

Aus dem
Institut für Biochemie und Molekularbiologie I
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

NAADP, CD38 und Ca^{2+} -Signalling: Komplexes Wechselspiel bei der Aktivierung von T-Lymphozyten

zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Chemie
an der Universität Hamburg



vorgelegt von

Sören Bruhn

aus Heide / Schleswig-Holstein

2008

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Die Inhalte von verwendeten Quellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Hamburg, den

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom 01.08.2005 bis zum 31.07.2008 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. AH Guse am Zentrum für Experimentelle Medizin , Institut für Biochemie und Molekularbiologie I: Zelluläre Signaltransduktion, Universität Hamburg, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, durchgeführt.

1. Gutachter:

Prof. Dr. Wolfgang W. Deppert, Universität Hamburg, Heinrich-Pette-Institut,
Abteilung Tumorstudiologie

2. Gutachter:

Prof. Dr. Andreas H. Guse, Universität Hamburg, Institut für Medizinische Biochemie
und Molekularbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Datum der Disputation: 18. Juli 2008

	Inhaltsverzeichnis	1
	Abkürzungen	5
1	Einleitung	7
1.1	Funktionen des nativen und des adaptiven Immunsystems	7
1.2	Oberflächenrezeptoren und Antigenerkennung	8
1.3	Das Ca ²⁺ -Signalsystem von T-Lymphozyten	9
1.4	Das InsP ₃ -abhängige Ca ²⁺ -Signalsystem	11
1.5	Der Ca ²⁺ -freisetzende Botenstoff cADPR	13
1.6	Die Entdeckung des Ca ²⁺ -mobilisierenden Botenstoffes NAADP	14
1.7	Funktion von NAADP im Ca ²⁺ -Signalsystem	15
1.8	Die Identität des NAADP-Rezeptors	16
1.9	NAADP und der Ca ²⁺ -Speicher	18
1.10	Der Metabolismus von NAADP	18
2	Problemstellung	22
3	Material und Methoden	23
3.1	Zellkultur	23
3.1.1	Jurkat T-Lymphozyten	23
3.1.2	Auftauen von Jurkat T-Lymphozyten	23
3.1.3	Einfrieren von Jurkat T-Lymphozyten	23
3.1.4	HeLa-Zellen	24
3.1.5	Auftauen von HeLa-Zellen	24
3.1.6	Einfrieren von HeLa-Zellen	24
3.1.7	Verwendete Geräte	24
3.1.8	Medien für Jurkat-Zellen	25
3.1.9	Medien für HeLa-Zellen	26
3.2	Molekularbiologische Arbeitsschritte	26
3.2.1	Erzeugung von transformationskompetenten <i>E.coli</i> / XL1-blue	26
3.2.2	Agarosegelelektrophorese	27
3.2.3	Auswahl der shRNA-Sequenzen zum CD38 Knock down	27
3.2.4	Auswahl der Sequenzen für die shRNA-Kontroll-Vektoren	27
3.2.5	Konstruktion der shRNA-Inserts	28
3.2.6	shRNA-Inserts für den CD38 knock down	28
3.2.7	shRNA-Inserts für die Kontroll-Klone	30
3.2.8	Annealing der shRNA-Fragmente	30
3.2.9	Ligation der shRNA-Inserts in den Vektor pSIREN RetroQ	31
3.2.10	<i>E.coli</i> -Transformation und Aufarbeitung von Plasmid-DNA	31
3.2.11	PCR-Amplifikation der shRNA-Fragmente	31
3.2.12	Restriktionsverdau des Amplikons si270 und des Vektors pDsRed2-C1	33
3.2.13	Ligation des Inserts si270 in den Vektor pDsRed2-C1	33

3.2.14	Amplifikation der shRNA-Fragmente si394, si771 und der scramble-Inserts	34
3.2.15	Ligation der shRNA-Inserts si394, si771 und der scramble-Inserts in den Vektor pDsRed2-C1	36
3.2.16	Isolation größerer Mengen an Plasmid-DNA	37
3.2.17	Transfektion von Jurkat T-Lymphozyten durch Elektroporation	37
3.2.18	Etablierung stabiler Zelllinien (Limiting Dilution)	38
3.2.19	Verwendete Geräte	38
3.2.20	Medien und Puffer	38
3.3	Proteinbiochemische Methoden	39
3.3.1	Präparation von Membranfraktionen durch Ultrazentrifugation	39
3.3.2	Western-Blot	40
3.3.3	Fluorimetrischer Assay zur Bestimmung der CD38-Aktivität	41
3.3.4	Verwendete Geräte	42
3.3.5	Puffer und Lösungen	42
3.4	Fluorimeter-Messung	45
3.4.1	Ratiometrische Bestimmung zytosolischer Calcium-Konzentrationen unter Verwendung des Calciumindikators Fura-2/AM	45
3.5	Quantifizierung endogener NAADP-Konzentrationen	45
3.5.1	Der enzymatische NAADP Cycling-Assay	45
3.5.2	Quantifizierung endogener NAADP-Konzentrationen im Überblick	46
3.5.3	Herstellung der Zell- und Gewebeextrakte	47
3.5.3.1	Aufarbeitung von Jurkat T-Lymphozyten	47
3.5.3.2	Aufarbeitung von HeLa-Zellen	47
3.5.3.3	Aufarbeitung von Geweben aus WT- und CD38 Knock out-Mäusen	48
3.5.4	Neutralisation der Zell- und Gewebeextrakte	48
3.5.5	Vorbereitung der Q-Sepharose-Säulen	48
3.5.6	Elution und Gefriertrocknung	49
3.5.7	Aufreinigung der NADase aus <i>Neurospora crassa</i>	49
3.5.8	Probenvorbereitung und NADase-Verdau	49
3.5.9	Erstellung der Eichgerade	50
3.5.10	Beladungsschema der Mikrotiterplatte	50
3.5.11	Einleitung der Basenaustauschreaktion	51
3.5.12	Die Enzymreinigung	51
3.5.13	Start der Zyklisierungsreaktion	52
3.5.14	NAADP-Detektion	52
3.5.15	Auswertung des NAADP-Assays	53
3.5.16	Verwendete Geräte	55
3.5.17	Puffer und Lösungen	55
4	Ergebnisse	57
4.1	Stimulation über den T-Zellrezeptor führt zu einem Anstieg der NAADP-Konzentration	57

4.1.1	Die NAADP-Erhöhung ist abhängig von der Stärke der Stimulation	59
4.1.2	Ein spezifischer Stimulus über den T-Zellrezeptor ist für eine zytosolische NAADP-Erhöhung erforderlich	60
4.2	Klonierung der Vektoren pDsRed2U6-si	61
4.2.1	Konstruktion der shRNA-Inserts für den CD38 Knock down	61
4.2.2	Herstellung des Vektors pDsRed2U6-si270	63
4.2.3	Klonierung der übrigen pDsRed2 U6-si Vektoren über ein Blau/weiß-Screening	65
4.2.4	Etablierung stabiler CD38 Knock down-Zelllinien	66
4.2.5	CD38 Knock down-Klone zeigen reduzierte NAD-Glykohydrolase-Aktivität	67
4.2.6	Die Knock down-Klone weisen eine stark verminderte CD38-Expresion auf	68
4.3	CD38-Expression beeinflusst die NAADP-Konzentration	69
4.3.1	CD38 Knock down führt in T-Lymphozyten zu einer leichten NAADP-Erhöhung	69
4.3.2	CD38 Knock out-Mäuse weisen in Milz und Thymus erhöhte NAADP-Konzentrationen auf	70
4.4	Expressionsverminderung von CD38 wirkt sich auf das Agoninst induzierte Calciumsignal aus	71
4.4.1	CD38 Knock down führt zu signifikanten Verminderungen in der Calciumkonzentration	74
4.5	Überexpression von CD38 in HeLa-Zellen vermindert die zytosolische NAADP-Konzentration	75
5	Diskussion der Ergebnisse	77
5.1	Methoden zur Bestimmung von NAADP	77
5.1.1	Der NAADP Cycling-Assay nach Graeff und Lee	77
5.1.2	Der NAADP Cycling-Assay nach Yamaguchi et al.	78
5.1.3	Der Radio-Rezeptor-Assay nach Patel et al.	78
5.1.4	Der Radio-Rezeptor-Assay nach Lewis et al.	80
5.1.5	Der NAADP-Cycling-Assay nach Gasser et al.	81
5.2	NAADP als Ca ²⁺ -freisetzender Botenstoff	81
5.2.1	Stimulation von Zellen führt zur Entstehung schneller NAADP-Signale	82
5.2.2	Dosis und Spezifität des Stimulus sind entscheidend für die NAADP-Bildung	85
5.3	Einfluss von CD38 auf das endogene NAADP	87
5.4	CD38 und das globale Ca ²⁺ -Signal	89
5.5	NAADP: Vom lokalen zum globalen Ca ²⁺ -Signal	91
5.6	CD38 und die Hydrolyse von NAADP	93
6	Zusammenfassung der Ergebnisse	96
7	Abstract	98
8	Literaturverzeichnis	100

9	Danksagung	111
10	Anhang	112
10.1	Veröffentlichungen	112
10.2	Poster-Beiträge zu Kongressen	112
10.3	Sequenzierungen	113
10.3.1	Vektor pDsRed2U6-si270	113
10.3.2	Vektor pDsRed2U6-si394	114
10.3.3	Vektor pDsRed2U6-si771	115
10.3.4	Vektor pDsRed2U6-si270scramble	116
10.3.5	Vektor pDsRed2U6-Si771scramble	117

Abkürzungen

ACh	Acetylcholin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
ADPR	Adenosindiphosphatribose
ADPRC	ADP-Ribosyl-Cyclase
cADPR	zyklische Adenosindiphosphatribose
Ca ²⁺	zweiwertige Calciumionen
[Ca ²⁺] _i	freie, zytosolische Konzentration zweiwertiger Calciumionen
CaM	Calmodulin
CICR	Calcium induzierte Ca ²⁺ -Freisetzung (Ca ²⁺ -induced Ca ²⁺ -release)
ConA	Concanavalin A
CRAC	Ca ²⁺ -release activated Ca ²⁺ -channels
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGTA	Ethylenglykol-(N,N,N',N')-tetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	foetales Kälberserum
FMN	Flavinmononukleotid
Fura-2/AM	Acetoxymethoxyester des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2
G-418	Genitacin-Sulfat
G6P	Glucose-6-Phosphat
G6P-DH	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny]-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (high performance liquid-chromatography)
InsP ₃	D- <i>myo</i> -Inositol-1,4,5-trisphosphat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
mRNA	Boten-Ribonukleonsäure (messenger RNA)
NAADP	Nikotinsäureadenindinukleotid-2`-phosphat
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP	Nikotinamidadenindinukleotid-2`-phosphat
NaP-Puffer	Natriumphosphat-Puffer
NCS	Serum neugeborener Kälber
NMN	Nikotinmononukleotid
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PKC	Proteinkinase C
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of mean)
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmischen/endoplasmischen Retikulums
SOC	store operated channel

Abkürzungen

TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TCR	T-Zellrezeptor (T cell receptor)
TFA	Trifluoressigsäure
Tg	Thapsigargin
Tyr	Tyrosin
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Funktionen des nativen Immunsystems

Um die Gefahr einer Infektion durch Bakterien, Viren, Würmer und anderer Pathogene zu minimieren, entwickelte sich in Säugetieren ein komplexes Verteidigungssystem, das Immunsystem, welches sich in das angeborene und das adaptive Immunsystem unterteilen lässt. Das angeborene Immunsystem besteht aus unterschiedlichen phagozytischen Zellen, zu denen unter anderem neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und Makrophagen gehören. Ein weiterer Bestandteil des angeborenen Immunsystems ist das Komplementsystem, welches aus einem Verband von Proteinen des Blutsystems besteht. Die neutrophilen Granulozyten machen ca. 70% der weißen Blutzellen aus. Diese Zellen können die Blutbahn verlassen und durch amöboide Bewegungen zum Infektionsherd gelangen und Pathogene durch Phagozytose zerstören. Neutrophile Granulozyten sind darauf spezialisiert Bakterien zu phagozytieren und nehmen somit eine Schlüsselposition des angeborenen Immunsystems bei der bakteriellen Abwehr ein (Janeway et al, 2002). Eine weitere Gruppe der phagozytierenden Zellen sind die Monozyten, die durch das Blutsystem zirkulieren und im Fall einer Infektion in das betroffene Gewebe einwandern und dort zu Makrophagen differenzieren. Makrophagen zeichnen sich durch ihre hohe Effizienz bei der Phagozytose und durch ihre Langlebigkeit aus. Eosinophile Granulozyten machen nur 1,5% der weißen Blutzellen aus und sind weniger phagozytisch aktiv als neutrophile Granulozyten und Makrophagen. Sie haben jedoch eine wichtige Funktion bei der Abwehr großer Parasiten, wie etwa von Würmern, die nicht durch Phagozytose aufgenommen werden können. Die Neutrophilen und Makrophagen, die auch als professionelle phagozytische Zellen bezeichnet werden, besitzen spezialisierte Lysosomen, die nach Aufnahme eines Pathogens mit dem sogenannten Phagosom fusionieren. Bei diesem Vorgang kommen die aufgenommenen Pathogene mit sehr reaktiven Molekülen wie Superoxid (O_2^-) und Hypochlorit (OCl^-) in Kontakt, sowie mit einer Mischung aus lysosomalen Hydrolasen, was zu einem Abbau der Pathogene führt (Alberts et al, 2002). Ein Schwerpunkt der Makrophagen ist die Beseitigung von beschädigtem oder abgestorbenem Gewebe und die Aufnahme von großen Mikroorganismen wie Protozoen. Dendritische Zellen sind ebenfalls in der Lage durch Phagozytose Krankheitserreger aufzunehmen. Nach der Aufnahme migrieren diese Zellen über lymphatische Gefäße in die Lymphknoten und präsentieren über Oberflächenrezeptoren Proteinfragmente der aufgenommenen Pathogene. T-Lymphozyten, deren Rezeptoren die Pathogenfragmente der Dendritischen Zellen erkennen und binden können, werden aktiviert. Die Dendritischen Zellen sind somit in der Lage das adaptive Immunsystem zu aktivieren. Eine weitere Gruppe des angeborenen Immunsystems sind die natürlichen Killerzellen, die eindringende Pathogene nicht direkt angreifen, sondern körpereigene Zellen, die mit Erregern, wie z.B. Viren infiziert sind, zerstören. Es werden auch entartete Zellen beseitigt, die zur Tumorbildung neigen.

Das Komplementsystem, welches aus mindestens 20 verschiedenen Proteinen besteht, ist ein weiterer Teil des angeborenen Immunsystems (Koppenheffer et al, 1999). Die Prote-

ine zirkulieren zunächst in einer nicht aktiven Form durch das Blutsystem. Die Aktivierung des Komplementsystems kann durch drei unterschiedliche Mechanismen erfolgen. Die klassische Aktivierung läuft über die Bindung von IgG- oder IgM-Molekülen, die an der Oberfläche eines Pathogens gebunden sind (Klassischer Weg). Antigene Polysaccharide aus der bakteriellen Zellwand wie Mannose oder Fucose sind ebenfalls in der Lage das Komplementsystem zu aktivieren (Lektin-Weg). Der dritte Mechanismus, der auch als Alternativer Weg bekannt ist, wird durch die spontane Aktivierung des Komplementfaktors C3 eingeleitet. Der daraus resultierende Faktor C3b bindet sowohl an körpereigene Zellen, als auch an eindringende Pathogene. Körpereigene Zellen besitzen Proteine, die die Zusammenlagerung weiterer Komplementfaktoren verhindern. Die Abwesenheit der Proteine bei Krankheitserregern, markiert diese für den Abbau (Tomlinson, 1993). Dem angeborenen Immunsystem kommen somit folgende Aufgaben zu. Zum einen werden unmittelbar nach einer Infektion die eindringenden Pathogene bekämpft. Hierbei ist besonders die Abwehr von Bakterien durch Phagozytose oder durch das Komplementsystem hervorzuheben. Ein weiterer Punkt ist, wie zuvor erwähnt, die Aktivierung des adaptiven Immunsystems,

1.2 Funktionen des adaptiven Immunsystems

Das adaptive Immunsystem besteht aus B-Lymphozyten und T-Lymphozyten. B-Lymphozyten sezernieren nach ihrer Aktivierung Antikörper, die dann durch das Blutsystem zirkulieren und das Antigen binden. Dieser Vorgang wird als humorale Immunantwort bezeichnet (Fearon und Locksley, 1996). T-Lymphozyten beseitigen Pathogene durch Kontakt mit einer infizierten, körpereigenen Zelle, weshalb die Reaktion auch als zellvermittelte Immunantwort bezeichnet wird. Die Bildung der T- und B-Lymphozyten erfolgt aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark (Ikuta et al, 1992). T-Lymphozyten wandern vom Knochenmark in den Thymus und vollenden dort den Reifungsprozess. B-Lymphozyten verbleiben zur Reifung im Knochenmark. Beide Gruppen von Lymphozyten besiedeln lymphatische Organe zu denen unter anderem die Milz, der Thymus, die Peyerschen Plaques und der Wurmfortsatz gehören (Butcher und Picker, 1996).

Eine Eigenschaft, die das adaptive Immunsystem grundlegend vom angeborenen Immunsystem unterscheidet, ist das Vorhandensein eines immunologischen Gedächtnisses (Zinkernagel et al 1996 und Sprent, 1997). Ein Versuchstier, dem ein Antigen injiziert wird, bildet im Fall einer humoralen Immunantwort spezifische Antikörper gegen dieses Antigen. Nach etwa 5 bis 10 Tagen erreicht die Immunantwort ein Maximum, das Antigen wird beseitigt und die Immunantwort nimmt wieder ab. Dieser Vorgang wird als primäre Immunantwort bezeichnet. Wird das Versuchstier einige Wochen später erneut mit dem Antigen konfrontiert, so setzt die Immunantwort viel schneller und in viel stärkerem Ausmaß ein und bildet die sekundäre Immunantwort. Diese verstärkte Immunantwort kann durch das Modell der klonalen Selektionstheorie (Burnet, 1976 und Forsdyke, 1995) erklärt werden. Bei der ersten Exposition mit dem Antigen bindet eine naive B-Lymphozyte mit dem passenden Rezeptor das Antigen und wird daraufhin aktiviert und beginnt zu proliferieren. Die meisten Zellen differenzieren zu Effektorzellen, die spezifische

Antikörper sezernieren. Einige Zellen entwickeln sich zu langlebigen Gedächtniszellen, die bei einem zweiten Kontakt mit dem Antigen viel schneller zu Effektorzellen differenzieren können. Das immunologische Gedächtnis bildet sich somit als Folge der primären Immunantwort. Weil durch die Stimulation einer naiven Lymphozyte viele Gedächtniszellen und Effektorzellen entstehen, die alle die gleiche Antigen-Spezifität besitzen, wird dieser Mechanismus klonale Expansion genannt (L Whitaker und AM Renton, 1993).

1.3 Oberflächenrezeptoren und Antigenerkennung

Die Abwehr von Pathogenen beruht auf der frühzeitigen Erkennung der Krankheitserreger durch das angeborene und das adaptive Immunsystem. In beiden Fällen verläuft der Erkennungsprozess zwischen dem Immunsystem und dem Pathogen über Oberflächenrezeptoren. Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkennen charakteristische Oberflächenstrukturen von Pathogenen. So sind im Menschen mindestens zehn TLR-Proteine, die alle zur Familie der Toll-like-Rezeptoren gehören, identifiziert worden. Diese Rezeptoren erkennen Oberflächenstrukturen, die ausschließlich auf Krankheitserregern vorkommen. Das angeborene Immunsystem ist somit in der Lage zwischen selbst und nicht-selbst zu unterscheiden. Die TLR-Proteine kommen unter anderem auf Makrophagen und neutrophilen Granulozyten vor. Die Funktionen der Rezeptoren sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist jedoch bekannt, dass TLR1 in der Lage ist Zymosan, einer Oberflächenstruktur aus Hefen, zu binden (Ikeda et al, 2005). TLR3 bindet lange, doppelsträngige RNA-Moleküle und ist an der Abwehr von Viren beteiligt. TLR6 erkennt bakterielles Peptidoglykan. Das angeborene Immunsystem kann durch Expression unterschiedlicher Rezeptoren auf eine Vielzahl von Pathogen reagieren, gewährleistet jedoch keinen vollkommenen Schutz, weil die Anzahl der Rezeptoren begrenzt ist.

Das adaptive Immunsystem hingegen ist in der Lage gegen jede fremde Substanz eine Immunantwort einzuleiten. Grundlage dieses Systems ist ein genetischer Mechanismus, der es dem adaptiven Immunsystem erlaubt Rezeptoren mit einer unbegrenzten Anzahl an Antigenespezifitäten hervorzubringen. T-Lymphozyten exprimieren Rezeptoren, die im Gegensatz zu den B-Lymphozyten, nur in membrangebundener Form vorkommen. T-Zellrezeptoren bestehen aus zwei Polypeptid-Ketten mit einer Länge von etwa 280 Aminosäuren. Jedes Monomer besitzt eine kurze C-terminale Domäne im Zytosol und eine Transmembran-Helix. An die Transmembran-Helix schließt sich eine konstante Immunglobulin-Domäne an, auf die eine variable Immunglobulin-Domäne am N-Terminus folgt. Die beiden Polypeptid-Ketten werden durch eine Disulfid-Brücke unmittelbar hinter der Transmembran-Helix stabilisiert. Die Antigen-Bindungsstelle des T-Zellrezeptors befindet sich am N-Terminus und wird durch die variablen Immunglobulin-Domänen beider Polypeptid-Ketten gebildet (Bentley und Mariuzza, 1996). Von besonderer Bedeutung für die Antigen-Spezifität sind hierbei hypervariable Bereiche, die als Schleifenstruktur die β -Faltblätter der variablen Immunglobulin-Domänen verbinden. Ein T-Lymphozyt exprimiert durchschnittlich 30000 T-Zellrezeptoren mit gleicher Antigen-Spezifität auf der Oberfläche. Die variablen Immunglobulin-Domänen des Rezeptors setzen sich aus

drei Gensegmenten zusammen, die als V-Segment (variabel), J-Segment (joining) und D-Segment (diversity) bezeichnet werden. Dadurch, dass jedes V-Segment mit jedem J-Segment und D-Segment kombinieren kann, erhöht sich die Anzahl der möglichen variablen Domänen. Dieser Vorgang wird als kombinatorische Diversität bezeichnet. Die Rekombination der Gensegmente verläuft über ein Enzymkomplex, der als V(D)J-Rekombinase bezeichnet wird (Fugmann et al, 2000). Beim Vorgang der Rekombination kommt es häufig zum Verlust einzelner Basen, die dann nach einem Zufallsprinzip wieder aufgefüllt werden. Dieser Vorgang erhöht besonders in den hypervariablen Schleifenstrukturen die Vielfalt. Bindet ein T-Zellrezeptor während des Reifungsprozesses im Thymus ein körpereigenes Molekül, so kommt es durch eine erneute Expression der V(D)J-Rekombinase zu einer Änderung der variablen Regionen. Dieser Mechanismus wird als Rezeptor-Editing bezeichnet. Bindet der Rezeptor nach der Unstrukturierung der variablen Region erneut körpereigene Moleküle, so wird die Zelle eliminiert. Durch diesen Vorgang, der als klonale Deletion bezeichnet wird, ist das Immunsystem in der Lage, eine Selbst-Toleranz aufrecht zu erhalten. Die Bildung der Antikörper der B-Lymphozyten erfolgt auf analoge Weise. Bei der Reifung der B-Lymphozyten gibt es jedoch einen zusätzlichen Mechanismus, der zu einer starken Erhöhung der Vielfalt in den variablen Domänen führt. Es handelt sich um die somatische Hypermutation, bei der in den hypervariablen Schleifenstrukturen Punktmutationen eingeführt werden (Tonegawa, 1983). Durch diese genetischen Mechanismen ist es möglich, dass das menschliche Immunsystem mehr als 10^{18} T-Zellrezeptoren mit unterschiedlichen Spezifitäten aufweist, obwohl das humane Genom über weniger als 40000 Gene verfügt (Janeway et al, 2002).

Für eine volle Aktivierung von T-Lymphozyten sind mehrere Signale erforderlich. Antigen präsentierte Zellen exprimieren auf der Oberfläche Proteine, die als Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC) bezeichnet werden und von denen es zwei Varianten gibt (Bjorkmann, 1997). In diesem Komplex wird ein Antigen präsentiert, das von T-Lymphozyten mit dem passenden Rezeptor gebunden werden kann. Diese Wechselwirkung wird durch einen Co-Rezeptor der T-Lymphozyten verstärkt. Zytotoxische T-Zellen, die in der Lage sind virusbefallene Zellen zu vernichten, binden zusätzlich mit dem Co-Rezeptor CD8 an MHC-I. Die Wechselwirkung zwischen dem T-Zellrezeptor und dem MHC-I Komplex und die zusätzliche Bindung von CD8 an den invarianten Teil von MHC-I stellen das erste Signal dar. Das zweite Signal wird durch die Wechselwirkung des CD80/CD86-Komplexes, welcher auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird, und dem Co-Rezeptor CD28 der T-Lymphozyten übermittelt. Die Aktivierung der T-Helferzellen erfolgt auf ähnliche Weise wie die Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen. Einziger Unterschied ist, dass die Helferzellen mit dem Co-Rezeptor CD4 an MHC-II binden. Die T-Helferzellen lassen sich in zwei Gruppen einteilen. T_H1 -Zellen aktivieren hauptsächlich Makrophagen und zytotoxische T-Zellen, während T_H2 -Zellen B-Lymphozyten aktivieren (Lichtman und Abbas, 1997). Ebenfalls eine wichtige Funktion bei der Aktivierung übernehmen die nicht polymorphen Polypeptidketten des CD3 Komplexes, die mit dem T-Zellrezeptor verbunden sind. Die Aktivierung von T-Lymphozyten leitet Prozesse wie Genaktivierung, Differenzierung und Proliferation ein. Eine sehr wichtige Funktion bei diesen Ereignissen übernimmt ein komplexes Ca^{2+} -Signalsystem. Grundlage

dieses Signalsystems sind Ca^{2+} -mobilisierende Botenstoffe, Ca^{2+} -Speicher und Pumpen, sowie Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran (Guse AH, 1998 und Lewis, 2001).

