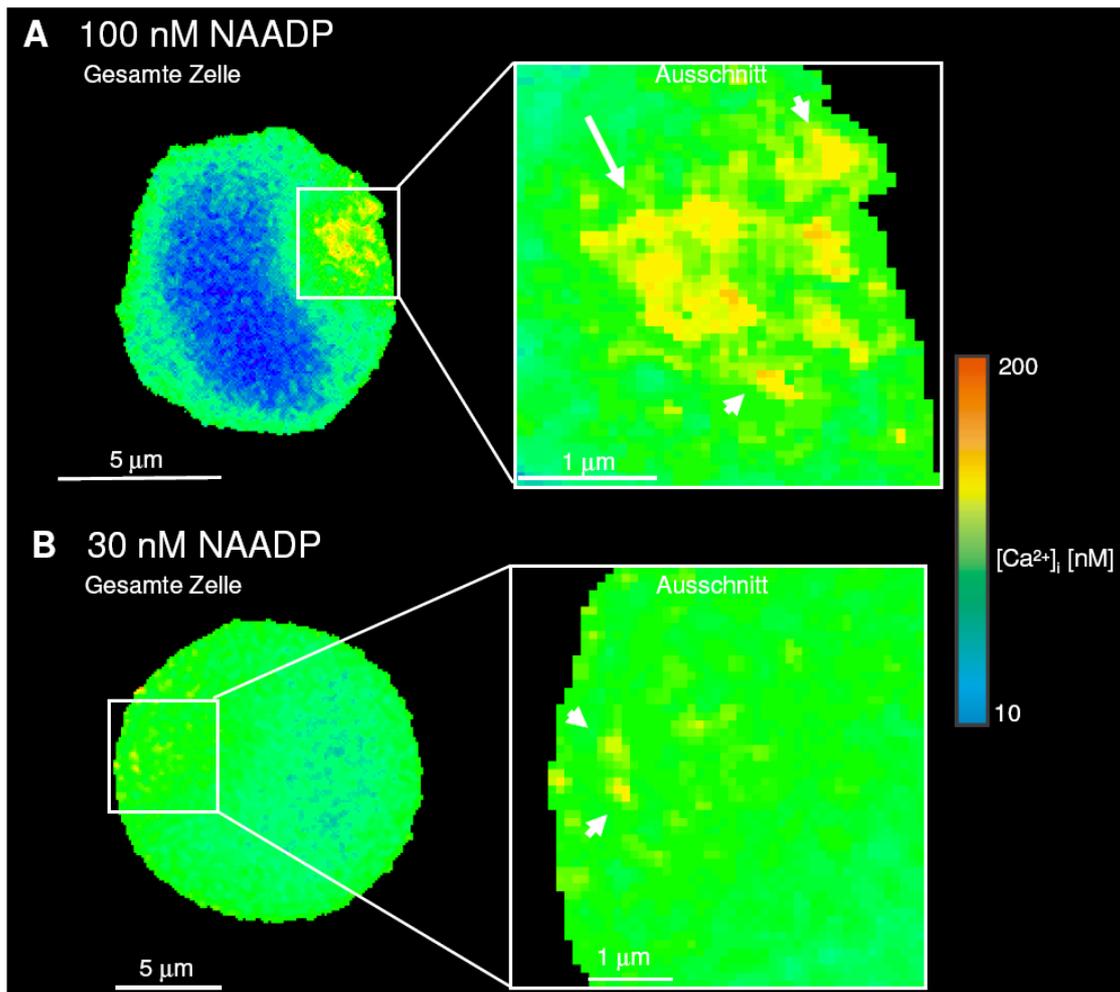
### 4.1 Subzelluläre und globale NAADP-vermittelte $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in humanen T-Lymphocyten

Nach der Mikroinjektion von 100 nM NAADP in Jurkat T-Lymphocyten blieben die subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale für einen sehr kurzen, anfänglichen Zeitraum von einigen hundert Millisekunden unverändert (Abb. 4.1 A; Zeitpunkt 37,730 s) und stellten sich wieder auf das Ruhenniveau vor der Mikroinjektion ein. Erst nach weiteren ca. 200 Millisekunden wurden charakteristische, NAADP-induzierte, subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beobachtet (Abb. 4.1 A; Zeitpunkt 37,903 s). Diese anfänglichen Signale ließen sich typischerweise als erstes nahe dem Punkt der Mikroinjektion entdecken und verschmolzen schnell zu einem größeren Signal, das hauptsächlich in einer Zone nahe der Plasmamembran verblieb (Abb. 4.1 A, Zeitpunkt 38,077 s).

Bevor das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal das Zentrum der Zelle erreichte, breitete es sich in einer ringähnlichen Struktur aus (Abb. 4.1 A; Zeitpunkte 38,252 und 38,433 s).



**Abb. 4.1: Subzelluläre Ca<sup>2+</sup> Signale hervorgerufen nach von NAADP in Jurkat T-Lymphocyten.** Jurkat T-Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen und parallel zu Mikroinjektionen mittels Ca<sup>2+</sup>-Imaging untersucht. **A**, Mikroinjektion von 100 nM NAADP. **B**, Mikroinjektion von 30 nM NAADP. **C**, Mikroinjektion von Intrazellulärpuffer. Die Bilddaten sind repräsentativ für 8–14 Zellen, die für jede der genannten Konditionen einzeln untersucht wurden. [Abbildung aus (Dammermann und Guse, 2005), verändert]



**Abb. 4.2: Charakterisierung subzellulärer Ca<sup>2+</sup>-Signale nach Mikroinjektion von NAADP in Jurkat T-Lymphocyten.** A und B stellen Bildvergrößerungen aus den Abb. 4.1, A und B dar und verdeutlichen die räumlichen und zeitlichen Eigenschaften der NAADP-abhängigen, subzellulären Ca<sup>2+</sup>-Signale. [Abbildung aus (Dammermann und Guse, 2005), verändert]

Es zeigte sich, dass 100 nM NAADP in der Mikroinjektionskapillare sehr schnell eine globale Ca<sup>2+</sup>-Antwort auslösten und nur ein sehr kurzer Zeitraum blieb, um subzelluläre Ca<sup>2+</sup>-Signale zu messen und zu analysieren (im Durchschnitt weniger als 1,5 Sekunden). Damit diese sogenannte Schrittmacher-Phase verlängert werden konnte, wurde die Pipettenkonzentration für NAADP auf 30 nM gesenkt. Diese Konzentration sollte noch ausreichen, um globale Ca<sup>2+</sup>-Signale in T-Lymphocyten zu induzieren (Berg et al., 2000).

Unter diesen Bedingungen war es dann möglich, subzelluläre Ca<sup>2+</sup>-Signale mit sehr niedriger Amplitude und kleinem Durchmesser zu beobachten (Abb. 4.1 B; Zeitpunkte 42,303 und 43,531 Sekunden). Im Vergleich zu den Mikroinjektionen mit

100 nM NAADP traten die ersten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalstrukturen mit einigen Sekunden Verzögerung auf, bevor das globale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in Erscheinung trat.

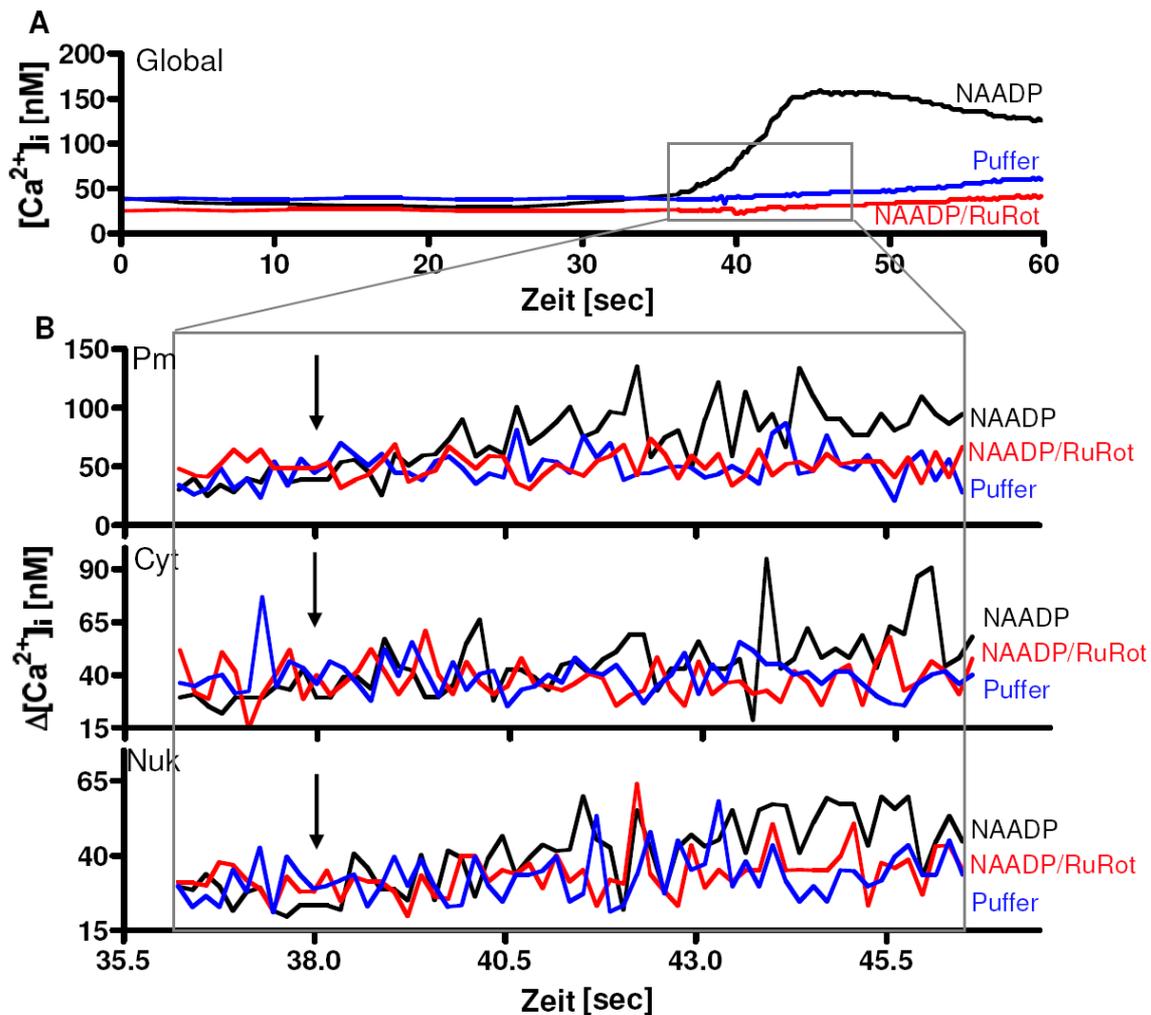
Um auszuschließen, dass es sich bei allen bis dahin gemachten Beobachtungen um Artefakte handelte, wurde Intrazellulärpuffer ohne NAADP in Jurkat T-Lymphocyten mikroinjiziert. Dabei stellte sich heraus, dass der Puffer alleine nach Mikroinjektion zu keinen Veränderungen in den basalen, subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen führte (Abb. 4.1 C).

Die Ergebnisse der Mikroinjektionen von 100 bzw. 30 nM NAADP und Intrazellulärpuffer als Negativkontrollen ließen den Schluss zu, dass (i) die subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale durch NAADP ausgelöst wurden und (ii) die zeitliche Auflösung der Bildaufnahme ausreichend hoch war, um die frühesten NAADP-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale zu erfassen und zu analysieren.

Eine vergrößerte Ansicht der Bilder, die NAADP-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale zeigten, ließ erkennen, dass im Falle der Mikroinjektion mit 100 nM NAADP sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale mehr in einem Teil der Zelle konzentrierten und dabei fast zu einem größeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal verschmolzen (Abb. 4.2 A; Pfeil). Der Durchmesser des zusammengeführten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals lag bei ca. zwei Mikrometern. Dennoch konnten in enger Nachbarschaft zum großen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal noch einzelne, kleinere  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale entdeckt werden. Sie hatten den für sogenannte  $\text{Ca}^{2+}$ -Quarks typischen Durchmesser von ca. 0,5 Mikrometern (Abb. 4.2 A; Pfeilspitzen). Im Vergleich dazu führten die Mikroinjektionen mit 30 nM NAADP hauptsächlich zur Entstehung der kleineren  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale (Abb. 4.2 B; Pfeilspitzen).

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass globale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale, die durch NAADP-Mikroinjektionen in humanen T-Lymphocyten ausgelöst wurden, in Gänze abhängig waren von der vollständigen Expression und Funktionsfähigkeit des Ryanodin Rezeptors (Langhorst et al., 2004). Dennoch ließen diese Daten die Möglichkeit bestehen, dass NAADP in einer sehr frühen Phase einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal aktiviert, der sich vom Ryanodin Rezeptor unterscheidet. An der Stelle könnte dann ein lokales  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal entstehen, dass durch den Mechanismus des CICR benachbarte Ryanodin Rezeptoren aktivieren würde. Dieses Modell wurde ursprünglich als *2-pool*

*model* von Cancela et al. aufgestellt (Cancela et al., 1999). Gemäß diesem Modell aktivieren  $IP_3$  und cADPR ihre spezifischen Rezeptoren,  $IP_3$ - und Ryanodin Rezeptoren, auf dem ER, während NAADP auf einen bis heute noch nicht näher molekular charakterisierten NAADP-Rezeptor wirkt, der sich in der Membran Lysosomen-ähnlicher, saurer Kompartimente befindet. Dort induziert NAADP lokale  $Ca^{2+}$ -Ströme, die über CICR benachbarte  $IP_3$ - und Ryanodin Rezeptoren aktivieren.



**Abb. 4.3: Inhibition NAADP-abhängiger, subzellulärer  $Ca^{2+}$ -Signale durch Koinjektion von Ruthenium Rot.** Jurkat T-Zellen (Subklon JMP) wurden mit Fura-2 AM beladen und nach Mikroinjektion mittels  $Ca^{2+}$ -Imaging untersucht. **A** und **B**, Auswertung globaler  $[Ca^{2+}]_i$  (A) und lokaler  $[Ca^{2+}]_i$  (B) in Folge der Mikroinjektion von NAADP (30 nM), NAADP (30 nM) plus Ruthenium Rot (*RuRot*; 10  $\mu$ M) oder Intrazellulärpuffer. Lokale  $Ca^{2+}$ -Antworten wurden im Cytosol nahe der Plasmamembran (Pm), im Cytosol (Cyt) oder im Nukleus (Nuk) gemessen und als Differenz der maximalen Signalamplitude zur Amplitude der näheren Umgebung dargestellt. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Mikroinjektion. Die  $Ca^{2+}$ -Signalverläufe sind repräsentativ für 7–14 Zellen, die für jede der genannten Konditionen einzeln untersucht wurden. [Abbildung aus (Dammermann und Guse, 2005), verändert]

Um zu entscheiden, ob in humanen T-Lymphocyten das *2-pool model* vorliegt oder ein Modell, in dem der Ryanodin Rezeptor direkt oder über ein zusätzliches Bindeprotein mit NAADP interagiert, wurden subzelluläre, NAADP-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale (s. Abb. 4.1 und 4.2) in einer Reihe weitergehender Experimente analysiert. Hierfür wurden die folgenden Substanzen in die T-Zellen mikroinjiziert und währenddessen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale gemessen: (i) NAADP und die zwei Antagonisten des Ryanodin Rezeptors, Ruthenium Rot und Ryanodin; (ii) NAADP und der  $\text{IP}_3$  Antagonist Heparin; oder (iii) NAADP nach Vorinkubation der T-Zellen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx Blocker SKF 96365.

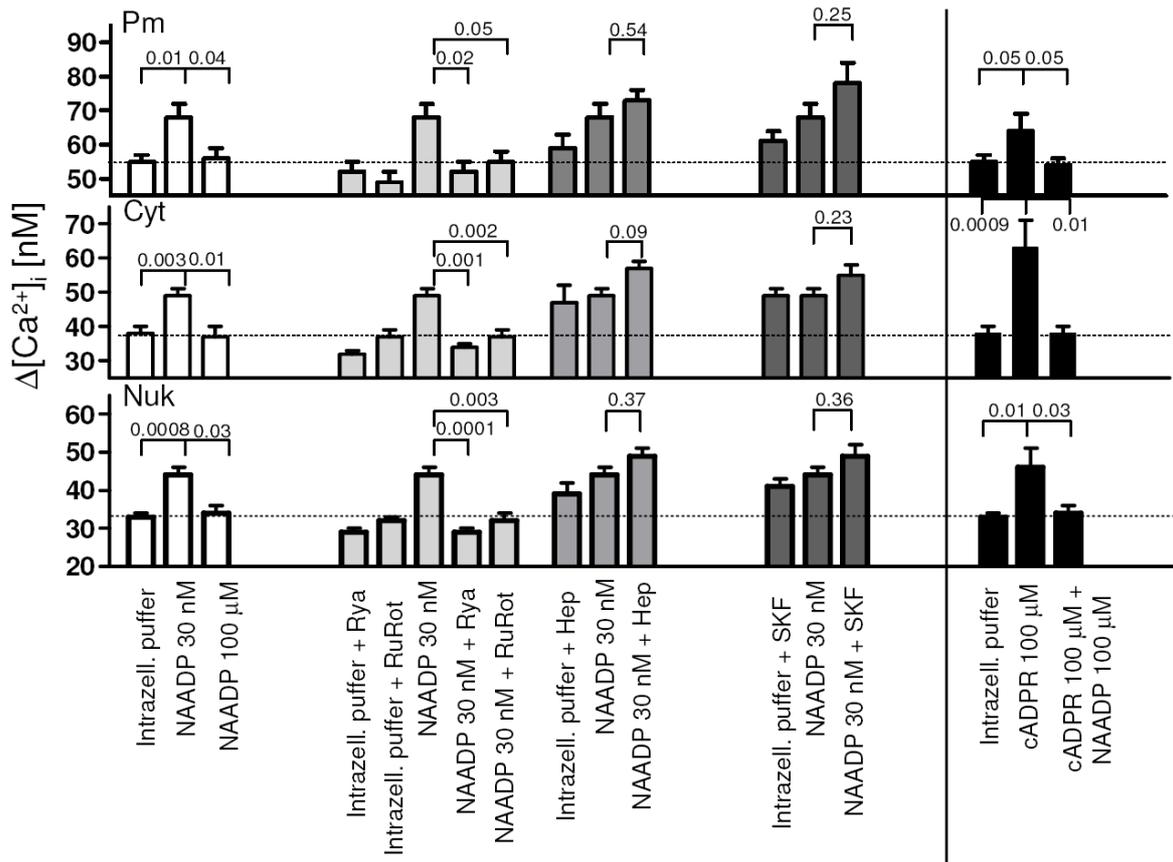
Wie vor kurzem gezeigt werden konnte, wurden globale, NAADP-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale vollständig unterdrückt, wenn Ruthenium Rot koinjiziert wurde (Langhorst et al., 2004). Eine Analyse kleiner subzellulärer Bereiche, sogenannter *regions of interest* (ROI), in Nähe zur Plasmamembran (Pm), im Cytosol (Cyt) und im Nukleus (Nuk) wies ein klares, oszillatorisches Verhalten der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf (Abb. 4.3 B). Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, dass die Amplitude der lokalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Anwesenheit von NAADP im Laufe der Zeit größer wurde (4.3 B; schwarze Signalverläufe). Im Gegensatz dazu unterdrückte Ruthenium Rot diesen Effekt, wenn es zusammen mit NAADP in T-Zellen koinjiziert wurde. Die Amplituden der subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale blieben so niedrig wie die nach der Mikroinjektion von Intrazellulärpuffer (Abb. 4.3 B; rote und blaue Signalverläufe).

Die quantitative Auswertung eines ganzen Datensatzes aus weiteren Vorinkubations- und Mikroinjektionsexperimenten lieferte folgende weitere Erkenntnisse.

Zum einen unterdrückte die Koinjektion der zwei Ryanodin Rezeptor Antagonisten, Ruthenium Rot und Ryanodin (eine hohe inhibitorische Konzentration), zusammen mit NAADP vollständig die Entstehung subzellulärer, NAADP-induzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale (Abb. 4.4). Das geschah unabhängig vom Ort der Entstehung (Plasmamembran, Cytosol oder Nukleus).

Zum anderen hatten weder die Koinjektion des  $\text{IP}_3$ -Antagonisten Heparin noch die Vorinkubation mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx Blocker SKF 96365 einen hemmenden Einfluss auf die Entstehung subzellulärer, NAADP-abhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale (Abb. 4.4). Vielmehr wurde ein schwacher, stimulatorischer Effekt durch die Mikroinjektion von

Heparin und die Vorinkubation mit SKF96365 in Anwesenheit sowie Abwesenheit von NAADP beobachtet (Abb. 4.4). Die schwache, agonistische Wirkung von Heparin auf den Ryanodin Rezeptor und die schwachen,  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierenden Eigenschaften von SKF 96365 sind gut dokumentiert und erklären somit die gemachten Beobachtungen (Bezprozvanny et al., 1993; Merritt et al., 1990).



**Abb. 4.4: Effekte verschiedener Inhibitoren auf die Amplitude NAADP-induzierter, subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale.** Jurkat T-Zellen (Subklon JMP) wurden mit Fura-2 AM beladen und nach Mikroinjektion mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging untersucht. Lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten wurden im Cytosol nahe der Plasmamembran (Pm), im Cytosol (Cyt) oder im Nukleus (Nuk) gemessen und als Differenz der maximalen Signalamplitude zur Amplitude der näheren Umgebung dargestellt, siehe Beispiel in Abb. 4.3. Die Pipettenkonzentrationen der Inhibitoren betragen wie folgt: Ruthenium Rot (*RuRot*; 10  $\mu\text{M}$ ); Ryanodin (*Rya*; 20 mM); und Heparin (*Hep*; 1 mg/ml) (man beachte, dass diese Konzentrationen noch um weitere 1:50-1:100 im Cytosol verdünnt wurden). Die Zellen wurden für 15 min mit SKF 96365 (30  $\mu\text{M}$ ) im Extrazellulärmedium vorinkubiert. Die Signalamplituden sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler ( $n = 5-14$  Zellen für jede Kondition);  $p$  Werte wurden mit Hilfe des *Student's t-test* berechnet. [Abbildung aus (Dammermann und Guse, 2005), verändert]

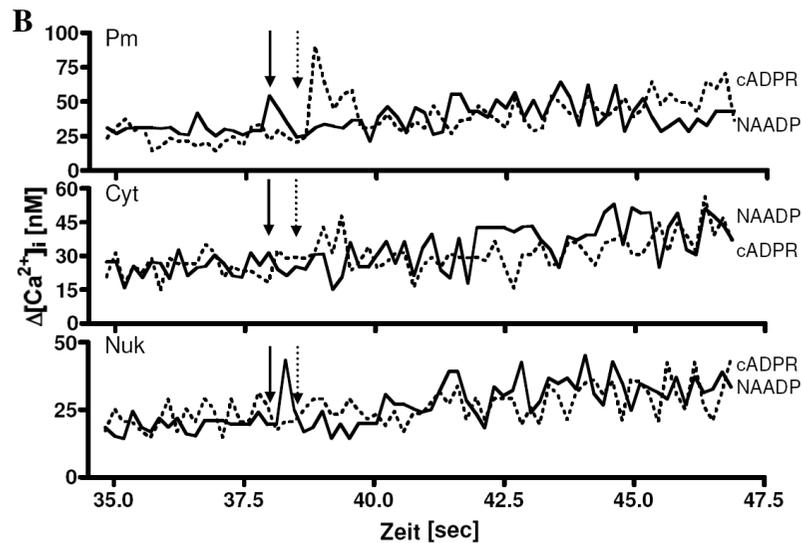
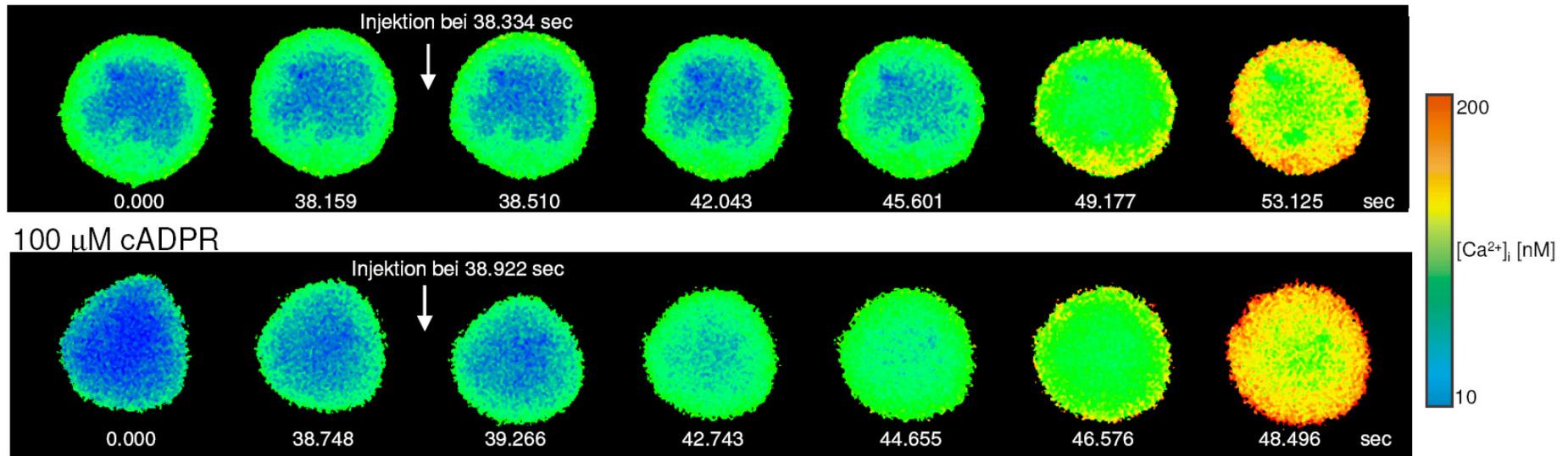
Desweiteren führte die Autoinaktivierung des NAADP-Signalsystems durch die Mikroinjektion einer hohen Konzentration NAADP zu gleichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalamplituden wie die Mikroinjektion von Intrazellulärpuffer (Abb. 4.4). Durch dieselbe

Autoinaktivierung wurde auch die Entstehung subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nach der Mikroinjektion von cADPR verhindert, einem etablierten Agonisten des Ryanodin Rezeptors (Guse, 2000) (Abb. 4.4). Ein räumlicher und zeitlicher Vergleich des Musters NAADP-abhängiger, subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale mit dem Muster der cADPR-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale wies keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 4.5). Das wird besonders gut deutlich bei Betrachtung der Bilder (Abb. 4.5 A) und  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalverläufe in subzellulären Bereichen nahe der Plasmamembran (Pm), im Cytosol (Cyt) und im Nukleus (Nuk; Abb. 4.5 B).

Obwohl diese pharmakologischen Daten und die räumlichen sowie zeitlichen Eigenschaften der NAADP-vermittelten, subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale für eine tragende Rolle des Ryanodin Rezeptors sprechen, könnte der Gebrauch von Inhibitoren alleine aufgrund ungenügender Spezifität über den wirklichen Sachverhalt hinwegtäuschen.

Deshalb wurden in einer zweiten, unabhängigen Herangehensweise Mikroinjektions- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Experimente an humanen T-Lymphocyten durchgeführt, deren Ryanodin Rezeptoren durch *knock-down* nur noch gering exprimiert wurden (Kunerth et al., 2004; Langhorst et al., 2004; Schwarzmann et al., 2002). Diese Jurkat T-Zellklone mit einem *knock-down* des Ryanodin Rezeptors wurden hergestellt durch die stabile Transfektion mit Plasmiden, die für *antisense*-RNA gegen den Ryanodin Rezeptor kodierten (Schwarzmann et al., 2002). Der Subklon 25 exprimiert *antisense*-RNA spezifisch für den Ryanodin Rezeptor Typ 3 und der Subklon 10 *antisense*-RNA spezifisch für alle drei Ryanodin Rezeptor Typen (1 bis 3). Zur Kontrolle wurde noch zusätzlich der Subklon E2 verwendet. T-Zellen dieses Subklons exprimierten stabil *antisense*-RNA, die spezifisch war für eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*), einem Protein, dass in T-Zellen nicht natürlich vorkommt. Die stark reduzierte Expression des Ryanodin Rezeptors auf Proteinebene wurde mittels Western Blot-Technik nachgewiesen und ausführlich dokumentiert ((Langhorst et al., 2004; Schwarzmann et al., 2002)).

