

# **Intrazelluläre Mechanismen Integrin-vermittelter Calcium-Signale in Jurkat T-Lymphozyten**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereiches Chemie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**Hella Schöttelndreier**  
aus Johannesburg

Hamburg 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1997 bis Januar 2001 unter der Leitung von Herrn Prof. A. H. Guse am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie in der Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion der Universität Hamburg durchgeführt.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. G. Gercken
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. A. H. Guse

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 T-Lymphozyten	1
1.1.1 Aktivierung von T-Lymphozyten	1
1.1.2 Wanderung von T-Lymphozyten	3
1.2 Extrazelluläre Matrix	4
1.2.1 Struktur und Komponenten der Basalmembran	5
1.2.2 Struktur und Funktion von Laminin	5
1.2.3 Struktur und Funktion von Collagen Typ IV	7
1.3 Integrine	7
1.3.1 Struktur der Integrine	7
1.3.2 Die Integrin-Familie	9
1.3.3 Funktion der Integrine	10
1.4 Ca <sup>2+</sup> -Signalgebung in T-Lymphozyten	12
1.4.1 Inositol-1,4,5-trisphosphat	12
1.4.2 Cyklische ADP-Ribose	14
1.4.3 Nikotinsäureadeninucleotid-2'-phosphat (NAADP)	15
1.5 Integrine und Ca <sup>2+</sup> -Signalgebung	16
<b>2. Problemstellung</b>	<b>18</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>20</b>
3.1 Material	20
3.1.1 Zellkultur	20
3.1.2 EZM-Proteine und Polyaminosäuren	20
3.1.3 Antikörper	20
3.1.4 Substanzen zur Untersuchung der Signaltransduktion	21
3.1.5 Proteaseinhibitoren	21
3.1.6 Weitere Substanzen	22
3.1.7 Geräte	22
3.2 Methoden	23
3.2.1 Zellkultur	23

---

3.2.1.1	Haltung von Jurkat T-Lymphozyten	23
3.2.1.2	Kryokonservierung von Jurkat T-Lymphozyten	23
3.2.2	Beschichtung der Deckgläser mit EZM-Proteinen	24
3.2.3	Ca <sup>2+</sup> -Messung in Jurkat T-Lymphozyten	24
3.2.3.1	Beladung der Zellen mit FURA 2-AM	25
3.2.3.2	Messung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentration am Imaging-System	25
3.2.3.3	Kalibrierung des Imaging-Systems	26
3.2.4	Bestimmung der Adhäsion von T-Lymphozyten	27
3.2.4.1	Bestimmung der schwachen Adhäsion von T-Lymphozyten	27
3.2.4.2	Bestimmung der starken Adhäsion von T-Lymphozyten	28
3.2.5	Bestimmung der Spreitung	28
3.2.6	Herstellung von Zellysaten	28
3.2.6.1	Beschichtung von Petrischalen	28
3.2.6.2	Präparation von Zellysaten und Proteinbestimmung	29
3.2.6.3	Immunpräzipitation	29
3.2.6.4	Gelelektrophorese	30
3.2.6.5	Western Blot	30
3.3	Statistische Auswertung	31
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
4.1	Adhäsion, Ca <sup>2+</sup> -Signale und Spreitung von T-Lymphozyten auf Laminin/Poly-L-Lysin und Collagen Typ IV/Poly-L-Lysin	32
4.1.1	Adhäsion von T-Lymphozyten auf Laminin/Poly-L-Lysin	32
4.1.2	Ca <sup>2+</sup> -Signale und Spreitung der T-Lymphozyten auf Laminin/Poly-L-Lysin	33
4.1.3	Untersuchung der Adhäsion auf Laminin/Poly-L-Lysin	35
4.1.4	Abhängigkeit der Adhäsion von Polyaminosäuren	36
4.1.5	Ca <sup>2+</sup> -Signale in Abhängigkeit der Polyaminosäure	38
4.1.6	Untersuchung der Spezifität der Ca <sup>2+</sup> -Signale auf Laminin/Poly-L-Lysin	43
4.2	Versuche zur Signaltransduktion nach Stimulation der T-Lymphozyten durch Laminin/Poly-L-Lysin	45
4.2.1	Rolle von Integrinen	45
4.2.2	Rolle von Tyrosinkinase	47
4.2.3	Rolle von Phosphatasen	49

---

4.2.4 Rolle von Phospholipase C	50
4.2.5 Rolle von Proteinkinase C	51
4.2.6 Rolle von Phospholipase A <sub>2</sub>	53
4.3 Untersuchungen tyrosinphosphorylierter Proteine	55
4.4 Mögliche Botenstoffe bei der Ca <sup>2+</sup> -Signalgebung	57
4.4.1 Rolle von zyklischer ADP-Ribose	57
4.4.2 Rolle von Inositol-1,4,5-trisphosphat	58
4.5 Untersuchungen der bei der Laminin-vermittelten Ca <sup>2+</sup> -Signalgebung beteiligten Ca <sup>2+</sup> -Kanäle und Ca <sup>2+</sup> -Speicher	60
4.5.1 Untersuchung des Ca <sup>2+</sup> -Einstroms	60
4.5.2 Pharmakologische Untersuchung der Ca <sup>2+</sup> -Kanäle	62
<b>5. Diskussion</b>	<b>64</b>
5.1 Diskussion der Methoden	64
5.1.1 Messung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentration und Auswertung	64
5.1.2 Inhibitionsversuche	68
5.1.3 Untersuchungen tyrosinphosphorylierter Proteine	69
5.1.4 Untersuchungen der sekundären Botenstoffe für die Ca <sup>2+</sup> -Signalgebung	70
5.2 Diskussion der Ergebnisse	73
5.2.1 Adhäsion der T-Lymphozyten auf verschiedenen Beschichtungen	74
5.2.2 Ca <sup>2+</sup> -Signalgebung und Spreitung der T-Lymphozyten	75
5.2.3 Tyrosinphosphorylierung von Proteinen als Mechanismus für die Signaltransduktion	78
5.2.4 Mögliche sekundäre Botenstoffe für die Ca <sup>2+</sup> -Signalgebung	79
5.2.5 Bedeutung der Proteinkinase C	83
5.2.6 Bedeutung der Phospholipase A <sub>2</sub>	85
5.2.7 Ca <sup>2+</sup> -Signalgebung in T-Lymphozyten nach Stimulation durch Laminin/Poly-L-Lysin	86
5.2.8 Modellvorstellung zu divergenten Signaltransduktionswegen	88
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>91</b>
<b>7. Literatur</b>	<b>93</b>

## Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzen-sulfonylfluorid
AM	Acetoxy-Methylester
APS	Ammonium-persulfat
BPB	4-Bromo-phenacyl-bromid
BSA	Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin)
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre $Ca^{2+}$ -Konzentration
cADPR	cyklische ADP-Ribose
cGMP	cyklisches Guanosinmonophosphat
CIF	Calcium influx factor
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EGTA	Ethylenglykol-tetraacetat
ER	endoplasmatisches Reticulum
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	fokale Adhäsionskinase
FCS	Serum fötaler Kälber (fetal calf serum)
HEPES	2-N-Hydroxymethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor (hepatocyte growth factor)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IAP	Integrin-assoziiertes Protein
ICAM	intracellular adhesion molecule
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub>	Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat
Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif

---

kDa	kilo Dalton
MAdCAM	mucosal addressin cell adhesion molecule
MAPkinase	mitogen activated protein kinase
MCP-1 $\beta$	monocyte chemoattractant protein 1 $\beta$
MIDAS	Metall-Ion abhängiges Adhäsionsmotiv
MIP-1 $\alpha$	macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$
MMP	Metalloproteinasen
M <sub>r</sub>	relatives Molekulargewicht
NAADP	Nicotinsäureadenindinukleotid-2'-phosphat
NAD	Nikotinamiddinukleotid
NADP	Nikotinamiddinukleotidphosphat
NCS	Serum neugeborener Kälber (newborn calf serum)
OBAA	3-[(4-octadecyl)benzoyl]-acryl-säure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PKC	Proteinkinase C
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase (Proteinkinase G)
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-(4,5)bisphosphat
RANTES	<u>r</u> egulated on <u>a</u> ctivation, <u>n</u> ormal <u>T</u> cell <u>e</u> xpressed and <u>s</u> ecreted
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SERCA	sarcoplasmic/endoplasmic reticular Ca <sup>2+</sup> -ATPase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor-Necrosis-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TZR	T-Zellrezeptor
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VLA	very late after activation

## **1. Einleitung**

Eine Vielzahl von infektiösen Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten können zu einer pathologischen Schädigung eines Organismus führen. Als Schutz gegen solche Infektionen entwickelte sich im Laufe der Evolution das Immunsystem, das durch ein komplexes Zusammenspiel von spezialisierten Zellen die pathogenen Erreger unschädlich macht (Male & Roitt, 1991). Dabei unterscheidet man ein angeborenes und ein spezifisches, adaptives Immunsystem. Das angeborene Immunsystem versucht zunächst das Eindringen pathogener Mikroorganismen physikalisch (z. B. durch die Haut) oder biochemisch (z. B. durch Enzyme) abzuwehren. Gelingt es Infektionserregern dennoch einzudringen, so stehen durch das angeborene Immunsystem Phagozyten (Freßzellen) zur Verfügung, die die Erreger aufnehmen und damit unschädlich machen (Male & Roitt, 1991). Das spezifische, adaptive Immunsystem beruht dagegen auf den Lymphozyten, die auf ihrer Oberfläche Rezeptoren besitzen, die spezifisch körperfremde Moleküle (Antigene) erkennen können. Bei Bindung eines Antigens kommt es zur klonalen Expansion der Lymphozyten, wobei ein Teil dieser Lymphozyten nach Beendigung der Infektion erhalten bleibt, so daß eine dauerhafte Immunität gegeben ist (Janeway & Travers, 1995)

### **1.1 T-Lymphozyten**

T-Lymphozyten entstehen wie alle Leukozyten (weiße Blutkörperchen) aus einer hämatopoetischen Stammzelle, von denen sich zwei verschiedene Zelllinien, die lymphatischen und die myeloischen Zellen ableiten. Die lymphatischen Stammzellen differenzieren zu T-Lymphozyten, die im Thymus sowie in der fetalen Leber gebildet werden, und B-Lymphozyten, die im Knochenmark entstehen (Lydyard et al, 1991). Zu Beginn einer Immunantwort werden naive T-Lymphozyten durch Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen im lymphatischen Gewebe aktiviert. Dadurch kommt es zu einer Vergrößerung der Zelle und zur Neusynthese von RNA und Proteinen. Durch Teilung dieses Lymphoblasten entstehen Klone mit gleicher Antigen-Spezifität (klonale Expansion), die durch Differenzierung dann zu Effektorzellen oder T-Gedächtniszellen werden (Janeway & Travers, 1995).

#### **1.1.1 Aktivierung von T-Lymphozyten**

Die Aktivierung der T-Lymphozyten erfolgt über den T-Zellrezeptor-Komplex (TZR-Komplex) durch Bindung an ein Antigen. Der TZR-Komplex besteht aus dem T-Zell-Rezeptor ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette), den assoziierten CD3-Ketten ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) und einem  $\zeta$ -Homodimer bzw. einem

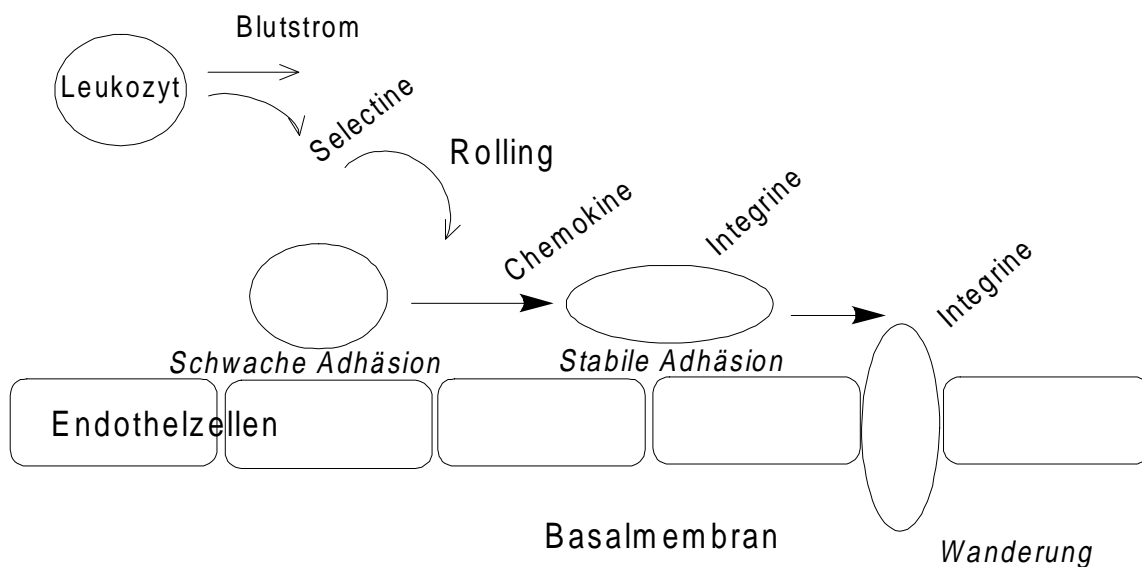


$\zeta/\eta$ -Heterodimer, wobei alle sieben Polypeptidketten die Zellmembran einfach durchspannen (Weiss, 1991; Finkel et al, 1991). Die spezifische Bindung eines Antigen an den T-Zellrezeptor ist nur möglich, wenn das Antigen von einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) prozessiert wurde und von einem MHC-Molekül (Haupthistokompatibilitätskomplex) auf ihrer Zelloberfläche so präsentiert wird, daß die antigene Bindungsstelle in den variablen Bereich der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des TZR kommt. Da der T-Zellrezeptor nur kurze cytoplasmatische Domänen besitzt, die weder eine enzymatische Aktivität noch Interaktionen zu anderen Proteinen zeigen, erfolgt die Signaltransduktion über den CD3-Komplex sowie über Co-Rezeptoren wie CD4 und CD8, die an den invarianten Teil des MHC-Moleküls binden (Emmrich, 1988; Janeway, 1992).

Nach der Ligation des TZR werden bestimmte Domänen (ITAM = immunoreceptor tyrosine-based activation motif) im cytosolischen Teil des CD3-Komplexes sowie der  $\zeta$ -Ketten durch membrangebundene Proteinkinasen der src-Familie, fyn und lck, tyrosinphosphoryliert. An die phosphorylierten ITAMs bindet dann ZAP-70, eine Proteinkinase der syk-Familie, die durch Phosphorylierung aktiviert wird und wiederum eine Reihe von intrazellulären Proteinen wie die Phospholipase  $C\gamma 1$  (PLC $\gamma 1$ ) phosphoryliert (Wange & Samelsen, 1996; Rudd, 1990). PLC $\gamma 1$  wird dadurch aktiviert und spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P $_2$ ) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (Ins(1,4,5)P $_3$ ) und 1,2-Diacylglycerol (DAG). Ins(1,4,5)P $_3$  setzt dann Ca $^{2+}$  aus intrazellulären Speichern frei, welches zu einem Einstrom von extrazellulärem Ca $^{2+}$  und so zu einer erhöhten intrazellulären Ca $^{2+}$ -Konzentration führt. Die freien Ca $^{2+}$ -Ionen aktivieren dann zusammen mit DAG die Proteinkinase C (PKC), die verschiedene membrangebundene Proteine wie die  $\gamma$ -Kette des CD3-Komplexes, cytoplasmatische Domänen von CD4 und CD45 und die Tyrosinkinase lck phosphoryliert (Berry und Nishizuka, 1990). Die Aktivierung von PKC ist notwendig für die Expression von Rezeptoren für Interleukin-2 (IL-2) sowie die Freisetzung von IL-2, das autokrin oder parakrin als Wachstumsfaktor für T-Lymphozyten dient. Dadurch wird die klonale Expansion und Differenzierung der T-Zellen stimuliert, die essentiell für die spezifische Immunantwort sind. Allerdings reicht für die volle Aktivierung der T-Lymphozyten die Stimulation über den T-Zellrezeptor allein nicht aus, sondern es sind weitere costimulatorische Signale erforderlich. Rezeptoren, die solche costimulatorischen Signale liefern, sind neben CD28, CD2, LFA-1, CD5 und diverse Interleukin-Rezeptoren.

### 1.1.2 Wanderung von T-Lymphozyten

Auf der Suche nach Infektionsherden und entzündlichen Bereichen müssen aktivierte T-Lymphozyten sich im Körper bewegen können und verlassen dabei auch die Blutbahn, um in lymphatisches oder entzündliches Gewebe einzudringen. Diese Migration der Zellen erfolgt im Wesentlichen über drei Schritte, die durch unterschiedliche Interaktionen von Rezeptoren mit Endothelzellen und Proteinen der extrazellulären Matrix gekennzeichnet sind (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1: Modell für die Migration von T-Lymphozyten**

T-Lymphozyten werden durch Interaktion von Selectinen mit Kohlenhydraten abgebremst und Botenstoffen (z. B. Chemokinen) ausgesetzt, die an einen 7-Transmembran-Rezeptor binden, der an ein G-Protein gekoppelt ist. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Integrine, die dann zu einer Spreitung und Adhäsion an die Endothelzellen führen. Anschließend wandern die T-Lymphozyten durch die Endothelschicht in die darunter liegende Basalmembran ein, wobei ebenfalls Integrine involviert sind. (verändert nach Brown, 1997)

Im ersten Schritt wird der im Blut schwimmende T-Lymphozyt über Selectine (Rezeptoren, die Kohlenhydratketten an Zelloberflächen erkennen; McEver, 1994; Varki, 1994) abgebremst, dann kommt es zu einer Adhäsion an die Endothelzellen (Butcher, 1991) sowie zu einer Spreitung der T-Zellen und anschließend zu einer Wanderung durch die Endothelschicht (Diapedesis) in die darunter befindliche basale Lamina (Ager, 1994; Albelda, 1994; Brown, 1997). Bei den letzten beiden Schritten spielen Integrine, eine Klasse von Oberflächenrezeptoren, eine wesentliche Rolle (Ager, 1994; Albelda, 1994; Brown, 1997). Diese Prozesse beinhalten eine Vielzahl von Regulationsmöglichkeiten (Übersichtsartikel:

Springer, 1994). So wird z. B. sowohl die Expression als auch die Aktivierung der Rezeptoren durch bestimmte Botenstoffe, sog. Chemoattractants, und damit die Adhäsion und Wanderung der T-Zellen beeinflusst (Shimizu et al, 1991). Chemoattractants können hierbei bestimmte Cytokine wie Interleukine (IL-7; Ariel et al, 1997; IL-15; Nieto et al, 1996; IL-2, Ariel et al, 1998) oder Tumor-Necrosis-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; Hershkoviz et al, 1994) oder Chemokine wie MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ ), MIP-1 $\beta$ , MCP-1 $\beta$  (monocyte chemoattractant protein 1 $\beta$ ) oder RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) sein (del Pozo et al, 1995; Lloyd et al, 1996; Tanaka et al, 1993; Cai et al, 1996). Desweiteren stimuliert der Hepatozyt Wachstumsfaktor (HGF) T-Zellen zu Adhäsion und Wanderung (Adams et al, 1994). In entzündlichem Gewebe kommt es zu einer Rekrutierung von T-Lymphozyten auch durch Abbauprodukte der extrazellulären Matrix, wobei Serin-Proteinasen sowie Matrix-Metalloproteinasen (MMP) eine wichtige Rolle spielen (Vaday & Lider, 2000). Da T-Lymphozyten diese Proteinasen nach Stimulation durch Chemokine zum Teil selbst sezernieren, sind sie aktiv an Veränderungen des entzündlichen Gewebes beteiligt und damit an der Signalgebung für weitere Zellen sowie am Verlauf einer Entzündung. Wie wichtig diese Regulation ist, zeigt sich im Falle der rheumatoiden Arthritis, bei der es zu einer außerordentlichen Rekrutierung von Lymphozyten und Monozyten in der Synovia (Gelenkschmiere) kommt und anschließend durch Freisetzung von Cytokinen und Enzymen zu einer Degradation der extrazellulären Matrix (Liote et al, 1996; Brown, 1997).

## 1.2 Extrazelluläre Matrix

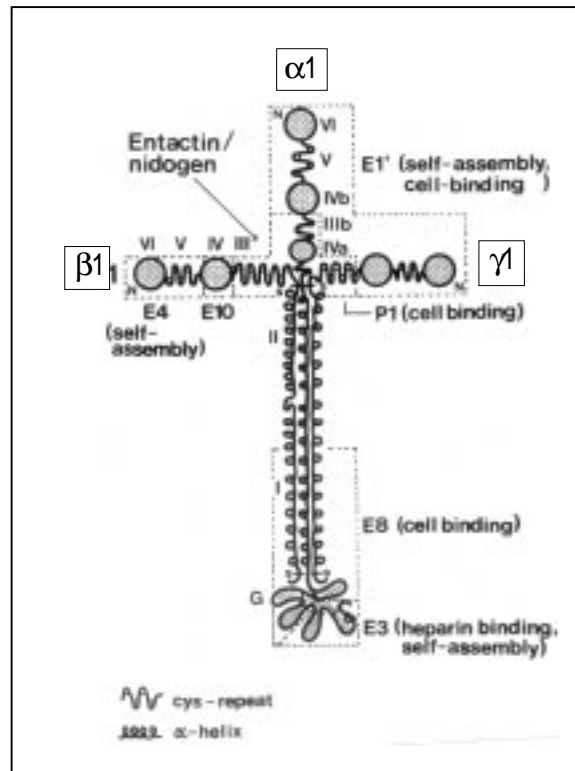
Zellen vielzelliger Organismen sind in die extrazelluläre Matrix (EZM) eingebettet, die von Zellen, z. B. von Fibroblasten sezerniert wird. Als extrazelluläre Matrix wird dabei ein komplexes Netz aus faserbildenden Proteinen, vor allem Collagenen, Elastin und Fibrillin, bezeichnet, in das Glykoproteine und Glykosaminoglykane, die Polysaccharidketten der Proteoglykane eingelagert sind. Die wichtigsten Glykosaminoglykane sind dabei Hyaluronat, Chondrotinsulfat, Heparansulfat und Heparin. Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix ist je nach Gewebe unterschiedlich. Neben der Stabilisierung von Gewebestrukturen hat die extrazelluläre Matrix auch eine Reihe von biologischen Funktionen bei der Entwicklung, Wanderung und Differenzierung von Zellen. Dabei sind insbesondere ihre makromolekulare Zusammensetzung und Struktur, sowie synergistische Interaktionen mit Wachstumsfaktoren und die Bindung an Rezeptoren an der Zelloberfläche von Bedeutung.

### 1.2.1 Struktur und Komponenten der Basalmembran

Als Basalmembran oder basale Lamina werden bestimmte Teile der extrazellulären Matrix bezeichnet, die unterschiedliche Zelllagen wie z. B. die Dermis von der Epidermis trennen. Sie besteht aus speziellen Proteinen der extrazellulären Matrix und grenzt direkt an Zellen an oder umgibt diese. Hauptbestandteile der Basalmembran sind Collagen Typ IV und Laminin, die jeweils Netzwerke ausbilden, die wiederum über Nidogen (Entactin) miteinander verbunden sind (Aumailley et al, 1989). Fibulin (ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein, Thomas & Dziadzek, 1993) und Perlecan (ein Proteoglykan, Aumailley et al, 1989) sind entweder durch direkte Bindung an Laminin oder Collagen oder über Nidogen in die Netzwerke eingelagert (Timpl et al, 1981; Yurchenco & O'Rear, 1994).

### 1.2.2 Struktur und Funktion von Laminin

Laminin ist ein extrazelluläres Matrixprotein, das ausschließlich in der Basalmembran epithelialer und nicht-epithelialer Zellen vorkommt. Es besteht aus drei Ketten, einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette, die ein kreuzförmiges Heterotrimer mit einem langen und drei kurzen Armen bilden (Abb. 1.2; Sonnenberg, 1990). Durch Kombination unterschiedlicher Laminin-Ketten werden je nach Gewebe verschiedene Isoformen des Laminins gebildet, wobei zur Zeit 7 Isoformen (Laminin-1 bis Laminin-7) bekannt sind (Burgeson et al, 1994; Timpl & Brown, 1994). Am besten charakterisiert ist dabei das auch in dieser Arbeit verwendete Laminin-1, das aus dem EHS-Tumor (Engelbreth-Holm-Swarm) der Maus recht einfach und in großen Mengen isoliert werden kann. Laminin-1 besteht aus der  $\alpha 1$  ( $M_r$  400 kDa), der  $\beta 1$  ( $M_r$  200 kDa) und der  $\gamma 1$ -Kette ( $M_r$  220 kDa), die im nativen Molekül ( $M_r$  800 kDa) durch Disulfidbrücken verknüpft sind (Abb. 1.2).



**Abb. 1.2: Struktur von Laminin-1**

Die drei Laminin-Ketten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) sind C-terminal in einer  $\alpha$ -Helix durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden. In den kurzen Armen befinden sich globuläre Strukturen (als Punkte dargestellt), die durch Cystein-reiche, EGF-ähnliche Strukturen voneinander getrennt sind. Die römischen Zahlen und G markieren durch Sequenz-analyse gefundene Domänen, während die mit E und P bezeichneten Domänen durch limitierten Abbau von Laminin gefunden wurden (E: durch Elastase und P: durch Pepsin). Jeweilige Bindungsstellen des Laminins sind gekennzeichnet. (verändert nach Yurchenco et al, 1990)

Laminin ist ein multifunktionales Protein, das für die Struktur der Basalmembran und die Morphogenese von Bedeutung ist. Dabei ist es in der Lage, durch Assemblierung ein Netzwerk zu bilden und Zellen durch Adhäsion zu Differenzierung, Migration und Proliferation anzuregen. Durch limitierten Abbau von Laminin durch Elastase, Pepsin, Chymotrypsin und Cathepsin wurden unterschiedliche Regionen des Laminins charakterisiert (Timpl et al 1983). So bindet das  $\alpha v \beta 3$ -Integrin an eine RGD-Sequenz im P1-Fragment (Aumailley et al, 1990; Abb. 1.2), während die Bindungsstellen für das  $\alpha 1 \beta 1$ - und das  $\alpha 2 \beta 1$ -Integrin im E1'-Fragment liegen. Das E8-Fragment (Abb. 1.2) enthält die Bindungsstellen für das  $\alpha 6 \beta 1$ -, das  $\alpha 7 \beta 1$ - und das  $\alpha 9 \beta 1$ -Integrin und stimuliert so u. a. das Neuritenwachstum und die Differenzierung, Wanderung und Proliferation von Myoblasten (Aumailley et al, 1990; Sonnenberg et al, 1990, von der Mark, 1991).

### **1.2.3. Struktur und Funktion von Collagen Typ IV**

Aus der Familie der Collagene ist in der Basalmembran hauptsächlich das Collagen Typ IV vorhanden, das aus zwei Ketten, einer  $\alpha 1(\text{IV})$  und einer  $\alpha 2(\text{IV})$  Kette besteht. Collagen Typ IV bildet wie Laminin ein Netzwerk, welches das strukturgebende Grundgerüst der Basalmembran darstellt (Timpl et al, 1981). Dieses Netzwerk entsteht durch drei unterschiedliche Interaktionen: 1. durch Zusammenlagerung von vier N-terminalen Segmenten zu einer 4-armigen Struktur, 2. durch kovalente Bindung von C-terminalen Domänen (NC1-Domäne) zu Dimeren und 3. durch nicht-kovalente Interaktionen der Tripelhelices (Yurchenco et al, 1994).

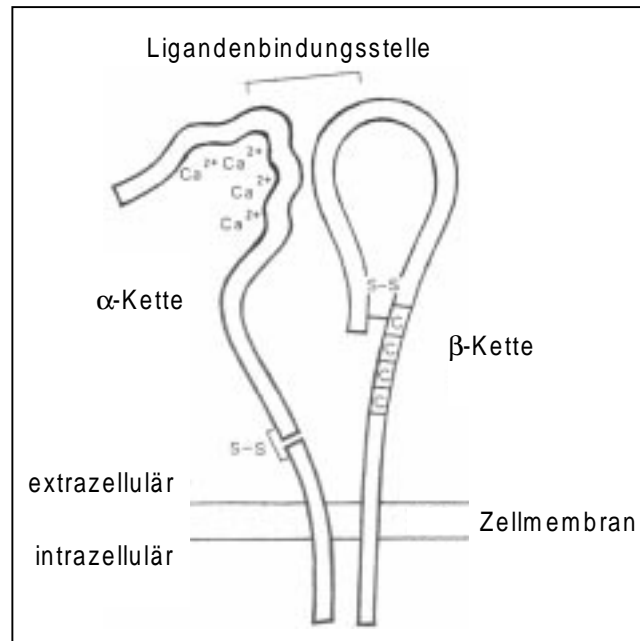
Für  $\text{CD4}^+$  T-Lymphozyten konnte eine spontane Wanderung in dreidimensionalen Collagen-Matrices beobachtet werden (Friedl et al, 1998).

## **1.3 Integrine**

Die Adhäsion von Zellen an extrazelluläre Matrixproteine führt zu Proliferation, Wanderung und Differenzierung der Zellen. Diese Prozesse sind insbesondere von Bedeutung bei der Embryogenese, der Wundheilung und der Metastasenbildung bei Krebs. Die Adhäsion der Zellen wird dabei hauptsächlich über bestimmte Oberflächenrezeptoren, die Integrine vermittelt (Clark & Brugge, 1995).

### **1.3.1 Struktur der Integrine**

Integrine sind heterodimere, transmembrane Glykoproteine, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette gebildet werden, die nicht kovalent miteinander verbunden sind und beide an der Bindung eines Liganden beteiligt sind (Hynes, 1987; Abb. 1.3).



**Abb. 1.3: Struktur der Integrine**

Integrine bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, die beide an der Bindung von Liganden beteiligt sind. Die  $\alpha$ -Kette besitzt extrazellulär drei bis vier Kationenbindungsstellen und besteht aus zwei Untereinheiten, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind. Die  $\beta$ -Kette ist durch eine Disulfidbrücke stark gefaltet und enthält eine Cystein-reiche Domäne (C). (verändert nach Sonnenberg, 1992)

Auffällig ist eine große extrazelluläre Domäne gegenüber einer kleinen intrazellulären Domäne. Die  $\alpha$ -Kette enthält drei bis vier Bindungsstellen für zweiwertige Kationen, die eine hohe Homologie zu den  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Loops der EF-Hand, z. B. von Calmodulin und Parvalbumin aufweisen (Strynadka & James, 1989; Tuckwell, 1992), sowie zu dem Galaktose bindenden Protein von *E. coli* (Vyas et al, 1987) und zu der Glykosyl-phosphatidyl-inositol spezifischen Phospholipase D (Low & Huang, 1991). Diese Kationenbindungsstellen sind für eine Konformationsänderung verantwortlich, die zu einer höheren Affinität der Integrine zu einem Liganden führt und daher als die aktive Form der Integrine bezeichnet wird. Einige  $\alpha$ -Ketten der Integrine (u. a.  $\alpha_6$ ) werden posttranslational in zwei Untereinheiten gespalten, bleiben aber über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft (von der Mark et al 1991, Abb. 1.3). Andere  $\alpha$ -Ketten (z. B.  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ) enthalten eine eingefügte I-Domäne, die Bindungsstellen für verschiedene Liganden erhält, z. B. für Collagen (Kamata et al, 1994).

Die  $\beta$ -Kette der Integrine besitzt 56 Cystein-Reste, die interne Disulfidbrücken ausbilden und so für eine stark gefaltete Konformation der  $\beta$ -Kette verantwortlich sind. Im extrazellulären Teil fast aller  $\beta$ -Ketten wurde ebenfalls eine I-Domäne gefunden, auf der sich ein Metall-Ion-

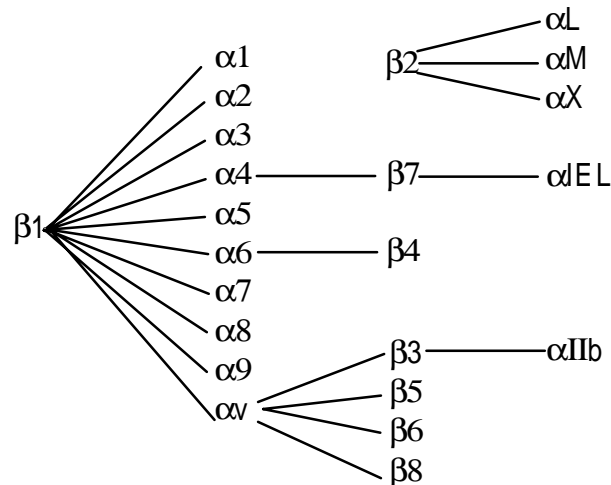
abhängiges Adhäsionsmotiv (MIDAS) befindet, das essentiell für die Integrin-vermittelte Adhäsion von Zellen zu sein scheint (Lee et al, 1995). Die cytoplasmatische Domäne der  $\beta$ -Kette enthält eine potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsstelle, die homolog zu der Phosphorylierungsstelle im EGF-Rezeptor ist (Argraves et al, 1987; Dedhar & Hannigan, 1996). Bei Bindung an ein EZM-Protein wird diese Stelle durch Kinasen, wahrscheinlich die fokale Adhäsionskinase pp125<sup>FAK</sup> phosphoryliert. Für  $\beta$ 1-Ketten wurde in fokalen Kontakten eine direkte Bindung an  $\alpha$ -Actinin (Otey et al, 1993) und Talin beschrieben, die über weitere Verknüpfung mit Vinculin, Paxillin und Tensin zu einer Interaktion mit den Actinfasern des Cytoskeletts führt (Johnson & Craig, 1995)

### 1.3.2 Die Integrin-Familie

Durch Kombination der z. Zt. bekannten 15 verschiedenen  $\alpha$ -Ketten und 8 verschiedenen  $\beta$ -Ketten werden 21 unterschiedliche Integrine gebildet, die die Integrin-Familie darstellen (Abb. 1.4).

Die größte Gruppe bilden hierbei die  $\beta$ 1-Integrine, die als VLA (= very late after activation antigens) bezeichnet werden. Die meisten Rezeptoren für EZM-Proteine gehören zu dieser Klasse, so auch die Rezeptoren für Laminin und Collagen (Abb. 1.4). Die zweite Gruppe, die  $\beta$ 2-Integrine sind hauptsächlich für die Interaktionen zwischen Zellen verantwortlich (Hogg, 1989; Kishimoto et al, 1987), während die  $\alpha$ v-Integrine wiederum Rezeptoren für EZM-Proteine wie Vitronektin (Cheresh & Spiro, 1987; Cheresh et al, 1989) darstellen.





<b>α1β1</b>	Collagen, Laminin-1	<b>αMβ2</b>	iC3b, Faktor X, Fibrinogen, ICAM-1
<b>α2β1</b>	Collagen, Laminin-1	<b>αLβ2</b>	ICAM-1, -2, -3
<b>α3β1</b>	Collagen, Laminin, Fibronectin, Epiligrin	<b>αxβ2</b>	iC3b, Fibrinogen
<b>α4β1</b>	Fibronectin (CS-1), VCAM	<b>α4β7</b>	Fibrinogen (CS-1), VCAM, MADCAM
<b>α5β1</b>	Fibronectin (RGD), Invasin	<b>αIELβ7</b>	?
<b>α6β1</b>	Laminin-1 (E8), Laminin-2, -5, Invasin	<b>α6β4</b>	Laminin-1, -5
<b>α7β1</b>	Laminin-1	<b>αIIbβ3</b>	Vitronectin, Fibronectin, Fibrinogen, von Willebrand-Faktor, Thrombospondin, Collagen
<b>α8β1</b>	?	<b>αvβ3</b>	Vitronectin, Fibrinogen, von Willebrand-Faktor, Fibronectin, denaturiertes Collagen, Laminin, Tenascin, Osteopontin, Thrombospondin
<b>α9β1</b>	Laminin-1 (E8), Collagen, Tenascin	<b>αvβ5</b>	Vitronectin
<b>αvβ1</b>	Fibronectin, Vitronectin	<b>αvβ6</b>	Fibronectin
		<b>αvβ8</b>	?

**Abb. 1.4: Die Integrin-Familie**

Durch Kombination der unterschiedlichen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten werden verschiedene Integrine gebildet, die sich in drei Gruppen einteilen lassen: die  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- oder  $\alpha$ v-Integrine. Die jeweiligen Liganden sind im unteren Teil der Abbildung aufgelistet (? = kein Ligand bekannt). Abkürzungen: VCAM = vascular cell adhesion molecule; ICAM = intercellular adhesion molecule; MADCAM = mucosal addressin cell adhesion molecule (verändert nach Cheresh, 1994)

### 1.3.3 Funktion der Integrine

Integrine sind nicht nur an der Adhäsion von Zellen an EZM-Proteine oder an andere Zellen beteiligt, sondern vermitteln auch Signale in das Innere der Zelle (Clark & Brugge, 1995). Da Integrine über keine enzymatische Aktivität verfügen, werden die Signale durch Interaktion der Integrine mit intrazellulären Proteinen weitergegeben (Hemler, 1998). Nach Bindung an einen Liganden entstehen meist Integrin-Protein-Komplexe, sog. fokale Adhäsionen. Dabei kommt es zu einer Zusammenlagerung mehrerer Integrine in der Zellmembran, die dann wiederum an

intrazelluläre Proteine binden (Clark & Brugge, 1995). Direkte Bindungen konnten für die  $\beta$ -Kette an  $\alpha$ -Actinin und Talin gezeigt werden, die wiederum über Vinculin, Paxillin oder Tensin die Verbindung zu den Actinfasern des Cytoskeletts herstellen. Eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielt die in fokalen Adhäsionen gefundene Kinase pp125<sup>FAK</sup> (FAK = fokale Adhäsionskinase), die weitere Proteine an Tyrosinresten phosphoryliert (Schaller & Parsons, 1994; Parsons et al, 1994). Dabei ist pp125<sup>FAK</sup> mit der  $\beta$ -Kette der Integrine assoziiert (Schaller & Parsons, 1994; Danker et al, 1998). Durch Ligandenbindung an ein Integrin kommt es zu einer Autophosphorylierung von pp125<sup>FAK</sup>, die somit Protein-Tyrosin-Kinasen der src-Familie (wie src, fyn oder csk) binden und aktivieren kann und durch Tyrosinphosphorylierung Paxillin in fokalen Adhäsionen lokalisiert. Es wird vermutet, daß durch die Phosphorylierung von Paxillin eine Bindung von Proteinen mit Src-Homologie (SH) 2-Domänen wie csk und crk ermöglicht wird (Schaller & Parsons, 1994). Ein weiteres Adaptorprotein, Grb2, kann ebenfalls an die phosphorylierte FAK binden und so eine Verbindung zu dem ras/MAP-Kinase Signaltransduktionsweg herstellen (Schlaepfer et al, 1994), der in vielen Zellsystemen die Genexpression reguliert.