1.4 Das Calcium-Signalsystem von T-Lymphozyten

Viele zelluläre Prozesse unterliegen einer Regulation durch Änderungen in der Ca^{2+} -Konzentration. Durch Schwankungen der freien Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma und im Nukleoplasma (wird als $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zusammengefasst) werden unter anderem Vorgänge wie die Proliferation von T-Lymphozyten (Müller et al, 2008), die Kontraktion von glatter und quergestreifter Muskulatur (Kasai et al, 1998), die Sekretion von Neurotransmittern an den synaptischen Endigungen (Alford et al, 1993) und die Sekretion von Enzymen im Pankreas (Cancela und Petersen, 1998) reguliert. Die Ca^{2+} -Signale setzen sich zum einen aus der Freisetzung von Ca^{2+} aus zytosolischen Speichern und aus dem Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} zusammen. Das Endoplasmatische Reticulum stellt den am besten untersuchten Ca^{2+} -Speicher dar (Berridge, 2002). Die Mitochondrien sind ebenfalls Ca^{2+} -speichernde Organellen, wobei ihre Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen nehmen Mitochondrien Ca^{2+} aus der Umgebung auf und geben es nach einiger Zeit wieder ab. Die Funktion der Mitochondrien in Bezug auf das Ca^{2+} -Signalsystem kann als eine Art Speicher beschrieben werden, der regulierend auf die Ca^{2+} -Homöostase einwirkt (Hoth et al, 2000). Es gibt Hinweise, dass sich der mitochondriale Ca^{2+} -Speicher und das ER gegenseitig bei der Aufnahme und bei der Abgabe von Ca^{2+} beeinflussen (Jouaville et al, 1995). Zwischen den Ca^{2+} -Speichern und dem Zytosol der Zelle herrscht ein großer Konzentrationsgradient. Im ER liegen Konzentrationen vor, die um $300\mu\text{M}$ liegen (Meldolesi und Pozzan, 1998). Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in nicht stimulierten T-Lymphozyten liegt bei etwa 100nM (Guse et al, 1999 und Gasser et al, 2006B). Im Extrazellularraum, der ebenfalls einen wichtigen Ca^{2+} -Speicher darstellt, herrschen Konzentrationen von $2,5\text{mM}$ (Berridge MJ, 2002). Durch Ca^{2+} -Pumpen, die sich in der Plasmamembran und im ER befinden, wird dieser hohe Gradient aufrecht erhalten. Die Pumpen, welche sich im ER befinden, werden als SERCA [*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase*] bezeichnet. Durch die Hydrolyse von ATP befördert SERCA Ca^{2+} entgegen dem Konzentrationsgefälle vom Zytosol in das ER (Toyoshima et al, 2000 und 2002). In der Plasmamembran befinden sich Pumpen, die als PMCA [*Plasma membran Ca^{2+} -ATPase*] bezeichnet werden und Ca^{2+} aus dem Zytosol in den Extrazellularraum transportieren. Die benötigte Energie wird ebenfalls durch die Hydrolyse von ATP gewonnen (Lee et al, 2005). Neben den Pumpen existieren Austauscher, die ein Ca^{2+} -Ion aus dem Zytosol entfernen und dafür zwei Na^+ -Ionen in das Zytosol transportieren. Zu dieser Gruppe gehören die NCX [*plasma membrane $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger*] (Hudecova et al, 2004) und die MNCX [*mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger*] (Chemykh et al, 2004). Sowohl die Ca^{2+} -Pumpen als auch die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher sorgen dafür, dass $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in ruhenden T-Lymphozyten Werte um 100nM erreicht. Eine Stimulation von T-Lymphozyten über den T-Zellrezeptor induziert einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die Aktivierung der

T-Lymphozyten lässt sich durch die Verwendung des monoklonalen Antikörpers OKT3 nachahmen. Der Antikörper bindet an den T-Zellrezeptor/CD3-Komplex und führt bei einer Messung von T-Lymphozyten in Suspension zu einem biphasischen Ca^{2+} -Signal. Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ steigt von dem basalen Wert innerhalb weniger Sekunden an und es entsteht ein Ca^{2+} -Peak, der Konzentrationen bis zu $1\mu\text{M}$ erreichen kann. An den schnell eintretenden Ca^{2+} -Peak schließt sich die Plateau-Phase an, in der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über längere Zeit in einem erhöhten Zustand gehalten wird (Guse et al, 1999). Die Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in unterschiedlichen Zellsystemen haben ergeben, dass die Ca^{2+} -Signaturen unterschiedliche Verläufe annehmen können.

a) Es kann eine Ca^{2+} -Erhöhung entstehen, die sich auf ein bestimmtes Areal der Zelle beschränkt und räumlich somit begrenzt ist. Die räumliche Ausdehnung des Signals kann durch Ca^{2+} -bindende Pufferproteine wie z.B Parvalbumin und Calbin reguliert werden. Dies findet bei der Sezernierung der Neurotransmitter in den synaptischen Endigungen der Neuronen statt (Berridge, 2000). Durch Mikroinjektionsexperimente in humanen T-Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass die entstehenden Ca^{2+} -Signale teilweise räumlich begrenzt sind. NAADP-Injektionen mit Konzentrationen unter 30nM führen zu einem zu kleinen, subzellulären Signalen und auch zu globalen Ca^{2+} -Signalen (Dammernann und Guse, 2005).

b) Die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration beschränkt sich nicht immer auf einen kleinen Bereich der Zelle, sondern kann diese auch in Form einer oder sich wiederholender Wellen durchlaufen (Syed et al, 2004). cADPR-Mikroinjektionen in humane T-Lymphozyten führen ebenfalls zur Entstehung von Ca^{2+} -Wellen, die die Zelle durchqueren (Guse et al, 1997).

c) Übertragungen von Information durch das Ca^{2+} -Signalsystem beruhen nicht nur auf einer Änderung der Konzentration oder dem Umfang der räumlichen Ausdehnung, sondern auch auf einem zeitlichen Aspekt. Ca^{2+} -Wellen können Zellen mit unterschiedlichen Frequenzen durchqueren. Zellen müssen also in der Lage sein, die Frequenzen der Ca^{2+} -Wellen zu entschlüsseln. Es konnten zwei Proteine identifiziert werden, die durch Änderungen der Ca^{2+} -Frequenzen beeinflusst werden. Hierzu gehören die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinkinase II (DeKonick et al, 1998) und die Proteinkinase C (Oancea und Meyer E, 1998). Eine frequenzabhängige Übermittlung von Informationen findet unter anderem in der Entwicklungsphase und der damit verbundenen Transkription von Genen statt. Dolmetsch und Kollegen haben gezeigt, dass bei einer niedrigen Frequenz von Ca^{2+} -Wellen der Transkriptionsfaktor NF- κB und bei einer höheren Frequenz der Transkriptionsfaktor NF-AT aktiviert wird (Dolmetsch et al, 1998).

Ca^{2+} unterscheidet sich von allen anderen Botenstoffen dadurch, dass es ein Ion ist. Es wird weder enzymatisch gebildet noch abgebaut. Die physiologische Wirkung von Ca^{2+} beruht darauf, dass es in der Zelle umgelagert oder verschoben wird. Die Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in T-Lymphozyten erfolgt im allgemeinen durch die Wechselwirkung eines Liganden mit dem T-Zellrezeptor. Die Folge dieser Wechselwirkung zwischen dem Ligand und dem Rezeptor ist die Bildung von Ca^{2+} -freisetzenden, intrazellulären Botenstoffen, die als sekundäre Botenstoffe [*second messenger*] bezeichnet werden. Die gebildeten sekundären Botenstoffe binden dann an Ca^{2+} -sensitive Kanalrezeptoren und leiten dadurch eine

Ca²⁺-Freisetzung aus zytosolischen Speichern ein. Zur Gruppe der Ca²⁺-mobilisierenden Botenstoffe gehört das D-*myo*-Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP₃), die zyklische Adenindinukleotidphosphat-Ribose (cADPR) und das Nikotinsäureadenindinukleotidphosphat (NAADP). Die wichtigsten Kanalrezeptoren, die eine Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER einleiten können, sind der InsP₃-Rezeptor und der Ryanodin-Rezeptor. Von jedem Rezeptor existieren drei Isoformen, die jeweils aus vier Untereinheiten bestehen. Die Expression und die subzelluläre Verteilung der Isoformen des InsP₃-Rezeptors ist abhängig von der Art der Zellen und des Gewebes (Hernandez et al, 2007). Auch die Expression der Isoformen des Ryanodin-Rezeptors ist abhängig vom Gewebe. So wird der Ryanodin-Rezeptor I hauptsächlich im Skelettmuskel, der Ryanodin-Rezeptor vor allem II im Herzmuskel und die Isoform III hauptsächlich im Hirn exprimiert. Im folgenden Abschnitt werden die Ca²⁺-mobilisierenden Botenstoffe näher erläutert.

1.5 Das InsP₃-abhängige Ca²⁺-Signalsystem

Nach der Aktivierung der T-Lymphozyten kommt es zur Phosphorylierung von Tyrosinresten an dem T-Zellrezeptor assoziierten CD3-Komplex. Diese Anordnung von Tyrosinresten wird als ITAM [*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*] bezeichnet. Die Phosphorylierung des ITAM-Motivs erfolgt durch die Tyrosin-Kinasen p59^{lyn} und p56^{lck} (Hegedus et al, 1999), deren Aktivierung durch die Wechselwirkung des Co-Rezeptors CD4 oder CD8 mit dem invarianten Teil des MHC-Komplexes eingeleitet wurde. Die Tyrosin-Kinase ZAP-70 bindet mit einer SH2-Domäne [*Src-homology domain*] an die phosphorylierten Tyrosin-Reste von ITAM und wird dabei von p56^{lck} phosphoryliert und aktiviert. Das aktivierte ZAP-70 phosphoryliert unter anderem das Adapterprotein LAT, das nun als Andockstelle für das Protein Grb2/SOS dient. Grb2/SOS ist die regulatorische Untereinheit für die PI3-Kinase (Besset et al, 2000) und für die Phospholipase C (Daulhac et al, 1997). Die aktivierte Phospholipase C spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat [PI(4,5)P₂], welches in geringen Konzentrationen an der inneren Seite der Plasmamembran vorkommt (Szymanska et al, 2008). Es entstehen die beiden Produkte InsP₃ und Diacylglycerol (DAG). Während DAG in der Membran verankert bleibt, diffundiert das gebildete InsP₃ durch das Zytosol und bindet dann an InsP₃ abhängige Rezeptoren, die sich in der ER-Membran befinden. Dies führt zu einer Öffnung der Rezeptor-Kanäle und Ca²⁺ strömt dem Konzentrationsgradienten folgend in das Zytosol. Das freigesetzte

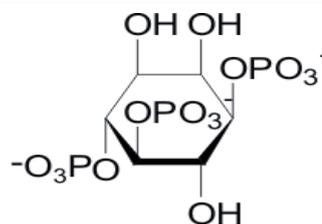


Abb.1: Strukturformel von InsP₃

Ca²⁺ wirkt sich regulierend auf den Öffnungszustand des InsP₃-Rezeptors aus, wobei hohe zytosolische Ca²⁺-Konzentrationen eine inhibierende Wirkung auf den Rezeptor haben (Berridge, 2000 und Fill et al, 2002). Um die Signalwirkung von InsP₃ zu beenden, wird der Botenstoff nach kurzer Zeit durch eine InsP₃-Kinase zu InsP₄ umgewandelt (Com-mune et al, 1995). InsP₄ hat keine Ca²⁺-freisetzende Wirkung, und somit kann die InsP₃-vermittelte Ca²⁺-Freisetzung schnell beendet werden (Xia und Yang, 2005).

Es gibt jedoch auch Arbeiten, die belegen, dass InsP_4 in bestimmten Geweben eine Ca^{2+} -freisetzende Wirkung hat. Dies konnte in Neuronen gezeigt werden, die sowohl die InsP_3 -Kinase als auch InsP_4 -Rezeptoren exprimieren (Irvine et al, 1999). Ob die Ca^{2+} -Freisetzung durch InsP_4 auch in anderen Zellsystemen eine wichtige Rolle spielt, ist noch unklar.

1.6 Der Ca^{2+} -freisetzende Botenstoff cADPR

Clapper und Kollegen entdeckten 1987 die Ca^{2+} -mobilisierende Wirkung von cADPR durch Experimente mit Seeigeleiern (Clapper et al, 1987). Die Bildung des sekundären Botenstoffes verläuft über die Umwandlung von NAD durch ADP-Ribosyl-Cyclasen. Bei der Reaktion wird vom NAD das Nikotinamid abgespalten und es bildet sich eine N-glykosidische Bindung zwischen dem anomeren C1-Atom der Ribose und dem N1-Atom des Adeninrings (Lee et al, 1994). Enzyme, die diese Reaktion durchführen sind die lösliche Cyclase aus dem Seehasen *Aplysia californica* und in humanen Zellen und Tierzellen das Ektoenzym CD38 (DeFlora et al, 2004).

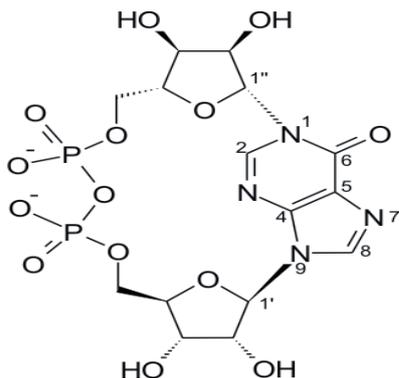


Abb.1.2: Struktur des Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffes cADPR

Das pH-Optimum der CD38-vermittelten cADPR-Bildung liegt im neutralen bis alkalischen Bereich (Lee, 2006). Ein direkter Zusammenhang zwischen CD38 und der cADPR-Bildung konnte durch unterschiedliche Gruppen erbracht werden (Takahashi et al, 1995; Partida-Sanchez et al, 2001; Bruzzone et al, 2003 und Soares et al, 2006). Die Tatsache, dass CD38 ein Ektoenzym ist, bedeutet, dass es Transportsysteme geben muss, um das Substrat NAD vom Zytosol in den Extrazellularraum zum katalytischen Zentrum des Enzyms zu überführen. Bruzzone und Kollegen konnten zeigen, dass der NAD-Transport durch Connexin 43 vermittelt wird und dass diese Kanäle bei hoher $[\text{Ca}^{2+}]_i$ geschlossen werden, um einen Verlust von zytosolischem NAD zu verhindern (Bruzzone et al, 2001). Nach der Umwandlung von NAD am aktiven Zentrum des Enzyms, muss das cADPR in das Zytosol der Zelle gelangen. Es gibt Hinweise, dass der Rücktransport über Nucleosid-Transporter (Giuda et al, 2002) oder über CD38 selbst verläuft (Franco et al, 1998). Der biologische Hintergrund dieses komplizierten Systems könnte sein, dass das extrazellulär gebildete cADPR von auch CD38-negativen Zellen aufgenommen wird und somit die Funktion eines parakrinen Botenstoffes übernimmt (Podesta et al, 2000).

Nach dem Rücktransport von cADPR in das Zytosol kommt es aufgrund einer Wechselwirkung mit dem Ryanodin-Rezeptor zu einer Freisetzung von Ca^{2+} (Guse, 2000 und Higashida et al, 2007). Ob es sich um eine direkte Interaktion handelt, oder ob der Kontakt zwischen cADPR und dem Rezeptor über ein Bindeprotein verläuft, ist noch unklar. Der Abbau des Botenstoffes erfolgt vermutlich über eine noch nicht identifizierte cADPR-Hydrolase (Guse, 2004). Es ist auch ein CD38-vermittelter cADPR-Abbau diskutiert worden. CD38 kann im Gegensatz zur Aplysia-Cyclase cADPR zu ADPR hydrolysieren (Lund et al, 1999). Eine langsame CD38-vermittelte cADPR-Hydrolyse ist auch von Kirchberger und Kollegen bestimmt worden (Kirchberger et al, 2006).

1.7 Die Entdeckung des Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffes NAADP

1987 wurde von Clapper und Kollegen Experimente zur Ca^{2+} -Freisetzung an Seeigeleiern durchgeführt. Es zeigte sich, dass Injektionen von NADP starke Ca^{2+} -Signale auslösen (Clapper et al, 1987). Aufgrund der Tatsache, dass NADP eine wichtige Funktion bei Reduktions- und Oxidationsprozessen in der Zelle ausübt, war es offensichtlich, dass eine Verunreinigung von NADP für die Ca^{2+} -freisetzende Wirkung verantwortlich sein musste. Die Aufklärung der Struktur gelang acht Jahre später durch ein HPLC-basiertes Aufreinigungsverfahren (Lee und Aarhus, 1995).

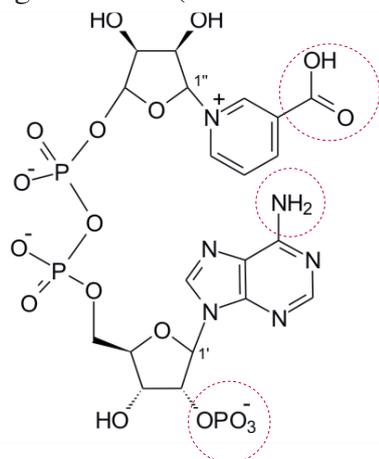


Abb.1.3: Strukturformel von NAADP (Nikotinsäureadenindinukleotidphosphat)

Die grauen Kreise markieren funktionelle Gruppen, die für die Ca^{2+} -Freisetzung im Seeigelei wichtig sind (Lee et al, 1997).

Die Ca^{2+} -freisetzende Substanz, die sich als NAADP herausstellte unterschied sich von NADP durch den Austausch der Nikitonamid-Gruppe gegen die Nikotinsäure-Gruppe. Es konnte durch Lee und Mitarbeiter gezeigt werden, dass NAADP für die Ca^{2+} -Freisetzung im Seeigelei wichtige strukturelle Merkmale aufweist (Lee et al, 1997). Es handelt sich hierbei um folgende Gruppen:

- 1) die Carboxyl-Gruppe der Nikotinsäure
- 2) die 2'-Phosphatgruppe der Ribose
- 3) die Aminogruppe am Adeninring

Veränderungen dieser Gruppen führen zu einem Verlust der Ca^{2+} -freisetzenden Wirkung (Lee und Aarhus, 1997). Dies lässt auf eine spezifische Wechselwirkung zwischen NAADP und dem Rezeptor schließen.

1.8 Funktion von NAADP im Ca^{2+} -Signalsystem

Die Ca^{2+} -mobilisierende Wirkung von NAADP konnte in unterschiedlichen Zellsystemen wie Mensch (Berg et al, 2000; Langhorst et al, 2004 und Dammermann und Guse, 2005), Tier (Santella, 2000) und Pflanze (Navazio et al, 2000) nachgewiesen werden. NAADP zeichnet sich dadurch aus, dass es im Vergleich zu den etablierten Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffen wie InsP_3 (Berridge et al, 1983) und cADPR (Guse et al, 1999) sehr potent ist und schon in sehr geringen Konzentrationen dazu in der Lage ist Ca^{2+} zu mobilisieren. Messungen in unterschiedlichen Zellsystemen haben verdeutlicht, dass NAADP in einem Konzentrationsbereich zwischen 10 und 100nM wirksam ist. Die Ca^{2+} -freisetzende Wirkung von NAADP unterliegt einer glockenförmigen Konzentrations-Wirkungsabhängigkeit, die im Seeiglelei (Lee et al, 1995), in pankreatischen Acinuszellen (Cancela et al, 1999) und in T-Lymphozyten (Berg et al, 2000) bestätigt werden konnte. Mikroinjektionsexperimente in T-Lymphozyten haben ergeben, dass Injektionen von 50 bis 100nM Ca^{2+} -Signale auslösen, die sich schnell über die ganze Zelle ausbreiten und als globale Signale bezeichnet werden (Berg et al, 2000). Injektionen unter 30nM lösen zum einen lokal begrenzte Signale aus, die als subzelluläre Signale bezeichnet werden und auch globale Signale (Dammermann und Guse, 2005). Wird in T-Lymphozyten eine sehr hohe NAADP-Konzentration injiziert, so kommt es zu einer Inaktivierung des TCR/CD3-, des cADPR- und des InsP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Signalsystems (Berg et al, 2000). Diese Experimente machen deutlich, dass NAADP innerhalb des Ca^{2+} -Signalsystems eine wichtige Rolle einnimmt und für einen normalen Ablauf eines Ca^{2+} -Signals ein funktionierendes NAADP-System erforderlich ist. Weiterhin hat sich gezeigt, dass NAADP mit einer Dosis-Wirkungsabhängigkeit im niedrigen nanomolaren Bereich die bis heute potenteste Ca^{2+} -mobilisierende Substanz ist. Dies zeigte sich auch durch die Bestimmung basaler NAADP-Konzentrationen in unterschiedlichen Zellsystemen. So wurden in humanen Erythrozyten Konzentrationen von 16nM, in Hepatozyten der Ratte von 4,5nM und in E.coli von 2,5nM gemessen (Churamani et al, 2004). Stimulationsexperimente haben ergeben, dass die endogene NAADP-Konzentration aufgrund eines physiologischen Agonisten ansteigt (Masgrau et al, 2003). In pankreatischen Acinuszellen der Maus konnte nach Stimualtion mit Cholecystokinin ebenfalls eine NAADP-Erhöhung gemessen werden. Es zeigte sich, dass es innerhalb weniger Sekunden nach der Cholecystokinin-Zugabe zu einem signifikanten Anstieg kam (Yamasaki et al, 2005). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass NAADP an der Initiierung des Calciumsignals beteiligt ist. Nach der Stimulation der Zellen kommt es zunächst zur Bildung von NAADP. Es entsteht ein kleines, lokal begrenztes Ca^{2+} -Signal. Dieses kleine Ca^{2+} -Signal führt zur Sensibilisierung der InsP_3 - und Ryanodin-Rezeptoren im ER (Cancela et al, 2000) und es wird dadurch eine weitere Ca^{2+} -Freisetzung eingeleitet, welche dann zur Bildung eines globalen Ca^{2+} -

Signals führt (Bak et al, 2002). Durch die Bestimmungen der basalen NAADP-Konzentrationen und den Nachweis, dass NAADP aufgrund eines physiologischen Stimulus ansteigt, wurde NAADP allgemein als Ca^{2+} -freisetzender sekundärer Botenstoff anerkannt (Yamasaki et al, 2005; Masgrau et al, 2003 und Liu et al, 2005).

Neben der Funktion von NAADP, das initiale Signal in der sogenannten Schrittmacherphase des Ca^{2+} -Signalsystems zu vermitteln, gibt es auch Berichte über andere Interaktionen von NAADP mit dem Signalsystem der Zelle. Billington und Kollegen konnten zeigen, dass extrazelluläres [^{32}P]NAADP aktiv über die Plasmamembran von RBL-2H3 Zellen transportiert wird. Es handelt sich hierbei um eine basophile Zelllinie der Ratte. Die extrazellulären NAADP-Zugaben führten in den Zellen zu einer Ca^{2+} -Freisetzung. Da NAADP bei einem physiologischen pH-Wert vier negative Ladungen besitzt, ist es eher unwahrscheinlich dass es sich um einen passiven Transport handelt. Eine Aufnahme durch Mechanismen wie Phagozytose oder Pinozytose konnte durch Verdrängungsversuche mit einer Kombination aus [^{32}P]NAADP und kaltem NAADP ausgeschlossen werden. Spezifische Transportmechanismen sind eine Voraussetzung für Botenstoffe, um in autokriner oder parokriner Weise wirksam zu sein (Billington et al, 2006).