## A 30 nM NAADP

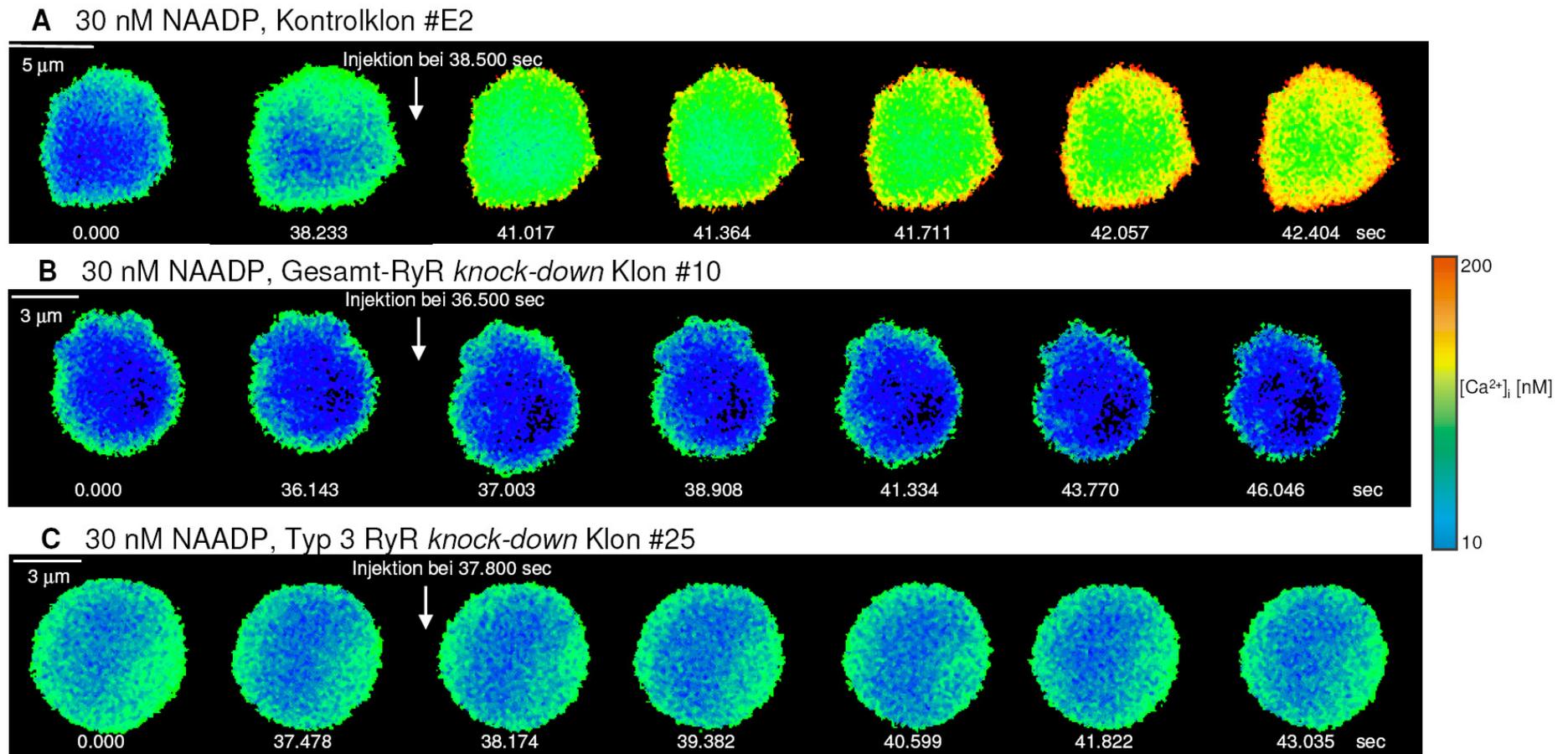


**Abb. 4.5: Vergleich der zeitlichen und räumlichen Eigenschaften NAADP- und cADPR-induzierter, subzellulärer  $Ca^{2+}$ -Signale.** Jurkat T-Zellen (Subklon JMP) wurden mit Fura-2 AM beladen und nach Mikroinjektion mittels  $Ca^{2+}$ -Imaging untersucht. **A**, Falschfarbenbilder zeigen die zeitliche und räumliche Entwicklung der  $Ca^{2+}$ -Signale in repräsentativen Zellen, denen zuvor NAADP (30 nM) oder cADPR (100  $\mu$ M) mikroinjiziert wurde. **B**, lokale  $[Ca^{2+}]_i$  in Folge der Mikroinjektion von NAADP (30 nM) oder cADPR (100  $\mu$ M). Lokale  $Ca^{2+}$ -Antworten wurden im Cytosol nahe der Plasmamembran (Pm), im Cytosol (Cyt) oder im Nukleus (Nuk) gemessen und als Differenz der maximalen Signalamplitude zur Amplitude der näheren Umgebung dargestellt. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Mikroinjektion (*durchgezogen* für NAADP, *unterbrochen* für cADPR). Die Bilddaten und  $Ca^{2+}$ -Signalverläufe sind repräsentativ für 5–9 Zellen, die für jede der genannten Konditionen einzeln untersucht wurden. [Abbildung aus (Dammermann und Guse, 2005), verändert]

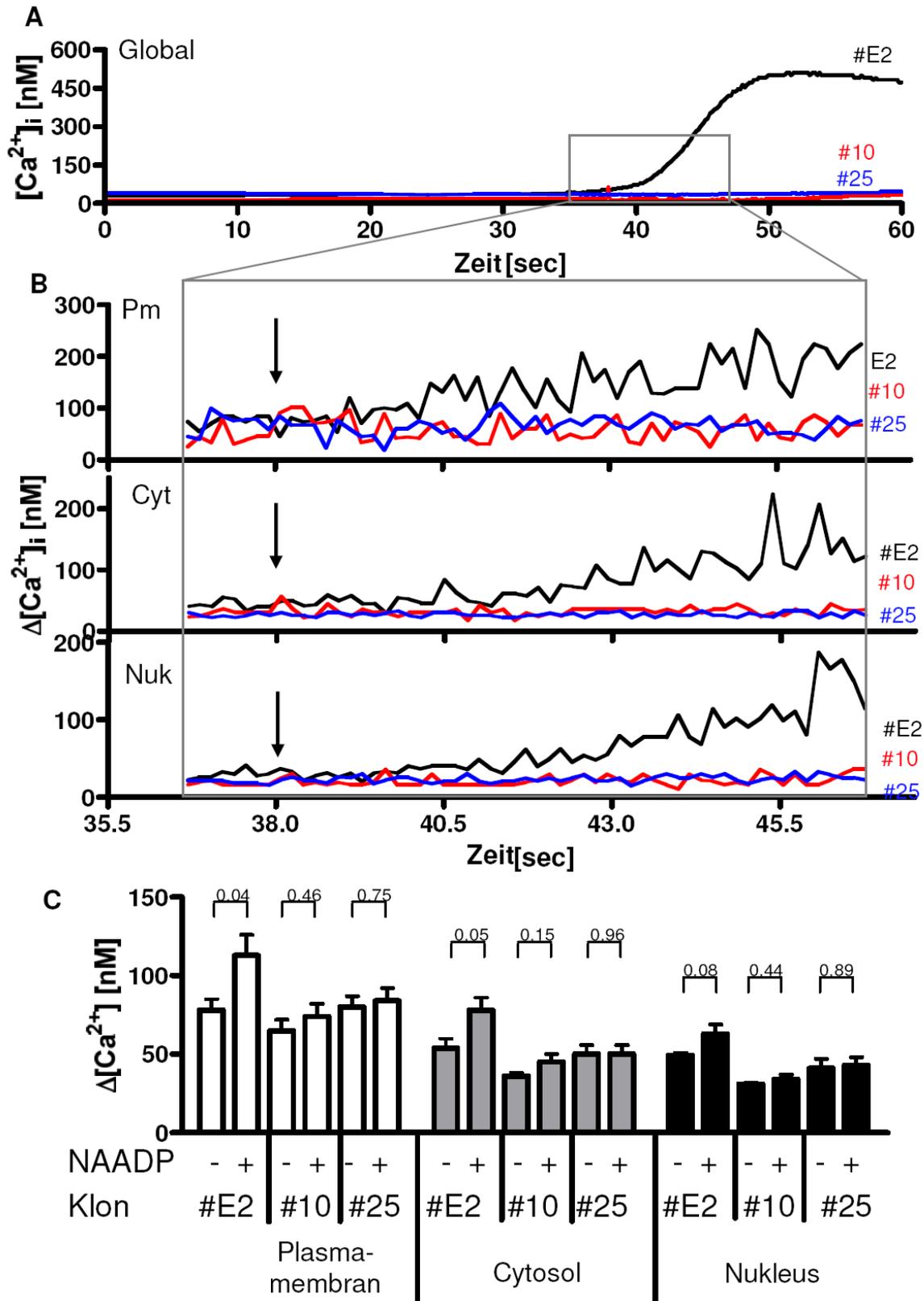
Die Mikroinjektion von NAADP in T-Zellen des Kontrollklons E2 führte zur Entstehung ähnlicher subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale, wie sie schon zuvor in T-Zellen des Subklons JMP beobachtet werden konnten (Abb. 4.6 A). In den Subklonen 10 und 25 hingegen konnten nach NAADP Mikroinjektion keine Veränderungen der subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale hin zu größeren Amplituden gemessen werden, d.h. weder im Subklon 10 mit der stark verringerten Expression aller drei Ryanodin Rezeptor Typen (Abb. 4.3 B), noch im Subklon 25 mit der stark verringerten Expression des Rezeptor Typs 3 (Abb. 4.3 C).

Zur ausreichenden Untermauerung dieser Beobachtungen wurde noch eine weitergehende, quantitative Auswertung bestimmter subzellulärer Bereiche in allen vermessenen T-Zellen der Subklone E2, 10 und 25 angeschlossen (Abb. 4.7). Es wurden wie bei den Experimenten mit NAADP an T-Zellen des Subklons JMP (Abb. 4.4) folgende subzellulären Bereiche bzw. *regions of interest* (ROI) gesetzt und analysiert: Plasmamembran (Pm), Cytosol (Cyt) und Nukleus (Nuk).

Nach der Mikroinjektion von NAADP in T-Zellen des Subklons E2 stiegen die Amplituden der subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in allen drei ROIs schnell an (Abb. 4.7 B). Dem gegenübergestellt blieben die subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in den T-Zellen der Subklone 10 und 25 nach NAADP-Mikroinjektion nahezu unverändert (Abb. 4.7 B). Eine statistische Auswertung zeigte anschließend, dass NAADP nach Mikroinjektion eine signifikante Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalamplituden im Kontrollklon E2 auslöste (Abb. 4.7 C). In den Subklonen mit einem *knock-down* des Ryanodin Rezeptors, 10 und 25, hingegen stellten sich nach NAADP-Mikroinjektion keine signifikanten Veränderungen ein im Vergleich zu Kontrollinjektionen mit Intrazellulärpuffer (Abb. 4.7 C).



**Abb. 4.6: Subzelluläre Ca<sup>2+</sup>-Signale nach Mikroinjektion von NAADP in RyR *knock-down* T-Zellklonen.** Jurkat T-Zellen (Subklon E2, 10 und 25) wurden mit Fura-2 AM beladen und nach Mikroinjektion mittels Ca<sup>2+</sup>-Imaging untersucht. **A**, Mikroinjektion von 30 nM NAADP in Kontrollklon E2, **B**, in Gesamt-RyR *knock-down* Klon 10, und , **C**, in Typ 3 RyR *knock-down* Klon 25. Die Bilddaten sind repräsentativ für 8–11 Zellen, die für jede der genannten Konditionen einzeln untersucht wurden. [Abbildung aus (Dammermann und Guse, 2005), verändert]



**Abb. 4.7: Inhibition NAADP-induzierter, subzellulärer  $Ca^{2+}$ -Signale in T-Zellen mit einem *knock-down* des RyR.** Jurkat T-Zellen (Subklone E2, 10 und 25) wurden mit Fura-2 AM beladen und nach Mikroinjektion mittels  $Ca^{2+}$ -Imaging untersucht. **A** und **B**, Auswertung globaler  $[Ca^{2+}]_i$  (**A**) und lokaler  $[Ca^{2+}]_i$  (**B**) in Folge der Mikroinjektion von NAADP (30 nM) in den Kontrollklon E2 bzw. in die RyR *knock-down* Klone 10 und 25. Lokale  $Ca^{2+}$ -Antworten wurden im Cytosol nahe der Plasmamembran (Pm), im Cytosol (Cyt) oder im Nukleus (Nuk) gemessen und als Differenz der maximalen Signalamplitude zur Amplitude der näheren Umgebung dargestellt. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der

Mikroinjektion. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalverläufe sind repräsentativ für 8–11 Zellen, die für jede der genannten Konditionen einzeln untersucht wurden. **C**, Die Signalamplituden sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler ( $n = 8-11$  Zellen für jede Kondition);  $p$  Werte wurden mit Hilfe des *Student's t-test* berechnet. Die Angabe „NAADP –“ steht für die Mikroinjektion von Intrazellulärpuffer. [Abbildung aus (Dammermann und Guse, 2005), verändert]

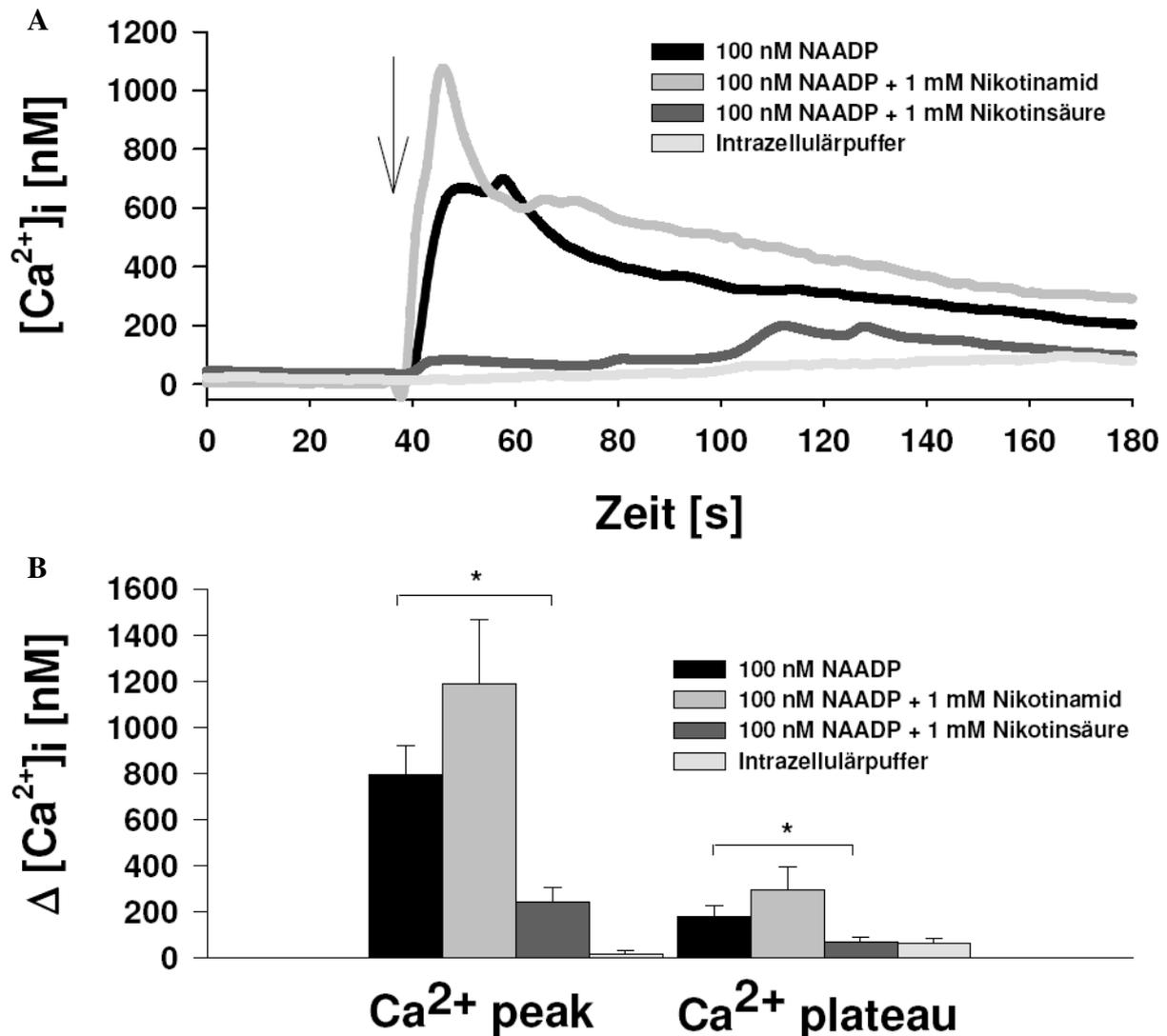
## **4.2 BZ52 und BZ194: niedermolekulare NAADP-Antagonisten und ihr Einfluß auf die $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsysteme in humanen und Ratten *Memory* T-Lymphocyten**

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Potter (*University of Bath*, Großbritannien) wurden zwei niedermolekulare Analoga des  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Botenstoffs NAADP synthetisiert und auf ihr Potential als Antagonisten der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsysteme in T-Zellen des Menschen und der Ratte untersucht. Die ersten Experimente wurden an humanen T-Zellen durchgeführt (4.2.1), alle weiteren Experimente schließlich an Ratten *Memory* T-Zellen (4.2.2).

### **4.2.1 Die Wirkung der niedermolekularen NAADP-Antagonisten BZ52 und BZ194 auf das $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystem in humanen T-Zellen**

Das Nukleotid NAADP wurde zuerst als Verunreinigung in Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP) Präparationen entdeckt und ist die wirkungsvollste, bis heute entdeckte, endogene Verbindung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Eigenschaften (Lee und Aarhus, 1995). Indem Jurkat T-Zellen als Modellsystem verwendet wurden, konnte vor kurzem demonstriert werden, dass die Stimulation des T-Zellrezeptor (TCR) / CD3 Komplexes die Aktivierung eines Signalweges zur Folge hat, der unbedingt auf die (i) Bildung von NAADP und (ii) lokale (subzelluläre) und globale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale angewiesen ist (Berg et al., 2000; Dammermann und Guse, 2005; Langhorst et al., 2004).

Die Mikroinjektion von NAADP löste, wie schon weiter oben beschrieben (4.1), in Jurkat T-Zellen eine deutliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort aus. Die Koinjektion von NAADP zusammen mit Nikotinsäure, aber nicht Nikotinamid reduzierte NAADP-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale signifikant und in sehr starkem Maße (Abb. 4.8 A und B). Dieses



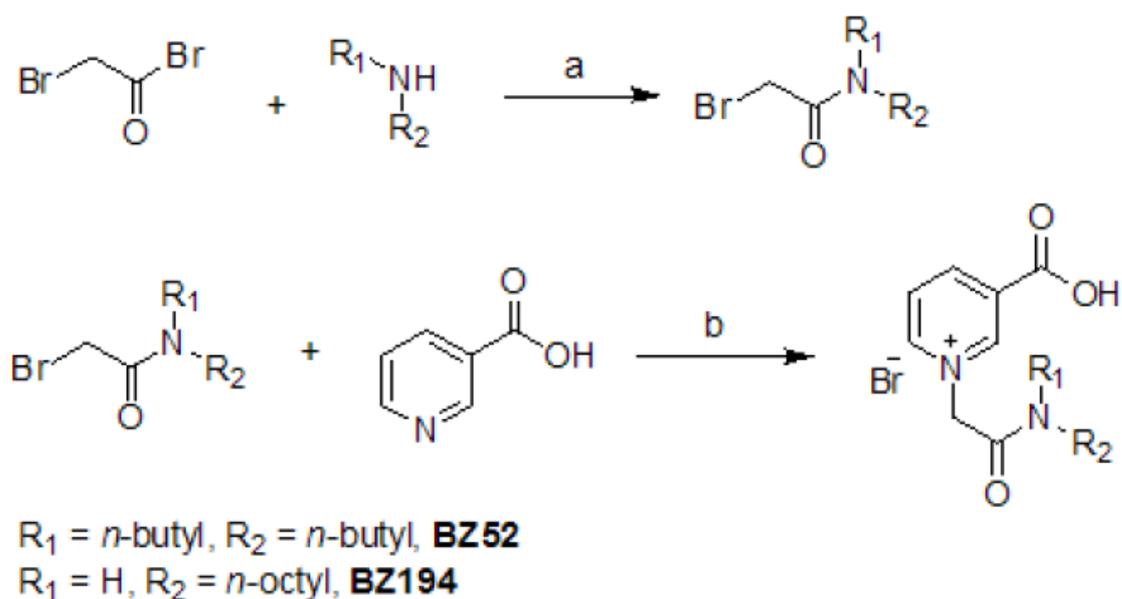
**Abb. 4.8: Inhibition NAADP-abhängiger  $Ca^{2+}$ -Signale in Jurkat T-Lymphocyten durch Nikotinsäure.** Jurkat T-Zellen (Subklon JMP) wurden mit Fura-2 AM beladen und nach Mikroinjektion mittels  $Ca^{2+}$ -Imaging untersucht. **A**, globale  $[Ca^{2+}]_i$  in Folge der Mikroinjektion von NAADP (100 nM), NAADP plus Nikotinamid (1 mM), NAADP plus Nikotinsäure (1 mM) oder Intrazellulärpuffer (Mittelwerte,  $n = 4 - 12$ ). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Mikroinjektion. **B**, Höhe und Vergleich der transienten  $Ca^{2+}$ -Peaks sowie der folgenden Plateauphase nach Mikroinjektion in Abhängigkeit von der jeweiligen Kondition (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 4 - 12$ ). Signifikanzen wurden mittels des *Student's t-test* berechnet und mit \* für  $p \leq 0,05$  gekennzeichnet.

Ergebnis deutete als erstes darauf hin, dass Derivate der Nikotinsäure für den Entwurf von NAADP-Antagonisten geeignet sein könnten, da Nikotinsäure mit hoher Wahrscheinlichkeit essentiell für die  $Ca^{2+}$ -freisetzende Eigenschaften von NAADP ist. NADP alleine wies nach Mikroinjektion keine nennenswerten,  $Ca^{2+}$ -freisetzenden Eigenschaften auf (Dowden et al., 2006).

Da die zelluläre Aufnahme von Nikotinsäure langsam abläuft und dieses Molekül intrazellulär hauptsächlich für die Biosynthese von Nikotinamidadenindinukleotid (NAD) verwendet wird, liess sich aus diesen initialen Experimenten schließen, dass

der Entwurf membranpermeabler Analoga eine viel versprechende Strategie darstellen könnte, um den NAADP  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg zu beeinflussen. Diese Möglichkeit konnte vor kurzem am Beispiel von Acinuszellen des Pankreas aufgezeigt werden (Dowden et al., 2006). Dennoch besaß die dort vorgestellte Leitsubstanz keinerlei antagonistisches Potential in T-Zellen.

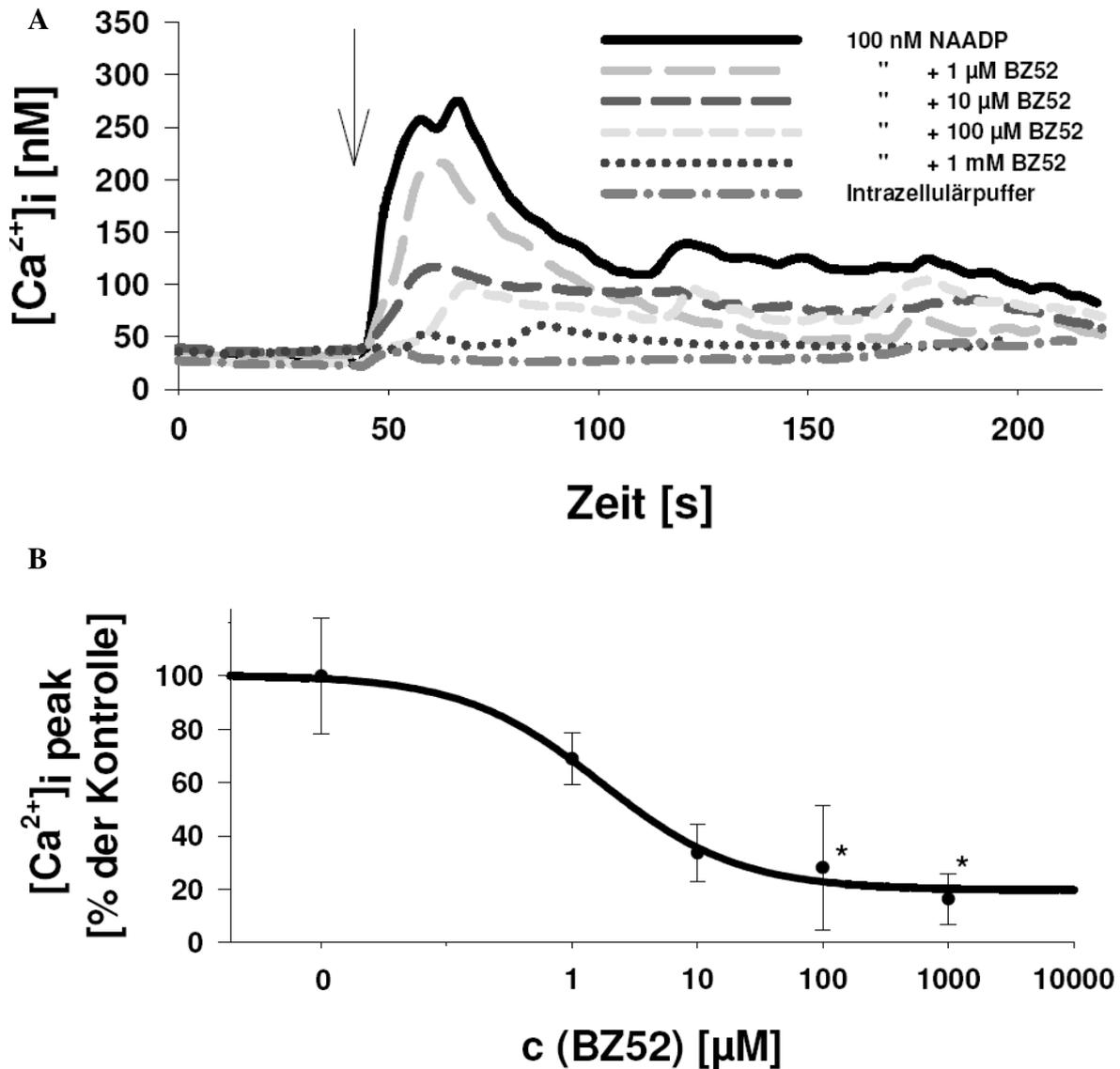
Da NAADP sehr viel aktiver ist in Bezug auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung als das vergleichsweise ähnlich aufgebaute NADP (Lee und Aarhus, 1995), wurde daraus der Schluss gezogen, dass der Nikotinsäurerest verantwortlich ist für die inhibierende Wechselwirkung mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystem. In Folge dessen wurden durch unseren Kooperationspartner Prof. Potter Prototypen neuartiger Nikotinsäurederivate synthetisiert, indem man Nikotinsäure mit Hilfe von 2-Bromo-acetylamid als Alkylierungsreagenz alkylierte (Abb. 4.9).



**Abb. 4.9: Synthesestrategie für die beiden NAADP – Antagonisten BZ52 und BZ194.** Reagenzien und Konditionen: a) Ether bei  $-15$  bis  $-20$  °C für 1,5 h; b) DMF,  $65$  °C, über Nacht. [Die Abbildung wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Bo Zhang und Prof. Barry Potter, *University of Bath*, Großbritannien]

Aus einer Reihe potentieller NAADP-Antagonisten mit variabler Seitenkettenlänge (Abb. 4.9; Reste R1 und R2) konnten zwei Kandidaten identifiziert werden, 3-Carboxyl-1-dibutylcarbamoylmethyl-pyridin (BZ52, Abb. 4.9) und 3-Carboxyl-1-

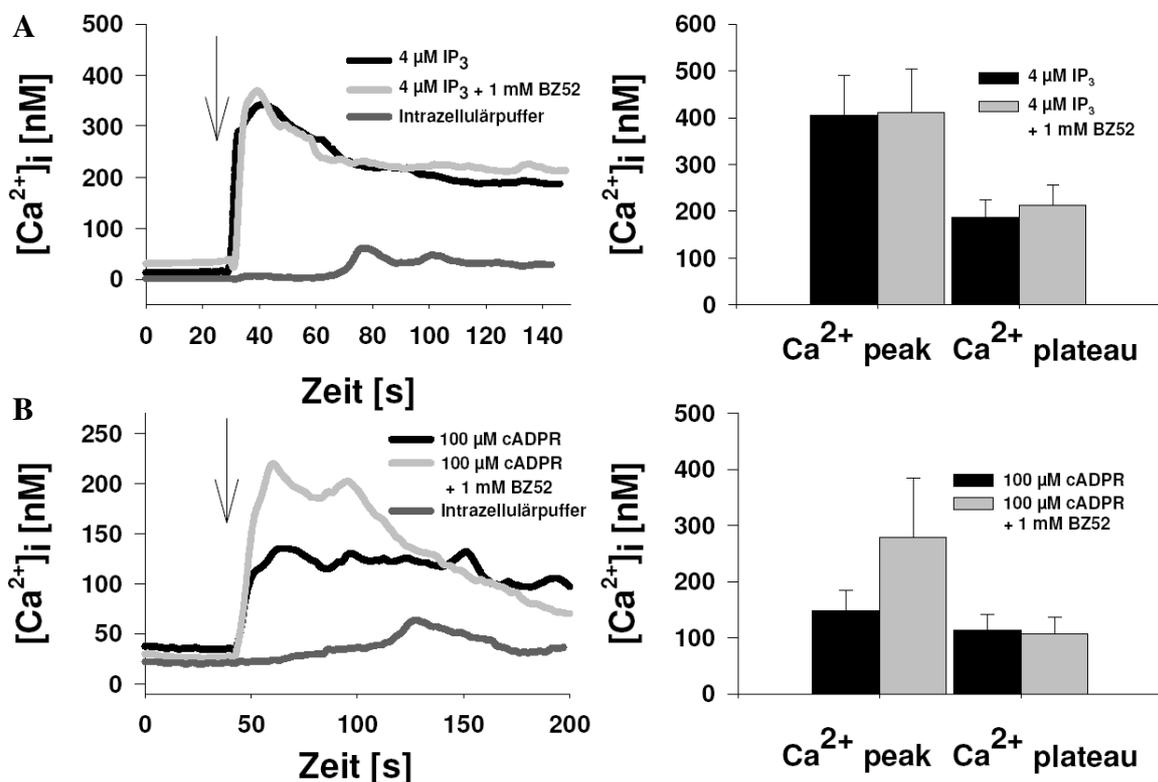
octylcarbamoylmethyl-pyridin (BZ194, Abb. 4.9), die letztlich wirkungsvoll den NAADP /  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg inhibierten.



**Abb. 4.10: Spezifische und konzentrationsabhängige Inhibition NAADP-induzierter  $\text{Ca}^{2+}$  Signale in Jurkat T-Lymphocyten durch das NAADP-Analogon BZ52.** Jurkat T-Zellen (Subklon JMP) wurden mit Fura-2 AM beladen und nach Mikroinjektion mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging untersucht. **A**, T-Zellen wurden 100 nM NAADP und steigende Konzentrationen BZ52 (1  $\mu\text{M}$  – 1 mM) koinjiziert (Mittelwerte,  $n = 3 - 9$ ). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Mikroinjektion. **B**, Konzentrations-Wirkungs-Kurve zur Darstellung des inhibitorischen Effekts von BZ52 (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 3 - 9$ ). Signifikanzen wurden mittels des *Student's t-test* berechnet und mit \* für  $p \leq 0,05$  gekennzeichnet.