Eine Besonderheit der Integrin-vermittelten Signalgebung ist, daß Integrine nicht nur Signale von außen nach innen in die Zelle geben, sondern auch Signale von innerhalb der Zelle empfangen und so die Affinität zu ihrem Liganden erhöhen können. Dies geschieht durch eine Konformationsänderung der Integrine, die durch Antikörper, die bestimmte Epitope erkennen, gezeigt werden kann (Luque et al, 1996). So kann die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch Phorbolster zu einer verstärkten Adhäsion der Zellen an EZM-Proteine führen, die auf „aktivierte“ Integrine zurückzuführen ist (Luque et al, 1996). Ebenso können Chemokine für eine Aktivierung der Integrine verantwortlich sein (HersHKoviz et al, 1995) oder eine Ligation von L-Selectin (Giblin et al, 1997). Desweiteren ist bei der Signalgebung über Integrine die Zusammenlagerung (clustering) von Integrinen von Bedeutung. So konnten Miyamoto und Mitarbeiter (1995) zeigen, daß die Bindung eines Liganden an ein Integrin wie auch die Zusammenlagerung der Integrine ohne Ligandenbindung bereits zu einem Signal führt. Das volle Signal wird aber erst durch Ligandenbindung und Zusammenlagerung der Integrine ermöglicht (Miyamoto et. al, 1995).

## 1.4 Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung in T-Lymphozyten

Wie bereits erwähnt, kommt es nach Aktivierung der T-Lymphozyten über den T-Zellrezeptor u. a. zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, die für die klonale Expansion und Differenzierung der T-Lymphozyten und damit für eine effektive Immunantwort essentiell ist. Bei der Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration werden zwei Phasen unterschieden: 1. ein transientes Ca<sup>2+</sup>-Signal und 2. eine langanhaltende Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (Plateau; Premack & Gardner 1992; Imboden et al, 1985). In der ersten Phase kommt es durch Botenstoffe zu einer Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus intrazellulären Speichern, die den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem extrazellulären Raum aktiviert, der für das langanhaltende Ca<sup>2+</sup>-Signal verantwortlich ist. Wie der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom durch die Plasmamembran in die Zelle aktiviert wird, ist noch nicht geklärt. Weit verbreitet ist das Modell des kapazitativen Ca<sup>2+</sup>-Einstroms nach Putney (Putney, 1986). Hierbei führt die Entleerung der intrazellulären Speicher zur Öffnung eines Ca<sup>2+</sup>-Kanals, der als SOC (store operated Ca<sup>2+</sup>-channel) oder CRAC (Ca<sup>2+</sup>-release activated Ca<sup>2+</sup>-channel) bezeichnet wird und elektrophysiologisch charakterisiert werden konnte (Hoth & Penner, 1992; Zweifach & Lewis, 1993; Premack et al, 1994). Der Mechanismus der Aktivierung dieses Kanals ist allerdings noch nicht geklärt. Diskutiert wird hierfür ein Calcium-Influx-Faktor (CIF) (Randriamampita & Tsien, 1993) oder eine direkte physikalische Kopplung zwischen Vesikeln in der Nähe der Plasmamembran und Ca<sup>2+</sup>-Kanälen in der Plasmamembran (Kiselyov et al, 1998). Zur Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus den intrazellulären Speichern sind drei physiologische Botenstoffe beschrieben: Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (Streb et al, 1983), cyklische ADP-Ribose (cADPR; Lee et al, 1989) und NAADP (Nicotinsäureadenin dinukleotid-2'-phosphat; Lee & Aarhus, 1995).

### 1.4.1 Inositol-1,4,5-trisphosphat

Nach Aktivierung von T-Lymphozyten über den T-Zellrezeptor kommt es u. a. zu einer Stimulation von PLC $\gamma$ 1 und damit zur Hydrolyse von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> und DAG. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> setzt dann über einen spezifischen Rezeptor, den Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-Rezeptor, Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern des endoplasmatischen Reticulums (ER) frei, welches zu einem transienten Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt (Berridge & Irvine, 1989; Berridge, 1993).

In T-Lymphozyten steigt die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-Konzentration nach Aktivierung über den T-Zellrezeptor schnell an, erreicht aber bereits nach 10 min wieder den Basalwert unstimulierter

Zellen (Guse, 1998).  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  wird dabei durch zwei Enzyme metabolisiert, die 5-Phosphatase, wobei  $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$  entsteht (Verjans et al, 1994), und die 3-Kinase, die  $\text{Ins}(1,3,4,5)$ -tetrakisphosphat ( $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ) bildet (Takazawa, 1990). Guse et al (1993) konnten zeigen, daß die Konzentration von  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  nach Stimulation über den TZR im Gegensatz zu  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  für mind. 60 min erhöht blieb. Allerdings führte eine Inhibition der  $\text{Ins}(1,4,5)$ -3-Kinase zu keiner Hemmung des langanhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals, so daß  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  nicht in der Lage ist,  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale zu generieren (da Silva et al, 1994).

Wie bereits erwähnt, setzt  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$   $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern frei. Die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher des ERs werden durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des sarcoplasmatischen/endoplasmatischen Reticulums (SERCA = sarcoplasmic/endoplasmic reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) wieder aufgefüllt. Werden die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher durch Hemmung von SERCA mit dem spezifischen Inhibitor Thapsigargin entleert und die Zellen anschließend stimuliert, so ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung inhibiert. Dadurch konnte gezeigt werden, daß  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$   $\text{Ca}^{2+}$  aus Speichern des ER freisetzt (Guse et al, 1993; Clementi et al, 1994). Dabei bindet  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  an einen spezifischen  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptor, der sich dann durch Konformationsänderung öffnet, so daß  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus den Speichern strömen. In Jurkat T-Lymphozyten konnte hierfür der Typ I  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptor gefunden werden, der essentiell für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung nach TZR-Stimulierung ist (Harnick et al, 1995; Jayaraman et al, 1995). Der Typ I  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptor besitzt Tyrosinphosphorylierungsstellen, die durch  $\text{p59}^{\text{fyn}}$  phosphoryliert werden (Jayaraman et al, 1996). Dadurch besteht die Möglichkeit einer Regulation durch  $\text{p59}^{\text{fyn}}$  nach Aktivierung über den TZR/CD3-Komplex. Allerdings war die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in T-Zellen von  $\text{fyn}$ -defizienten Mäusen nur geringfügig beeinflusst (Hedin et al, 1995).

Ein weiterer  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptor wurde in der Plasmamembran von Jurkat T-Lymphozyten gefunden (Khan et al, 1992), der die gleiche Affinität zu  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  und  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  zeigte. Da aber  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in T-Lymphozyten nicht beeinflusst, ist die Rolle dieses  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptors weiterhin unklar.

### 1.4.2 Cyclische ADP-Ribose

Als weiterer Botenstoff, der  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern freisetzen kann, wurde die cyclische ADP-Ribose (cADPR, Abb. 1.6) in Seeigeleiern entdeckt (Lee et al, 1989).

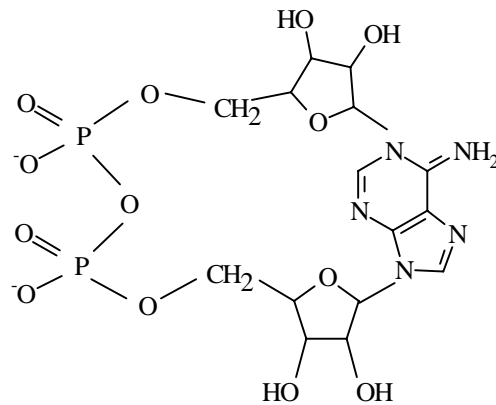


Abb. 1.6: Struktur von cADPR

Guse und Mitarbeiter konnten in den letzten Jahren zeigen, daß cADPR auch in T-Lymphozyten  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisiert (Guse et al, 1995, 1996, 1997; da Silva et al, 1998) und eine wichtige Rolle bei der langanhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung spielt (Guse et al, 1999). Durch Messung der cADPR-Konzentration mit Hilfe von HPLC wurde gezeigt, daß die Konzentration von cADPR in T-Lymphozyten kurz nach Stimulation über den TZR/CD3-Komplex ansteigt und bis zu 60 min erhöht bleibt (Guse et al, 1999).

cADPR wird durch Zyklisierung von  $\beta\text{-NAD}^+$  unter Freisetzung von Nicotinamid gebildet. Die Bildung von cADPR erfolgt enzymatisch mit Hilfe von ADP-Ribosyl-Cyklasen. Am besten untersucht ist hierbei die aus *Aplysia californica*, dem kalifornischen Seehasen, gewonnene Aplysia-Cyklase (Lee & Aarhus, 1991). Dabei handelt es sich um ein 29 kDa großes Enzym, das in Lösung als Dimer vorliegt und deren Struktur durch Röntgenstrukturanalyse bereits aufgeklärt wurde (Prasad et al, 1996). Desweiteren fanden Graeff et al (1998) in Homogenaten aus Seeigeleiern eine cytosolische cADPR-Cyklase, die durch cGMP aktiviert wurde und eine membrangebundene cADPR-Cyklase, die cGMP-unabhängig war. In höheren Eukaryonten wurde durch Sequenzhomologie eine neue Klasse an ADP-Ribosyl-Cyklasen gefunden, die membrangebunden vorliegen und neben der Cyclase-Aktivität auch NAD-Glykohydrolase und eine cADPR-Hydrolase-Aktivität besitzen (States et al, 1992). Hier wird besonders CD38, ein Transmembranprotein, das auch in T-Lymphozyten exprimiert wird, diskutiert. Allerdings liegt die katalytische Aktivität von CD38 außerhalb der Zelle, und es ist noch nicht geklärt, wie das

gebildete cADPR in die Zellen gelangen soll, um hier  $\text{Ca}^{2+}$  freizusetzen. Guse et al (1999) konnten im Cytosol von Jurkat T-Lymphozyten bereits eine ADP-Ribosyl-Cyklase-Aktivität messen, aber die Charakterisierung dieser cytosolischen Cyclase in T-Zellen steht noch aus.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch cADPR wird nicht von Thapsigargin, einem spezifischen Inhibitor für SERCA, beeinflusst. Daher muß die Freisetzung aus anderen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern als aus dem ER erfolgen. Neben dem ER wurden Coffein-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher in Jurkat T-Lymphozyten gefunden (Guse et al, 1993; Ricard et al, 1997a). Coffein ist seit langem bekannt,  $\text{Ca}^{2+}$  über den Ryanodin-Rezeptor (RyR) freizusetzen und langanhaltende  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale zu generieren. Die von cADPR vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung wird durch Coffein (Lee, 1993) und  $\text{Sr}^{2+}$  (Lee, 1995) verstärkt, während Ryanodin (Galione et al, 1991), Ruthenium Rot (Galione et al, 1991) und  $\text{Mg}^{2+}$  in hohen Konzentrationen (Graeff et al, 1995) die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch cADPR hemmen. Desweiteren zeigte eine Bindungsstudie mit [ $^3\text{H}$ ]-Ryanodin in einer Zellfraktion von T-Lymphozyten, daß cADPR die Bindung von Ryanodin an den Rezeptor verstärkt. Da Ryanodin nur an den Ryanodin-Rezeptor bindet, wenn er geöffnet ist, erscheint eine Öffnung durch cADPR sehr wahrscheinlich (Guse et al, 1999). Allerdings wurde noch keine direkte Bindung für cADPR an den Ryanodin-Rezeptor gezeigt, so daß ein weiterer Botenstoff an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch cADPR beteiligt sein könnte.

### 1.4.3 Nikotinsäureadenindinukleotid-2'-phosphat (NAADP)

NAADP wurde als weiterer Botenstoff für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern beschrieben (Lee & Aarhus, 1995). Es entsteht durch Austausch der Nikotinamid-Gruppe von NADP (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) durch Nikotinsäure (Abb. 1.7).

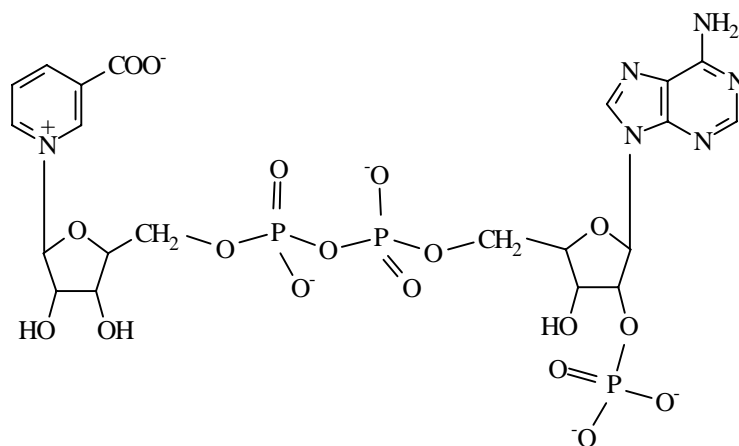


Abb. 1.7: Struktur von NAADP

NAADP setzt  $\text{Ca}^{2+}$  schon in nanomolaren Konzentrationen in Seeigeleiern (Lee & Aarhus, 1995), in Azinuszellen des Pankreas (Cancela, 1999) und in Jurkat T-Lymphozyten (Berg et al, 2000) frei, während in Mikrosomen aus Hirn 1  $\mu\text{M}$  NAADP nötig ist (Bak et al, 1999). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch NAADP in Seeigeleiern sowie in T-Lymphozyten konnte dabei weder durch  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - noch durch cADPR-Antagonisten gehemmt werden und ist damit, im Gegensatz zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in Azinuszellen, unabhängig von der durch  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  oder cADPR vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. In höheren Konzentrationen ist NAADP in der Lage, sich selbst zu desensitivieren, so daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung gehemmt wird (Lee et al, 1997; Genazzani et al, 1996). Durch gleichzeitige Mikroinjektion von selbst-inaktivierenden Konzentrationen an NAADP mit aktivierenden Konzentrationen an  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  oder cADPR in Jurkat T-Lymphozyten, konnte die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  bzw. cADPR inhibiert werden (Berg et al, 2000). In Übereinstimmung hiermit führte eine Injektion von selbst-hemmenden NAADP-Konzentrationen auch zu einer kompletten Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung über den TZR/CD3-Komplex (Berg et al, 2000). Nach dem Modell von Petersen und Cancela (1999) liefert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch NAADP das Trigger- $\text{Ca}^{2+}$ , das dann den  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptor und den Ryanodin-Rezeptor für ihre Liganden sensitiviert. Ob NAADP dabei an einen eigenen Rezeptor bindet oder als Costimulator für den  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - bzw. Ryanodin-Rezeptor wirkt, ist noch nicht geklärt.

### 1.5 Integrine und $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung

Neben zahlreichen Signaltransduktionsprozessen sind Integrine auch in der Lage,  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale zu stimulieren. Dabei scheint die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung von Zelltyp zu Zelltyp sowie von Integrin zu Integrin zu variieren. So konnte für HUVEC (= human umbilical vein endothelial cells) Zellen eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, die auf einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom beruhte, nach Kontakt mit Vitronektin ( $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrin) aber nicht mit Collagen ( $\alpha 2\beta 1$ -Integrin) gemessen werden (Leavesley et al, 1993). Schwartz et al (1994) fanden bei Endothelzellen ebenfalls eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Kontakt mit Fibronektin über das  $\alpha\text{v}$ -Integrin, obwohl dieses Integrin nicht an der Adhäsion der Zellen an Fibronektin beteiligt ist, die über das  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin verläuft. In Endothelzellen wurde außerdem ein Integrin-assoziiertes Protein (IAP) beschrieben, daß bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung nach Kontakt mit Fibronektin oder Vitronektin involviert ist (Schwartz et al, 1993). Aufgrund der vorausgesagten Struktur von IAP kommt es sogar als möglicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal in Frage (Schwartz et al, 1993).

In Leukozyten wurde eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nach Kreuzvernetzung von CD18, einem  $\beta 2$ -Integrin, beobachtet, die durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bedingt war (Altieri et al, 1992). Allerdings war diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung von der Aktivierung und Differenzierung der Zellen sowie von der assoziierten  $\alpha$ -Kette (CD11b) abhängig.

Zur Frage wie Integrine  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in den Zellen generieren, fanden Hellberg et al (1996) eine Tyrosinphosphorylierung von PLC $\gamma 2$  in Neutrophilen nach Stimulation über das  $\beta 2$ -Integrin und eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ . In Azinuszellen des Pankreas wurde nach Stimulation über  $\beta 1$ -Integrine eine Tyrosinphosphorylierung von PLC $\gamma 1$  gefunden (Wrenn et al, 1996), und in Jurkat T-Lymphozyten wurde nach Stimulation über das  $\alpha 4\beta 1$ -Integrin eine Erhöhung der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Konzentration gemessen (Ricard et al, 1997). Weismann et al (1997) fanden in Jurkat T-Lymphozyten ebenfalls eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Interaktion mit diversen Matrix-Proteinen wie Laminin, Collagen und Fibronectin. Nur Vitronectin war nicht in der Lage,  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale zu generieren (Weismann et al, 1997).

Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung durch Integrine scheint Calreticulin, ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein, wichtig zu sein. So konnten in Calreticulin-defizienten embryonalen Stammzellen keine Integrin-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale mehr beobachtet werden und die Adhäsion der Zellen war trotz gleicher Expression der Integrine gestört (Coppolino et al, 1997). Die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in die intrazellulären Speicher war dabei aber vergleichbar mit Wildtyp-Zellen. Kürzlich konnten Coppolino et al (1999) Calreticulin in Immunpräzipitaten mit  $\alpha v$ -Integrin nach Stimulation mit Vitronectin, aber nicht mit Collagen Typ IV, nachweisen. Für Jurkat T-Lymphozyten wurde eine Interaktion von Calreticulin mit  $\alpha 2\beta 1$ -Integrinen nach Kontakt mit Collagen Typ I beschrieben (Coppolino et al, 1995).



## 2. Problemstellung

Weismann et al (1997) fanden bereits, daß Integrine nach Interaktion mit verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix in der Lage sind,  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Jurkat T-Lymphozyten zu stimulieren. Aufbauend auf dieser Arbeit sollte daher die Integrin-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in Jurkat T-Lymphozyten nach Interaktion mit zwei Proteinen der Basalmembran, Laminin und Collagen Typ IV, untersucht werden. Dabei war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die intrazellulären Mechanismen der Integrin-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung zu untersuchen.

Die Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sollte mit Hilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes FURA 2-AM in einzelnen Zellen an einem digitalen Imaging-System erfolgen. Hierfür wurden die T-Lymphozyten auf mit Laminin oder Collagen Typ IV beschichtete Deckgläser gegeben und auf den Objektträger des Mikroskops am Imaging-System überführt. Da die Zellen nur sehr schlecht an Laminin und auch Collagen Typ IV hafteten, blieben sie nicht im Fokus oder in dem Bildausschnitt der digitalen Kamera des Imaging-Gerätes, so daß eine Bestimmung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über einen längeren Zeitraum dann nicht mehr möglich war. Daher sollte zunächst ein besser geeignetes Meßsystem etabliert werden. Poly-L-Lysin war schon bekannt, T-Lymphozyten (wie auch andere Zellen) ohne Stimulation an Deckgläser zu adhären. Daher wurde eine Kombination von Laminin bzw. Collagen Typ IV und Poly-L-Lysin als Beschichtung der Deckgläser gewählt. Kontakt der T-Lymphozyten mit dieser Beschichtung führte 1. zu einer sehr starken Adhäsion der Zellen, 2. zu einer stark erhöhten, langanhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung verglichen mit Zellen auf EZM-Protein allein, und 3. zu einer Spreitung der Zellen.

Der Ersatz von Poly-L-Lysin durch andere Polyamino-säuren sollte zunächst die Rolle der Polyamino-säure klären und sicherstellen, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung sowie die Spreitung der Zellen nicht auf unspezifische Effekte zurückzuführen war.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung und die Spreitung der T-Lymphozyten nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin sollten dann mit Hilfe spezifischer Antikörper sowie mit spezifischen inhibitorischen Substanzen untersucht werden. Bei der Aufklärung der sekundären Botenstoffe der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung stand ein membranpermeabler Antagonist für die cyclische ADP-Ribose, 7-Deaza-8-Br-cADPR, zur Verfügung, Die nähere Bestimmung von Proteinen, die in die

Integrin-vermittelte Signaltransduktion in T-Lymphozyten involviert sind, sollte mittels Gelelektrophorese und Western Blot erfolgen.

Da die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in T-Lymphozyten bis heute nur unzureichend beschrieben sind, war die pharmakologische Charakterisierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, durch die der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach der Integrin-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung erfolgt, ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Diese Daten sollten mit der pharmakologischen Charakterisierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle verglichen werden, die nach Stimulation über den TZR/CD3-Komplex dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom dienen. Dadurch sollte geklärt werden, ob nach Stimulation der T-Lymphozyten über unterschiedliche Rezeptoren, TZR/CD3-Komplex und Integrine, dieselben oder eben unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom verantwortlich wären.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

Alle im folgenden nicht genannten Substanzen wurden in höchstmöglicher Reinheit bei Merck, Darmstadt oder Sigma, Deisenhofen bezogen.

##### 3.1.1 Zellkultur

RPMI 1640 mit Glutamax I

Serum neugeborener Kälber (NCS)

Serum fötaler Kälber (FCS)

Penicillin/Streptomycin

Trypanblau

alle Substanzen von Gibco LifeTechnologies, Karlsruhe

##### 3.1.2 EZM-Proteine und Polyaminosäuren

Laminin I, Maus, isoliert aus EHS-Tumor, LifeTechnologies, Karlsruhe

Collagen Typ IV; LifeTechnologies, Eggenstein

Poly-L-Lysin, Hydrobromid, M. W. 15000-30000

Poly-D-Lysin, Hydrobromid, M. W. 15000-30000

Poly-DL-Serin, M.W. 5000-15000

Poly-L-Arginin, Hydrochlorid, M. W. 15000-70000

Poly-L-Glutaminsäure, Na-Salz, M. W. 15000-50000

alle Polyaminosäuren von Sigma, Deisenhofen

##### 3.1.3 Antikörper

anti- $\beta$ 1 Integrin, P4C10, monoclonal, Maus, Pharmingen, Hamburg

anti- $\beta$ 1 Integrin, 4B7R, monoclonal, Maus, Pharmingen, Hamburg

anti- $\alpha$ 6 Integrin, CD49f, monoclonal, Ratte, Pharmingen, Hamburg

anti- $\alpha$ 6 Integrin, GoH3, monoclonal, Maus, LifeTechnologies

anti- $\beta$ 4 Integrin, CD104, monoclonal, Maus, Pharmingen, Hamburg

anti-Phosphotyrosin, PY99, monoclonal, Maus, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

anti-Phosphotyrosin, polyclonal, Kaninchen, Upstate

anti-PLC $\gamma$ 1, polyclonal, Kaninchen Antiserum, Pharmingen, Hamburg

anti-PLC $\gamma$ 1, E-12, monoclonal, Maus, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg  
anti-FAK, C-20, polyclonal, Kaninchen, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg  
anti-FAK, A.17, polyclonal, Kaninchen, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg  
anti-fyn, 15, monoclonal, Maus, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg  
anti-lck, 3A5, monoclonal, Maus, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg  
Peroxidase konjugierter Ziege anti-Maus, IgG (H+L), dianova, Hamburg  
Peroxidase konjugierter Ziege anti-Kaninchen, IgG (H+L), dianova, Hamburg  
Peroxidase konjugierter Esel anti-Maus, IgG (H+L), minimale Reaktion mit Rind, Huhn,  
Ziege, Meerschweinchen, Hamster, Pferd, Mensch, Kaninchen, Ratte und Schaf Serum  
Proteine, dianova, Hamburg

### **3.1.4 Spezifische Substanzen zur Aufklärung der Signaltransduktion**

Die folgenden Substanzen wurden bei Calbiochem Novabiochem, Bad Soden bezogen:

U73122, U73343

Genistein, Daidzein

Calphostin C

Cytochalasin D

OBAA

SK-F96365 Hydrochlorid

Nitrendipin

Verapamil

GF109203x, Biomol, Hamburg

Bromophenacyl-Bromid (BPB) Sigma, Deisenhofen

### **3.1.5 Proteaseinhibitoren**

Alle Proteaseinhibitoren wurden bei Biomol, Hamburg bezogen:

Pefabloc SC

Leupeptin

Pepstatin

Antipain

### **3.1.6 Weitere Substanzen**

FURA 2 freie Säure, Calbiochem, Bad Soden

FURA 2-AM, Calbiochem, Bad Soden

Protein-G-Sepharose, fastflow, Amersham Pharmacia Biotech

ECL-kit, RPN 2106, Amersham Pharmacia Biotech

BioRad Reagenz, Biorad, München

MultiMark, multi coloured protein standard, Novex

### **3.1.7 Geräte**

Varifuge 3.0 R, Heraeus, Hanau

CO<sub>2</sub>-Inkubator, Heraeus, Hanau

Sterile Werkbank, BDK, Sonnenbühl-Genkingen

Lichtmikroskop, Will, Wetzlar

Inversmikroskop, Leitz, Wetzlar

Hämozytometer mit Teilung nach Neubauer, Hellma, Mülheim, Baden

Inverses Axiovert 100 Fluoreszenz-Mikroskop, Zeiss, Oberkochen

Digitale, ratiometrische Imaging-Station, Photo Med GmbH/Photon Technology, Wedel

PAGE-Elektrophoresekammer, Höfer, Pharmacia, Freiburg

Western Blot Kammer, BioRad, München

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

#### 3.2.1.1 Haltung von Jurkat T-Lymphozyten

*Zellkulturmedium I: RPMI 1640 mit Glutamax I, 7,5 % Serum neugeborener Kälber (NCS), 25 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin*

Für alle Versuche wurden T-Lymphozyten der humanen leukämischen Zelllinie Jurkat verwendet. Diese wurden in Zellkulturmedium I im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in sterilen Zellkulturflaschen kultiviert. Verdünnt wurde die Zellsuspension alle 2 Tage von 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml auf 0,3 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml. Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe eines Hämozytometers. Die Vitalität der Zellen wurde durch Anfärbung mit Trypanblau bestimmt.

#### 3.2.1.2 Kryokonservierung von Jurkat T-Lymphozyten

*Einfriermedium: 90 % (v/v) Serum von Kälberföten (FCS) und 10 % (v/v) DMSO*

Zur Kryokonservierung von Jurkat T-Lymphozyten wurden 2 x 10<sup>7</sup> Zellen bei 338 x g 5 min in einem 12 ml Plastikröhrchen (Falcon) zentrifugiert, in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden für mind. 2 Stunden bei -70°C eingefroren bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

*Zellkulturmedium II: RPMI 1640 mit Glutamax I, 10 % FCS, 25 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin*

Zum Auftauen der Jurkat T-Lymphozyten wurden 1 bis 2 Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und unter einer sterilen Werkbank in ein steriles Röhrchen mit 15 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium II pipettiert. Danach wurden die Zellen 3 mal gewaschen indem sie bei 555 x g 5 min zentrifugiert und in jeweils 15 ml Medium wieder resuspendiert wurden. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in sterile Zellkulturflaschen überführt und im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nachdem sie sich innerhalb von 24 Stunden ca. um den Faktor 1,8 vermehrten, wurde das Zellkulturmedium II mit Zellkulturmedium I nach jeder Verdünnung in folgenden Verhältnissen eingesetzt: 3:1; 1:1; 1:3 und die Zellen dann wie unter 3.2.1.1 beschrieben in Zellkulturmedium I kultiviert.

### 3.2.2 Beschichtung der Deckgläser mit EZM-Proteinen

*PBS-Puffer: 137 mM NaCl, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM KCl, pH 7,4*

Zunächst wurden kleine Dichtungsringe ( $\varnothing = 1,2$  cm) mit Silikonpaste auf den Deckgläsern (21 x 56 mm, Stärke 0,13 - 0,17 mm) befestigt. In diese Kammern wurden je 100  $\mu$ l EZM-Protein (5  $\mu$ g/ml in PBS-Puffer) gegeben und eine Stunde bei 37°C im Brutschrank (oder über Nacht bei 4°C) inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser je zweimal mit 100  $\mu$ l kaltem PBS-Puffer gewaschen und 100  $\mu$ l der entsprechenden Polyaminosäure (50  $\mu$ g/ml in A. bidest) oder BSA (2% in PBS-Puffer) in die Kammer gegeben und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Deckgläser mit je 100  $\mu$ l kaltem PBS-Puffer wurden die Beschichtungen unter 100  $\mu$ l PBS-Puffer abgedeckt bis zur Messung stehengelassen, so daß die Beschichtung nicht trocknete.

### 3.2.3 Ca<sup>2+</sup>-Messung in Jurkat T-Lymphozyten

Die Messung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von Jurkat T-Lymphozyten erfolgte ratiometrisch mit Hilfe des Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes FURA 2-AM an einem digitalen Imaging-System. FURA 2 ist ein fluoreszierendes EGTA-Derivat mit von der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration abhängigen Fluoreszenzeigenschaften. So nimmt die Intensität des emittierten Lichts bei 510 nm nach Anregung bei 340 nm mit steigender Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zu, während die Intensität des emittierten Lichts bei 510 nm nach Anregung bei 380 nm mit steigender Ca<sup>2+</sup>-Konzentration abnimmt. Die Ratio wird durch das Verhältnis der Intensitäten der Emission nach Anregung bei 340 nm und nach Anregung bei 380 nm gebildet (Ratio = I<sub>340</sub>:I<sub>380</sub>) und in der vorliegenden Arbeit als Ratiowert bezeichnet. Der Vorteil der ratiometrischen Messung liegt darin, daß Parameter wie Konzentration des Farbstoffes, Empfindlichkeit des Meßsystems, Ausbleichen des Farbstoffes etc. die Meßwerte nicht beeinflussen (Thomas et al., 1991).

FURA 2-AM ist die veresterte Form der FURA 2 freien Säure und somit permeabel für Zellmembranen. Während der Beladung der Zellen spalten cytosolische Esterasen den Acetoxymethylester FURA 2-AM zu FURA 2 freier Säure, so daß der Farbstoff nun nicht mehr membranpermeant ist und im Cytosol sowie Diffusions-bedingt auch im Nucleus der Zellen verbleibt.

### 3.2.3.1 Beladung der Zellen mit FURA 2-AM

*Ca<sup>2+</sup>-Meßpuffer: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM HEPES,  
1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,5 mM Glucose, pH 7,4*

Ca.  $8 \times 10^6$  Zellen wurden bei 555 x g 4 min zentrifugiert, in 1 ml warmem Zellkulturmedium I (vgl. 3.2.1.1) resuspendiert und 5 min bei 37°C im Wasserbad stehengelassen. Dann wurden 4 µM (Endkonzentration) FURA 2-AM zugegeben und die Zellen 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 4 ml Zellkulturmedium I wurde nochmals für 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 555 x g 4 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, mit 4 ml Ca<sup>2+</sup>-Meßpuffer gewaschen und anschließend in 4 ml Ca<sup>2+</sup>-Meßpuffer resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde vor Licht geschützt bei Raumtemperatur bis zur Messung aufbewahrt, wobei die Messungen in einem Zeitraum von bis zu 6 Stunden durchgeführt wurden.

### 3.2.3.2 Messung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration am Imaging-System

Die Messung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration erfolgte an einem digitalen Imaging System der Firma Photomed/PTI (Wedel). Hierzu wurden jeweils 40 µl Zellsuspension und 60 µl Ca<sup>2+</sup>-Meßpuffer in die Kammer (s. 3.2.2) auf den beschichteten Deckgläsern gegeben. Die Deckgläser wurden auf das inverse Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100; Zeiss, Oberkochen) des Imaging Gerätes überführt und bei einer 400-fachen Vergrößerung fokussiert. Die Probe wurde mit Wellenlängen von 340 nm bzw. 380 nm angeregt. Das Emissionslicht wurde bei 510 nm gefiltert, mit einer CCD-Kamera (Typ C2400-77 Auflösung: 525 x 487 pixel; Hamamatsu) aufgenommen und an einen Rechner weitergeleitet. Mit Hilfe entsprechender Software (Image Master, Version 1.333 for windows; Photomed/PTI) wurden die Fluoreszenzbilder nach Anregung von 340 nm und 380 nm aufgenommen und gespeichert und das Ratiobild 340:380 mit Hilfe der Software errechnet. Die jeweiligen Fluoreszenzbilder wurden als Falschfarbenbilder in der sog. Poenie-Tsien-Darstellung dargestellt. Bei der Poenie-Tsien-Darstellung sind von 8 bit nur 6 bit für die Darstellung der Farben verfügbar während die restlichen 2 bit zur Berechnung eines besseren Signal-Rausch-Verhältnisses genutzt werden, indem durch Festlegung eines Grenzwertes die gemessene Intensität verstärkt oder geschwächt wird. In der Regel wurden alle 20 sec Fluoreszenzbilder über einen Zeitraum bis zu 60 min aufgenommen.

Die Auswertung der so aufgenommenen Rohdaten erfolgte mit Hilfe entsprechender Software der Firma Photomed/PTI (Image Master, Version 1.333 for windows). Dabei wurden sog. „regions of interest“ (ROI) in einzelne Zellen gesetzt, so daß jeweils die ganze Zelle ein ROI



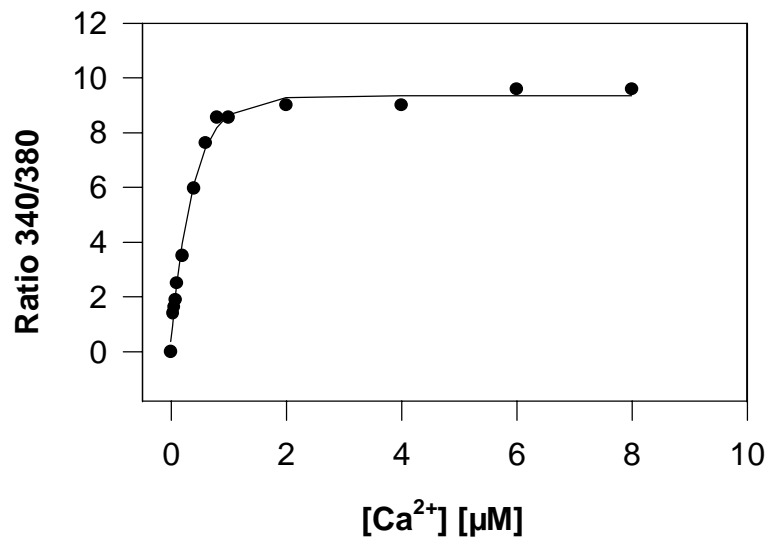
darstellte, und der Mittelwert der Ratio 340/380 für die jeweilige Interessenzzone gebildet. Mittels der Software wurden also die Mittelwerte der Ratios einzelner ganzer Zellen zu allen Zeitpunkten der Messung errechnet. Die Ratiowerte wurden dann mit Hilfe einer externen Kalibrierung in die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen umgerechnet.

### 3.2.3.3 Kalibrierung des Imaging-Systems

*Intrazellulärer Puffer: 20 mM HEPES, 110 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,2*

Da das Imaging-System wie unter 3.2.3.2 beschrieben nur die Ratiobilder 340:380 der Fluoreszenzbilder nach Anregung mit den Wellenlängen 340 nm bzw. 380 nm darstellte, war eine Kalibrierung des Systems erforderlich, um die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu bestimmen. Die Kalibrierung des Systems erfolgte durch Puffer mit definierten Konzentrationen an freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Die Konzentrationen an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  in intrazellulärem Puffer plus 1 mM EGTA und definierten Mengen an  $\text{CaCl}_2$  wurden nach (Alexander Fabiato, 1991) berechnet. Danach wurden Puffer mit definierten Konzentrationen an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  von 25 nM bis 10  $\mu\text{M}$  hergestellt.

Zur Kalibrierung wurden 100  $\mu\text{l}$  des definierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffers auf ein Deckglas gegeben, 1  $\mu\text{M}$  (Endkonzentration) FURA 2 freie Säure zugegeben und gut durchmischt. Das Deckglas wurde auf das Mikroskop des Imaging-Systems überführt und mit Licht der Wellenlängen 340 nm bzw. 380 nm angeregt. Die Emission wurde bei 510 nm gefiltert und die Fluoreszenzbilder aufgenommen. Mit Hilfe der Imaging Software (Image Master, Version 1.333 for windows) wurde die Ratio 340:380 gebildet. Anhand dieser Ratiowerte für verschiedene Konzentrationen an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  wurde eine Eichkurve erstellt (Abb. 3.2.1).



**Abb. 3.2.1: Kalibrierung des Imaging-Systems**

Zur Kalibrierung des Imaging-Systems wurden Puffer mit definierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen hergestellt, mit  $1 \mu\text{M}$  FURA 2 freier Säure versetzt und die Emission nach Anregung bei 340 nm bzw. 380 nm bei 510 nm gemessen. Mit Hilfe der Software (Image Master, Version 1.333 for windows; Photomed/PTI) wurde die jeweilige Ratio 340/380 gebildet. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus mind. 3 Messungen.