Ein Zusammenhang zwischen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und Vorgängen wie der Änderung der Transkription, die eine Voraussetzung für Prozesse wie Proliferation und Differenzierung sind, ist durch das Vorhandensein Ca^{2+} -abhängiger Transkriptionsfaktoren wie CREB und NFAT (Shaywitz AJ und Greenberg ME, 1999) allgemein anerkannt. Durch ein Abpuffern der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konnte in Zellsystemen wie Neuronen (Gu X und Spitzer NC, 1995), Keratinozyten (Li L et al, 1995) und Myozyten (Ferrari M et al, 1996) eine Differenzierung unterbunden werden. Es gibt jedoch nur wenig Informationen über den direkten Einfluss der Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffe bei Vorgängen wie der Differenzierung. In PC 12 Zellen der Ratte, einem Zellsystem für neuronale Differenzierung, führte eine NAADP-Zugabe zu starken morphologischen Veränderungen, die ein deutliches Zeichen für Differenzierung sind. Extrazelluläre Gaben von InsP_3 waren nicht in der Lage, diese morphologischen Veränderungen hervorzurufen (Brailoiu et al, 2006). Es gibt auch Arbeiten, die belegen, dass NAADP das Wachstum von Neuronen verstärkt (Brailoiu et al, 2005) und an der Modulation der Neurotransmission beteiligt ist (Chameau et al, 2001). Es ist auch berichtet worden, dass extrazelluläre Zugaben von NAADP zu einer Aktivierung des P2Y_{11} -Rezeptors führen (Moreschi et al, 2008). Die Aktivierung dieses Rezeptors, die auch über NAD ablaufen kann (Moreschi et al, 2006), ist in unterschiedliche Regulationsmechanismen involviert:

- a) Es kommt zu einer Aktivierung der Adenylat-Cyclase und zu einem Anstieg der zytosolischen cAMP-Konzentration.
- b) Über die Proteinkinase A kommt es zu einer Aktivierung von CD38, was einer Erhöhung der cADPR-Konzentration und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ einleitet. Dies führt unter anderem zu einer Aktivierung von Granulozyten..

Durch die Möglichkeit der Aktivierung des P2Y_{11} -Rezeptors kann NAD und auch NAADP der Status eines proinflammatorischen Cytokins zugesprochen werden, welches regulierend auf das Immunsystem einwirkt (Moreschi et al, 2008).

Um die physiologische Relevanz dieses Vorgangs zu erhärten, sind noch weitere Experimente erforderlich, da in den beschriebenen Versuchen mit sehr hohen NAADP-Konzentrationen gearbeitet wurde.

1.9 Die Identität des NAADP-Rezeptors

Trotz der grossen Fortschritte auf dem Gebiet der NAADP-vermittelten Signaltransduktion, gibt es immer noch Vorgänge, die noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Ein Punkt der seit Jahren kontrovers diskutiert wird, ist die Identität des Rezeptors, über den NAADP Ca^{2+} -freisetzt. Es gibt unterschiedliche Experimente in Seeigeleiern, die darlegen, dass NAADP die Ca^{2+} -Freisetzung über einen vom Ryanodin-Rezeptor pharmakologisch differenzierbaren Ca^{2+} -Kanal ausübt (Lee et al, 1995; Genazzani et al, 1997 und Churchill und Galione, 2001). An gereinigten Mikrosomen aus Nieren- und Herzgewebe konnte eine Ca^{2+} -Freisetzung festgestellt werden, die ebenfalls unabhängig vom Ryanodin-Rezeptor ist (Bak et al, 1999). Auf der anderen Seite gibt es auch Experimente, die eine Ca^{2+} -Freisetzung aufgrund einer Wechselwirkung zwischen NAADP und dem Ryanodin-Rezeptor nahelegen. Durch elektrophysiologische Einzelkanalmessungen an künstlichen Lipidschichten konnte gezeigt werden, dass die Ryanodin-Rezeptoren 1 und 2 direkt durch NAADP reguliert werden. Die pharmakologische Inhibition des Ryanodin-Rezeptors durch Ruthenium-Rot und Ryanodin unterdrückte die NAADP-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung (Mojsisova et al, 2001). Dieser Effekt wurde auch an Mikrosomen aus dem Skelettmuskel (Hohenegger et al, 2002) sowie an pankreatischen Acinuszellen (Gerasimenko et al, 2003) beschrieben. Auch in T-Lymphozyten konnte belegt werden, dass die NAADP-vermittelte Ca^{2+} -Mobilisierung über den Ryanodin-Rezeptor verläuft. Durch Co-Injektionen von Ruthenium-Rot, einem Antagonisten des Ryanodin-Rezeptors, konnte das NAADP-vermittelte Ca^{2+} -Signal unterdrückt werden (Langhorst et al, 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass T-Lymphozyten, in denen die Expression der Ryanodin-Rezeptoren durch einen antisenseRNA-Ansatz reduziert wurde, nach Injektion von NAADP keine Ca^{2+} -Signale bilden (Langhorst et al, 2004 und Dammermann und Guse, 2005).

1.10 NAADP und der Ca^{2+} -Speicher

Ein weiterer Punkt, der seit Jahren kontroverse Diskussionen verursacht, ist die Identität des Speichers, aus dem NAADP Ca^{2+} freisetzt. Diese Diskussion ist unmittelbar mit der Aufklärung der molekularen Identität des NAADP-sensitiven Rezeptors verknüpft. Auf der einen Seite wird das Modell vertreten, dass der NAADP-abhängige Speicher in Seeigeleiern ein saures, lysosomartiges Kompartiment darstellt (Chini et al, 1995; Lee HC und Aarhus R, 1995 und Churchill et al, 2002). Nach diesem Modell bindet NAADP an einen NAADP-Rezeptor, der sich auf einem solchen Kompartiment befindet und es kommt zu einer Ca^{2+} -Freisetzung. Diese kleine, lokal begrenzte Ca^{2+} -Freisetzung führt zu einer Sensibilisierung der InsP_3 - und Ryanodin-Rezeptoren, die sich auf dem ER befinden. Dies bewirkt einen Austritt von Ca^{2+} aus dem ER (Cancela et al, 1999 und Cancela

et al, 2000). Dieser Mechanismus wird als CICR [*Ca²⁺ induced Ca²⁺-release*] bezeichnet (Bak et al, 2002). Eine Entleerung oder Zerstörung dieser sauren Kompartimente führt zu einer Inhibition des NAADP-vermittelten Ca²⁺-Signals. Eine Inkubation mit Bafilomycin A1 bewirkte eine Inhibition der ATP abhängigen Protonenpumpen auf lysosomartigen Kompartimenten (Churchill et al, 2002). Der Einsatz von GPN (Glycyl-phenylalanin-2-naphtylamid) induziert eine Zerstörung der lysosomartigen Kompartimente. GPN ist zunächst membranpermeabel, lagert sich in sauren Kompartimenten an und wird dort durch das lysosomale Enzym Cathepsin C hydrolysiert. Die Anreicherung der membranimpermeablen Produkte führt zu einer osmotischen Lyse der Organellen (Jadot et al, 2001). Die Abhängigkeit des NAADP-vermittelten Ca²⁺-Signals von den sauren, lysosomartigen Kompartimenten konnte durch die Verwendung der beschriebenen Pharmaka in Seeigelleiern (Churchill et al, 2002) und in Säugetierzellen (Kinnear et al, 2004; Yamasaki et al, 2004 und Brailoiu et al, 2005) beschrieben werden.

In humanen T-Lymphozyten hingegen konnte keine Abhängigkeit NAADP-vermittelter Ca²⁺-Signale von sauren Kompartimenten festgestellt werden. Eine Inkubation der Lymphozyten mit GPN inhibierte sowohl das NAADP vermittelte- als auch das cADPR- und InsP₃-vermittelte Ca²⁺-Signal und erwies sich für diese Untersuchungen als unspezifisch. Eine Inkubation mit Bafilomycin A1 hatte keine inhibitorische Wirkung auf das durch NAADP eingeleitete Ca²⁺-Signal. Eine pharmakologisch induzierte Entleerung des ER durch Thapsigargin (Nakano et al, 2006) inhibierte das NAADP-vermittelte Ca²⁺-Signal fast vollständig (Steen et al, 2006).

Es existieren somit zur Zeit zwei unterschiedliche Modelle. Zum einen konnte gezeigt werden, dass NAADP an einen vom Ryanodin-Rezeptor differenzierbaren Ca²⁺-Kanal bindet und Ca²⁺ aus einem Lysosom-ähnlichen Kompartiment mobilisiert, was dann zu einer Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER führt (Genazzani et al, 1997 und Churchill et al, 2002). Dieses Modell wird als Zwei-Pool-Modell bezeichnet (Yamasaki et al, 2005). In humanen T-Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass für eine Ca²⁺-Freisetzung durch NAADP der Ryanodin-Rezeptor und das ER erforderlich sind. Es kommt somit zu einer initialen Ca²⁺-Mobilisierung über den Ryanodin-Rezeptor, die dann durch in der Nähe liegende InsP₃- und Ryanodin-Rezeptoren amplifiziert wird (Hohenegger et al, 2002 und Dammermann und Guse, 2005). Dieser Vorgang wird als Ein-Pool-Modell bezeichnet.

1.11 Der Metabolismus von NAADP

Sekundäre Botenstoffe entfalten nur dann ihre physiologische Wirkung wenn sie in enzymatisch regulierter Form gebildet und wieder abgebaut werden können. Die Vermessung der Zeitverläufe aus den pankreatischen Acinuszellen haben gezeigt, dass es innerhalb weniger Sekunden zu einer starken Erhöhung kommt, die ebenso schnell wieder abfiel. Für die Bildung und für den Abbau müssen somit effiziente Enzymsysteme zur Verfügung stehen. Im Zusammenhang mit der NAADP-Bildung wird häufig über eine mögliche Beteiligung von CD38 diskutiert (De Flora et al, 2004 und Graeff et al, 2006). CD38 wurde 1980 als Oberflächenantigen auf T-Lymphozyten entdeckt (Reinherz et al, 1980).

Durch einen Vergleich von Proteinsequenzen wurde dann die Ähnlichkeit zu der ADP-Ribosyl-Cyclase aus *Aplysia californica* festgestellt. CD38 gehört zur Gruppe der Typ II Transmembran-Glykoproteine (Metha et al, 1996) und stellte sich in den letzten Jahren als multifunktionelles Enzym heraus. CD38 katalysiert die Umwandlung von NAD zu cADPR (Lee, 2006). Weiterhin ist CD38 in der Lage NAD in ADPR umzuwandeln. Arbeiten von Lund und Kollegen haben gezeigt, dass etwa 97% des NAD zu ADPR und ein nur sehr kleiner Teil zu cADPR umgewandelt wird. CD38 katalysiert auch die Hydrolyse von cADPR zu ADPR (Lund et al, 1998). Diese multifunktionellen Umsetzungen sind abhängig von dem pH-Wert. Das pH-Optimum für die cADPR- und ADPR-Bildung liegt im neutralen bis alkalischen Bereich, während die Bildung von NAADP bevorzugt im sauren pH-Bereich abläuft (Lee, 2006).

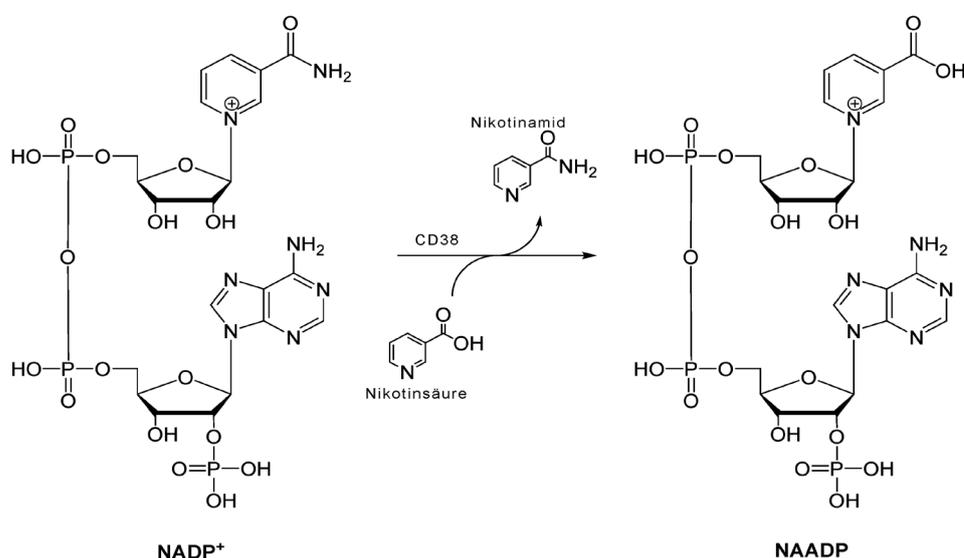


Abb.1.4: Enzymatische Bildung von NAADP durch die Basenaustauschreaktion

Die ADP-Ribosylcyclase CD38 tauscht die Nikotinamid-Gruppe gegen eine Nikotinsäure-Gruppe aus

Bei der CD38-vermittelten Synthese von NAADP wird die Nikotinamid-Gruppe von NADP gegen eine Nikotinsäure-Gruppe ausgetauscht. Es gibt jedoch auch Punkte am Modell der Basenaustausch-Reaktion, die gegen eine Beteiligung von CD38 bei der Synthese von NAADP sprechen. CD38 ist, wie schon erwähnt, ein Ektoenzym, was bedeutet, dass sich die Edukte der Reaktion und das katalytische Zentrum des Enzyms nicht auf der selben Seite der Zellmembran befinden. Dieser Umstand wird, wie bei der Bildung von cADPR auch, als topologisches Paradoxon bezeichnet (Zocchi et al, 1999). Es sind jedoch noch keine Transportproteine identifiziert worden, die die schnelle Bildung und den schnellen Abbau aus den Zeitverläufen der pankreatischen Acinuszellen (Yamasaki et al, 2005) erklären könnten. Das pH-Optimum der Basenaustausch-Reaktion liegt mit pH 5 in einem eher unphysiologischen Bereich und für die Umsetzung sind Nikotinsäure-Konzentrationen erforderlich, die unter normalen Umständen so nicht in Zellen vorliegen (Graeff et al, 1998). 2006 haben Soares und Kollegen durch NAADP-Messungen in Geweben von CD38 Knock out-Mäusen zeigen können, dass diese Tiere keine erniedrigten NAADP-Konzentrationen aufweisen (Soares et al, 2006). Welchen Einfluss CD38 auf

die endogene NAADP-Konzentration in humanen Zellen hat, ist jedoch noch nicht klar. Im Zusammenhang mit der zellulären NAADP-Synthese sind auch Reaktionen diskutiert worden, die nicht über ADP-Ribosyl-Cyclase laufen. Es ist postuliert worden, dass die Bildung über eine Desaminase ablaufen könnte, wobei NADP unter Freisetzung von NH_3 in NAADP umgewandelt wird (Chini et al, 1995). Weiterhin ist die Möglichkeit einer NAAD-Phosphorylierung durch eine 2'-Kinase erörtert worden (Lerner et al, 2001). Es konnten jedoch noch keine Enzyme identifiziert werden, die die entsprechenden Substrate für eine NAADP-Bildung akzeptieren. Der Abbau von NAADP ist ebenfalls noch unklar. Es ist zum einen über eine CD38-vermittelte Hydrolyse von NAADP diskutiert worden. Bei dieser Reaktion wird NAADP zu Nikotinsäure und ADPRP hydrolysiert (Graeff et al, 2006). Es gibt jedoch keine Experimente, die diese Hypothese auf zellulärer Ebene unterstützen. Weiterhin wird eine Dephosphorylierung von NAADP zu NAAD in Betracht gezogen. Eine Dephosphorylierung von NAADP konnte in Herz- (Chini et al, 1995) und in Leberpräparaten (Chini und Dousa, 1995) gemessen werden. Enzyme, die diese Reaktion katalysieren sind jedoch noch nicht identifiziert worden.

Zusammenfassend konnte dargestellt werden, dass NAADP eine wichtige Funktion in der Ca^{2+} -vermittelten Signaltransduktion ausübt und seit seiner Entdeckung die potenteste Ca^{2+} -freisetzende Substanz darstellt. Die zentrale Rolle dieses Botenstoffes zeigt sich unter anderem dadurch, dass in T-Lymphozyten die Inaktivierung des NAADP-Signalsystems ebenfalls eine Inaktivierung des cADPR- und des InsP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Signalsystems einleitet. Es konnte in unterschiedlichen Zellsystemen gezeigt werden, dass die NAADP-Konzentration nach einem physiologischen Stimulus ansteigt. Diese NAADP-Erhöhung führt zur Bildung eines lokal begrenzten Ca^{2+} -Signals, welches an der Initiierung der Ca^{2+} -Signale in der Schrittmacherphase des Ca^{2+} -Signalsystems beteiligt ist. Diese zytosolische Ca^{2+} -Erhöhung führt unter anderem zu einer Aktivierung von Genen und den damit verbundenen Prozessen wie Differenzierung und Proliferation, die besonders in T-Lymphozyten von Bedeutung sind. Zu den Bereichen des NAADP-Signalsystems, die noch unverstanden sind, gehören die Bildung und der Abbau von NAADP. Durch die Beteiligung von NAADP in so unterschiedlichen Bereichen der Signaltransduktion, sind noch weiterführende Experimente für ein besseres Verständnis über diesen Botenstoff notwendig.

2 Problemstellung

Die Untersuchung von intrazellulären Botenstoffen ist wichtig für das Verständnis, wie extrazelluläre Signale integriert werden und dadurch die zellulären Reaktionen beeinflussen. Das Ca^{2+} -Signalsystem ist, wie in der Einleitung beschrieben, an vielen wichtigen Abläufen beteiligt. Hierzu gehören Prozesse wie die Genaktivierung, die Differenzierung und die Proliferation, die besonders bei T-Lymphozyten von Bedeutung sind. Die Art der Stimulation und das daraus entstehende Ca^{2+} -Signal entscheidet darüber, ob T-Lymphozyten zu proliferieren beginnen oder in die Apoptose gehen. Durch das Wissen über die Konzentrationsverhältnisse der Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffe, können solche komplexen Vorgänge besser verstanden werden.

Ein Teilprojekt dieser Arbeit war es, die endogenen Konzentrationen von NAADP in humanen T-Lymphozyten mit Hilfe eines enzymatischen Cycling-Assays zu bestimmen. Es sollte herausgefunden werden, ob NAADP die Kriterien eines sekundären Botenstoffes erfüllt. Um dies zu klären, sollte ermittelt werden, ob die NAADP-Konzentration nach einer Stimulation über den TCR/CD3-Komplex ansteigt. Von besonderem Interesse waren hierbei die Konzentrationsverhältnisse unmittelbar nach der Stimulation, da Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen darauf hingewiesen haben, dass NAADP einen maßgeblichen Einfluss auf die Entstehung des Ca^{2+} -Signals hat. Weiterhin war von Interesse, wie sich die NAADP-Konzentration durch unterschiedliche Stimulationszeiten und durch steigende Antikörperkonzentrationen ändert. Durch die Verwendung verschiedener Agonisten und Pharmaka sollte die Spezifität der NAADP-Erhöhung ermittelt werden.

Der zweite Schwerpunkt der Arbeit lag auf dem Metabolismus von NAADP. Um zu klären, ob die ADP-Ribosyl-Cyclase CD38, wie in unterschiedlichen Veröffentlichungen postuliert wird, in die Synthese des Botenstoffes involviert ist, sollten durch einen shRNA-Ansatz stabile CD38 Knock down-Klone etabliert werden. Neben den endogenen NAADP-Konzentrationen waren auch die zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen in den Klonen von Interesse, weil die Bildung der Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffe cADPR, ADPR und NAADP zumindestens in vitro über CD38 verlaufen kann. Weiterhin sollten NAADP-Messungen in Geweben von CD38 Knock out-Mäusen durchgeführt werden, um eine Synthese des Botenstoffes durch eine eventuelle Restaktivität in den Knock down-Klonen auszuschließen.

Es sollten auch HeLa-wt Zellen, die CD38 negativ sind, und HeLa-Zellen, in denen CD38 zur Überexpression gebracht wurde, vermessen werden. Durch die Vermessung der etablierten Knock down-Klone, der Knock out-Gewebe und der CD38^{pos} -HeLa-Zellen sollte Gewissheit über den Einfluss von CD38 auf die NAADP-Bildung erlangt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Die folgenden Versuche wurden unter der Verwendung des Subklons JMP der Jurkat Zelllinie und unter Verwendung von HeLa-Zellen durchgeführt. Weiterhin wurden zelluläre NAADP-Konzentrationen in verschiedenen Geweben von WT Mäusen und CD38-Knock out Mäusen gemessen. Es wurden hierfür die Organe (Herz, Thymus und Milz) unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

3.1.1 Jurkat T-Lymphozyten

Die Jurkat-Zellen wurden aus dem Blut eines an akuter lymphatischer Leukämie (ALL) erkrankten Patienten isoliert (Schneider et al, 1977). Der in dieser Arbeit verwendete Subklon JMP zeichnet sich durch eine hohe Expression des Oberflächenantigens CD3 aus, welcher ein Bestandteil des T-Zell-Rezeptorkomplexes ist. Die in Suspension wachsenden JMP-Zellen wurden bei 5% CO_2 und 37°C im CO_2 -Inkubator gehalten. Alle zwei bis drei Tage wurde die Zelldichte bestimmt und mit frischem Komplettmedium so eingestellt, dass die Dichte der Suspension zwischen $0,3 \cdot 10^6$ und $1,2 \cdot 10^6$ Zellen/ml lag. Die im Verlauf dieser Arbeit hergestellten Jurkat-Klone wurden nach der Transfektion für zwei Wochen in Selektionsmedium gehalten, und anschließend in RPMI-Medium II kultiviert.

3.1.2 Auftauen von Jurkat T-Lymphozyten

Zum Auftauen von Jurkat-Zellen wurden Kryoröhrchen mit den entsprechenden Zellen dem Stickstofftank entnommen und bei 37°C in Ethanol erwärmt. Die angetauten Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer Kulturfläche von 25cm^2 gegeben, in welche RPMI-Komplettmedium bei Jurkat-WT oder RPMI-Medium II bei transfizierten Zellen vorgelegt wurde. Die Zellen wurden dann im CO_2 -Inkubator kultiviert und bei Erreichen einer Zelldichte von $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml mit Medium wie beschrieben (3.1.1) verdünnt.

3.1.3 Einfrieren von Jurkat T-Lymphozyten

Jurkat-Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10^7 Zellen / ml in Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen aliquotiert, bei -80°C über Nacht eingefroren und dann im flüssigen Stickstoff gelagert.

3.1.4 HeLa-Zellen

Die HeLa-Zellen wurden 1951 einer am Zervixkarzinom erkrankten Patientin entnommen (Scherer et al, 1953). Bei den Zellen handelt es sich um Epithelzellen, welche mit dem humanen Papillomvirus 18 (HPV-18) infiziert waren und dadurch zu Tumorzellen entarteten. Es wurde in dieser Arbeit zum einen mit HeLa Wildtyp- (Wt) Zellen gearbeitet, welche ursprünglich vom ATCC (Rochville, MD) bezogen wurden. Desweiteren wurde mit CD38-transfizierten HeLa-Zellen [Zocchi et al, 1998] gearbeitet, welche freundlicherweise von Prof. Antonio De Flora (Institut für Biochemie, Zentrum für Experimentelle Medizin, Universität Genua, Italien) zur Verfügung gestellt wurden. Die adhärent wachsenden HeLa-Zellen wurden bei 5% CO₂ und 37°C im CO₂-Inkubator gehalten und alle drei bis vier Tage bei Erreichen der Konfluenz mit Trypsin gelöst und mit DMEM-Komplettmedium 1:10 verdünnt.

3.1.5 Auftauen von HeLa-Zellen

Die Zellen lagerten, aliquotiert in Kryoröhrchen, in flüssigem Stickstoff. Bei Bedarf wurde ein Röhrchen bei 37°C im Ethanolbad aufgetaut. Die Zellen wurden dann in eine Zellkulturflasche mit einer Kulturfläche von 25cm² gegeben, in welche 10ml vorgewärmtes DMEM-Komplettmedium vorgelegt wurde. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen trypsiniert und mit DMEM-Komplettmedium 1:10 verdünnt oder für Zellaufarbeitungen expandiert.