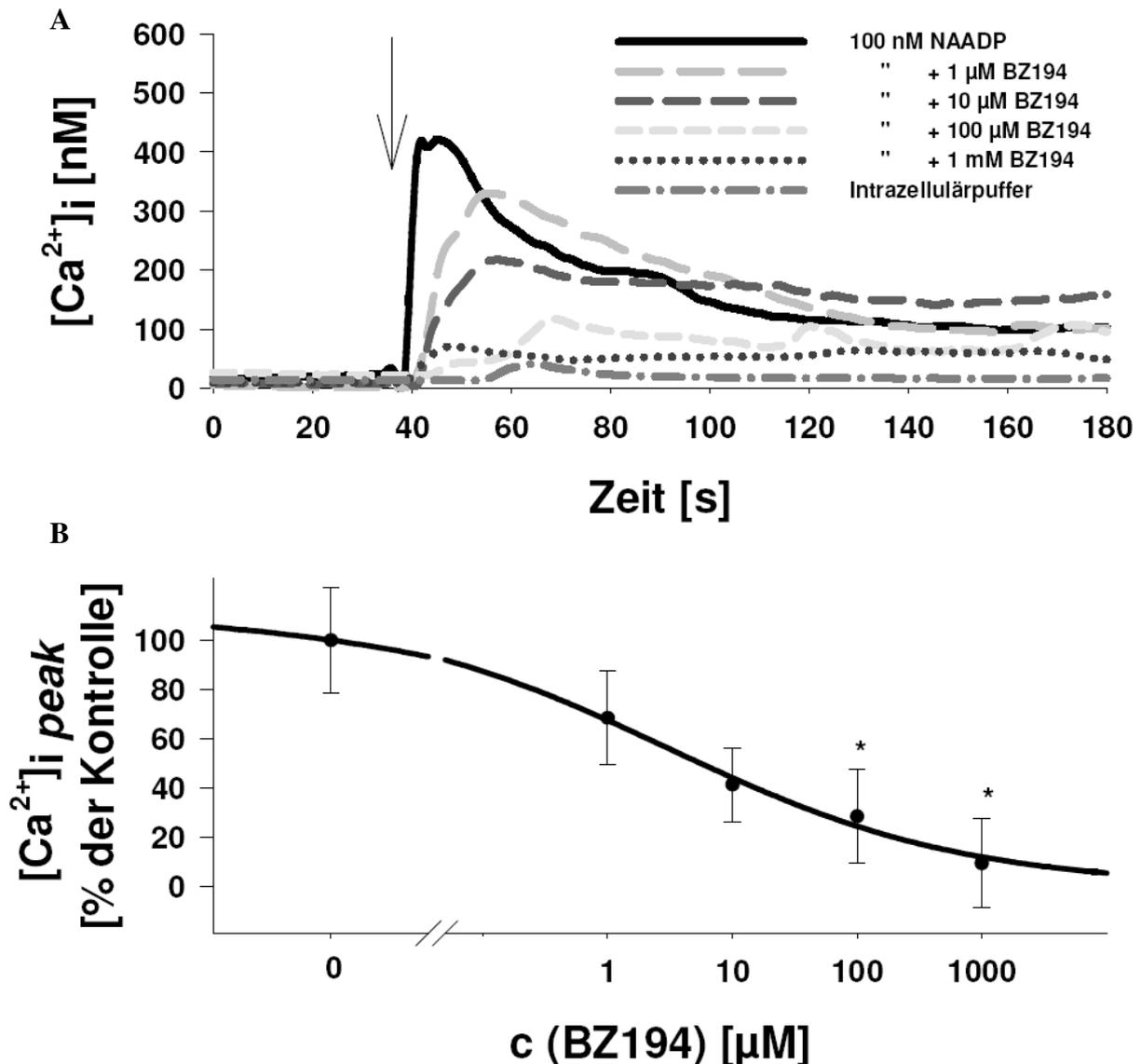
Als erstes wurde das Wirkungsspektrum von BZ52 untersucht. Diese Substanz stellte sich als potenter NAADP-Antagonist heraus, der nach Koinjektion mit NAADP die NAADP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Jurkat T-Lymphocyten (Subklon JMP) unterdrückte. In einer typischen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung wurden

NAADP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale bei steigenden BZ52-Konzentrationen (1 – 1000  $\mu\text{M}$ ) zunehmend stärker inhibiert (Abb. 4.10 A). Der  $\text{IC}_{50}$  lag bei ca. 1,7  $\mu\text{M}$  (Abb. 4.10 B). Ein weiterer, entscheidender Aspekt der Wirkungsweise von BZ52 war darüber hinaus die Tatsache, dass die beiden anderen wichtigen,  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden sekundären Botenstoffe in T-Zellen,  $\text{IP}_3$  (Streb et al., 1983) und cADPR (Lee et al., 1989), nicht beeinflusst wurden. Wenn man  $\text{IP}_3$  oder cADPR mit einer maximal-wirksamen Konzentration von 1 mM BZ52 in T-Zellen koinjizierte, nahm die Stärke der entstehenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nicht ab (Abb. 4.11 A und B). Dieses Ergebnis macht die hohe Spezifität von BZ52 deutlich.



**Abb. 4.11: Keine Inhibition  $\text{IP}_3$ - und cADPR-abhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Jurkat T-Lymphocyten durch BZ52.** Jurkat T-Zellen (Subklon JMP) wurden mit Fura-2 AM beladen und nach Mikroinjektion mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging untersucht. **A**, globale  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Folge der Mikroinjektion von  $\text{IP}_3$  (4  $\mu\text{M}$ ),  $\text{IP}_3$  plus BZ52 (1 mM) oder Intrazellulärpuffer (Mittelwerte,  $n = 4 - 7$ ). Rechts: Vergleich der transienten  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks sowie der folgenden Plateauphase nach Mikroinjektion in Abhängigkeit von der jeweiligen Kondition (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 4 - 7$ ). **B**, globale  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Folge der Mikroinjektion von cADPR (100  $\mu\text{M}$ ), cADPR plus BZ52 (1 mM) oder Intrazellulärpuffer (Mittelwerte,  $n = 4 - 9$ ). Rechts: Vergleich der transienten  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks sowie der folgenden Plateauphase nach Mikroinjektion in Abhängigkeit von der jeweiligen Kondition (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 4 - 9$ ). Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Mikroinjektion.

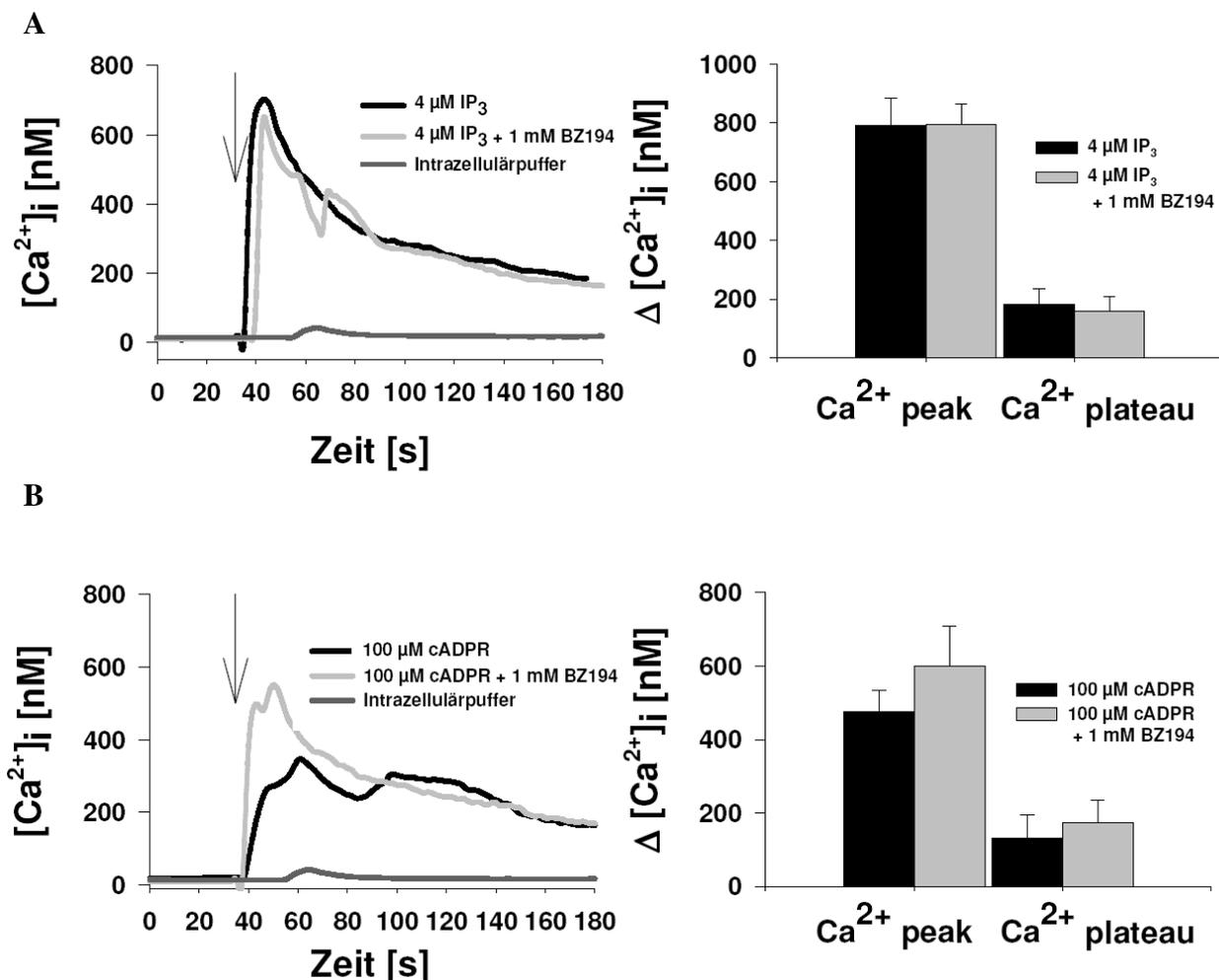
Im Anschluß an die Untersuchung von BZ52 wurde der potentielle NAADP-Antagonist BZ194 untersucht, der außerdem aufgrund seiner längeren Alkylkette



**Abb. 4.12: Spezifische und konzentrationsabhängige Inhibition NAADP-induzierter  $\text{Ca}^{2+}$  Signale in Jurkat T-Lymphocyten durch das NAADP-Analogon BZ194.** Jurkat T-Zellen (Subklon JMP) wurden mit Fura-2 AM beladen und nach Mikroinjektion mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging untersucht. **A**, T-Zellen wurden mit 100 nM NAADP und steigenden Konzentrationen BZ194 (1  $\mu\text{M}$  – 1 mM) koinjiziert (Mittelwerte,  $n = 5 - 14$ ). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Mikroinjektion. **B**, Konzentrations-Wirkungs-Kurve zur Darstellung des inhibitorischen Effekts von BZ194 (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 5 - 14$ ). Signifikanzen wurden mittels des *Student's t-test* berechnet und mit \* für  $p \leq 0,05$  gekennzeichnet.

membranpermeabel zu sein schien. Diese Substanz stellte sich ebenfalls als potenter NAADP-Antagonist heraus, der nach Koinjektion mit NAADP das NAADP /  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystem in Jurkat T-Lymphocyten inhibierte. In einer wiederum typischen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung wurden NAADP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale bei steigenden BZ194-Konzentrationen (1 – 1000  $\mu\text{M}$ ) zunehmend unterdrückt (Abb. 4.12 A). Der  $\text{IC}_{50}$  lag bei ca. 3,0  $\mu\text{M}$  (Abb. 4.12 B). In Anlehnung an die Spezifitäts-

untersuchungen mit BZ52 kennzeichnete sich auch BZ194 in seiner Wirkungsweise dadurch aus, dass die beiden anderen wichtigen,  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden sekundären Botenstoffe in T-Zellen,  $\text{IP}_3$  (Streb et al., 1983) und cADPR (Lee et al., 1989), nicht beeinflusst wurden. Wenn man  $\text{IP}_3$  oder cADPR mit einer maximal-wirksamen Konzentration von 1 mM BZ194 in T-Zellen koinjizierte, nahm die Stärke der entstehenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nicht ab (Abb. 4.13 A und B). Dieses Ergebnis macht wie bei BZ52 die hohe Spezifität von BZ194 deutlich.



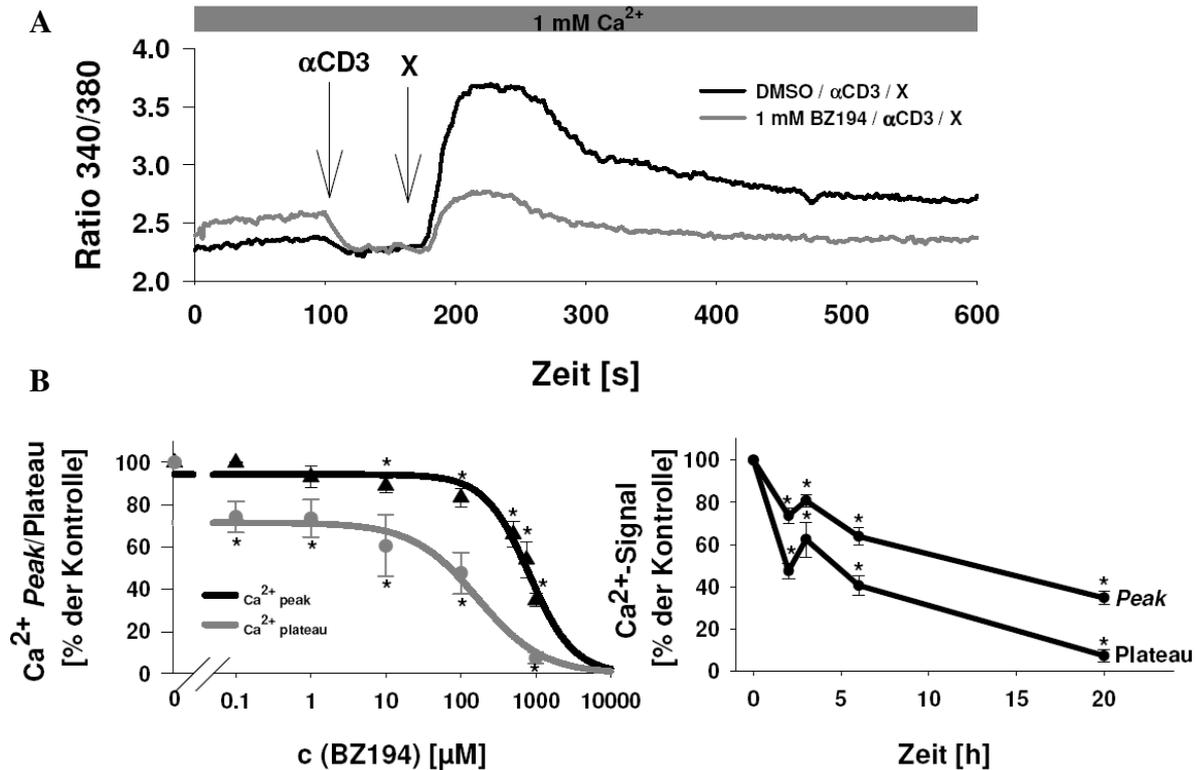
**Abb. 4.13: Keine Inhibition  $\text{IP}_3$ - und cADPR-abhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Jurkat T-Lymphocyten durch BZ194.** Jurkat T-Zellen (Subklon JMP) wurden mit Fura-2 AM beladen und nach Mikroinjektion mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging untersucht. **A**, globale  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Folge der Mikroinjektion von  $\text{IP}_3$  (4  $\mu\text{M}$ ),  $\text{IP}_3$  plus BZ194 (1 mM) oder Intrazellulärpuffer (Mittelwerte,  $n = 5 - 13$ ). Rechts: Vergleich der transienten  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks sowie der folgenden Plateauphase nach Mikroinjektion in Abhängigkeit von der jeweiligen Kondition (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 5 - 13$ ). **B**, globale  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Folge der Mikroinjektion von cADPR (100  $\mu\text{M}$ ), cADPR plus BZ194 (1 mM) oder Intrazellulärpuffer (Mittelwerte,  $n = 6 - 13$ ). Rechts: Vergleich der transienten  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks sowie der folgenden Plateauphase nach Mikroinjektion in Abhängigkeit von der jeweiligen Kondition (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 6 - 13$ ). Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Mikroinjektion.

Im Rahmen der Spezifitätsexperimente fielen BZ52 und BZ194 zusätzlich durch einen weiteren Effekt auf. Beide Antagonisten inhibierten cADPR-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nicht. Vielmehr erhöhten BZ52 und BZ194 deutlich die Amplitude des transienten  $\text{Ca}^{2+}$ -*Peaks* nach Mikroinjektion (Abb. 4.11 B und 4.13 B). Die sich anschließende  $\text{Ca}^{2+}$ -Plateauphase verlief wieder ähnlich wie bei den Positivkontrollen mit cADPR. Dennoch waren die Amplitudenerhöhungen in beiden Fällen nicht signifikant.

#### **4.2.2 Die Wirkung des niedermolekularen NAADP-Antagonisten BZ194 auf das $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystem in primären Ratten T-Zellen**

Nach Abschluss der Versuche mit BZ52 und BZ194 an der Jurkat T-Zelllinie wurde die experimentelle Strategie in zwei wesentlichen Punkten weiterentwickelt: (i) alle weiteren Experimente wurden an primären *myelin basic protein* (MBP)-spezifischen,  $\text{CD4}^+$  *memory* Ratten T-Zellen durchgeführt, wie sie im Krankheitsmodell der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) zum Einsatz kommen und (ii) von den beiden bisher analysierten, potentiellen NAADP-Antagonisten wurde BZ194 ausgewählt, da es aufgrund seiner längeren Alkylkette eher membranpermeabel sein sollte.

Tatsächlich blockierte BZ194 in Abhängigkeit von der Konzentration sowie der Vorinkubationszeit TCR/CD3-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale (Abb. 4.14 A und B). Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte lagen bei ca. 0,8 mM für den  $\text{Ca}^{2+}$ -*Peak* und 0,17 mM für das  $\text{Ca}^{2+}$ -Plateau. Überdies wurde anhand von Messungen in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -freien System, mit anschließender  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe (Gasser et al., 2006) entdeckt, dass BZ194 (i) die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern stark abschwächte und zusätzlich den (ii) schnellen, transienten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx*peak* nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe zusammen mit der (iii) folgenden, lang anhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Plateauphase unterdrückte (Abb. 4.15 A und B).

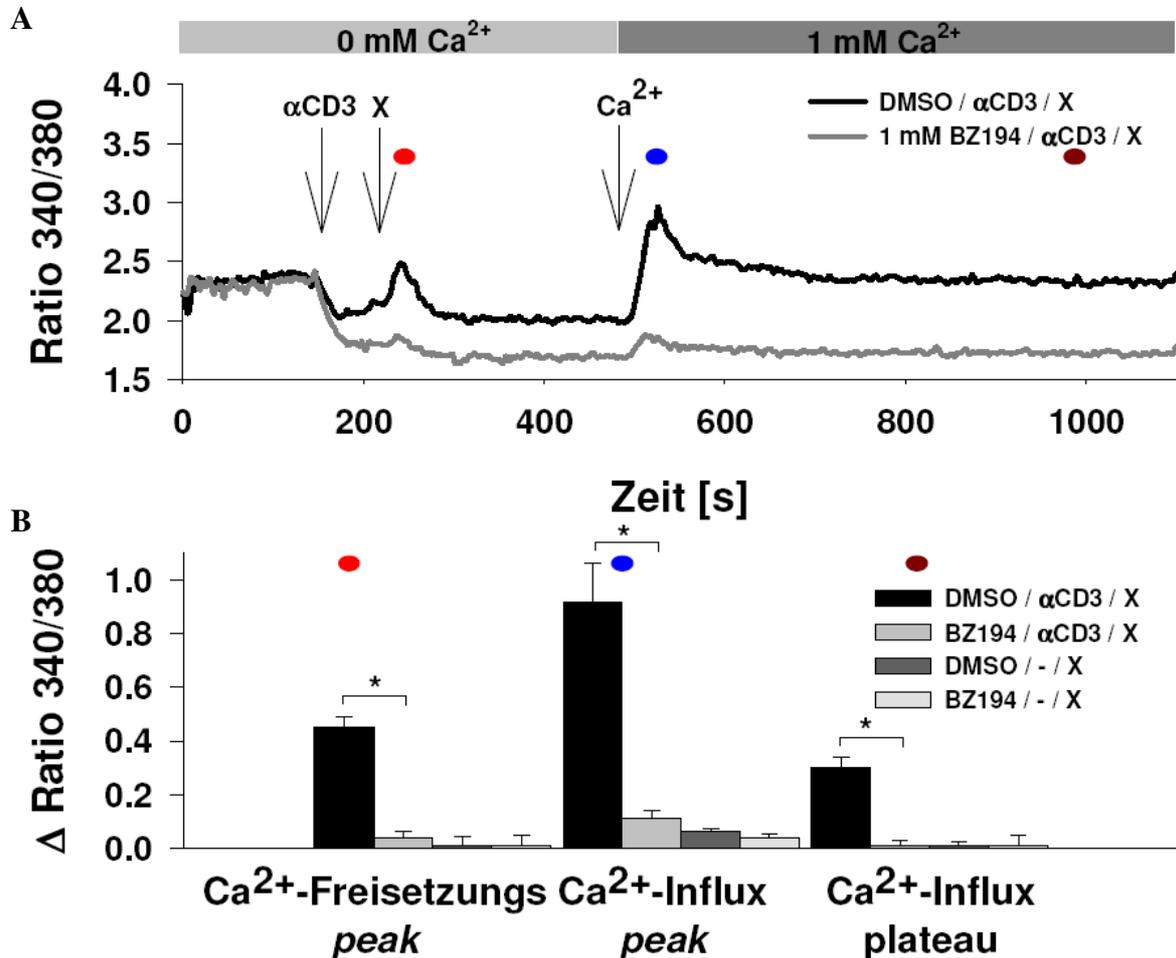


**Abb. 4.14: Der NAADP-Antagonist BZ194 inhibiert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsysteme in ruhenden, MBP-spezifischen Ratten *Memory* T-Zellen.** Ruhende, MBP-spezifische *Memory* Ratten T-Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen und mittels ratiometrischer Fluorimetrie vermessen. **A**, T-Zellen wurden über Nacht mit 1 mM BZ194 bzw. DMSO vorinkubiert. Die Pfeile markieren die Zugabe von (1. Pfeil) anti-CD3-mAb (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und (2. Pfeil) einem vernetzenden, sekundären Antikörper (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). (Mittelwerte,  $n = 8 - 9$ ). **B**, Links: Konzentrations-Wirkungs-Kurven zur Darstellung des inhibitorischen Effekts von BZ194 auf den transienten  $\text{Ca}^{2+}$ -Peak sowie die folgende Plateauphase (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 8 - 9$ ). Rechts: Effekte steigender Vorinkubationszeiten mit BZ194 auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsysteme in Ratten T-Zellen. Signifikanzen wurden mittels des *Student's t-test* berechnet und mit \* für  $p \leq 0,05$  gekennzeichnet.

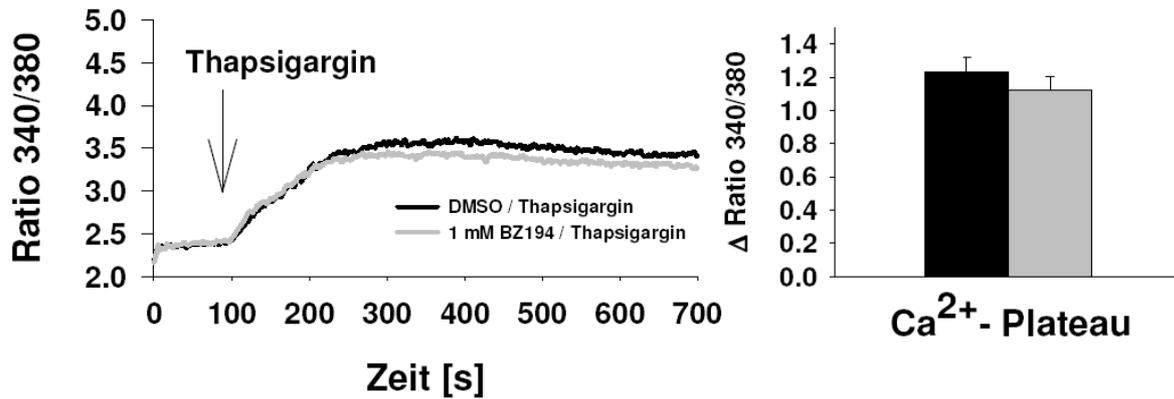
In einem weiteren Schlüsselexperiment konnte demonstriert werden, dass der kapazitative  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom als wesentlicher Bestandteil des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influsses in Anwesenheit von BZ194 nicht beeinflusst wurde (Abb. 4.16). Somit war ein weiterer Beweis dafür erbracht, dass diese Substanzklasse, zu der BZ52 und BZ194 zählen, keine nennenswerten Unspezifitäten aufwies.

Nach Abschluß der *in vitro*  $\text{Ca}^{2+}$ -Versuche mit BZ52 und BZ194 untersuchten Kooperationspartner um Chiara Chordiglieri und PD Dr. Alexander Flügel am MPI für Neurobiologie in Martinsried weitere Elemente der T-Zellaktivierung stromabwärts der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsysteme nach Inhibition mit BZ194 (Abb. 4.17). Sowohl die Antigen-induzierte Cytokinproduktion als auch die Proliferation primärer, MBP-spezifischer,  $\text{CD4}^+$  humaner und Ratten *Memory* T-Zellen wurden unterdrückt. BZ194 reduzierte

sehr stark die IL2-Sekretion in Ratten T-Zellen sowie deren Proliferation (Abb. 4.17 A und B). Ein vergleichbares Bild ergab sich auch für humane T-Zellen (Abb. 4.17 C und D).

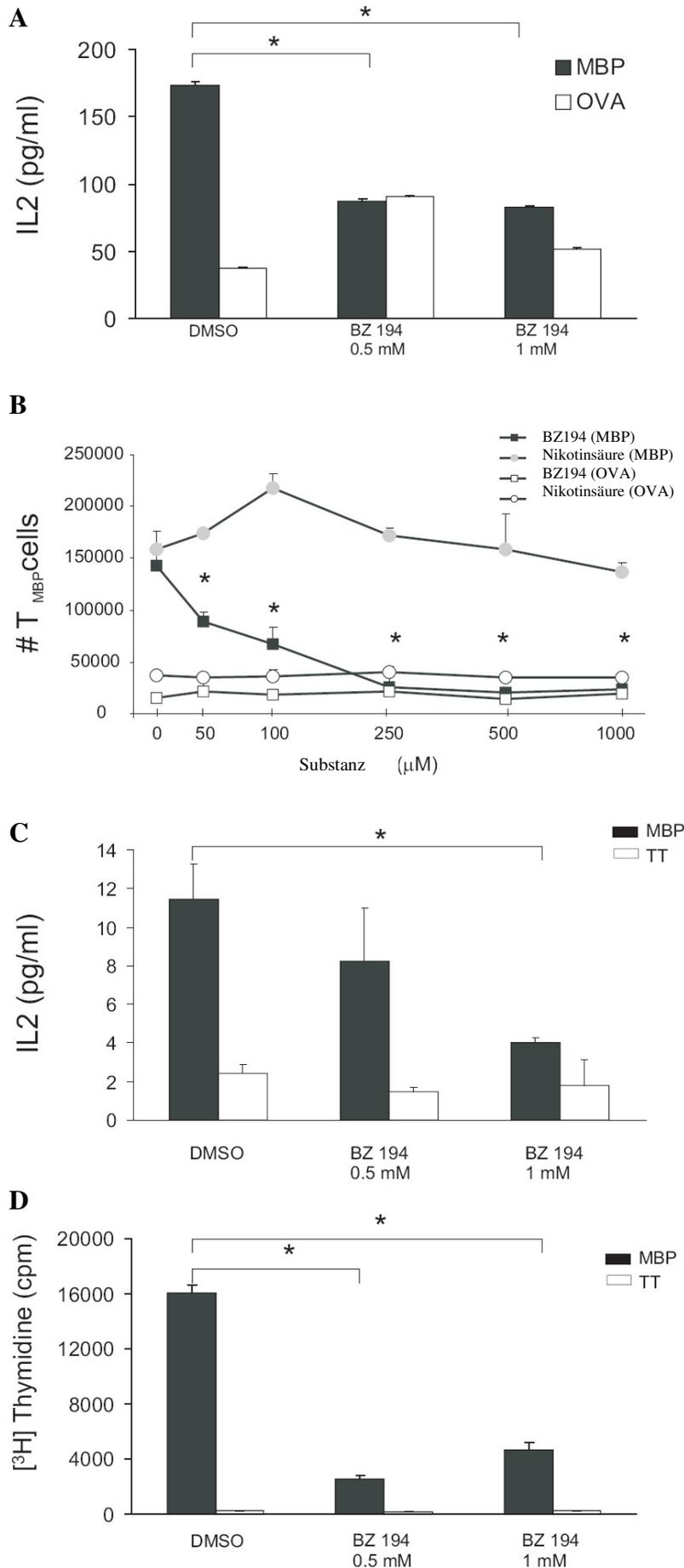


**Abb. 4.15: Der NAADP-Antagonist BZ194 inhibiert Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung und Ca<sup>2+</sup>-Influx in ruhenden, MBP-spezifischen Ratten *Memory* T-Zellen.** Ruhende, MBP-spezifische *Memory* Ratten T-Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen und mittels ratiometrischer Fluorimetrie vermessen. **A**, T-Zellen wurden über Nacht mit 1 mM BZ194 bzw. DMSO vorinkubiert. Die Pfeile markieren die Zugabe von (1. Pfeil) anti-CD3-mAb (10 µg/ml) und (2. Pfeil) einem vernetzenden, sekundären Antikörper (40 µg/ml) unter Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen. Dann wurde (3. Pfeil) die extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auf 1 mM erhöht (Mittelwerte, n = 6 – 7). **B**, Die Balkengrafik fasst die Ergebnisse aus A zusammen (transienter Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungspeak und Influxpeak sowie das Ca<sup>2+</sup>-Influxplateau). Die Negativkontrollen wurden ohne die Stimulation durch anti-CD3-mAb ausgeführt (Mittelwerte ± Standardfehler, n = 6 – 7). Signifikanzen wurden mittels des *Student's t-test* berechnet und mit \* für p ≤ 0,05 gekennzeichnet. Die farbigen Punkte (rot, blau und dunkelrot) markieren die Zeitpunkte, an denen die Werte für B erfasst wurden.



**Abb. 4.16: Der NAADP-Antagonist BZ194 hat keinen inhibitorischen Einfluss auf den Thapsigargin-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx.** Ruhende, MBP-spezifische *Memory* Ratten T-Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen und mittels ratiometrischer Fluorimetrie vermessen. T-Zellen wurden über Nacht mit 1 mM BZ194 bzw. DMSO vorinkubiert. Der Pfeil markiert die Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Thapsigargin (Mittelwerte,  $n = 9$ ). Rechts: Vergleich der Plateauphase nach Thapsigargin-Zugabe in Abhängigkeit von der jeweiligen Kondition (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 9$ ).

Diese Versuche machten deutlich, dass BZ194 (i) die Proliferation primärer T-Zellen beeinflussen bzw. hemmen kann und (ii) die Synthese aktivierungsspezifischer Botenstoffe gedrosselt wird. Es wurden Ereignisse beeinflusst, die in den Signalwegen der T-Lymphocyten stromabwärts der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalebene liegen und zeitlich betrachtet erst Stunden und Tage später ihre volle Wirkung entfalten.



