

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) 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 Ca^{2+} -Signale untersucht werden.

Die Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in T-Lymphozyten erfolgte an einem Imaging-System. Dazu wurden Zellen mit FURA 2-AM, einem Ca^{2+} -sensitiven Fluorophor beladen, auf mit EZM-Protein beschichtete Deckgläser gegeben und durch digitales ratiometrisches 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 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 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 Ca^{2+} -Signalen noch zu einer Spreitung der Zellen.

Mit Hilfe spezifischer Anti-Integrin-Antikörper wurde gezeigt, daß sowohl die 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 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 Ca^{2+} -Signalgebung als auch in die Spreitung der Zellen involviert waren, während Phospholipase A_2 und Proteinkinase C nur an der Spreitung nicht aber an der 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 Ca^{2+} -Signals. Dadurch wurde erstmals cADPR als sekundärer Botenstoff bei der Integrin-vermittelten Ca^{2+} -Signalgebung nachgewiesen.

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