3.1.6 Einfrieren von HeLa-Zellen

Es wurden Zellen mit einer Dichte von 4×10^7 / ml in Einfriermedium aufgenommen, in Kryoröhrchen aliquotiert, über Nacht bei -80°C eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.1.7 Verwendete Geräte: *Zellkultur*

Sterile Werkbank	BDK, Sonnenbrühl-Genkingen
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Hanau
Wasserbad Thermomix UB	Braun, Melsungen
Casy 1 TT Zellzähler	Schärfesystem, Reutlingen
Variofuge 3 OR	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop	Will, Wetzlar

3.1.8 Medien für Jurkat-Zellen

RPMI-Komplettmedium

- RPMI-1640 mit Glutamax I mit HEPES Invitrogen, Gibco, Karlsruhe
- new born calfserum, (NCS) 7.5%, 30 min. bei 56°C inaktiviert Biochrom AG, Berlin
- Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration: 50µg/ml) Invitrogen, Gibco, Karlsruhe

RPMI-Medium II

- RPMI-1640 mit Glutamax I mit HEPES Invitrogen, Gibco, Karlsruhe
- New born calfserum, (NCS) 7.5%, 30 min. bei 56°C inaktiviert Biochrom AG, Berlin
- Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration: 50µg/ml) Invitrogen, Gibco, Karlsruhe
- G418 (gelöst in RPMI-1640, steril filtriert (Endkonzentration = 400µg/ml) Biochrom AG, Berlin
- Natriumpyruvat, steril filtriert Endkonzentration = 1mM Invitrogen, Gibco, Karlsruhe

Einfriermedium: Jurkat-Zellen

- fetal calf serum (FCS)(v/v = 90%) Biochrom AG, Berlin
- DMSO, (v/v = 10%) Sigma, München

Selektionsmedium: Jurkat-Zellen

- RPMI-1640 mit Glutamax I mit HEPES Invitrogen, Gibco, Karlsruhe
- New born calfserum, (NCS) 7.5%, 30 min. bei 56°C inaktiviert Biochrom AG, Berlin
- Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration: 50µg/ml) Invitrogen, Gibco, Karlsruhe
- G418 (gelöst in RPMI-1640, steril filtriert (Endkonzentration = 800µg/ml) Biochrom AG, Berlin
- Natriumpyruvat, steril filtriert Endkonzentration = 1mM Invitrogen, Gibco, Karlsruhe

Kristallmedium

- RPMI-1640 ohne L-Glutamin und ohne Phenol-Rot Invitrogen, Gibco, Karlsruhe
- New born calfserum, (NCS) 7.5%, 30 min. bei 56°C inaktiviert Biochrom AG, Berlin

3.1.9 Medien für HeLa-Zellen

DMEM-Komplettmedium

- DMEM +Glutamax I mit 4,5g/l Glucose Invitrogen, Gibco, Karlsruhe
- Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration: 50µg/ml) Invitrogen, Gibco, Karlsruhe
- fetal calf serum, (FCS) Biochrom AG, Berlin
- 10%, 30 min. bei 56°C inaktiviert Invitrogen, Gibco, Karlsruhe

Einfriermedium

- fetal calf serum (FCS) (v/v = 90%) Biochrom AG, Berlin
- DMSO (v/v = 10%) Sigma, München

Trypsin-EDTA (L2153)

Biochrom AG, Berlin

PBS (Ca²⁺ und Mg²⁺ frei)

- NaCl (140mM) Sigma, München
 - KCl (3mM) Merck, Darmstadt
 - Na₂HPO₄ x H₂O (8mM) Merck, Darmstadt
 - KH₂PO₄ (1,5mM) Merck, Darmstadt
- Der Puffer wird mit HCl auf pH 7,4 eingestellt

3.2 Molekularbiologische Arbeitsschritte

3.2.1 Erzeugung von transformationskompetenten *E.coli* XL1-blue

Die *E.coli*-Bakterien wurden bei -80°C gelagert. Zur Erzeugung von transformationskompetenten Bakterien wurde ein Aliquot aufgetaut und auf einer LB-Tetracyclin-Platte ein Verdünnungsausstrich durchgeführt. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht. 5ml tetracyclinhaltiges LB-Medium wurden mit einem einzelnen Klon des Verdünnungsausstriches angeimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator über Nacht inkubiert (Über-Nacht-Kultur).

50ml tetracyclinhaltiges LB-Medium wurden mit 500 μ l der Über-Nacht-Kultur angeimpft und dann auf einen Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert, bis die Dichte der Zellen 4-7 x 10⁷/ ml (OD₆₀₀ = 0,6) betrug. Die Zellen wurden daraufhin für 15 Minuten auf Eis gestellt und bei 1000x g bei 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 17ml eines RbCl-haltigen Puffers (RF-1) resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 Minuten bei 1000x g und 4°C wurde das Pellet in 4ml RF-2 Puffer resuspendiert und erneut für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Volumen von 100 μ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert

3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Herstellung von 1%igen Gelen (w/v) wurde die Agarose in 50ml 1xTAE-Puffer aufgekocht. Die Lösung wurde mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,4 μ g/ml versetzt und in die Gelkammern gegossen. Nach dem Abkühlen wurden die Gießsperrn und der Kamm entfernt, das Gel mit 1xTAE-Puffer überschichtet und dann die mit 6xLadungspuffer (Fermentas) versetzten Proben aufgetragen. Als Größen-Marker wurden der GeneRuler™100bp DNA Ladder (Fermentas) und der MassRuler™DNA Ladder, High Range (Fermentas) verwendet. Die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde für eine Stunde bei 80V durchgeführt. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 321nm.

3.2.3 Auswahl der shRNA-Sequenzen zum CD38-Knock down

Um geeignete Zielsequenzen für die Expressionsverminderung von CD38 zu erhalten, wurde die CD38 cDNA mit der Acc. No BC007964 in die öffentlichen web-basierten Programme GenSript und siDirect eingegeben. Beide Programme (GenSript: <http://genscript.com> und siDirect: <http://design.RNAi.jp>) wurden mit den empfohlenen Standard-Parametern verwendet. Aus den zur Auswahl stehenden Sequenzen wurden vier für die knock down Experimente verwendet.

3.2.4 Auswahl der Sequenzen für die shRNA Kontroll-Vektoren

Für die Generierung der Kontroll-shRNAs wurde das Programm *siRNA Sequence Scrambler* von GenSript verwendet. Die CD38 cDNA (BC007964) wurde unter Verwendung der Standardparameter in das Programm eingegeben.

Um sicherzustellen, dass die vorgeschlagenen Sequenzen der CD38 Knock down-Inserts keine Sequenzhomologien zu anderen humanen Genen aufweisen, wurde die Existenz entsprechender Homologien in einer Blast-Analyse überprüft (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.2.5 Konstruktion der shRNA-Inserts

Die Oligonukleotide, welche die Inserts für die knock down-Vektoren und die Kontrollvektoren bilden, wurden von der Firma MWG bezogen. Der obere und der untere Strang der Inserts wurden jeweils in zwei Segmenten bestellt. Dies wurde zum einen so durchgeführt, weil es sehr viel einfacher ist zwei kürzere Inserts in einen Vektor zu ligieren als ein längeres, zusammenhängendes Fragment. Zum anderen gewährt MWG für Oligonukleotide mit einer Länge von über 50 Basen keine Garantien für die Richtigkeit der Sequenzen. Die Überhänge der beiden einzelnen Inserts waren so gewählt, dass sie sich beim Annealing durch komplementäre Basenpaarung zum vollständigen Insert zusammenfügen.

Damit die T4-DNA-Ligase die shRNA-Inserts in den Vektor ligieren kann, ist es erforderlich, dass sich an den 5'-Enden Phosphatgruppen befinden. Weil der Vektor in phosphorylierter Form vorlag, mussten nur die Insertfragmente, welche sich im Mittelteil befinden, am 5'-Ende mit Phosphatgruppen zu versehen. Die unphosphorylierten Insertfragmente wurden in HPSF-Reinheit und die 5'-phosphorylierten Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigter Form bestellt.

3.2.6 shRNA-Inserts für den CD38 knock down

Oligonukleotide: si 270

si 270 oberer Strang A

5'- GATCCGCCTGAGATGAGACATGTATATT -3'

si 270 oberer Strang B

5'- pCAAGAGATCTACATGTCTCATCTCAGGTTTTTTACGCGTG -3'

si 270 unterer Strang A

5'- AATTCACGCGTAAAAACCTGAGATGAGACATGTAGATCT -3'

si 270 unterer Strang B

5'- pCTTGAATATACATGTCTCATCTCAGGCG - 3'

Oligonukleotide: si 394

si 394 oberer Strang A

5` - GATCCGCCGTACCTTGCAACAATATTT - 3`

si 394 oberer Strang B

5` - pCAAGAGAATCTTGTTGCAAGGTACGGTTTTTTACGCGTG - 3`

si 394 unterer Strang A

5` - AATTCACGCGTAAAAAACCGTACCTTGCAACAAGATTCT - 3`

si 394 unterer Strang B

5` - pCTTGAAATATTGTTGCAAGGTACGGCG - 3`

Oligonukleotide: si 458

si 458 oberer Strang A

5` - GATCCGTCCAGCGGGACATGTTAATT - 3`

si 458 oberer Strang B

5` - pCAAGAGATGAACATGTCCCGCTGGACTTTTTTTACGCGTG - 3`

si 458 unterer Strang A

5` - AATTCACGCGTAAAAAAGTCCAGCGGGACATGTTCATCT - 3`

si 458 unterer Strang B

5` - pCTTGAATTAACATGTCCCGCTGGACG - 3`

Oligonukleotide: si 771

si 771 oberer Strang A

5` - GATTCGGTGATACATGGTGGAAGATATT - 3`

si 771 oberer Strang B

5` - pCAAGAGATCTCTCCACCATGTATCACCTTTTTTTACGCGTG - 3`

si 771 unterer Strang A

5` - AATTCACGCGTAAAAAAGGTGATACATGGTGGAAGAGATCT - 3`

si 771 unterer Strang B

5` - pCTTGAATATCTTCCACCATGTATCACCG - 3`

3.2.7 shRNA-Inserts für die Kontroll-Klone

Oligonukleotide: si 270 scramble

si 270 scramble oberer Strang A

5` - GATCCCAGCGGATTCAATGTATAAGGTT -3`

si 270 scramble oberer Strang B

5` - pCAAGAGACCTTATACATTGAATCCGCTGTTTTTTACGCGTG -3`

si 270 scramble unterer Strang A

5` - AATTCACGCGTAAAAACAGCGGATTCAATGTATAAGGTCT -3`

si 270 scramble unterer Strang B

5` - pCTTGAACCTTATACATTGAATCCGCTGG -3`

Oligonukleotide: si771 scramble

si 771 scramble oberer Strang A

5` - GATCCGAAGGCGATTGAGTAGAATTGTT -3

si 771 scramble oberer Strang B

5` - pCAAGAGACAATTCTACTCAATCGCCTTCTTTTTTACGCGTG -3`

si 771 scramble unterer Strang A

5` - AATTCACGCGTAAAAAGAAGGCGATTGAGTAGAATTGTCT -3`

si 771 scramble unterer Strang B

5` - pCTTGAACAATTCTACTCAATCGCCTTCG -3`

3.2.8 Annealing der shRNA-Inserts

Die vier Oligonukleotide, welche zusammen ein vollständiges Insert bilden, wurden in Wasser aufgenommen, so, dass die Endkonzentration eines jeden Oligonukleotids 100µM betrug. Die zusammengehörigen Fragmente (oberer Strang A + unterer Strang B = linkes Fragment, oberer Strang B + unterer Strang A = rechtes Fragment) wurden zu gleichen Teilen gemischt. Das Annealing wurde in einem Mastercycler personal (Eppendorf) unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

30sec	95°C
2min	72°C
2min	37°C

Die Oligonukleotide wurden dann auf 25°C abgekühlt.

3.2.9 Ligation der shRNA-Inserts in den Vektor pSIREN RetroQ

Die Inserts wurden in den Vektor pSIREN RetroQ (BD Clontech) mit folgendem Ansatz eingefügt.

1 μ l	Vektor (25 μ g/ml)
2,5 μ l	linkes Fragment (5 μ M)
2,5 μ l	rechtes Fragment (5 μ M)
2,5 μ l	Y ⁺ /Tango Puffer 10* (Fermentas)
1,25 μ l	ATP (10mM)
2 μ l	T4 DNA-Ligase (1 weiß-unit/ μ l)
13,25 μ l	vollentsalztes Wasser

Die Ansätze wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.10 *E.coli*-Transformation und Aufarbeitung von Plasmid-DNA

Für eine Transformation wurde ein Aliquot mit transformationskompetenten *E.coli* (XL1-blue) auf Eis aufgetaut und der gesamte Ligationsansatz (25 μ l) hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert, für eine Minute auf 42°C erhitzt und anschließend für zwei Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium zum Transformationsansatz, erfolgte eine Inkubation von einer Stunde bei 37°C unter Schütteln. Nach einer 4 minütigen Zentrifugation (2000rpm, RT) wurde das Pellet mit 100 μ l SOC-Medium resuspendiert und auf antibiotikumhaltige Agarplatten ausplattiert. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37°C über Nacht.

Zur Durchführung einer Mini-Präparation wurde 6ml Selektionsmedium mit einem Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde mit dem peQLab Miniprep Kit I (peQLab) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde mit 60 μ l Wasser eluiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

3.2.11 PCR-Amplifikation der shRNA-Fragmente

Um einen geeigneten Vektor für eine stabile Transfektion zu generieren, wurden aus dem Vektor pSIREN RetroQ die vier shRNA-Inserts jeweils zusammen mit dem direkt vor den Inserts liegenden U6-Promotor in den Vektor pDsRed2-C1 umkloniert. Der auf diese Weise erzeugte Vektor (pDsRed2U6-si) hat eine Größe von 5,1 kb und enthält neben dem U6-Promoter, der nach der Transfektion für eine starke Transkription der shRNA-Fragmente sorgt, das DsRed2-Markergen, welches nach der Transfektion eine Identifizierung der Zellen erlaubt.

Zusätzlich trägt der Vektor eine Neomycinresistenz, welche die Selektion der transfizierten Zellen und somit eine Etablierung stabiler Klone ermöglicht. Es wurden folgende Primer für die PCR-vermittelte Amplifikation des U6-Promotors mit dem jeweiligen shRNA-Insert verwendet. Als Vorwärtsprimer wurde der Primer pSIREN RetroQ Mlu left (5'-TAACGCGTGTCTCTCCCCCTTGAACCTC-3') verwendet. Als Rückwärtsprimer wurde der Primer pSIREN RetroQ right (5'-CTACCGGTGGATGTGGAATG-3') verwendet. Durch die Verwendung des Vorwärtsprimers wurden direkt vor dem U6-Promoter am 5'-Ende zwei zusätzliche Basenpaare eingefügt, wodurch eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Mlu I geschaffen wurde. Somit konnten die Amplikons nach der PCR auf beiden Seiten mit dem Enzym Mlu I geschnitten werden, weil die shRNA-Fragmente direkt hinter der Terminatorsequenz für die Polymerase III ebenfalls eine Mlu I-Schnittstelle besitzen. Die Amplifikation für die shRNA-Expressionskassette mit dem Insert si270 wurde mit folgendem Ansatz erstellt. Als Ausgangsmaterial dienen die pSIREN RetroQ Vektoren, bei denen die U6-Promotoren und die shRNA-Inserts durch Sequenzierung auf die richtige Nukleotidabfolge überprüft worden waren.

5 μ l	cloned Pfu Reaktionspuffer 10x (Stratagene)
0,5 μ l	dNTP Mix (jedes Nukleotid 20mM)
5 μ l	pSIREN RetroQ si270 (10ng DNA)
1 μ l	Vorwärtsprimer (20pmol/ μ l)
1 μ l	Rückwärtsprimer (20pmol/ μ l)
1 μ l	Pfu DNA-Turbopolymerase (2,5u/ μ l; Stratagene)
5 μ l	DMSO (Sigma, D-8481)
31,5 μ l	vollentsalztes Wasser

Die PCR wurde in einem Mastercycler personal (Eppendorf) mit folgendem Programm durchgeführt.

1.	95°C	2min
2.	95°C	30sec
3.	55°C	30sec
4.	72°C	1min
5.	Schritt 2-4	29x wiederholen
6.	72°C	10min

Die 10 minütige Inkubation bei 72°C am Ende der PCR wurde durchgeführt, um die DNA-Polymerase zu inaktivieren. Nach der PCR wurde das Amplifikat nach Angaben des Herstellers mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) aufgereinigt und dessen Länge durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft.

3.2.12 Restriktionsverdau des Amplikons si270 und des Vektors pDsRed2-C1

Um das shRNA-Insert in den Vektor pDsRed2-C1 zu klonieren, wurde das Insert mit dem Restriktionsenzym MluI inkubiert, welches auf beiden Seiten des Inserts schneidet.

35 μ l	aufgereinigtes Amplikon (700ng DNA)
6 μ l	R ⁺ -Puffer 10x (Fermentas)
1 μ l	MluI (10u/ μ l; Fermentas)
18 μ l	vollentsalztes Wasser

Der Restriktionsverdau erfolgte für 2,5 Stunden bei 37°C, an dessen Anschluss MluI durch eine Inkubation für 20 Minuten bei 65°C inaktiviert wurde.

Der Restriktionsverdau des Vektors pDsRed2-C1 wurde nach folgendem Ansatz für 4,5 Stunden bei 37°C durchgeführt.

1 μ l	pDsRed2-C1 (1 μ g/ μ l)
2 μ l	R ⁺ -Puffer 10x (Fermentas)
0,5 μ l	MluI (10u/ μ l; Fermentas)
16,5 μ l	vollentsalztes Wasser

Um bei der folgenden Ligation zwischen dem shRNA-Insert und dem geschnittenen Vektor eine Religation des Vektors zu verhindern, wurde der Vektor mit 4,8 u alkalischer Phosphatase (Roche) für zwei Stunden bei 37°C inkubiert, welche durch Aufreinigung des Ansatzes mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) entfernt wurde.

3.2.13 Ligation des shRNA-Inserts si270 in den Vektor pDsRed2-C1

Für die Fertigstellung des Vektors pDsRed2U6-si270 wurde das geschnittene Amplifikat si270 in den geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pDsRed2-C1 kloniert.

3 μ l	pDsRed2-C1 (60ng DNA)
3 μ l	Insert si270 (20ng)
2,5 μ l	R ⁺ -Puffer 10x (Fermentas)
1,25 μ l	ATP (10mM)
2 μ l	T4 DNA-Ligase (1 weiß-unit/ μ l)
13,25 μ l	vollentsalztes Wasser

Der Ligationsansatz wurde für 50 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die *E.coli*-Transformation und Über-Nachtkultur mit anschließender Plasmidisolierung erfolgte wie

unter 3.2.10 beschrieben. Die Agar-Platten und das LB-Medium wurden mit dem Antibiotikum Kanamycin ($30\mu\text{g/ml}$) versetzt. Zur Überprüfung der Ligation wurde eine Agarose-Gelelektrophorese und eine Sequenzierung der Plasmid-DNA durchgeführt. Die Sequenzierung des Vektors erfolgte bei der Firma MWG. Hierfür wurde $1\mu\text{g}$ Plasmid-DNA und der entsprechende Sequenzierungsprimer in einer Endkonzentration von $10\text{pmol}/\mu\text{l}$ mit vollentsalztem Wasser in einem Endvolumen von $20\mu\text{l}$ aufgenommen. Die Sequenzierungsproben wurden in gefrorenem Zustand an folgende Adresse verschickt: MWG Biotech AG, Sequencing Department, Frauenhoferstrasse 22, 82152 Martinsried.

Die Klonierung der anderen Vektoren für den CD38 knock down und die Kontroll-Vektoren wurden über eine andere Klonierungsstrategie durchgeführt, bei dem die Inserts zunächst in den Vektor pGem T Easy (Promega), welcher ein blau/weiss-Screening ermöglicht, zwischenkloniert wurden.

3.2.14 Amplifikation der shRNA-Fragmente si394, si771 und der scramble-Inserts

Der erste Schritt war die Amplifikation des U6-Promotors mit jeweils einem der shRNA-Fragmente. Als Ausgangsmaterial dienen die pSIREN RetroQ-Vektoren (Abschnitt 3.2.10), bei denen die Nukleotidabfolge des U6-Promotors und der shRNA-Expressionskassetten durch Sequenzanalyse bestätigt worden waren. Für die folgenden PCR-Amplifikationen wurde mit der Taq-Polymerase gearbeitet, um A`-Überhänge an beiden Enden der Inserts zu erhalten. Es sind folgende DNA-Konzentrationen für die Amplifikation der shRNA-Expressionskassetten eingesetzt worden: si394 = 45ng DNA, si458 = 40ng , si771 = $52,5\text{ng}$ DNA, si270 scramble = 10ng , si771 scramble = 22ng .

Die PCR-Ansätze waren wie folgt zusammengesetzt:

$5\mu\text{l}$	Taq-Puffer 10 x (Fermentas)
$0,5\mu\text{l}$	dNTP-Mix
$1\mu\text{l}$	Vorwärtsprimer
$1\mu\text{l}$	Rückwärtsprimer
$x\mu\text{l}$	DNA (pSIREN RetroQ)
$1\mu\text{l}$	Taq-Polymerase (Fermentas)
$5\mu\text{l}$	DMSO
$3,3\mu\text{l}$	MgCl_2
$y\mu\text{l}$	vollentsalztes Wasser (ad. $50\mu\text{l}$)

Material & Methoden

Die Amplifikation für das Insert si394 wurde mit folgendem Programm durchgeführt.

1. 95°C 2 min
2. 95°C 1 min
3. 55°C 30 sec
4. 72°C 1 min
5. Schritt 2-4 29x wiederholen
6. 72°C 10min
7. 4°C hold

PCR-Programm für das Fragment si771 und si458

1. 95°C 2 min
2. 95°C 1 min
3. 53°C 30 sec
4. 72°C 1 min
5. Schritt 2-4 29x wiederholen
6. 72°C 10min
7. 4°C hold

PCR-Programm für das Fragment si270 scramble und si771scramble

1. 95°C 2 min
2. 95°C 1 min
3. 54°C 30 sec
4. 72°C 1 min
5. Schritt 2-4 29x wiederholen
6. 72°C 10min
7. 4°C hold

Die amplifizierten shRNA-Expressionskassetten wurden nach der Aufreinigung (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) in den Vektor pGemT Easy (Promega, Madison, USA) ligiert, welcher eine Ampicillinresistenz trägt. Da der Vektor T⁺-Überhänge hat, mussten die Inserts nach der Amplifikation nicht geschnitten werden. Die PCR-Amplifikate wurden mit folgenden DNA-Mengen in den Vektor ligiert: si394 = 80ng, si771 = 40ng, si270scramble = 75ng, si771scramble = 55ng.

Die Ligationsansätze wurden für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

- | | |
|------|--------------------------|
| 10µl | Rapid Ligation Buffer 2x |
| 1µl | pGemT Easy (50ng) |
| 1µl | T4-Ligase |
| xµl | shRNA-Amplifikate |
| yµl | A. bidest. (ad 20µl) |

Es wurde der gesamte Ligationsansatz für die *E. coli*-Transformation verwendet.

Die Farbreaktion für das Blau/weiss-Screening wurde durch Zugabe von 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal, 1% v/v) und Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG, Endkonzentration 15 μ M) induziert. Beide Substanzen wurden direkt vor dem Ausplattieren in 100 μ l des Transformationsansatzes gegeben. Für die folgende Über-Nacht-Kultur wurden nur die weissen Klone verwendet. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte wie unter 3.2.10 beschrieben. Den Agarplatten und dem LB-Medium wurde Ampicillin (100 μ g/ml) zugesetzt. Die shRNA-Expressionskassetten wurden durch eine 90 minütige Inkubation bei 37°C mit dem Restriktionsenzym MluI aus dem Vektor herausgeschnitten. Eine Temperaturerhöhung auf 65°C für 20 Minuten führte zur Inaktivierung des Restriktionsenzym. Dieser Insert/Vektor-Verdau wurde in dieser Form für den nächsten Ligationsansatz verwendet.

3.2.15 Ligation der shRNA-Inserts si394, si771 und der scramble-Inserts in den Vektor pDsRed2-C1

Für die folgende Ligation wurde 90ng des geschnittenen und dephosphorylierten Vektors pDsRed2-C1 (Durchführung 3.2.12) verwendet.

5 μ l	Vektor pDsRed2-C1
15 μ l	Insert/Vektor-Verdau (ca.100ng)
3 μ l	R ⁺ -Puffer 10x (Fermentas)
1,25 μ l	ATP (10mM)
2 μ l	T4 DNA-Ligase (1 weiß-unit/ μ l)
3,75 μ l	vollentsalztes Wasser

Nach einer 90 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, wurde der gesamte Ligationsansatz für eine *E.coli*-Transformation verwendet. Die Agarplatten und das LB-Medium für die Über-Nacht-Kultur mit anschließender Isolation der Plasmid-DNA, waren mit dem Antibiotikum Kanamycin (30 μ g/ml) versetzt. Die Größe der shRNA-Inserts wurde zuerst durch Gelelektrophorese überprüft und die Abfolge der Nukleotide durch eine Sequenzierung bestätigt.

Es konnten folgende Vektoren kloniert werden, die im folgenden nach den Namen der shRNA-Inserts benannt wurden:

CD38 Knock down-Vektoren	Kontroll-Vektoren
pDsRed2U6-si270	pDsRed2U6-si270 scramble
pDsRed2U6-si394	
pDsRed2U6-si771	pDsRed2U6-si771scramble

Tab. 3 : Vektoren für die CD38 Knock down-Experimente

3.2.16 Isolation größerer Mengen an Plasmid-DNA

Um für die Transfektion eukaryotischer Zellen eine ausreichende Menge an Plasmid-DNA zu erhalten, wurden 200ml kanamycinhaltiges LB-Medium mit 200 μ l einer Mini-kultur angeimpft und über Nacht bei 37° im Schüttelinkubator inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Endofree Plasmid-Maxi-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde in 1 ml vollentsalztem Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Für die Sequenzierung der Vektoren wurden folgende Sequenzierungsprimer verwendet:

	Primer für die pSIREN-RetroQ-Vektoren
links: pSIRENRetroQMluI left	5`-(TAACGCGT)GTCTCTCCCCCTTGAACCTC-3`
rechts: pSIRENRetroQ right	5`-CTACCGGTGGATGTGGAATG-3`
	Primer für die pDsRed2-U6 si-Vektoren
links: pSIRENRetroQMluI left:	5`-(TAACGCGT)GTCTCTCCCCCTTGAACCTC-3`
rechts: DsRedU6 2228 rev	5`-GCCATCGCCCTGATAGAC-3`

Tab. 3.1: Verwendete Sequenzierungsprimer

3.2.17 Transfektion von Jurkat T-Lymphozyten durch Elektroporation

Es wurden 2,5 x 10⁷ Zellen bei 500x g pelletiert (5 min, RT) und anschließend in 1 ml Kristallmedium (RPMI 1640, 7,5% NCS) vorsichtig resuspendiert. Es wurden 40 μ g Vektor in eine Elektroporationsküvette von Eppendorf vorgelegt, 400 μ l Zellsuspension zugegeben und die Zellen für acht Minuten bei 37°C inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 960 μ F (μ A*s/V) und 0,24kV. Die durch die Elektroporation verklumpten Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und in 10ml RPMI-Komplettmedium überführt und über Nacht im CO₂-Inkubator kultiviert.