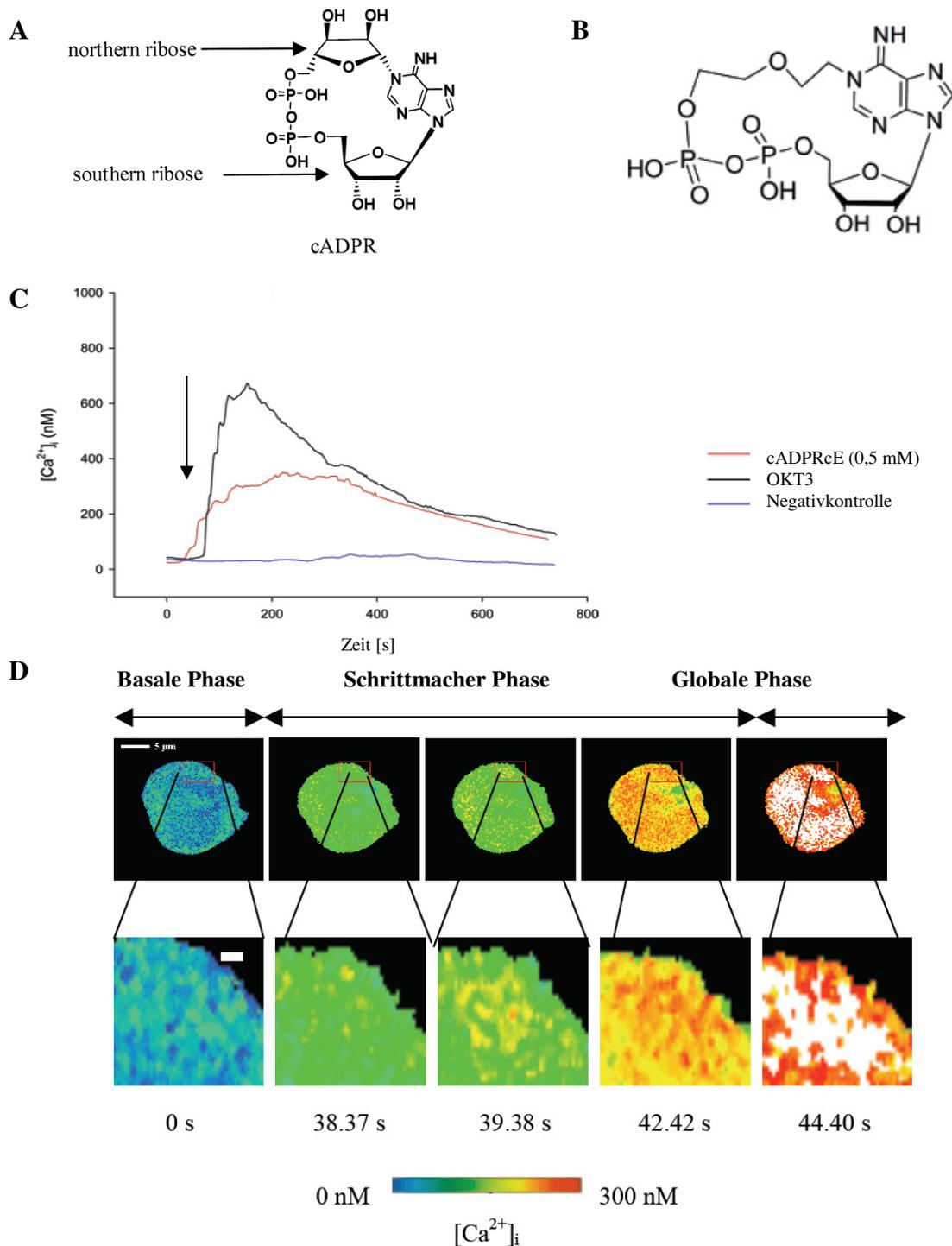
**Abb. 4.17: Effekte von BZ194 auf die Proliferation und IL-2 Sekretion MBP-spezifischer humaner und Ratten Memory T-Zellen.** **A**, IL-2 Sekretion MBP-spezifischer Ratten Memory T-Zellen nach Stimulation mit OVA oder MBP in der Gegenwart von DMSO (Vehikelkontrolle) oder BZ194 (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, Triplikate, repräsentativ für zwei unabhängige Experimente). \*  $p \leq 0,0001$ . **B**, Proliferation MBP<sub>GFP</sub>-spezifischer Ratten T-Zellen in Kultur mit professionellen APC des Thymus in der Gegenwart von MBP oder OVA (Kontrollantigen). Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen BZ194 oder Nikotinsäure und DMSO als Lösungsmittel inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels Cytofluorimetrie. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, Triplikate, repräsentativ für 12 unabhängige Experimente). \*  $p \leq 0,0001$ . **C**, IL-2 Sekretion MBP-spezifischer humaner T-Zellen nach Stimulation mit TT oder MBP in der Gegenwart von DMSO (Vehikelkontrolle) oder BZ194 (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, Triplikate, repräsentativ für drei unabhängige Experimente). \*  $p \leq 0,0001$ . **D**, Proliferation MBP-spezifischer humaner T-Zellen nach Stimulation mit MBP oder OVA (Kontrollantigen). Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen BZ194 inkubiert. Es wurde die [<sup>3</sup>H] Thymidin Inkorporation gemessen. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, Triplikate, repräsentativ für drei unabhängige Experimente). \*  $p \leq 0,0001$ . [Die Daten wurden erhoben und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Chiara Chordiglieri und PD Dr. Alexander Flügel, MPI, Martinsried.]

### 4.3 Ein synthetisches cADPR-Analogon als wirksamer Agonist in den Ca<sup>2+</sup>-Signalsystemen humaner T-Lymphocyten

Kooperationspartner unserer Arbeitsgruppe um Prof. Liangren Zhang und Prof. Lihe Zhang an der Universität Peking in China synthetisierten und charakterisierten kürzlich eine Reihe neuartiger cADPR Analoga mit Adenin als Base, bei denen die „nördliche“ Ribose (*northern ribose*, Abb. 4.18 A) durch eine Etherbrücke oder unterschiedliche Alkanketten ersetzt worden war. Die Substanzen wurden auf Ihre biologische Aktivität in Jurkat T-Lymphocyten getestet. Die Versuchsergebnisse zu einer der neu synthetisierten Substanzen, cADPRcE (Abb. 4.18 B), sind in diesem Abschnitt des Ergebnisteils wiedergegeben.

Der cADPR-abhängige Ca<sup>2+</sup>-Signalweg ist ein wesentlicher Bestandteil der Ca<sup>2+</sup>-Signalwege in T-Lymphocyten und für die Aktivierung dieses Zelltyps unerlässlich (Guse et al., 1999; Guse, 2004). Vor diesem Hintergrund zeigte das synthetische cADPR-Analogon cADPRcE aufgrund seiner hydrophoben Modifikation einige interessante Eigenschaften. So wie kürzlich schon für ein strukturell verwandtes, künstliches cADPR-Analogon, cIDPRE, gezeigt werden konnte (Gu et al., 2004), war die Substanz cADPRcE in der Lage, die Plasmamembran von T-Lymphocyten durch Diffusion zu überwinden. Sobald sie das Cytosol erreichte, löste sie ein prominentes Ca<sup>2+</sup>-Signal mit transientem Ca<sup>2+</sup>-Peak aus, der von einer lang anhaltenden Plateauphase mit erhöhter Ca<sup>2+</sup>-Konzentration gefolgt wurde (Abb. 4.18 C). Im Vergleich zum Ca<sup>2+</sup>-Signal einer TCR/CD3-abhängigen Stimulation war die Substanz cADPRcE ein Agonist des cADPR-Ca<sup>2+</sup>-Signalwegs (Abb 4.18 C). Es fiel auf, dass cADPRcE keinen so prominenten Ca<sup>2+</sup>-Peak induzierte, wie er nach Stimulation des TCR/CD3-Komplexes auftrat. Die Verläufe beider Ca<sup>2+</sup>-Signale waren vor allem während der langanhaltenden Plateauphase erhöhter Ca<sup>2+</sup>-Konzentration einander sehr ähnlich.

Im Laufe der konfokalen Ca<sup>2+</sup>-Messungen auf Einzelzellebene wurde deutlich, dass die Substanz cADPRcE vor dem Eintreten eines globalen Ca<sup>2+</sup>-Signals subzelluläre Ca<sup>2+</sup>-Signale induzierte (Abb. 4.18 D). Die Regionen, in denen diese lokalen Ca<sup>2+</sup>-Signale auftraten, fanden sich hauptsächlich in der Nähe der Plasmamembran sowie inmitten des Cytosols der T-Zellen wieder.

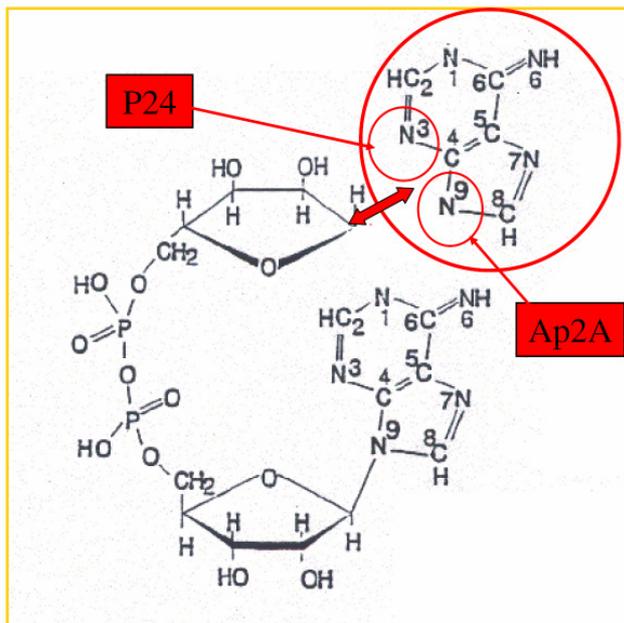


**Abb. 4.18: Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung durch das synthetische cADPR-Analogon cADPRcE in einzelnen T-Zellen.** Jurkat T-Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen und mittels des ratiometrischen, konfokalen Ca<sup>2+</sup>-Imaging in Anwesenheit von 1 mM Ca<sup>2+</sup> extrazellulär vermessen. **A** und **B**, cADPR Struktur (**A**) und im Vergleich dazu die Struktur des synthetischen Analogons cADPRcE. **C**, Ca<sup>2+</sup>-Signalverläufe dreier Zellen, die mit cADPRcE (0,5 mM), dem anti-CD3 Antikörper OKT3 oder Messpuffer (Vehikelkontrolle) stimuliert wurden. **D**, Es sind charakteristische ratiometrische Bilder der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> einer Jurkat T-Zelle in Falschfarbendarstellung zu sehen. Desweiteren wurde ein ausgewählter subzellulärer Bereich vergrößert abgebildet. Die verschiedenen Phasen der Messung sind gekennzeichnet (basale Phase vor Zugabe von 10 a, die sich anschließende Schrittmacher-Phase und die globale Phase). Der Messbalken in der unteren Bilderreihe entspricht eine Länge von 1  $\mu$ m. [Die Daten wurden gemeinsam erhoben mit Jianfeng Xu, Universität Peking, China.]

#### 4.4 Zwei natürlich vorkommende cADPR-Metabolite als wirksame Agonisten in den $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystemen humaner HeLa-Karzinomzellen

Nachdem im vorherigen Abschnitt ein synthetisches cADPR-Analogon vorgestellt und seine  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Eigenschaften beschrieben wurden, werden in diesem Kapitel zwei natürlich vorkommende cADPR-Metabolite genannt, P24 und Ap2A, die im Gegensatz zum Signalmolekül cADPR linear sind und über zwei Adeninbasen verfügen (Abb. 4.19).

Die ADP-Ribosylcyclasen (ADPRCs) des Menschen, CD38, des Mollusken *Aplysia californica* und des Schwammes *Axinella polypoides* sind in der Lage, aus Adenin und cADPR die beiden linearen cADPR-Metabolite P24 und Ap2A zu bilden (Basile et al., 2005).

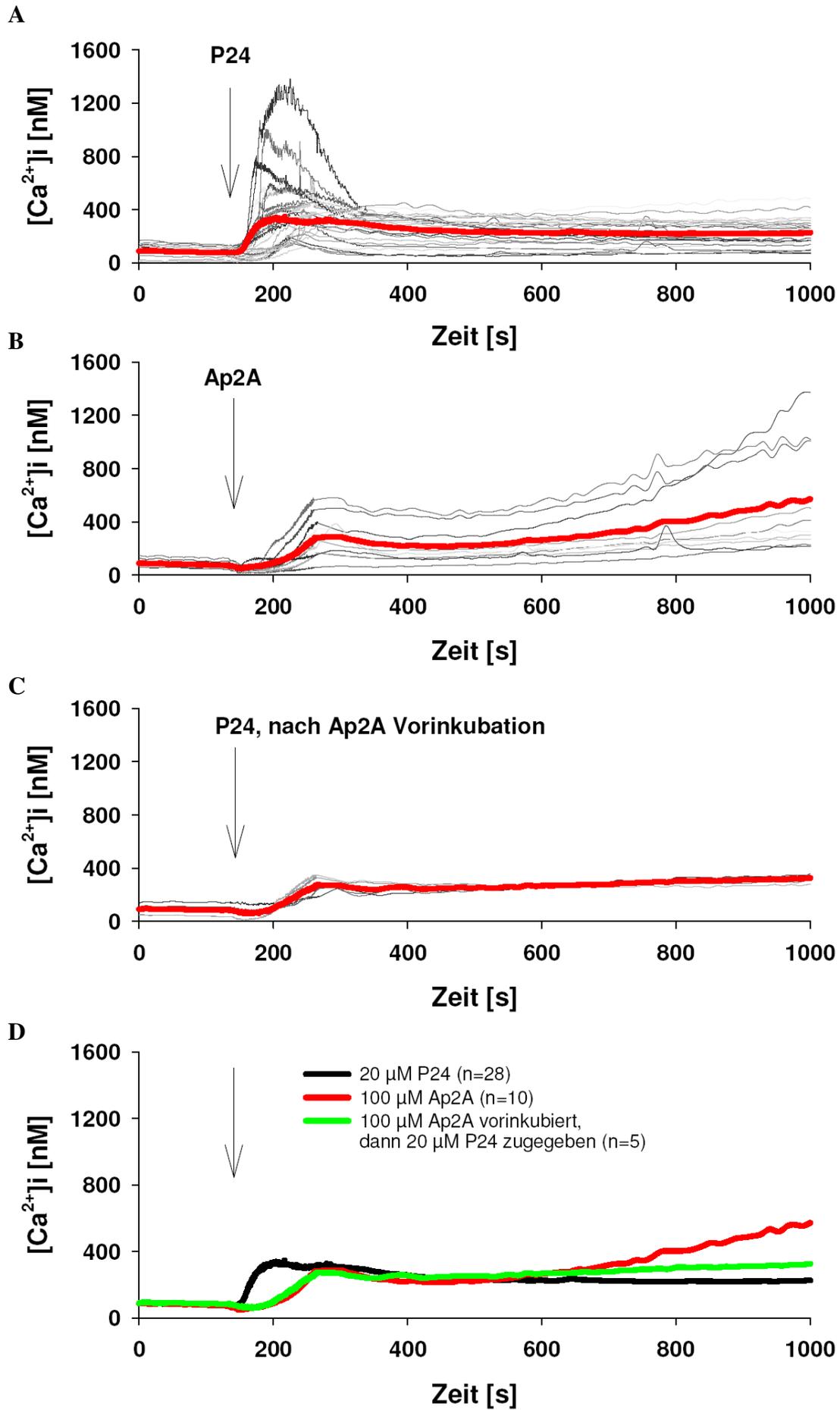


**Abb. 4.19: Strukturen zweier physiologischer, cADPR-verwandter NAD-Metabolite, P24 und Ap2A.**

Die ADPR-Cyclasen des Menschen, (CD38), des Mollusken *A. californica* und des Schwammes *A. polypoides* sind in der Lage, zwei bis vor kurzem unbekannte Nukleotide (P24 und Ap2A) aus cADPR und Adenin zu synthetisieren. Ap2A ist über eine C1'-N9 N-glykosidische Bindung mit einem zweiten Adeninmolekül verbunden, P24 über eine C1'-N3 N-glykosidische Bindung. Beide Moleküle sind im Gegensatz zum zyklischen cADPR linear.

[Die Abbildung wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Giovanna Basile und Prof. A. de Flora, Universität Genua, Italien.]

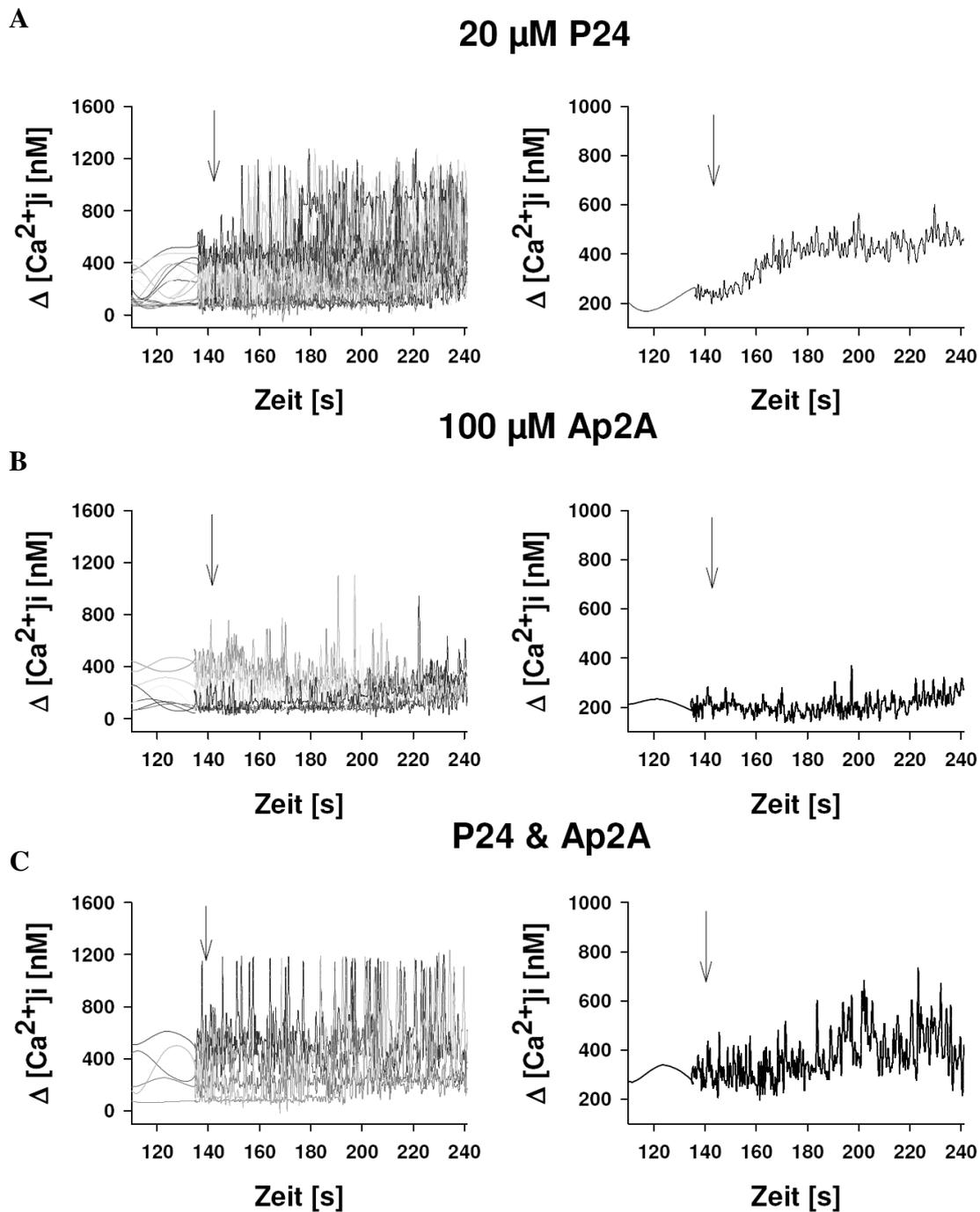
In einer ersten Reihe von Experimenten konnte mit Hilfe konfokaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen auf Einzelzellebene demonstriert werden, dass beide Metabolite bei extrazellulärer Zugabe membranpermeant waren und in HeLa Karzinomzellen  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Eigenschaften besaßen (Abb. 4.20).



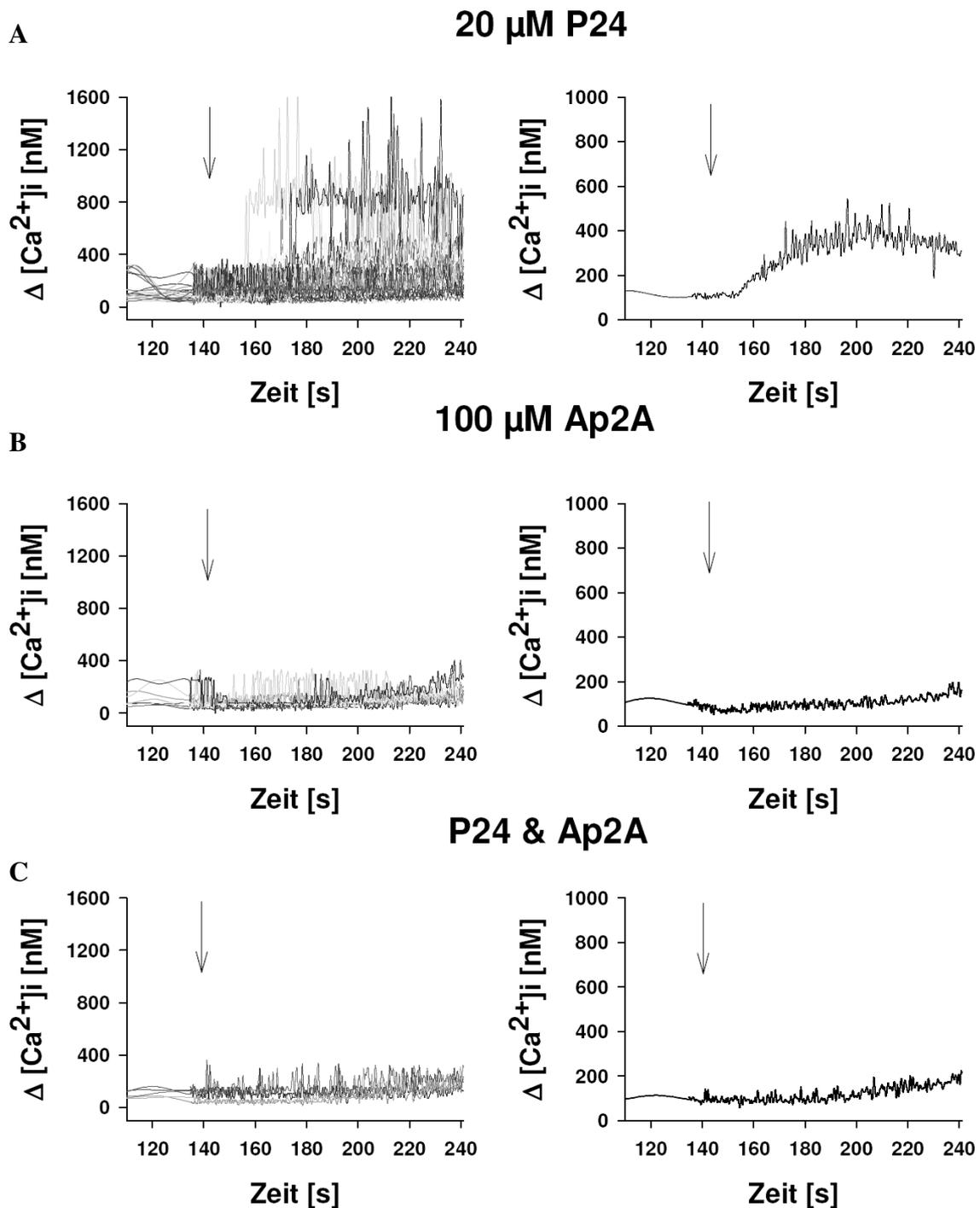
**Abb. 4.20: Effekte der cADPR-Metabolite P24 und Ap2A auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsysteme in HeLa Zellen.** HeLa Karzinom Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen und nach Substanzzugabe mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging untersucht. **A**,  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nach Zugabe von P24 (20  $\mu\text{M}$ ); Mittelwerte in rot ( $n = 28$ ). **B**,  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nach Zugabe von Ap2A (100  $\mu\text{M}$ ); Mittelwerte in rot ( $n = 10$ ). **C**, HeLa Zellen wurden mit 100  $\mu\text{M}$  Ap2A für 30 min bei 37 °C vorinkubiert und anschließend die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nach Stimulation mit P24 (20  $\mu\text{M}$ ) gemessen; Mittelwerte in rot ( $n = 5$ ). **D**, Vergleich der gemittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale aus A – C. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der Substanzzugabe.

Die Zugabe von P24 alleine löste in den Zellen eine prominente  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort aus, die sich aus einem schnell einsetzenden initialen, transienten  $\text{Ca}^{2+}$ -Peak und einer lang anhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Plateauphase zusammensetzte (Abb. 4.20 A). Wenn man Ap2A alleine zu den Zellen gab, erfolgte auch hier die Entstehung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals, aber der transiente  $\text{Ca}^{2+}$ -Peak setzte verzögert ein und war insgesamt etwas schwächer (Abb. 4.20 B). Auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Plateauphase entwickelte sich differenzierter, indem die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zum Ende der Messungen hin stark zunahm und nicht auf einem konstanten Niveau blieb wie bei P24 (Abb. 4.20 B). In Kombinationsexperimenten mit beiden Substanzen zeigte sich schließlich, dass P24-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nach Vorinkubation der HeLa Zellen mit Ap2A ebenfalls nur verzögert eintraten und darüber hinaus die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während der lang anhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Plateauphase deutlich zunahm (Abb. 4.20 C). Wenn man jedoch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Plateauphasen aller drei Konditionen anhand der gemittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalverläufe miteinander vergleicht, fällt sofort auf, dass beim kombinierten Einsatz von Ap2A und P24 die Zunahme der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration langsamer und schwächer erfolgte als nach der alleinigen Zugabe von P24 (Abb. 4.20 D).

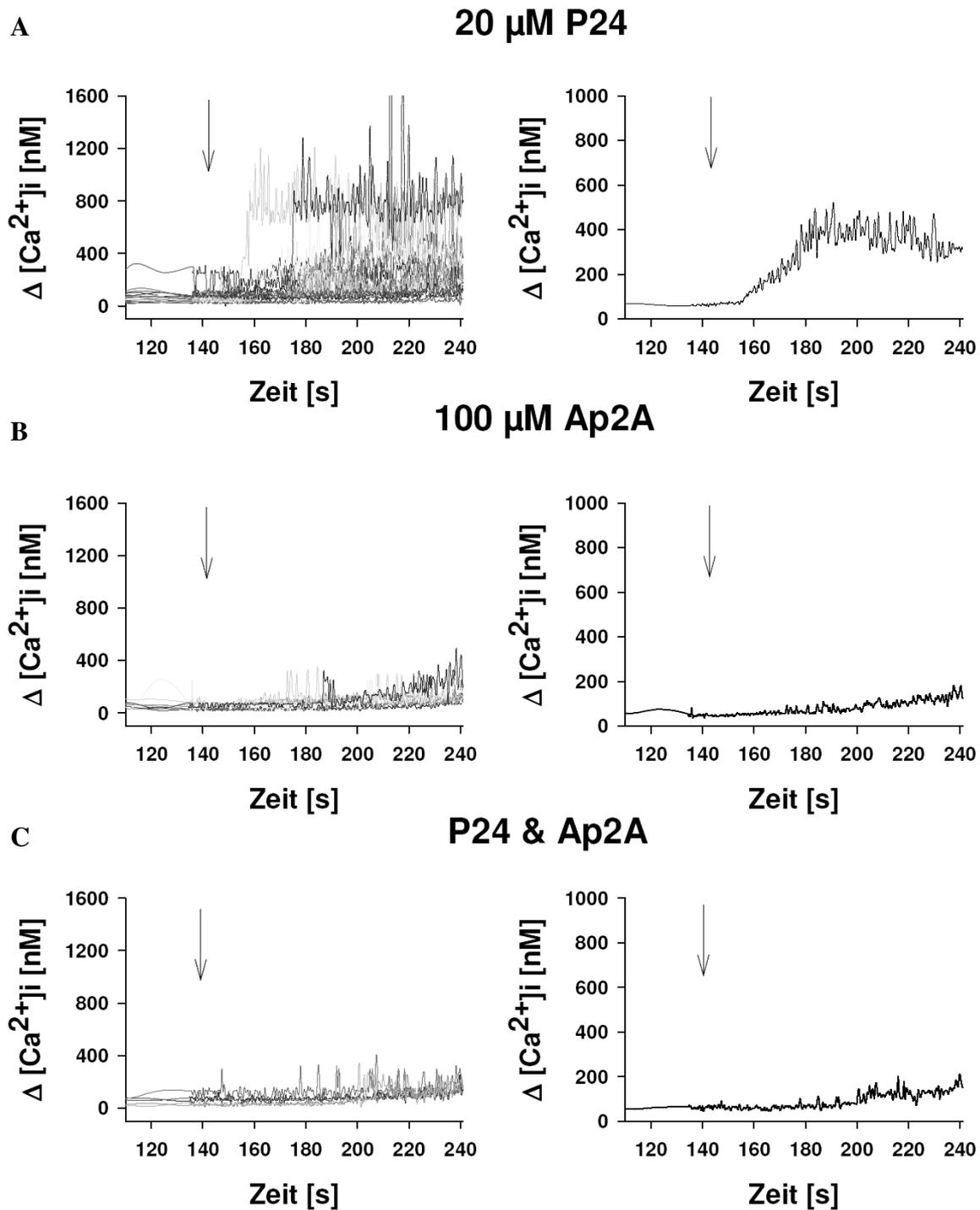
Nach der Untersuchung der globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale wurden auch die subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale einer genauen Analyse unterzogen, wodurch sich weitere Erkenntnisse gewinnen ließen. Auf der Ebene der subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale jedoch unterschieden sich die beiden Substanzen deutlich voneinander. P24 löste in einer sog. „Schrittmacher“-Phase nach Zugabe frühzeitig lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale mit steigenden Signalamplituden aus, die sich zuerst in der Nähe der Plasmamembran formierten, um dann weiter in das Cytosol und dann den Nukleus vorzudringen (Abb. 4.21 A, 4.22 A und 4.23 A). Abbildung 4.24 A zeigt beispielhaft einen Bereich des Cytosols mit hoher subzellulärer Aktivität.



**Abb. 4.21: Effekte der cADPR-Metabolite P24 und Ap2A auf die subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nahe der Plasmamembran in HeLa Zellen.** HeLa Karzinom Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen und nach Substanzzugabe mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging untersucht. Lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten wurden im Cytosol nahe der Plasmamembran gemessen und als Differenz der maximalen Signalamplitude zur Amplitude der näheren Umgebung dargestellt. Subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale wurden nach Zugabe von, **A**, P24 (20  $\mu\text{M}$ ) (Mittelwerte,  $n = 28$ ), von, **B**, Ap2A (100  $\mu\text{M}$ ) (Mittelwerte,  $n = 10$ ) und von, **C**, P24 nach Ap2A Vorinkubation (30 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ ) (Mittelwerte,  $n = 5$ ) gemessen. Auf der linken Seite finden sich die einzelnen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalverläufe jeder Zelle und auf der rechten Seite die gemittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalverläufe. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der Substanzzugabe.