Die so erstellte Eichkurve wurde zur Bestimmung der freien intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration genutzt. Bei entscheidenden Änderungen des Meßsystems, z. B. dem Einbau einer neuen UV-Lampe, wurde die Eichkurve neu erstellt. Daher differiert der Zusammenhang zwischen Ratiowert und  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Laufe dieser Arbeit, da über den gesamten Zeitraum 4 verschiedene Eichkurven erstellt wurden.

### 3.2.4 Bestimmung der Adhäsion von T-Lymphozyten

#### 3.2.4.1 Bestimmung der schwachen Adhäsion von T-Lymphozyten

Zur Bestimmung der schwachen Adhäsion von T-Lymphozyten wurden Deckgläser wie unter 3.2.2 beschrieben beschichtet. Ca.  $8 \times 10^6$  Zellen wurden 4 min bei  $555 \times g$  zentrifugiert, in 4 ml  $\text{Ca}^{2+}$ -Meßpuffer gewaschen und anschließend in 4 ml  $\text{Ca}^{2+}$ -Meßpuffer resuspendiert.  $40 \mu\text{l}$  dieser Zellsuspension und  $60 \mu\text{l}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Meßpuffer wurden in die beschichtete Kammer auf dem Deckglas gegeben und zur Adhäsion 15 min bei RT stengelassen. Danach wurde das Deckglas um ca.  $45^\circ$  gekippt und die Zellsuspension mit der Pipette abgesaugt. Die Zellen in der abgenommenen Suspension wurden im Hämocytozometer gezählt. Die eingesetzte Zellzahl wurde durch Mischen von  $40 \mu\text{l}$  Zellsuspension plus  $60 \mu\text{l}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Meßpuffer und Zellzählung im Hämocytozometer bestimmt.

### 3.2.4.2 Bestimmung der starken Adhäsion der T-Lymphozyten

Vor Bestimmung der starken Adhäsion wurde zunächst die schwache Adhäsion wie unter 3.2.4.1 beschrieben bestimmt. Nach Absaugen der Zellsuspension zur Bestimmung der schwachen Adhäsion, wurden 100  $\mu\text{l}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Meßpuffer in die Kammer gegeben und die noch adhärierenden Zellen durch 8-maliges kräftiges Auf- und Abziehen mit der Pipette resuspendiert und im Hämozytometer gezählt. Die eingesetzte Zellzahl wurde wiederum durch Mischen von 40  $\mu\text{l}$  Zellsuspension und 60  $\mu\text{l}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Meßpuffer und Zählung im Hämozytometer bestimmt.

### 3.2.5 Bestimmung der Spreitung

Nach Kontakt der Zellen mit einem Deckglas, daß mit einem EZM-Protein in Kombination mit einer positiv geladenen Polyaminosäure beschichtet war, zeigten die Zellen eine Spreitung, d. h., daß die sonst eher runden T-Lymphozyten sich abflachten. Als gespreitet galt daher eine Zelle, deren Durchmesser oder längste Achse mind. zweimal so lang war verglichen mit einer Zelle auf BSA/Poly-L-Lysin, die keine Spreitung zeigte. Zur quantitativen Bestimmung der Spreitung wurden Zellen auf beschichtete Deckgläser überführt und 10 min bei RT zur Adhäsion stehengelassen. Anschließend wurde das Verhältnis von gespreiteten zu nicht gespreiteten Zellen aus drei Zellfeldern pro Experiment bestimmt.

### 3.2.6 Herstellung von Zellysaten

#### 3.2.6.1 Beschichtung von Petrischalen

Zur Untersuchung von Tyrosinphosphorylierungen wurden Zellysate hergestellt. Da eine größere Zellzahl als für  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen benötigt wurde, wurden anstatt der Deckgläser Petrischalen ( $\varnothing = 11\text{cm}$ ) beschichtet. Dazu wurden die Petrischalen mit 5 ml EZM-Protein (5  $\mu\text{g/ml}$  in PBS) im Brutschrank bei 37°C 1 Stunde (oder über Nacht bei 4°C) inkubiert, zweimal mit je 5 ml kaltem PBS gewaschen und eine weitere Stunde bei 37°C mit Poly-L-Lysin (50  $\mu\text{g/ml}$  in A. bidest.) oder BSA (2 % in PBS) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS wurden die beschichteten Petrischalen bis zur Messung unter PBS stehengelassen, so daß sie nicht trockneten. Als Kontrolle wurden Petrischalen mit BSA (2 % in PBS) und Poly-L-Lysin (50  $\mu\text{g/ml}$  in A. bidest) in gleicher Weise beschichtet.

### 3.2.6.2 Präparation von Zellysaten und Proteinbestimmung

*Lysis-Puffer A: 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,5, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 500 μM AEBSF, 20 μM Leupeptin, 1 μM Pepstatin, 10 μM Antipain*

*Lysis-Puffer B: 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,5, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 500 μM AEBSF, 20 μM Leupeptin, 1 μM Pepstatin, 10 μM Antipain, 1 % (v/v) NP-40*

Zur Herstellung der Zellysate wurden ca. 150 ml Zellsuspension ( $10^6$  Zellen/ml) bei 555 x g 4 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, in Ca<sup>2+</sup>-Meßpuffer gewaschen und in 50 ml Ca<sup>2+</sup>-Meßpuffer resuspendiert. Die Zelldichte betrug dann  $3 \times 10^6$  Zellen/ml.

5 ml dieser Zellsuspension wurden auf eine beschichtete Petrischale gegeben und für die jeweils angegebene Zeit zur Adhäsion bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde der Überstand abgenommen, 1 ml eiskalter Lysis-Puffer A zugegeben und die Petrischale auf Eis überführt. Mit Hilfe eines Gummischabers wurden die adhärierenden Zellen von der Petrischale gelöst und in ein eiskaltes Eppendorfgefäß überführt. Dann wurden die Zellen bei 555 x g 4 min bei 4°C zentrifugiert und in 100 μl Lysis-Puffer B resuspendiert. Zur Lysis wurden die Zellen 10 min auf Eis inkubiert und dann bei 12000 x g bei 4°C 10 min zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die Proteinbestimmung durchgeführt und der Rest bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der BioRad-Methode mit Hilfe einer Eichgeraden mit verschiedenen Konzentrationen an BSA.

### 3.2.6.3 Immunpräzipitation

*SDS Probenpuffer (1x): 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10 % (v/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,00125 % (w/v) Bromophenolblau*

Zur Bestimmung der Tyrosinphosphorylierung von Proteinen und von PLCγ1 wurde nach Herstellung der Zellysate eine Immunpräzipitation durchgeführt. Dazu wurde anti-Phosphotyrosin Antikörper (3 μg, polyclonal, rabbit, Upstate) oder anti-PLCγ1 Antikörper (1:125, polyclonal, rabbit, Pharmingen) mit 25 μl Protein G-Sepharose-Perlen (50 % w/v in Lysis-Puffer B, s. 3.2.6.3) in 250 μl Lysis-Puffer B 2 h im Kühlraum geschüttelt, anschließend bei 12000 x g 1 min bei 4°C zentrifugiert und dreimal mit je 800 μl kaltem Lysis-Puffer B gewaschen. Dann wurden 500 μg Protein aus den Zellysaten in 250 μl Lysis-Puffer B zugegeben und weitere 2 h im Kühlraum geschüttelt. Anschließend wurde wiederum bei 12000 x g 1 min bei 4°C zentrifugiert und dreimal mit je 800 μl kaltem Lysis-Puffer B und einmal mit kaltem PBS-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde dann in 35 μl SDS-Probenpuffer (zweifach konzentriert) resuspendiert und 4 min bei 95°C gekocht. Die Probe wurde erneut 1 min bei

12000 x g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand entweder direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen oder bei -70°C aufbewahrt.

### 3.2.6.4 Gelelektrophorese

*SDS Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS*

Die Auftrennung der Zellysate oder Immunpräzipitate erfolgte mit Hilfe von Gelelektrophorese nach der Methode von Laemmli. Dazu wurden 7,5 %ige oder 10 %ige Polyacrylamidgele (8 x 6 cm, 0,75 mm dick), wie in Tab. 3.2.1 dargestellt, hergestellt.

	Trenngel 7,5 %	Trenngel 10 %	Sammelgel 3 %
0,5 M Tris, pH 6,8	—	—	2,5 ml
1,5 M Tris, pH8,8	2,5 ml	2,5 ml	—
Acrylamid (30 %)	2,5 ml	3,3 ml	1,0 ml
A. bidest	4,8 ml	4,0 ml	6,3 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl
SDS (10 % w/v)	100 µl	100 µl	100 µl
APS (10 % w/v)	100 µl	100 µl	100 µl

**Tab. 3.2.1: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele**

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben bei 95°C 5 min in SDS-Probenpuffer inkubiert und 60 µg Protein pro Tasche (Zellysate) bzw. 30 µl des Immunpräzipitats aufgetragen. Die Proteine wurden bei 17 mA in einer Hoefer Elektrophoresekammer aufgetrennt.

### 3.2.6.5 Western Blot

*Blot-Puffer: 192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol*

*TBS-Puffer: 1,4 M NaCl, 0,1 M Tris, pH 8,0*

Die aufgetrennten Proteine wurden im Naßblotverfahren (3 h, 550 mA, bei 4°C) auf eine Nitrocellulose-Membran überführt. Anschließend wurde die Membran in TBS-Puffer kurz gewaschen und dann mit 5 % Magermilchpulver in TBS/0,5 % Tween 20 für 1 Stunde bei 4°C abgedeckt, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden. Danach wurde der erste Antikörper in 2,5 % Magermilchpulver in TBS/0,5 % Tween 20 über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit 2,5 % Magermilchpulver in TBS/0,5

% Tween 20 für jeweils 10 min, wurde mit dem zweiten, Peroxidase-gekoppelten Antikörper eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde intensiv mit TBS/0,5 % Tween 20 mehrmals gewaschen, im letzten Schritt dann nur mit TBS. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz mit dem ECL-Kit von Amersham. Anschließend wurde der Film in der Dunkelkammer entwickelt, fixiert, gewässert und getrocknet.

### **3.3 Statistische Auswertung**

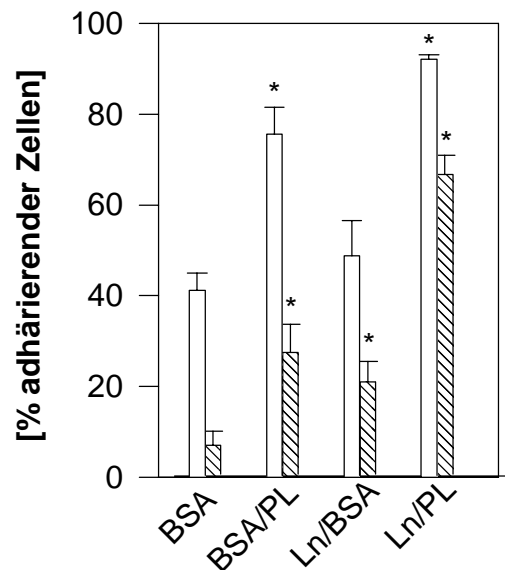
Soweit nicht anders angegeben, sind alle angegebenen Werte Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mind. 3 unabhängigen Experimenten. Die Berechnung signifikanter Unterschiede zwischen verschiedenen Meßreihen erfolgte mit Hilfe des ungepaarten t-Tests nach Student. Zur Berechnung der Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals wurden die Mittelwerte der einzelnen Zellen aus verschiedenen Experimenten zu einem bestimmten Zeitpunkt (z. B. 10 min nach Stimulation) gebildet. Die prozentuale Inhibition bezieht sich auf eine 100%-ige Stimulation der Zellen mit Laminin/Poly-L-Lysin ohne Inhibitor, wobei der Mittelwert der basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (von unstimulierten Zellen auf BSA/Poly-L-Lysin) jeweils abgezogen wurde.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Adhäsion, Ca<sup>2+</sup>-Signale und Spreitung von T-Lymphozyten auf Laminin/Poly-L-Lysin und Collagen IV/Poly-L-Lysin**

#### **4.1.1 Adhäsion von T-Lymphozyten auf Laminin/Poly-L-Lysin**

Weismann et al (1997) zeigten, daß Kontakt von Jurkat T-Lymphozyten mit einer Beschichtung von Deckgläsern aus Laminin und BSA zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führte. Ein Problem bei diesen Messungen war die schwache Adhäsion der T-Lymphozyten auf den mit Laminin und BSA beschichteten Deckgläsern, so daß die Zellen im Laufe der Messungen am digitalen Imaging-System nicht innerhalb des Fokus oder des Bildausschnitts der digitalen Kamera blieben und ihr Ca<sup>2+</sup>-Signal somit nicht weiter verfolgt werden konnte. Daher wurde zu Beginn dieser Arbeit nach einer Möglichkeit gesucht, die Zellen stärker zu adhären. Aus Versuchen mit BSA und Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern war bekannt, daß sich Poly-L-Lysin gut eignet, die nicht adhären T-Lymphozyten an die Deckgläser anzuheften ohne sie dabei zu stimulieren (vgl. Kontrollen bei Weismann et al, 1997 und Guse et al, 1997). Daher wurde zunächst eine Beschichtung aus Laminin und Poly-L-Lysin gewählt und die Adhäsion der T-Lymphozyten mit dem Adhäsionsassay wie in Material und Methoden unter 3.2.4 beschrieben bestimmt (Abb. 4.1.1).



**Abb. 4.1.1: Adhäsion der Zellen auf verschiedenen Beschichtungen**

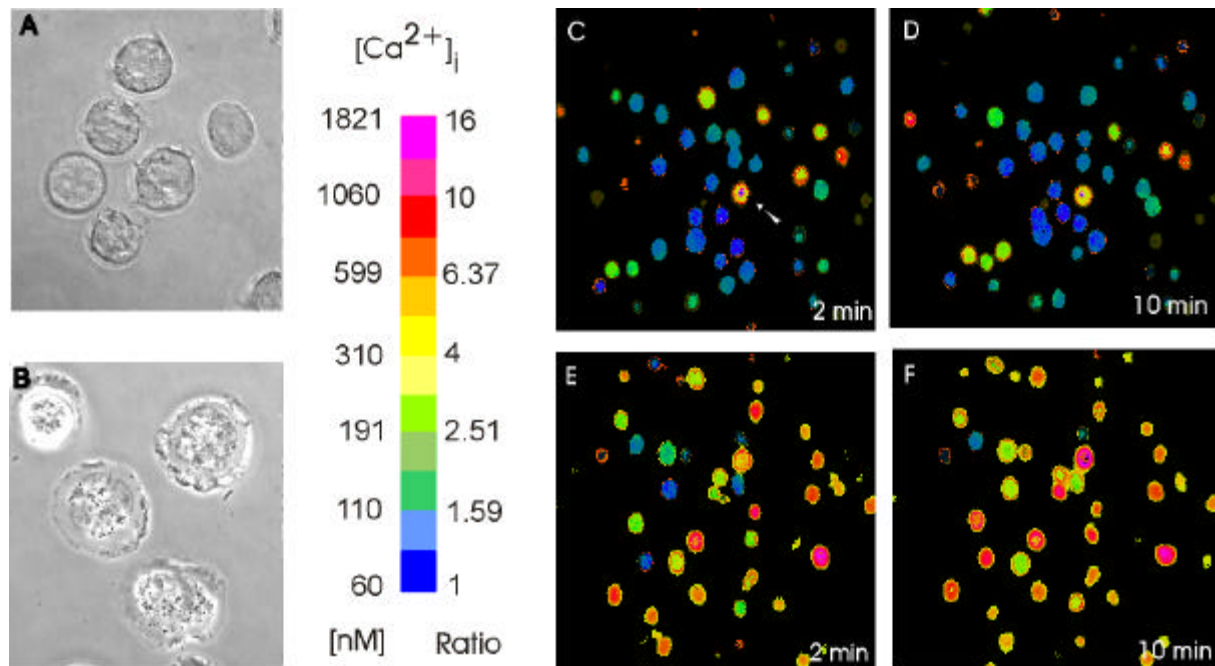
Zur Bestimmung der Adhäsion wurden Deckgläser mit BSA, BSA/Poly-L-Lysin, Laminin/BSA oder Laminin/Poly-L-Lysin beschichtet. T-Lymphozyten wurden auf die beschichteten Deckgläser überführt und nach 15 min die schwache und die starke Adhäsion wie in Material und Methoden (3.2.4) beschrieben bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus mind. 5 Experimenten. Die Sternchen markieren einen signifikanten Unterschied ( $P > 0,95$ ) jeweils für die schwache und die starke Adhäsion ermittelt durch den t-Test nach Student verglichen mit Zellen auf BSA.

Die schwache wie auch die starke Adhäsion der T-Lymphozyten ist auf einer Beschichtung aus Laminin/Poly-L-Lysin deutlich höher verglichen mit der Adhäsion von Zellen auf einer Beschichtung aus Laminin/BSA oder auch BSA/Poly-L-Lysin (Abb. 4.1.1). Dabei scheinen Laminin und Poly-L-Lysin synergistische Effekte auf die Adhäsion der Zellen zu haben.

#### 4.1.2 $\text{Ca}^{2+}$ -Signale und Spreitung der T-Lymphozyten auf Laminin/Poly-L-Lysin

Interessanterweise zeigten Jurkat T-Lymphozyten nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin neben der oben beschriebenen verstärkten Adhäsion eine Spreitung sowie eine wesentlich erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verglichen mit Zellen auf Laminin/BSA.





**Abb. 4.1.2: Stimulation intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale durch Laminin**

Deckgläser wurden mit Laminin/BSA (A; C; D) oder Laminin/Poly-L-Lysin (B; E; F) beschichtet, T-Lymphozyten auf die beschichteten Deckgläser überführt und 15 min zur Adhäsion stengelassen. Die Durchlichtbilder (A, B, C) wurden mit einem Phasenkontrastmikroskop bei einer 630-fachen Vergrößerung aufgenommen. Für die Falschfarbenbilder (D, E, F, G, H, I) wurden mit FURA 2 AM beladene T-Lymphozyten auf die beschichteten Deckgläser überführt und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration 2 und 10 min nach Kontakt der Zellen mit der Beschichtung ratiometrisch wie in Material und Methoden beschrieben bestimmt. Der Pfeil in C markiert eine Zelle, die aufgrund ihrer Größe eine höhere Konzentration an FURA 2 AM hatte, so daß die Intensität des emittierten Lichtes außerhalb des dynamischen Bereiches der CCD-Kamera lag. Solche Zellen wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Gezeigt sind repräsentative Experimente in der Poenie-Tsien-Darstellung (s. Material und Methoden, 3.2.3.2) aus mind. 15 Versuchen.

Anhand der Durchlichtbilder ist deutlich zu erkennen, daß T-Lymphozyten, die auf Laminin/BSA (Abb. 4.1.2 A) beschichteten Deckgläsern hafteten, keine Spreitung zeigten. Hingegen befanden sich fast alle Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin nach 15 min in einem gespreiteten Zustand (Abb. 4.1.2 B).

Die Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Abhängigkeit der Beschichtung ist ebenfalls in Abb. 4.1.2 als Falschfarbenbild (vgl. Material und Methoden, 3.2.3.2) dargestellt. Hier ist zu erkennen, daß Zellen auf Laminin/BSA (Abb. 4.1.2 C und D) eine leicht erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Vergleich zu Zellen auf BSA/Poly-L-Lysin (Weismann et al, 1997) zeigten, wohingegen Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin (Abb. 4.1.2 E und F) eine stark erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration hatten.

In Kontrollexperimenten konnte festgestellt werden, daß Poly-L-Lysin in Kombination mit BSA die T-Lymphozyten nach Kontakt weder zu einer Spreitung noch zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen stimulierte. Die Daten für BSA/Poly-L-Lysin sind vergleichbar mit denen auf BSA allein, mit der Ausnahme, daß die Adhäsion auf BSA/Poly-L-Lysin stärker war (vgl. Abb. 4.1.1). In Bezug auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale scheint Poly-L-Lysin in Kombination mit Laminin also den Effekt von Laminin allein zu verstärken, während die Spreitung der Zellen als neu zu beobachtendes Phänomen hinzukommt.

#### 4.1.3 Untersuchung der Adhäsion auf Laminin/Poly-L-Lysin

Die Adhäsion der T-Lymphozyten auf Laminin/Poly-L-Lysin wurde unter verschiedenen Bedingungen und an mehreren Zeitpunkten bestimmt (Abb. 4.1.3).

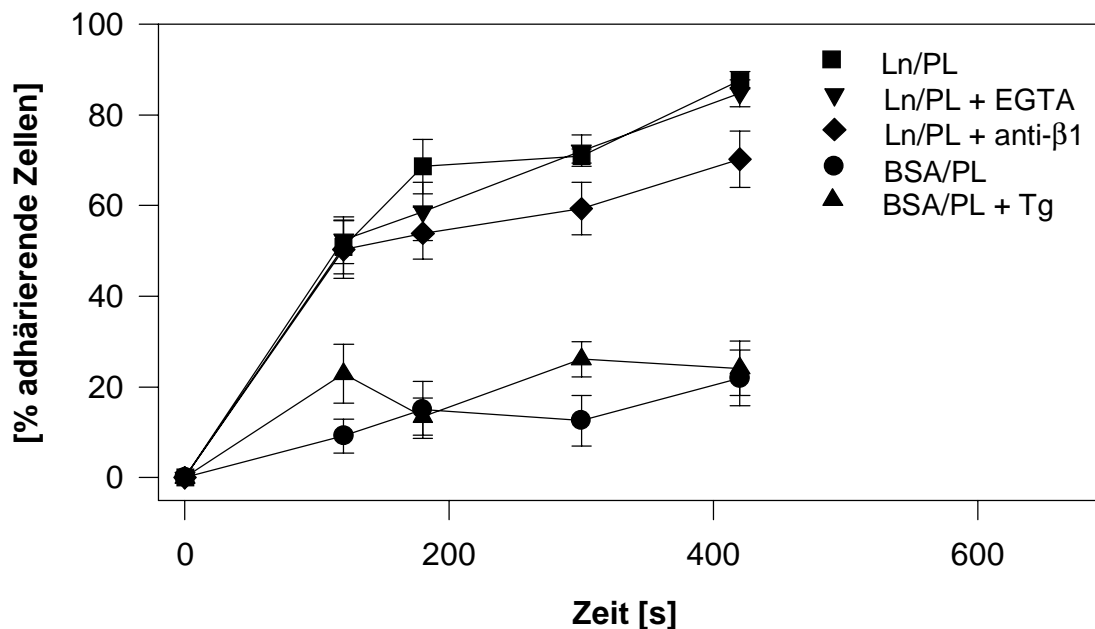


Abb. 4.1.3: Zeitverlauf der starken Adhäsion unter verschiedenen Bedingungen

T-Lymphozyten wurden auf BSA/Poly-L-Lysin oder Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt und die starke Adhäsion wie in Material und Methoden (3.2.4.2) beschrieben bestimmt. Die Zellen wurden hierbei mit Thapsigargin (Tg, 1  $\mu\text{M}$ ) oder EGTA (2 mM) 2 min bei RT oder mit einem anti- $\beta 1$  Integrin Antikörper (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 30 min bei RT vorinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus mind. 5 unabhängigen Versuchen.

Weismann et al (1997) haben durch Vorinkubation der Zellen mit spezifischen Antikörpern gezeigt, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale der T-Lymphozyten nach Kontakt mit Laminin/BSA über  $\alpha 6\beta 1$ -Integrine vermittelt werden. Zunächst sollte daher die Frage geklärt werden, ob die Adhäsion der Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin ebenfalls durch  $\beta 1$ -Integrine vermittelt würde. Dazu wurden die Zellen mit einem spezifischen anti- $\beta 1$  Integrin Antikörper (P4C10, LifeTechnologies) vorinkubiert und die starke Adhäsion der Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Deutlich zu sehen ist, daß die Adhäsion der Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin durch Vorinkubation mit anti- $\beta 1$  Integrin Antikörper nur geringfügig beeinflußt wurde. Die verstärkte Adhäsion der Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin scheint also nicht durch  $\beta 1$ -Integrine vermittelt zu werden.

Ferner sollte die Frage geklärt werden, ob die Adhäsion abhängig vom intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel der Zellen wäre, der nach Kontakt der T-Lymphozyten mit Laminin/Poly-L-Lysin stark erhöht war (vgl. 4.1.2.). Dazu wurden die Zellen mit 2 mM EGTA vorinkubiert, so daß ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zellen und die dadurch bewirkte Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unterbunden wurde. Die Ergebnisse in Abb. 4.1.3. zeigen, daß die Adhäsion der Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin auch unabhängig von der langanhaltenden Phase der erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration war.

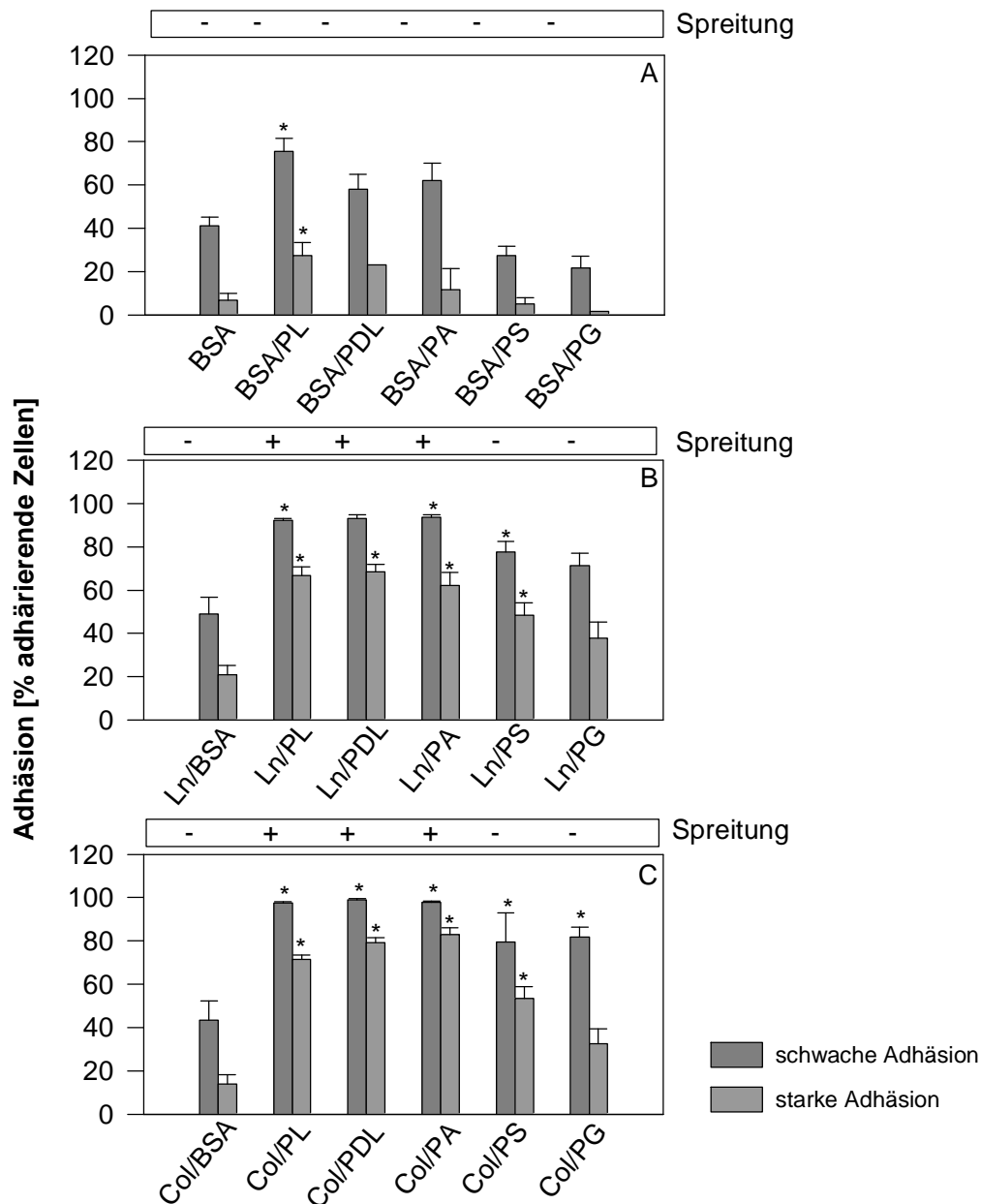
Als weiterer Hinweis wurde ebenfalls die Adhäsion von Zellen auf BSA/Poly-L-Lysin bestimmt, die mit Thapsigargin vorinkubiert waren. Thapsigargin ist ein Hemmstoff der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des endoplasmatischen Reticulums, so daß es nach Entleerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher über den kapazitiven Mechanismus (Putney et al, 1986) zu einem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  von außerhalb der Zelle kommt, die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration also steigt. So stimulierte T-Lymphozyten zeigten aber keine Erhöhung der Adhäsion auf BSA/Poly-L-Lysin verglichen mit unstimulierten Zellen.

Die Adhäsion der Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin war also unabhängig von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und wurde nicht über  $\beta 1$ -Integrine vermittelt.

#### **4.1.4 Abhängigkeit der Adhäsion von Polyaminosäuren**

Zur weiteren Charakterisierung der Adhäsion wurden Beschichtungen mit BSA, Laminin oder Collagen Typ IV, als weiterem Protein der extrazellulären Matrix, jeweils in Kombination mit verschiedenen Polyaminosäuren untersucht. Ziel war es zu klären, ob die Adhäsion der Zellen abhängig wäre von der Ladung der Polyaminosäure. Daher wurden als positiv geladene Polyaminosäuren Poly-L-Lysin, Poly-D-Lysin und Poly-L-Arginin eingesetzt, als neutrale aber

polare Polyaminosäure Poly-D,L-Serin und Poly-L-Glutaminsäure als negativ geladene Polyaminosäure. Es wurden jeweils die schwache und die starke Adhäsion der Zellen 15 min nach Kontakt zur jeweiligen Beschichtung bestimmt (Abb. 4.1.4).



**Abb. 4.1.4: Adhäsion und Spreitung von T-Lymphozyten auf verschiedenen Beschichtungen**

Jurkat T-Lymphozyten wurden auf Deckgläser mit verschiedenen Beschichtungen gegeben und die schwache und starke Adhäsion nach 15 min wie in Material und Methoden (3.2.4) beschrieben bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von mind 5 Experimenten. Die Sternchen markieren signifikante Abweichungen ( $P > 0,05$ ) nach dem t-Test nach Student gegen BSA (A), Ln/BSA (B) und Col/BSA (C). Ferner wurde die Spreitung der Zellen wie in Material und Methoden (3.2.5) beschrieben bestimmt. „+“ bedeutet, daß mind. 75 % der Zellen 15 min nach Kontakt mit der Beschichtung gespreitet waren. Abkürzungen: PL, Poly-L-Lysin; PDL, Poly-D-Lysin; PA, Poly-L-Arginin; PS, Poly-D,L-Serin; PG, Poly-L-Glutaminsäure; Ln, Laminin I; Col, Collagen Typ IV

Die Adhäsionsversuche auf BSA in Kombination mit einer Polyaminosäure (Abb. 4.1.4 A) belegten die Ladungsabhängigkeit der Adhäsion sehr gut. So adhärten Zellen auf einer Beschichtung aus BSA in Kombination mit Poly-L- oder D-Lysin, sowie mit Poly-L-Arginin wesentlich stärker als auf BSA allein oder in Kombination mit Poly-D,L-Serin. Auf einer Beschichtung aus BSA kombiniert mit Poly-L-Glutaminsäure war die starke Adhäsion dagegen so gut wie nicht mehr vorhanden (Abb. 4.1.4 A).

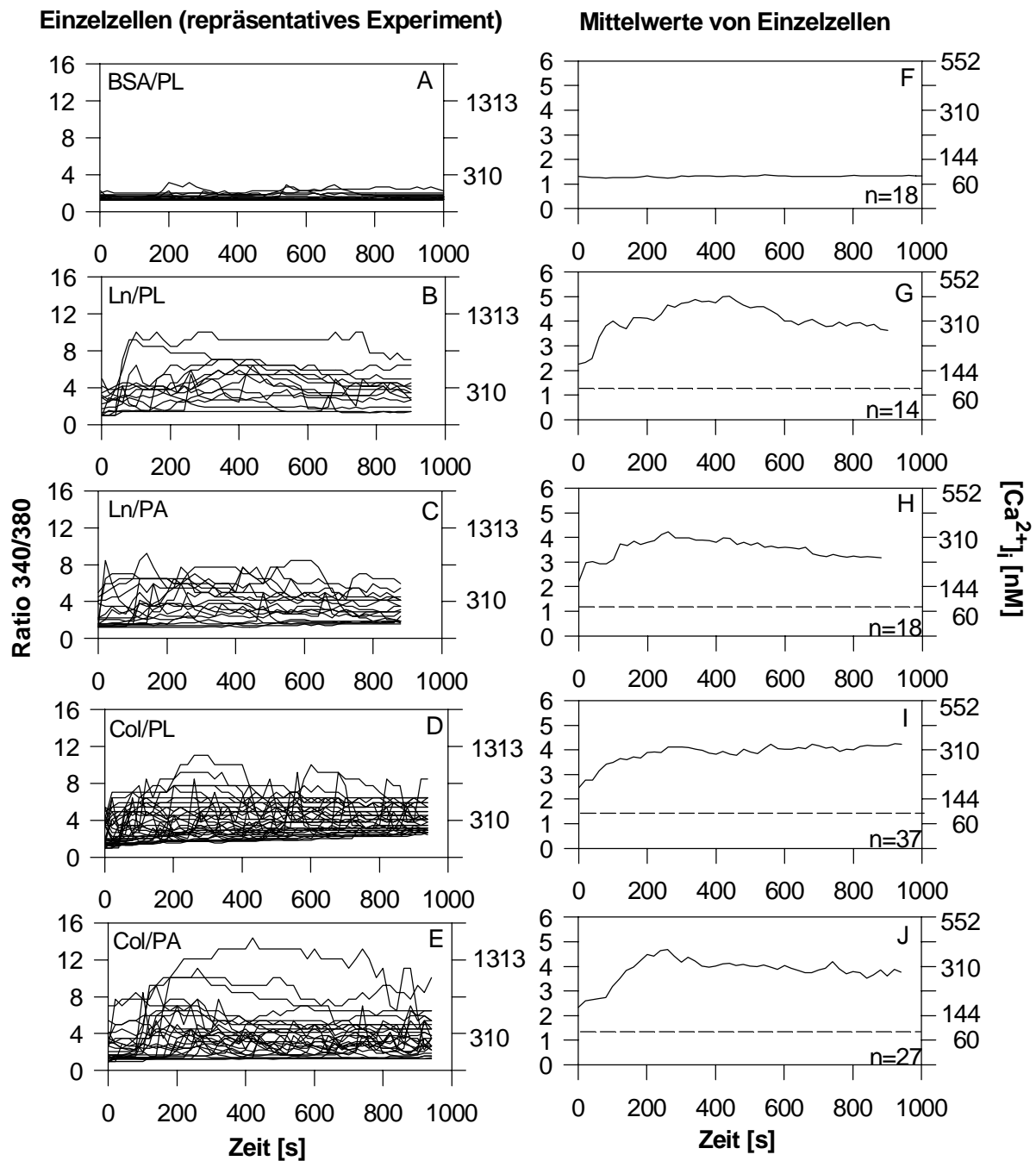
T-Lymphozyten in Kontakt mit den extrazellulären Matrixproteinen Laminin oder auch Collagen Typ IV in Kombination mit BSA zeigten schon eine höhere Adhäsion verglichen mit BSA allein. Die Adhäsion wurde aber auch hier durch die positiv geladenen Polyaminosäuren deutlich verstärkt und nahm zur negativ geladenen Polyaminosäure hin ab (Abb. 4.1.4 B und C).

Die starke Adhäsion der Zellen an Beschichtungen mit Poly-L-Lysin war also nicht spezifisch für Poly-L-Lysin, da sie durch andere positiv geladene Polyaminosäuren ersetzt werden konnte. Hingegen scheint die Ladungswechselwirkung zwischen negativ geladener Zellmembran und positiv geladenen Polyaminosäuren wie Poly-L- oder -D-Lysin und Poly-L-Arginin die Adhäsion der Zellen zu verstärken.

Ferner war die Spreitung der Zellen auf Beschichtungen aus Laminin oder Collagen Typ IV nur in Kombination mit positiv geladenen Polyaminosäuren zu beobachten. Beschichtungen aus Laminin sowie Collagen Typ IV allein und Kombinationen dieser EZM Proteine mit Poly-D,L-Serin oder Poly-L-Glutaminsäure führten dagegen zu keiner Spreitung der Zellen. Ebenfalls konnte auf BSA allein oder in Kombination mit einer Polyaminosäure nie eine Spreitung beobachtet werden (s. Abb. 4.1.4 A).

#### **4.1.5 Ca<sup>2+</sup>-Signale in Abhängigkeit der Polyaminosäure**

Während in Kapitel 4.1.4 die Adhäsion in Abhängigkeit der Polyaminosäure untersucht wurde, sollten hier die Ca<sup>2+</sup>-Signale in Abhängigkeit der Beschichtungen bestimmt werden. Dazu wurde die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von T-Lymphozyten gemessen, die auf Beschichtungen aus Laminin bzw. Collagen Typ IV in Kombination mit einer positiv geladenen Polyaminosäure hafteten. Als Kontrolle dienten Zellen auf Beschichtungen aus BSA/Poly-L-Lysin. Repräsentative Ca<sup>2+</sup>-Messungen sind in Abb. 4.1.5 dargestellt.