Zur Entfernung der Zelltrümmer wurde 5ml Ficoll in ein 15ml PP-Röhrchen vorgelegt und mit 10ml der transfizierten Zellen überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei 1000xg (10 min, RT). Um die bei der Zentrifugation entstehenden Phasen nicht zu vermischen, war es erforderlich, die Bremse der Zentrifuge auszuschalten. Zellen, die intakt waren, sammelten sich an der Phasengrenze zwischen dem Medium und dem Ficoll und bildeten einen weißen Ring, welcher mit einer Pasteurpipette aufgenommen und in 5ml Selektionsmedium überführt wurde.

3.2.18 Etablierung stabiler Zelllinien (Limiting Dilution)

Die transfizierten Zellen wurden für 14 Tage in Selektionsmedium (800 μ g/ml G418) kultiviert und dann auf RPMI-Medium II (400 μ g/ml G418) umgestellt. Nach der Umstellung auf das RPMI-Medium II wurden die Zellen mit einer Dichte von 0,25 Zellen pro Vertiefung in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen ausgesät und bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen in Kulturflaschen mit einer Kulturfläche von 25cm² umgesetzt und expandiert.

3.2.19 Verwendete Geräte: *Molekularbiologische Arbeitsschritte*

Brutschrank BE 500	Memmert, Schwabach
Gelelektrophoreseapparatur GNA-100	Amersham Pharmacia, Freiburg
UV-Transilluminator IL-350-M	Bachhofer, Reutlingen
PCR Mastercycler Personal	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Netzteil Power-Pac 3000	Biorad, München
Schüttler WT12	Whatmann, Göttingen
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau

3.2.20 Medien und Puffer: *Molekularbiologische Arbeitsschritte*

LB-Medium

- Bacto™Tryptone, 1% (w/v)	BD, Sparks, USA
- Bacto™Yeast Extract, 0,5% (w/v)	BD, Sparks, USA
- NaCl, 1% (w/v)	Sigma, München

die Lösung wird durch Autoklavieren sterilisiert

LB-Agarplatten

LB-Medium mit 1,5% Agar wurde autoklaviert, auf 60°C abgekühlt, mit Antibiotikum versetzt und in Plastikschalen gegossen. Es wurden folgende Endkonzentration für das LB-Medium und die Agarplatten eingesetzt: Ampicillin = 100 μ g/ml, Kanamycin = 30 μ g/ml, Tetracyclin = 5 μ g/ml

Ficoll-Paque™Plus	Amersham Bioscience, Piscataway, USA
Ethidiumbromid (17-1328-01)	Amersham Bioscience, Piscataway, USA
TAE-Laufpuffer x 50	Eppendorf, Hamburg
SeaKem LE Agarose	Cambrex, Rockland, USA

RF-1 Puffer

- RbCl (100mM) Sigma, München
 - MnCl (50mM) Sigma, München
 - CaCl₂-Dihydrat (10mM) Meck, Darmstadt
 - Glycerin (15%) Invitrogen, Carlsbad, USA
 - Kaliumacetat (30mM) Merck, Darmstadt
- pH 5,8 einstellen mit NaOH

RF-2 Puffer

- RbCl (10mM) Sigma, München
- CaCl₂-Dihydrat (75mM) Meck, Darmstadt
- Glycerin (15%) Invitrogen, Carlsbad, USA
- MOPS (10mM) Serva, New York, USA

der pH wird mit NaOH auf 6,8 eingestellt, anschließend wird die Lösung steril filtriert

SOC-Medium

- Bacto™Tryptone, 2% (w/v) BD, Sparks, USA
 - Bacto™Yeast Extract, 0,5% (w/v) BD, Sparks, USA
 - NaCl, 8,55mM Sigma, München
 - KCl, 2,5mM Merck, Darmstadt
- der pH wird mit NaOH auf 7 eingestellt, die Lösung wird durch Autoklavieren sterilisiert
- MgCl₂, 10mM Merck, Darmstadt
 - Glucose, 20mM J.T.Baker, Deventer, Niederlande
- beide Lösungen werden als steril filtrierte Lösungen hinzugegeben.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Präparation von Membranfraktionen durch Ultrazentrifugation

Es wurden zur Herstellung von Membranfraktionen 5×10^8 Jurkat T-Lymphozyten vereinigt, zweimal mit Calcium-Messpuffer gewaschen und anschließend in 10ml Calcium-Messpuffer resuspendiert. Nach Zugabe einer Tablette Proteaseinhibitor (Roche Diagnostics, Mannheim), wurden die Zellen in einem Potter-Elvehjem Homogenisator mechanisch aufgeschlossen (30 Zyklen, 1500U/min). Dieser Arbeitsschritt wurde, wie alle folgenden auch, auf Eis durchgeführt. Durch eine fünfminütige Zentrifugation mit 500xg bei 4°C wurden nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer abgetrennt. Die Überstände wurden für 10 Minuten bei 4°C mit 2000xg abzentrifugiert. Durch diesen Vorgang entstand ein Pellet (P2), das an Zellkernen angereichert war. Die Überstände wurden daraufhin in einer Ultrazentrifugation für 30 Minuten bei 10000xg (P10-Pellet) abzentrifugiert.

Bei der P10-Fraktion handelt es sich um eine schwere Membranfraktion, welche mit Lysosomen und Mitochondrien angereichert ist. Die P2 und P10-Pellets wurden in 1ml Lysispuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert. Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Fraktionen wurden Aliquots 1:10 und 1:30 mit Wasser verdünnt. Jeweils $5\mu\text{l}$ der Verdünnungen wurden in Mikrotiterplatten pipetiert und mit $250\mu\text{l}$ BioRad-Reagenz versetzt. Eine BSA-Verdünnungsreihe wurde als Standard verwendet. Nach einer Inkubationsphase von 20 Minuten bei RT, erfolgte die Auswertung der Proben am Mikrotiterplatten-Photometer bei 595nm.

3.3.2 Western-Blot

Die Auftrennung der Proteine der P10-Membranfraktion erfolgte in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem 12,5%igen SDS-Gel. Die Probenkammer wurde nach dem Auspolymerisieren des Gels mit SDS-Page-Elektrodenpuffer befüllt. Es wurden von den Membranfraktionen jeweils $60\mu\text{g}$ Protein unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Die Proben wurden vor dem Auftragen für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und dann abzentrifugiert (12000rpm, 3 Minuten). Vor dem Beladen des Gels wurden alle Probenaschen zweimal mit $100\mu\text{l}$ Elektrodenpuffer gespült. Die nicht benötigten Probenaschen wurden mit Probenpuffer x1 beladen. Die Auftrennung der Proteine im 3%igen Sammelgel erfolgte bei 20mA. Bei Eintritt der Proteine in das Tenngel wurde die Stromstärke auf 30mA erhöht. Vor dem Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen (Millipore) wurde das Gel mit 1x Transferpuffer (10% Methanol, ohne SDS) gespült. Die zugeschnittenen Membranen wurden zunächst mit 100%igem Methanol benetzt, mit Wasser gespült und vor dem Zusammenbau, für 15 Minuten in 1x Transferpuffer äquilibriert. Die Blotapparatur wurde in folgender Anordnung zusammengesetzt.

Anode (+)
Schwammtuch
2x Whatmann-Papier
Gel
PVDF-Membran
2x Whatmann-Papier
Schwammtuch
Kathode (-)

Abb. 3.1: Anordnung der Blotapparatur

Alle Komponenten wurden vor dem Zusammenbau mit dem Transferpuffer befeuchtet, um eine Austrocknung zu verhindern. Der Proteintransfer auf die PVDF-Membran erfolgte für 3 Stunden bei 250 mA im Kühlraum bei 8°C .

Um den Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran zu überprüfen, wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau S-Lösung gefärbt. Das SDS-Gel wurde für 30 Minuten mit Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend für zwei Stunden entfärbt. Bei einem vollständigen Transfer der Proteine enthielt das Polyacrylamid Gel keine Proteine mehr, während die Ponceau S inkubierte Membran deutliche Färbungen zeigte.

Die PVDF-Membranen wurden unter Schwenken 3x für 10 Minuten mit Wasser gespült, und eine Stunde in TBS mit 5% (w/v) Magermilchpulver geblockt. Dieser Vorgang sorgte dafür, dass unspezifische Bindungsstellen abgedeckt wurden. Die Membran wurde daraufhin 3x für 10 Minuten in TBS mit 0,1% (v/v) Tween-20 (=TBST) gewaschen. Die Inkubation mit dem Erst-Antikörper (anti-CD38 mAK, 1µg/ml) erfolgte Über-Nacht bei 8°C in TBST mit 2,5% (w/v) Magermilchpulver. Die Membran wurde dann bei RT 3x für 10 Minuten mit TBST gewaschen, für eine Stunde mit dem Peroxidase gekoppelten Zweit-Antikörper (human präabsorbiertes Ziege anti-Maus HRP-Konjugat 1:5000) in TBST mit 2,5% (w/v) Magermilchpulver inkubiert und zweimal für drei Minuten mit TBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 10 Minuten in TBST, an deren Anschluss die Membran 2x für 15 Minuten mit TBST und dann 2x für 30 Minuten mit TBS gespült wurde. Die Entwicklung der Blots erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems in einer Dunkelkammer. Für jeden Blot wurden 6ml ECL-1 Reagenz und 6ml ECL-2 Reagenz gemischt und der Ansatz lichtgeschützt gelagert. Die Blots wurden für eine Minute in der angesetzten ECL-Lösung inkubiert und die entstehende Chemilumineszenz mit dem Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biosciences, Freiburg) aufgezeichnet. Die Belichtung des Films erfolgte für 2 bis 30 Minuten.

3.3.3 Fluometrischer Assay zur Bestimmung der CD38-Aktivität

Zur Ermittlung der enzymatischen Aktivität von CD38 wurde ein Assay verwendet, bei dem der Fluoreszenzanstieg durch die enzymatische Umwandlung von ethenoNAD zu ethenoADPR verfolgt wird. Es wurden hierfür 200µg der hergestellten Membranfraktionen (3.3.1) in 1ml Extrazellulärpuffer aufgenommen und die Veränderung in der Fluoreszenz bei einer Exzitationswellenlänge von 300 nm und einer Emissionswellenlänge von 410 nm unter Rühren am Fluorimeter (Hitachi F-2000) vermessen. In der ersten 100 Sekunden wurde die basale Fluoreszenz vermessen. Nach Ablauf der 100 Sekunden wurde ethenoNAD in einer Endkonzentration von 100µM zugesetzt und die Fluoreszenz für weitere 900 Sekunden verfolgt. Es wurde mit folgenden Einstellungen am Fluorimeter gearbeitet:

Response Level	8,0 Sekunden	Exzitation	300 nm
PM Voltage	700 Volt	Emission	410 nm
Bandpass 1	10 nm	x-Achse	1000
Bandpass 2	10 nm	y-Achse	9999
gain	Autoselekt		

Tab. 3.2 : Fluorimeter-Einstellung zur Bestimmung der CD38-Aktivität

3.3.4 Verwendete Geräte: *Proteinbiochemische Methoden*

Ultrazentrifuge CU L-7 80 mit Titan Festwinkelrotor Ti50 oder Ti80	Beckmann , Unterschleißheim
Zentrifuge Cryofuge 8500i	Heraeus, Hanau
Blotting-Aparatur Trans-Blot Cell	Biorad, München
Mikrotiterplatten Photometer	MWG-Biotech, Ebersberg
Elvehejm-Homogenisator	IKA-Labortechnik, Staufen
Elektrophoresesystem	Amersham-Phamacia, Freiburg
Fluoreszenz-Spektrophotometer Hitachi F-2000	Colora Messtechnit, Lorch
Quarzküvetten, 2ml Volumen	Hellma, Mühlheim/ Baden

3.3.5 Puffer und Lösungen: *Proteinbiochemische Methoden*

Lysispuffer (pH 7,2)	
- HEPES (20 mM)	Biomol, Hamburg
- NaCl (110 mM)	Merck, Darmstadt
Calciummesspuffer (pH 7,4)	
- NaCl (140 mM)	Merck, Darmstadt
- KCl (5 mM)	Merck, Darmstadt
- MgSO ₄ (1 mM)	Merck, Darmstadt
- CaCl ₂ (1 mM)	Sigma, München
- HEPES (20 mM)	Biomol, Hamburg
- NaH ₂ PO ₄ (1 mM)	Merck, Darmstadt
- D-Glukose (5,5 mM)	Sigma, München
in Aqua bidest., die Lösung wird mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt	
SDS-PAGE-Elektrodenpuffer, pH 8,3 (10x)	
- Tris Base (250 mM)	Sigma, München
- Glycin (1,92 M)	
- SDS 1% (w/v)	Roth, Karlsruhe

Material & Methoden

Ponceau-Färbelösung

- Ponceau S 2% (w/v) Merck, Darmstadt
- Trichloressigsäure 3% (w/v) Merck, Darmstadt

Lysispuffer

- HEPES (20 mM) Biomol, Hamburg
- NaCl (110 mM) Merck, Darmstadt
- Proteaseinhibitormix complete Roche Diagnostic, Mannheim

Coomassie- Färbelösung

- Coomassie Brilliant Blue 0,1% (w/v) Merck, Darmstadt
- Methanol, 40% (v/v) Merck, Darmstadt
- Essigsäure, 10% (v/v) Merck, Darmstadt
- Aqua bidest. 50% (v/v)

Coomassie-Entfärbelösung

- Methanol, 40% (v/v) Merck, Darmstadt
- Essigsäure, 10% (v/v) Merck, Darmstadt
- Aqua bidest. 50% (v/v)

TBS, pH 7,6

- Tris Base (20 mM) Sigma, München
 - NaCl (150 mM) Merck, Darmstadt
- der pH wird mit 30%iger HCl eingestellt

Tween-20

Merck, Darmstadt

ECL™ Detektionsreagenz

Amersham Pharmacia, Freiburg

Protein Standards (Precision Plus/ All Blue)

Bio-Rad Laboratories, München

Transferpuffer (10x für Blot auf PVDF)

- Tris Base (250 mM) Sigma, München
- Glycin (1,92 M)

Für den 1x Transferpuffer werden 400ml 10x Transferpuffer mit 400ml Methanol p.A. versetzt und mit A. bidest. auf 4 Liter aufgefüllt.

Material & Methoden

Probenpuffer x 6

- Tris-HCl (0,5M, pH6,8)
- Glycerol (30%)
- SDS (10%)
- Bromphenolblau (0,01%)

Sigma, München
Invitrogen, Carlsbad / USA
Biomol, Hamburg
Biomol, Hamburg

1. Antikörper

CD38 (AT1) sc7325, mouse monoclonal
IgG, Konzentration: 200µg/ml

Santa Cruz, Delaware / USA

2. Antikörper

Peroxidase gekoppelter Antikörper IgG,
Ziege anti-Maus, Prod. Nr: 115-035-003

Dianova, Hamburg

3.4 Fluorimeter-Messung

3.4.1 Ratiometrische Bestimmung zytosolischer Calcium-Konzentrationen unter Verwendung des Calciumindikators Fura-2/AM

Die Messung freier, intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen erfolgte mit dem Ca^{2+} sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2/AM. Der Farbstoff ist in veresterter Form membranpermeabel und verbleibt nach Umwandlung durch zytosolische Esterasen in der Zelle (Thomas und Delaville 1991). Die Bestimmung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration erfolgte in Anlehnung an die von Trevis et al (1987) beschriebene Methode. Es wurden 1×10^7 Zellen in 10ml RPMI-Komplettmedium aufgenommen, für 5 Minuten bei 37°C inkubiert und dann abzentrifugiert (5 min, $500 \times g$, RT). Das Zellpellet wurde dann in 1 ml RPMI-Komplettmedium aufgenommen, welches mit Fura-2/AM versetzt wurde (Endkonzentration $1 \mu\text{M}$) und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit Medium 1:5 verdünnt, für weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert, abzentrifugiert mit $500 \times g$ (5 min, RT) und zweimal mit 5ml Calciummesspuffer gewaschen. Die Zellen wurden dann in 5ml Calciummesspuffer aufgenommen und bis zur Messung im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu verhindern. Die Messungen wurden mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen pro ml in einer Quarzküvette durchgeführt. Es wurde zunächst die basale Ca^{2+} -Konzentration für 200 Sekunden aufgezeichnet. Nach Ablauf der 200 Sekunden erfolgte eine Stimulation der Zellen mit OKT3 (anti-CD3 mAK, $10 \mu\text{g/ml}$) oder mit dem Lektin Concanavalin A ($100 \mu\text{g/ml}$). Die Emission bei 495 ± 10 nm wurde in Intervallen von 5 Sekunden nach wechselnder Anregung bei 340 ± 10 nm und 380 ± 10 nm aufgezeichnet. Für die Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration erfolgte eine Kalibrierung mit 0,1% Triton X-100 (maximales Ratio) und Tris / EGTA (60 mM / 8 mM) (minimales Ratio) nach der Formel von Grynkiewicz et al. (1985).

3.5 Quantifizierung endogener NAADP-Konzentrationen

3.5.1 Der enzymatische NAADP Cycling Assay

Alle in dieser Arbeit beschriebenen NAADP-Messungen wurden mit Hilfe eines enzymatischen Cycling Assays (Gasser et al, 2006) durchgeführt. Es wurden NAADP-Bestimmungen in Suspensionszellen, adhärent wachsenden Zellen und in verschiedenen Geweben von WT-Mäusen und CD38 Knock out-Mäusen durchgeführt.

3.5.2 Quantifizierung endogener NAADP-Konzentrationen im Überblick

Es sind alle Arbeitsschritte in der zeitlichen Abfolge dargestellt. Es beginnt mit der Erstellung von Zell- oder Gewebeextrakten und der Festphasenextraktion. Zum Schluss sind die Abläufe des NAADP -Assays dargestellt

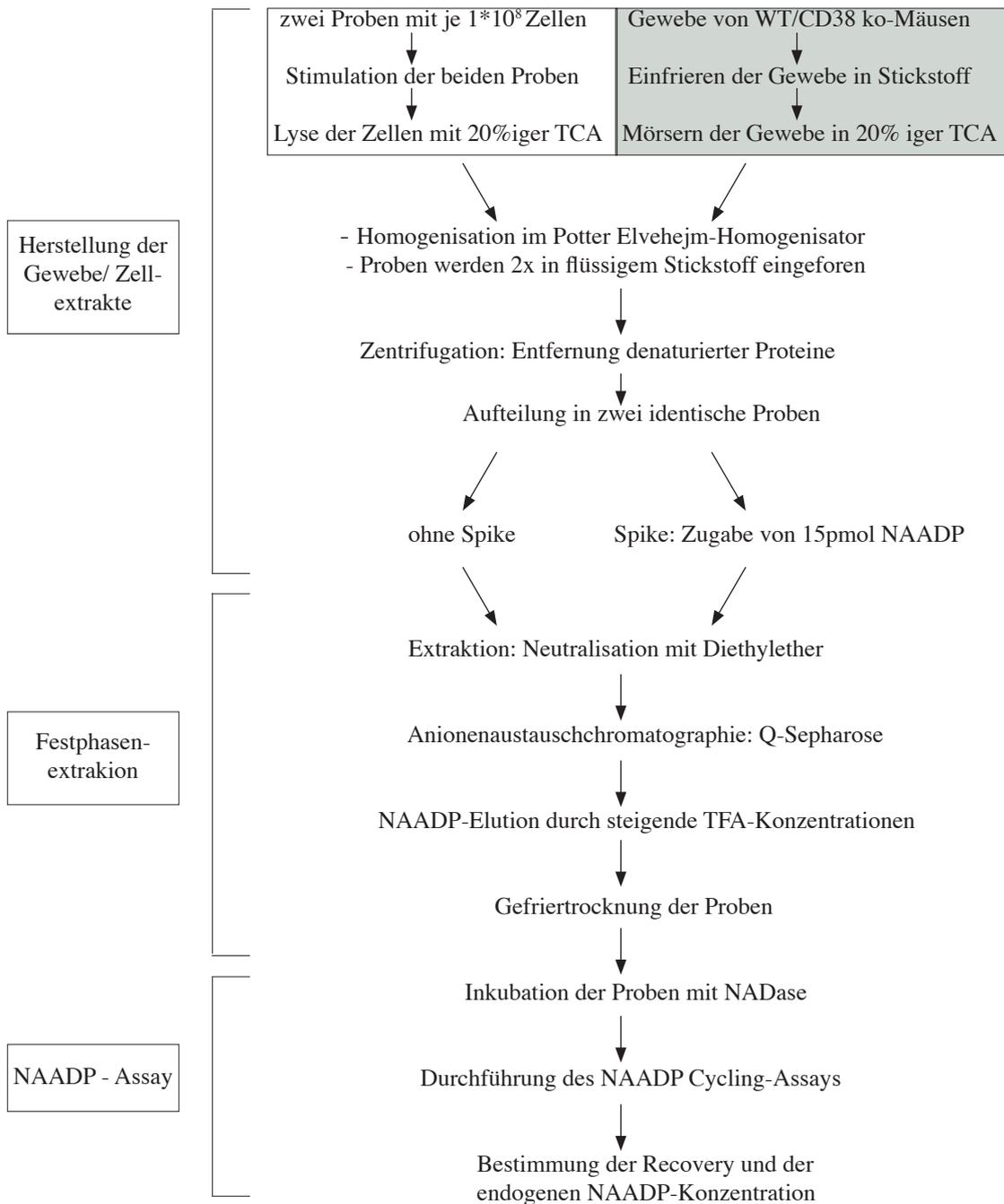


Abb. 3.2: Arbeitsschritte zur Quantifizierung endogener NAADP-Konzentrationen
Die Arbeitsschritte dieser Übersicht werden nachfolgend detailliert beschrieben.

3.5.3 Herstellung der Zell- und Gewebeextrakte

3.5.3.1 Aufarbeitung von Jurkat T-Lymphozyten

Um NAADP in Jurkat T-Lymphozyten (JMP-WT oder CD38 Knock down) zu messen, wurden für jedes Experiment 2×10^8 Zellen mit $500 \times g$ (5min, RT) pelletiert, mit Calciummesspuffer gewaschen und auf zwei Blue-Cap-Röhrchen aufgeteilt, so, dass in jedem Röhrchen 10 ml einer Zellsuspension mit einer Dichte von 1×10^7 Zellen pro ml vorlag. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde jeder Probe $100 \mu\text{l}$ Zellsuspension entnommen. Um zu verhindern, dass sich ein festes Zellpellet bildete, wurden die Blue-Cap-Röhrchen nach der Entnahme für die Zellzahlbestimmung, welche mit dem Casy-Zellzähler (Schärfesystem, Reutlingen) durchgeführt wurde, für 30 Minuten bei Raumtemperatur liegend gelagert. Nach Ablauf der 30 minütigen Inkubationszeit wurden die Zellen mit OKT3 ($5 \mu\text{g/ml}$) oder Concanavalin A ($100 \mu\text{g/ml}$) stimuliert oder es wurden für die Messung von Basalwerten unstimulierte Zellen verwendet. In einigen Experimenten wurden die Zellen vor der Stimulation für 10 Minuten mit Genistein ($80 \mu\text{g/ml}$) oder PP2 ($1 \mu\text{M}$) inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei $960 \times g$ (1min, 4°C) wurden die Überstände abgenommen, in beide Proben 1ml eisgekühlter TCA 20% (w/v) zugegeben und die Proben in einen Potter Elvehøjm Homogenisator überführt. Die Zellen wurden bei 1500 rpm mit fünf Auf- und Abwärtsbewegungen aufgeschlossen. Die Proben wurden zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren, bei 37°C aufgetaut und zur Entfernung der denaturierten Proteine für 10 Minuten zentrifugiert ($5400 \times g$, 4°C). Eine der beiden Proben wurden dann mit 15 pmol NAADP versehen (Spike).

3.5.3.2 Aufarbeitung von HeLa-Zellen

Für die Vermessung von HeLa-WT oder HeLa^{CD38+} Zellen wurden 25 bis zur Konfluenz dichtgewachsene Zellkulturflaschen (2×10^8 Zellen) mit einer Kulturfläche von 175 cm^2 mit 15 ml PBSx1 gewaschen, mit 7ml Trypsin (500mg/l) für 10 Minuten inkubiert und in Blue-Caps überführt, in die 7,5ml Calciummesspuffer und 7,5ml DMEM-Medium vorgelegt wurde. Es folgte eine Zentrifugation bei $500 \times g$ (5 min, RT). Die Pellets wurden in einem Blue-Cap vereinigt, mit Calciummesspuffer auf 50ml aufgefüllt und erneut bei $500 \times g$ (5min, RT) abzentrifugiert. Die Zellen wurden so auf zwei Proben aufgeteilt, dass in jedem Blue-Cap 10ml einer Zellsuspension mit einer Dichte von 1×10^7 Zellen pro ml vorlag. Es wurden $100 \mu\text{l}$ der Suspension für die Zellzahlbestimmung abgenommen. Nach Ablauf einer 30 minütigen Inkubationszeit, in der die Zellen liegend gelagert wurden, erfolgte eine Stimulation mit Carbachol ($100 \mu\text{M}$ Endkonzentration) oder die Zellen wurden für die Messung von Basalwerten ohne Carbacholzugabe weiterverarbeitet. In einigen Experimenten wurden die Zellen vor der Carbachol-Stimulation für 20 Minuten mit Atropin ($10 \mu\text{M}$) inkubiert. Die Zellen wurden dann mit $960 \times g$ (1 min, 4°C) abzentrifugiert, die Überstände abgenommen und die Zellpellets mit 1ml eisgekühlter TCA 20% (w/v) versetzt. Es folgte eine Homogenisation der Proben im Potter-Elvehøjm Homogenisator bei 1500 rpm mit fünf Auf- und Abwärtsbewegungen.