**Abb. 4.22: Effekte der cADPR-Metabolite P24 und Ap2A auf die subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale des Cytosols in HeLa Zellen.** HeLa Karzinom Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen und nach Substanzzugabe mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging untersucht. Lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten wurden im Cytosol gemessen und als Differenz der maximalen Signalamplitude zur Amplitude der näheren Umgebung dargestellt. Subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale wurden nach Zugabe von, **A**, P24 (20  $\mu\text{M}$ ) (Mittelwerte,  $n = 28$ ), von, **B**, Ap2A (100  $\mu\text{M}$ ) (Mittelwerte,  $n = 10$ ) und von, **C**, P24 nach Ap2A Vorinkubation (30 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ ) (Mittelwerte,  $n = 5$ ) gemessen. Auf der linken Seite finden sich die einzelnen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalverläufe jeder Zelle und auf der rechten Seite die gemittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalverläufe. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der Substanzzugabe.



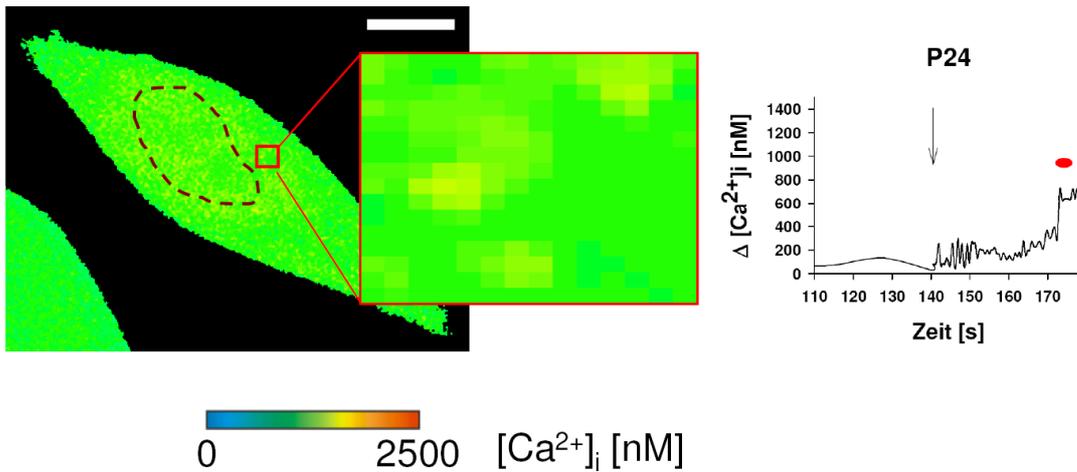
**Abb. 4.23: Effekte der cADPR-Metabolite P24 und Ap2A auf die subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale des Nukleus in HeLa Zellen.** HeLa Karzinom Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen und nach Substanzzugabe mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging untersucht. Lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten wurden im Cytosol gemessen und als Differenz der maximalen Signalamplitude zur Amplitude der näheren Umgebung dargestellt. Subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale wurden nach Zugabe von, **A**, P24 (20  $\mu\text{M}$ ) (Mittelwerte,  $n = 28$ ), von, **B**, Ap2A (100  $\mu\text{M}$ ) (Mittelwerte,  $n = 10$ ) und von, **C**, P24 nach Ap2A Vorinkubation (30 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ ) (Mittelwerte,  $n = 5$ ) gemessen. Auf der linken Seite finden sich die einzelnen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalverläufe jeder Zelle und auf der rechten Seite die gemittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalverläufe. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der Substanzzugabe.

Im Gegensatz zu P24 löste Ap2A nach Zugabe keine subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale mit steigenden Signalamplituden in der gleichen „Schrittmacher“-Phase wie P24 aus. Die Regionen in der Nähe der Plasmamembran, das gesamte Cytosol und der Nukleus blieben ruhig auf einem Niveau mit basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen und kleinen Signalamplituden (Abb. 4.21 B, 4.22 B und 4.23 B). Das anhaltende Ruhenniveau basaler, subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Bereichen des Cytosols gibt Abbildung 4.24 B repräsentativ wieder.

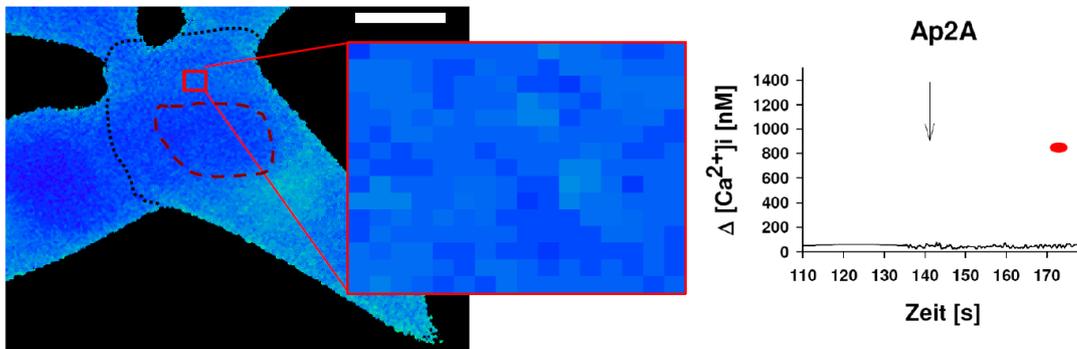
Eine weitere Auffälligkeit auf Ebene der subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale ergab sich bei den  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen mit Ap2A-Vorinkubation und anschließender P24-Zugabe. Während der „Schrittmacher“-Phase induzierte P24 lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale mit steigenden Signalamplituden in Bereichen des Cytosols nahe der Plasmamembran (Abb. 4.21 C). Diese Signale ähnelten in Stärke und Geschwindigkeit ihrer Entstehung denen aus den Experimenten mit P24 Zugabe alleine (Abb. 4.21 A). Obwohl diese Ereignisse sehr ausgeprägt waren, pflanzten sie sich nicht von der Plasmamembran aus bis in das Cytosol und den Nukleus fort (Abb. 4.22 C, 4.23 C). Das gesamte Cytosol und der Nukleus blieben ruhig auf einem Niveau mit basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen und kleinen Signalamplituden (Abb. 4.24 C).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in humanen HeLa Karzinomzellen (i) P24 alleine frühzeitig prominente globale und subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale auslöste, (ii) Ap2A im Gegensatz dazu nur verzögert globale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale induzierte und die subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in der „Schrittmacher“-Phase in den Bereichen nahe der Plasmamembran, des Cytosols und des Nukleus auf Ruhenniveau verblieben. Darüber hinaus zeigte sich in Kombinationsexperimenten mit Ap2A und P24, dass (iii) Ap2A nach Vorinkubation das Auftreten P24-vermittelter globaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale verzögerte und starke lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale auf Bereiche der Plasmamembran beschränkt blieben.

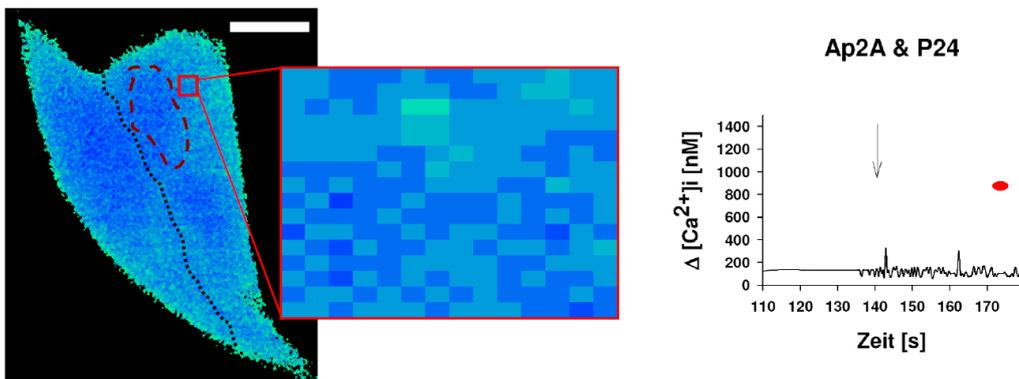
A



B



C



**Abb. 4.24: Effekte der cADPR-Metabolite P24 und Ap2A auf die subzellulären  $Ca^{2+}$ -Signale des Cytosols in HeLa Zellen.** HeLa Karzinom Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen und nach Substanzzugabe mittels  $Ca^{2+}$ -Imaging untersucht. Lokale  $Ca^{2+}$ -Antworten wurden im Cytosol gemessen und als Differenz der maximalen Signalamplitude zur Amplitude der näheren Umgebung dargestellt. Subzelluläre  $Ca^{2+}$ -Signale wurden nach Zugabe von, **A**, P24 (20  $\mu$ M), von, **B**, Ap2A (100  $\mu$ M) und von, **C**, P24 nach Ap2A Vorinkubation (30 min, 37 °C) gemessen. Auf der linken Seite finden sich einzelne HeLa Zellen mit einer Falschfarbendarstellung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration wieder. Zusätzlich wurde ein ausgewählter Bereich des Cytosols mit einer Größe von ca. 2 x 2  $\mu$ m vergrößert abgebildet. Alle Zeitpunkte für die Aufnahmen lagen bei 180 s (durch rote Punkte auf der rechten Seite mit den  $Ca^{2+}$ -Signalverläufen markiert). Die Länge der Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu$ m. Die gepunkteten schwarzen Linien kennzeichnen die Zellgrenzen, während die gestrichelten dunkelroten Linien die ungefähre Position des Zellkerns markieren. Auf der rechten Seite sind die dazugehörigen  $Ca^{2+}$ -Signalverläufe verzeichnet. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der Substanzzugabe.

## 5 Diskussion

### 5.1 NAADP als primärer $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzender sekundärer Botenstoff in humanen T-Lymphocyten

Subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale gehen in der sog. *pacemaker*-Phase globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen und -Oszillationen voraus und spielen damit eine entscheidende Rolle für T-Lymphocyten auf dem Weg zur Proliferation und Differenzierung. Erst vor kurzer Zeit gelang es, die Bedeutung der subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in den Signalwegen näher zu untersuchen, die zu einer Aktivierung der T-Lymphocyten führen (Kunerth et al., 2004). Unter weitgehend physiologischen Bedingungen konnte an T-Lymphocyten gezeigt werden, dass neben dem sekundären Botenstoff  $\text{IP}_3$  und seinem Rezeptor auch der sekundäre Botenstoff cADPR sowie der Ryanodin-Rezeptor an der Initiation, Modulation und Ausbreitung subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beteiligt sind (Guse, 2004) a; (Guse, 2004) b).

Eine Stimulation des TCR/CD3-Rezeptorkomplexes führte zu einer erhöhten  $\text{IP}_3$ -Konzentration und zu einer Aktivierung des  $\text{IP}_3$ -Rezeptors (Guse et al., 1993). cADPR wurde im Vergleich langsamer gebildet und aktivierte den Ryanodin-Rezeptor verzögert (Guse et al., 1999). Die  $\text{IP}_3$ -Konzentration erreichte bereits drei Minuten nach Stimulation ihren Höchstwert, um dann innerhalb der nächsten fünf bis zehn Minuten wieder abzufallen (Guse et al., 1993). Im Gegensatz dazu stieg die cADPR-Konzentration erst fünf bis zehn Minuten nach Stimulation signifikant an und blieb anschließend über eine Stunde auf einem konstant hohen Niveau (Guse et al., 1999).

Initiale, subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale des  $\text{IP}_3$ -Rezeptors wurden durch eigene  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale des Ryanodin-Rezeptors verstärkt. Darüber hinaus fand eine gegenseitige Amplifikation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten über  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (CICR) statt (Kunerth et al., 2004). Ausgehend von der Plasmamembran breiteten sich die subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale entlang der Ryanodin-Rezeptoren ins Zellinnere aus, bis sich daraus ein globales  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal entwickelte (Kunerth et al., 2004).

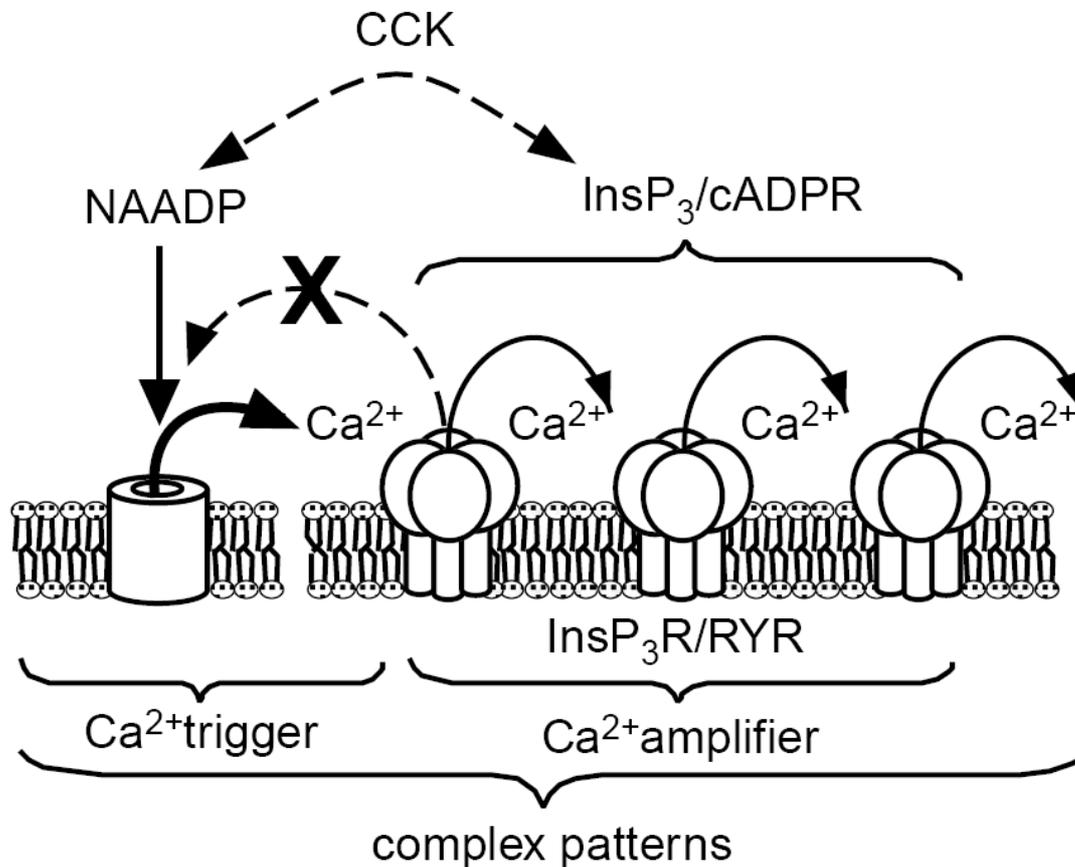
Im Bereich des Cytosols sowie des Zellkerns traten nach physiologischer Stimulation subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale erhöhter Frequenz nur bei Expression des Ryanodin-Rezeptor-Typs 3 auf und wurden durch cADPR moduliert (Kunerth et al., 2004). Eine Variation der Amplituden konnte hingegen unter keinen Versuchsbedingungen festgestellt werden (ebd.). Die räumliche Gleichverteilung von  $\text{IP}_3$ - und Ryanodin-Rezeptoren im Bereich der Plasmamembran sprach für eine konzertierte Aktion dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle bei der Generierung subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale (Kunerth et al., 2004).

In Anlehnung an diese Resultate erlauben die Ergebnisse des ersten Teils (4.1) der hier vorliegenden Arbeit einen ergänzenden Blick auf die Stellung des sekundären Botenstoffs NAADP sowie des Ryanodin-Rezeptors innerhalb des Signalwegs subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale. Vorhergehende pharmakologische und molekularbiologische Untersuchungen hatten bereits gezeigt, dass NAADP in Abhängigkeit vom Ryanodin-Rezeptor in humanen T-Lymphocyten globale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale induzierte (Langhorst et al., 2004).

Die Mikroinjektionen von 100 und 30 nM NAADP vermochten beide jeweils globale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in T-Zellen zu induzieren, wobei letztere mit einigen Sekunden Verzögerung entstanden und zuvor eingeleitet wurden durch lokale, d.h. subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale. Somit war erfolgreich eine Voraussetzung geschaffen worden, um die Eigenschaften und Abhängigkeiten NAADP-induzierter, subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale eingehender zu untersuchen.

Vor kurzem wurde nach einer Reihe eindrucksvoller Experimente an Acinuszellen des Pankreas ein Modell zur Entstehung und Rolle NAADP-abhängiger, lokaler und globaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale aufgestellt (Cancela et al., 1999; Cancela et al., 2000). Dieses sogenannte *2-pool model* (Abb. 5.1) besagt, dass NAADP nach physiologischer Stimulation (hier: CCK) an einen NAADP-Rezeptor bindet, so dass lokal begrenzt  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird, die vom ER unterscheidbar sind. Der NAADP-Rezeptor ist hierbei nicht identisch mit dem Ryanodin Rezeptor. Mit Hilfe dieses Startersignals werden benachbarte  $\text{IP}_3$ - und Ryanodin Rezeptoren über CICR aktiviert und entleeren  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER in das Cytosol. Der Prozess wird darüber hinaus noch besonders in Anwesenheit der beiden anderen  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden,

sekundären Botenstoffe  $IP_3$  und  $cADPR$  verstärkt. Andererseits unterliegt der NAADP-Rezeptor nicht dem Einfluss von CICR.



**Abb. 5.1: 2-pool model.** NAADP setzt zuerst  $Ca^{2+}$  aus NAADP-abhängigen, intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speichern frei. Mit Hilfe dieses Startersignals werden über CICR benachbarte  $IP_3$ - und Ryanodin Rezeptoren mobilisiert, so dass es zu einer sich selbst verstärkenden und auch fortpflanzenden  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER kommt. CICR hat keinerlei Einfluss auf den NAADP-Rezeptor. Desweiteren wird der CICR in Anwesenheit der beiden anderem sekundären Botenstoffe  $cADPR$  und  $IP_3$  verstärkt. (verändert nach (Cancela et al., 1999))

Vor dem Hintergrund dieses *2-pool models* und ausgehend von der Tatsache, dass in dieser Arbeit subzelluläre  $Ca^{2+}$ -Signale mit einer ausreichend großen Verweildauer in humanen T-Zellen generiert werden konnten (s.o.), kristallisierte sich im Verlaufe der weiteren Untersuchungen ein anderes Modell heraus.

Cancela et al. demonstrierten kürzlich, dass in Acinuszellen des Pankreas NAADP-vermittelte, subzelluläre  $Ca^{2+}$ -Signale durch eine inhibitorische Ryanodinkonzentration unterdrückt wurden (Cancela et al., 2000). Da im Seeigeleisystem aber eine Inhibition der Ryanodin Rezeptoren keine Hemmung der NAADP-vermittelten  $Ca^{2+}$ -

Freisetzung zur Folge hatte (Lee and Aarhus, 1995), interpretierten Cancela et al. ihre Daten nicht als direkten Effekt des Ryanodins auf die NAADP-Sensitivität des Ryanodin Rezeptors. Vielmehr gingen sie davon aus, dass NAADP nach wie vor ein Startersignal induzierte und lediglich die sich anschließende Verstärkung über CICR durch Ryanodin aufgehalten wurde. Yamasaki et al. gelang es kürzlich in einigen Arbeiten aufzuzeigen, dass NAADP in Acinuszellen und  $\beta$ -Zellen des Pankreas Calcium aus einem anderen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher als das ER freisetzte, auf das  $\text{IP}_3$  und cADPR wirkten (Yamasaki et al., 2004; Yamasaki et al., 2005). Die NAADP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale entstanden direkt nach der physiologischen Stimulation über CCK und der damit verknüpften Erhöhung der intrazellulären NAADP-Konzentration (Yamasaki et al., 2005). NAADP interagierte auch hier nicht mit dem Ryanodin Rezeptor (Yamasaki et al., 2005). Diese Erkenntnisse unterstützten die Aussage von Cancela et al., dass NAADP lediglich ein Startersignal induzierte (Cancela et al., 2000; Cancela et al., 2002).

Auch in humanen T-Zellen mündete die pharmakologische Inhibition sowie die molekularbiologisch herbeigeführte, erniedrigte Expression des Ryanodin Rezeptors in einer Hemmung NAADP-vermittelter, globaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale (Langhorst et al., 2004). Obwohl dieses Ereignis von Langhorst et al. auf die direkte Inhibition des Rezeptors zurückgeführt wurde, bestand nach wie vor die Möglichkeit, dass sich NAADP in humanen T-Zellen ähnlich verhielt, wie es von Cancela et al. für die Acinuszellen postuliert worden war (s.o.).

In den Experimenten der hier vorliegenden Arbeit erreichte man durch die Koinjektion der Inhibitoren Ruthenium Rot und Ryanodin mit NAADP, dass NAADP-induzierte, subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale im Jurkat-Klon JMP vollständig unterdrückt wurden (s. Abb. 4.3 und 4.4). Die gemessenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale überstiegen, was ihre Amplitude betraf, nicht das übliche Ruhenniveau der Zellen. Um jedoch mögliche Unspezifitäten beim Einsatz der beiden Antagonisten auszuschließen, untersuchte man noch in Form von Positivkontrollen die Wirkung der beiden Substanzen Heparin sowie SKF 96365 auf die Entwicklung NAADP-vermittelter, subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale. Bei Heparin handelt es sich um einen Antagonisten des  $\text{IP}_3$ -Rezeptors (Bultynck et al., 2003) und bei SKF 96365 um einen Blocker des ( $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten)  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx (Merritt et al., 1990). In der Tat reduzierte die Koinjektion von NAADP mit

Heparin bzw. die NAADP-Mikroinjektion nach Vorinkubation der Zellen mit SKF 96365 nicht nennenswert den Aufbau subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale. Im Gegenteil waren die Signalamplituden im Vergleich zu denen nach reinen NAADP-Mikroinjektionen sogar noch leicht erhöht. Dieser unterschwellige, agonistische Effekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung wurde sowohl für Heparin (Bezprozvanny et al., 1993) als auch für SKF 96365 (Merritt et al., 1990) bereits ausführlich dokumentiert. Letztlich konnte mit diesen Positivkontrollen die Spezifität der beiden Antagonisten Ryanodin (in hoher Konzentration) und Ruthenium Rot hinsichtlich des Ryanodin Rezeptors unterstrichen werden.

Zur weiteren Untermauerung der bis hierher gemachten Beobachtungen verglich man noch cADPR-vermittelte, subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale mit NAADP-vermittelten, subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen (s. Abb. 4.5). Da für cADPR die direkte Wirkung auf den Ryanodin Rezeptor als gesichert gelten konnte (Gerasimenko und Gerasimenko, 2004; Guse, 2004; Lee, 2001), sollten etwaige Ähnlichkeiten der räumlichen und zeitlichen Eigenschaften der subzellulären Signale für NAADP denselben Schluss zulassen. Es stellte sich dann in der Tat heraus, dass sich die subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nach cADPR- oder NAADP-Mikroinjektion sehr ähnlich entwickelten. Die ersten subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale traten lokal begrenzt in Randbereichen der Zellen auf und breiteten sich anschließend ringartig entlang der Plasmamembran aus. Danach wurden noch das Cytosol sowie der Nukleus erfasst. Es formte sich ein globales  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal. Nach der Erfassung dieser charakteristischen Details ging man noch einen Schritt weiter. Es sollte durch die Koinjektion einer hohen Konzentration von NAADP zusammen mit cADPR der NAADP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg autoinaktiviert und dann die cADPR-abhängigen, subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale analysiert werden. Bekanntlich ging diese Autoinaktivierung in humanen T-Zellen mit einer gleichzeitigen Inhibition  $\text{IP}_3$ - und cADPR-vermittelter, globaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale einher (Berg et al., 2000). Tatsächlich konnten nach der Koinjektion keine lokalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ereignisse mehr festgestellt werden, die oberhalb des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ruhelevels der T-Zellen lagen.

Auf zweierlei Art und Weise konnte so auch hier eine direkte Wirkungsbeziehung des Ryanodin Rezeptors mit NAADP aufgezeigt werden: (i) durch die große räumliche und zeitliche Ähnlichkeit der cADPR- und NAADP-vermittelten, subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -

Signale und (ii) durch die Hemmung cADPR-induzierter, subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nach Autoinaktivierung des NAADP- $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegs.

Insgesamt ergab sich nach den Ergebnissen der Arbeit mit der T-Zelllinie Jurkat JMP, dass (i) der Ryanodin-Rezeptor für die Generierung NAADP-vermittelter, subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale notwendig ist, und dass (ii) NAADP diese Signale auf Ebene der Amplituden moduliert.

Die bis zu diesem Zeitpunkt gezogenen Schlüsse zur NAADP-Ryanodin Rezeptor-Wirkungsbeziehung beruhten auf einer pharmakologischen Strategie und ließen sich mit Hilfe der Publikationen anderer Arbeitsgruppen noch zusätzlich gut untermauern. Hohenegger et al. zeigten vor kurzem (Hohenegger et al., 2002) mit einer Reihe eleganter Experimente (u.a. Einzelkanalmessungen am Ryanodin Rezeptor Typ 1 in *lipid planar bilayers*), dass NAADP den Ryanodin Rezeptor schon im nanomolaren Konzentrationsbereich öffnete und zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR führte. Dieser Effekt war mit Hilfe der beiden Antagonisten Ruthenium Rot und Ryanodin umkehrbar. Der strukturell nächste Verwandte des NAADP, der Redox-Metabolit NADP, entfaltete indes keine Wirkung. Desweiteren demonstrierten Gerasimenko et al., im Widerspruch zu den Schlüssen von Cancela et al. (Cancela et al., 1999), dass die NAADP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in Acinuszellen des Pankreas sehr wohl auf die direkte Aktivierung des Ryanodin Rezeptors zurückzuführen war (Gerasimenko und Gerasimenko, 2004; Gerasimenko et al., 2003; Gerasimenko et al., 2006). Es stellte sich heraus, dass NAADP  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER und lysosomalen Speichern freisetzte.

Da alle Untersuchungen zu NAADP und dem Ryanodin Rezeptor in der Hauptsache auf einer pharmakologischen Strategie fussten, wurde die pharmakologische Herangehensweise dieser Arbeit noch um eine molekularbiologische ergänzt.

Hierfür standen sowohl *knock-down* Zelllinien des Ryanodin-Rezeptors als auch eine Kontrollzelllinie bereit (Schwarzmann, 2002, Dissertation; (Schwarzmann et al., 2002), die mittels einer molekularbiologischen Strategie der *antisense-RNA* aus Tet On Jurkat-Klonen generiert worden waren (Elbashir et al., 2001; Fire et al., 1998; Novina und Sharp, 2004). Der Ryanodin-Rezeptor-Typ 3 ist die in Jurkat T-Lymphocyten vorherrschende Isoform. Über empfindliche *nested* RT-PCR konnten

auch Transkripte für die Isoformen 1 und 2 nachgewiesen werden (Schwarzmann, 2002, Dissertation). Mangels isotypspezifischer anti-humaner Antikörper ist ein Nachweis der Isoformen auf Proteinebene in Jurkat T-Lymphocyten gegenwärtig leider nicht möglich.

Die Zelllinie E2 ist ein Kontrollklon mit einem *antisense*-Konstrukt gegen das Reporterprotein EGFP und sollte keinen Einfluss auf zelluläre Prozesse ausüben. Mikroinjektionen mit 100 nM NAADP lösten globale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale aus (Langhorst et al., 2004), ohne dass diesen deutliche und länger anhaltende subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale vorausgingen. Erst Mikroinjektionen mit 30 nM NAADP erbrachten die gewünschten subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale (s. Abb. 4.6 und 4.7). Sie breiteten sich abhängig von dem Ort der Mikroinjektion, ausgehend von einem bestimmten Bereich unterhalb der Plasmamembran, zunächst entlang des Zellrands und dann ins Zellinnere aus. Der Jurkat-Klon E2 generierte dem Jurkat-Klon JMP qualitativ vergleichbare NAADP-vermittelte, globale und subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale. Es konnte somit ein zweites Mal demonstriert werden, dass NAADP, neben den etablierten sekundären Botenstoffen  $\text{IP}_3$  und cADPR, subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in humanen T-Lymphocyten hervorrufen konnte.