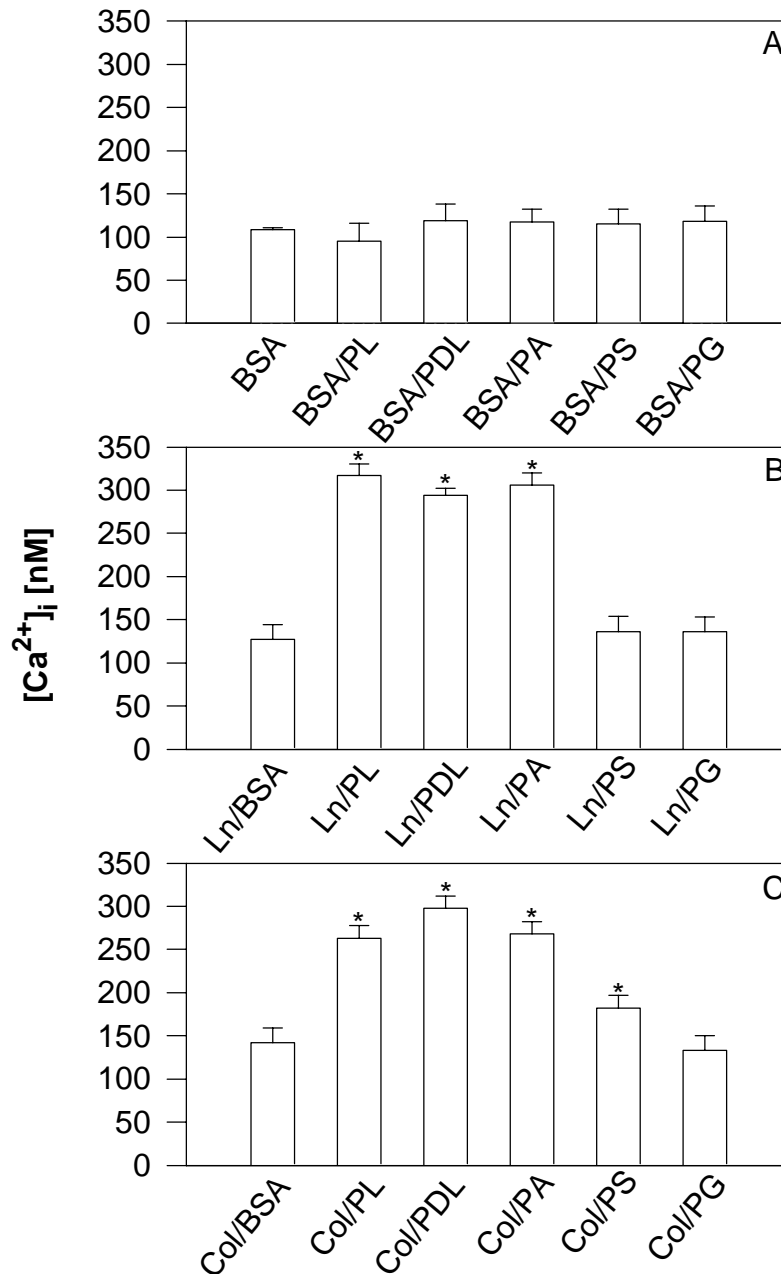
**Abb. 4.1.5: Zeitverläufe der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung von T-Lymphozyten auf Laminin und Collagen Typ IV jeweils kombiniert mit positiv geladenen Polyamino Säuren**

FURA 2-AM beladene T-Lymphozyten wurden auf Deckgläser mit verschiedenen Beschichtungen überführt und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration alle 20 s über 15 min gemessen. Auf der linken Seite sind repräsentative Experimente von Zellen auf BSA/Poly-L-Lysin (A), Laminin/Poly-L-Lysin (B), Laminin/Poly-L-Arginin (C), Collagen IV/Poly-L-Lysin (D), Collagen IV/Poly-L-Arginin (E) dargestellt. Auf der rechten Seite sind die berechneten Durchschnittswerte der jeweiligen Experimente gezeigt (F-J; n=Anzahl der Zellen). Die gestrichelte Linie zeigt die basale intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von unstimulierten Zellen auf BSA/Poly-L-Lysin.

Unstimulierte T-Lymphozyten, die auf BSA/Poly-L-Lysin hafteten, zeigten eine intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $95 \pm 21$  nM (n=99), die als basale intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration definiert wurde. Dagegen zeigten Zellen nach Kontakt mit Beschichtungen aus Laminin in Kombination mit Poly-L-Lysin bzw. Poly-L-Arginin eine Zunahme der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf  $317 \pm 13$  nM (n=196) bzw.  $294 \pm 8$  nM (n=238) 10 min nach Kontakt der T-Lymphozyten mit der Beschichtung. Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal stieg dabei innerhalb der ersten 2 min nach Kontakt der Zellen mit der Beschichtung an und die erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde bis zu einer Stunde aufrecht erhalten (längere  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen waren aus technischen Gründen nicht möglich).

Vergleichbare Ergebnisse wurden für Zellen gefunden, die auf Beschichtungen aus Collagen Typ IV und Poly-L-Lysin bzw. Poly-L-Arginin hafteten. Hier stieg die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf  $263 \pm 15$  nM (n=156) auf Collagen Typ IV/Poly-L-Lysin und auf  $298 \pm 14$  nM (n=161) auf Collagen Typ IV/Poly-L-Arginin.

Desweiteren wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale von T-Lymphozyten in Bezug auf verschiedene Polyaminosäuren untersucht. Dazu wurden wiederum Deckgläser mit BSA in Kombination mit einer Polyaminosäure, sowie mit Laminin bzw. Collagen Typ IV in Kombination mit einer Polyaminosäure beschichtet und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Zellen 10 min nach Kontakt mit der Beschichtung gemessen (Abb. 4.1.6).



**Abb. 4.1.6: Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration in Abhängigkeit von der Beschichtung**

Die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration von T-Lymphozyten wurde ratiometrisch wie in Material und Methoden (3.2.3) beschrieben 10 min nach Kontakt der Zellen bei RT mit BSA (2%)/Polyaminosäure (A), Laminin (5  $\mu$ g/ml)/Polyaminosäure (B) oder Collagen IV/Polyaminosäure (C) gemessen (Polyaminosäure jeweils 50  $\mu$ g/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von mind. 100 Zellen aus mind. 5 unabhängigen Versuchen. Die Sternchen markieren signifikante Unterschiede ( $P > 0,95$ ) gegen BSA (A), Laminin/BSA (B) oder Collagen IV/BSA (C) nach dem t-Test nach Student. Abkürzungen: PL, Poly-L-Lysin; PDL, Poly-D-Lysin; PA, Poly-L-Arginin; PS, Poly-D;L-Serin; PG, Poly-L-Glutaminsäure; Ln, Laminin I; Col, Collagen Typ IV



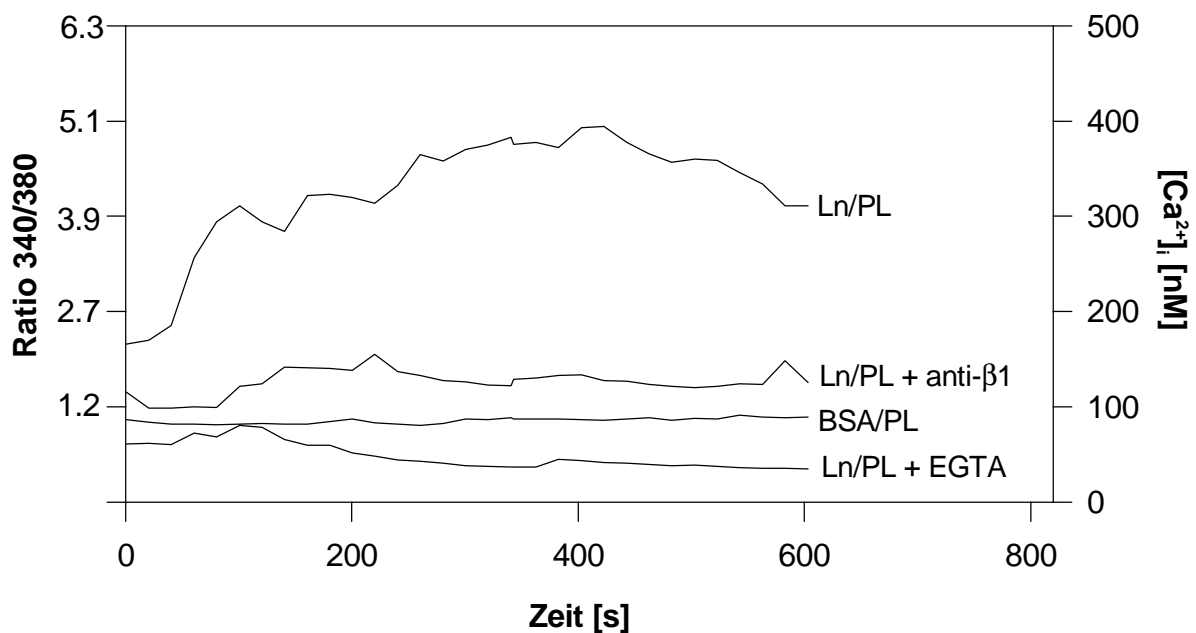
In den Kontrollexperimenten, in denen T-Lymphozyten auf Beschichtungen aus BSA und einer Polyaminosäure hafteten, zeigten die Zellen eine basale intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 95 bis 120 nM (Abb. 4.1.6 A) 10 min nach Kontakt der Zellen mit der Beschichtung. Diese Konzentration blieb über den gesamten Zeitraum der Messung konstant (vgl. Abb. 4.1.5 A und F).

Nach Kontakt mit Beschichtungen aus Laminin bzw. Collagen Typ IV in Kombination mit BSA zeigten T-Lymphozyten eine leicht erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $127 \pm 17$  nM (n=197) bzw.  $142 \pm 17$  nM (n=223). Diese Daten sind in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Weismann et al (1997). Eine Adhäsion der Zellen an eine Beschichtung aus Laminin bzw. Collagen Typ IV in Kombination mit einer positiv geladenen Polyaminosäure führte dagegen zu einer signifikant höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $263 \pm 15$  nM (Col/PL; n=156) bis zu  $317 \pm 13$  nM (Ln/PL; n=196) verglichen mit Zellen auf Laminin bzw. Collagen Typ IV. Kontakt der Zellen zu einer Beschichtung aus Laminin bzw. Collagen Typ IV in Kombination mit Poly-DL-Serin bzw. Poly-L-Glutaminäure führte dagegen zu keiner signifikanten Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Zellen verglichen mit Zellen, die auf den EZM Proteinen kombiniert mit BSA hafteten. Einzige Ausnahme bildete hierbei der Kontakt der Zellen zu einer Beschichtung aus Collagen Typ IV in Kombination mit Poly-D,L-Serin. Hier war die Erhöhung auf  $182 \pm 15$  nM (n=91) zwar relativ gering, aber dennoch signifikant verglichen mit Zellen auf Collagen Typ IV/BSA.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale wie die Adhäsion der T-Lymphozyten ebenfalls durch die vorhandene Polyaminosäure beeinflusst wurden in dem Sinne, daß auch hier die Stimulation der Zellen durch die EZM Proteine Laminin und Collagen Typ IV durch Kombination mit einer positiv geladenen Polyaminosäure wesentlich verstärkt wurde. Da auch hier Poly-L-Lysin durch die anderen positiv geladenen Polyaminosäuren Poly-D-Lysin sowie Poly-L-Arginin ersetzt werden konnte, ist eine spezifische Wirkung von Poly-L-Lysin auszuschließen, zumal auch die Kontrollen auf BSA/Poly-L-Lysin keine Stimulierung der Zellen zeigten.

#### 4.1.6 Untersuchung der Spezifität der $\text{Ca}^{2+}$ -Signale auf Laminin/Poly-L-Lysin

Weismann et al (1997) konnten in Versuchen mit spezifischen Antikörpern zeigen, daß  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale von Jurkat T-Lymphozyten nach Kontakt mit Laminin durch das  $\alpha\beta 1$ -Integrin vermittelt werden. Daher wurden zur weiteren Charakterisierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale der T-Lymphozyten nach Kontakt mit einer Beschichtung aus Laminin/Poly-L-Lysin die Zellen mit einem spezifischen anti- $\beta 1$  Integrin Antikörper (P4C10) vorinkubiert und anschließend die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gemessen (Abb. 4.1.7).



**Abb. 4.1.7: Zeitverlauf der Laminin-vermittelten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unter verschiedenen Bedingungen**

T-Lymphozyten wurden auf Deckgläser überführt, die entweder mit BSA (2%)/Poly-L-Lysin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder Laminin (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )/Poly-L-Lysin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) beschichtet waren. Für die Inhibitionsversuche wurden die Zellen vor Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin mit anti- $\beta 1$  Integrin Antikörper (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 30 min oder mit EGTA (2 mM) 3 min bei RT inkubiert. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung erfolgte alle 20 s über 15 min. Gezeigt sind repräsentative Experimente von mind. 6 unabhängigen Versuchen.

Es ist deutlich zu erkennen, daß Vorinkubation der Zellen mit dem spezifischen anti- $\beta 1$  Integrin Antikörper zu einer fast kompletten Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals führte. Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der vorinkubierten Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin war vergleichbar mit der von unstimulierten Zellen, die auf BSA/Poly-L-Lysin hafteten. Das starke  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal der Zellen nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin wurde also ausschließlich durch  $\beta 1$ -Integrine vermittelt.

Ferner wurde untersucht, ob ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von außerhalb der Zellen zu der erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führte. Dazu wurden die Zellen 10 min mit 2 mM EGTA vorinkubiert und anschließend die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gemessen. Auch hier konnte die Stimulation der T-Lymphozyten inhibiert werden (nähere Untersuchungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms folgen in Kap. 4.5).

Zusammenfassend ist demnach festzustellen, daß die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der T-Lymphozyten nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin durch  $\beta 1$ -Integrine vermittelt und durch einen Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  bedingt wurde.

## **4.2 Versuche zur Signaltransduktion nach Stimulierung der T-Lymphozyten durch Laminin/Poly-L-Lysin**

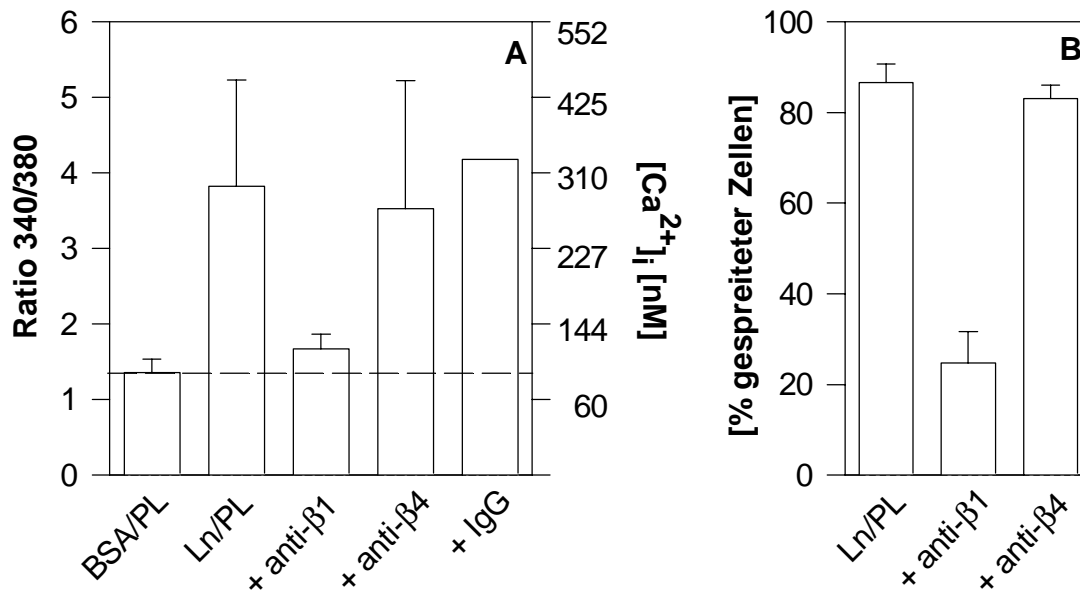
Wie in Kap. 4.1 beschrieben führte der Kontakt von Jurkat T-Lymphozyten mit einer Beschichtung aus Laminin/Poly-L-Lysin

1. zu einer verstärkten Adhäsion der Zellen verglichen mit Zellen auf einer Beschichtung aus Laminin/BSA
2. zu einer stark erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verglichen mit Zellen auf einer Beschichtung aus Laminin/BSA
3. zu einer Spreitung der Zellen.

Zur Aufklärung der Signalübertragung wurden zunächst verschiedene spezifische Inhibitoren eingesetzt und deren Wirkung auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale und Spreitung der Zellen untersucht.

### **4.2.1 Rolle von Integrinen**

Weismann et al (1997) haben gezeigt, daß bei Jurkat T-Lymphozyten der Rezeptor für Laminin das  $\alpha 6\beta 1$ -Integrin ist. Im Rahmen dieser Arbeit sind daher ebenfalls Experimente mit einem spezifischen anti- $\beta 1$  Integrin Antikörper durchgeführt worden. Dabei konnte sowohl das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal der Zellen nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin wie auch die Spreitung inhibiert werden (vgl. Kap. 4.1), nicht aber die starke Adhäsion der Zellen. Ferner ist das  $\alpha 6\beta 4$ -Integrin als Laminin-Rezeptor bekannt (E. Lee et al, 1992). Daher wurden T-Lymphozyten mit einem spezifischen anti- $\beta 4$  Integrin Antikörper vorinkubiert und auf Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser gegeben (Abb. 4.2.1).



**Abb. 4.2.1: Rolle von  $\beta$ 4-Integrinen bei Laminin-vermittelten  $Ca^{2+}$ -Signalen**

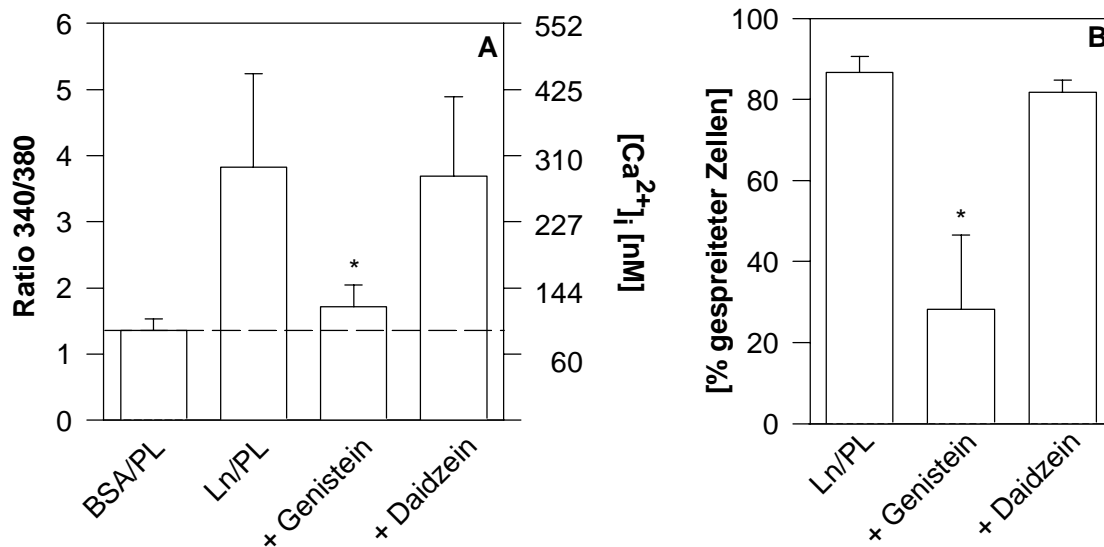
T-Lymphozyten wurden auf BSA/Poly-L-Lysin oder Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt und die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration (A) sowie die Spreitung der Zellen (B) wie in Material und Methoden beschrieben bestimmt. Für die Inhibitionsversuche wurden die Zellen vor Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin mit anti- $\beta$ 1 Integrin Antikörper (P4C10), anti- $\beta$ 4 Integrin Antikörper (CD104) oder IgG (je 10  $\mu$ g/ml) 30 min bei RT inkubiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung nach 10 min aus mind. 3 Versuchen.

Abb. 4.2.1 A zeigt die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration 10 min nach Kontakt der Zellen mit Laminin/Poly-L-Lysin. Hier ist eine deutliche Hemmung des  $Ca^{2+}$ -Signals nach Vorinkubation mit anti- $\beta$ 1 Integrin Antikörper zu sehen. Vorinkubation mit anti- $\beta$ 4 Integrin Antikörper führte ebenfalls zu einer geringen Hemmung des  $Ca^{2+}$ -Signals, die jedoch nach dem t-Test nach Student nicht signifikant war ( $P=0,78$ ). Kontrollversuche, in denen die Zellen mit einem IgG gleichen Isotyps als Kontrolle vorinkubiert wurden, beeinflussten das  $Ca^{2+}$ -Signal dagegen nicht (Abb. 4.2.1 A).

Ebenso war die Spreitung der Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin nach Vorinkubation mit anti- $\beta$ 1 Integrin Antikörpern stark inhibiert, nicht aber nach Vorinkubation mit dem anti- $\beta$ 4 Integrin Antikörper (Abb. 4.2.1 B). Das  $\beta$ 4-Integrin scheint also weder bei der  $Ca^{2+}$ -Signalgebung noch bei der Spreitung der T-Lymphozyten auf Laminin/Poly-L-Lysin eine Rolle zu spielen, während das  $\beta$ 1-Integrin essentiell für die Signalübertragung beider Prozesse ist.

#### 4.2.2 Rolle von Tyrosinkinasen

Weismann (persönliche Mitteilung) zeigte bereits, daß durch Vorinkubation der T-Lymphozyten mit Genistein, einem Tyrosinkinase-Inhibitor, das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nach Kontakt der Zellen mit Laminin/BSA gehemmt werden konnte. Daher wurde die Rolle von Tyrosinkinasen auch in Bezug auf die Stimulation durch Kontakt der Zellen mit Laminin/Poly-L-Lysin untersucht (Abb. 4.2.2).

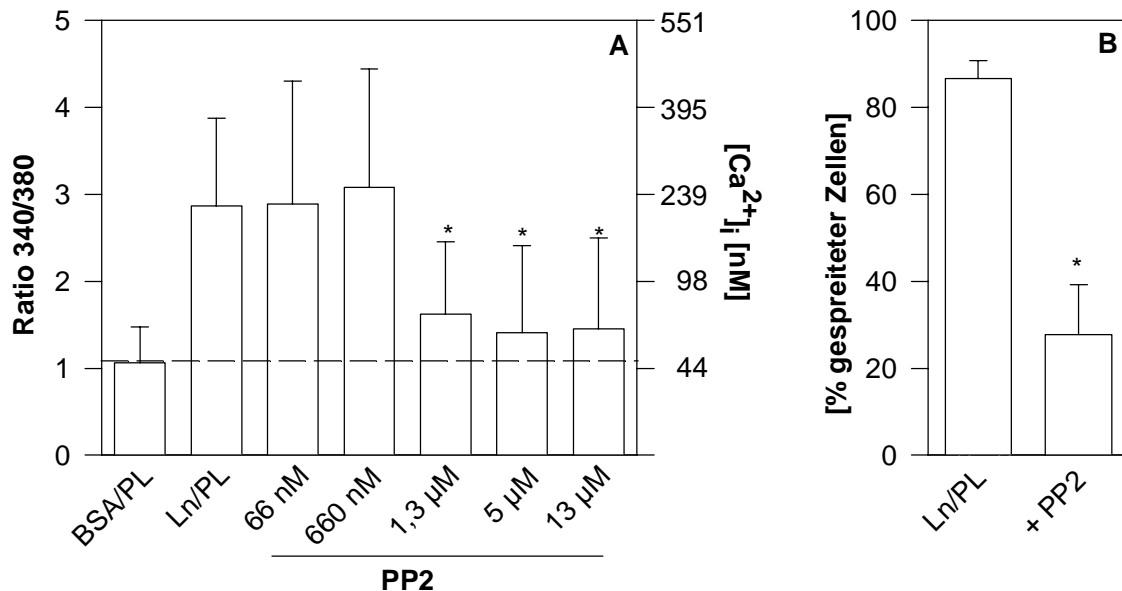


**Abb. 4.2.2: Wirkung von Genistein und Daidzein auf die Laminin-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung und Spreitung der Zellen**

T-Lymphozyten wurden auf BSA/Poly-L-Lysin oder Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (A) sowie die Spreitung (B) der Zellen 10 min nach Kontakt mit der jeweiligen Beschichtung bestimmt. Für die Inhibitionversuche wurden die Zellen vor Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin mit Genistein bzw. Daidzein (je 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 10 min bei RT inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus je 6 Versuchen.

Vorinkubation der Zellen mit Genistein inhibierte sowohl das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal (Abb. 4.2.2 A) als auch die Spreitung (Abb. 4.2.2 B) der T-Lymphozyten auf Laminin/Poly-L-Lysin. Daidzein als wirkungsloses Analogon des Genisteins zeigte dagegen keine Effekte auf das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal noch auf die Spreitung der Zellen (Abb. 4.2.2 A und B). Da Genistein ein Inhibitor für viele Tyrosinkinasen ist, wurde nach diesen Ergebnissen ein spezifischer Inhibitor für src-Kinasen eingesetzt. In Versuchen zur Messung der Enzymaktivität, hemmt PP2 die Tyrosinkinasen  $\text{p56}^{\text{lck}}$  und  $\text{p59}^{\text{fyn}}$  schon in nanomolaren Konzentrationen (Hanke et al, 1996). In den folgenden Versuchen wurden verschiedene Konzentrationen von PP2 eingesetzt und die intrazelluläre

Ca<sup>2+</sup>-Konzentration 300 s nach Kontakt der Zellen mit Laminin/Poly-L-Lysin bestimmt (Abb. 4.2.3).



**Abb. 4.2.3: Wirkung von PP2 auf die Laminin-vermittelte Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung und Spreitung der Zellen**

T-Lymphozyten wurden auf BSA/Poly-L-Lysin oder Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt und die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (A) sowie die Spreitung (B) der Zellen 10 min nach Kontakt mit der jeweiligen Beschichtung bestimmt. Für die Inhibitionsversuche wurden die Zellen vor Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin mit verschiedenen Konzentrationen an PP2 20 min bei RT inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus mind. 3 Versuchen. Die Sternchen markieren signifikante Unterschiede ( $P > 0,95$ ) nach dem t-Test nach Student gegen nicht behandelte Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin.

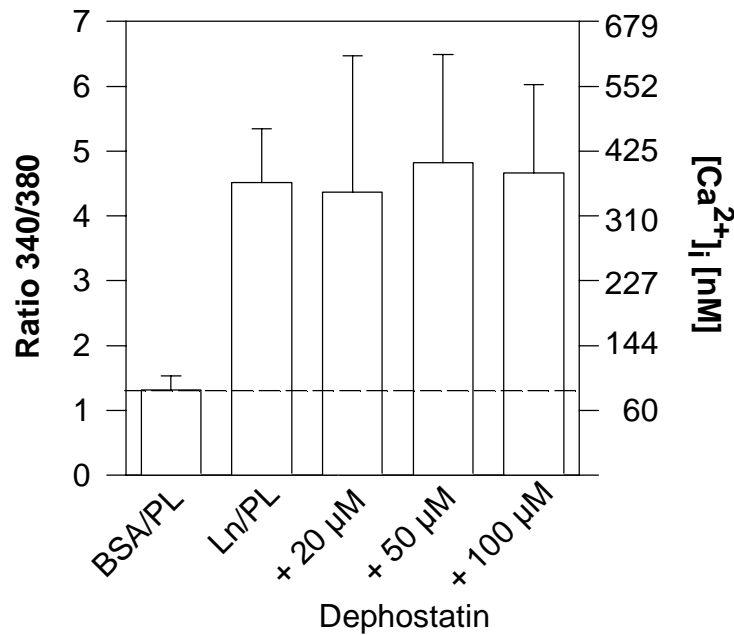
Vorinkubation mit 1,3 μM PP2 zeigte eine signifikante Hemmung des Ca<sup>2+</sup>-Signals 300 s nach Kontakt der T-Zellen mit Laminin/Poly-L-Lysin ( $P > 0,99$ ; Abb. 4.2.3 A). Diese Ergebnisse stimmen recht gut mit den Ergebnissen von Hanke et al (1996) überein. Bei quantitativen Untersuchungen der Tyrosinphosphorylierung eines Proteins von 70 kD im Western Blot von T-Zellen nach Stimulation über den T-Zell-Rezeptor, fanden Hanke et al (1996) eine signifikante Inhibition der Tyrosinphosphorylierung nach Vorinkubation mit 1 μM, 10 μM und 100 μM PP2.

Ebenso wurde die Spreitung der Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin durch Vorinkubation mit 5 μM PP2 signifikant gehemmt (Abb. 4.2.3 B).

Diese Ergebnisse bestätigten somit die Resultate der Versuche mit Genistein. Tyrosinkinassen, insbesondere Kinasen der src-Familie sind daher sowohl bei der Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung als auch bei der Spreitung der T-Lymphozyten auf Laminin/Poly-L-Lysin involviert.

### 4.2.3 Rolle von Phosphatasen

Neben der Phosphorylierung von Proteinen ist die Dephosphorylierung durch Phosphatasen eine weitere Möglichkeit der Signalgebung (Hunter, 1995). Daher wurden T-Lymphozyten mit dem Phospho-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Dephostatin (Imoto et al, 1993) vorinkubiert (Abb. 4.2.4).



**Abb. 4.2.4: Wirkung von Dephostatin auf die Laminin-vermittelte Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung**

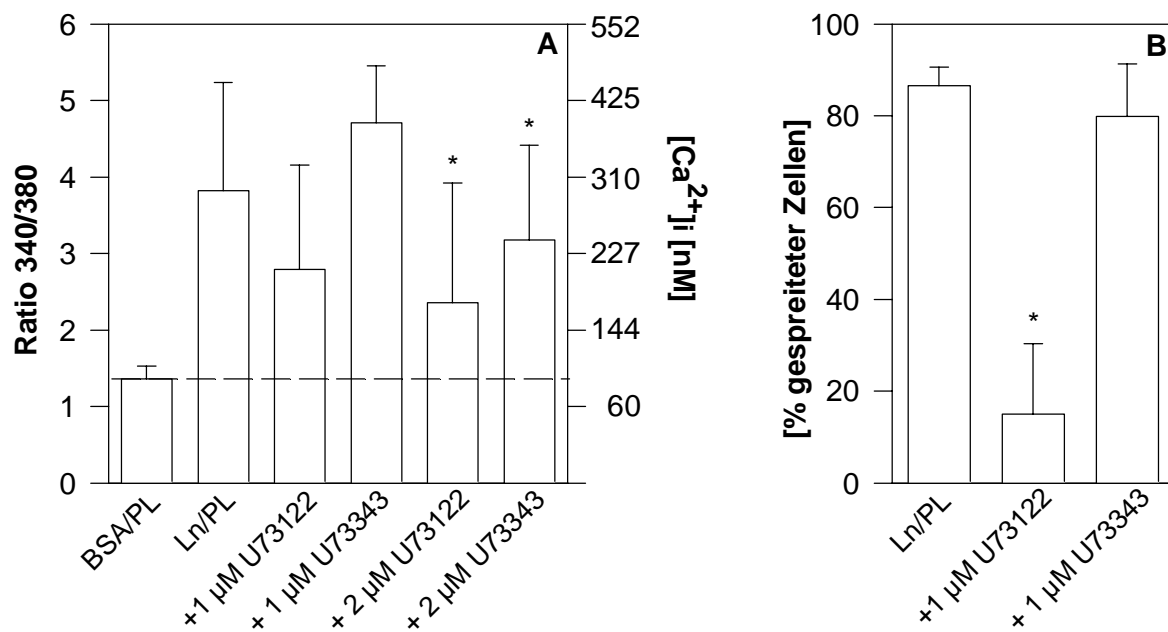
T-Lymphozyten wurden auf Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt und die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration nach 10 min ratiometrisch bestimmt. Für die Inhibitionsversuche wurden die Zellen vor Kontakt mit der Beschichtung mit 20 µM, 50 µM oder 100 µM Dephostatin 15 min bei RT inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen auf BSA/Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus mind. 3 Experimenten.

Eine Vorinkubation der Zellen mit steigenden Konzentrationen an Dephostatin führte weder zu einer Inhibition des Ca<sup>2+</sup>-Signals (Abb. 4.2.4) noch zu einer Hemmung der Spreitung (nicht gezeigt). Längere Inkubationszeiten bis zu 30 min ergaben keine Änderung dieser Ergebnisse. Eine Dephosphorylierung von Proteinen scheint daher als möglicher Regulationsmechanismus keine wesentliche Rolle zu spielen.



#### 4.2.4 Rolle von Phospholipase C

Durch einen spezifischen Inhibitor der PLC, U73122, sollte untersucht werden, ob die PLC-vermittelte  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Synthese auch bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung nach Stimulation über  $\beta 1$ -Integrine in T-Lymphozyten genutzt würde. Als Kontrolle wurden Zellen mit einem nicht wirksamen Analogon des Inhibitors, U73343 vorinkubiert (Abb. 4.2.5).



**Abb. 4.2.5: Wirkung von U73122 auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung und Spreitung der Zellen**

FURA 2-AM beladene T-Lymphozyten wurden auf BSA/Poly-L-Lysin oder Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (A) sowie die Spreitung der Zellen (B) nach 10 min bestimmt. Für die Inhibitionsversuche auf Laminin/Poly-L-Lysin wurden die Zellen mit U73122 oder U73343 10 min bei RT vorinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mind. 3 Versuchen. Die Sternchen markieren signifikante Unterschiede nach dem t-Test nach Student gegen Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin ( $P > 0,95$ ).

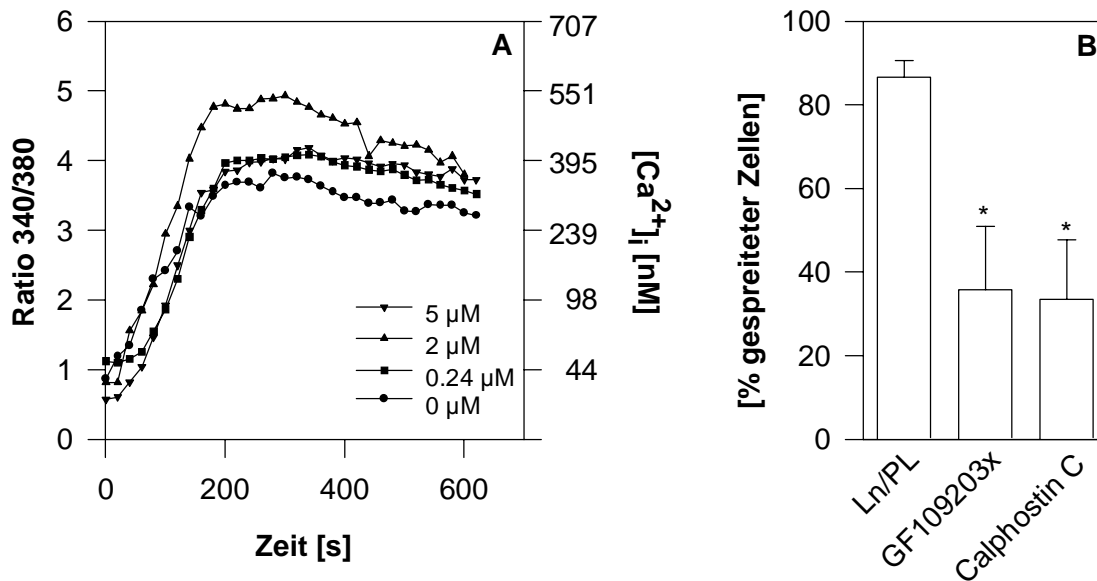
Vorinkubation der Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  U73122 führte zu einer Verringerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration 10 min nach Kontakt der Zellen mit Laminin/Poly-L-Lysin (Abb. 4.2.5 A), die nach dem t-Test nach Student nahe an der Signifikanzschwelle liegt ( $P = 0,89$ ). Eine höhere Konzentration von U73122 (2  $\mu\text{M}$ ) reduzierte die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zwar signifikant ( $P > 0,99$ ; Abb. 4.2.5 A). Allerdings führte eine Vorinkubation mit 2  $\mu\text{M}$  der Kontrollsubstanz, U73343 ebenfalls zu einer signifikanten Erniedrigung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $P = 0,98$ ; Abb. 4.2.5 A). Vorinkubationen der Zellen mit dem Inhibitor

sowie mit dem unwirksamen Analogon von 5  $\mu\text{M}$  waren bereits so toxisch, daß die Zellen lysierten und somit keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen mehr möglich waren. Eine zuverlässige Aussage zur Rolle von PLC in Bezug auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung nach Stimulation mit Laminin/Poly-L-Lysin ist somit nach diesen Ergebnissen schwierig, deutet aber auf eine Beteiligung von PLC, und damit der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung hin.

Eindeutig sind dagegen die Ergebnisse bei der Untersuchung der Spreitung der Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin nach Vorinkubation mit U73122 (Abb. 4.2.5 B). Nach Inhibition von PLC befanden sich nur 15% der Zellen 600 s nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin in einem gespreiteten Zustand. Vorinkubation der Zellen mit U73343 führte dagegen nur zu einer sehr geringen nicht signifikanten Verringerung der Spreitung der T-Lymphozyten. PLC ist somit in den Prozeß der Spreitung der Zellen involviert.

#### **4.2.5. Rolle von Proteinkinase C**

Durch Spaltung von  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  entsteht neben  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  auch DAG, das wiederum Proteinkinase C (PKC) aktiviert. PKC spielt in vielen Signaltransduktionsprozessen eine wichtige Rolle, da es Serin- oder Threonin-Reste verschiedener Proteine phosphorylieren kann. Ob PKC in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung bzw. in der Spreitung von T-Lymphozyten nach Stimulation über  $\beta 1$ -Integrine von Bedeutung wäre, sollte durch spezifische Inhibition von PKC mit GF109203x und Calphostin C untersucht werden (Abb. 4.2.6).