Die Proben wurden zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren, im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und dann für 10 Minuten abzentrifugiert (5400xg, 4°C). In eine der beiden Probe wurde eine Stoffmenge von 15 pmol NAADP (Spike) hinzugefügt.

3.5.3.3 Aufarbeitung von Geweben aus WT- und CD38 Knock out-Mäusen

Den durch Genickbruch getöteten Tieren wurden die Thymie, die Milzen und die Herzen entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Organe wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Für eine Messung sind von den einzelnen Organen mindesten folgenden Einwaagen erforderlich:

Organ	Gewebe pro Experiment	Anzahl der Organe pro Experiment
Herz	100mg	1
Thymus	200mg	4
Milz	450mg	5

Tab. 3.3: Darstellung eingesetzter Gewebemengen pro Experiment

Zur Aufarbeitung eines Organs wurde die erforderliche Gewebemenge nach dem Auswiegen in einen Mörser überführt, mit flüssigen Stickstoff übergossen und nach dem Verdampfen des Stickstoffs gemörsert. Nach Zugabe von 2 ml eisgekühlter TCA 20% (w/v) wurde ein weiteres Mal gemörsert. Die Probe wurde in einem Potter Elvehøj-Homogenisator aufgeschlossen, zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C wieder aufgetaut. Durch diesen Vorgang fielen die denaturierten Membranen und Proteine aus, welche dann durch eine Zentrifugation bei 5400xg (10 min, 4°C) entfernt wurden. Der Gewebeeextrakt wurde in zwei identische Proben aufgeteilt, von denen eine Probe mit einer NAADP- Zugabe von 15 pmol versehen wurde (Spike).

3.5.4 Neutralisation der Zell- und Gewebeeextrakte

Zur Neutralisation der sauren Zell- und Gewebeeextrakte wurde auf die Proben das zehnfache Volumen an wassergesättigtem Diethylether gegeben, eine Minute gevortext und der Ether dann wieder abgenommen. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt und der pH-Wert der Proben durch pH-Papier überprüft. Zur Entfernung des Ethers wurden die Proben bei -80°C eingefroren und eine Stunde gefriergetrocknet.

3.5.5 Vorbereitung der Q-Sepharose-Säulen

Es wurden 20ml Q-Sepharose in einen Erlenmeyer-Kolben gegeben, viermal mit 20ml Wasser (bidest.) und dreimal mit 20ml TFA (150mM) gewaschen. Zum Schluss wurde die Q-Sepharose viermal mit 5mM Tris-HCl (pH 8) gewaschen und bis zur weiteren Verwendung in Methanol 20% (v/v) bei 4°C gelagert. Für jedes Experiment wurden zwei Q-Sepharose-Säulen verwendet. In jede Supelco Filtrationsröhre (Supelco, USA) wurde

eine Fritte eingesetzt, 500 μ l Wasser (bidest.) zugegeben und der Meniskus an der Säule markiert. Mit Hilfe einer Vakuumpumpe wurde dreimal 1ml Wasser durch die Fritte gesaugt. Durch Zugabe von 1ml Methanol wurde die Säule aktiviert, welche daraufhin bis zur Markierung mit Q-Sepharose befüllt wurde. Die Q-Sepharose wurde fünfmal mit 1ml eisgekühlter TFA (150 mM), und fünfmal mit 3 ml eisgekühlter Tris-HCl (10mM, pH 8) gewaschen. Die beiden Proben (eine Probe mit Spike, eine Probe ohne Spike) wurden nach der Gefriertrocknung (3.5.7) mit Tris-HCl (10mM, pH 8) auf 10 ml aufgefüllt und in 1 ml Aliquots auf die Säulen gegeben. Die Säulen wurden dann viermal mit 2,5ml eisgekühlter Tris-HCl (10mM, pH 8) gewaschen.

3.5.6 Elution und Gefriertrocknung

Für die NAADP-Elution wurden eisgekühlte TFA-Lösungen mit folgenden Konzentrationen verwendet: 10mM, 12,5mM, 15mM, 17,5mM, 20mM und 25mM. Von jeder TFA-Lösung wurden dreimal 500 μ l auf die Säulen gegeben und nach steigenden TFA-Konzentrationen eluiert. Das Auffangen der Eluate mit den TFA-Konzentrationen 17,5 mM, 20mM und 25mM erfolgte unter Eiskühlung in Reagenzgläsern, in die 3,5ml Wasser (bidest.) vorgelegt wurde. Im Anschluss an die Elution wurden die Reagenzgläser mit Parafilm verschlossen und bei -20°C eingefroren. Der Parafilm wurde mit einer Kanüle durchstochen und die Proben für weitere 15 Minuten bei -80°C eingefroren und dann über Nacht gefriergetrocknet.

3.5.7 Aufreinigung der NADase aus *Neurospora crassa*

Um Nukleotide zu entfernen, die mit dem Cycling Assay interferieren, wurden die Proben mit einer NADase aus dem Pilz *Neurospora crassa* inkubiert. Da es sich bei dem Produkt von Sigma (N9629) um ein Rohprodukt handelt, war es erforderlich das Enzym vor der Verwendung aufzureinigen. Dafür wurden 2,9mg Enzym (1,595u) in 320 μ l Puffer Tris-MgCl₂-Puffer (10mM / 2,5mM, pH 7) gelöst und mit 320 μ l BSA (5mg / ml) und 660 μ l einer 2%igen Aktivkohlesuspension versetzt. Dieser Ansatz wurde dann für 30 Minuten unter Schütteln bei 37°C inkubiert und die Aktivkohle im Anschluss durch Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm entfernt. Der Überstand, in dem sich das gelöste Enzym befand, wurde durch ein Centricon YM-10 (Millipore Corporation) auf 150 μ l eingengt. Die Zentrifugation erfolgte für 20 Minuten bei 4°C und 4500xg. Das Enzym wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.5.8 Probenvorbereitung und NADase-Verdau

Das NAADP der Proben wurden nach der Gefriertrocknung mit 1,5ml Tris-MgCl₂-Puffer (1mM / 2,5mM, pH 7,3) aufgenommen, wobei jedes Reagenzglas für eine Minute gevortext wurde. Die Proben wurden dann in 1,5ml Schraubdeckel-Röhrchen überführt und für vier Stunden bei 37°C unter Schütteln mit 0,1 Unit aufgereinigter NADase inkubiert. Zur Inaktivierung der NADase wurden die Proben für 20 Minuten auf 95°C erhitzt und dann in ein Eisbad überführt.

3.5.9 Erstellung der Eichgerade

Zur Quantifizierung des endogenen NAADP aus den Gewebe- oder Zellextrakten, wurde für jedes Experiment eine Eichgerade aus NAADP-Standards mit vermessen. Es wurden 4µl einer 10µM NAADP-Lösung mit Tris-MgCl₂-Puffer (1mM / 2,5mM, pH 7,3) auf 4ml aufgefüllt. Somit betrug die Stoffmenge in 200µl 2000fmol NAADP. Diese Lösung wurde dann 1:1 mit Tris-MgCl₂-Puffer (1mM / 2,5mM, pH 7,3) verdünnt, so, dass Standards mit folgenden NAADP-Stoffmengen vorlagen:

- 2000 fmol in 200µl
- 1000 fmol in 200µl
- 500 fmol in 200µl
- 250 fmol in 200µl
- 125 fmol in 200µl
- 0 fmol in 200µl

Es wurden 1,5ml von jedem Standard in ein 1,5ml Schraubdeckel-Röhrchen überführt, mit 0,1 Unit NADase versetzt und für vier Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte analog zu den Proben der Gewebe-/Zellextrakte durch eine Inkubation für 20 Minuten bei 95°C mit anschließender Überführung in ein Eisbad.

3.5.10 Beladungsschema der Mikrotiterplatte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	17,5	20	25				17,5+	20+	25+				Mix A+: mit Cylase
B	17,5	20	25				17,5+	20+	25+				
C	17,5	20	25				17,5+	20+	25+				
D	0	0	125	125	250	250	500	500	1000	1000	2000	2000	MixA-: ohne Cyase
E	17,5	20	25				17,5+	20+	25+				
F	17,5	20	25				17,5+	20+	25+				
G	17,5	20	25				17,5+	20+	25+				
H	0	0	125	125	250	250	500	500	1000	1000	2000	2000	

Abb. 3.3: Probenbeladung für die Mikrotiterplatte

In den Reihen A, B und C wurden TFA-Eluate von Gewebe/ Zellextrakten aufgetragen, wobei die Zahlen für die jeweilige TFA-Konzentration (mM) steht, mit der eluiert wurde. In der Reihe D sind die NAADP-Standards (0 -2000 fmol) aufgetragen. In den Spalten 1, 2 und 3 (schwarze Zahlen) wurden Proben ohne Spike und in den Spalten 7, 8 und 9 (rote Zahlen) wurden Proben mit NAADP-Spike aufgetragen. Die Reihen E, F, G und H wurden genauso beladen, wie die oberen vier Reihen, wurden jedoch im Verlauf der Messung ohne ADP-Ribosyl-Cyclase (ADPRC) vermessen.

In die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden von den Proben und von den NAADP-Standards 200 μ l aufgetragen, wobei die Standards der Eichreihe als Doppel-Bestimmung und die TFA-Fractionen der Zell- oder Gewebeextrakte als Dreifach-Bestimmung durchgeführt wurden (Abbildung 3.3).

3.5.11 Einleitung der Basenaustauschreaktion

Zu den Proben und Standards der Eichgerade in den Reihen A bis D wurde eine Mischung aus folgenden Substanzen in jede Vertiefung gegeben, welche als Mix A⁺ bezeichnet wurde.

Nicotinamid, 1M	6 μ l
Natriumacetat, 100mM, pH 4,2	4 μ l
ADP-Ribosyl-Cyclase, 100ng/ μ l	1 μ l

In jede Vertiefung der Reihen E, F, G und H wurde eine Mischung aus folgenden Substanzen gegeben, die als Mix A⁻ benannt wurde.

Nicotinamid, 1M	6 μ l
Natriumacetat, 100mM, pH 4,2	4 μ l
Wasser (bidest.)	1 μ l

Diese Probenanordnung gewährleistete eine schnelle Überprüfung der Spezifität des Versuchs. Aufgrund der Abwesenheit der ADP-Ribosyl-Cyclase in den Reihen E bis H, sollte keine Fluoreszenz entstehen. Nach der Zugabe von Mix A⁺ und Mix A⁻ zu den Gewebe-/ Zellextrakten und zu den Standards der Eichgerade folgte eine Inkubation im Dunkeln für 60 Minuten bei Raumtemperatur.

3.5.12 Die Enzymreinigung

Um eine mögliche Verunreinigung durch interferierende Nukleotide zu vermeiden, wurden die Enzyme, welche für den weiteren Versuchsablauf erforderlich waren, gereinigt. Es wurde folgender Ansatz für 30 Minuten unter Schütteln bei 37°C inkubiert (Angaben beziehen sich auf eine Vertiefung).

Diaphorase, 12 μ g/ μ l	2 μ l
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6P-DH) 1 μ g/ μ l	2 μ l
BSA, 5mg/ml	4 μ l
Aktivkohlesuspension, 2%ig	24 μ l

Die Aktivkohle wurde durch Zentrifugation bei 13000 rpm (10 min, 4°C) entfernt.

3.5.13 Start der Zyklisierungsreaktion

Im Anschluss an die 60 minütige Inkubation wurde jede Vertiefung der Mikrotiterplatte mit 59,1 μ l einer als Mix B bezeichneten Lösung versetzt, welche folgende Substanzen enthielt.

Nicotinamid, 1M	1 μ l
Natriumphosphat-Puffer, (NaP) (500mM, pH 8)	20 μ l
FMN, 1mM	1 μ l
BSA, 5mg/ml	2 μ l
Resazurin, 10mM	0,1 μ l
Glucose-6-Phosphat, 100mM	5 μ l
Enzymreinigung (3.5.15)	30 μ l

3.5.14 NAADP-Detektion

Nach der Zugabe von Mix B zu den NAADP-Standards und den TFA-Eluaten der Gewebe- und Zellextrakte erfolgte die erste Messung in einem Fluoreszenz-Photometer mit einer Exzitations-Wellenlänge von 544nm und einer Emissions-Wellenlänge von 590nm. Die Ergebnisse dieser Messung wurden als Startwerte bezeichnet. Mit dieser Messung unmittelbar nach Zugabe von Mix B lässt sich die unspezifische Fluoreszenz ermitteln, die durch spontane Reduktion des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes Resazurin entsteht. Die Mikrotiterplatte wurde nach dieser Messung Über-Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und dann ein zweites Mal vermessen, wodurch die Fluoreszenz ermittelt wird, die sich durch den Oxidations- und Reduktionszyklus von NADP gebildet hat. Diese Werte wurden als Endwerte bezeichnet. Die Startwerte und die Endwerte wurden jeweils dreimal gemessen.

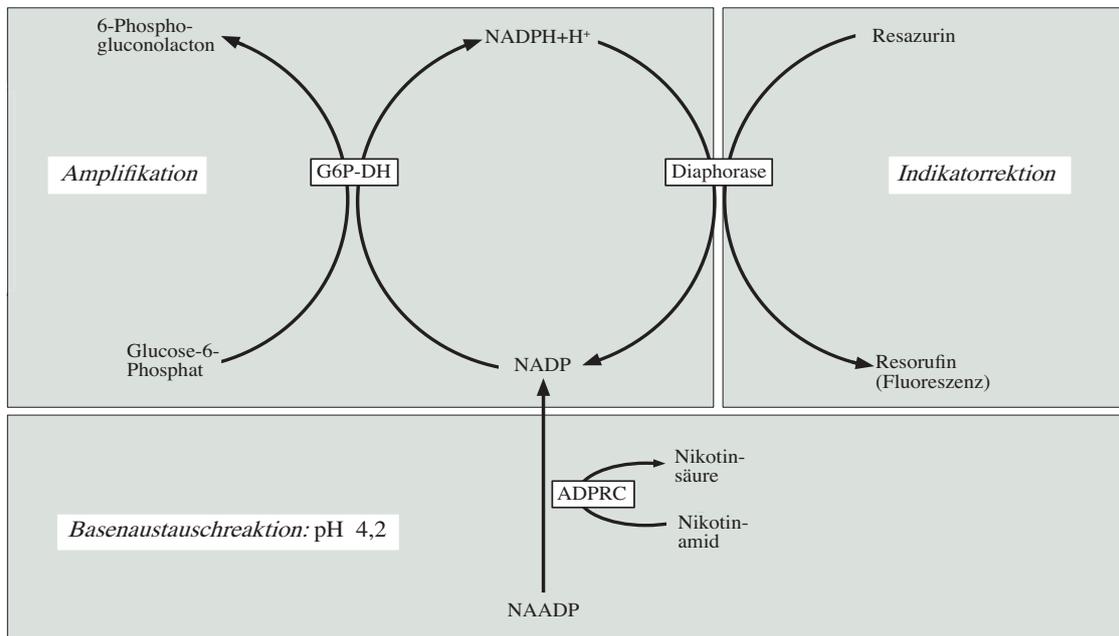


Abb.3.4: Übersicht der einzelnen Reaktionen des NAADP Cycling-Assays

Durch Zugabe von Mix A⁺ und Mix A⁻ zu den vorbereiteten Proben (3.5.3-3.5.8) wurde das NAADP quantitativ durch die ADP-Ribosyl Cyclase bei einem pH-Wert von 4,2 und einem Nikotinamid-Überschuss in NADP überführt. Durch Zugabe von Mix B wurde das NADP durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase unter Verbrauch von Glucose-6-Phosphat zu NADPH+H⁺ reduziert und dann durch die Diaphorase zu NADP reoxidiert. Parallel zu dieser Reaktion läuft die Indikator-Reaktion ab, bei der Resazurin durch die Diaphorase zu dem fluoreszierenden Resorufin reduziert wird. Ein NAADP-Molekül, welches durch die Cyclase in den Assay überführt wird, kann viele Moleküle Resorufin erzeugen, so, dass das ursprüngliche Signal stark amplifiziert wird. Nach der Zugabe von Mix B wurde der Ansatz für mindestens 12 Stunden im Dunkeln inkubiert.

3.5.15 Auswertung des NAADP-Assays

Um die spezifische Fluoreszenz zu ermitteln, die sich nach Ablauf der Über-Nacht Inkubation gebildet hatte, wurden von den Endwerten der Messung die Startwerte subtrahiert. Zu jedem Messpunkt der Eichgerade wurden Mittelwerte aus den sechs Einzelwerten gebildet und es wurden die neun Einzelmessungen der jeweiligen Gewebe-/Zellextrakte gemittelt. Von den Fluoreszenzwerten aus den Reihen A, B, C und D (Inkubation mit Mix A⁺) wurden die unspezifischen Fluoreszenzwerte aus den Reihen E, F, G und H (Inkubation mit Mix A⁻) abgezogen. Zur Auswertung der Messung wurden zu jedem Messpunkt folgende drei Werte grafisch dargestellt:

- 1) Fluoreszenzdifferenz der Werte mit ADPRC (Reihen A bis D) nach Abzug der Startwerte von den Endwerten (Fluoreszenz I)
- 2) Fluoreszenzdifferenz der Werte ohne ADPRC (Reihen E bis H) nach Abzug der Startwerte von den Endwerten (Fluoreszenz II = unspezifische Fluoreszenz)
- 3) Subtraktion der Fluoreszenz II von der Fluoreszenz I

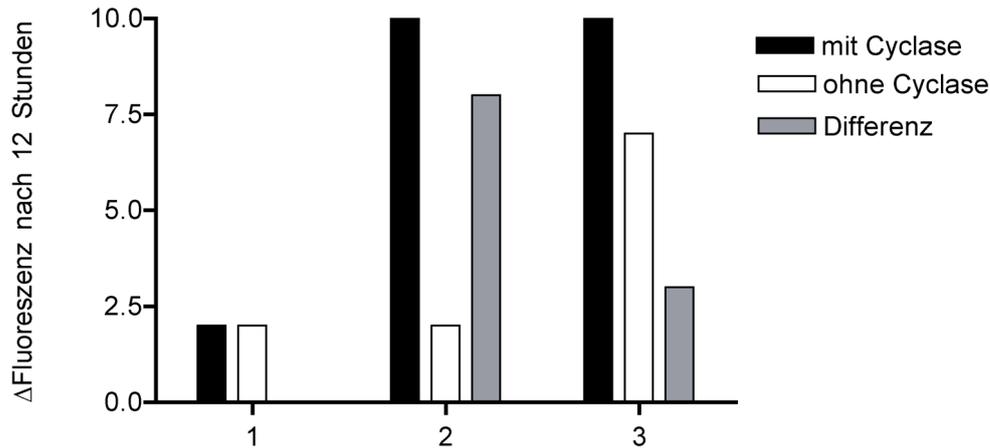


Abb. 3.5: Exemplarische Auswertung einer NAADP-Messung

Die Abbildung zeigt die grafische Auswertung einer Messung. Die Skalierung in diesem Beispiel ist willkürlich gewählt. Es sind, wie unter 3.5.16 beschrieben, für jede Probe drei Parameter dargestellt. Probe 1 stellt einen Ansatz ohne NAADP dar (Blindwert). Probe 2 zeigt einen optimalen Verlauf, in der sich die unspezifische Fluoreszenz (weisse Balken) auf der Höhe des Blindwerts befindet. Probe 3 zeigt einen nicht optimalen Verlauf eines Experiments. Die Fluoreszenzdifferenzen, die ohne ADPRC entstanden sind (weisse Balken), zeigen im Vergleich zum Blindwert hohe Fluoreszenzwerte.

Diese Art der Ergebnisdarstellung ermöglicht eine schnelle Überprüfung der Spezifität der Reaktion. Wie in Abbildung 3.5 zu sehen ist, entsteht in dem Ansatz der Probe 2, welcher mit ADPRC versetzt wurde, durch die Umwandlung von NAADP zu NADP ein deutliches Signal. In dem Ansatz, der ohne ADPRC vermessen wurde, wird kein NAADP in NADP überführt. Es sind nur niedrige Werte zu sehen, die sich auf gleicher Höhe mit den Blindwerten befinden. Diese Fluoreszenz, welche als unspezifische Fluoreszenz bezeichnet wird, entsteht vermutlich dadurch, dass Spuren von NADP durch die im Cycling-Assay verwendeten Substanzen in das System eingeführt wurden. Diese unspezifische Fluoreszenz (weisse Balken) wird von den Fluoreszenzwerten abgezogen, die durch Zugabe der ADPRC entstanden sind (schwarze Balken). Auf diese Weise wird die spezifische Fluoreszenz ermittelt (graue Balken). Die unspezifischen Fluoreszenzwerte der Probe 3 sind im Vergleich zu Probe 2 stark erhöht. Diese Art der grafischen Darstellung ermöglicht Rückschlüsse über die Reinheit des Probenansatzes.

Um die endogene NAADP-Konzentration zu ermitteln, wurde die noch zu detektierende Menge des zu den Proben zugesetzten NAADP (3.5.3.1 bis 3.5.3.3) ermittelt.

Durch Subtraktion der Gewebe-/Zellextraktfraktionen aus den Spalten 1, 2 und 3 (Proben ohne Spike) von den Fraktionen aus den Spalten 7, 8 und 9 (Proben mit Spike) wurde die Wiederfindung (*Recovery*) ermittelt, welche ein Maß für den Verlust an NAADP während der Durchführung der Messung darstellt. Der Standard mit 2000 fmol / Vertiefung wurde als Referenzprobe verwendet und stellte somit den 100%-Wert dar. Die Bestimmung der endogenen NAADP-Konzentrationen erfolgte unter Berücksichtigung der Zellzahl, der *Recovery* und des zellulären Volumens.

3.5.16 Verwendete Geräte: *NAADP Cycling-Assay*

Gefriertrocknungsgerät	Snijders scientific, Tillburg/Holland
Filtrationsröhrchen (3ml) + Fritte	Supelco, Bellefort/USA
Centricon YM-10	Millipore, Bredford/USA
Viktor 1420 Multilabel Counter	Wallac GmbH, Freiburg
Mikrotiterplatte (schwarz, Polysteren)	Brand, Wertheim
Mikro-Schraubröhre, 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht

3.5.17 Puffer und Lösungen: *NAADP Cycling-Assay*

Diethylether	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Trifluoressigsäure	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Q-Sepharose™Fast Flow	Amersham, Uppsala/Schweden
Nikotinamid, 1M	Sigma, München
Natriumacetat, 100mM, pH 4,2	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat, 500mM, pH 8	Calbiochem, San Diego/USA
Resazurin, 10mM (R2127)	Sigma, München
Aplysia-Cyclase, 100ng/ μ l (A8950)	Sigma, München
Diaphorase, 12 μ g/ μ l (D5540)	Sigma, München
Glucose-6-Phosphat, 100mM	Sigma, München
G6P-DH, 1 μ g/ μ l (G8164)	Sigma, München
Flavinmononukleotid, 1mM (F8399)	Sigma, München
NADase, 0,1u/ μ l (N9629)	Sigma, München
NAADP (N5655)	Sigma, München

Material & Methoden

Tris-MgCl₂-Puffer

- Tris, 1mM

- MgCl₂, 2,5 mM

Puffer mit HCl auf pH 7,3 einstellen

Atropin (10μM)

Carbachol (100μM)

Genistein (80μg/ml)

Daidzein (80μg/ml)

Invitrogen, Karlsruhe

Meck, Darmstadt

Sigma, München

Sigma, München

Sigma, München

Sigma, München

4 Ergebnisse

Der erste Teil des folgenden Abschnittes beschreibt NAADP-Messungen in Jurkat T-Lymphozyten, die klären sollten, ob NAADP die Kriterien eines Second Messengers erfüllt. Es wurde zunächst überprüft, wie sich die NAADP-Konzentrationen nach Stimulation über den T Zell-Rezeptor verändern. Desweiteren wurde durch unterschiedliche pharmakologische Ansätze untersucht, welche Spezifität ein Signal für eine zytosolische NAADP-Erhöhung in T-Lymphozyten haben muss. Der zweite Teil behandelt eine mögliche Beteiligung der ADP-Ribosylcyclase CD38 in der NAADP vermittelten Signaltransduktion. Es wird die Etablierung stabiler CD38 Knock down-Zelllinien und deren Charakterisierung durch proteinbiochemische und molekularbiologische Techniken dargestellt. Es folgt die Bestimmung endogener NAADP-Konzentrationen in CD38 Knock down-Klonen, in Geweben von CD38 Knock out-Mäusen und in CD38 transfizierten HeLa-Zellen im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Zellen und Geweben. Es ist allgemein akzeptiert, dass das multifunktionelle Enzym CD38 die Bildung des Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffs cADPR vermittelt. Weiterhin ist bekannt, dass CD38 durch Umwandlung von NAD in vitro den Botenstoff ADPR bildet. CD38 scheint somit eine zentrale Position in der Ca^{2+} -vermittelten Signaltransduktion einzunehmen. Durch Bestimmung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im JMP-WT und in den CD38 Knock down-Klonen sollte der Einfluss des Enzyms auf die Ca^{2+} -Regulation aufgeklärt werden

4.1 Stimulation des T-Zellrezeptors führt zu einem Anstieg der NAADP-Konzentration

Da gezeigt werden konnte, dass der gegen den CD3-Komplex des T-Zellrezeptors gerichtete Antikörper OKT3 zu einer Aktivierung der Zellen und somit zu einer Erhöhung des zytosolischen Calciums führt (Berg et al, 2000), wurde dieser Antikörper eingesetzt, um einen NAADP-Anstieg in den T-Lymphozyten einzuleiten. Vermutungen, dass durch die Aktivierung von Zellen ein kurzes, schnelles NAADP-Signal vermittelt wird, konnten durch Messungen in pankreatischen Acinus-Zellen der Maus bestätigt werden (Yamasaki et al, 2005). Um diese schnellen Signale messen zu können, wurden die Zellen für 10 Sekunden mit OKT3 stimuliert und die endogene NAADP-Konzentration mit Hilfe des NAADP Cycling-Assays vermessen. Um eine mögliche Beteiligung von NAADP zu späteren Zeitpunkten in der calciumvermittelten Signaltransduktion erfassen zu können, wurden Stimulationsexperimente mit bis zu 50 Minuten Inkubationszeit durchgeführt.