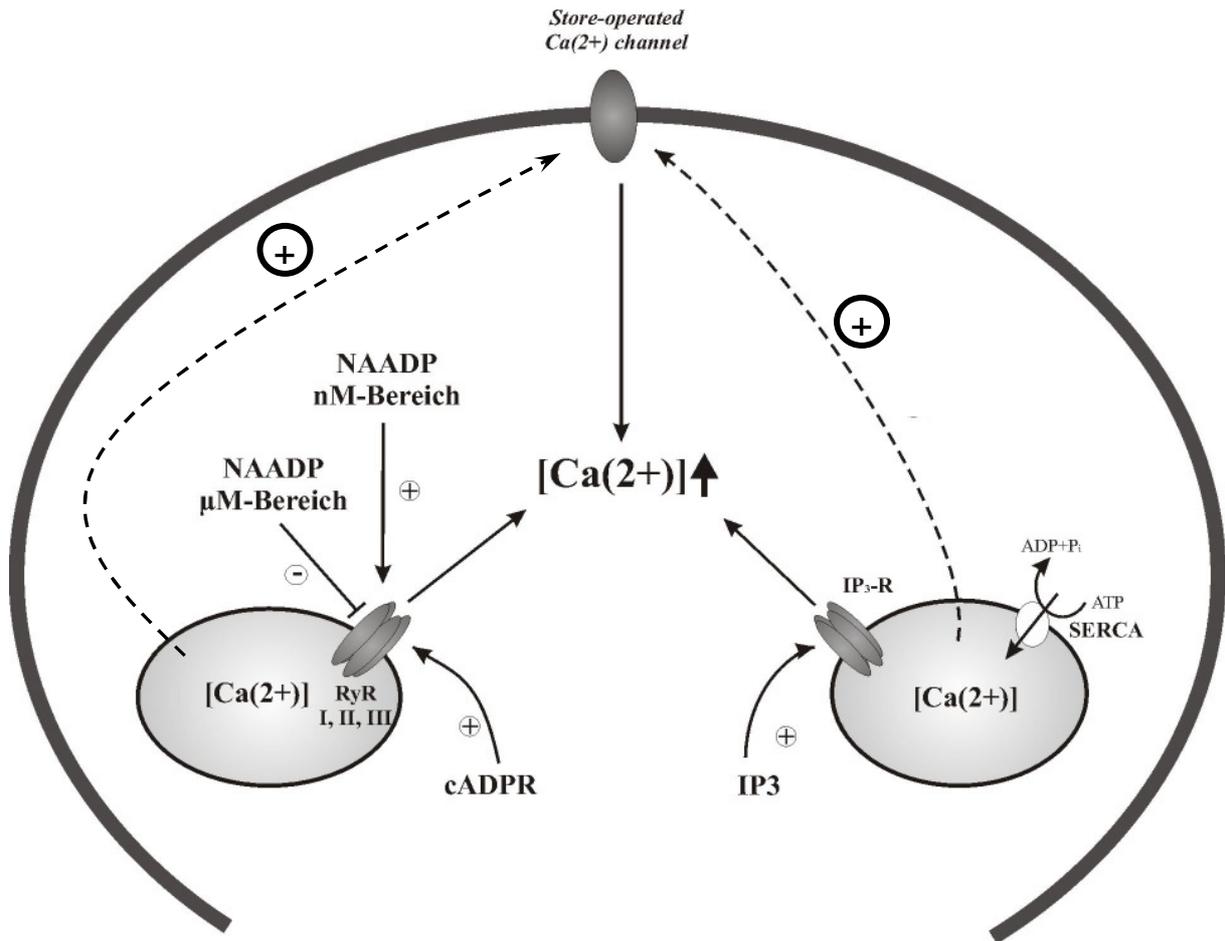
Die Zelllinie 10 exprimierte ein 240 bp stabiles *antisense*-Konstrukt, das neben einer 100%-igen Homologie zum Ryanodin-Rezeptor-Typ 3 auch eine hohe Homologie zu den Typen 1 und 2 besaß. Die homologen Abschnitte überschritten dabei weit die erforderliche Länge von 21 bp, die nötig sind, um native, zelluläre mRNA-Moleküle über *RNA-interference* vollständig abzubauen (Elbashir et al., 2001). Bei Mikroinjektionen von 30 nM NAADP blieben subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale aus und es wurde nur eine basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalaktivität gemessen (s. Abb 4.6 und 4.7). Im Fall der Kontrollkondition (Mikroinjektion von Intrazellulärpuffer) trat ebenfalls nur eine basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalaktivität auf. Dieser Klon zeigte eindrucksvoll, wie eine Reduktion der Ryanodin Rezeptor-Expression die Bildung NAADP-vermittelter, subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in humanen T-Lymphocyten unterband, und verifizierte so die mit dem Jurkat-Klon JMP gewonnenen pharmakologischen Daten. Dieser *knock-down* Klon ließ jedoch ebenfalls nicht den Schluss zu, dass die reduzierte Expression eines bestimmten Ryanodin Rezeptor-Typs für die ausbleibende  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort verantwortlich war. Auf Proteinebene galt, dass die Zelllinie 10 gegenüber der

Kontrollzelllinie E2 sowie der parentalen Zelllinie eine allgemein reduzierte Ryanodin Rezeptor-Expression aufwies (Schwarzmann, 2002, Doktorarbeit; (Schwarzmann et al., 2002). Eine isotypspezifische Charakterisierung des Ryanodin-Rezeptor-Expressionsmusters bedarf entsprechender anti-humaner Antikörper, welche, wie bereits bemerkt, zur Zeit nicht verfügbar sind.

Die Zelllinie 25 exprimierte stabil ein 511 bp *antisense*-Konstrukt, das eine 100%-ige Homologie zum Ryanodin-Rezeptor-Typ 3, jedoch eine nur geringe Homologie zu den Typen 1 und 2 besaß. Man ging daher davon aus, dass ausschließlich der Ryanodin-Rezeptor-Typ 3 in der Expression reduziert war (Schwarzmann et al., 2002). Mikroinjektionen mit 30 nM NAADP lösten ebenso wenig wie Intrazellulärpuffer subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale aus (s. Abb. 4.6 und 4.7). Der *knock-down* Klon verhielt sich vergleichbar dem Klon 10. Dies bestätigte die pharmakologischen Daten, die mit dem Jurkat-Klon JMP durch Koinjektion von Ruthenium Rot und Ryanodin gewonnenen wurden. Unter der Voraussetzung, dass im *knock-down* Klon 25 ausschließlich der in humanen T-Lymphocyten dominante Ryanodin Rezeptor-Typ 3 verschwindend gering exprimiert wurde, konnte die Suche nach einer funktionellen Unterscheidung der Ryanodin-Rezeptor-Typen eingegrenzt werden. Damit war die Notwendigkeit des Typ 3 Ryanodin Rezeptors für eine Generierung NAADP-vermittelter, subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale unterstrichen worden.

Ein Vergleich der Signalamplituden des Kontrollklons E2 mit den Basalamplituden der beiden *knock-down* Klone 10 und 25 nach Mikroinjektion von 30 nM NAADP zeigte deutlich, dass die Signalamplituden im Bereich der Plasmamembran, des Cytosols sowie des Zellkerns signifikant höher waren (s. Abb. 4.7). Ein *knock-down* des Ryanodin-Rezeptors bewirkte demnach eine Unterdrückung subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale und damit einhergehender erhöhter Signalamplituden.

Zusammengenommen bestätigten die Ergebnisse aus diesem Teil der Arbeit mit den Zelllinien E2, 10 und 25 die Daten des Jurkat-Klons JMP: Sie besagen, dass (i) der Ryanodin-Rezeptor für die Generierung NAADP-vermittelter, subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale notwendig ist, und dass (ii) NAADP diese Signale auf Ebene der Amplituden moduliert (Abb. 5.2).



**Abb. 5.2: Modell der Interaktion der verschiedenen Komponenten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegs in T-Lymphocyten.** Die beiden etablierten sekundären Botenstoffe cADPR und  $\text{IP}_3$  lösen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus pharmakologisch unterscheidbaren intrazellulären Speichern aus. Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale werden durch den kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx verstärkt. Das Membranprotein STIM1, das vor allem in der ER-Membran vorkommt, registriert über seine luminalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen die Entleerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichers. Daraufhin rückt es näher an die Plasmamembran heran oder wechselt in sie über (der genaue Modus ist noch strittig). Dort interagiert es mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal Ore1 bzw. CRACM und induziert dessen Öffnung. NAADP in nanomolaren Konzentrationen aktiviert den Ryanodin-Rezeptor. Mikromolare NAADP-Konzentrationen wirken inaktivierend.

+ ... aktivierende Einflüsse; - ... inhibierende oder inaktivierende Einflüsse

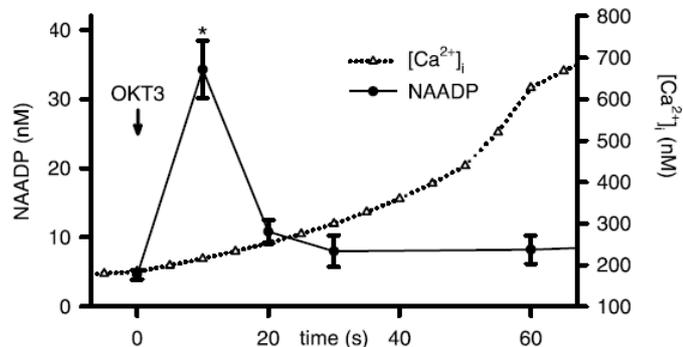
**RyR** ... Ryanodin-Rezeptor; **IP<sub>3</sub>-R** ... IP<sub>3</sub>-Rezeptor

Schritte, deren Mechanismus nach allerneuesten Erkenntnissen verstanden (s.o. STIM1&Ore1) worden ist, sind durch gestrichelte Pfeile gekennzeichnet (verändert nach Langhorst, 2003, Diplomarbeit)

Die Ergebnisse zur NAADP-Ryanodin Rezeptor-Wirkungsbeziehung aus dieser Arbeit reihen sich gut ein in weitere, neuere Erkenntnisse zu NAADP in humanen T-Lymphocyten (Gasser et al., 2006). Wie bereits weiter oben beschrieben wurde, löste die Stimulation des TCR/CD3-Rezeptorkomplexes in T-Zellen innerhalb weniger Sekunden einen schnellen Anstieg der intrazellulären NAADP-Konzentration aus (Abb. 5.3). Nach 20 Sekunden sank die Konzentration dann wieder auf ein Niveau herab wie kurz vor der Stimulation. Gleichzeitig erreichte die globale  $\text{Ca}^{2+}$ -

Konzentration Werte von weit über 200 nM. Diese Beobachtungen gehen recht gut einher mit der Entwicklung subzellulärer und

globaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nach NAADP-Mikroinjektion (Pipettenkonzentration: 30 nM). Wenn man von einer Verdünnung des NAADP nach Mikroinjektion um den Faktor 50 – 100 in der Zelle ausgeht, bewegt sich die finale, intrazelluläre NAADP-Konzentration nach Mikroinjektion in einem ähnlichen



**Abb. 5.3: Anstieg der intrazellulären NAADP-Konzentration nach TCR/CD3-Stimulation.** Die endogene NAADP-Konzentration stieg nach der Stimulation des TCR/CD3-Rezeptorkomplexes schnell an. Parallel dazu ist auch noch der Verlauf der globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wiedergegeben. (verändert nach (Gasser et al., 2006)).

Rahmen wie die NAADP-Konzentration nach TCR/CD3-Stimulation. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass NAADP in der initialen Phase der T-Zellaktivierung entscheidend ist für das Einschalten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegs, der dann später, moduliert durch die beiden anderen Botenstoffe  $\text{IP}_3$  und cADPR, die Differenzierung und Proliferation der T-Zellen steuert (Guse et al., 1999).

In Anbetracht aller Ergebnisse zur Struktur und Funktion NAADP-abhängiger, subzellulärer und globaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in humanen T-Lymphocyten und ergänzt durch kürzlich erschienene Arbeiten (Gasser et al., 2006; Langhorst et al., 2004) lässt sich festhalten, dass (i) NAADP direkt oder über ein putatives, akzessorisches Bindeprotein auf den Ryanodin Rezeptor wirkt und (ii) den primären,  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden, sekundären Botenstoff in humanen T-Lymphocyten darstellt.

Die offenen Fragestellungen auf diesem Gebiet sind: (i) Molekulare Identifikation und genaue pharmakologische Charakterisierung der NAADP-Bindungsstelle auf dem Ryanodin Rezeptor / des NAADP-Bindeproteins / des NAADP-Rezeptors, (ii) Identifikation und Kinetik der NAADP-aufbauenden bzw. -abbauenden Enzyme und (iii) im Falle des Ektoenzym CD38 die Auflösung des topologischen Paradoxons.

## 5.2 Funktion und Potential niedermolekularer NAADP-Antagonisten in eukaryontischen Zellsystemen und Tiermodellen

Im vorhergehenden Abschnitt dieser Arbeit wurde ausführlich über die Bedeutung des  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden, sekundären Botenstoffs NAADP in humanen T-Lymphocyten berichtet. NAADP nimmt dort den Rang des primären,  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden, sekundären Botenstoffs ein und ist noch vor  $\text{IP}_3$  und cADPR für die Aktivierung der zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalmaschinerie unbedingt erforderlich (Berg et al., 2000; Gasser et al., 2006). Diese Aktivierung ist ein Schlüsselereignis auf den Signalwegen der humanen T-Zellen in Richtung Proliferation und Differenzierung (Quintana et al., 2005; Winslow und Crabtree, 2005) und somit gleichzeitig von entscheidender Bedeutung für ein funktionierendes, humanes Immunsystem. T-Zellen, gerade in ihrer Ausprägung als T-Helferzellen ( $\text{T}_{\text{H}0}$ ,  $\text{T}_{\text{H}1}$  und  $\text{T}_{\text{H}2}$ ), bestimmen den Verlauf einer Immunantwort nach einem Befall des Organismus mit Pathogenen, indem sie B-Lymphocyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen, Granulocyten u.a. steuern.

Vor diesem Hintergrund entstand die Idee, die potentiellen, ursächlichen Zusammenhänge zwischen Autoimmunerkrankungen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalssystemen in T-Zellen zu ergründen. In Fällen von Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis und Diabetes Mellitus Typ 1 entwickelt das Immunsystem eine Empfindlichkeit für körpereigene Antigene. Normalerweise ist das Immunsystem aber indifferent gegenüber Autoantigenen. Das Phänomen wird allgemein als Immuntoleranz bezeichnet und ist vor allem eine Eigenschaft der T-Lymphocyten. Die Toleranz bildet sich während der Reifung der T-Zellen im Thymus dadurch aus, dass dort autoreaktive T-Zellen in Anwesenheit fast aller körpereigenen Antigene erkannt und dann in die Apoptose getrieben werden (negative Selektion; (Kishimoto und Sprent, 1997; Sprent et al., 1996). Solche Zellen, die der Apoptose entgehen können, werden durch weitere, nachgeschaltete Prozesse immunologisch inert. Beim Ausbruch einer Autoimmunerkrankung jedoch ist dieser negative Selektionsprozess gestört. Über Wege, die noch nicht vollständig verstanden sind, gelingt es autoreaktiven T-Zellen eine Immunantwort gegen körpereigene Organe und Gewebe in Gang zu setzen. Man vermutet als Auslöser hierfür beispielsweise vorhergehende Infektionen, in denen virale oder bakterielle Superantigene eigentlich inerte, autoreaktive T-Zellen stimulieren und aktivieren (Barnaba und Sinigaglia, 1997;

Rocken et al., 1992). Das Spektrum möglicher Immunantwortarten reicht von der Synthese inflammatorischer Cytokine (Bradl und Flügel, 2002) über das Einwandern von Makrophagen und Monocyten in die betroffenen Gewebe (Wekerle, 1993) bis hin zur gesteigerten Antikörperproduktion durch Plasmazellen (Fulcher und Basten, 1997; Tan, 1991). Je nach Art der Autoimmunerkrankung sind die Folgen dieser Aktionen mehr oder minder dramatisch. Nach Ausbruch der Multiplen Sklerose beispielsweise treten über einen Zeitraum von vielen Jahren schubweise Entzündungen des ZNS, vor allem in Regionen des Rückenmarks, auf, die unterbrochen werden von Phasen immunologischer Inaktivität (Sospedra und Martin, 2005; Steinman, 1996). Mit der Zeit zerstören diese entzündlichen Prozesse immer mehr Myelinscheiden entlang der Axone und die saltatorische Weiterleitung neuraler Impulse verlangsamt sich oder bricht ganz zusammen; Symptome sind v.a. zunehmende Defizite im motorischen Bereich (Sospedra und Martin, 2005). Ein anderes Beispiel bietet der Diabetes Mellitus Typ 1 („jugendliche Diabetes“) bei dem in jungen Jahren autoreaktive Antikörper die Insulin-sezernierenden Inselzellen ( $\beta$ -Zellen) des Pankreas vollständig zerstören (Green und Flavell, 1999; Wong und Janeway, 1999). Der betroffene Patient leidet daraufhin an lebenslangem Insulinmangel und ist auf die Gabe von synthetischem Insulin zur Kontrolle des Blutzuckerspiegels angewiesen (Green und Flavell, 1999).

In Kooperation mit zwei Arbeitsgruppen, der Gruppe um Prof. Barry Potter (*University of Bath*, Großbritannien) und der Gruppe um PD Dr. Alexander Flügel (MPI für Neurobiologie, Martinsried), entstand ein Projekt, das mehrere aufeinander folgende Ziele hatte: (i) zuerst galt es, eine Substanzbibliothek niedermolekularer NAADP-Analoga zu schaffen; hieraus ausgewählte Kandidaten sollten dann (ii) *in vitro* daraufhin getestet werden, ob sie NAADP-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale antagonisieren bzw. inhibieren; abschließend (iii) sollten validierte Analoga in präklinischen Studien in einem Krankheitsmodell der Ratte zum Einsatz kommen, das in vielen Aspekten der Multiplen Sklerose gleicht: die Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis (EAE).

Diese inflammatorische Nervenkrankheit induziert man entweder durch die Immunisierung naiver Ratten mit ZNS-spezifischen Antigenen (sog. aktive EAE (aEAE)) (Paterson, 1966) oder durch den Transfer aktivierter, ZNS-

antigenspezifischer T-Zellen (sog. Transfer-EAE (tEAE)) (Ben-Nun et al., 1981). Die Bandbreite möglicher Antigene ist groß; es fallen einige Proteine aus Oligodendrocyten darunter, so. z.B. *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG) und *myelin basic protein* (MBP), außerdem Proteine aus Astrocyten, so. z.B. *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) oder  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende S100 $\beta$ -Proteine (Wekerle, 1993). Unabhängig von der Art des Antigens müssen encephalitogene T-Zellen aktiviert sein, um die Blut-Hirn-Schranke überwinden und in das ZNS einwandern zu können (Wekerle, 1993). Sobald sie wieder ihr spezifisches Antigen im ZNS erkennen, synthetisieren sie verstärkt inflammatorische Cytokine und Chemokine, die weitere T-Zellen, Makrophagen und Monocyten anlocken. Dieser Prozess der Einwanderung in das ZNS lässt inflammatorische Läsionen entstehen. Die Symptome sind abhängig von der Art des Antigens und seiner Dichte in den verschiedenen Bereichen des ZNS (Bradl und Flügel, 2002). MBP beispielsweise konzentriert sich in den dickeren Myelinscheiden des Rückenmarks, so dass sich beim Einsatz MBP-spezifischer T-Zellen die meisten entzündlichen Läsionen entlang des Rückenmarks bilden. Es kommt so zu einer mehrtägigen Lähmung der Ratte, deren Ursache in der verstärkten Einwanderung von Makrophagen und Granulocyten liegt (Bradl und Flügel, 2002). Aufgrund der Schwellung des Gewebes und des damit einhergehenden höheren Druckes auf die Axone kommt es zu Störungen in der Weiterleitung der Nervenimpulse.

Mit der EAE stand nun ein seit den 1980er Jahren getestetes und etabliertes Modell einer Autoimmunerkrankung zur Verfügung (Wekerle, 1993). Das Modell besaß eine Vielzahl erprobter Komponenten: Zuvorderst stand die Tatsache, dass mit T-Zellen gearbeitet wurde, deren Antigenpezifität unzweifelhaft geklärt war (hier: *myelin basic protein* (MBP)); des weiteren existierten Protokolle zur vielfachen, monoklonalen Expansion dieser MBP-spezifischen T-Zellen, so dass die experimentelle Reproduzierbarkeit von Datenpaketen über größere Zeiträume hinweg gewährleistet werden konnte; außerdem gelang es kürzlich, GFP-transduzierte, MBP-spezifische T-Zellen zu generieren (Flügel et al., 1999). Solche Zellen ließen sich sehr gut verwenden für eine intensive *in situ* bzw. *in vivo* Beobachtung der T-Zellmigration im Körper der Ratte. Die Methode der Wahl hierfür war die Zwei-Photonen-Mikroskopie (Kawakami et al., 2005).

Zuallererst mussten jedoch geeignete Antagonisten gefunden werden, die sich funktionell sehr weit an die NAADP-Struktur anlehnten, aber gleichzeitig stark vereinfacht waren. Diese Moleküle sollten sich idealerweise schnell und in großen Mengen synthetisieren lassen.

Um diese Frage nach der geeigneten Ausgangsstruktur zu klären, wurden erste Mikroinjektionsexperimente mit NAADP, Nikotinamid und Nikotinsäure an humanen T-Lymphocyten durchgeführt. Nikotinsäure zeigte nach Koinjektion mit NAADP sehr vielversprechend, dass es NAADP-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale blocken konnte. Nikotinamid hingegen wies keine inhibitorische Wirkung auf. Vielmehr erhöhte es noch den initialen, transienten, NAADP-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalpeak. Mit Nikotinsäure war letztlich eine gute, strukturelle Plattform für die Erstellung einer Substanzbibliothek gefunden worden.

In Folge dieses Ergebnisses gelang der Arbeitsgruppe um Prof. Barry Potter die Synthese zweier Moleküle, BZ52 und BZ194, die neben der hydrophilen Nikotinsäuregruppe über hydrophobe Reste mit variabler Kettenlänge verfügten. Die daraus resultierende erhöhte Hydrophobizität sollte den Substanzen helfen, die Plasmamembran zu überwinden. Die ersten *in vitro*-Versuche wurden mit BZ52 und dann mit BZ194 an humanen T-Zellen durchgeführt.

BZ52 stellte sich als effektiver Antagonist des NAADP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegs heraus. Zum einen erfolgte die Hemmung NAADP-induzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale im Rahmen einer klassischen Konzentrations-Wirkungsbeziehung ( $\text{IC}_{50} = 1,7 \mu\text{M}$ ) und zum anderen erwies sich BZ52 als NAADP-spezifisch. Weder der  $\text{IP}_3$ - noch der cADPR-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg wurden nach Koinjektionen dieser beiden sekundären Botenstoffe und BZ52 inhibiert. Im Falle des Signalmoleküls cADPR trat stattdessen ein Effekt wie mit Nikotinamid auf: der initiale, transiente, cADPR-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalpeak war gegenüber dem nach einfacher cADPR-Mikroinjektion deutlich, aber statistisch nicht signifikant erhöht. Dieses Ereignis war bisher nicht zu erklären und sollte in näherer Zukunft genauer untersucht werden. Es wäre beispielsweise denkbar, dass BZ52 als allosterischer Effektor in den cADPR-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg eingriff.

Nachdem BZ52 untersucht worden war, ging man zum strukturell sehr ähnlichen BZ194 über. Im Vergleich mit BZ52 verfügte BZ194 lediglich über eine längere, hydrophobe Alkylkette. Gerade weil eine solche Ähnlichkeit zwischen beiden Molekülen bestand, erschienen die Ergebnisse der folgenden Mikroinjektionsexperimente nicht gänzlich überraschend. Genau wie BZ52 vermochte BZ194 NAADP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in humanen T-Lymphocyten konzentrationsabhängig ( $\text{IC}_{50} = 3,0 \mu\text{M}$ ) zu unterdrücken. Darüber hinaus war es auch spezifisch für den NAADP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg. Entsprechende Kontrollversuche zeigten deutlich, dass  $\text{IP}_3$ - und cADPR-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nicht verändert wurden. Dabei trat noch ein Nebeneffekt auf, der in der Form schon nach cADPR-BZ52-Koinjektionen beobachtet worden war: die BZ194-abhängige Erhöhung des cADPR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalpeaks gegenüber den Positivkontrollen mit cADPR. Diese Veränderung in der Signalamplitude war aber nicht signifikant. Es gelten hier die gleichen Überlegungen, die weiter oben schon gemacht wurden.

Zusammengenommen bewiesen die Mikroinjektionsexperimente mit BZ52 und BZ194 sowie den drei  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden, sekundären Botenstoffen  $\text{IP}_3$ , cADPR und NAADP eindrucksvoll, dass (i) beide synthetischen NAADP-Analoga starke Antagonisten des NAADP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegs in humanen T-Zellen repräsentierten. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert lag im niedrigen mikromolaren Bereich und bewegte sich damit in einer ähnlichen Größenordnung wie viele andere, kommerziell erhältliche Antagonisten und Agonisten. Darüber hinaus (ii) entfalteten beide Moleküle hochspezifisch ihre Wirkung. Einzig und allein der NAADP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg wurde gehemmt, aber nicht die  $\text{IP}_3$ - und cADPR-abhängigen Wege. Zum ersten Mal standen damit leistungsstarke, pharmakologische Werkzeuge zur Verfügung, mit denen der für humane T-Zellen so wichtige NAADP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg ausgeschaltet werden konnte (Berg et al., 2000; Gasser et al., 2006).

Obwohl BZ52 und BZ194 ein starkes, pharmakologisches Potential offenbart hatten, musste die Erprobung beider Substanzen noch einen Schritt weiter vorangetrieben werden in Richtung der *in situ* und *in vivo* Verwendbarkeit im Rahmen eines Krankheitsmodells. Einerseits fußten alle Erkenntnisse auf Experimenten an einer immortalisierten, humanen T-Zelllinie (Jurkat) und andererseits waren die zwei NAADP-Analoga stets über Mikroinjektionen appliziert worden. Um diese beiden

Einschränkungen aufzuheben, mussten (i) die folgenden Experimente an primären T-Zellen durchgeführt werden und (ii) einer der beiden Antagonisten, wenn möglich, auch passiv seine Wirkung entfalten, d.h. über Diffusion. Als primäre T-Zellen standen die eingangs schon beschriebenen MBP-spezifischen, encephalitogenen Ratten *memory* T-Zellen zur Verfügung. Ausserdem wurde BZ194 als Antagonist ausgewählt, da er aufgrund seiner längeren Alkylkette über eine bessere Membranpermeabilität als BZ52 verfügen sollte.

In einer Serie erster Experimente zeigte sich, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in primären Ratten T-Zellen nach Vorinkubation mit BZ194 und Stimulation des TCR/CD3-Rezeptorkomplexes deutlich geschwächt wurden. Dieser Effekt betraf den transienten  $\text{Ca}^{2+}$ -Peak ( $\text{IC}_{50} = 0,8 \text{ mM}$ ) genauso wie die folgende  $\text{Ca}^{2+}$ -Plateauphase ( $\text{IC}_{50} = 0,17 \text{ mM}$ ) und war klar konzentrationsabhängig. Desweiteren stellte sich heraus, dass die Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale bei gleicher BZ194-Konzentration umso stärker ausfiel je länger man die Ratten T-Zellen der Substanz aussetzte. Der kurzfristige Anstieg der Signalstärke nach drei Stunden Vorinkubationszeit wurde dadurch erklärt, dass die T-Zellen nach zweistündiger, serumfreier Kultivierung in Gegenwart von Serum weiter vorinkubiert wurden. Da Serumproteine über Bindungsstellen für hydrophobe Nukleotide verfügten, konnte diese Eigenschaft zu einem Sinken der effektiven BZ194-Konzentration führen. Schon jetzt demonstrierten diese Versuche eindrucksvoll, dass BZ194 in primären T-Zellen wirksam war und nicht nur in der humanen T-Zelllinie Jurkat. Desweiteren war das Molekül membranpermeabel.

Trotz alledem mussten zusätzlich noch zwei wichtige Bestandteile des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystems untersucht werden:  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und (kapazitiver)  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx. Die folgenden Experimente zeigten, dass BZ194 nach Vorinkubation und Stimulation des TCR/CD3-Rezeptorkomplexes die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung sowie den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx effektiv hemmte. Dennoch entfaltete BZ194 seine Wirkung insofern spezifisch, als dass der Thapsigargin-induzierte, kapazitave  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nicht betroffen wurde. BZ194 band nicht an CRAC-Kanäle in der Plasmamembran, so dass diese blockiert wurden. Dieser Befund war von entscheidender Bedeutung, da mit dem  $\text{I}_{\text{CRAC-Ca}^{2+}}$ -Strom als wichtigem Teil des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influxsystems in T-Zellen ein neuralgischer Punkt vorhanden war, der sehr leicht pharmakologisch beeinflusst werden konnte (Fischer

et al., 2001; Ishikawa et al., 2003; Parekh et al., 2002; Yonetoku et al., 2006; Zitt et al., 2004). BZ194 entfaltet seine Wirkung weiter stromaufwärts von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influxaktivierung; ausgehend von den Daten der Mikroinjektionsexperimente sollte das NAADP-Analogon die initiale, NAADP-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER über die Ryanodin Rezeptoren gehemmt haben. Der reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx war lediglich ein sekundärer Effekt.

Nachdem alle bisher beschriebenen *in vitro*-Versuche mit BZ194 an den Ratten T-Zellen abgeschlossen worden waren, führte die Arbeitsgruppe um PD Dr. Alexander Flügel noch einige weitere *in vitro*-Experimente durch. So sollte getestet werden, inwieweit BZ194 die Proliferation und Cytokinsynthese der Ratten T-Zellen beeinflussen konnte.

Beide Aspekte der T-Zellaktivierung wurden durch BZ194 gehemmt. Sowohl die Proliferation als auch die IL2-Produktion wurden konzentrationsabhängig gesenkt. Darüber hinaus erwies sich BZ194 auch in primären, humanen, MBP-spezifischen T-Zellen als wirksam: hier wurde die Proliferation und IL2-Produktion auf vergleichbare Weise konzentrationsabhängig reduziert. Damit zeichnete sich ab, dass der Einsatz von BZ194 weitreichende Konsequenzen für viele Effektorfunktionen der T-Zellen und ihrer darüber ausgeübten Kontrolle des Immunsystems haben sollte.

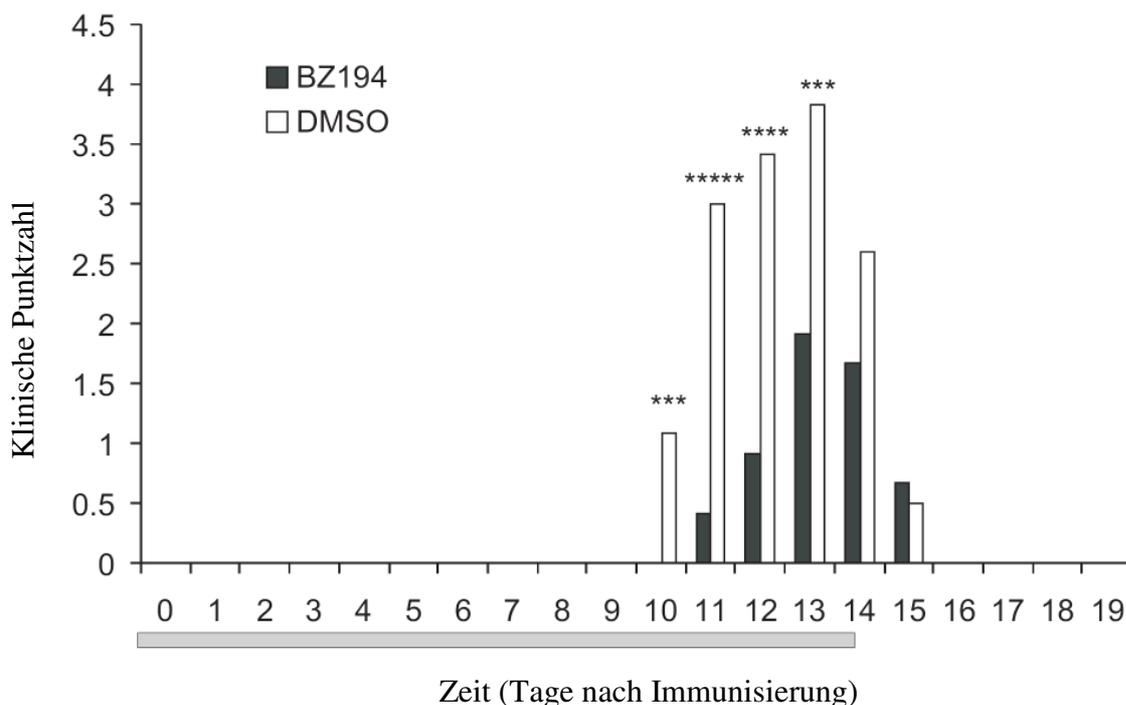
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass (i) BZ194 das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystem der T-Zellen nach Diffusion in die Zellen konzentrationsabhängig hemmte und (ii) dass sowohl  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung als auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx betroffen waren. Weiterhin (iii) wirkte BZ194 spezifisch, da es keine Auswirkungen auf den Thapsigargin-induzierten, kapazitativen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx hatte. Schließlich (iv) hemmte die Substanz auch noch das Zellwachstum bzw. die Zellteilung, d.h. sie war antiproliferativ für primäre T-Zellen der Ratte und des Menschen. Ausserdem (v) reduzierte BZ194 die IL2-Proteinsynthese, einem wichtigem Wachstumsfaktor; auch dies traf auf humane und Ratten T-Zellen zu.