**Abb. 4.2.6: Rolle von PKC in der Laminin-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung und Spreitung von T-Lymphozyten**

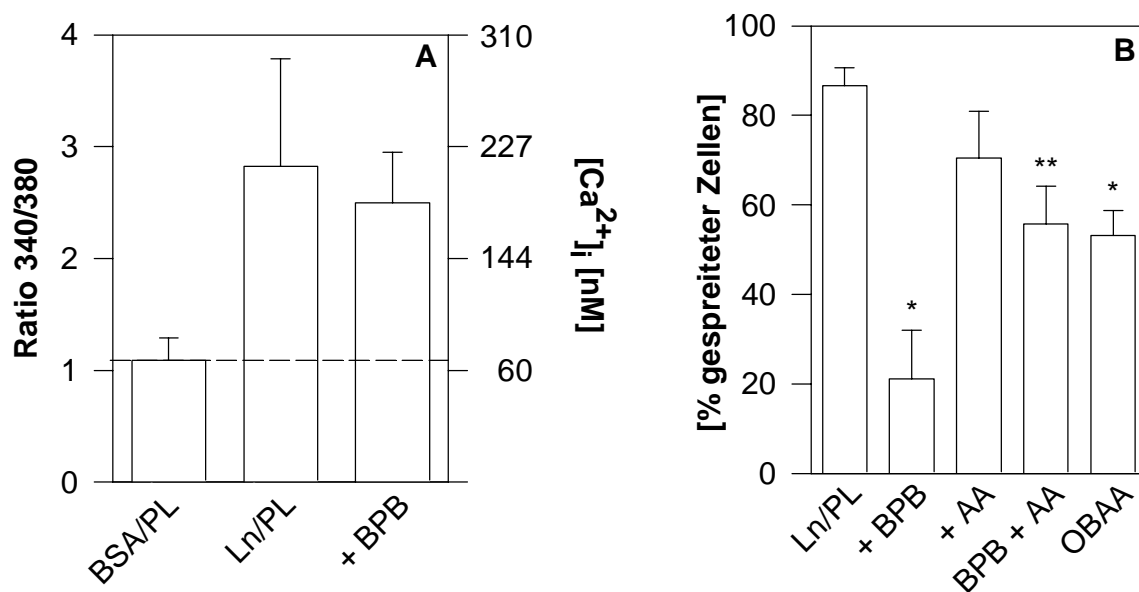
FURA 2-AM beladene T-Lymphozyten wurden auf Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ratiometrisch gemessen (A). Für die Inhibitionsversuche wurden die Zellen mit GF109203x 10 min bei RT vorinkubiert. Ferner wurde die Spreitung der Zellen 10 min nach Kontakt der Zellen mit Laminin/Poly-L-Lysin bestimmt. Zur Inhibition der Spreitung wurden die Zellen mit 240 nM GF109203x oder mit 1,3  $\mu\text{M}$  Calphostin C 10 min bei RT vorinkubiert (B). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus je 5 Versuchen.

Vorinkubation von T-Lymphozyten mit 5  $\mu\text{M}$  GF109203x führte zu keiner Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin (Abb. 4.2.6 A). Die Spreitung der Zellen konnte dagegen schon mit nanomolaren Konzentrationen von GF 109203x inhibiert werden. (Abb. 4.2.6 B). Dieses Ergebnis konnte mit einem weiteren PKC-Inhibitor, Calphostin C, verifiziert werden (Abb. 4.2.6 B).  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen von T-Lymphozyten nach Vorinkubation mit Calphostin C (1,3  $\mu\text{M}$ , 10 min) auf Laminin/Poly-L-Lysin ergaben dagegen widersprüchliche Ergebnisse. Hier wurde nur in 50 % der Versuche (von 10 unabhängigen Versuchen, Daten nicht gezeigt) die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration 600 s nach Kontakt der Zellen mit Laminin/Poly-L-Lysin gehemmt, so daß hier keine zuverlässige Aussage möglich ist.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß PKC eine entscheidende Rolle bei der Spreitung der Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin zukommt, sie nach den Ergebnissen mit GF109203x in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung aber nicht von Bedeutung zu sein scheint.

#### 4.2.6 Rolle von Phospholipase A<sub>2</sub>

Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) hydrolysiert Phospholipide und setzt so freie Fettsäuren wie Arachidonsäure in Zellen frei. In HeLa-Zellen ist bereits die Rolle von PLA<sub>2</sub> bei der Spreitung von Zellen nach Kontakt mit Collagen beschrieben worden (Auer et al, 1995). Durch Inhibition von PLA<sub>2</sub> sollte deren Bedeutung in der Signalgebung durch  $\beta$ 1-Integrine in T-Zellen untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen mit dem PLA<sub>2</sub>-Inhibitor Bromophenacyl-Bromid (BPB) vorinkubiert und auf mit Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt (Abb. 4.2.7).



**Abb. 4.2.7: Rolle von PLA<sub>2</sub> in der Laminin-vermittelten  $Ca^{2+}$ -Signalgebung und Spreitung von T-Lymphozyten**

T-Lymphozyten wurden auf BSA/Poly-L-Lysin oder Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt und die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration nach 10 min ratiometrisch gemessen (A). Für die Inhibitionsversuche wurden die Zellen mit 6  $\mu$ M BPB 10 min bei RT vorinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 7 Versuchen. Ebenso wurde die Spreitung der Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin nach 10 min bestimmt (B). Dazu wurden die Zellen mit 6  $\mu$ M BPB (+ BPB) oder 105 nM OBAA (+ OBAA) 5 min bei RT vorinkubiert. Bei den Arachidonsäure-Versuchen wurden die Zellen entweder mit 0,4  $\mu$ M Arachidonsäure (+ AA) 5 min bei RT vorinkubiert oder die Zellen mit 6  $\mu$ M BPB 5 min vorinkubiert und 2 min vor Überführung der Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin 0,4  $\mu$ M Arachidonsäure (BPB + AA) zugegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mind. 3 Versuchen.

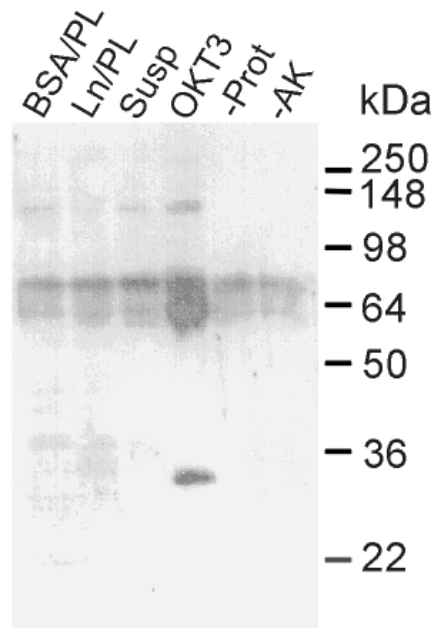
Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung nach Kontakt der Zellen mit Laminin/Poly-L-Lysin konnte nicht signifikant ( $P=0,54$ ) durch Vorinkubation mit BPB inhibiert werden, so daß sie  $\text{PLA}_2$ -unabhängig zu sein scheint (Abb. 4.2.7 A).

Die Spreitung der Zellen nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin wurde dagegen nach Vorinkubation mit BPB reduziert (Abb. 4.2.7 B). Diese Inhibition konnte durch Zugabe von Arachidonsäure, einem Produkt von  $\text{PLA}_2$ , zumindest teilweise wieder aufgehoben werden (Abb. 4.2.7 B). OBAA, ein weiterer spezifischer  $\text{PLA}_2$ -Inhibitor, hemmte ebenfalls die Spreitung der Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin, zeigte sich aber weniger effektiv (Abb. 4.2.7 B).

$\text{PLA}_2$  scheint somit auch in T-Lymphozyten nach Stimulation durch Laminin/Poly-L-Lysin bei der Spreitung eine wesentliche Rolle zu spielen.

### 4.3 Untersuchungen tyrosinphosphorylierter Proteine

In Kap. 4.2.2 konnte mit den Tyrosinkinase-Inhibitoren, Genistein und PP2, sowohl die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung als auch die Spreitung der Zellen nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin inhibiert werden. Daher sollte mit Hilfe von Western Blot Experimenten untersucht werden, welche Proteine nach Stimulation der Zellen über  $\alpha 6\beta 1$ -Integrine an Tyrosinresten phosphoryliert würden (Abb. 4.3.1).



**Abb. 4.3.1: Anti-Phosphotyrosin Blot nach Stimulation mit Laminin/Poly-L-Lysin**

Jurkat T-Lymphozyten wurden auf BSA/Poly-L-Lysin (BSA/PL) oder Laminin/Poly-L-Lysin (Ln/PL) beschichtete Petrischalen überführt, 10 min zur Adhäsion inkubiert und Zellysate wie unter Material und Methoden (3.2.6) beschrieben hergestellt. Im Kontrollexperiment wurden T-Lymphozyten in Suspension (Susp) unstimuliert oder mit anti-CD3 Antikörper (OKT3, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1 min) stimuliert und ebenfalls Zellysate hergestellt. Die tyrosinphosphorylierten Proteine wurden mit anti-Phosphotyrosin-Antikörper (polyclonal, rabbit, Upstate; 3  $\mu\text{g}$ ) immunpräzipitiert. Als Kontrollen wurden Immunpräzipitationen ohne Protein (-Prot) und ohne Antikörper (-Ab) durchgeführt. Die Präzipitate wurden über SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und mittels Naßblot auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die Membran wurde anschließend mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper (PY99, monoclonal, mouse, Santa Cruz; 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubiert und die Proteine mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (goat anti-mouse, Dianova; 1:5000) durch Chemilumineszenz detektiert.

Nach OKT3-Stimulation ist eine deutliche Zunahme an tyrosinphosphorylierten Proteinen zu erkennen, während die Zellysate von Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin keine Unterschiede zu unstimulierten Zellen auf BSA/Poly-L-Lysin oder zu Zellen in Suspension aufwiesen (Abb.

4.3.1). Unterschiedliche Adhäsionszeiten (2, 5, 10 und 30 min) der T-Lymphozyten auf Laminin/Poly-L-Lysin erbrachten ebenfalls keine unterschiedliche Tyrosinphosphorylierung (nicht gezeigt). Auch eine direkte Auftrennung der Zellysate mit SDS-PAGE und anschließendem anti-Phosphotyrosin-Blot zeigten keine Unterschiede zu unstimulierten Zellen, wohl aber zu OKT3-stimulierten Zellen (nicht gezeigt).

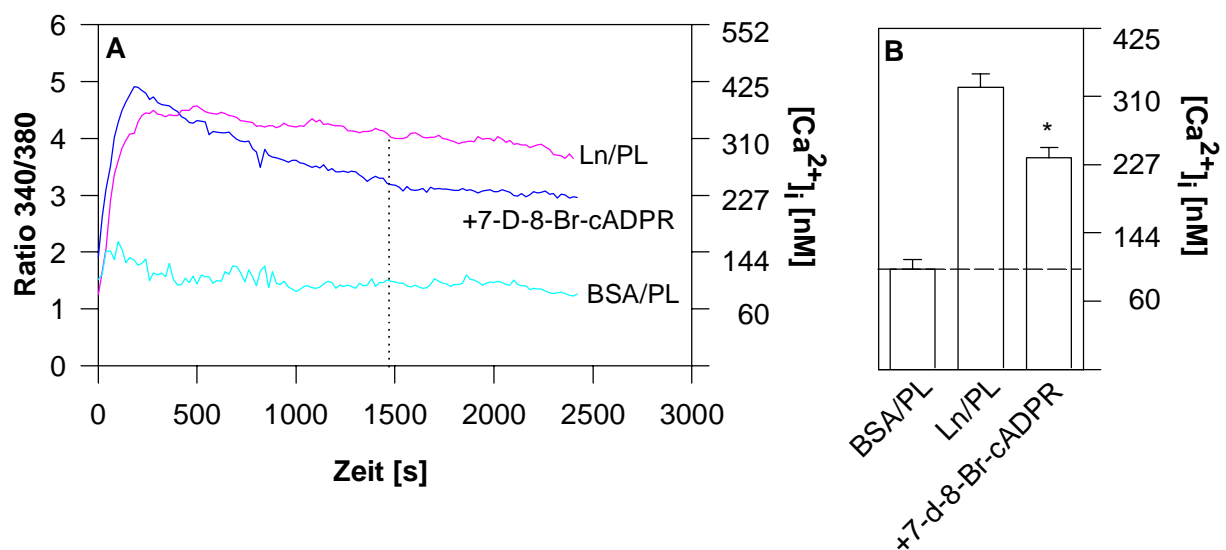
Mit Hilfe des anti-Phosphotyrosin-Blots läßt sich also keine Tyrosinphosphorylierung von Proteinen nach Stimulation der T-Lymphozyten über das  $\alpha6\beta1$ -Integrin nachweisen, obwohl die Inhibitoren der Tyrosinkinasen (Genistein und PP2) sowohl die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung als auch die Spreitung der Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin inhibieren konnten (vgl. 4.2.2).

#### 4.4 Mögliche Botenstoffe für $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung

In Kapitel 4.2 wurden Inhibitoren für verschiedene Enzyme eingesetzt, um mögliche Signaltransduktionswege aufzuzeigen. Hierbei wurde sowohl die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung wie auch die Spreitung der Zellen nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin betrachtet. In diesem Kapitel sollte nun untersucht werden, welche intrazellulären Botenstoffe für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus den intrazellulären Speichern verantwortlich ist. Dazu wurden die beiden in T-Lymphozyten bekannten Botenstoffe,  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  und cADPR, untersucht.

##### 4.4.1 Die Rolle von cADPR

Zur Untersuchung der Rolle von cADPR wurden die Zellen mit einem membranpermeablen cADPR-Antagonisten, 7-Deaza-8-Br-cADPR (Sethi et al, 1997) vorinkubiert und dann auf Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt (Abb. 4.4.1).



**Abb. 4.4.1: 7-Deaza-8-Br-cADPR inhibiert das Integrin-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal**

FURA 2-AM beladene T-Lymphozyten wurden auf BSA/Poly-L-Lysin oder Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ratiometrisch über 40 min gemessen. Für die Inhibitionsversuche wurden die Zellen 20 min mit  $100 \mu\text{M}$  7-Deaza-8-Br-cADPR bei RT vorinkubiert. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Werte wurden alle 20 s aufgenommen. Dargestellt sind die gemittelten Kurvenverläufe aus mind. 3 Versuchen (A) und die prozentuale Inhibition  $\pm$  Standardfehler nach 1500 sec (B). Das Sternchen markiert einen signifikanten Unterschied ( $P > 0.99$ ) nach dem t-Test nach Student gegen nicht inkubierte Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin. (BSA/PL:  $n=39$ , Ln/PL:  $n=89$ , +7-d-8-Br-cADPR:  $n=113$ ).



Vorinkubation der Zellen mit 100  $\mu\text{M}$  7-Deaza-8-Br-cADPR führte zu einer signifikanten Inhibition des langanhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals (Abb. 4.4.1 A) auf 61,3 % 25 min nach Kontakt der Zellen mit Laminin/Poly-L-Lysin (Abb. 4.4.1 B). Diese Ergebnisse sind somit vergleichbar mit der Hemmung durch 7-Deaza-8-Br-cADPR nach Stimulierung über den T-Zellrezeptor in T-Lymphozyten, bei der eine Inhibition auf 58 % beobachtet wurde (Guse et. al., 1999). Hiermit wurde erstmals gezeigt, daß cADPR auch nach Stimulation über das  $\beta 1$ -Integrin an der langanhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung beteiligt ist.

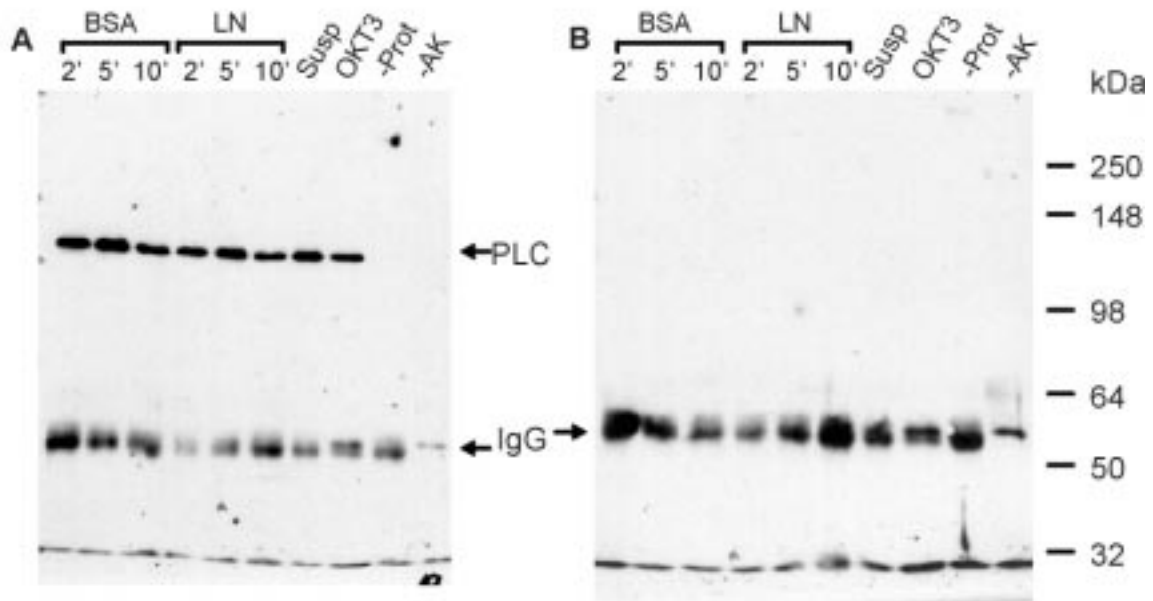
Die Spreitung der T-Lymphozyten auf Laminin/Poly-L-Lysin wurde dagegen durch 7-Deaza-8-Br-cADPR nicht inhibiert. Dies zeigt auch, daß 7-Deaza-8-Br-cADPR keine unspezifischen Effekte auf die Signaltransduktion zur Spreitung und damit auf PLC,  $\text{PLA}_2$  und PKC ausübte, sondern spezifisch auf die cADPR-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale wirkte.

#### 4.4.2 Rolle von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$

Die Rolle von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  sollte indirekt durch Inhibition der PLC (vgl. Kap. 4.2.5) und durch Tyrosinphosphorylierung von  $\text{PLC}\gamma 1$  untersucht werden, da eine direkte quantitative Analytik von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  nicht möglich war. Für eine HPLC-Analytik von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  wären  $5 \times 10^7$  Zellen pro Probe benötigt worden, welches für diese Experimente nicht durchführbar war (vgl. Diskussion der Methoden, 5.1.4). Daher sollte eine mögliche Tyrosinphosphorylierung von  $\text{PLC}\gamma 1$  mittels Western Blot untersucht werden (Abb. 4.4.2).

In Abb. 4.4.2 A ist zu erkennen, daß durch die Immunpräzipitation mit dem anti- $\text{PLC}\gamma 1$ -Antikörper gut detektierbare Mengen an  $\text{PLC}\gamma 1$  (146 kD) gewonnen werden konnten. Ferner ist auch die aufgetragene Menge an  $\text{PLC}\gamma 1$  für alle Proben vergleichbar. Abb. 4.4.2 B zeigt dagegen keine Tyrosinphosphorylierung von  $\text{PLC}\gamma 1$ , nicht einmal bei der Probe, die mit einem anti-CD3-Antikörper (OKT3) über den T-Zellrezeptor/CD3-Komplex stimuliert wurde. Auch andere Bedingungen bei der Herstellung der Zellysate, während der Immunpräzipitation oder die Verwendung anderer Antikörper führte zu demselben Ergebnis.

Zusammenfassend muß hier festgestellt werden, daß eine Tyrosinphosphorylierung von  $\text{PLC}\gamma 1$  zwar durch Western Blot Experimente nicht nachgewiesen werden konnte, dies aber methodisch begründet zu sein scheint. Durch die Experimente mit dem PLC-Inhibitor U73122 (vgl. Kap. 4.2.5) erscheint aber eine Rolle von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  nach Stimulierung von T-Lymphozyten durch Laminin/Poly-L-Lysin dennoch wahrscheinlich (vgl. Diskussion).



**Abb. 4.4.2: Anti-PLC $\gamma$ 1 Western Blot nach Stimulation der Zellen mit Laminin/Poly-L-Lysin**

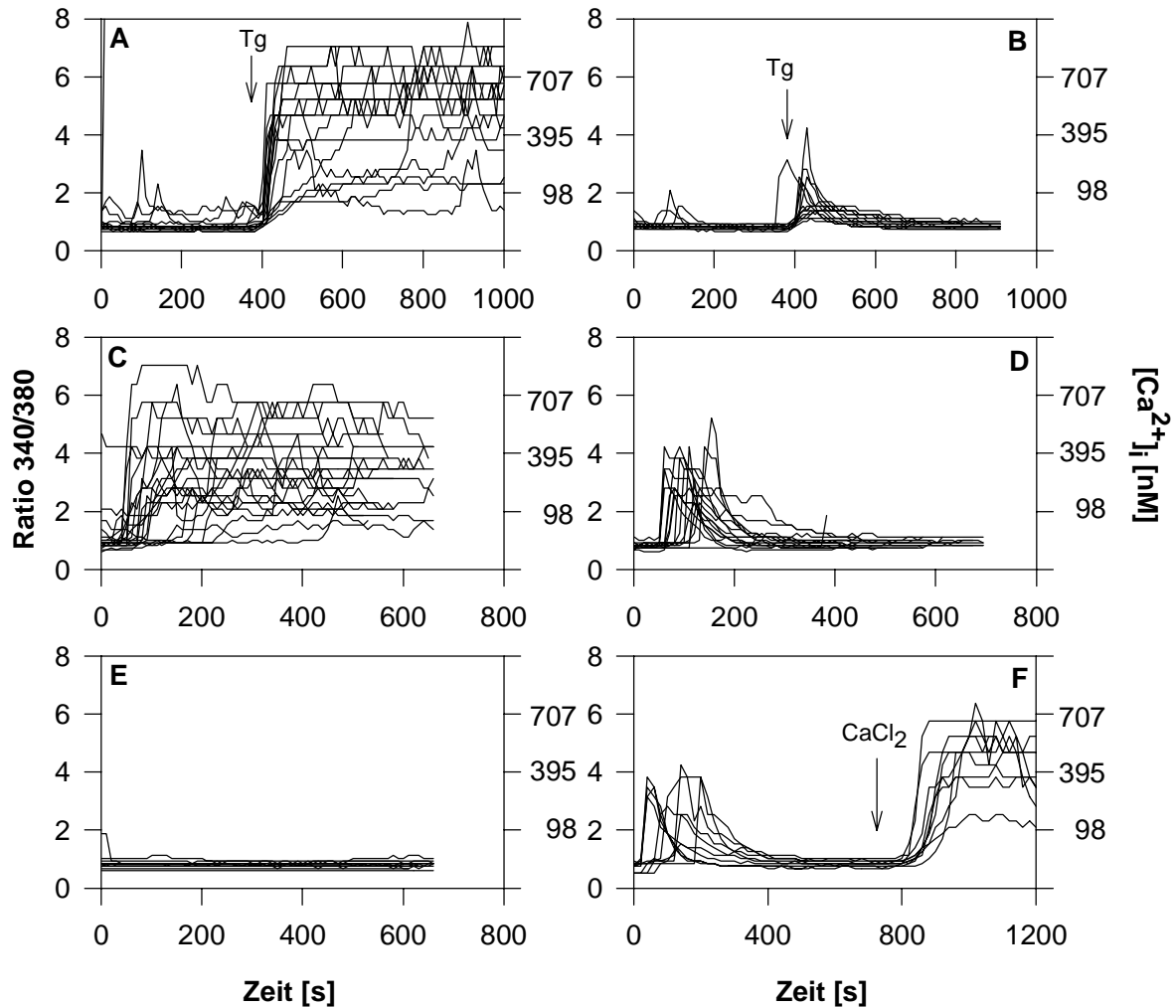
Jurkat T-Lymphozyten wurden auf BSA/Poly-L-Lysin (BSA/PL) oder Laminin/Poly-L-Lysin (Ln/PL) beschichtete Petrischalen überführt, 2, 5 oder 10 min zur Adhäsion stehengelassen und Zellysate wie unter Material und Methoden (3.2.6) beschrieben hergestellt. Als Kontrolle wurden T-Lymphozyten in Suspension (Susp) unstimuliert oder mit anti-CD3 Antikörper (OKT3, 10  $\mu$ g/ml, 1 min) stimuliert und ebenfalls Zellysate hergestellt. PLC $\gamma$ 1 wurde mit anti-PLC $\gamma$ 1-Antikörper (polyclonal, rabbit, Pharmingen; 1:125) immunpräzipitiert. Als Kontrollen wurden ebenfalls Immunpräzipitationen ohne Protein (-Prot) und ohne Antikörper (-Ab) durchgeführt. Die Präzipitate wurden geteilt, über 2 Gele mittels SDS-PAGE (7,5%) aufgetrennt und durch Naßblot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die Membran wurde anschließend mit einem anti-PLC $\gamma$ 1-Antikörper (monoclonal, mouse, Santa Cruz; 1  $\mu$ g/ml; A) bzw. einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper (PY99, monoclonal, mouse, Santa Cruz; 1  $\mu$ g/ml; B) inkubiert und die Proteine mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (goat anti-mouse, Dianova; 1:5000) über Chemilumineszenz detektiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von mind. 6 Experimenten.

## **4.5 Untersuchungen der bei den $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen beteiligten $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher nach Stimulation mit Laminin/Poly-L-Lysin**

Wie in der Einleitung beschrieben, besteht eine Möglichkeit der Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Stimulation von Zellen durch Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern, gefolgt von einem Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durch bestimmte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Zellmembran. In diesem Kapitel soll zunächst untersucht werden, ob dieser kapazitative Mechanismus auch für die Stimulation von T-Lymphozyten durch Laminin/Poly-L-Lysin gilt und durch welche  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle der Einstrom aus dem extrazellulären Raum erfolgt.

### **4.5.1 Untersuchung des $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms**

Zunächst sollte die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern untersucht werden. Dazu wurden T-Lymphozyten mit EGTA vorinkubiert, auf mit Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt und die Freisetzung aus den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern gemessen (Abb. 4.5.1 D). Als Kontrolle wurden Zellen mit EGTA vorinkubiert, auf BSA/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt und die Freisetzung aus den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern mit Thapsigargin, einem ATPase-Inhibitor des endoplasmatischen Reticulums, stimuliert (Abb. 4.5.1 B).



**Abb. 4.5.1: Untersuchung des Laminin-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms**

FURA 2-AM beladene T-Lymphozyten wurden A: auf BSA/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser gegeben und durch Zugabe von Thapsigargin (Tg, 1  $\mu\text{M}$ ) stimuliert; B: mit EGTA (2 mM) 5 min bei RT vorinkubiert, auf BSA/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt und nach 4 min durch Zugabe von Thapsigargin (1  $\mu\text{M}$ ) stimuliert; C: auf Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser gegeben; D: mit EGTA (2 mM) 10 min bei RT vorinkubiert und auf Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt; E: mit EGTA (2 mM) und Thapsigargin (1  $\mu\text{M}$ ) 10 min bei RT vorinkubiert und auf Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt; F: mit EGTA (2 mM) 10 min bei RT vorinkubiert, auf Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt und nach 5 min  $\text{CaCl}_2$  (750  $\mu\text{M}$ ) zugegeben. Die ratiometrische Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgte alle 20 sec. Dargestellt sind repräsentative Experimente aus mind. 3 Versuchen.

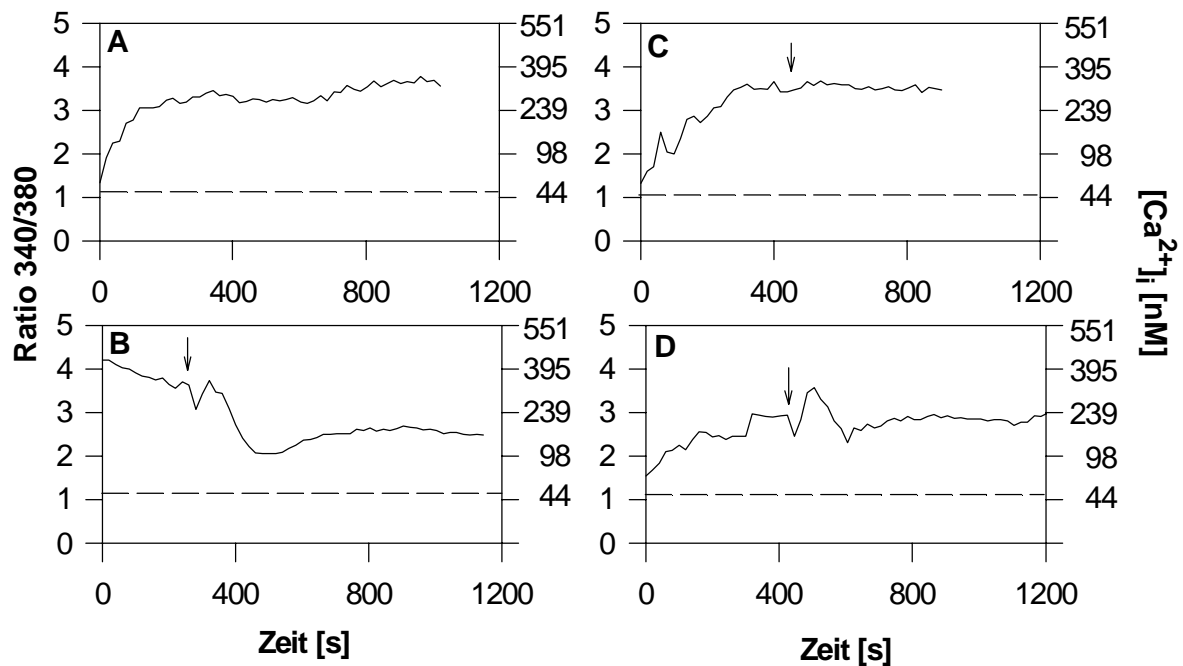
Thapsigargin setzte durch Hemmung der ATPase  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern frei und bewirkte so einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem extrazellulären Raum (Abb. 4.5.1 A). Wurden die Zellen vor Kontakt mit BSA/Poly-L-Lysin mit EGTA inkubiert und anschließend mit Thapsigargin stimuliert, so erfolgte lediglich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus den intrazellulären

Speichern (Abb. 4.5.1 B). T-Lymphozyten, die mit EGTA vorinkubiert wurden und dann mit Laminin/Poly-L-Lysin stimuliert wurden, zeigten nach Kontakt mit der Beschichtung ebenfalls eine Freisetzung aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern (Abb. 4.5.1 D). Die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgte kurz nach Kontakt der Zellen mit Laminin/Poly-L-Lysin und dauerte ca. 2-3 min bis die basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wieder erreicht wurde. T-Lymphozyten, deren intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher bereits durch Vorinkubation mit Thapsigargin entleert wurden, zeigten in Gegenwart von EGTA auf Laminin/Poly-L-Lysin keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale mehr (Abb. 4.5.1 E), d. h. also, daß Thapsigargin-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher nach Stimulation der Zellen über  $\alpha 6\beta 1$ -Integrine entleert wurden. Zur Untersuchung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms wurden T-Lymphozyten wiederum mit EGTA vorinkubiert und auf Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser gegeben (Abb. 4.5.1. F). Nach der Freisetzung aus den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern wurde  $\text{CaCl}_2$  zugegeben, so daß der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom erfolgte. Dieser war vergleichbar mit der Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Stimulation mit Laminin/Poly-L-Lysin von nicht vorinkubierten Zellen (vgl. Abb. 4.5.1 C).

#### 4.5.2 Pharmakologische Untersuchungen der $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle

Welche  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle an dem Einstrom des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  beteiligt sind, sollte anhand eines pharmakologischen Profils der Kanäle untersucht werden. Dazu wurden T-Lymphozyten auf mit Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser gegeben und unterschiedliche Inhibitoren von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in verschiedenen Konzentrationen zugegeben (Abb. 4.5.2).

In Abb. 4.5.2 B ist zu erkennen, daß Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  SK-F 96365 zu einer deutlichen Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin führte. Zugabe von 5  $\mu\text{M}$  SK-F 96365 führte zu keiner Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals, Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  SK-F 96365 erhöhte dagegen noch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (nicht gezeigt). Diese Daten stimmen mit Ergebnissen überein, die für die Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals nach Stimulation über den TCR/CD3-Komplex mit Hilfe von OKT3 gefunden wurden (Diplomarbeit C. de Witt, 1996). Hierbei wurde ebenfalls eine stimulierende Wirkung von SK-F 96365 bei höheren Konzentrationen gefunden. Allerdings war nach Stimulation mit OKT3 die Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  SK-F 96365 am größten, der  $\text{IC}_{50}$  betrug 7  $\mu\text{M}$ . Nach Stimulation der Zellen über  $\alpha 6\beta 1$ -Integrine wurde das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal bereits nach Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  SK-F 96365 effektiv gehemmt, während 10  $\mu\text{M}$  bereits zu einer deutlichen Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führten.



**Abb. 4.5.2: Wirkung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal Inhibitoren auf die Laminin-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung**

FURA 2-AM beladene T-Lymphozyten wurden auf Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser gegeben und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ratiometrisch bestimmt (A). Dann wurden 1  $\mu\text{M}$  SK-F 96365 (B), 100  $\mu\text{M}$  Verapamil (C) oder 50  $\mu\text{M}$  Nitrendipin (D) zugegeben. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Zugabe. Dargestellt sind die gemittelten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von Zellen aus mind. 3 unabhängigen Experimenten. Die gestrichelte Linie stellt die basale intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dar.

Verapamil und Nitrendipin, beides Inhibitoren der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, führten bis zu Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  (Abb. 4.5.1 C) bzw. 50  $\mu\text{M}$  (Abb. 4.5.1 D) zu keiner Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms. Versuche mit Econazol, einem Inhibitor mit ähnlicher Struktur wie SK-F 96365, führten zu keinem Ergebnis, da 1  $\mu\text{M}$  Econazol die Zellen aktivierte und bei höheren Konzentrationen (10  $\mu\text{M}$ ) die Zellen bereits lysierten (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend ist also festzustellen, daß nach Kontakt von T-Lymphozyten mit Laminin/Poly-L-Lysin Thapsigargin-sensitive intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher entleert werden und der Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durch SK-F 96365 sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle erfolgt.

## 5. Diskussion

Im folgenden Kapitel sollen zunächst die angewendeten Methoden diskutiert werden. Spezielle methodische Probleme werden aber auch in der „Diskussion der Ergebnisse“ an entsprechender Stelle erörtert, sofern die Interpretation der Ergebnisse dieses erfordert. In Kapitel 5.2 werden dann die Ergebnisse diskutiert und eine Modellvorstellung zur Signaltransduktion in Jurkat T-Lymphozyten über  $\beta 1$ -Integrine entwickelt.

### 5.1 Diskussion der Methoden

#### 5.1.1 Messung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und Auswertung

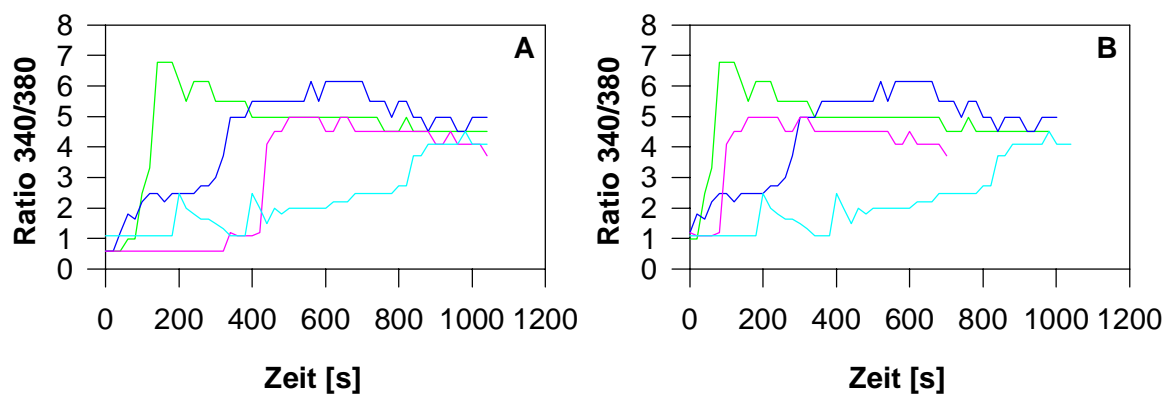
Die Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgte mit Hilfe eines Imaging-Systems. Als großer Vorteil erwies sich hierbei die Verwendung des  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes FURA 2, da er eine ratiometrische Messung ermöglicht (Tsien et al, 1985). Bei einer ratiometrischen Messung erfolgt die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes durch Licht mit den Wellenlängen 340 nm und 380 nm während die Emission jeweils bei 520 nm gemessen wird. Anschließend wird das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten nach Anregung beider Wellenlängen ( $I_{340}:I_{380}$ ), also der Ratiowert 340/380 gebildet. Dadurch war die Messung unabhängig von der intrazellulären FURA 2 Konzentration, der Lichtintensität, der Zelldicke und vom Ausbleichen des Farbstoffes (Thomas et al, 1991). Ebenso war die Beladung der Zellen durch die veresterte und damit membranpermeable Form von FURA 2, FURA 2-AM, sehr einfach und zuverlässig durchführbar. Ein weiterer Vorteil liegt in den Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffes selbst. So ist er recht stabil, zeigt sehr wenig Hintergrundfluoreszenz und ist vor allem recht spezifisch für  $\text{Ca}^{2+}$  gegenüber anderen zweiwertigen Kationen wie z. B.  $\text{Mg}^{2+}$  (Thomas et al, 1991). Probleme mit FURA 2-AM könnten durch unspezifische Bindung an zelluläre Proteine, eine Einlagerung in zelluläre Kompartimente oder durch eine nicht vollständige Spaltung des Acetoxymethylesters durch die intrazellulären Esterasen und damit eine nicht vollständige Freisetzung von FURA 2 freier Säure entstehen (Thomas et al, 1991). Ebenso kann die Pufferwirkung von FURA 2 die Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beeinflussen (Thomas et al, 1991). Hierbei erweist sich die starke Fluoreszenzintensität von FURA 2 als vorteilhaft, da er so in relativ geringen Konzentrationen (im Gegensatz z. B. zu Quin-2) eingesetzt werden kann (Grynkiewicz et al, 1985).