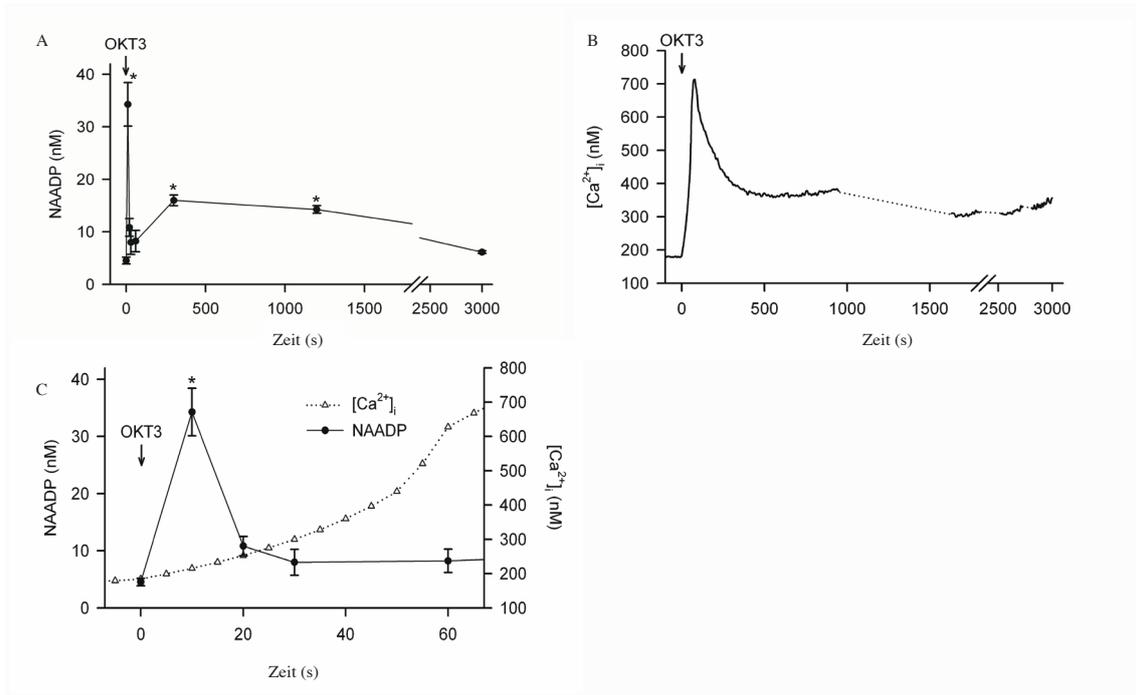


Abb. 4: Erhöhung zellulärer NAADP-Konzentrationen nach Stimulation über den T-Zellrezeptor.

(A) Jurkat T-Lymphozyten wurden für unterschiedliche Zeiten mit OKT3 ($5\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Endogenes NAADP wurde extrahiert und durch den NAADP Cycling-Assay vermessen. ($n = 3-8$, Mittelwerte \pm S.E.M.) * $p < 0,05$ im Vergleich zum Basalwert. (B) $[Ca^{2+}]_i$ wurde in Fura2 beladenen Zellen in Gegenwart von 1mM extrazellulärem Calcium gemessen. Die Zellen wurden mit OKT3 ($5\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu verhindern wurde die Messung zweimal für 10 Minuten unterbrochen (gepunktete Linie). (C) stellt eine Vergrößerung der ersten 60 Sekunden aus dem NAADP-Zeitverlauf und der Ca^{2+} -Messung aus Teilabbildung (B) dar.

Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, stieg die NAADP-Konzentration schon nach wenigen Sekunden Stimulation durch den Antikörper OKT3 an. Es wurde nach 10 Sekunden ein Maximum von $34\pm 8\text{nM}$ ($n = 4$) erreicht, dass nach weiteren 10 Sekunden fast auf basale Konzentrationen wieder abfiel. Es handelt sich somit um einen 7,6 fachen Anstieg in der NAADP-Konzentration nach Stimulation der Zellen. Nach einer Minute Stimulation kam es zu einem weiteren Anstieg, der nach 5 Minuten Konzentrationen von $16\pm 2\text{nM}$ ($n = 4$) erreichte und nach 50 Minuten auf Werte von $6\pm 1\text{nM}$ ($n = 3$) absank. Durch Stimulation von Fura2 beladenen Jurkat T-Lymphozyten mit der gleichen OKT3-Konzentration ($5\mu\text{g/ml}$) stieg die $[Ca^{2+}]_i$ ebenfalls innerhalb weniger Sekunden an (Ca^{2+} -Peak) und erreichte einen Wert von 700nM. Auf diesen kurzen Calciumanstieg folgte eine erhöhte Plateau-Phase, die während der gesamten Messdauer von 50 Minuten bestehen blieb. Durch einen direkten Vergleich der Verläufe zeigte sich, dass NAADP nach einer Aktivierung der Zellen in einer sehr frühen Phase der calciumvermittelten Signaltransduktion in T Lymphozyten, welche auch als Schrittmacher-Phase bezeichnet wird, aktiv ist. Die NAADP-Erhöhung trat zeitlich kurz vor der $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung ein (Abbildung 4C).

4.1.1 Die NAADP-Erhöhung ist abhängig von der Stärke der Stimulation

Durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen des Antikörpers OKT3 konnte gezeigt werden, dass der NAADP-Anstieg abhängig von der Stärke der Stimulation ist, welche über den T-Zellrezeptor vermittelt wird.

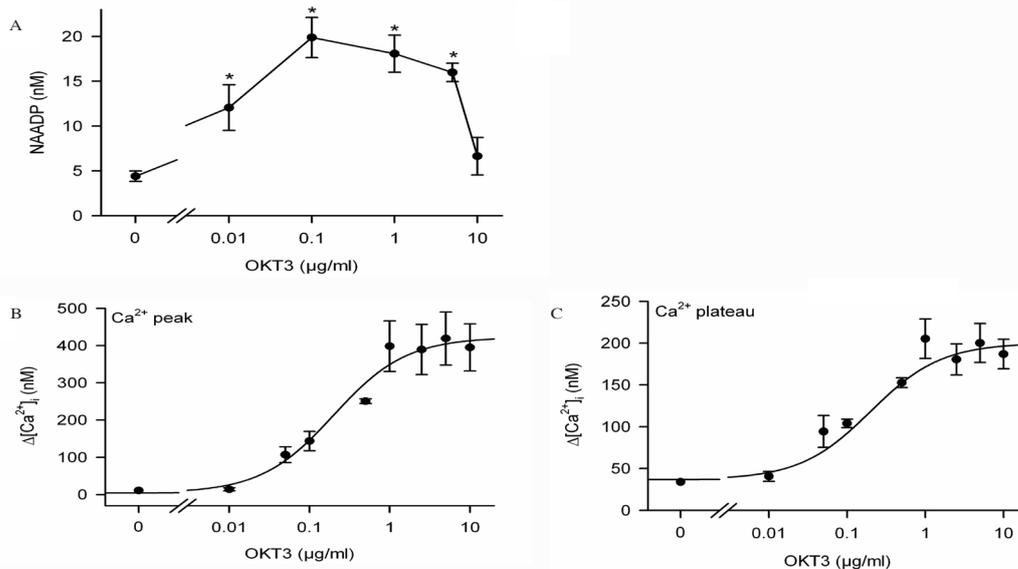


Abb. 4.1: Konzentrations-Wirkungskurve für NAADP und Ca²⁺ nach OKT3-Stimulation. (A) Jurkat T-Lymphozyten wurden für 5 Minuten mit steigenden Konzentrationen OKT3 stimuliert. NAADP wurde extrahiert und durch den NAADP Cycling-Assay vermessen. (n = 2 - 7, Mittelwerte ± S.E.M.). p < 0,05 im Vergleich zum Basalwert. (B) Es wurde die Differenz Fura2-beladener Zellen zwischen dem Peak und der basalen [Ca²⁺]_i-Konzentration nach fünfminütiger Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen an OKT3 bestimmt (n = 3 - 6, Mittelwerte ± S.E.M.). In (C) wurden die Differenzen zwischen dem Plateau und der basalen [Ca²⁺]_i-Konzentration nach Stimulation für 5 Minuten mit ansteigenden Konzentrationen OKT3 bestimmt (n = 3 - 6, Mittelwerte ± S.E.M.).

Wie in Abbildung 4.1 zu sehen ist, reagierten die Jurkat T-Lymphozyten bereits auf sehr geringe Antikörperkonzentrationen von 0,01 µg/ml mit einem signifikanten NAADP-Anstieg. OKT3-Konzentrationen von 0,1 µg/ml führten zu einer maximalen NAADP-Erhöhung (20 ± 7 nM, n = 3) die durch weitere Erhöhung der Antikörperkonzentration wieder abnahm. OKT3-Konzentrationen von 10 µg/ml führten im Vergleich zum Basalwert, der bei 4 ± 2 nM (n = 7) lag, zu einer nicht signifikant erhöhten NAADP-Konzentration (7 ± 4 nM, n = 3). Stimulation Fura2-AM beladener Zellen mit OKT3-Konzentrationen von 0,01 µg/ml bis 10 µg/ml führten im Calcium-Peak und im Calcium-Plateau zu einem Konzentrationsanstieg (Abbildung 4.1 B und C). Es zeigte sich, dass bei einer OKT3-Konzentration von 0,1 µM, sowohl im Peak als auch im Plateau, eine halbmaximale Calciumkonzentration erreicht wurde, während NAADP bei diesen Antikörperkonzentrationen bereits ein Maximum erreichte.

4.1.2 Ein spezifischer Stimulus über den T-Zellrezeptor ist für eine zytosolische NAADP-Erhöhung erforderlich

Um die Signaltransduktionswege, die zur Bildung von NAADP führen, weiter zu untersuchen, wurden Jurkat T-Lymphozyten mit den Tyrosinkinase-Inhibitoren PP2 und Genistein vorinkubiert und dann mit OKT3 stimuliert. Durch diese Vorgehensweise sollte die Bedeutung der Tyrosin-Phosphorylierung in der NAADP vermittelten Signaltransduktion herausgearbeitet werden.

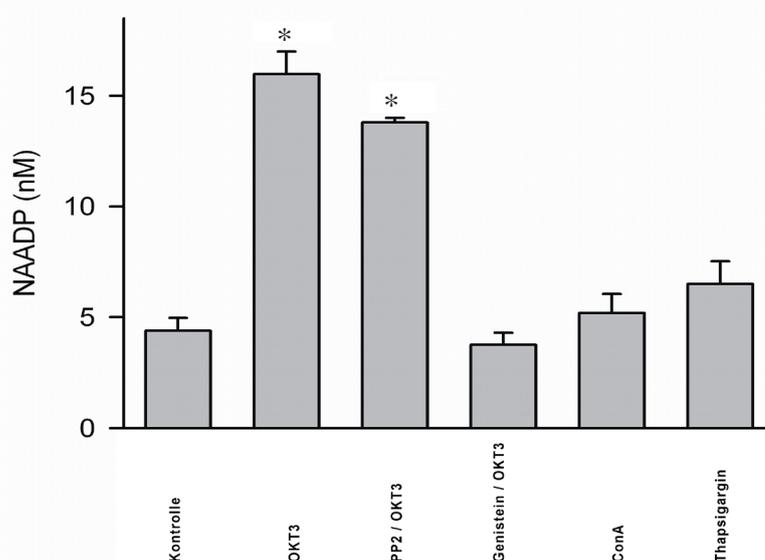


Abb. 4.2: Die Erhöhung cytosolischer NAADP-Konzentrationen erfolgt durch spezifische Stimulation über den T-Zellrezeptor und ist abhängig von Tyrosin-Kinasen. Jurkat T-Lymphozyten wurden unstimuliert (Kontrollen), oder für 5 Minuten mit OKT3 ($5\mu\text{g/ml}$), Concanavalin A ($100\mu\text{g/ml}$) oder Thapsigargin (100nM) stimuliert. In einigen Experimenten wurden die Zellen vor der Stimulation mit OKT3 für 5 Minuten mit PP2 ($1\mu\text{M}$) oder Genistein ($80\mu\text{g/ml}$) vorinkubiert. ($n = 2 - 7$, Mittelwerte \pm S.E.M) * $p < 0,05$ im Vergleich zum Basalwert

Wie in Abbildung 4.2 zu sehen ist, entwickelten T-Lymphozyten in denen durch fünfminütige PP2-Inkubation die Tyrosin-Kinasen $p56^{\text{lc}}k$ und $p59^{\text{fyn}}$ inhibiert wurden (Baskin und Wilson, 1997), ähnlich hohe NAADP-Anstiege, wie Zellen, die ohne PP2-Behandlung mit OKT3 stimuliert wurden. Eine unspezifische Inhibition der Tyrosin-Kinasen durch Genistein (Li und Sarkar, 2002) verhinderte einen OKT3 induzierten NAADP-Anstieg. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation der Zellen durch das Lektin Concanavalin A (ConA), welches einen Calciumeinstrom über den ADPR/TRPM2-Calciumsignalweg einleitet (Suen et al, 2000 und Gasser et al, 2006), keine signifikante NAADP-Erhöhung auslöst. Auch eine durch Thapsigargin ausgelöste Entleerung des Endoplasmatischen Reticulums führte zu keinem signifikanten NAADP-Anstieg.

4.2 Klonierung der Vektoren pDsRed2U6-si

4.2.1 Konstruktion der shRNA-Inserts für den CD38-Knock down

Der nächste Abschnitt beschreibt die Klonierung der Vektoren, die für den CD38 Knock down eingesetzt wurden, sowie die Etablierung stabiler Klone, um den Einfluss von CD38 auf das Calciumsignal und das NAADP-Signalsystem von T-Zellen zu untersuchen. Zur Durchführung einer siRNA vermittelten Expressionsverminderung eines Proteins stehen verschiedene Programme zur Verfügung, die im Internet frei zugänglich sind. Da noch nicht in allen Einzelheiten geklärt ist, welche Eigenschaften eines mRNA-Abschnittes ein geeignetes Ziel für einen optimalen „Knock down“ ausmachen, erleichtern diese Programme lediglich das Erstellen von potentiellen Sequenzen, geben aber keine Garantien über die Funktionalität der Sequenzen. Beide verwendeten Programme (GenSript:<http://genscript.com> und siDirect: <http://design.RNAi.jp>) berücksichtigen, dass die Aufnahme des Gegensinnstranges in den RISC (RNA induced silencing complex) durch Stabilitätsunterschiede zwischen den Enden des RNA-Doppelstranges begünstigt wird (Tomari et al, 2004 und Khvorova et al, 2003). RISC wird vorzugsweise mit dem Strang beladen, an dessen 5`-Ende weniger stabile Basenpaarungen vorhanden sind (Schwarz et al, 2003). Das Programm siDirect wendet für die Prüfung der Kreuzreaktivität der ermittelten siRNA-Sequenzen einen Vergleichsalgorithmus mit einer nicht redundanten cDNA-Datenbank an, was den Vorteil hat, dass wie bei der BLAST-Suche kurze, fast-übereinstimmende Abschnitte nicht übersehen werden. Das Programm GenScript ermittelt geeignete Zielsequenzen aufgrund der Differenzen der freien Energie ΔG zwischen den Enden des RNA-Doppelstranges. Beide Programme schließen Abschnitte aus, in denen viele G/C-Abfolgen vorhanden sind, um die Entwindung der RNA-Helix nicht zu erschweren. Durch das Programm siDirect werden 19 Basen vorgeschlagen, welche in der siRNA den Doppelstrang bilden, während GenScript die Verwendung von 21 Basen empfiehlt.

Da es vorkommen kann, dass zwei Programme durch die Verwendung verschiedener Algorithmen bei der Berechnung einer mRNA unterschiedliche Sequenzvorschläge hervorbringen, liegt die Auswahl der Zielsequenzen in diesen Fällen beim Experimentator. Die in dieser Arbeit verwendeten Zielsequenzen wurden ausgewählt, weil sie von beiden verwendeten Programmen vorgeschlagen wurden. Die siRNA-Fragmente si270, si394 und si458 sind durch siDirect erstellte Sequenzvorschläge. Die Sequenz si771 wurde durch das Programm GenSript ermittelt. Die ausgewählten Sequenzen wurden nach dem 5`-Nukleotid ihres Sinnstranges in der CD38 cDNA-Sequenz mit der Acc. No BC007964 benannt.

Nachfolgend sind die vier vollständigen siRNA-Inserts, welche für den CD38-Knock down verwendet wurden, sowie die durch den *siRNA Sequence Scrambler* von GenScript erstellten Kontroll-Sequenzen, dargestellt.

Ergebnisse

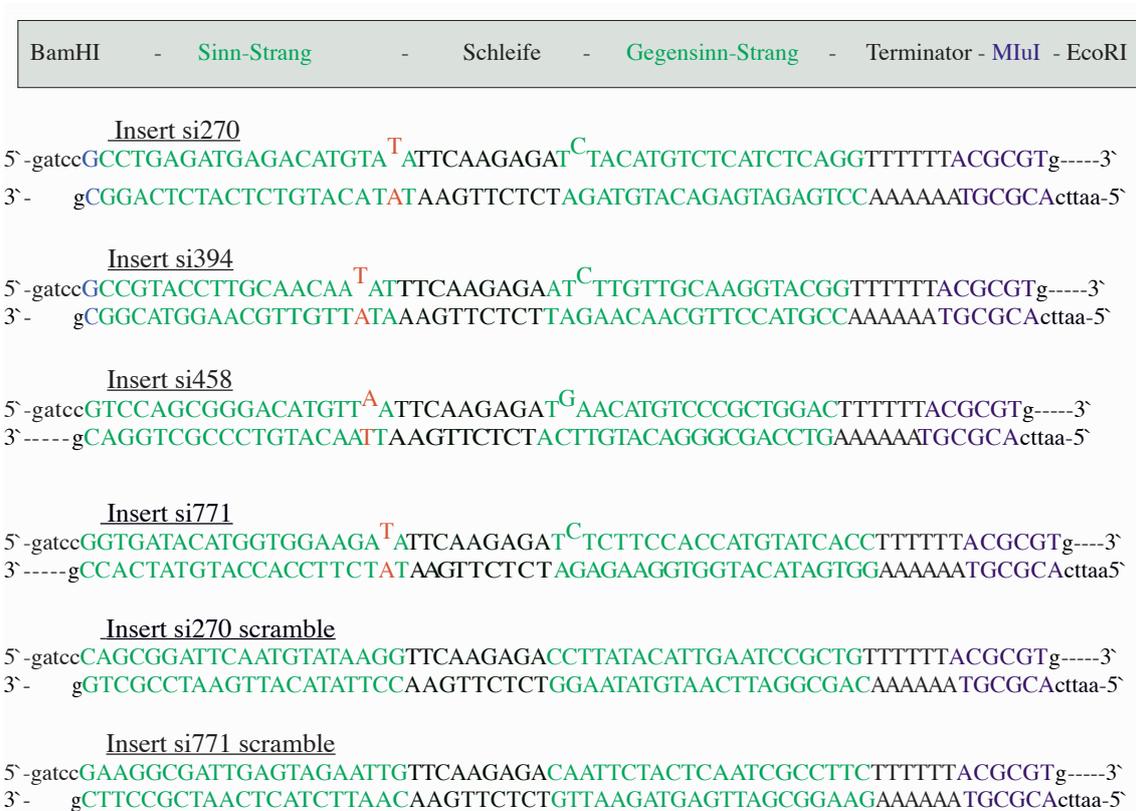


Abb. 4.3: Inserts für die Expression von shRNA

Dargestellt sind die sechs Inserts, die nach der Transkription unter der Kontrolle des humanen U6-Promotors die Haarnadelschleifen-RNA bilden sollen. Die Schnittstellen für die Klonierung in den Vektor pSIREN RetroQ wurden in kleinen Buchstaben dargestellt. Bei den Inserts si270 und si394 wurde vor dem Sinnstrang ein G eingefügt (blaue Buchstaben). Der Sinn- und der Gegensinnstrang sind durch neun Basen getrennt, welche die Schleife bilden. Die Terminator-Sequenz für die RNA-Polymerase besteht aus einer Abfolge aus sechs Thymidin-Basen. Die in lila dargestellte MluI-Schnittstelle ist für die Klonierung in den Vektor pDsRed2-C1 erforderlich. Durch die rot dargestellten Nukleotide entstehen in der doppelsträngigen RNA fehlerhafte Basenpaarungen.

Die in Abbildung 4.3 dargestellten Inserts wurden zunächst in den Vektor RNAi Ready pSIREN RetroQ (BD, Clontech) eingefügt. Bei diesem Vektor handelt es sich um einen selbstinaktivierenden retroviralen Expressionsvektor, der für die Aufnahme von shRNA optimiert wurde. Der Vektor wird in linearisierter Form, geschnitten durch BamH I und EcoR I, geliefert und eignet sich für die Herstellung von transient und von stabil transfizierten Zellen. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Schnittstellen war sichergestellt, dass die Inserts in der richtigen Orientierung inkloniert werden konnten. Das Nukleotid, welches auf die BamHI-Schnittstelle folgt, ist das erste, das von der RNA-Polymerase III transkribiert wird.

Bei den Inserts si270 und si394 wurde direkt vor den Sinnstrang noch ein Guanosin eingefügt, weil die RNA-Polymerase III bei der Initiation der Transkription Purinnukleotide bevorzugt (Zecherle et al, 1996). Hinter dem Gegensinn-Strang liegt die Terminator-Se-

quenz für die RNA-Polymerase III, welche aus sechs hintereinander liegenden Thyminen besteht, von denen die ersten beiden noch transkribiert werden.

Um die Restriktionsanalyse der Inserts zu erleichtern, wurde hinter die Terminator-Sequenz noch eine Mlu I-Schnittstelle eingefügt. Durch die in Abbildung 4.3 rot dargestellten Nukleotide entstehen nach der Transkription fehlerhafte Basenpaarungen in der doppelsträngigen RNA. Diese fehlerhaften Basenpaarungen, die in unmittelbarer Nähe der Schleifenstruktur entstehen, erleichtern die Bindung des doppelsträngigen RNA-Moleküls an den DICER-Komplex, welcher die Schleifenstruktur von dem RNA-Molekül entfernt (Novina et al.2004)



Abb. 4.4: Darstellung einer Haarnadelschleifen-Struktur. Abgebildet ist die Haarnadelschleifen-Struktur, die sich nach der Transkription des Fragments si270 bildet. Das rot dargestellte Nukleotid stellt die eingefügte Fehl-Basenpaarung dar. Bei der blau dargestellte Base handelt es sich um das extra eingefügte Purinnukleotid. Zusätzlich sind die beiden potentiellen Schnittstellen für den DICER-Komplex auf dem Sinn- und dem Gegensinnstrang angegeben.

Die Schnittstellen an der Schleifenstruktur, welche der von (Brummelkamp et al, 2006) verwendeten entspricht, befinden sich in einem Abstand von 20 bis 21 Nukleotiden vom 5'-Ende und 3'-Ende entfernt. Die Uridine am 3'-Ende, die durch die Terminator-Sequenz entstehen, bilden einen Überhang am Gegensinn-Strang.

4.2.2 Herstellung des Vektors pDsRed2 U6-si270

Um die Insertion der shRNA-Fragmente in den Vektor pSIREN RetroQ zu überprüfen, wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Die Inserts wurden durch eine Inkubation mit den Restriktionsenzymen Mlu I und Sal I aus dem Vektor herausgeschnitten. Die Mlu I-Schnittstelle wurde durch die Insertion der shRNA-Inserts in den Vektor eingefügt. Das Restriktionsenzym Sal I schneidet den Vektor auf der Position 1438, wodurch nach dem Restriktionsverdau ein Fragmente mit entsprechender Größe entsteht.

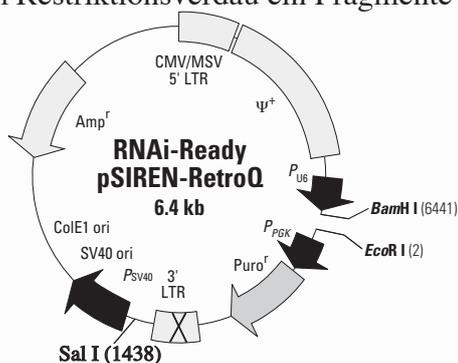


Abb.4.5: Vektorkarte von pSIREN RetroQ. Dargestellt ist der Vektor RNA_iReady pSIREN RetroQ der Firma Clontech.