BZ194 ist daher nicht nur ein leistungsstarkes pharmakologisches Werkzeug, um Fragen zu NAADP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystemen zu untersuchen. Mit Hilfe dieses Analogons liessen sich wichtige Effektorfunktionen der T-Zellen hemmen, wie z.B. die IL2-Synthese, und somit letztlich Fragen angehen, die das gesamte

Immunsystem betrafen. BZ194 bot sich geradezu an, am Krankheitsmodell der Ratten EAE getestet zu werden.

In der Tat übte BZ194 einen signifikanten Einfluss auf den Ausbruch und den Verlauf der EAE aus; das galt für beide Formen der EAE, die aktive EAE (Immunisierung naiver Tiere mit Antigen) und die Transfer-EAE (Injektion aktivierter, encephalitogener T-Zellen). Alle *in vivo*-Versuche wurden von der Gruppe um PD Dr. Alexander Flügel durchgeführt.

Tägliche intraperitoneale Injektionen von BZ194, aber nicht von Lösungsmittel (DMSO) oder Nikotinsäure verzögerten das Auftreten der ersten Lähmungserscheinungen und linderten die Symptome nach der aktiven Immunisierung mit MBP (Abb. 5.4).



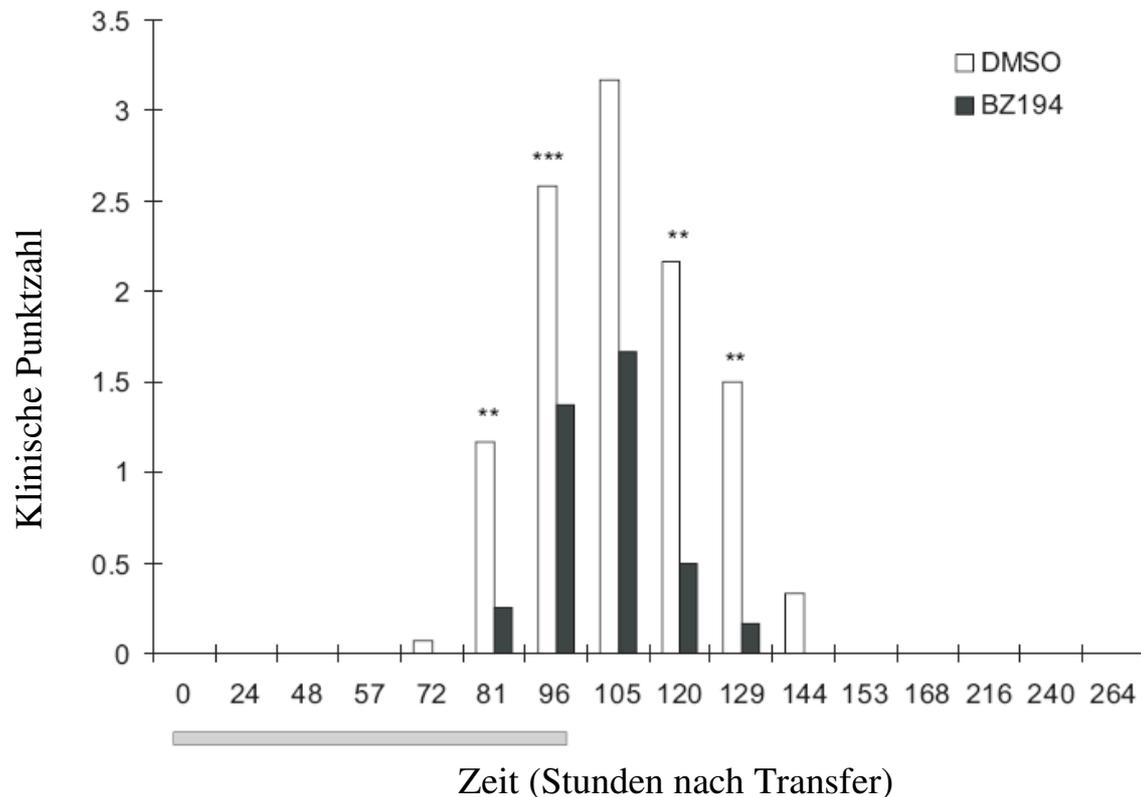
**Abb. 5.4: Hemmung der aktiven EAE durch den NAADP-Antagonisten BZ194.** Es ist der klinische Verlauf der EAE nach der Immunisierung mit MBP abgebildet. Der graue Querbalken steht für die Zeit, in der die Versuchstiere mit dem Lösungsmittel DMSO (Vehikelkontrolle; weisse Balken) oder BZ194 (schwarze Balken) behandelt wurden. Der Verlauf ist repräsentativ für die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuche mit jeweils  $n = 7$  Versuchstieren/Gruppe.  $p$  Werte wurden mit Hilfe des *Student's t-test* berechnet.  $p$  Werte: ( \*\*\*) =  $p \leq 0,005$ , (\*\*\*\*) =  $p \leq 0,001$ , (\*\*\*\*\*) =  $p \leq 0,0005$ . [Die Daten wurden erhoben und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Chiara Chordiglieri und PD Dr. Alexander Flügel, MPI, Martinsried.]

Cytofluorimetrische und histologische Analysen an Tag zwölf offenbarten typische EAE Läsionen bzw. Entzündungen im Rückenmark der Kontrolltiere in Gegenwart einer hohen Anzahl an T-Zellen, Monocyten/Makrophagen sowie B-Zellen. Im Kontrast dazu wiesen Versuchstiere, die mit BZ194 behandelt wurden, nur milde Entzündungsherde auf. Außerdem demonstrierten quantitative mRNA-Analysen, dass im entzündeten Gewebe der Kontrolltiere der Spiegel an proinflammatorischen Cytokinen und Chemokinen, wie IL2, IFN $\gamma$  sowie IL17, deutlich erhöht war. Diese Veränderungen wurden nach der Behandlung mit BZ194 drastisch reduziert.

Leider sind diese Befunde nur von geringerem klinischen Interesse, da MS-Patienten die initiale Phase, in der naive, autoreaktive T-Zellen aktiviert wurden, bereits längst durchlaufen haben, bevor sie dann in Behandlung kommen (Muraro et al., 2000; Ponsford et al., 2001).

Es musste untersucht werden, inwiefern BZ194 vollständig aktivierte, encephalitogene Gedächtnis-T-Zellen beeinflussen konnte. Im Rahmen einer Transfer-EAE stellte sich heraus, dass der NAADP-Antagonist den Ausbruch der Krankheit verzögerte und die Schwere der Symptome herabsetzte (Abb. 5.5).

Wenn man BZ194 präventiv während der ersten ein bis vier Tage verabreichte, reduzierten sich Paralyse und Gewichtsverlust deutlich. Ebenso verhielt es sich, wenn der Antagonist nach den ersten Anzeichen einer Paralyse zum Einsatz gebracht wurde. Cytofluorimetrische, histologische und mRNA-Analysen ergaben, dass die Zahl an Entzündungsherden im Rückenmark BZ194-behandelter Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren stark herabgesetzt war und deutlich weniger autoreaktive T-Zellen und Monocyten bzw. Makrophagen eingewandert waren. Damit einhergehend hatte sich auch die Konzentration proinflammatorischer Cytokine und Chemokine im Nervengewebe gesenkt.

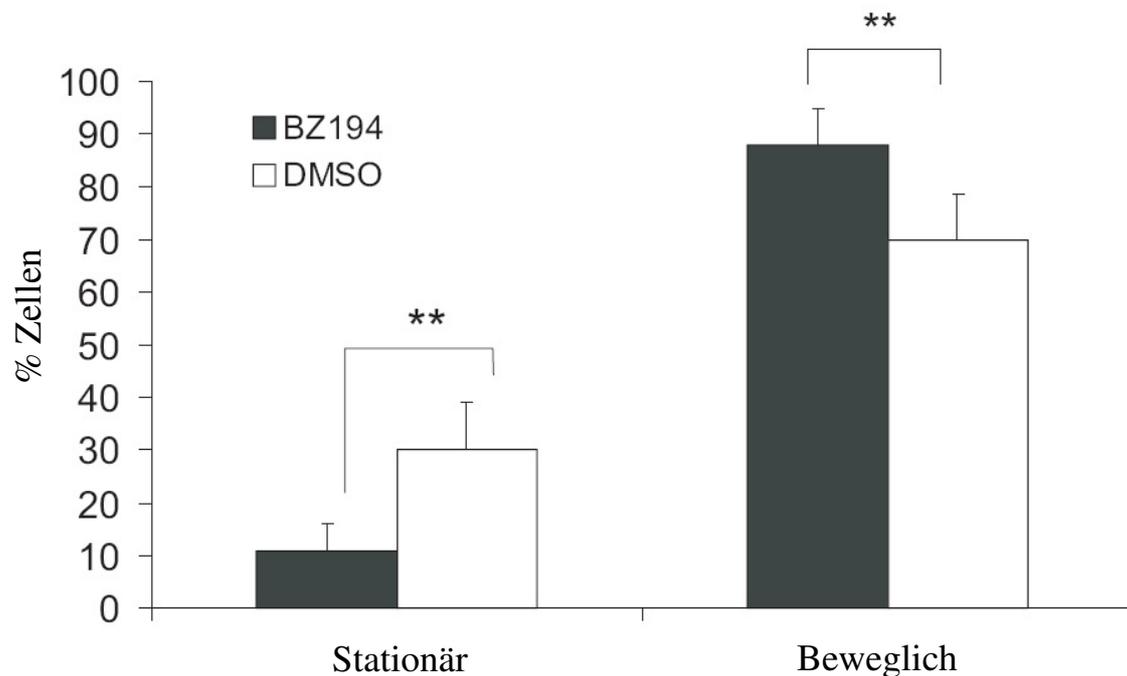


**Abb. 5.5: Hemmung der Transfer-EAE durch den NAADP-Antagonisten BZ194.** Es ist der klinische Verlauf der EAE nach dem Transfer aktivierter, MBP-spezifischer und GFP-transduzierter T-Zellen abgebildet. Der graue Querbalken steht für die Zeit, in der die Versuchstiere mit dem Lösungsmittel DMSO (Vehikelkontrolle; weisse Balken) oder BZ194 (schwarze Balken) behandelt wurden. Der Verlauf ist repräsentativ für die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Versuchen mit jeweils  $n = 6$  Versuchstieren/Gruppe.  $p$  Werte wurden mit Hilfe des *Student's t-test* berechnet.  $p$  Werte: (\*\*) =  $p \leq 0,01$ , (\*\*\*) =  $p \leq 0,005$ .

[Die Daten wurden erhoben und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Chiara Chordiglieri und PD Dr. Alexander Flügel, MPI, Martinsried.]

Da diese Ergebnisse vermuten liessen, dass BZ194 in die Reaktivierung autoreaktiver T-Zellen im Rückenmark eingriff, wurde die Motilität MBP-spezifischer, GFP-positiver T-Zellen *in situ* und in Echtzeit untersucht. Neuere Arbeiten hatten gezeigt, dass autoreaktive T-Zellen in EAE-Läsionen charakteristische Bewegungsmuster besaßen (Kawakami et al., 2005). 35 % der transferierten T-Zellen im Zielgewebe blieben stationär und befanden sich wahrscheinlich im Prozess der Antigenerkennung (Kawakami et al., 2005). Der Rest der T-Zellen, 65 %, bewegte sich mit kontinuierlich durch das Rückenmarksgewebe (Kawakami et al., 2005). In BZ194-behandelten Tieren wurden dann autoreaktive T-Zellen mit vergleichbaren Bewegungsmustern beobachtet. Jedoch war in diesem Fall der Anteil beweglicher T-

Zellen signifikant erhöht (85 %). Nur 15 % der Effektorzellen waren stationär. In entsprechenden Kontrolltieren lag der Anteil bei 30 %.



**Abb. 5.6: T<sub>MBP-GFP</sub>-Zell Beweglichkeit im Rückenmark vier Tage nach Transfer.** Der Anteil stationärer T-Zellen in DMSO-behandelten Kontrolltieren war signifikant höher als in BZ194-behandelten Tieren. Schwarze Balken: BZ194-behandelte Tiere, weiße Balken: DMSO-behandelte Kontrolltiere. Mittelwerte ± Standardabweichung (n=5). [Die Daten wurden erhoben und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Chiara Chordiglieri und PD Dr. Alexander Flügel, MPI, Martinsried.]

Zusammenfassend konnte bezüglich der Interaktion von BZ194 mit der EAE festgestellt werden, dass BZ194 (i) sowohl bei der aEAE als auch bei der tEAE den Ausbruch der Krankheit um fast einen Tag verzögerte. Desweiteren (ii) wurden Symptome wie Lähmung und Gewichtsverlust abgemildert.

Es ist gelungen, hochspezifische NAADP-Antagonisten zu etablieren und mit ihrer Hilfe zu zeigen, dass der NAADP-Ca<sup>2+</sup>-Signalweg eine entscheidende Rolle spielt für die frühen Aktivierungsschritte antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Der NAADP-Antagonist BZ194 blockierte sowohl Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung als auch Ca<sup>2+</sup>-Influx. Damit waren wichtige Elemente der Interaktion autoreaktiver T-Zellen mit APCs gehemmt (Delon et al., 1998; Feuillet et al., 2005; Montes et al., 1999). In beiden Typen der EAE (aktive sowie Transfer-EAE) war eine deutliche Abnahme inflammatorischer Reaktionen *in vivo* die Folge. Der therapeutische Effekt von BZ194 äußerte sich in

---

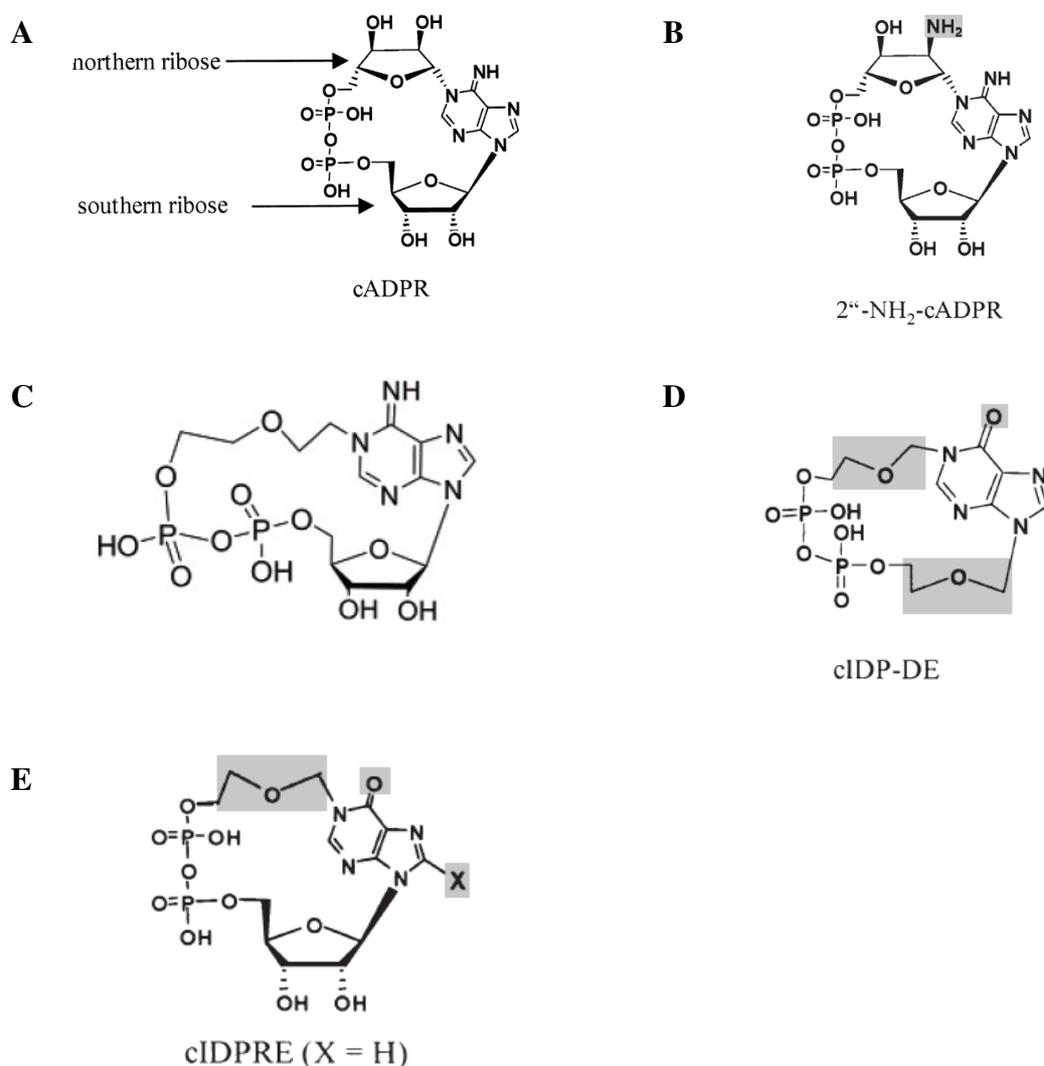
einer Unterdrückung proinflammatorischer Cytokine, den Hauptverantwortlichen für die Entstehung neuraler Läsionen und Schäden im ZNS (Hohlfeld, 1997). Das am weitesten hervorstechende Merkmal von BZ194 war jedoch die Tatsache, dass es neben seiner hemmenden Wirkung auf encephalitogene T-Zellen zunächst keine weiteren Nebenwirkungen hatte. Hierzu stehen genauere Untersuchungen (Histologie u.a.) allerdings noch aus. Zum ersten Mal war es *in vitro* und *in vivo* gelungen, eine ursächliche Verknüpfung aufzuzeigen zwischen dem NAADP-Ca<sup>2+</sup>-Signalweg und einem (neuro-inflammatorischen) Krankheitsmodell. In Zukunft könnten sich die hier vorgestellten NAADP-Antagonisten als Substanzen mit Modellcharakter erweisen, um neuartige Therapien zur Behandlung der MS zu entwickeln.

### 5.3 Struktur-Wirkungsbeziehung und generelles Prinzip der Vereinfachung von P24 und weiteren cADPR-Analoga

Das Signalmolekül cADPR ist nach IP<sub>3</sub> der zweite sekundäre Botenstoff, dessen große Bedeutung für die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung in Eukaryonten aufgedeckt wurde (Lee et al., 1989; Lee, 2001). In einer Vielzahl von Zellen ist cADPR an essentiellen Effektorfunktionen beteiligt, so z.B. der T-Zellaktivierung (Guse et al., 1999), der Vasodilatation (Boittin et al., 2003), der Chemotaxis von Phagozyten (Partida-Sanchez et al., 2004) und der Enzymsekretion von Acinuszellen des Pankreas (Cancela, 2001). Die Eigenschaften dieses Botenstoffs sind vor allem durch das Zusammenspiel mit den beiden anderen Ca<sup>2+</sup>-freisetzenden, sekundären Botenstoffen IP<sub>3</sub> und NAADP sehr komplex und facettenreich (Berridge et al., 2000). Um deshalb im Rahmen der Erforschung des cADPR-Feldes auch feinere Nuancen des Signalweges analysieren zu können, ist es von großem Wert, über eine Palette pharmakologischer Werkzeuge mit hoher Spezifität und Aktivität für den cADPR-Ca<sup>2+</sup>-Signalweg zu verfügen. Wichtige Merkmale solcher spezifischer Agonisten und Antagonisten sind: leichte Synthetisierbarkeit, Stabilität, weitgehende strukturelle Homologie zur Ausgangssubstanz bei gleichzeitiger struktureller Vereinfachung, Membranpermeabilität und Kenntnis der funktionellen Reste.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe neuer, aber auch schon bekannter Verwandter des Signalmoleküls cADPR untersucht und vorgestellt. Der erste Vertreter, das synthetisch hergestellte Molekül cADPRcE wirkte als Agonist in humanen T-Zellen und induzierte prominente Ca<sup>2+</sup>-Signale, die in ihrer Stärke vergleichbar waren mit solchen nach Stimulation des TCR/CD3-Rezeptorkomplexes (Xu et al., 2006). Desweiteren war der Agonist membranpermeabel aufgrund der Substitution seiner nördlichen Ribose durch eine hydrophobe Etherbrücke (Xu et al., 2006). Die beiden anderen, genannten Analoga des cADPR, P24 und Ap2A, waren schon aus früheren Publikationen bekannt (Basile et al., 2005; Bruzzone et al., 2006) und natürlichen Ursprungs (Basile et al., 2005). Ap2A ist über eine C1'-N9 N-glykosidische Bindung mit einem zweiten Adeninmolekül verbunden, P24 über eine C1'-N3 N-glykosidische Bindung. Beide Moleküle sind im Gegensatz zum zyklischen cADPR linear. In humanen HeLa Karzinomzellen lösten beide Analoga globale Ca<sup>2+</sup>-Signale aus, wobei die Ap2A-abhängigen Signale verzögert auftraten. Bei genauerer

Betrachtung der „Schrittmacher“-Phase mit ihren subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen wurde deutlich, dass lediglich P24 frühzeitig prominente, lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale auslöste, die in Nähe zur Plasmamembran entstanden und sich dann ins Zellinnere ausbreiteten. Nach Ap2A-Applikation hingegen blieben die subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in der „Schrittmacher“-Phase auf Ruheniveau. Sehr bemerkenswert war dann noch der Befund, dass Ap2A nach Vorinkubation das Auftreten P24-vermittelter globaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale verzögerte und starke lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale auf Bereiche der Plasmamembran beschränkt blieben. Eine weitere herausragende Eigenschaft, die beide Substanzen verband, war deren Membranpermeabilität.



**Abb. 5.7: Struktur des  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden, sekundären Botenstoffs cADPR und verwandter Analoga.** Es sind folgende Strukturen abgebildet: **A**, cADPR, **B**, 2''-NH<sub>2</sub>-cADPR, **C**, cADPRcE, **D**, cIDP-DE, **E**, cIDPRE. [Abbildung verändert nach (Guse et al., 2002; Guse, 2005; Xu et al., 2006)]

Mehrere frühere Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung von cADPR mündeten in der Synthese einer Reihe neuartiger Analoga, die sich im wesentlichen

in den Bereichen der nördlichen und südlichen Ribose sowie der Base (Adenin) von cADPR unterschieden (Abb. 5.7) (Guse, 2005).

Die ersten Modifikationen erfolgten an der Base Adenin an 8-Position in der Form von 8-Br-cADPR und 8-NH<sub>2</sub>-cADPR (Walseth und Lee, 1993). Diese beiden synthetischen Produkte erwiesen sich als Antagonisten cADPR-abhängiger Ca<sup>2+</sup>-Signale in Seeigleihomogenaten (Walseth und Lee, 1993). Veränderungen der nördlichen Ribose an 2''-Position in Form einer Aminogruppe als Rest anstatt der natürlichen Hydroxylgruppe etablierten einen Agonisten des cADPR-Ca<sup>2+</sup>-Signalwegs in permeabilisierten, humanen T-Lymphocyten, 2''-NH<sub>2</sub>-cADPR (Abb. 5.7) (Guse et al., 2002). 8-Br-, 8-NH<sub>2</sub>- und 2''-NH<sub>2</sub>-cADPR stellten Analoga dar, deren Struktur mit Hinsicht auf cADPR nicht vereinfacht worden war. Mit der Synthese von cADPRcE hingegen gelang eine weitgehende Vereinfachung, indem die nördliche Ribose komplett durch eine Etherbrücke mit einer zusätzlichen Methylengruppe ersetzt wurde (Xu et al., 2006). Zusammen mit anderen künstlich hergestellten cADPR-Analoga, wie z.B. cIDPRE und cIDP-DE (Abb. 5.7; beides Agonisten des cADPR-Ca<sup>2+</sup>-Signalwegs) (Gu et al., 2004; Guse et al., 2005; Guse, 2005), wurde so ein Prinzip zur Vereinfachung der cADPR-Struktur unter Bewahrung der agonistischen Aktivität gefunden. Im Falle von cIDPRE hatte man die nördliche Ribose durch eine Etherbrücke ersetzt und die Base Adenin gegen Hypoxanthin ausgetauscht. cIDP-DE andererseits verfügte über zwei Etherbrücken, die die nördliche und südliche Ribose ersetzten. Es wurde hier ebenfalls die Base Adenin durch Hypoxanthin ersetzt. cIDPRE und cIDP-DE erwiesen sich beide als Agonisten des cADPR-Ca<sup>2+</sup>-Signalwegs in humanen T-Zellen und Kardiomyocyten (Gu et al., 2004; Guse et al., 2005).

Im Kontrast dazu waren die beiden cADPR-Metabolite P24 und Ap2A natürlichen Ursprungs und lagen in linearer Form vor (Basile et al., 2005). Erste Messungen hatten schon gezeigt, dass P24 und Ap2A zu einem Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in HeLa Karzinomzellen führten (Bruzzone et al., 2006), so dass diese Daten die in der vorliegenden Arbeit gesammelten Beobachtungen unterstützten. Aufgrund der Tatsache, dass P24 und Ap2A durch ADPRCs aus cADPR synthetisiert wurden, neigte man zu der Annahme, dass es sich bei beiden Metaboliten mit hoher Wahrscheinlichkeit um Agonisten des cADPR-Ca<sup>2+</sup>-Signalweges in HeLa Zellen

handelte. Mit Blick auf andere Arbeiten aus neuester Zeit bot sich aber noch eine andere Interpretation an.

Bei ADPR handelte es sich wie bei P24 und Ap2A um ein lineares Molekül, das durch ADPRCs aus cADPR oder NAD synthetisiert werden konnte (Aarhus et al., 1995; Goodrich et al., 2005). Es liess sich zeigen, dass ADPR einen nicht-selektiven,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kationenkanal aus der Familie der TRP-Kanäle aktivierte: TRPM2 (Gasser et al., 2006; Heiner et al., 2006; Kolisek et al., 2005; Perraud et al., 2001; Sano et al., 2001). In humanen T-Zellen stellte sich ADPR als ein Induktor für die Apoptose heraus, die durch einen langanhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Na}^{+}$ -Influx über TRPM2 getragen wurde (Gasser et al., 2006). Interessanterweise demonstrierten Basile et al., dass P24 neben seinem  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierenden Effekt zusätzlich cytostatisch bzw. cytotoxisch auf humane, hematopoetische Stammzellen wirkte (Basile et al., 2005). Im Gegensatz dazu verstärkte cADPR das Zellwachstum (Basile et al., 2005). Vor dem Hintergrund der proapoptotischen Wirkung von ADPR über TRPM2 in humanen T-Zellen und der Linearität des Moleküls konnte angenommen werden, dass P24, statt auf den cADPR- $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg (und damit den Ryanodin Rezeptor) zu wirken, andere  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Ionenkanäle, wie z.B. TRPM2, modulierte. Es könnte sich bei P24 wie bei ADPR um ein proapoptotisches,  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierendes Signalmolekül in Zellen hematopoetischen Ursprungs handeln.

Im Falle von Ap2A demonstrierten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass es die  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierende Aktivität von P24 auf der Ebene subzellulärer und globaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in HeLa Zellen reduzierte. Leider ist die Wirkung von Ap2A auf humane, hematopoetische Stammzellen nicht von Basile et al. untersucht worden. Es liess sich deshalb nur spekulieren, inwieweit Ap2A vielleicht ein antiapoptotischer Modulator des ADPR- $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegs sein könnte.

Abschließende Aussagen zur Wirkung von P24 und Ap2A auf z.B. TRPM2 in Zellen hematopoetischen Ursprungs (z.B. T-Zellen) erfordern weitergehende Experimente, z.B. durch die *patch-clamp* Technik.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mit cADPRcE, P24, Ap2A und anderen synthetischen oder natürlichen cADPR-Analoga einige vielversprechende und leistungsstarke, pharmakologische Werkzeuge zur Verfügung stehen, um die komplexen Zusammenhänge eukaryontischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege zu ergründen. Mit

---

der zunehmenden Anzahl an Agonisten und Antagonisten wächst stetig die Chance, ein Molekül mit Modellcharakter für zukünftige, innovative klinische Therapieansätze zu entdecken.

## 6 Zusammenfassung

NAADP hat im Laufe der letzten Jahre begonnen, auf dem Feld  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzender, sekundärer Botenstoffe eine zunehmend gleichwertige Rolle neben  $\text{IP}_3$  und cADPR zu spielen (Berridge et al., 1999; Berridge et al., 2000; Lee, 2005). Im direkten Vergleich ist NAADP sogar der potenteste endogene  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisator (Berg et al., 2000). Im Gegensatz dazu ist cADPR schon länger als sekundärer Botenstoff etabliert (Guse et al., 1999).

In T-Lymphocyten, der Schlüsselkomponente des adaptiven Immunsystems, bildet NAADP das Fundament für alle  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalwege, da eine Inaktivierung des NAADP-Systems auch  $\text{IP}_3$ - und cADPR-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale weitgehend unterbindet (Berg et al., 2000). Im Gegensatz zu anderen Zellsystemen nimmt hier der Ryanodin-Rezeptor eine zentrale Stellung ein: NAADP muss für eine globale  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung direkt mit diesem  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal interagieren (Langhorst et al., 2004). In diesem Zusammenhang unaufgeklärt ist derzeit jedoch immer noch die Rolle von lokalen, subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen, den Schrittmachern aller nachfolgenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale. Der erste Teil der hier vorliegenden Arbeit sollte daher die Existenz NAADP-abhängiger subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale und deren Abhängigkeit von dem Ryanodin-Rezeptor in humanen T-Lymphocyten aufklären.

Die Mikroinjektion niedriger NAADP-Konzentrationen (30 nM) löste verzögerte, zeitlich ausgedehnte, subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale aus, die bei Koinjektion von Ruthenium Rot oder Ryanodin, zwei Antagonisten des Ryanodin-Rezeptors, vollständig unterdrückt wurden. Die Koinjektion von Heparin, einem Inhibitor des  $\text{IP}_3$ -Rezeptors, übte keinen Einfluss auf NAADP-vermittelte, subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale aus. Genauso wenig inhibierte der Einsatz des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influxblockers SKF 96365 diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale. Darüber hinaus entwickelten sich nach Mikroinjektion von cADPR subzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale mit räumlichen und zeitlichen Charakteristika, die denen nach NAADP-Mikroinjektion glichen. Die Autoinaktivierung des NAADP- $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystems verhinderte dann wiederum das Auftreten dieser cADPR-abhängigen, subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale. In zwei Zelllinien, in denen die Expression des Ryanodin-Rezeptors durch *RNA-interference* stark reduziert war, traten ebenfalls keine NAADP-abhängigen, subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale auf.