Die Umsetzung der gemessenen Ratiowerte 340/380 in die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen erfolgte durch eine externe Kalibrierung des Imaging-Systems. Diese wurde in Puffern mit definierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und FURA 2 freier Säure durchgeführt und anhand dieser Daten eine Eichkurve erstellt (s. Material und Methoden, 3.2.3). Dabei wurde davon ausgegangen, daß die verwendeten Puffer den Bedingungen in der Zelle sehr ähnlich sind. Dies ist insbesondere wichtig bei pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke, da diese Parameter direkt die Dissoziationskonstante von FURA 2 beeinflussen (Bers et al, 1994; Tsien et al, 1994) Auch Proteine haben einen Einfluß auf die Dissoziationskonstante. Somit birgt die externe Kalibrierung Ungenauigkeiten für die exakte Bestimmung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Dies wurde minimiert durch Verwendung eines intrazellulären Puffers mit physiologischem pH-Wert (pH 7,2) und Messung bei Raumtemperatur, bei der ebenfalls alle Messungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Zellen durchgeführt wurden. Ferner war die ratiometrische Bestimmung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen über  $1 \mu\text{M}$  problematisch, da sich hierbei der Ratiowert 340/380 nur noch minimal oder gar nicht änderte (vgl. Abb. 3.2.1). Die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, die selbst nach Stimulation der Zellen gemessen wurden, überschritten jedoch nur selten bei einzelnen Zellen die Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  freiem  $\text{Ca}^{2+}$ , so daß dieser Fehler für die hier durchgeführten Messungen vernachlässigbar ist. Ebenso erwies sich die Bestimmung der sehr kleinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ( $<25 \text{ nM}$ ) als recht schwierig, da hier der Fehler durch eine eventuelle Verunreinigung mit anderen Ionen von den Deckgläsern oder eingesetzten Reagenzien sehr groß wird. Dennoch bietet die externe Kalibrierung gerade in dem für die Messungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von T-Lymphozyten interessanten Bereich von  $50 \text{ nM}$  (basal) bis ca.  $700 \text{ nM}$  (nach Stimulation) eine zuverlässige Methode zur Bestimmung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Dies wird auch durch die gute Korrelation der in dieser Arbeit gewonnenen Daten mit Literaturdaten bestätigt. So maßen Guse et al (1993) in Jurkat T-Lymphozyten am Fluorimeter eine basale intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $80\text{-}120 \text{ nM}$ , die nach Stimulation über den T-Zellrezeptor/CD3-Komplex mit einem anti-CD3 Antikörper (OKT3) auf ca.  $300 \text{ nM}$   $[\text{Ca}^{2+}]_i$  anstieg. Haverstick et al (1997) bestimmten in Indo-1 beladenen Jurkat T-Lymphozyten eine etwas niedrigere basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $50 \text{ nM}$ ) am Fluorimeter. Dagegen fanden Mason et al (1991) im Fluorimeter eine basale intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von ca.  $100 \text{ nM}$  in Indo-1 oder Quin-2 beladenen T-Lymphozyten von Ratten. Ebenso betrug die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in einem FURA-2 beladenen T-Zellklon (P28) ca.  $100\text{-}150 \text{ nM}$  (Donnadieu et al, 1992). Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen basalen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in Jurkat T-



Lymphozyten von  $95 \pm 21$  nM stimmen demnach sehr gut mit den Daten aus der Literatur überein.

Zur Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration am Imaging-System wurden die Zellen auf ein beschichtetes Deckglas gegeben und auf den Objektträger des Imaging-Systems überführt, während die Zellen noch zum Deckglas hin absanken. Sobald die ersten Zellen in Kontakt mit der Beschichtung des Deckglases waren, wurden sie fokussiert und die Messung gestartet. Dies bedeutet, daß bei Start der Messung durch die unterschiedliche Geschwindigkeit des Herabsinkens der Zellen noch nicht alle Zellen in Kontakt mit der Beschichtung waren und somit noch nicht stimuliert wurden. Daher variierte der Anfangszeitpunkt der Stimulation zwischen den Zellen eines Zellfeldes. Für die Auswertung war es aber wichtig einen einheitlichen Anfangszeitpunkt der Stimulation für alle Zellen eines Zellfeldes zu erreichen, um eine aussagekräftige Mittelwertbildung durchführen zu können. Sonst würde sich die Geschwindigkeit der Signalentstehung bei der Mittelwertbildung durch den zeitlich unterschiedlichen Kontakt der Zellen zur Beschichtung verringern. Daher wurde für jede Zelle eines Zellfeldes der jeweilige Zeitpunkt sobald sie im Fokus, also in Kontakt mit der Beschichtung war, gleich null gesetzt. Durch diese Synchronisation in der Auswertung wurde somit ein einheitlicher Startpunkt der Stimulation für alle Zellen erreicht (Abb. 5.1.1).

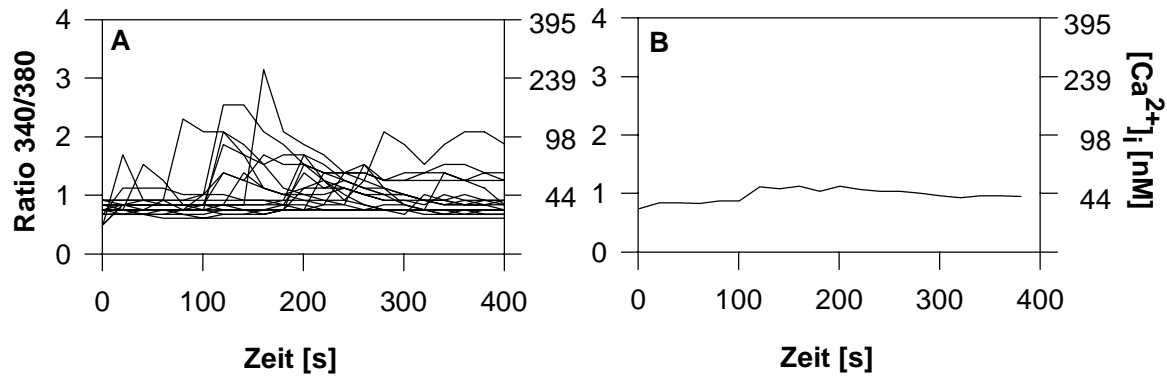


**Abb. 5.1.1: Synchronisation des Startpunktes**

T-Lymphozyten wurden auf Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bestimmt. Durch zeitlich versetztes Herabsinken der Zellen ist der Beginn der Stimulation unterschiedlich (A). In der Auswertung wurde für jede Zelle der Kontakt zur Beschichtung gleich null gesetzt und so der Beginn der Stimulation synchronisiert (B).

Die unterschiedliche Geschwindigkeit der Stimulation der Zellen durch Laminin/Poly-L-Lysin in den dargestellten Einzelzellmessungen basiert also nur auf individuellen Unterschieden zwischen den Zellen in der betrachteten Zellpopulation des Zellfeldes. Bei der Mittelwertbildung wirkt daher der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Folge einer Stimulation durch Laminin/Poly-L-Lysin langsamer als er tatsächlich in den jeweiligen Zellen ist. Hier wird der Vorteil der Einzelzellmessung an einem Imaging-System gegenüber einer Messung am Fluorimeter deutlich. Im Fluorimeter ist nur die Betrachtung der Zellpopulation in der Küvette möglich, welches der Mittelwertbildung am Imaging-System entspricht, auch wenn die Zellzahl in der Küvette wesentlich höher ist. Betrachtet man aber die Einzelzellmessungen, so werden die individuellen Unterschiede zwischen den Zellen deutlich: so reagieren die Zellen unterschiedlich schnell auf den Stimulus und auch in unterschiedlicher Höhe. Erfolgt jedoch eine Reaktion, so wird anhand der Einzelzellmessungen deutlich, daß die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration innerhalb einiger Sekunden erfolgt (es sei in diesem Zusammenhang nochmal darauf hingewiesen, daß alle 20 s gemessen wurde).

Besonders wichtig werden diese individuellen Unterschiede zwischen den Zellen bei der Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern (vgl Kap. 4.5). Hierbei wurden die T-Lymphozyten mit EGTA vorinkubiert um das extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  zu komplexieren und dann auf die beschichteten Deckgläser überführt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus den intrazellulären Speichern erfolgte kurz nach Kontakt der Zellen mit Laminin/Poly-L-Lysin und führte zu einer kurzfristigen Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Wird aber nun ein Mittelwert der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gebildet, so „verschwindet“ das transiente  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal durch die individuellen Unterschiede zwischen den Zellen (Abb. 5.1.2). Daher wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern nur als Einzelzellmessung dargestellt.



**Abb. 5.1.2: Einzelzelldarstellung und Mittelwertbildung bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern**

T-Lymphozyten wurden nach Vorinkubation mit EGTA (2 mM, 10 min) auf Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gemessen. Dargestellt ist die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den intrazellulären Speichern für einzelne Zellen (A) sowie der daraus gebildete Mittelwert (B).

### 5.1.2 Inhibitionsversuche

Zur Aufklärung der Signaltransduktionswege wurden eine Reihe pharmakologisch wirksamer Inhibitoren eingesetzt. Diese Substanzen waren meist nur in organischen Lösemitteln wie DMSO löslich, welches in Konzentrationen über 2% (v/v) toxisch für die Zellen ist. Daher wurde in allen Versuchen eine Endkonzentration von DMSO größer als 1 % (v/v) vermieden. Da viele Inhibitoren recht instabil und Hydrolyse- sowie UV-empfindlich sind und nicht bekannt ist, zu welchem Anteil sie in die Zellen aufgenommen werden, wurden alle Inhibitoren in mehreren Konzentrationen eingesetzt und verschiedene Inkubationszeiten getestet. Gezeigt sind die Ergebnisse der Versuche mit optimalen Inhibitorkonzentrationen sowie Inkubationszeiten für Jurkat T-Lymphozyten.

Für eine Reihe von Inhibitoren sind neben ihrer spezifischen Wirkung ebenso andere unspezifische Effekte beschrieben worden, auf die in der Diskussion der Ergebnisse (Kap. 5.2) näher eingegangen wird.

Zu beachten ist hierbei, daß oft strukturell verwandte, aber nicht wirksame Kontrollsubstanzen fehlen. Eine Ausnahme ist der PLC-Inhibitor U73122, für den U73343 als unwirksames Analogon angeboten wird. In den Versuchen zur PLC-Inhibition hemmten 2  $\mu\text{M}$  U73343 die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung ebenso wie das wirksame U73122, so daß hierbei von einer zum Teil unspezifischen Wirkung von U73122 ausgegangen werden muß. Dagegen inhibierte das unwirksame Analogon des Tyrosinkinase-Inhibitors Genistein, das Daidzein, in den

eingesetzten Konzentrationen weder das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal noch die Spreitung der Zellen im Gegensatz zu Genistein, was für einen spezifischen Effekt des Genisteins spricht.

Bei der Inhibition der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle erwiesen sich die Inhibitoren in bestimmten Konzentrationen ebenso als Aktivator für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Dies wurde für SK-F 96365 schon in der Diplomarbeit von de Wit (1996) gezeigt, die einen agonistischen Effekt von SK-F 96365 oberhalb einer Endkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  beobachtete.

### 5.1.3 Untersuchungen tyrosinphosphorylierter Proteine

Die Versuche zur Tyrosinphosphorylierung bestimmter Proteine durch Western Blot werden durch verschiedene Faktoren beeinflusst. So können bei der Herstellung der Zellysate Interaktionen von Proteinen durch die Aufarbeitung verloren gehen, welches insbesondere bei der Untersuchung von Copräzipitationen von Bedeutung ist, besonders wenn es sich um eine relativ schwache Interaktion von Proteinen handelt.

Zur Herstellung der Zellysate wurden die Zellen zunächst auf die beschichteten Petrischalen überführt und sanken mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ab. Daher war kein definierter Startpunkt für den Kontakt aller Zellen mit der Beschichtung gegeben (vgl. Kap. 5.1.1). Eine Zentrifugation der Zellen auf die Petrischalen hätte hier vorteilhaft sein können, aber erstens stand hierfür keine Apparatur zur Verfügung und zweitens wäre es gerade bei einem Zeitpunkt von nur 2 min nach Kontakt der Zellen zu den EZM Proteinen ebenfalls problematisch in der Durchführung gewesen. Bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung nach Stimulation der T-Lymphozyten über die  $\beta 1$ -Integrine sind aber wahrscheinlich gerade dies die entscheidenden Zeitpunkte, da die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale bei dem Großteil der Zellen innerhalb von 2 min nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin entstehen.

Desweiteren blieb bei der Herstellung der Zellysate ein nicht löslicher Rückstand aus Zelltrümmern und DNA zurück, der abzentrifugiert wurde. Dieser Rückstand wurde ebenfalls auf tyrosinphosphorylierte Proteine untersucht, indem er direkt mit SDS-Probenpuffer für 5 min auf  $95^\circ\text{C}$  erhitzt wurde. Nach Zentrifugation wurde der Überstand auf einem SDS-Gel aufgetrennt, die Proteine mittels Naßblot auf eine Nitrozellulose-Membran überführt und mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper inkubiert. Hierbei wurden zahlreiche tyrosinphosphorylierte Proteine nachgewiesen. Da aber eine Proteinbestimmung in SDS-Probenpuffer nicht durchführbar ist, war eine quantitative Bestimmung der Proteinmenge unmöglich. Durch die unterschiedliche Adhäsion der Zellen auf BSA/Poly-L-Lysin (als

Kontrolle) und Laminin/Poly-L-Lysin variierte der Proteingehalt der Zellysate bei gleicher eingesetzter Anzahl der Zellen aber erheblich, da nur die adhärierenden Zellen aufgearbeitet wurden. Eine quantitative Aussage über eine mögliche Zunahme der Tyrosinphosphorylierung bestimmter Proteine konnte also nicht getroffen werden. Problematisch wird dies für Proteine, die durch Tyrosinphosphorylierung möglicherweise an die Zellmembran translozieren, und somit nicht quantitativ erfaßt werden konnten.

Ferner war die Immunpräzipitation sowie der Western Blot abhängig von der Spezifität der eingesetzten Antikörper, die nicht immer gegeben war. So erkannte z. B. ein spezifischer Antikörper für die fokale Adhäsionskinase (FAK; Santa Cruz, sc-557, Kaninchen, Antiserum) neun Proteine unterschiedlicher Größe in einem Western Blot aus Zellysaten. Bei den Immunpräzipitationen konnten die eingesetzten Antikörper das gewünschte Protein dagegen häufig nicht anreichern (z. B. anti- $\beta$ 1 Integrin Antikörper, monoclonal, P4C10, Maus, Life Technologies), so daß sie für eine erfolgreiche Immunpräzipitation ungeeignet waren.

Schwierig war ebenfalls die Untersuchung der Tyrosinkinasen der src-Familie. In T-Lymphozyten sind dies hauptsächlich Proteine der Größen 56 kDa (lck) und 59 kDa (fyn), die ohnehin meist autophosphoryliert sind. Im Western Blot wurde mit den hier eingesetzten Zweitantikörpern jedoch meist auch die schwere Kette des Erstantikörpers erkannt, die bei 55 kDa liegt. Daher war eine Aussage zur Tyrosinphosphorylierung sowie zur möglichen Kopräzipitation z. B. mit  $\beta$ 1-Integrin der Kinasen der src-Familie nicht möglich, obwohl als Zweitantikörper ein gegen die IgGs der Spezies des Erstantikörpers (Maus oder Kaninchen) präadsorbierter Antikörper eingesetzt wurde.

#### **5.1.4 Untersuchungen der sekundären Botenstoffe für die $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung**

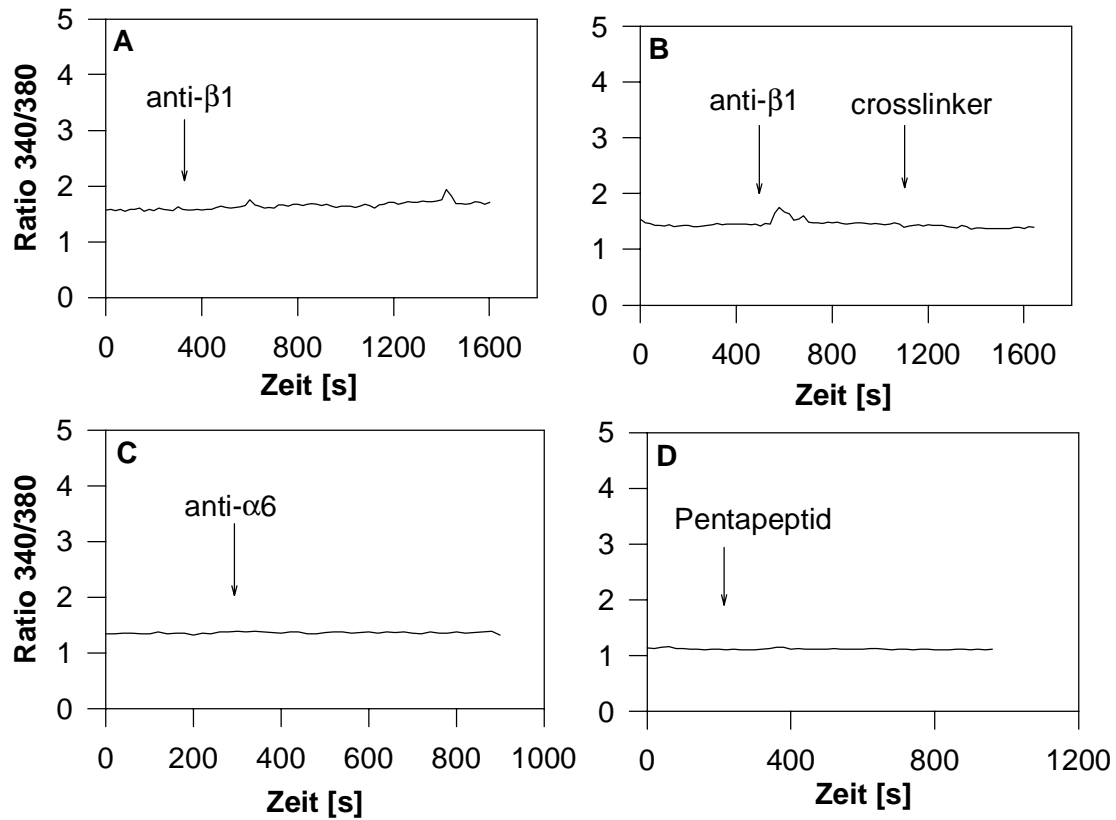
Als Botenstoffe für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung kommen  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  (Streb et al, 1983), cADPR (Lee et al, 1989) und NAADP (Lee et al, 1995) in Frage. Eine direkte quantitative Messung von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  mittels MDD HPLC war nicht möglich, da hierfür  $5 \times 10^7$  Zellen pro Probe benötigt werden (Guse et al 1995). Das hätte für die hier durchgeführten Versuche bedeutet, daß für jede Probe 5 mit Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Petrischalen hätten eingesetzt werden müssen, welches schon aus Kostengründen, aber vor allem wegen der Durchführung schwierig möglich gewesen wäre, zumal der Anstieg des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , zumindest nach Stimulation der T-Lymphozyten über den TZR/CD3-Komplex sehr schnell erfolgt (Maximum an  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  nach 2 min, nach 10 min nur noch um ca. 50% erhöht; Guse et al, 1998; Granja

et al, 1991). Da das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nach Stimulation der T-Lymphozyten über die  $\beta 1$ -Integrine vergleichbar schnell entsteht wie das nach Stimulation über den TZR/CD3-Komplex, dürfte auch hier das Maximum an intrazellulärem  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  bei ca. 2 min nach der Stimulation liegen und sich somit wiederum die oben beschriebene Schwierigkeit der Synchronisation des Startpunktes der Stimulation bedingt durch den zeitlich differierenden Kontakt der Zellen mit EZM-Protein ergeben. Daher wurde in dieser Arbeit versucht, die Rolle von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  über den Nachweis einer Aktivierung von  $\text{PLC}\gamma 1$ , welches  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  durch Spaltung von  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  freisetzt, aufzuklären.

Für eine quantitative Bestimmung von cADPR mittels HPLC wären sogar  $1-2 \times 10^8$  Zellen pro Versuch benötigt worden (da Silva, 1998), was für diese Versuche unmöglich durchführbar gewesen wäre. Daher wurden in dieser Arbeit Versuche zur Rolle von cADPR mit Hilfe des membranpermeablen Antagonisten 7-deaza-8-Br-cADPR durchgeführt (Sethi et al, 1997).

Auf Grund der oben erwähnten Schwierigkeiten der quantitativen Bestimmung dieser Botenstoffe wurden zu Beginn dieser Arbeit zahlreiche Versuche durchgeführt, die Stimulation der T-Lymphozyten über die  $\beta 1$ -Integrine nicht über die EZM-Proteine direkt sondern z. B. durch aktivierende anti-Integrin Antikörper zu erreichen. Der Vorteil einer solchen Stimulation wäre ein einheitlicher Startpunkt durch Zugabe des aktivierenden anti-Integrin Antikörpers gewesen und die Tatsache, daß eine größere Anzahl an Zellen pro Experiment schneller hätte aufgearbeitet werden können, da die Stimulation der Zellen in Suspension hätte erfolgen können. Ein weiterer Vorteil wäre die Möglichkeit der Mikroinjektion von nicht membranpermeanten Substanzen gewesen, da die Zellen auf einer nicht stimulierenden Beschichtung (BSA/Poly-L-Lysin) hätten haften können und die Stimulation je nach Bedarf vor oder nach der Mikroinjektion hätte erfolgen können. Daher wurden die Zellen auf BSA/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt und mit verschiedenen anti-Integrin Antikörpern (anti- $\alpha 6$  bzw. anti- $\beta 1$  Integrin Antikörper) sowie einer Kombination beider Antikörper versetzt und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gemessen. Dies führte aber zu keiner Stimulation der Zellen (Abb. 5.3), obwohl die Zellen nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale zeigten. Auch eine Verbindung der Integrinseitenketten durch Verbinden der jeweiligen Antikörper mit einem sog. Kreuzvernetzer (Ziege anti-Maus IgG) bewirkte keine Stimulation der Zellen. Desweiteren erschien der Einsatz von Laminin-Peptiden (Pentapeptid: YIGSR und Nonapeptid: CDPGYIGSR), die spezifisch an die Integrine binden

(Iwamoto et al, 1987; Graf et al, 1987) vielversprechend, führte aber ebenfalls zu keiner Stimulation der T-Lymphozyten (Abb. 5.3).



**Abb. 5.1.3: Versuche zur Stimulation der Zellen durch Antikörper oder Peptide**

T-Lymphozyten wurden auf BSA/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt und anti-β1 Integrin Antikörper (P4C10, 10 µg/ml; A), anti-β1 Integrin Antikörper + Kreuzvernetzer (Ziege anti-Maus IgG, 100 µg/ml; B), anti-α6 Integrin Antikörper (GoH3, 10 µg/ml; C) oder Laminin-Pentapeptid (YIGSR, 1 mM; D). Die Zugabe ist jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet. Dargestellt sind repräsentative Experimente von mind. 3 unabhängigen Versuchen.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit ist erstmals beschrieben worden, daß Kontakt von Jurkat T-Lymphozyten mit Laminin/Poly-L-Lysin 1) zu einer verstärkten Adhäsion der Zellen verglichen mit Zellen auf einer Beschichtung aus Laminin/BSA, 2) zu stark erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen ebenfalls verglichen mit Zellen auf einer Beschichtung aus Laminin/BSA und 3) zu einer Spreitung der Zellen führte. Die Signaltransduktion für diese Effekte ist mit einer Reihe von spezifischen Inhibitoren untersucht worden (Schöttelndreier et al, 1999). Die Ergebnisse sind in Tab. 5.1 zusammengefaßt.

	$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Spreitung	Starke Adhäsion
Laminin/Poly-L-Lysin	100%	100%	100%
<b>Inhibition von Integrinen</b>			
Ln/PL + anti- $\beta$ 1 Integrin AK (10 $\mu$ g/ml, 30 min)	12,5%	28,1%	80,1%
Ln/PL + anti- $\beta$ 4 Integrin AK (10 $\mu$ g/ml, 30 min)	87,4%	94,3%	Keine Inh.
Ln/PL + IgG Isotypkontrolle (10 $\mu$ g/ml, 30 min)	113%	100%	Keine Inh.
<b>Inhibition von Tyrosinkinasen</b>			
Ln/PL + Genistein (80 $\mu$ M, 10 min)	14,2%	44,6%	83,4%
Ln/PL + PP2 (5 $\mu$ M, 20 min)	19,4%	32,0%	Keine Inh.
<b>Inhibition von Phosphatasen</b>			
Ln/PL + Dephostatin (100 $\mu$ M, 15 min)	105%	100%	Keine Inh.
<b>Inhibition von PLC</b>			
Ln/PL + U73122 (1 $\mu$ M, 10 min)	57,9%	15,3%	85,6%
Ln/PL + U73343 (1 $\mu$ M, 10 min)	135,6%	90,8%	Keine Inh..
<b>Inhibition von PKC</b>			
Ln/PL + Calphostin C (1.3 $\mu$ M, 5 min)	*	38,0%	92,3%
Ln/PL + GF109203x (5 $\mu$ M, 10 min)	122%	41,7%	95,4%
<b>Inhibition von PLA<sub>2</sub></b>			
Ln/PL + BPB (6 $\mu$ M, 5 min)	79,7%	27,0%	89,7%

(Fortsetzung s. S. 74)



	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Spreitung	Starke Adhäsion
<b>Komplexierung von extrazellulärem Ca<sup>2+</sup></b>			
Ln/PL + EGTA (2 mM, 2 min)	17,3%	97,2%	96,8%
<b>cADPR-Antagonist</b>			
7-Deaza-8-Br-cADPR (100 µM, 30 min)	61,3%	100%	Keine Inh.

**Tab. 5.1: Wirkung verschiedener Substanzen auf die Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung, Spreitung und starke Adhäsion von T-Lymphozyten auf Laminin/Poly-L-Lysin**

T-Lymphozyten wurden entweder direkt auf Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt oder mit einer der aufgeführten Substanzen vor Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin inkubiert. Die Vorinkubation wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln für die angegebene Zeit durchgeführt. Die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wurde 10 min, die Spreitung und die starke Adhäsion der Zellen jeweils 15 min nach Kontakt der Zellen mit Laminin/Poly-L-Lysin wie in Material und Methoden beschrieben bestimmt. Für Calphostin C wurde die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ebenfalls bestimmt, führte aber nur in 50% der Experimente zu einer Inhibition (\*; s. Kap. 4.2.5). Die starke Adhäsion der Zellen wurde nicht für alle Substanzen quantitativ bestimmt, aber qualitativ führte keine dieser Substanzen zu einer Inhibition der Adhäsion (Keine Inh.). Signifikante Unterschiede sind grau unterlegt.

### 5.2.1 Adhäsion der T-Lymphozyten auf verschiedenen Beschichtungen

Wie schon Weismann et al (1997) zeigten, war die Adhäsion von T-Lymphozyten an die extrazellulären Matrixproteine Laminin und Collagen Typ IV stärker verglichen mit der Adhäsion von Zellen auf einer Beschichtung aus BSA allein. Für die Adhäsion von T-Lymphozyten an Fibronectin und Vitronectin wurde nachgewiesen, daß sie über Integrine ( $\alpha\beta1$ -/ $\alpha5\beta1$ - bzw.  $\alpha\beta3$ -Integrin) vermittelt wurden (Weismann et al, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die Adhäsion der T-Lymphozyten an eine Beschichtung aus Laminin oder Collagen Typ IV jeweils in Kombination mit einer Polyaminosäure noch stärker war verglichen mit der Adhäsion der Zellen auf den EZM-Proteinen allein. Besonders auffällig war die starke Adhäsion der Zellen an Beschichtungen aus einer Kombination von EZM Protein mit einer positiv geladenen Polyaminosäure. Diese starke Adhäsion der Zellen auf Laminin/Poly-L-Lysin oder einer anderen positiv geladenen Polyaminosäure konnte nur geringfügig durch Vorinkubation mit einem spezifischen anti- $\beta1$  Integrin Antikörper gehemmt werden und war auch unabhängig von der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Weismann et al (1997), die,

außer für die Adhäsion an Fibronectin, ebenfalls keine positive Korrelation zwischen Adhäsion und  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung zeigten). Daher scheint es sich hierbei hauptsächlich um eine Ladungswechselwirkung zwischen der positiv geladenen Polyaminosäure und der negativ geladenen Glykokalyx der Zellen zu handeln. Tatsächlich nimmt die Adhäsion der Zellen auf einer Beschichtung aus EZM-Protein und einer neutralen oder negativ geladenen Polyaminosäure ab. Für eine starke Adhäsion durch Ladungswechselwirkung spricht auch, daß sich die Adhäsion durch keinen der verwendeten Inhibitoren zur Aufklärung der Signaltransduktion beeinflussen ließ, so daß eine Signalgebung von innerhalb der Zelle nach außen bei der Adhäsion keine Rolle zu spielen scheint. Dennoch ist ein synergistischer Effekt von EZM Protein und Polyaminosäure zu erkennen, da die Adhäsion der Zellen auf Beschichtungen aus BSA und Polyaminosäure wesentlich geringer ist.

### 5.2.2 $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung und Spreitung der Zellen

Neben der starken Adhäsion der T-Lymphozyten auf einer Beschichtung aus Laminin oder Collagen Typ IV in Kombination mit einer positiv geladenen Polyaminosäure kommt es zu einer stark erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verglichen mit Zellen auf einer Beschichtung aus EZM-Protein und BSA und zu einer Spreitung der Zellen. Diese beiden Signale werden ausschließlich über  $\beta 1$ -Integrine vermittelt, da durch Vorinkubation der Zellen mit anti- $\beta 1$  Integrin Antikörper (P4C10) sowohl die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale als auch die Spreitung der Zellen nach Kontakt mit Laminin und auch mit Collagen Typ IV jeweils in Kombination mit einer positiv geladenen Polyaminosäure komplett inhibiert werden konnten. Hierbei werden also über  $\beta 1$ -Integrine von T-Lymphozyten nach Interaktion mit verschiedenen EZM-Proteinen dieselben Signale vermittelt, obwohl jeweils andere  $\alpha$ -Ketten involviert sind ( $\alpha 6$  für Laminin und  $\alpha 2$  für Collagen Typ IV; Weismann et al, 1997). Das  $\alpha 6\beta 4$ -Integrin, das ebenfalls als Laminin-Rezeptor beschrieben wurde (De Luca et al, 1990; Lee et al, 1992), ist bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung sowie der Spreitung von T-Lymphozyten auf Laminin/Poly-L-Lysin, wie durch Versuche mit anti- $\beta 4$ -Integrin Antikörper gezeigt, ohne Bedeutung. Allerdings ist die Expression von  $\alpha 6\beta 4$ -Integrinen in Jurkat T-Lymphozyten ohnehin sehr gering (Vivinus-Nebot, 1999).

Die Kombination der EZM-Proteine der basalen Lamina mit einer positiv geladenen Polyaminosäure verstärkt das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal der Zellen verglichen mit dem von Zellen auf EZM-Protein allein. Dies könnte verschiedene Gründe haben. So bilden die EZM-Proteine eine dreidimensionale Struktur aus. Sowohl Laminin als auch Collagen Typ IV bilden dabei Netzwerke aus, die in der basalen Lamina nebeneinander existieren und nur über Nidogen (Entactin) miteinander verknüpft sind (Yurchenco, 1990; Yurchenco, 1994). Die Struktur dieser Netze kann dabei durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, insbesondere auch durch die Interaktion von Laminin mit seinem Rezeptor (Colognato et al, 1999). Die Kombination der EZM-Proteine mit einer positiv geladenen Polyaminosäure könnte also die Struktur eines solchen Netzes, das sich ebenfalls *in vitro* ausbildet, insofern beeinflussen, daß eine für die Interaktion zwischen Integrin und EZM-Protein günstigere Struktur unterstützt wird. Dieses könnte ein ladungsabhängiger Prozeß sein, da neutrale oder negativ geladene Polyaminosäuren in Kombination mit dem jeweiligen EZM-Protein weder zu einer Verstärkung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals noch zu einer Spreitung der Zellen nach ihrer Adhäsion an die Beschichtung führten.

Ebenso könnte eine positiv geladene Polyaminosäure zu einer Stabilisierung einer bestimmten Struktur der  $\beta 1$ -Kette der Integrine führen und so ebenfalls die Interaktion der Integrine mit dem EZM-Protein begünstigen. Bekannt ist, daß Integrine häufig erst in einem aktivierten Zustand sein müssen, um Signale in die Zelle weitergeben zu können (Giblin et al, 1997; Luque et al, 1996; Mobley et al, 1994; Rodriguez-Fernandez et al, 1999; Hershkovic et al, 1995). Dies geht vermutlich mit einer Strukturänderung der Integrine einher. Es ist also gut vorstellbar, daß durch die positiv geladenen Polyaminosäuren die „aktivierte“ Form der Integrine begünstigt wird und somit die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale verstärkt werden. Denkbar ist auch ein Zusammenspiel einer Strukturänderung des EZM-Proteins und der Integrine.

Ferner könnte es ebenso zu einer Verstärkung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals kommen, da die Adhäsion der Zellen auf einer Beschichtung aus EZM-Protein und positiv geladener Polyaminosäure wesentlich stärker ist als auf EZM-Protein allein, so daß die Interaktion zwischen Integrin und EZM-Protein stabilisiert wird oder einfach länger andauert, da die Zelle sich nicht mehr bewegen kann. Ebenfalls häufig diskutiert wird ein Zusammenspiel zwischen der Interaktion von Integrinen mit EZM-Proteinen und einer Anhäufung von Integrinen (clustering von Integrinen). Die Besetzung der Integrine mit einem Liganden führt bereits zu einem Signal,

aber erst die Anhäufung von Integrinen an bestimmten Stellen der Zellmembran führt zu dem kompletten Signal (Miyamoto et al, 1995). In Übereinstimmung mit Weismann et al (1997) wurde gezeigt, daß der Kontakt der Zellen mit EZM-Protein allein durch die „Besetzung“ des Integrins zu einer leicht erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt. Die Kombination von EZM-Protein und einer positiv geladenen Polyaminosäure führt dann aber zu der Anhäufung von Integrinen (Clustering) und damit zu der Übermittlung des ganzen Signals, in diesem Falle zu einem wesentlich verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal und zu einer Spreitung der Zellen.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Einbeziehung des Integrin assoziierten Proteins (IAP). Dieses Protein ist mit Integrinen assoziiert und wird als möglicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal zumindest in Endothelzellen diskutiert (Schwartz et al, 1993), durch den ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom erfolgen kann. Weismann hat bereits zwei Antikörper gegen IAP (B6H12 und 2D3) eingesetzt und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in T-Lymphozyten nach Interaktion mit Fibronectin und Laminin untersucht (mündliche Mitteilung). Die unterschiedlichen Antikörper führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. So konnte der bei Neutrophilen inhibierend wirkende anti-IAP Antikörper B6H12 (Schwartz et al, 1993) auch bei Jurkat T-Lymphozyten die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung nach Kontakt mit Fibronectin oder Laminin inhibieren. Der zweite anti-IAP Antikörper 2D3 aber, der bei Neutrophilen nicht inhibierend wirkt (Schwartz et al, 1993), hemmte in Jurkat T-Lymphozyten ebenfalls die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung nach Kontakt mit Fibronectin oder Laminin. Ob IAP in T-Lymphozyten nach Interaktion mit EZM-Proteinen eine Rolle spielt, ist also weiterhin unklar. Allerdings konnten Ticchioni et al (1997) bei peripheren T-Zellen trotz hoher Expression von IAP keine funktionelle Assoziation von Integrinen und IAP beobachten. Sollte es dennoch bei Jurkat T-Lymphozyten eine Rolle spielen, so wäre denkbar, daß die Interaktion von Integrin und IAP durch die Kombination von EZM-Protein mit einer positiv geladenen Polyaminosäure gefördert wird, vielleicht wiederum durch die oben besprochenen möglichen Strukturänderungen, und so zu dem verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal führt. Der Effekt der Spreitung der Zellen läßt sich hiermit allerdings nicht erklären, zumal diese unabhängig von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist.

### 5.2.3 Tyrosinphosphorylierung von Proteinen als Mechanismus für die Signaltransduktion

Vorinkubation von Jurkat T-Lymphozyten mit spezifischen Inhibitoren für Tyrosinkinase führte zu einer Inhibition sowohl der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung als auch der Spreitung der Zellen nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin. Genistein, ein Inhibitor für verschiedene Tyrosinkinase, sowie PP2, ein spezifischer Inhibitor für Tyrosinkinase der src-Familie, hemmten sowohl die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung wie auch die Spreitung der Zellen in gleichem Maße, während Daidzein, ein nicht wirksames Analogon des Genisteins, zu keiner Inhibition führte. Weismann zeigte bereits, daß Genistein auch zu einer Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in T-Lymphozyten nach Kontakt mit Laminin/BSA beschichteten Deckgläsern führte (mündliche Mitteilung). Eine Tyrosinphosphorylierung von Proteinen als Mechanismus für eine Signaltransduktion über  $\beta 1$ -Integrine scheint also sehr wahrscheinlich, insbesondere durch Kinasen der src-Familie. Daher wurde mittels Western Blot nach tyrosinphosphorylierten Proteinen in Jurkat T-Lymphozyten nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern gesucht. In Zellysaten wurden hierbei zwar tyrosinphosphorylierte Proteine unterschiedlicher Größe gefunden, es konnte aber keine Zunahme der Tyrosinphosphorylierung nach Kontakt der Zellen mit Laminin/Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern gefunden werden. Lediglich Stimulation der Zellen über den TZR/CD3-Komplex mit einem anti-CD3 Antikörper (OKT3) führte zu einer erhöhten Tyrosinphosphorylierung von Proteinen folgender Größe: 128 kDa, 70 kDa, 59 kDa und 30 kDa.

