

## 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.