Insgesamt führen die Ergebnisse dieses ersten Arbeitsabschnittes daher zu dem Schluss, dass (i) NAADP in humanen T-Lymphocyten an der Generierung subzellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beteiligt ist und (ii) diese Signale direkt von dem Ryanodin-Rezeptor ausgehen.

Mit Hinblick auf die fundamentalen Folgen, die eine Inaktivierung des NAADP- $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystems in T-Lymphocyten nach sich zieht (Berg et al., 2000), wurden im zweiten Teil der hier vorliegenden Arbeit zwei synthetische, niedermolekulare NAADP-Analoga, BZ52 und BZ194, auf ihr Potential als spezifische NAADP-Antagonisten in humanen und Ratten T-Zellen getestet. Initiale Mikroinjektionsexperimente hatten demonstriert, dass Nikotinsäure NAADP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale deutlich zu unterdrücken vermag. Tatsächlich erwiesen sich in humanen T-Lymphocyten beide Substanzen in einer klaren Konzentrations-Wirkungsbeziehung als potente Inhibitoren des NAADP- $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegs, ohne die  $\text{IP}_3$ - und cADPR- $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsysteme zu beeinflussen. Daraufhin schlossen sich Untersuchungen mit dem NAADP-Analogon BZ194 an primären, MBP-spezifischen  $\text{CD4}^+$  Ratten *memory* T-Zellen an, die als encephalitogene T-Zellen eine Schlüsselrolle bei Induktion der EAE spielen, einem MS-ähnlichen Krankheitsmodell in der Ratte. Es sollte untersucht werden, ob BZ194 die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsysteme dieser T-Zellen beeinflusst. In der Tat unterdrückte BZ194 die Entstehung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen nach Stimulation des TCR/CD3-Komplexes konzentrationsabhängig. Bei genauerem Hinsehen waren sowohl  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung als auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx von der inhibierenden Wirkung des BZ194 betroffen, obwohl Versuche mit Thapsigargin zeigten, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx für sich betrachtet von BZ194 unbeeinflusst blieb. Weitere Experimente der Arbeitsgruppe um PD Dr. Alexander Flügel (MPI Martinsried) mit der Substanz am Krankheitsmodell der EAE zeigten sehr deutlich, dass eine Unterdrückung des NAADP- $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystems den Ausbruch der Krankheit verzögern und die Schwere der Symptome mindern konnte. Diese Befunde passten zu anderen Ergebnissen, die verdeutlichten, dass BZ194 ebenfalls die Proliferation der Ratten T-Zellen und ihre IL2-Synthese hemmte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass (i) mit BZ52 und BZ194 jetzt zwei spezifische Antagonisten des NAADP- $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystems in T-Lymphocyten bereitstehen und (ii) durch deren Einsatz Ereignisse der T-Zellaktivierung unterdrückt werden, die in den Signalwegen der T-Lymphocyten stromabwärts der  $\text{Ca}^{2+}$ -

---

Signalebene liegen und zeitlich betrachtet erst Stunden und Tage später ihre volle Wirkung entfalten.

Der dritte und vierte Teil der hier vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit synthetischen und natürlich vorkommenden Analoga des Signalmoleküls cADPR und deren Wirkung in den  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystemen humaner T-Lymphocyten und HeLa Karzinomzellen. Das vereinfachte und synthetische Analogon cADPRcE erwies sich als potenter Agonist des cADPR- $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystems in humanen T-Zellen und auch die beiden natürlich vorkommenden cADPR-Metaboliten P24 und Ap2A stellten Agonisten der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsysteme in HeLa Karzinomzellen dar. Alle diese Analoga des Signalmoleküls cADPR sind ein bedeutender Entwicklungsschritt in Richtung der Bereitstellung innovativer und einfacher pharmakologischer Werkzeuge, mit denen die komplexen Zusammenhänge eukaryontischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege ergründet werden können.

## 7 Literaturverzeichnis

### References

- Aarhus, R., Graeff, RM., Dickey, DM. et al. (1995). ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J Biol Chem* *270*, 30327-30333.
- Baker, PF., Blaustein, MP., Keynes, RD. et al. (1969). The ouabain-sensitive fluxes of sodium and potassium in squid giant axons. *J Physiol* *200*, 459-496.
- Barnaba, V. and Sinigaglia, F.. (1997). Molecular mimicry and T cell-mediated autoimmune disease. *J Exp Med* *185*, 1529-1531.
- Basile, G., Taglialatela-Scafati, O., Damonte, G. et al. (2005). ADP-ribosyl cyclases generate two unusual adenine homodinucleotides with cytotoxic activity on mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 14509-14514.
- Ben-Nun, A., Wekerle, H. and Cohen, IR.. (1981). The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* *11*, 195-199.
- Berg, I., Potter, BV., Mayr, GW. et al. (2000). Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP(+)) is an essential regulator of T-lymphocyte Ca(2+)-signaling. *J Cell Biol* *150*, 581-588.
- Berridge, G., Dickinson, G., Parrington, J. et al. (2002). Solubilization of receptors for the novel Ca<sup>2+</sup>-mobilizing messenger, nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *J Biol Chem* *277*, 43717-43723.
- Berridge, M., Lipp, P. and Bootman, M.. (1999). Calcium signalling. *Curr Biol* *9*, R157-9.
- Berridge, MJ.. (1993). Cell signalling. a tale of two messengers. *Nature* *365*, 388-389.
- Berridge, MJ.. (2002). The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* *32*, 235-249.
- Berridge, MJ., Lipp, P. and Bootman, MD.. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* *1*, 11-21.

- Bezprozvanny, I., Watras, J. and Ehrlich, BE.. (1991). Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* 351, 751-754.
- Bezprozvanny, IB., Ondrias, K., Kaftan, E. et al. (1993). Activation of the calcium release channel (ryanodine receptor) by heparin and other polyanions is calcium dependent. *Mol Biol Cell* 4, 347-352.
- Billington, RA., Bellomo, EA., Floriddia, EM. et al. (2006). A transport mechanism for NAADP in a rat basophilic cell line. *FASEB J* 20, 521-523.
- Boittin, F., Dipp, M., Kinnear, NP. et al. (2003). Vasodilation by the calcium-mobilizing messenger cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem* 278, 9602-9608.
- Boittin, F., Galione, A. and Evans, AM.. (2002). Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate mediates Ca<sup>2+</sup> signals and contraction in arterial smooth muscle via a two-pool mechanism. *Circ Res* 91, 1168-1175.
- Bootman, M., Niggli, E., Berridge, M. et al. (1997). Imaging the hierarchical Ca<sup>2+</sup> signalling system in HeLa cells. *J Physiol* 499 ( Pt 2), 307-314.
- Bootman, MD., Berridge, MJ. and Lipp, P.. (1997). Cooking with calcium: the recipes for composing global signals from elementary events. *Cell* 91, 367-373.
- Bradl, M. and Flügel, A.. (2002). The role of T cells in brain pathology. *Curr Top Microbiol Immunol* 265, 141-162.
- Bruzzone, S., Dodoni, G., Kaludercic, N. et al. (2006). Mitochondrial dysfunction induced by a cytotoxic adenine dinucleotide produced by ADP-ribosyl cyclases from cADPR. *J Biol Chem* , .
- Bruzzone, S., Guida, L., Zocchi, E. et al. (2001). Connexin 43 hemi channels mediate Ca<sup>2+</sup>-regulated transmembrane NAD<sup>+</sup> fluxes in intact cells. *FASEB J* 15, 10-12.
- Bruzzone, S., Kunerth, S., Zocchi, E. et al. (2003). Spatio-temporal propagation of Ca<sup>2+</sup> signals by cyclic ADP-ribose in 3T3 cells stimulated via purinergic P2Y receptors. *J Cell Biol* 163, 837-845.
- Bultynck, G., Sienaert, I., Parys, JB. et al. (2003). Pharmacology of inositol trisphosphate receptors. *Pflugers Arch* 445, 629-642.
- Cancela, JM.. (2001). Specific Ca<sup>2+</sup> signaling evoked by cholecystokinin and acetylcholine: the roles of NAADP, cADPR, and IP<sub>3</sub>. *Annu Rev Physiol* 63, 99-117.

- Cancela, JM., Churchill, GC. and Galione, A.. (1999). Coordination of agonist-induced  $\text{Ca}^{2+}$ -signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. *Nature* 398, 74-76.
- Cancela, JM., Gerasimenko, OV., Gerasimenko, JV. et al. (2000). Two different but converging messenger pathways to intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release: the roles of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, cyclic ADP-ribose and inositol trisphosphate. *EMBO J* 19, 2549-2557.
- Cancela, JM., Van Coppenolle, F., Galione, A. et al. (2002). Transformation of local  $\text{Ca}^{2+}$  spikes to global  $\text{Ca}^{2+}$  transients: the combinatorial roles of multiple  $\text{Ca}^{2+}$  releasing messengers. *EMBO J* 21, 909-919.
- Carafoli, E.. (2003). The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 326-332.
- Carafoli, E., Tiozzo, R., Lugli, G. et al. (1974). The release of calcium from heart mitochondria by sodium. *J Mol Cell Cardiol* 6, 361-371.
- Chini, EN. and Dousa, TP.. (1995). Enzymatic synthesis and degradation of nicotinate adenine dinucleotide phosphate (NAADP), a  $\text{Ca}^{2+}$ -releasing agonist, in rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 209, 167-174.
- Chini, EN., Beers, KW. and Dousa, TP.. (1995). Nicotinate adenine dinucleotide phosphate (NAADP) triggers a specific calcium release system in sea urchin eggs. *J Biol Chem* 270, 3216-3223.
- Chini, EN., Chini, CCS., Kato, I. et al. (2002). Cd38 is the major enzyme responsible for synthesis of nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate in mammalian tissues. *Biochem J* 362, 125-130.
- Clapper, DL., Walseth, TF., Dargie, PJ. et al. (1987). Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J Biol Chem* 262, 9561-9568.
- Dammermann, W. and Guse, AH.. (2005). Functional ryanodine receptor expression is required for NAADP-mediated local  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in T-lymphocytes. *J Biol Chem* 280, 21394-21399.
- De Flora, A., Franco, L., Guida, L. et al. (2000). Topology of CD38. *Chem Immunol* 75, 79-98.

- Delon, J., Bercovici, N., Raposo, G. et al. (1998). Antigen-dependent and -independent  $Ca^{2+}$  responses triggered in T cells by dendritic cells compared with B cells. *J Exp Med* 188, 1473-1484.
- Dowden, J., Berridge, G., Moreau, C. et al. (2006). Cell-permeant small-molecule modulators of NAADP-mediated  $Ca^{2+}$  release. *Chem Biol* 13, 659-665.
- Ebashi, S. and Kodama, A.. (1965). A new protein factor promoting aggregation of tropomyosin. *J Biochem (Tokyo)* 58, 107-108.
- Elbashir, SM., Harborth, J., Lendeckel, W. et al. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Endo, M., Tanaka, M. and Ogawa, Y.. (1970). Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature* 228, 34-36.
- Feuillet, V., Lucas, B., Di Santo, JP. et al. (2005). Multiple survival signals are delivered by dendritic cells to naive  $CD4^+$  T cells. *Eur J Immunol* 35, 2563-2572.
- Fill, M. and Copello, JA.. (2002). Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* 82, 893-922.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, MK. et al. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fischer, BS., Qin, D., Kim, K. et al. (2001). Capsaicin inhibits Jurkat T-cell activation by blocking calcium entry current I(CRAC). *J Pharmacol Exp Ther* 299, 238-246.
- Flügel, A., Willem, M., Berkowicz, T. et al. (1999). Gene transfer into  $CD4^+$  T lymphocytes: green fluorescent protein-engineered, encephalitogenic T cells illuminate brain autoimmune responses. *Nat Med* 5, 843-847.
- Franco, L., Guida, L., Bruzzone, S. et al. (1998). 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, 1507-1520.
- Franco, L., Zocchi, E., Usai, C. et al. (2001). Paracrine roles of  $NAD^+$  and cyclic ADP-ribose in increasing intracellular calcium and enhancing cell proliferation of 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 276, 21642-21648.

- Fulcher, DA. and Basten, A.. (1997). B-cell activation versus tolerance--the central role of immunoglobulin receptor engagement and T-cell help. *Int Rev Immunol* *15*, 33-52.
- Gasser, A., Bruhn, S. and Guse, AH.. (2006). Second messenger function of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate revealed by an improved enzymatic cycling assay. *J Biol Chem* *281*, 16906-16913.
- Gasser, A., Glassmeier, G., Fliegert, R. et al. (2006). Activation of T cell calcium influx by the second messenger ADP-ribose. *J Biol Chem* *281*, 2489-2496.
- Gerasimenko, JV., Maruyama, Y., Yano, K. et al. (2003). Naadp mobilizes  $Ca^{2+}$  from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors. *J Cell Biol* *163*, 271-282.
- Gerasimenko, JV., Sherwood, M., Tepikin, AV. et al. (2006). NAADP, cADPR and  $IP_3$  all release  $Ca^{2+}$  from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area. *J Cell Sci* *119*, 226-238.
- Gerasimenko, O. and Gerasimenko, J.. (2004). New aspects of nuclear calcium signalling. *J Cell Sci* *117*, 3087-3094.
- Goodrich, SP., Muller-Steffner, H., Osman, A. et al. (2005). Production of calcium-mobilizing metabolites by a novel member of the ADP-ribosyl cyclase family expressed in *schistosoma mansoni*. *Biochemistry* *44*, 11082-11097.
- Grapengiesser, E.. (1993). Cell photodamage, a potential hazard when measuring cytoplasmic  $Ca^{2+}$  with Fura-2. *Cell Struct Funct* *18*, 13-17.
- Green, EA. and Flavell, RA.. (1999). The initiation of autoimmune diabetes. *Curr Opin Immunol* *11*, 663-669.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, RY.. (1985). A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* *260*, 3440-3450.
- Gu, X., Yang, Z., Zhang, L. et al. (2004). Synthesis and biological evaluation of novel membrane-permeant cyclic ADP-ribose mimics: n1-[(5''-o-phosphorylethoxy)methyl]-5'-o-phosphorylinosine 5',5''-cyclicpyrophosphate (cIDPRE) and 8-substituted derivatives. *J Med Chem* *47*, 5674-5682.

- Guida, L., Bruzzone, S., Sturla, L. et al. (2002). Equilibrative and concentrative nucleoside transporters mediate influx of extracellular cyclic ADP-ribose into 3T3 murine fibroblasts. *J Biol Chem* 277, 47097-47105.
- Guse, AH.. (2000). Cyclic ADP-ribose. *J Mol Med* 78, 26-35.
- Guse, AH.. (2004). Biochemistry, biology, and pharmacology of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Curr Med Chem* 11, 847-855.
- Guse, AH.. (2004). Regulation of calcium signaling by the second messenger cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Curr Mol Med* 4, 239-248.
- Guse, AH.. (2005). Second messenger function and the structure-activity relationship of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *FEBS J* 272, 4590-4597.
- Guse, AH. and Emmrich, F.. (1991). T-cell receptor-mediated metabolism of inositol polyphosphates in Jurkat T-lymphocytes. identification of a d-myo-inositol 1,2,3,4,6-pentakisphosphate-2-phosphomonoesterase activity, a d-myo-inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate-1/3-phosphatase activity and a d/l-myo-inositol 1,2,4,5,6-pentakisphosphate-1/3-kinase activity. *J Biol Chem* 266, 24498-24502.
- Guse, AH., Berg, I., da Silva, CP. et al. (1997).  $Ca^{2+}$  entry induced by cyclic ADP-ribose in intact T-lymphocytes. *J Biol Chem* 272, 8546-8550.
- Guse, AH., Cakir-Kiefer, C., Fukuoka, M. et al. (2002). Novel hydrolysis-resistant analogues of cyclic ADP-ribose: modification of the "northern" ribose and calcium release activity. *Biochemistry* 41, 6744-6751.
- Guse, AH., Gu, X., Zhang, L. et al. (2005). A minimal structural analogue of cyclic ADP-ribose: synthesis and calcium release activity in mammalian cells. *J Biol Chem* 280, 15952-15959.
- Guse, AH., Roth, E. and Emmrich, F.. (1993). Intracellular  $Ca^{2+}$  pools in Jurkat T-lymphocytes. *Biochem J* 291 ( Pt 2), 447-451.
- Guse, AH., da Silva, CP., Berg, I. et al. (1999). Regulation of calcium signalling in t lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature* 398, 70-73.
- Hamada, K., Miyata, T., Mayanagi, K. et al. (2002). Two-state conformational changes in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulated by calcium. *J Biol Chem* 277, 21115-21118.

- Heiner, I., Eisfeld, J., Warnstedt, M. et al. (2006). Endogenous ADP-ribose enables calcium-regulated cation currents through TRPM2 channels in neutrophil granulocytes. *Biochem J* 398, 225-232.
- Hohenegger, M., Suko, J., Gscheidlinger, R. et al. (2002). Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate activates the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochem J* 367, 423-431.
- Hohlfeld, R.. (1997). Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. principles, problems and perspectives. *Brain* 120 ( Pt 5), 865-916.
- Ishikawa, J., Ohga, K., Yoshino, T. et al. (2003). A pyrazole derivative, ym-58483, potently inhibits store-operated sustained  $Ca^{2+}$  influx and il-2 production in T lymphocytes. *J Immunol* 170, 4441-4449.
- Jurado, LA., Chockalingam, PS. and Jarrett, HW.. (1999). Apocalmodulin. *Physiol Rev* 79, 661-682.
- Kawakami, N., Nagerl, UV., Odoardi, F. et al. (2005). Live imaging of effector cell trafficking and autoantigen recognition within the unfolding autoimmune encephalomyelitis lesion. *J Exp Med* 201, 1805-1814.
- Kishimoto, H. and Sprent, J.. (1997). Negative selection in the thymus includes semimature t cells. *J Exp Med* 185, 263-271.
- Klein, MG., Cheng, H., Santana, LF. et al. (1996). Two mechanisms of quantized calcium release in skeletal muscle. *Nature* 379, 455-458.
- Knight, MM., Roberts, SR., Lee, DA. et al. (2003). Live cell imaging using confocal microscopy induces intracellular calcium transients and cell death. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C1083-9.
- Koch-Nolte, F., Adriouch, S., Bannas, P. et al. (2006). ADP-ribosylation of membrane proteins: unveiling the secrets of a crucial regulatory mechanism in mammalian cells. *Ann Med* 38, 188-199.
- Kolisek, M., Beck, A., Fleig, A. et al. (2005). Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell* 18, 61-69.

- Kunerth, S., Langhorst, MF., Schwarzmann, N. et al. (2004). Amplification and propagation of pacemaker  $\text{Ca}^{2+}$  signals by cyclic ADP-ribose and the type 3 ryanodine receptor in T cells. *J Cell Sci* 117, 2141-2149.
- Langhorst, MF., Schwarzmann, N. and Guse, AH.. (2004).  $\text{Ca}^{2+}$  release via ryanodine receptors and  $\text{Ca}^{2+}$  entry: major mechanisms in NAADP-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in T-lymphocytes. *Cell Signal* 16, 1283-1289.
- Lee, HC.. (2001). Physiological functions of cyclic ADP-ribose and NAADP as calcium messengers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 317-345.
- Lee, HC.. (2005). Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)-mediated calcium signaling. *J Biol Chem* 280, 33693-33696.
- Lee, HC. and Aarhus, R.. (1995). A derivative of  $\text{NAD}^{\text{P}}$  mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem* 270, 2152-2157.
- Lee, HC. and Aarhus, R.. (1997). Structural determinants of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate important for its calcium-mobilizing activity. *J Biol Chem* 272, 20378-20383.
- Lee, HC., Walseth, TF., Bratt, GT. et al. (1989). Structural determination of a cyclic metabolite of  $\text{NAD}^+$  with intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing activity. *J Biol Chem* 264, 1608-1615.
- Lipp, P. and Niggli, E.. (1996). Submicroscopic calcium signals as fundamental events of excitation--contraction coupling in guinea-pig cardiac myocytes. *J Physiol* 492 ( Pt 1), 31-38.
- McNeil, PL., Murphy, RF., Lanni, F. et al. (1984). A method for incorporating macromolecules into adherent cells. *J Cell Biol* 98, 1556-1564.
- Mendez, F. and Penner, R.. (1998). Near-visible ultraviolet light induces a novel ubiquitous calcium-permeable cation current in mammalian cell lines. *J Physiol* 507 ( Pt 2), 365-377.
- Merritt, JE., Armstrong, WP., Benham, CD. et al. (1990). SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem J* 271, 515-522.

- Meszaros, LG., Bak, J. and Chu, A.. (1993). Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor  $Ca^{2+}$  channel. *Nature* 364, 76-79.
- Mikoshiba, K.. (2003). Inositol 1,4,5 trisphosphate ( $IP_3$ ) receptor. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 121, 241-253.
- Montes, M., McIlroy, D., Hosmalin, A. et al. (1999). Calcium responses elicited in human T cells and dendritic cells by cell-cell interaction and soluble ligands. *Int Immunol* 11, 561-568.
- Moore, CP., Rodney, G., Zhang, JZ. et al. (1999). Apocalmodulin and  $Ca^{2+}$  calmodulin bind to the same region on the skeletal muscle  $Ca^{2+}$  release channel. *Biochemistry* 38, 8532-8537.
- Muraro, PA., Pette, M., Bielekova, B. et al. (2000). Human autoreactive  $CD4^+$  t cells from naive  $CD45RA^+$  and memory  $CD45RO^+$  subsets differ with respect to epitope specificity and functional antigen avidity. *J Immunol* 164, 5474-5481.
- Noguchi, N., Takasawa, S., Nata, K. et al. (1997). Cyclic ADP-ribose binds to FK506-binding protein 12.6 to release  $Ca^{2+}$  from islet microsomes. *J Biol Chem* 272, 3133-3136.
- Novina, CD. and Sharp, PA.. (2004). The RNAi revolution. *Nature* 430, 161-164.
- Papp, S., Dziak, E., Michalak, M. et al. (2003). Is all of the endoplasmic reticulum created equal? The effects of the heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -handling proteins. *J Cell Biol* 160, 475-479.
- Parekh, AB., Riley, AM. and Potter, BVL.. (2002). Adenophostin A and ribophostin, but not inositol 1,4,5-trisphosphate or manno-adenophostin, activate the  $Ca^{2+}$  release-activated  $Ca^{2+}$  current, I(CRAC), in weak intracellular  $Ca^{2+}$  buffer. *Biochem J* 361, 133-141.
- Partida-Sanchez, S., Iribarren, P., Moreno-Garcia, ME. et al. (2004). Chemotaxis and calcium responses of phagocytes to formyl peptide receptor ligands is differentially regulated by cyclic adp ribose. *J Immunol* 172, 1896-1906.
- Paterson, PY.. (1966). Experimental allergic encephalomyelitis and autoimmune disease. *Adv Immunol* 5, 131-208.

- Patterson, RL., Boehning, D. and Snyder, SH.. (2004). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu Rev Biochem* 73, 437-465.
- Perraud, AL., Fleig, A., Dunn, CA. et al. (2001). ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by nudix motif homology. *Nature* 411, 595-599.
- Ponsford, M., Mazza, G., Coad, J. et al. (2001). Differential responses of CD45<sup>+</sup>ve T-cell subsets to MBP in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 124, 315-322.
- Quintana, A., Griesemer, D., Schwarz, EC. et al. (2005). Calcium-dependent activation of T-lymphocytes. *Pflugers Arch* 450, 1-12.
- Reuter, H. and Seitz, N.. (1968). The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol* 195, 451-470.
- Rocken, M., Urban, JF. and Shevach, EM.. (1992). Infection breaks T-cell tolerance. *Nature* 359, 79-82.
- Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A. et al. (2001). Immunocyte Ca<sup>2+</sup> influx system mediated by LTRPC2. *Science* 293, 1327-1330.
- Schatzmann, HJ.. (1966). ATP-dependent Ca<sup>2+</sup>-extrusion from human red cells. *Experientia* 22, 364-365.
- Scheuplein, F., Adriouch, S., Glowacki, G. et al. (2003). Triggering of T-cell apoptosis by toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferase ART2. *Ann N Y Acad Sci* 1010, 296-299.
- Schieven, GL., Kirihara, JM., Gilliland, LK. et al. (1993). Ultraviolet radiation rapidly induces tyrosine phosphorylation and calcium signaling in lymphocytes. *Mol Biol Cell* 4, 523-530.
- Schneider, U., Schwenk, HU. and Bornkamm, G.. (1977). 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, 621-626.
- Schwarzmann, N., Kunerth, S., Weber, K. et al. (2002). Knock-down of the type 3 ryanodine receptor impairs sustained Ca<sup>2+</sup> signaling via the T cell receptor/CD3 complex. *J Biol Chem* 277, 50636-50642.

- Sencer, S., Papineni, RV., Halling, DB. et al. (2001). Coupling of RyR1 and L-type calcium channels via calmodulin binding domains. *J Biol Chem* 276, 38237-38241.
- Singaravelu, K. and Deitmer, JW.. (2006). Calcium mobilization by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) in rat astrocytes. *Cell Calcium* 39, 143-153.
- Sospedra, M. and Martin, R.. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23, 683-747.
- Sprent, J., Kishimoto, H., Cai, Z. et al. (1996). The thymus and T cell death. *Adv Exp Med Biol* 406, 191-198.
- Steinman, L.. (1996). Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 85, 299-302.
- Streb, H., Irvine, RF., Berridge, MJ. et al. (1983). Release of  $Ca^{2+}$  from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306, 67-69.
- Takemura, H., Hughes, AR., Thastrup, O. et al. (1989). Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J Biol Chem* 264, 12266-12271.
- Tan, EM.. (1991). Autoantibodies in pathology and cell biology. *Cell* 67, 841-842.
- Thomas, D., Lipp, P., Tovey, SC. et al. (2000). Microscopic properties of elementary  $Ca^{2+}$  release sites in non-excitable cells. *Curr Biol* 10, 8-15.
- Thomas, JM., Masgrau, R., Churchill, GC. et al. (2001). Pharmacological characterization of the putative cADP-ribose receptor. *Biochem J* 359, 451-457.
- Tovey, SC., de Smet, P., Lipp, P. et al. (2001). Calcium puffs are generic  $InsP_3$ -activated elementary calcium signals and are downregulated by prolonged hormonal stimulation to inhibit cellular calcium responses. *J Cell Sci* 114, 3979-3989.
- Toyoshima, C. and Nomura, H.. (2002). Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* 418, 605-611.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. et al. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405, 647-655.

- Tsien, RW., Fox, AP., Hess, P. et al. (1987). Multiple types of calcium channel in excitable cells. *Soc Gen Physiol Ser* 41, 167-187.
- Tsien, RY.. (1981). A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* 290, 527-528.
- Tsugorka, A., Rios, E. and Blatter, LA.. (1995). Imaging elementary events of calcium release in skeletal muscle cells. *Science* 269, 1723-1726.
- Walseth, TF. and Lee, HC.. (1993). Synthesis and characterization of antagonists of cyclic-ADP-ribose-induced  $Ca^{2+}$  release. *Biochim Biophys Acta* 1178, 235-242.
- Walseth, TF., Aarhus, R., Kerr, JA. et al. (1993). Identification of cyclic ADP-ribose-binding proteins by photoaffinity labeling. *J Biol Chem* 268, 26686-26691.
- Wekerle, H.. (1993). Experimental autoimmune encephalomyelitis as a model of immune-mediated CNS disease. *Curr Opin Neurobiol* 3, 779-784.
- Winslow, MM. and Crabtree, GR.. (2005). Immunology. decoding calcium signaling. *Science* 307, 56-57.
- Wong, FS. and Janeway, CAJ.. (1999). Insulin-dependent diabetes mellitus and its animal models. *Curr Opin Immunol* 11, 643-647.
- Xu, J., Yang, Z., Dammermann, W. et al. (2006). Synthesis and agonist activity of cyclic ADP-ribose analogues with substitution of the northern ribose by ether or alkane chains. *J Med Chem* 49, 5501-5512.
- Yamasaki, M., Churchill, GC. and Galione, A.. (2005). Calcium signalling by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP). *FEBS J* 272, 4598-4606.
- Yamasaki, M., Masgrau, R., Morgan, AJ. et al. (2004). Organelle selection determines agonist-specific  $Ca^{2+}$  signals in pancreatic acinar and beta cells. *J Biol Chem* 279, 7234-7240.
- Yamasaki, M., Thomas, JM., Churchill, GC. et al. (2005). Role of NAADP and cADPR in the induction and maintenance of agonist-evoked  $Ca^{2+}$  spiking in mouse pancreatic acinar cells. *Curr Biol* 15, 874-878.
- Yao, Y., Choi, J. and Parker, I.. (1995). Quantal puffs of intracellular  $Ca^{2+}$  evoked by inositol trisphosphate in xenopus oocytes. *J Physiol* 482 ( Pt 3), 533-553.
- Yonetoku, Y., Kubota, H., Okamoto, Y. et al. (2006). Novel potent and selective calcium-release-activated calcium (CRAC) channel inhibitors. part 1: synthesis and

inhibitory activity of 5-(1-methyl-3-trifluoromethyl-1h-pyrazol-5-yl)-2-thiophenecarboxamides. *Bioorg Med Chem* 14, 4750-4760.

Zhang, J., Jin, D. and Higashida, H.. (2005). Acetylcholine stimulates cyclic ADP-ribose formation via M1 muscarinic receptors in rat superior cervical ganglion. *Biochem Biophys Res Commun* 335, 920-924.

Zitt, C., Strauss, B., Schwarz, EC. et al. (2004). Potent inhibition of Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2. *J Biol Chem* 279, 12427-12437.

Zocchi, E., Franco, L., Guida, L. et al. (1993). A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD<sup>+</sup> glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 196, 1459-1465.

## 8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich besonders Prof. Andreas H. Guse dafür danken, dass ich in seiner Arbeitsgruppe an einem sehr interessanten und innovativen Thema arbeiten konnte. Darüberhinaus bin ich ihm auch sehr dankbar für die intensive und sehr gute Betreuung, die ich im Vorfeld und im Laufe meiner Doktorarbeit erfahren habe.

Mein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. L. Renwrantz für die Betreuung meiner Doktorarbeit am Fachbereich Biologie.

Ganz besonders möchte ich auch meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe danken: Ralf Fliegert für genau die richtigen Hinweise und Denkanstöße bei einigen theoretischen Problemen von Zeit zu Zeit; Andreas Gasser, Karin Weber, Tanja Kirchberger, Sören Bruhn, Angelika Harneit wie auch allen anderen für eine sehr schöne Zeit.

Meiner Familie und allen meinen Freunden danke ich aus ganzem Herzen für die tolle Unterstützung, die ich während der Zeit meiner Doktorarbeit bekommen habe.