Da zwei spezifische Inhibitoren für Tyrosinkinase (Genistein und PP2) aber sowohl die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale wie auch die Spreitung hemmen konnten, und dazu ein nicht wirksames Analogon (Daidzein) zu keiner Hemmung der Signale führte, bleibt eine Tyrosinphosphorylierung dennoch sehr wahrscheinlich und der fehlende Nachweis mittels Western Blot scheint eher methodisch bedingt zu sein. So ist die Synchronisation des Startpunktes der Stimulation durch das Herabsinken der Zellen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit auf die beschichtete Petrischale nicht möglich. Handelt es sich bei der Tyrosinphosphorylierung der Proteine aber um eine transiente Phosphorylierung, so wären bei einem nicht synchronisierten Startpunkt der Stimulation möglicherweise zu wenig Zellen bereits bzw. noch aktiviert, um eine Änderung der Tyrosinphosphorylierung quantitativ nachweisen zu können. Außerdem könnte auch die Tyrosinphosphorylierung nur einiger Proteine von gleicher Größe nach Stimulation durch Laminin/Poly-L-Lysin bereits zur Signalgebung ausreichen, die im Western Blot nicht

nachzuweisen ist. Durch eine mögliche Translokation tyrosinphosphorylierter Proteine, könnten sich diese auch in dem nicht löslichen Rückstand der Zellysate befinden und wären somit nicht zugänglich für eine quantitative Analyse mittels Western Blot.

In der Literatur wurden bereits eine Reihe von Proteinen beschrieben, die nach Stimulation von  $\beta 1$ -Integrinen tyrosinphosphoryliert wurden. So werden die Prolinreiche Tyrosinkinase-2 (PYK-2) in humanen Killerzellen (Gismondi et al, 1997), p130cas in humanen B-Zellen (Manie et al, 1997) und Fibroblasten der Ratte (Vuori et al, 1995), p21ras in T-lymphoblastischen Zellen (Kapron-Bras et al, 1993), Tensin in Fibroblasten der Ratte (Bockholt et al, 1993), Paxillin in T-Zellen (Miron et al, 1997) und in Fibroblasten der Ratte (Burrige et al, 1992) sowie die fokale Adhäsionskinase (FAK) in humanen Killerzellen (Rabinowich et al, 1996) in Fibroblasten (Schlaepfer et al, 1994) und in T-Lymphozyten (Haller et al, 1997) nach Stimulation von  $\beta 1$ -Integrinen tyrosinphosphoryliert. Die Frage aber, welche Proteine in Jurkat T-Lymphozyten durch eine mögliche Tyrosinphosphorylierung über  $\beta 1$ -Integrine nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin stimuliert werden, konnte durch Western Blot Experimente im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die mögliche Tyrosinphosphorylierung der Phospholipase C wird unter 5.2.5 diskutiert.

Eine weitere Möglichkeit der Regulation wäre ebenfalls eine Dephosphorylierung von Proteinen durch Phosphatasen als Gegenspieler zu Tyrosinkinasen (Fischer et al, 1991; Sun et al, 1994; Stone et al, 1994; Hunter, 1995). Da aber Dephostatin als Inhibitor von Phosphatasen weder die  $Ca^{2+}$ -Signalgebung noch die Spreitung der Zellen hemmte, erscheint dieser Mechanismus als eher unwahrscheinlich.

#### **5.2.4 Mögliche sekundäre Botenstoffe für die $Ca^{2+}$ -Signalgebung**

Als sekundäre Botenstoffe für die  $Ca^{2+}$ -Signalgebung sind drei intrazelluläre Moleküle beschrieben:  $Ins(1,4,5)P_3$ , cADPR und NAADP. So fanden Streb et al (1983), daß  $Ins(1,4,5)P_3$   $Ca^{2+}$  aus den intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speichern freisetzt. Guse et al (1995 und 1999) charakterisierten die Rolle von cADPR in T-Lymphozyten. Berg et al (2000) gelang der Nachweis, daß NAADP ebenfalls in der  $Ca^{2+}$ -Signalgebung von T-Lymphozyten eine bedeutende Rolle spielt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Rolle von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  untersucht. Eine direkte Messung von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  war wie unter Diskussion der Methoden beschrieben nicht möglich. Daher wurde zunächst versucht,  $\text{PLC}\gamma 1$  durch den spezifischen Inhibitor U73122 zu hemmen. Eine Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  U73122 führte zu einer Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals nach Kontakt der T-Lymphozyten mit Laminin/Poly-L-Lysin, wobei der Unterschied gegen nicht inhibierte Zellen nach dem t-Test nach Student an der Grenze der Signifikanz bei  $P=0,90$  lag ( $P=0,89$ ). Dagegen zeigte das nicht wirksame Analogon U73343 in dieser Konzentration eindeutig ( $P=0,61$ ) keine Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals. Bei einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  scheint also die Hemmung von PLC durch das wirksame U73122 noch nicht vollständig, aber spezifisch zu sein. Eine höhere Konzentration von U73122 ( $2 \mu\text{M}$ ) führte zwar zu einer verstärkten und deutlich signifikanten ( $P>0,99$ ) Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung, aber in dieser Konzentration inhibierte, wenn auch in geringerem Maße, U73343 die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung ebenfalls signifikant ( $P>0,95$ ). Die Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung durch das unwirksame Analogon U73343 in der höheren Konzentration deutet somit auf einen unspezifischen Effekt des PLC-Inhibitors hin. So hemmt U73122 z. B. die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  (Hellberg et al, 1996) und L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Macrez-Lepêtre et al (1996). Da bei T-Lymphozyten L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle nicht vorhanden sind, ist es wahrscheinlich, daß U73122 neben PLC zumindest teilweise die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  hemmt. Das unwirksame Analogon U73343 inhibierte dagegen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  nicht (Hellberg et al, 1996), so daß hier weitere unspezifische Effekte des Inhibitors wahrscheinlich sind, die ebenso durch U73343 verursacht werden. Da die Inhibition der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung durch  $1 \mu\text{M}$  U73122, nicht aber durch  $1 \mu\text{M}$  U73343, schon vorhanden ist, ist diese Inhibition spezifisch. Daher ist es wahrscheinlich daß PLC an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung über  $\beta 1$ -Integrine in Jurkat T-Lymphozyten beteiligt ist. Dies ist in Übereinstimmung mit Ricard et al (1997b), die einen Anstieg von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  nach Stimulation über das  $\alpha 4\beta 1$ -Integrin in Jurkat T-Lymphozyten fanden.

Die Spreitung der Zellen wurde dagegen nur durch U73122 gehemmt, nicht aber durch U73343 (auch nicht in der höheren Konzentration, so daß der unspezifische Effekt des Inhibitors sich nicht auf die Spreitung auszuwirken scheint). Daher ist PLC also in die Spreitung der Zellen nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin involviert.

Desweiteren wurde versucht, eine mögliche Stimulation der PLC $\gamma$ 1 durch Phosphorylierung von Tyrosinresten über Western Blot nachzuweisen. PLC $\gamma$ 1 konnte durch Immunpräzipitation gut angereichert und im Western Blot detektiert werden. Allerdings war es nicht möglich eine Tyrosinphosphorylierung von PLC $\gamma$ 1 zu detektieren, auch nicht in Zellen, die über den TZR/CD3-Komplex stimuliert wurden. Hierfür ist aber bereits eine Tyrosinphosphorylierung von PLC $\gamma$ 1 beschrieben worden (Mustelin et al, 1990; Granja et al, 1991; Weiss et al, 1991). Allerdings lag die eingesetzte Zellzahl pro Experiment bei allen Veröffentlichungen höher als die, die in diesen Versuchen eingesetzt werden konnte. Eine direkte Messung der Enzymaktivität oder von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> waren weitere Nachweise zur Involvierung von PLC $\gamma$ 1 in T-Zellen (Mustelin et al, 1990; Granja et al, 1991; Weiss et al, 1991). Granja et al (1991) zeigten außerdem, daß das Maximum der Tyrosinphosphorylierung von PLC $\gamma$ 1 bereits 2 min nach Stimulation erreicht war und nach 10 min auf das 2-3-fache verglichen mit unstimulierten Zellen zurückging. Weiss et al (1991) stimulierten Jurkat T-Zellen sogar für nur 30 sec und wiesen dann bereits eine erhöhte Tyrosinphosphorylierung nach. Dies spricht für eine sehr schnelle Aktivierung von PLC $\gamma$ 1 nach Stimulation über den TZR/CD3-Komplex, die aber vergleichbar sein wird mit der Stimulation über  $\beta$ 1-Integrine, da die Ca<sup>2+</sup>-Signale in beiden Fällen vergleichbar schnell erfolgen. Da bei der Stimulation der Zellen durch Laminin/Poly-L-Lysin der Kontakt der Zellen mit der Beschichtung aber abgewartet werden muß und zudem nach 2 min noch gar nicht alle Zellen abgesunken, also stimuliert sind, ergeben sich hier experimentelle Schwierigkeiten, die den Nachweis einer Tyrosinphosphorylierung von PLC $\gamma$ 1 nicht ermöglichen. Dennoch erscheint eine Involvierung von PLC $\gamma$ 1 in die Integrin-vermittelte Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung recht wahrscheinlich. So wurde bereits eine Tyrosinphosphorylierung von PLC $\gamma$ 1 in humanen Neutrophilen nach Stimulation über  $\beta$ 2-Integrine (Hellberg et al, 1996) und in Azinuszellen des Pankreas nach Ligation von  $\beta$ 1-Integrinen (Wrenn et al 1996) gezeigt. Ebenso fanden Ricard et al (1997b) eine Zunahme von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> in Jurkat T-Lymphozyten nach Stimulation über das  $\alpha$ 4 $\beta$ 1-Integrin.

Um aufzuklären, welche Bedeutung cADPR in T-Lymphozyten nach Stimulation über  $\beta$ 1-Integrine hat, wurden die Zellen mit einem spezifischen membranpermeablen cADPR-Antagonisten, 7-Deaza-8-Br-cADPR inkubiert. Hierbei wurde die Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung, aber nicht die Spreitung der Zellen nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin inhibiert. Wie von Guse et al (1999) beschrieben, spielt cADPR hauptsächlich eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der



langanhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nach Stimulation von T-Lymphozyten über den TZR/CD3-Komplex. 7-Deaza-8-Br-cADPR inhibierte die Stimulation der T-Zellen über  $\beta 1$ -Integrine nach 25 min auf ca. 60 % und zeigt damit die gleiche Inhibition der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung wie nach Stimulation über den TZR/CD3-Komplex (Guse et al, 1999). Ferner verzögerte eine Antagonisierung des Effektes von cADPR die Geschwindigkeit, mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nach OKT3-Stimulation gebildet wurden (Guse et al, 1999). Dieses konnte für T-Lymphozyten auf Laminin/Poly-L-Lysin auch nach Synchronisation der Zellen auf einen einheitlichen Zeitpunkt der Stimulation nicht festgestellt werden, so daß cADPR in diesem Fall nur für die langanhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale von Bedeutung zu sein scheint.

Da sowohl der PLC-Inhibitor U73122 als auch der cADPR-Antagonist 7-Deaza-8-Br-cADPR zu einer Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals nach Stimulation mit Laminin/Poly-L-Lysin führten, wurden zur weiteren Aufklärung des Signalweges die Zellen mit beiden Inhibitoren inkubiert und auf mit Laminin/Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser überführt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in T-Lymphozyten durch Laminin/Poly-L-Lysin wurde aber überraschenderweise durch Inkubation mit beiden Inhibitoren nicht gehemmt, sondern nahm sogar noch geringfügig zu (auf ca. 120%). Da U73122 in DMSO gelöst werden mußte, wurde auch der Effekt von DMSO auf die Wirkung von 7-Deaza-8-Br-cADPR untersucht. 7-Deaza-8-Br-cADPR zeigte jedoch auch unter diesen Bedingungen die übliche Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals, so daß ein Effekt von DMSO auf den cADPR-Antagonisten ausgeschlossen werden muß. Eine eventuelle Reaktion der Inhibitoren miteinander ist ebenfalls recht unwahrscheinlich, da die Inkubation der Zellen bei Raumtemperatur erfolgte. Der Einsatz von Xestospongin, einem membranpermeanten Inhibitor des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptors, anstelle des PLC-Inhibitors U73122 erwies sich in Versuchen mit Stimulation von T-Lymphozyten über den TZR/CD3-Komplex als sehr unzuverlässig und war stark abhängig von der bezogenen Charge (Berg, mündliche Mitteilung), da es sich um einen aufgereinigten Naturstoff handelt. Daher werden erst neue membranpermeante Agonisten oder Antagonisten die genauere Aufklärung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in T-Lymphozyten nach Stimulation mit Laminin/Poly-L-Lysin ermöglichen.

Neuere Untersuchungen zu dem erst kürzlich entdeckten NAADP in T-Lymphozyten wiesen ebenfalls eine Bedeutung dieses Botenstoffes in T-Lymphozyten für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung nach (Berg et al, 2000). So konnte durch Mikroinjektion von NAADP gezeigt werden, daß es schon in nanomolaren Konzentrationen in der Lage ist,  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale zu generieren. In höheren Konzentrationen zeigt NAADP eine Autoinaktivierung, so daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung inhibiert wird (Lee et al, 1997; Genazzani et al, 1996). Nach Mikroinjektion von NAADP in dieser selbst-inaktivierenden Konzentration und anschließender Stimulation der Zellen über den TZR/CD3-Komplex konnte das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal gehemmt werden (Berg et al, 2000). Da Mikroinjektionen für die hier durchzuführenden Versuche nicht möglich waren (sie müßten vor dem Kontakt der Zellen mit Laminin/Poly-L-Lysin erfolgen), kann die Frage, ob NAADP auch nach Stimulation durch Laminin/Poly-L-Lysin von Bedeutung ist, ebenfalls erst durch zukünftige membranpermeable Agonisten bzw. Antagonisten für NAADP geklärt werden.

### 5.2.5 Bedeutung von Proteinkinase C

Die PKC-Inhibitoren GF109203x sowie Calphostin C hemmten die Spreitung der T-Lymphozyten auf Laminin/Poly-L-Lysin, während GF109203x keine Auswirkung auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung der Zellen hatte. Für Calphostin C konnte dagegen keine Aussage zur Inhibition der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung getroffen werden. Hier wurde nach Inkubation der Zellen nur in 50 % der Experimente eine Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung gefunden. Dies mag an der nötigen Voraktivierung von Calphostin C durch UV-Licht liegen (Bruns et al, 1991), die möglicherweise nicht immer vollständig war. Dagegen spricht, daß die Spreitung der Zellen in allen Experimenten gehemmt werden konnte. Allerdings könnten auch verschiedene Subtypen von PKC an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung und der Spreitung beteiligt sein, die unterschiedliche  $\text{IC}_{50}$ -Werte für eine Inhibition aufweisen könnten.

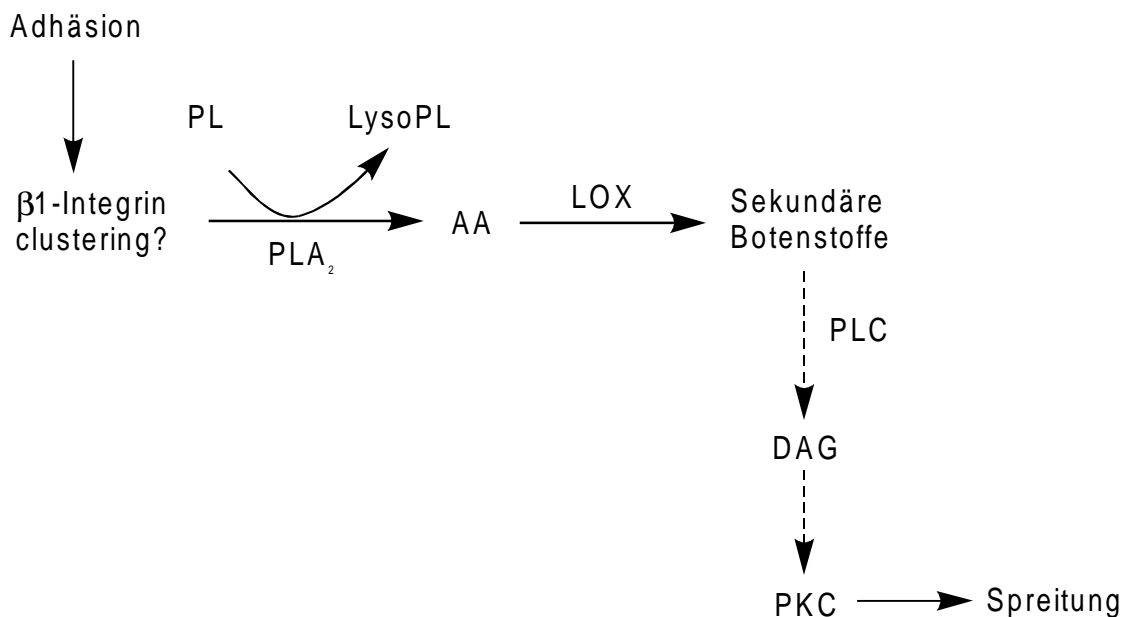
PKC scheint also wie für andere Zelltypen bereits beschrieben auch bei Jurkat T-Lymphozyten in die Spreitung involviert zu sein. So fanden Vuori et al (1993), daß in CHO-Zellen eine Aktivierung von PKC mit Phorbolestern zu einer erhöhten Spreitung der Zellen auf Fibronectin sowie zu einer erhöhten Adhäsion und Migration der Zellen führte, während Calphostin C diese Effekte inhibierte. Ebenso führte eine Stimulation von PKC in Dickdarm-Karzinomzellen zu einer Spreitung und Migration der Zellen auf diversen EZM-Proteinen (Rigot et al, 1998). In  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen führte eine Aktivierung von PKC zu einer Adhäsion an Laminin und Fibronectin, während die Inhibition der PKC die Adhäsion verhinderte (Miron et al, 1992). Hierbei wurde ebenfalls beschrieben, daß eine geringere Expression von PKC in T-Zellen zu

einer Verhinderung der Adhäsion an Laminin und Fibronectin führte. PKC könnte bei diesen Prozessen über einen Rezeptor für aktivierte PKC (Rack-1) an die  $\beta$ -Untereinheit der Integrine assoziiert sein. In humanen Fibroblasten der Niere wurde dies für die  $\beta$ 1-Integrine, in einer humanen lymphoiden Zelllinie (JY) für  $\beta$ 2-Integrine durch Kopräzipitation von Lilienthal et al (1998) gezeigt. PKC scheint desweiteren eine wichtige Rolle bei der Lokalisation von Proteinen des Cytoskeletts sowie der Bildung von fokaler Adhäsion zu spielen (Lewis et al, 1996; Woods et al, 1992). Das Cytoskelett ist ebenfalls für die Spreitung von Jurkat T-Lymphozyten auf Laminin/Poly-L-Lysin von Bedeutung, wie durch eigene Inhibitionsversuche mit Cytochalasin D gezeigt werden konnte. PKC könnte also in T-Lymphozyten nach Stimulation durch Laminin/Poly-L-Lysin direkt eine Wirkung auf die  $\beta$ 1-Integrine haben sowie auf die Umgestaltung des Cytoskeletts (evtl. durch Ausbildung fokaler Adhäsion). Welche(r) Subtyp(en) der PKC hierbei von Bedeutung sind, kann derzeit noch nicht beantwortet werden. Für Endothelzellen ist aber kürzlich eine Kolokalisation von PKC $\alpha$  mit  $\beta$ 1-Integrinen durch Kopräzipitation und Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) gezeigt worden (Ng et al, 1999).

In Bezug auf die Rolle der PKC bei der Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung in T-Lymphozyten, konnte keine Inhibition des Ca<sup>2+</sup>-Signals durch Vorinkubation mit GF109203x erzielt werden. Haverstick et al (1997) beschrieben, daß in Jurkat T-Lymphozyten eine Aktivierung von PKC durch Phorbol ester zu einer Hemmung der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus den intrazellulären Speichern sowie zu einer Hemmung des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms nach Stimulation über den T-Zellrezeptor führte. Dieser Mechanismus scheint bei der Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung über  $\beta$ 1-Integrine nicht so zu sein, da PKC, wie durch die Versuche zur Spreitung der Zellen gezeigt, durchaus aktiviert zu werden scheint, aber keine Inhibition des Ca<sup>2+</sup>-Signals zu beobachten ist, sondern im Gegenteil ein verstärktes Ca<sup>2+</sup>-Signal in T-Lymphozyten auf Laminin/Poly-L-Lysin vorhanden ist. In diesem Fall könnte es aber auch sein, daß ein anderer Subtyp der PKC aktiviert wird. Haverstick et al (1997) fanden nämlich PKC $\beta$ I als verantwortlichen Subtyp, während es nicht ausgeschlossen ist, daß über  $\beta$ 1-Integrine ein oder mehrere andere Subtyp(en) der PKC aktiviert werden.

### 5.2.6 Bedeutung von Phospholipase A<sub>2</sub>

Zwei Inhibitoren der PLA<sub>2</sub>, BPB und OBAA, konnten die Spreitung von T-Lymphozyten nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin hemmen, hatten aber keinen Effekt auf die Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung der Zellen. PLA<sub>2</sub> setzt durch Hydrolyse von Phospholipiden Arachidonsäure frei. Zugabe von Arachidonsäure nach Inhibition von PLA<sub>2</sub> konnte die Inhibition der Spreitung zumindest teilweise wieder aufheben. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Daten, die aus Versuchen mit HeLa-Zellen gewonnen wurden, die auf einem Collagensubstrat adhärten (Auer et al, 1995; Chun et al, 1993). Danach postulieren Auer und Jacobson (1995) sowie Chun und Jacobson (1993) eine Aktivierung von PLA<sub>2</sub> über eine Anhäufung von  $\beta$ 1-Integrinen (clustering), die zu einer Freisetzung von Arachidonsäure führt. Lipoxygenase (LOX) oxidiert dann wiederum Arachidonsäure zu weiteren Botenstoffen, die letztendlich PKC aktivieren, eventuell unter Einbeziehung von PLC und DAG (Abb. 5.2.1).



**Abb. 5.2.1: Modell der Jacobson-Gruppe zur Stimulierung von HeLa-Zellen auf einem Gelatin-Substrat**

Adhäsion von HeLa-Zellen an ein Gelatin-Substrat führt über  $\beta$ 1-Integrine zu einer Aktivierung von PLA<sub>2</sub>. Dabei werden Phospholipide (PL) zu Lysophospholipiden (LysoPL) und Arachidonsäure (AA) umgesetzt. Arachidonsäure wird dann von Lipoxygenase (LOX) zu weiteren Metabolit(en) oxidiert, die wiederum PLC aktivieren, so daß Diacylglycerol (DAG) entsteht. PKC wird dann von DAG aktiviert und führt zu einer Spreitung der Zellen. (nach: Auer et al, 1995)

Dieselbe Gruppe untersuchte später die Rolle von PKC in dem Prozeß der Spreitung der Zellen (Chun et al, 1997) und zeigte, daß Calphostin C auch in HeLa Zellen die Spreitung auf einem Gelatinsubstrat inhibiert. PKC ist hierbei wichtig für die Umgestaltung des Cytoskeletts, so daß es zu einer Spreitung der Zellen kommen kann, und reguliert auch das Vorhandensein von exocytotischen  $\beta 1$ -Integrinen an der Zelloberfläche, um die Spreitung der Zellen zu verstärken (Abb. 5.2.1).

Ob eine Stimulation von T-Lymphozyten durch Laminin/Poly-L-Lysin über  $\beta 1$ -Integrine ebenfalls zunächst  $PLA_2$  aktiviert und dann über weitere Metaboliten zu einer Aktivierung von PKC führt, kann durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche nicht vollständig geklärt werden. Allerdings erscheint die Aktivierung von PLC in Folge einer Aktivierung von  $PLA_2$  bei Jurkat T-Lymphozyten sehr unwahrscheinlich, da eine Hemmung von  $PLA_2$  die  $Ca^{2+}$ -Signalgebung, die zumindest teilweise über PLC verläuft, nicht inhibieren konnte.

### **5.2.7 $Ca^{2+}$ -Signalgebung in T-Lymphozyten nach Stimulation durch Laminin/Poly-L-lysin**

Wie entstehen nun die  $Ca^{2+}$ -Signale in T-Lymphozyten nach Stimulation über  $\beta 1$ -Integrine durch Laminin/Poly-L-Lysin? Sicher ist, daß die  $Ca^{2+}$ -Signale ausschließlich über die  $\beta 1$ -Integrine vermittelt werden, da sie komplett durch Inkubation der Zellen mit einem anti- $\beta 1$  Integrin Antikörper inhibiert werden können. Bei der Entstehung der  $Ca^{2+}$ -Signale gilt auch in diesem Fall das Modell des kapazitiven  $Ca^{2+}$ -Einstroms (Putney et al, 1986). Die Komplexierung von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  führt lediglich zu einem transienten  $Ca^{2+}$ -Signal in den Zellen nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin. Dies ist die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus den intrazellulären Speichern, denn werden die intrazellulären Speicher bereits vor Kontakt der Zellen mit Laminin/Poly-L-Lysin durch Thapsigargin entleert, so ist kein  $Ca^{2+}$ -Signal mehr zu beobachten. Wird nach Chelatisierung von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  und Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus den intrazellulären Speichern  $Ca^{2+}$  wieder extrazellulär zugesetzt, so kommt es zu einem Einstrom des extrazellulären  $Ca^{2+}$ . Diese Versuche sind also in Übereinstimmung mit dem Modell des kapazitiven  $Ca^{2+}$ -Einstroms (Putney et al, 1986), demnach es nach Stimulation der Zelle zu einer Entleerung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher kommt, die dann wiederum zu einem Einstrom von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  führt. Als Botenstoffe für die Freisetzung aus den intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speichern des endoplasmatischen Reticulums kommen hierbei neben  $Ins(1,4,5)P_3$  auch cADPR und NAADP in Frage.

Bei der Stimulation der T-Lymphozyten durch Laminin/Poly-L-Lysin scheint  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  sehr wahrscheinlich an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung beteiligt zu sein (s. Kap. 5.2.4) und cADPR ist für die langanhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale mitverantwortlich. Daten zu NAADP, das erst kürzlich als  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzender Botenstoff in T-Lymphozyten beschrieben wurde (Berg et al, 2000), liegen dagegen noch nicht vor, so daß durchaus ein Zusammenspiel von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , cADPR und NAADP möglich erscheint. Wie es nach der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den intrazellulären Speichern zu einem Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  kommt, ist bis heute nicht eindeutig geklärt (s. Einleitung).

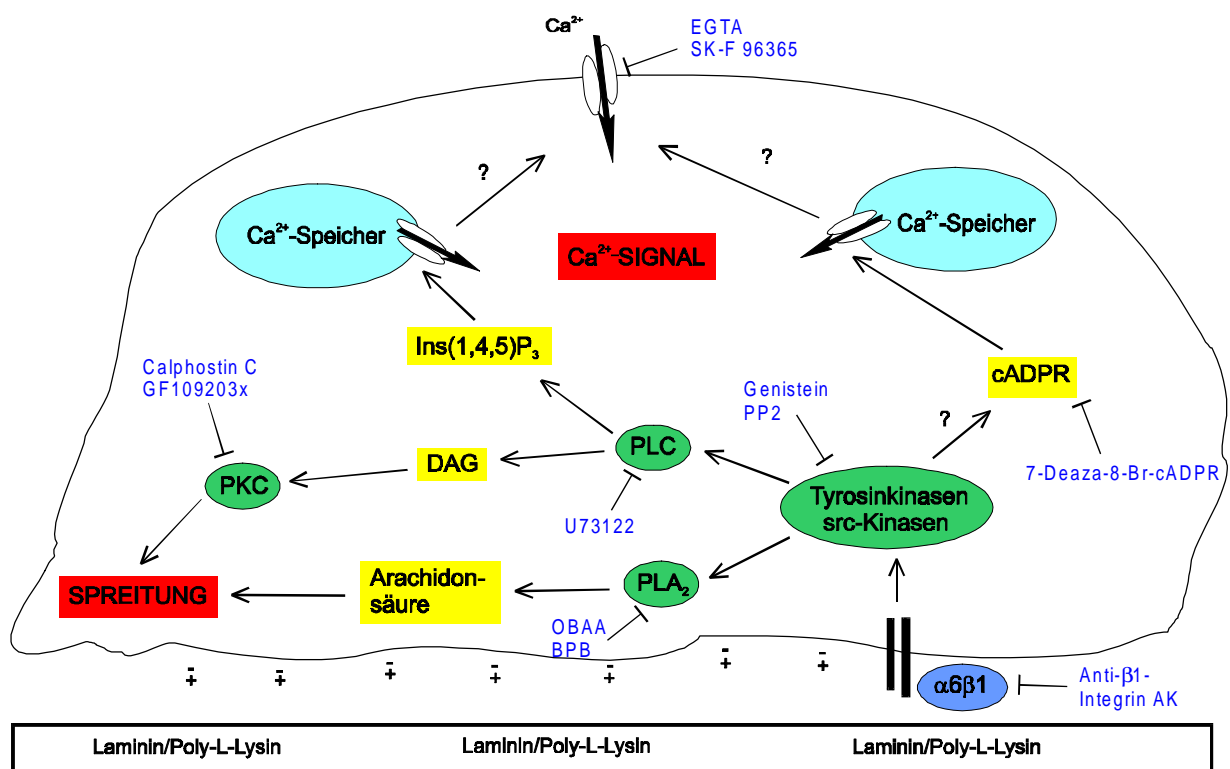
Zu den für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom verantwortlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen wurden in dieser Arbeit Versuche mit verschiedenen Inhibitoren für  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle durchgeführt, um ein pharmakologisches Profil des/der involvierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals/Kanäle zu erstellen. Hierbei zeigte lediglich SK-F 96365 eine Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms, während Verapamil und Nitrendipin, beides Inhibitoren der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, zu keiner Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms führten. Diese Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede zu den Daten von de Wit (1996), die die Wirkung verschiedener Inhibitoren für  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle nach Stimulation über den TZR/CD3-Komplex mit OKT3 in Jurkat T-Lymphozyten untersuchte. Verapamil inhibierte den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom demnach weder nach Stimulation mit OKT3 noch nach Stimulation über  $\beta 1$ -Integrine. Nitrendipin zeigte dagegen eine gute Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms nach Stimulation mit OKT3, war aber wirkungslos nach Stimulation durch Laminin/Poly-L-Lysin. SK-F 96365 inhibierte sowohl den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach Stimulation mit OKT3 als auch nach Stimulation mit Laminin/Poly-L-Lysin, allerdings gab es Unterschiede im Wirkungsprofil des Inhibitors. So hemmte SK-F 96365 das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nach Stimulation über  $\beta 1$ -Integrine in 10-fach geringerer Konzentration verglichen mit der Hemmung nach OKT3-Stimulation.

Auf Grund dieser Unterschiede erscheint ein unterschiedlicher Mechanismus in Abhängigkeit der Stimulation der T-Lymphozyten wahrscheinlich. Nach der Stimulation über den TZR/CD3-Komplex kommt es zur Freisetzung von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  und damit zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern über den  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptor (Berridge et al, 1989). Desweiteren zeigten Guse et al (1999), daß cADPR nach OKT3-Stimulation über den Ryanodin-Rezeptor ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern freisetzt. Durch welche Kanäle dann allerdings der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle erfolgt, ist bis heute nicht geklärt. So können durchaus verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle für den Einstrom verantwortlich sein. In diesem Fall könnte nach Stimulation durch Laminin/Poly-L-Lysin nur der SK-F 96365-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal

benutzt werden verglichen mit der OKT3-Stimulation, bei der auch ein oder mehrere  $Ca^{2+}$ -Kanal/Kanäle, die durch Econazol und Nitrendipin inhibiert werden können, einen Einstrom von  $Ca^{2+}$  ermöglichen. Dies wäre gleichzeitig ein Grund dafür, daß SK-F 96365 den  $Ca^{2+}$ -Einstrom nach Stimulation über Laminin/Poly-L-Lysin in viel niedrigeren Konzentrationen hemmt, da hier dann der  $Ca^{2+}$ -Einstrom über die anderen  $Ca^{2+}$ -Kanäle entfallen würde. Allerdings tritt der agonistische Effekt von SK-F 96365 nach Stimulation über die  $\beta 1$ -Integrine schon bei deutlich niedrigeren Konzentrationen auf als nach OKT3-Stimulation, so daß der  $Ca^{2+}$ -Einstrom je nach Stimulation auch durch komplett unterschiedliche  $Ca^{2+}$ -Kanäle erfolgen könnte.

### 5.2.8 Modellvorstellung zu divergenten Signaltransduktionswegen

Auf Grund der dargestellten Ergebnisse und der bisherigen Diskussion wurde folgendes Modell zur Stimulation von Jurkat T-Lymphozyten nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin entwickelt (Abb. 5.2.2).



**Abb. 5.2.2: Modell zur Laminin-vermittelten Signaltransduktion in Jurkat T-Lymphozyten**

Dargestellt sind die Signaltransduktionswege nach Stimulation von T-Lymphozyten über  $\alpha 6 \beta 1$ -Integrine, die zur  $Ca^{2+}$ -Signalgebung und zur Spreitung der Zellen führen (Erläuterungen siehe Text). In blauer Schrift sind dabei die jeweiligen spezifischen Inhibitoren angegeben.

Danach werden die Signale über  $\alpha 6\beta 1$ -Integrine nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin in die Zelle weitergeleitet. Hierbei verstärkt die positiv geladene Polyaminosäure, wahrscheinlich durch strukturelle Veränderung der Integrine und / oder des Laminins sowie durch eine verstärkte Adhäsion die Signalgebung in die Zelle verglichen mit Laminin allein. In der Zelle werden dann zunächst Tyrosinkinasen aktiviert, wobei hier die Aktivierung von Tyrosinkinasen der src-Familie sehr wahrscheinlich ist. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung erfolgt dann wahrscheinlich durch Aktivierung von PLC über  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  durch eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären, Thapsigargin-sensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern und über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch cADPR über den Ryanodin-Rezeptor. Dadurch kommt es zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, die durch SK-F 96365 inhibiert werden können. Es ist dabei nicht ausgeschlossen, daß sowohl an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung als auch an dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom weitere Botenstoffe beteiligt sind. Ebenso ist das Zusammenspiel der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  und cADPR noch nicht geklärt, nur daß cADPR bei der Aufrechterhaltung des langanhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals von Bedeutung ist.

Die Spreitung der T-Lymphozyten nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin wird ebenfalls durch  $\beta 1$ -Integrine aktiviert, auf die eine Stimulation von Tyrosinkinasen erfolgt. Ob es sich dabei um dieselben Tyrosinkinase(n) handelt, die auch bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung involviert sind, ist noch nicht geklärt. Dennoch scheinen auch hier Tyrosinkinasen der src-Familie beteiligt zu sein. Die Aktivierung der Tyrosinkinasen führt dann zur Aktivierung von PLC und  $\text{PLA}_2$ . PLC setzt DAG frei, welches wiederum mit  $\text{Ca}^{2+}$  PKC stimuliert und letztendlich unter Einbeziehung des Cytoskeletts zur Spreitung der Zellen führt. Durch die Aktivierung von  $\text{PLA}_2$  wird dagegen Arachidonsäure freigesetzt, was wiederum zu einer Stimulation von PKC führt und damit auch zu einer Spreitung der Zellen. Möglich wäre auch, daß von dem durch PLC freigesetzten DAG ebenso Arachidonsäure abgespalten wird, welches wiederum zu einer Aktivierung von PKC führen könnte. Da die Spreitung der T-Lymphozyten unabhängig von einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ist, scheint die transiente  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus den  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern schon für eine Aktivierung von PKC auszureichen oder es sind  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Subtypen von PKC involviert.



Es soll darauf hingewiesen werden, daß dieses nicht unbedingt direkte Schritte sein müssen, sondern daß durchaus noch mehrere Metaboliten an der Signaltransduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung (z. B. NAADP) wie auch der Spreitung der Zellen beteiligt sein können. Ebenso bleibt noch die Frage, ob bei beiden Signaltransduktionswegen die gleichen Subtypen der Enzyme involviert sind. Dieses wird jedoch erst durch noch spezifischere Inhibitoren bzw. Antikörper oder molekularbiologisch zu klären sein.

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Signaltransduktion in T-Lymphozyten nach Interaktion mit Laminin und Collagen Typ IV, zwei Proteinen der Basalmembran untersucht. Weismann et al (1997) zeigten bereits, daß Proteine der extrazellulären Matrix (EZM)  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Jurkat T-Lymphozyten stimulieren. Beteiligte Rezeptoren sind hierbei das  $\alpha 6 \beta 1$ -Integrin für Laminin und das  $\alpha 2 \beta 1$ -Integrin für Collagen Typ IV. Aufbauend auf dieser Arbeit sollten die intrazellulären Mechanismen der Integrin-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale untersucht werden.

Die Bestimmung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in T-Lymphozyten erfolgte an einem Imaging-System. Dazu wurden Zellen mit FURA 2-AM, einem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluorophor beladen, auf mit EZM-Protein beschichtete Deckgläser gegeben und durch digitales ratiometrisches  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging auf der Einzelzellebene untersucht. Hierfür ist eine gute Adhäsion der Zellen an die Deckgläser notwendig, damit sie im Fokus bzw. in dem Bildausschnitt der digitalen Kamera des Imaging-Gerätes bleiben. Da T-Zellen keine feste Adhäsion an Laminin noch an Collagen Typ IV zeigten, wurde eine Beschichtung der Deckgläser mit EZM-Protein in Kombination mit Poly-L-Lysin gewählt. Poly-L-Lysin allein ist nicht in der Lage, T-Lymphozyten zu stimulieren. In Kombination mit Laminin bzw. Collagen Typ IV führte es allerdings 1. zu einer sehr starken Adhäsion der Zellen, 2. zu einer stark erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verglichen mit Zellen auf EZM-Protein allein, und 3. zu einer Spreitung der Zellen.

Die starke Adhäsion der T-Lymphozyten auf EZM-Protein/Poly-L-Lysin beruht auf einer Ladungswechselwirkung zwischen der negativ geladenen Zellmembran und der positiv geladenen Polyamino-säure, da andere positiv geladene Polyamino-säuren wie Poly-D-Lysin oder Poly-L-Arginin kombiniert mit EZM-Protein zu einer vergleichbar starken Adhäsion der Zellen und ebenso zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung und Spreitung der Zellen führten. Dagegen war die Adhäsion bei neutralen (Poly-D,L-Serin) oder negativ geladenen Polyamino-säuren (Poly-L-Glutaminsäure) in Kombination mit Laminin oder Collagen Typ IV geringer und führte auch nicht zu vergleichbar hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen noch zu einer Spreitung der Zellen.

Mit Hilfe spezifischer Anti-Integrin-Antikörper wurde gezeigt, daß sowohl die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung wie auch die Spreitung der T-Lymphozyten nach Kontakt mit Laminin/Poly-L-Lysin ausschließlich über  $\beta 1$ -Integrine verläuft. Desweiteren war die Spreitung der Zellen  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig, welches bereits divergente Signaltransduktionswege vermuten ließ, die mit Hilfe spezifischer Inhibitoren untersucht wurden. Dabei zeigte sich, daß Tyrosinkinase,

insbesondere Kinasen der src-Familie, sowie Phospholipase C sowohl in die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung als auch in die Spreitung der Zellen involviert waren, während Phospholipase  $\text{A}_2$  und Proteinkinase C nur an der Spreitung nicht aber an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung der Zellen beteiligt waren.

Versuche mit einem membranpermeablen Antagonisten der cyklischen ADP Ribose (cADPR), 7-Deaza-8-Br-cADPR, führten zu einer Inhibition des langanhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals. Dadurch wurde erstmals cADPR als sekundärer Botenstoff bei der Integrin-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung nachgewiesen.

Die weitere Untersuchung der Integrin-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in T-Lymphozyten zeigte, daß es zunächst zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern kam, die sensitiv für Thapsigargin, einem Inhibitor der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des endoplasmatischen Reticulums, waren. Nachfolgend kam es zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, der durch SK-F 96365, einem Inhibitor der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, gehemmt wurde. Die pharmakologische Charakterisierung dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zeigte Unterschiede zu den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, die für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach Stimulation über den T-Zellrezeptor (TZR)/CD3-Komplex verantwortlich sind. So hemmte SK-F 96365 den Integrin-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom schon in einer 10-fach geringeren Konzentration verglichen mit dem über den TZR/CD3-Komplex stimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Nitrendipin, ein Inhibitor spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, hemmte im Gegensatz zur Stimulation über den TZR/CD3-Komplex den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nicht, während Verapamil, ein weiterer Inhibitor spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, in beiden Fällen wirkungslos war. Diese unterschiedlichen pharmakologischen Profile für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zeigen, daß nach unterschiedlicher Stimulation der T-Lymphozyten verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom verantwortlich zu sein scheinen.

## 7. Literatur

- Adams, D. H., L. Harvath, d. P. Bottaro, R. Interrante, G. Catalano, Y. Tanaka, A. Strain, S. G. Hubscher und S. Shaw (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7144-7148: Hepatocyte growth factor and macrophage inflammatory protein 1 $\beta$ : Structurally distinct cytokines that induce rapid cytoskeletal changes and subset-preferential migration in T cells
- Ager, A. (1994) *Trends Cell Biol.* **4**, 326-333: Lymphocyte recirculation and homing: roles of adhesion molecules and chemoattractants
- Albelda, S. M., C. W. Smith und P. A. Ward (1994) *FASEB J.* **8**, 504-512: Adhesion molecules and inflammatory injury
- Altieri, D. C., S. J. Starnes und C. G. Gahmberg (1992) *Biochem. J.* **288**, 465-473: Regulated Ca<sup>2+</sup> signaling through leukocyte CD11b/CD18 integrin
- Argraves, W. S., S. Suzuki, H. Arai, K. Thompson, M. D. Pierschbacher und E. Ruoslahti (1987) *J. Cell Biol.* **105**, 1183-1190: Amino acid sequence of the human fibronectin receptor
- Ariel, A., E. J. Yavin, R. Hershkoviz, A. Avron, S. Franitza, I. Hardan, L. Cahalon, M. Fridkin und O. Lider (1998) *J. Immunol.* **161**, 2465-2472: IL-2 induces T cell adherence to extracellular matrix: inhibition of adherence and migration by IL-2 peptides generated by leukocyte elastase
- Ariel, A., R. Hershkoviz, L. Cahalon, D. E. Williams, S. T. Akiyama, K. M. Yamada, C. Chen, R. Alon, T. Lapidot und O. Lider (1997) *Eur. J. Immunol.* **27**, 2562-2570: Induction of T cell adhesion to extracellular matrix or endothelial cell ligands by soluble or matrix-bound interleukin-7
- Auer, K. L. und B. S. Jacobson (1995) *Mol. Biol. Cell* **6**, 1305-1313:  $\beta$ 1 integrins signal lipid second messengers required during cell adhesion
- Aumailley, M., H. Wiedemann, K. Mann und R. Timpl (1989) *Eur. J. Biochem.* **184**, 241-248: Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV
- Aumailley, M., R. Timpl und A. Sonnenberg (1990) *Exp. Cell Res.* **188**, 55-60: Antibody to integrin alpha 6 subunit specifically inhibits cell-binding to laminin fragment 8
- Bak, J., P. White, G. Timar, L. Missiaen, A. A. Genazzi und A. Galione (1999) *Curr. Opin. Biol.* **9**, 751-754: Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate triggers Ca<sup>2+</sup>-release from brain microsomes

- Berg, I., B. V. L. Potter, G. W. Mayr und A. H. Guse (2000) *J. Cell Biol.* **150**, 581-588: Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP<sup>+</sup>) is an essential regulator of T-lymphocyte Ca<sup>2+</sup>-signalling
- Berridge, M. J. (1993) *Nature* **361**, 315-325: Inositol-trisphosphate and calcium signalling
- Berridge, M. J. und R. F. Irvine (1989) *Nature* **341**, 197-205: Inositol phosphates and cell signalling
- Berry, N. und Y. Nishizuka (1990) *Eur. J. Biochem.* **189**, 204-214: Protein kinase C and T cell activation
- Bockholt, S. M. und K. Burrridge (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 14565-14567: Cell spreading on extracellular matrix proteins induces tyrosine phosphorylation of tensin
- Brown, E. (1997) *Sem. Hematol.* **34**, 319-326: Neutrophil adhesion and the therapy of inflammation
- Brown, E. J. (1997) *Trends Cell Biol.* **7**, 289-295: Adhesive interactions in the immune system
- Bruns, R. F., F. D. Miller, R. L. Merriman, J. J. Howbert, W. F. Heath, E. Kobayashi, I. Takahashi, T. Tamaoki und H. Nakano (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**, 288-293: Inhibition of protein kinase C by calphostin C is light-dependent
- Burgeson, R. E., M. Chiquet, R. Deutzmann, P. Ekblom, J. Engel, H. Kleinman, G. R. Martin, G. Meneguzzi, M. Paulsson und J. Sanes (1994) *Matrix Biol.* 209-211: A new nomenclature for the laminins
- Burrridge, K., C. E. Turner und L. H. Romer (1992) *J. Cell Biol.* **119**, 893-903: Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125<sup>FAK</sup> accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly
- Butcher, E. C. (1991) *Cell* **67**, 1033-1036: Leukocyte-endothelial cell recognition: Three (or more) steps to specificity and diversity
- Cai, J.-P., S. Hudson, M.-W. Ye und Y.-H. Chin (1996) *Cell. Immunol.* **167**, 269-275: The intracellular signaling pathways involved in MCP-1-stimulated T cell migration across microvascular endothelium
- Cancela, J. M., G. C. Churchill und A. Galione (1999) *Nature* **398**, 74-76: Coordination of agonist-induced Ca<sup>2+</sup>-signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells
- Chun, J., K. A. Auer und B. S. Jacobson (1997) *J. Cell. Physiol.* **17**, 361-370: Arachidonate initiated protein kinase C activation regulated HeLa cell spreading on a gelatin substrate by inducing F-actin formation and exocytotic upregulation of  $\beta$ 1-integrin

- Clark, E. A. und J. S. Brugge (1995) *Science* **268**, 233-239: Integrins and signaltransduction pathways: the road taken
- Clementi, E., G. Martino, L. M. E. Grimaldi, E. Brambilla und J. Meldolesi (1994) *Eur. J. Immunol.* **24**, 1365-1371: Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -stores of T lymphocytes: changes induced by *in vitro* and *in vivo* activation
- Colognato, H., D. A. Winkelmann und P. Yurchenco (1999) *J. Cell Biol.* **145**, 619-631: Laminin polymerization induces a receptor-cytoskeleton network
- Coppolino, M. G. und S. Dedhar (1999) *Biochem. J.* **340**, 41-50: Ligand-specific, transient interaction between integrins and calreticulin during cell adhesion to extracellular matrix proteins is dependent upon phosphorylation/dephosphorylation events
- Coppolino, M. G., M. J. Woodside, N. Demaurex, S. Grinstein, R. St-Arnaud und S. Dedhar (1997) *Nature* **386**, 843-847: Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion
- da Silva, C. P., B. V. L. Potter, G. W. Mayr und A. H. Guse (1998) *J. Chromatogr. B* **707**, 43-50: Quantification of intracellular levels of cyclic ADP-ribose by high performance liquid chromatography
- Danker, K., B. Gabriel, C. Heidrich und W. Reutter (1998) *Exp. Cell Res.* **239**, 326-331: Focal adhesion kinase pp125<sup>FAK</sup> and the  $\beta$ 1-integrin subunit are constitutively complexed in HaCaTcells
- De Luca, M., R. N. Tamura, C. Kajiji, S. Bondanza, P. Rossino, R. Cancedda, P. C. Marchisio und V. Quaranta (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6888-6892: Polarized integrin mediates human keratinocyte adhesion to basal lamina
- de Wit, Christina (1996) Diplomarbeit, Universität Hamburg: Regulation intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in T-Lymphozyten: Die Wirkung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten
- Dedhar, S. und G. E. Hannigan (1996) *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 657-669: Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling
- Del Pozo, M. A., P. Sanchez-Mateos, M. Nieto und F. Sanchez-Madrid (1995) *J. Cell Biol.* **131**, 495-508: Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway
- Donnadieu, E., G. Bismuth und A. Trautmann (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 25864-25872: Calcium fluxes in T lymphocytes

- Emmrich, F. (1988) *Immunol Today* **9**, 296-305: Cross-linking of CD4 and CD8 with the T cell receptor complex formation and T cell receptor selection
- Fabiato, A. (1991) in: Mc Cormack, J. G. und P. H. Cobbold, Cellular calcium - a practical approach, IRL press at Oxford university press, Oxford, New York, 159-175: Ca<sup>2+</sup>-buffering: computer programs and simulations
- Feldmann, M. und D. Male (1991) in: Roitt, I. M., J. Brostoff und D. K. Male, Kurzes Lehrbuch der Immunologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 90-101: Zellkooperation bei der Antikörperantwort
- Finkel, T. H., R. T. Kubo und J. C. Cambier (1991) *Immunol Today* **12**, 79-85: T cell development and transmembrane signaling: changing biological responses through an unchanging receptor
- Fischer, E. H., H. Charbonneau und N. K. Tonks (1991) *Science* **253**, 401406: Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes
- Friedl, P., F. Entschladen, C. Conrad, B. Niggemann und K. S. Zänker (1998) *Eur. J. Immunol.* **28**, 2331-2343: CD4<sup>+</sup> T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize  $\beta$ 1-integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion
- Galione, A., H. C. Lee und W. B. Busa (1991) *Science* **253**, 1143-1146: Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup>-release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose
- Genazzani, A. A., T. M. Empson, und A. Galione (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 11599-11602: Unique inactivation properties of NAADP-sensitive Ca<sup>2+</sup>-release
- Giblin, P. A., S. T. Hwang, T. R. Katsumoto und S. D. Rosen (1997) *J. Immunol.* **159**, 3498-3507: Ligation of L-selectin on T lymphocytes activates  $\beta$ 1 integrins and promotes adhesion to fibronectin
- Gismondi, A., L. Bisogno, F. Mainiero, G. Palmieri, M. Piccoli, L. Frati und A. Santoni (1997) *J. Immunol.* **159**, 4729-4736: Proline-rich tyrosine kinase-2 activation by  $\beta$ 1 integrin fibronectin receptor cross-linking and association with paxillin in human natural killer cells
- Graeff, R. M., L. Franco, A. de Flora und H. C. Lee (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 118-125: Cyclic GMP-dependent and -independent effects on the synthesis of the calcium messengers cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate
- Graeff, R. M., R. J. Podein, R. Aarhus und H. C. Lee (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **206**, 786-791: Magnesium ions but not ATP inhibit cyclic ADP-ribose-induced calcium release

- Graf, J., Y. Iwamoto, M. Sasaki, G. R. Martin, H. K. Kleinman, F. A. Robey und Y. Yamada (1987) *Cell* **48**, 989-999: Identification of an amino acid sequence in laminin mediating cell attachment, chemotaxis and receptor binding
- Granja, C., L. Lin, E. J. Yunis, V. Relias und J. D. Dasgupta (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 16277-16280: PLC $\gamma$ 1, a possible mediator of T cell receptor function
- Guse, A. H., C. P. da Silva, F. Emmrich, G. A. Ashamu, B. V. L. Potter und G. W. Mayr (1995) *J. Immunol.* **155**, 3353-3359: Characterization of cyclic adenosine diphosphate-ribose-induced Ca<sup>2+</sup>-release in T- lymphocyte cell lines
- Guse, A. H., C. P. da Silva, I. Berg, A. L. Skapenko, K. Weber, P. Heyer, M. Hohenegger, G. A. Ashamu, H. Schulze-Koops, B. V. L. Potter und G. W. Mayr (1999) *Nature* **398**, 70-73: Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose
- Guse, A. H., E. Roth und F. Emmrich (1993) *Biochem. J.* **291**, 447-451: Intracellular Ca<sup>2+</sup>-pools in Jurkat T lymphocytes
- Guse, A. H., I. Berg, C. P. da Silva, B. V. L. Potter und G. W. Mayr (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 8546-8550: Ca<sup>2+</sup>-entry induced by cyclic ADP-ribose in intact T-lymphocytes
- Haller, H., U. Kunzendorf, K. Sacherer, C. Lindschau, G. Walz, A. Distler und F. C. Luft (1997) *J. Immunol.* **148**, 1061-1067: T cell adhesion to P-selectin induces tyrosine phosphorylation of pp125 focal adhesion kinase and other substrates
- Hanke, J. H., J. P. Gardner, R. L. Dow, P. S. Changelian, W. H. Brissette, E. J. Weringer, B. A. Pollok und P. A. Connelly (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 695-701: Discovery of a novel, potent, and src family-selective tyrosine kinase inhibitor
- Harnick, D. J., T. Jayaraman, Y. Ma, P. Mulieri, L. O. Go und A. R. Marks (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 2833-2840: The human type 1 inositol-1,4,5-trisphosphate receptor from T-lymphocytes
- Haverstick, D. M., M. Dicus, M. S. Resnick, J. J. Sando und L. S. Gray (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 15426-15433: A role for protein kinase C $\beta$ 1 in the regulation of Ca<sup>2+</sup>-entry in Jurkat T cells
- Hedin, K. E., M. W. Appleby und D. E. Clapham (1995) *Immunol.* **84**, 183-192: Developmental regulation of TCR-CD3-dependent Ca<sup>2+</sup> responses of individual normal and pp59<sup>fyn</sup>-deficient T-lymphocytes



- Hellberg, C., L. Molony, L. Zheng und T. Andersson (1996) *Biochem. J.* **317**, 403-407: Ca<sup>2+</sup> signalling mechanisms of the  $\beta$ 2-integrin on neutrophils: involvement of phospholipase C $\gamma$ 2 and Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>
- Hemler, M. E. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 578-585: Integrin associated proteins
- Hershkoviz, R., I. Goldkorn und O. Lider (1995) *Immunol.* **85**, 125-130: Tumour necrosis factor- $\alpha$  interacts with laminin and functions as a pro-adhesive cytokine
- Hershkoviz, R., L. Cahalon, S. Miron, R. Alon, T. Sapir, St. D, Akiyama, K. M. Yamada und O. Lider (1994) *J. Immunol.* **153**, 554-565: TNF- $\alpha$  associated with fibronectin enhances phorbol myristate acetate-or antigen-mediated integrin-dependent adhesion of CD4<sup>+</sup> T cells via protein tyrosine phosphorylation
- Hoth, M. und R. Penner (1992) *Nature* **355**, 353-356: Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells
- Hunter, T (1995) *Cell* **80**, 225-: Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling
- Hynes, R. O. (1987) *Cell* **48**, 549-554: Integrins: a family of cell surface receptors
- Imoto, M., H. Takeya, T. Sawa, C. Hayashi, M. Hamada, T. Takeuchi und K Umezawa (1993) *J. Antibiot.* **46**, 1342-1346: Dephostatin, a novel protein tyrosine phosphatase inhibitor produced by streptomyces
- Iwamoto, Y., F. A. Robey, J. Graf, M. Sasaki, H. K. Kleinman, Y. Yamada und G. R. Martin (1987) *Science* **238**, 1132-1134: YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation
- Janeway Jr, C. A. (1992) *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 645-674: The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation
- Janeway, C. A. und P. Travers (1995) *Immunologie*, 1. Auflage, Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag
- Jayaraman, T., E. Ondriasova, K. Ondrias, D. J. Harnick und A. R. Marks (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6007-6011: The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for T-cell receptor signaling
- Jayaraman, T., K. Ondrias, E. Ondriasova und A. R. Marks (1996) *Science* **272**, 1492-1494: Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by tyrosine phosphorylation
- Johnson, R. P. und S. W. Craig (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, 159-164: The carboxy-terminal tail domain of vinculin contains a cryptic binding site for acidic phospholipids

- Kamata, T., W. Puzon und Y. Takada (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 9659-9663: Identification of putative ligand binding sites within I domain of integrin alpha 2 beta 1 (VLA-2, CD49b/CD29)
- Kapron-Bras, C., L. Fitz-Gibbon, P. Jeevaratnam, J. Wilkins und S. Dedhar (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 20701-20704: Stimulation of tyrosine phosphorylation and accumulation of GTP-bound p21<sup>ras</sup> upon antibody-mediated  $\alpha 2 \beta 1$  integrin activation in T-lymphoblastic cells
- Khan, A. A., J. P. Steiner und S. H. Snyder (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2849-2853: Plasma membrane inositol 1,4,5-trisphosphate receptor of lymphocytes: selective enrichment in sialic acid and unique binding specificity
- Kiselyov, K., X. Xu, G. Mozhayeva, T. Kuo, I. Pessah, B. Mignery, X. Zhu, L. Birnbaumer und S. Muallem (1998) *Nature* **396**, 478-482: Functional interaction of InsP<sub>3</sub> receptors and store-operated Htrp3 channels
- Leavesley, D. I., M. A. Schwartz, M. Rosenfeld und D. A. Cheresh (1993) *J. Cell Biol.* **121**, 163-170: Integrin  $\beta 1$ - and  $\beta 3$ -mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signaling mechanisms
- Lee, E. C., M. M. Lotz, G. D. Steele, Jr. und A. M. Mercurio (1992) *J. Cell. Biol.* **117**, 671-678: The integrin  $\alpha 6 \beta 4$  is a laminin receptor
- Lee, H. C. und R. Aarhus (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 2152-2157: A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositoltrisphosphate and cyclic ADP-ribose
- Lee, H. C., R. Aarhus und T. F. Walseth (1993) *Science* **261**, 352-355: Calcium mobilization by dual receptors during fertilization of sea urchin eggs
- Lee, H. C., T. F. Walseth, G. T. Bratt, R. N. Hayes und D. L. Clapper (1989) *J. Biol. Chem.* **25**, 1608-1615: Structural determination of a cyclic metabolite of NAD<sup>+</sup> with intracellular Ca<sup>2+</sup>-mobilizing activity
- Lee, J. O., L. A. Bankston, M. A. Arnaout und R. C. Liddington (1995) *Structure* **3**, 1333-1340: Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pattern for activation
- Lee, J. O., P. Rieu, M. A. Arnaout und R. Liddington (1995) *Cell* **80**, 631-638: Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18)
- Lewis, J. M., D. A. Cheresh und M. A. Schwartz (1996) *J. Cell Biol.* **134**, 1323-1332: Protein kinase C regulates  $\alpha v \beta 5$ -dependent cytoskeletal association and focal adhesion kinase phosphorylation
- Lilienthal, J und D. D. Chang (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 2379-2383: Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin  $\beta$  subunit

- Liote, F., B. Boval-Boizard, D. Weill, D. Kuntz und J. L. Wautier (1996) *Clin. Exp. Immunol.* **106**, 13-19: Blood monocyte activation in rheumatoid arthritis: increased monocyte adhesiveness, integrin expression and cytokine release
- Lloyd, A. R., J. J. Oppenheim, D. H. Kelvin und D. D. Taub (1996) *J. Immunol.* **156**, 932-938: Chemokines regulate T cell adherence to recombinant adhesion molecules and extracellular matrix proteins
- Low, M. G. und K. S. Huang (1991) *Biochem. J.* **279**, 483-493: Factors affecting the ability of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D to degrade the membrane anchors of cell surface proteins
- Luque, A., M. Gómez, W. Puzon, Y. Takada, F. Sánchez-Madrid und C. Cabañas (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 11067-11075: Activated conformations of very late activation integrins detected by a group of antibodies (HUTS) specific for a novel regulatory region (355-425) of the common  $\beta 1$  chain
- Lydyard, P. und C. Grossi (1991) in: Roitt, I. M., J. Brostoff und D. K. Male, Kurzes Lehrbuch der Immunologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 11-30: Zellen der Immunantwort
- Macrez-Lepêtre. M., J. Morel und J. Mironneau (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**, 30-34: Effects of phospholipase C inhibitors on  $\text{Ca}^{2+}$ -channel stimulation and  $\text{Ca}^{2+}$ -release from intracellular stores evoked by  $\alpha_{1A}$ - and  $\alpha_{2A}$ -adrenoreceptors in rat portal vein myocytes
- Male, D. und I. Roitt, (1991) in: Roitt, I. M., J. Brostoff und D. K. Male, Kurzes Lehrbuch der Immunologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1-10: Erworbene (adaptive) und angeborene Immunität
- Manié, S. N., A. Astier, N. Haghayeghi, T. Canty, B. J. Druker, H. Hirai und A. S. Freedman (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 15636-15641: Regulation of integrin-mediated p130<sup>Cas</sup> tyrosine phosphorylation in human B cells
- Mason, M. J., M. P. Mahaut-Smith und S. Grinstein (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10872-10879: The role of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in the regulation of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  permeability of unstimulated rat lymphocytes
- McEver, R. P. (1994) *Curr. Opin. Immunol.* **6**, 75-84: Selectins
- Miron, S., R. Herschkoviz, I. Tirosh, Y. Shechter, A. Yayun und O. Lider (1992) *Cell Immunol.* **144**, 182-189: Involvement of a protein kinase C and protein phosphatases in adhesion of  $\text{CD4}^+$  T cells to and detachment from extracellular matrix proteins

- Miron, S., S. G. Kachalsky, R. Hershkovich und O. Lider (1997) *J. Leukoc. Biol.* **62**, 405-413: Pervanadate-induced adhesion of CD4<sup>+</sup> T cell to fibronectin is associated with tyrosine phosphorylation of paxillin
- Miyamoto, S., S. K. Akiyama und K. M. Yamada (1995) *Science* **267**, 883-885: Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function
- Mobley, J. L., E. Ennis und Y. Shimizu (1994) *Blood* **83**, 1983-1050: Differential activation-dependent regulation of integrin function in cultured human T-leukemic cell lines
- Mustelin, T., K. M. Coggeshall, N. Isakov und A. Altman (1990) *Science* **247**, 1584-1587: T cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C requires tyrosine phosphorylation
- Ng, T., D. Shima, A. Squire, P. I. H. Bastiaens, S. Gschmeissner, M. J. Humphries und P. J. Parker (1999) *EMBO J.* **18**, 3909-3923: PKC $\alpha$  regulates  $\beta$ 1 integrin dependent cell motility through association and control of integrin traffic
- Nieto, M., M. A. del Pozo und F. Sanchez-Madrid (1996) *Eur. J. Immunol.* **26**, 1302-1307: Interleukin-15 induces adhesion receptor redistribution in T lymphocytes
- Otey, C. A., G. B. Vasquez, K. BurrIDGE und B. W. Erickson (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 21193-21197: Mapping of the alpha-actinin binding site within the beta 1 integrin cytoplasmic domain
- Parsons, J. T., M. D. Schaller, J. Hildebrand, T. H. Leu, A. Richardson und C. Otey (1994) *J. Cell Sci. Suppl.* **18**, 109-113: Focal adhesion kinase: structure and signalling
- Prasad, G. S., D. E. McRee, E. A. Stura, D. G. Levitt, H. C. Lee und C. D. Stout (1996) *Nat. Struct. Biol.* **3**, 957-964: Crystal structure of Aplysia ADP ribosyl cyclase, a homologue of the bifunctional ectozyme CD38
- Premack, B. A., T. V. McDonald und P. Gardner (1994) *J. Immunol.* **152**, 5226-5240: Activation of Ca<sup>2+</sup>-current in Jurkat T cells following the depletion of Ca<sup>2+</sup>-stores by microsomal Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitors
- Putney, J. W. (1986) *Cell Calcium* **7**, 1-12: A model for receptor-regulated calcium entry
- Rabinowich, H. M. Manciuola, T. B. Herbermann und T. L. Whiteside (1996) *J. Immunol.* **157**, 3860-3868:  $\beta$ 1-integrin-mediated activation of focal adhesion kinase and its association with fyn and zap-70 in human NK cells
- Randriamampita, C. und R. Y. Tsien (1993) *Nature* **364**, 809-814: Emptying of intracellular Ca<sup>2+</sup>-stores releases a novel small messenger that stimulates Ca<sup>2+</sup>-influx

- Ricard, I., J. Martel, L. Dupuis und M. D. Payet (1997a) *Cell Signal* **9**, 197-206: A caffeine/ryanodine sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -pool is involved in triggering spontaneous variations of  $\text{Ca}^{2+}$  in Jurkat T lymphocytes by a  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release (CICR) mechanism
- Ricard, I., M. D. Payet und G. Dupuis (1997b) *Eur. J. Immunol.* **27**, 1530-1538: Clustering the adhesion molecules VLA-4 (CD49d/CD29) in Jurkat T cells or VCAM-1 (CD106) in endothelial (ECV 304) cells activates the phosphoinositide pathway and triggers  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilization
- Rigot, V., M. Lehmann, F. André, N. Daemi, J. Marvaldi und J. Luis (1998) *J. Cell Science* **111**, 3119-3127: Integrin ligation and PKC activation are required for migration of colon carcinoma cells
- Rodriguez-Fernández, J. L., M. Gómez, A. Luque, N. Hogg, F. Sánchez-Madrid und C. Cabañas (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**, 1891-1907: The interaction of activated integrin lymphocyte function-associated antigen 1 with ligand intercellular adhesion molecule 1 induces activation and redistribution of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 in T lymphocytes
- Rudd, C. E. (1990) *Immunol. Today* **11**, 400-406: CD4, CD8 and the TCR-CD3 complex a novel class of protein-tyrosine kinase receptor
- Schaller, M. D. und J. T. Parsons (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 705-710: Focal adhesion kinase and associated proteins
- Schlaepfer, D. D., S. K. Hanks, T. Hunter und P. van der Geer (1994) *Nature* **372**, 786-791: Integrin-mediated signal transduction linked to ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase
- Schöttelndreier, H., G. W. Mayr und A. H. Guse (1999) *Cell Signal.* **11**, 611-619:  $\beta$ 1-integrins mediate  $\text{Ca}^{2+}$ -signalling and T cell spreading via divergent pathways
- Schwartz, M. A. und K. Denninghoff (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 11133-11137:  $\alpha$ v integrins mediate the rise in intracellular calcium in endothelial cells on fibronectin even though they play a minor role in adhesion
- Schwartz, M. A., E. J. Brown und B. Fazeli (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 19931-19934: A 50 kDa integrin-associated protein is required for integrin-regulated calcium entry in endothelial cells
- Sethi, J. K., R. M. Empson, V. C. Bailey, B. V. L. Potter und A. Galione (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 16358-16363: 7-Deaza-8-bromo-cyclic ADP ribose, the first membrane permeable, hydrolysis resistant cyclic ADP ribose antagonist

- Shimizu, Y. und S. Shaw (1991) *FASEB J.* **5**, 2292-2299: Lymphocyte interactions with extracellular matrix
- Springer, T. A. (1994) *Cell* **76**, 301-314: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm
- States, D. J., T. F. Walseth und H. C. Lee (1992) *Trends Biochem. Sci.* **17**, 495-: Similarities in amino acid sequences of *Aplysia* ADP-ribosyl cyclase and human lymphocyte antigen CD38
- Stone, R. und J. E. Dixon (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 31323-31326: Protein-tyrosine phosphatases
- Streb, H., R. F. Irvine, M. J. Berridge und I. Schulz (1983) *Nature* **306**, 67-69: Release of  $\text{Ca}^{2+}$  from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate
- Strynadka, N. C. und M. N. James (1989) *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 951-998: Crystal structures of the helix-loop-helix calcium binding proteins
- Sun, H. und N. K. Tonks (1994) *TIBS* **19**, 480-485: The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling
- Takazawa, K., M. Lemos, A. Delvaux, C. Lejeune, J. E. Dumont und C. Erneux (1990) *Biochem. J.* **268**, 213-217: Rat brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase.  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity, purification and antibody production
- Tanaka, Y., D. H. Adams, S. Hubscher, H. Hirano, U. Siebenlist und S. Shaw (1993) *Nature* **361**, 79-82: T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 $\beta$
- Thomas, A. P. und F. Delaville (1991) in: Mc Cormack, J. G. und P. H. Cobbold, Cellular Calcium - A practical approach, Oxford, New York, Tokyo, IRL press, 1-54: The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells
- Thomas, T. und M. Dziadek (1993) *Placenta* **14**, 701-713: Differential expression of laminin, nidogen and collagen IV genes in the midgestation mouse placenta
- Ticchioni, M., M. Deckert, F. Mary, G. Bernard, E. J. Brown und A. Bernard (1997) *J. Immunol.* **158**, 677-684: Integrin-associated protein (CD47) is a comitogenic molecule on CD3-activated human T cells
- Timpl, R., H. Wiedemann, V. van Delden, H. Furthmayr und K. Kuhn (1981) *Eur. J. Biochem.* **120**, 203-211: A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes

- Timpl, R., S. Johansson, V. van Delden, I. Oberbaumer und M. Hook (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 8922-8927: Characterization of protease-resistant fragments of laminin mediating attachment and spreading of rat hepatocytes
- Tuckwell, D. S., A. Brass und M. J. Humphries (1992) *Biochem. J.* **285**, 325-331: Homology modelling of integrin EF-hands. Evidence for widespread use of a conserved cation-binding site
- Vaday, G. G. und O. Lider (2000) *J. Leukoc. Biol.* **67**, 149-157: Extracellular matrix moieties, cytokines and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation
- Varki, A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7390-7397: Selectin ligands
- Verjans, B., C. Moreau und C. Erneux (1994) *Mol. Cell. Endocrinol.* **98**, 167-171: The control of intracellular signal molecules at the level of their hydrolysis: the example of inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase
- Vivinus-Nebot, M., M. Ticchioni, F. Mary, P. Hofman, V. Quaranta, P. Rousselle und A. Bernard (1999) *J. Cell Biol.* **144**, 563-574: Laminin 5 in the human thymus: control of T cell proliferation via  $\alpha 6\beta 4$  integrins
- von der Mark, H., J. Durr, A. Sonnenberg, K. von der Mark, R. Deutzmann und S. L. Goodman (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 23593-23601: Skeletal myoblasts utilize a novel beta 1-series integrin and not alpha 6 beta 1 for binding to the E8 and T8 fragments of laminin
- Vuori, C. und E. Ruoslahti (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 21459-21462: Activation of protein kinase C precedes  $\alpha 5\beta 1$  integrin-mediated cell spreading on fibronectin
- Vuori, K. und E. Ruoslahti (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 22259-22262: Tyrosine phosphorylation of p130<sup>Cas</sup> and cortactin accompanies integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix
- Vyas, N. K., M. N. Vyas und F. A. Quiocho (1987) *Nature* **327**, 635-638: A novel calcium binding site in the galactose-binding protein of bacterial transport and chemotaxis
- Wange, R. L. und L. E. Samelsen (1996) *Immunity* **5**, 197-205: Complex complexes: Signalling at the TCR
- Weismann, M., A. H. Guse, L. Sorokin, B. Bröker, M. Frieser, R. Hallmann und G. W. Mayr (1997) *J. Immunol.* **158**, 1618-1627: Integrin-mediated intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -signaling in Jurkat T-lymphocytes
- Weiss, A. (1991) *Annu. Rev. Genet.* **25**, 487-510: Molecular and genetic insights into T cell receptor structure and function

- Weiss, A., G. Koretzky, R. C. Schatzman und T. Kadlecsek (1991) *Proc. Nat. Acad. Sci.* **88**, 5484-5488: Functional activation of the T cell antigen receptor induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C- $\gamma$ 1
- Woods, A. und J. R. Couchman (1992) *J. Cell Science* **101**, 277-290: Protein kinase C involvement in focal adhesion formation
- Wrenn, R. W., T. L. Creazzo und L. E. Herman (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**, 876-882:  $\beta$ 1 integrin ligation stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C $\gamma$ 1 and elevates intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in pancreatic acinar cells
- Yurchenco, P. D. und J. C. Schittny (1990) *FASEB J.* **4**, 1577-1590: Molecular architecture of basement membranes
- Yurchenco, P. D. und J. J. O'Rear (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 674-681: Basal lamina assembly
- Zweifach, A. und R. S. Lewis (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6295-6299: Mitogen-regulated  $\text{Ca}^{2+}$  current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -stores



## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. G. Gercken danke ich für die stets hilfsbereite Unterstützung dieser Arbeit sowie für die bereitwillige Übernahme des ersten Gutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Guse für die Überlassung des Themas sowie für die engagierte Unterstützung und sehr gute Zusammenarbeit bei der Anfertigung dieser Arbeit. Die interessanten Diskussionen, kritischen Anregungen und zahlreichen Ideen waren stets sehr konstruktiv.

Desweiteren danke ich Frau Dr. Ingeborg Berg für die geduldige und sehr hilfsbereite Einführung in das  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-System sowie für die äußerst gute Zusammenarbeit, die anregenden Diskussionen und das sehr nette Arbeitsklima.

Frau Karin Weber danke ich für die sehr nette Zusammenarbeit sowie für die ideenreiche Hilfe bei der Herstellung der Zellysate und der praktischen Durchführung der Western Blots.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. B. V. L. Potter von der University of Bath, England für die Bereitstellung des cADPR-Antagonisten.

Bei Herrn Thomas Klokow und Thorsten Kaiser bedanke ich mich besonders für die bereitwillige Hilfe bei diversen Problemen mit der Software, und Herrn Andreas Bauche danke ich für seine spontane und unkomplizierte Hilfe bei der praktischen Durchführung dieser Arbeit.

Bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises, insbesondere bei Cristina da Silva, Nadine Schwarzmann und Katrin Schweitzer, bedanke ich mich ganz besonders für die ausgesprochen hilfsbereite und nette Unterstützung, die vielen aufmunternden Worte und anregenden Diskussionen und nicht zuletzt für das motivierende und sehr angenehme Arbeitsklima.

## Lebenslauf

Name Hella Anne Dorothea Schöttelndreier  
Geburtsdatum 24. August 1969  
Geburtsort Johannesburg, Südafrika  
Nationalität Deutsch

### Schulbildung

Aug. 1976 - Juli 1980 Grundschule Troisdorf-Sieglar  
Aug. 1980 - Mai 1989 Gymnasium Troisdorf-Sieglar

### Auslandsaufenthalt

Sep. 1989 - Juni 1990 Au-Pair Aufenthalt in Paris/Frankreich

### Chemiestudium

Okt. 1990 - Sep. 1993 Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn  
Sep. 1993 Vordiplom  
Okt. 1993 - Jan. 1997 Universität Hannover mit Studienschwerpunkt in Biochemie

### Diplomarbeit

Juli 1996 - Jan. 1997 Institut für Toxikologie an der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. H. Wellhöner

### Doktorarbeit

seit Feb. 1997 Universität Hamburg, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Abt. für Zelluläre Signaltransduktion unter der Leitung von Prof. Dr. A. H. Guse

### Berufstätigkeit

Feb. 1997 - April 2000 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Ich erkläre ebenso, daß ich mich zu keiner Zeit an anderer Stelle um einen Doktorgrad beworben habe.

Hamburg, 30. Januar 2001