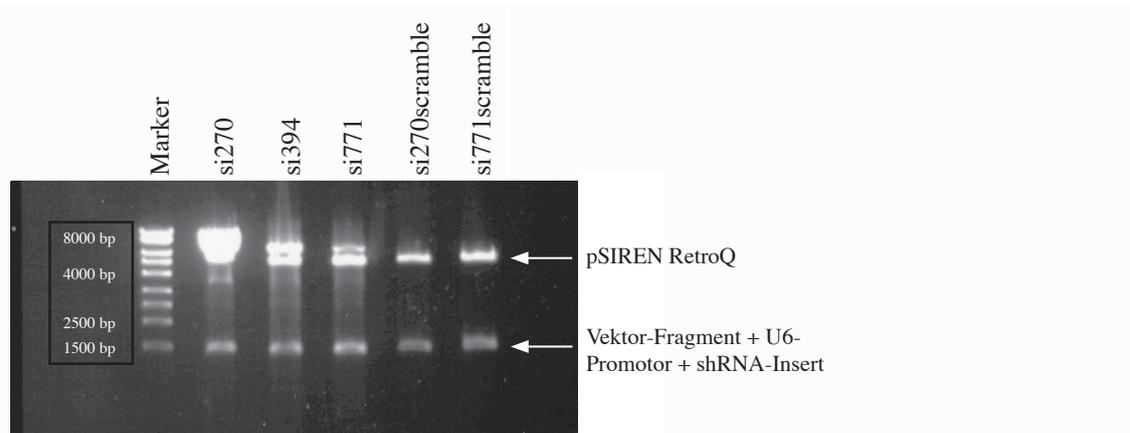


Abb. 4.6: Restriktionsverdau des Vektors pSIREN RetroQ

In der Abbildung sind die pSIREN RetroQ-Vektoren mit den shRNA-Inserts abgebildet. Die Vektoren wurden für 60 Minuten mit Mlu I und Sal I inkubiert und dann auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

Die in Abbildung 4.6 dargestellten Fragmente haben die erwartete Größe. Durch eine Sequenzierungsreaktion konnte gezeigt werden, dass die Vektoren ein fehlerfreies shRNA-Insert enthalten. Die Ausdrücke der Sequenzierungen befinden sich im Anhang. Um einen geeigneten Vektor für eine stabile Transfektion zu erhalten, sollten aus den pSIREN RetroQ-Vektoren die shRNA-Fragmente zusammen mit den U6-Promotoren durch PCR amplifiziert werden und in den Vektor pDsRed2-C1 kloniert werden. Der so erzeugte Vektor, mit der Bezeichnung pDsRed2 U6-si enthält mit dem DsRed2 ein Markergen, das die Identifizierung transfizierter Zellen für transiente Transfektionen erlaubt. Zusätzlich enthält der Vektor eine Neomycinresistenz, die eine Selektion der transfizierten Zellen für die Etablierung stabiler Klone ermöglicht. Ein weiterer Vorteil des konstruierten Vektors ist, dass er mit 5,1 kb deutlich kleiner ist als der pSIREN RetroQ-Vektor mit 6,4 kb, was eine höhere Transfektionseffizienz bewirken kann.

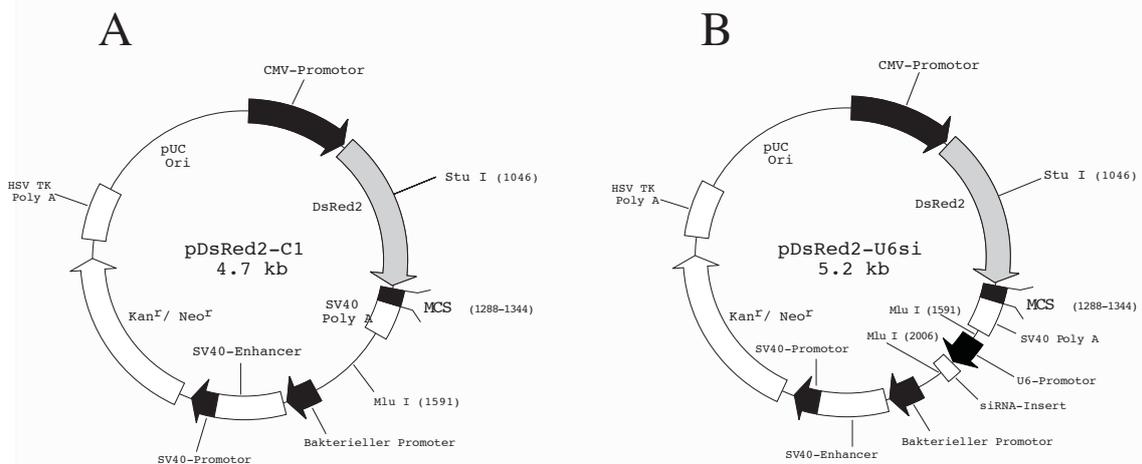


Abb. 4.7: Vektorkarten von pDsRed2-C1 und pDsRed2 U6-si

In **A** ist der Vektor pDsRed2-C1 von der Firma Clontech dargestellt. **(B)** Durch Einfügen der shRNA-Inserts zusammen mit dem U6-Promotor über die Mlu I-Schnittstelle entsteht der Vektor pDsRed2 U6-si (B).

Die direkte Umklonierung des U6-Promotors mitsamt des shRNA-Fragments in den pDsRed2-C1 Vektor konnte nur mit dem Insert si270 erfolgreich durchgeführt werden. Die anderen shRNA-Fragmente si394, si771 und die beiden Kontroll-Vektoren si270scramble und si 771scramble konnten nicht durch diese Klonierungsstrategie kloniert werden. Zum einen war es teilweise sehr schwierig die shRNA-Expressionskassette (shRNA-Insert und U6-Promotor) aus dem Vektor pSIREN RetroQ durch PCR zu amplifizieren. Dies war erst möglich als gewisse Parameter wie DNA-Menge oder Annealing Temperatur angepasst wurden. So ließ sich die Expressionskassette von Fragment si270scramble nur mit einer DNA-Menge von 10 ng und einer Annealing-Temperatur von 54°C amplifizieren, während für das Fragment si771 53 ng an Template-DNA eingesetzt und eine Temperatur von 53°C verwendet wurde. Zum anderen ließen sich die Mlu I geschnittenen Expressionskassetten der anderen Fragmente nicht in den Vektor pDsRed2-C1 klonieren. Es wuchsen nur wenig Bakterienkolonien nach der Transformation mit den Ligationsansätzen auf den Agarplatten. Nach einer Restriktionsanalyse der aufgearbeiteten Plasmid-DNA stellte sich heraus, dass die Bakterien nur den religierten Vektor pDsRed2-C1 trugen. Es wurde auch versucht, die Insertion der shRNA-Expressionskassette in den Vektor zu erhöhen, indem der Ligationsansatz über Nacht bei 8°C inkubiert wurde. Auch eine Veränderung des Insert/Vektor-Ratios bei der Ligation führte zu keiner Aufnahme der shRNA-Expressionskassette in den pDsRed2-C1 Vektor. Ein weiterer Ansatz, der zu keinem positiven Ergebnis führte, war die Elution der geschnittenen shRNA-Expressionskassetten aus dem Gel, welche dann in den linearisierten Vektor kloniert werden sollten. Die DNA-Elution des Inserts aus dem Gel wurde mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) durchgeführt.

4.2.3 Klonierung der übrigen pDsRed2 U6-si Vektoren über ein Blau/weiß-Screening

Um die Komplikationen bei der Klonierung der weiteren Vektoren zu umgehen, wurden die Expressionskassetten in den Vektor pGem T Easy (Promega) zwischenkloniert. Der Vektor pGem T Easy ist für die Aufnahme von PCR-Amplifikaten mit 3'-A Überhängen optimiert. Der Vektor selbst besitzt an beiden 3'-Enden einen T-Überhang, was zum einen die Religation des leeren Vektors erschwert und zum anderen die Aufnahme kompatibler PCR-Fragmente erleichtert. Die Insertion der Taq-amplifizierten Expressionskassetten in den Vektor erwies sich als deutlich einfacher. Die *E.coli*-Transformation erbrachte nach Induktion der Farbreaktion durch Zugabe von X-Gal und IPTG zum Transformationsansatz zu mehr als 80% weisse Bakterienklone, was für eine Aufnahme der Expressionskassette spricht. Beim Ligationsansatz wurde nach Angaben von Promega mit einem Insert/Vektor-Ratio von 8 : 1 und 10 : 1 gearbeitet, mit denen gute Transformationseffizienzen erzielt wurden. Die Präparation der Plasmid-DNA ergab, dass nur sehr wenige der weissen Bakterienkolonien keine Expressionskassette trugen und somit falsch positiv waren.

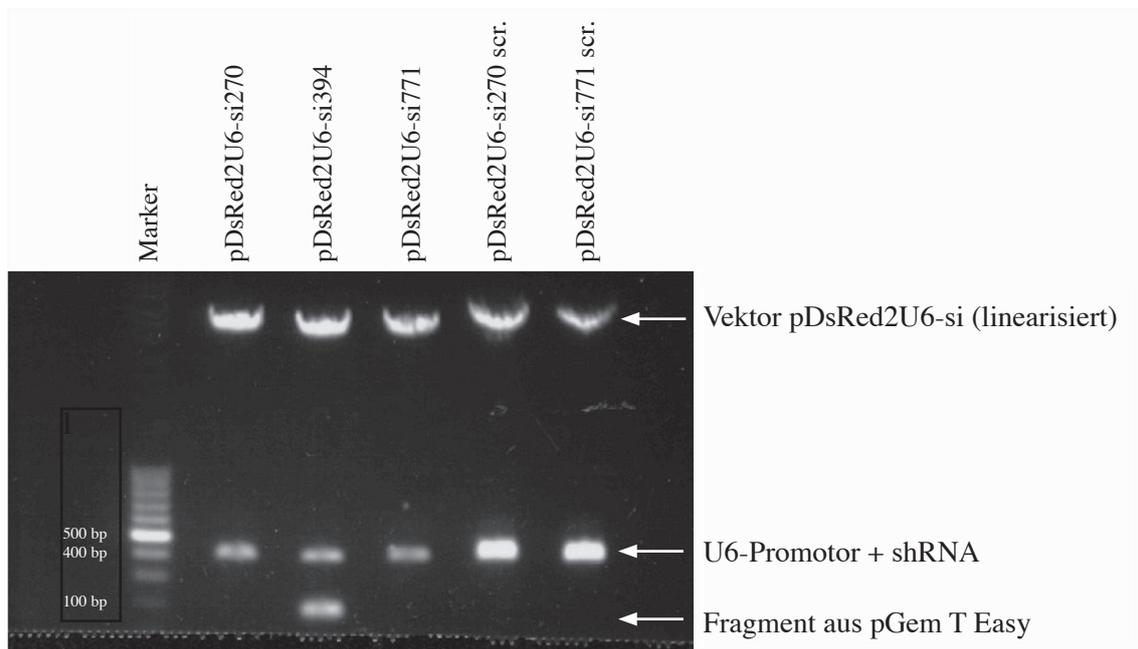


Abb. 4.8: Restriktionsverdau der Vektoren pDsRed2 U6-si. Die Vektoren wurden für 60 Minuten mit Mlu I inkubiert und dann auf ein 1%iges Agarosegel gegeben.

Nach dem Herausschneiden der Expressionskassetten aus dem Vektor pGem T Easy mit Mlu I konnten diese in den ebenfalls durch Mlu I linearisierten Vektor pDsRed2-C1 eingefügt werden, was sich als deutlich einfacher herausstellte als die direkte Klonierung aus dem pSIREN RetroQ-Vektor.

Wie in Abbildung 4.8 dargestellt, konnten die shRNA-Expressionskassetten erfolgreich in den Vektor pDsRed2-C1 kloniert werden. Das DNA-Fragment, das sich auf einer Höhe von 100 bp befindet, entstammt dem Vektor pGem T Easy, welcher für das Blau/ weiss-Screening verwendet wurde. Dieser Vektor trägt an der Position 114 ebenfalls eine Mlu I-Schnittstelle, so dass dieses kleine Fragment durch die Verwendung des Insert/Vektor-Verdau mit in den pDsRed2-C1-Vektor kloniert werden kann. Bei diesem kleinen Fragment handelt es sich um ein Stück aus dem lacZ-Gen.

4.2.4 Etablierung stabiler CD38 Knock down-Zelllinien

Die Jurkat T-Lymphozyten wurden durch Elektroporation mit den pDsRed2U6si-Vektoren und den Kontrollvektoren transfiziert. Durch eine Inkubation für 14 Tage unter Verwendung von Selektionsmedium (800µg/ml G418) wurde angenommen, dass die verbliebenen Zellen den Vektor stabil in das Genom integriert hatten. Durch Zellver-einzelung (Limiting Dilution) wurden dann Klone erhalten. Durch jedes transfizierte shRNA-Konstrukt konnten 10 - 15 Klone generiert werden. Durch die Verdünnung der Zellen in der Limiting Dilution auf 0,25 Zellen pro Vertiefung, wurden 24 Klone für jedes shRNA-Konstrukt erwartet. Das Screening der erzeugten Klone erfolgte zunächst über die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ und die Bestimmung der Glykohydrolase-Aktivität.

Die Klone der Konstrukte si270 und si771 lieferten jeweils einen Klon, der im Vergleich zum JMP-WT ein stark reduziertes Calcium-Signal zeigte, sowie vier bis fünf Klone, die im Vergleich zum Wildtyp eine mittlere Reduktion im Calcium-Signal aufwiesen. Die Klone des Konstruktes si394, sowie die Klone der mit den Kontroll-Vektoren transfizierten T-Lymphozyten, zeigten keine Reduktion im $[Ca^{2+}]_i$.

4.2.5 CD38 Knock down-Klone zeigen reduzierte NAD-Glykohydrolyse-Aktivität

Zur Bestimmung der Enzymaktivität in den stabilen CD38 Knock down-Zellen wurden durch Ultrazentrifugation hergestellte Membranfraktionen mit dem unter 3.3.3 beschriebenen Fluoreszenz-Assay unter Verwendung von ethenoNAD vermessen. Das Substrat ethenoNAD wurde zur Überprüfung der ADPRC-Aktivität (Graeff et al, 1996) und zur Bestimmung der NADGH-Aktivität (Cockayne et al, 1998) verwendet. Durch die Abspaltung der Nikotinamid-Gruppe wird der Fluoreszenz vermindernde Effekt dieser Gruppe aufgehoben und es ist ein Anstieg in der Fluoreszenz messbar.

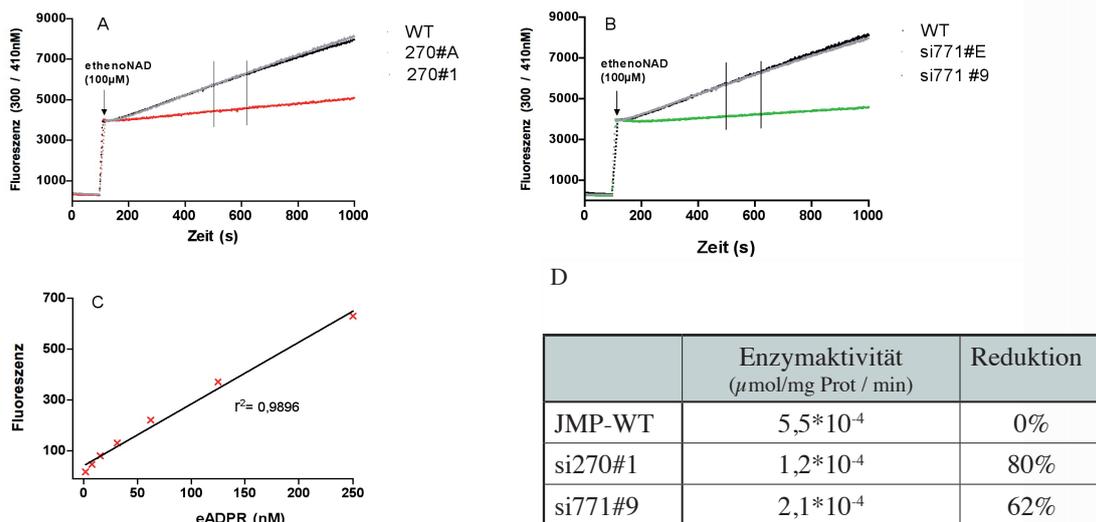


Abb. 4.9: Bestimmung der CD38 Enzym-Aktivität

In **A** und **B** wurden $200\mu\text{g}$ der jeweiligen P10-Membranfraktion in 1ml Ca^{2+} -Messpuffer aufgenommen und nach 100 Sekunden mit ethenoNAD ($100\mu\text{M}$) versetzt. Der Anstieg der Fluoreszenz wurde für 900 Sekunden gemessen (Extinktion = 300nm , Emission = 410nm). schwarz = JMP-WT, grau = Kontrollklone (A = si270scramble#A, B = si771scramble#E), rot = Klon si270#1, grün = Klon si771#9. Abbildung **C** zeigt eine Kalibrierkurve für ethenoADPR. In **D** sind die Enzymaktivitäten der CD38 Knock-Klone im Vergleich zum JMP-WT dargestellt

Die in Abbildung 4.9 dargestellten Messungen zeigen, dass die enzymatische Umwandlung von ethenoNAD zu ethenoADPR in den CD38 Knock down-Klonen si270#1 und si771#9 stark reduziert war (Teilabbildungen A und B). Die Kontrollklone si270scramble#A und si771scramble#E zeigten einen vergleichbaren Substratumsatz wie die Jurkat-WT Zellen. Durch die ethenoADPR-Kalibrierung ergaben sich die in Abbildung 4.9 D dargestellten Enzymaktivitäten.

4.2.6 CD8 Knock down-Klone weisen eine stark verminderte CD38-Expression auf

Um Aufschluss über die Expression von CD38 in den Knock down-Klonen, den Kontroll-Klonen und im Jurkat-WT zu erlangen, wurden Westernblot-Experimente durchgeführt. Humanes CD38 wird in der Literatur als Transmembran-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 45kDa beschrieben. Das Enzym besteht aus einem kurzen, N-terminalen Ende, welches sich im Zytoplasma befindet, einer einfachen Transmembrandomäne und dem extrazellulären, C-terminalen Ende, welches auch die enzymatische Aktivität besitzt. Aufgrund dieser Anordnung gehört es zur Gruppe der Typ-II-Transmembranproteine (Metha et al, 1996). Es stellte sich heraus, dass die Knock down-Klone im Vergleich zum Jurkat-WT und zu den Kontrollklonen nur noch eine schwache CD38-Expression aufwiesen.

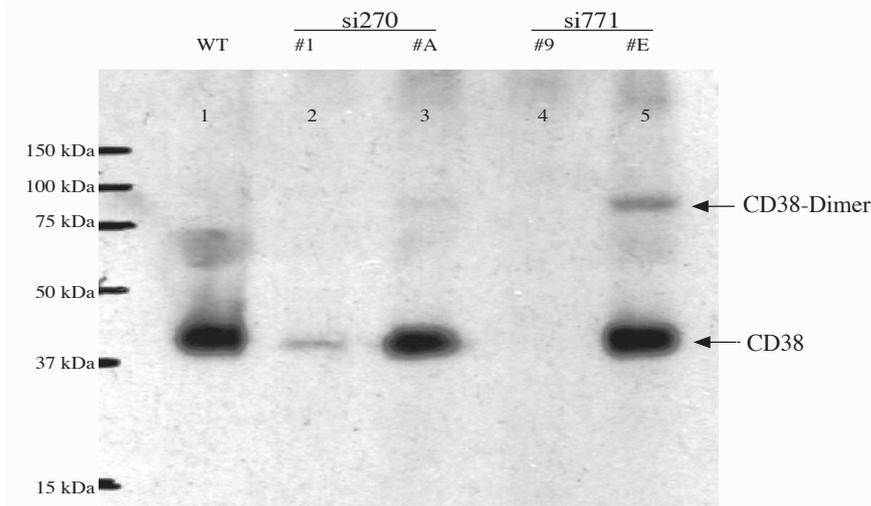


Abb. 4.10: Nachweis von CD38 in Jurkat T-Lymphozyten durch Western Blot-Analyse

Es wurden jeweils 60µg der P10-Fraktion vom 1) Jurkat-WT, 2) Klon si270#1, 3) Kontrollklon si270scramble#A, 4) Klon si771#9 und 5) Kontrollklon si771scramble#E unter nicht reduzierenden Bedingungen in einem 12,5%igen Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden dann durch einen Tank-Blottransfer (3 Stunden, 4°C und 240mA) auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion erfolgte über Nacht mit dem anti CD38 Antikörper AT1. Der Blot wurde durch das ECL-System der Firma Amersham Pharmacia Biotech unter Verwendung eines HRP-gekoppelten Zweitantikörpers (Dianova) entwickelt.

Das in Abbildung 4.10 exemplarisch dargestellte Western Blot-Experiment zeigt auf einer Höhe von 45kDa spezifische Banden. Die beiden Kontroll-Klone si270scramble#A und si771scramble#E wiesen ähnlich ausgeprägte CD38-Banden wie der Jurkat-WT auf. Im Knock down-Klon si270#1 war die CD38-Expression im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert. Der Klon si771#9 zeigte keine detektierbare CD38-Expression. Die Kontroll-Klone si270#A und si771#E wiesen auf der Höhe von 80kDa eine schwache Bande auf. Hierbei könnte es sich um eine dimerisierte Form von CD38 handeln. Es sind zum einen katalytisch aktive, durch posttranslationale Modifikation, oligomerisierte CD38-Formen (Umar et al, 1996) und auch ebenfalls katalytisch aktive dimere und tetramere Formen des Ectoenzym beschrieben worden (Bruzzone et al, 1998).

4.3 CD38-Expression beeinflusst die NAADP-Konzentration

4.3.1 CD38 Knock down führt in T-Lymphozyten zu einer leichten NAADP-Erhöhung

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit dem Metabolismus von NAADP. Die einzigen bekannten Enzyme, die in der Lage sind NAADP zu synthetisieren, sind CD38 und die ADP-Riboylcyclase aus *Aplysia californica* (Graeff et al, 2006 und Liu et al, 2005). Um eine mögliche Beteiligung von CD38 an der in vivo-Synthese näher zu charakterisieren, wurden NAADP-Messungen in Jurkat WT-Zellen und in den CD38 Knock down-Klonen durchgeführt. Es wurden auch NAADP-Messungen in verschiedenen Geweben aus WT-Mäusen und aus CD38 knock out-Mäusen durchgeführt. Desweiteren wurden NAADP-Konzentrationen in HeLa-WT-Zellen, die CD38 negativ sind und in CD38^{pos.}-HeLa-Zellen, die CD38 überexprimieren, gemessen.

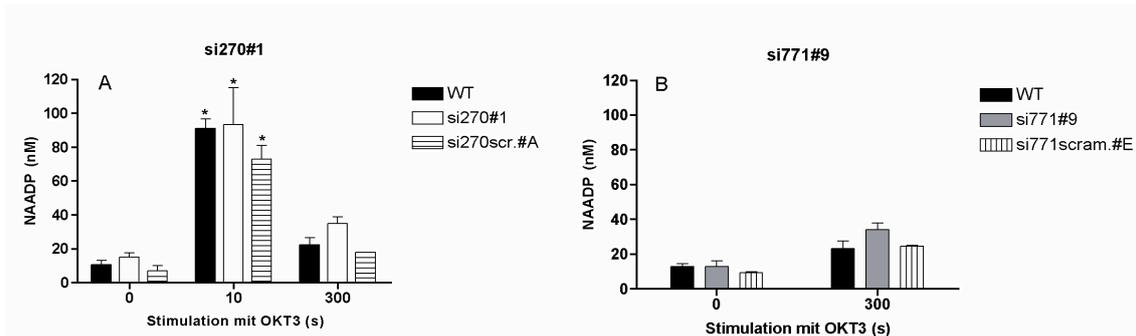


Abb. 4.11: Auch CD38 Knock down T-Lymphozyten verfügen über einen induzierbaren NAADP-Metabolismus. In Jurkat-WT (schwarze Balken), Klon si270#1 (weisse Balken), Klon si771#9 (graue Balken) und in den Kontrollklonen si270scramble#A, und si771scramble#E (gestrichelte Balken) wurden NAADP-Messungen in unstimulierten Zellen oder nach 10 Sekunden und 5 Minuten OKT3-Stimulation ($5\mu\text{g/ml}$) durchgeführt. Das NAADP wurde extrahiert und mit dem NAADP Cycling-Assay vermessen. ($n = 2 - 4$, Mittelwerte \pm S.E.M * $< 0,05$ im Vergleich zu den Basalwerten).

Messungen in den CD38 Knock down-Klonen zeigten, dass diese Zellen einen den WT-Zellen vergleichbaren NAADP-Metabolismus aufwiesen.

Zellen	0 Sekunden	10 Sekunden	5 Minuten
JMP-WT	11 \pm 5nM	91 \pm 10nM	22 \pm 8nM
si270#1	15 \pm 5nM	93 \pm 30nM	35 \pm 6nM
si270#A	7 \pm 4nM	73 \pm 11nM	22 \pm 5nM
si771#9	13 \pm 6nM	nd	34 \pm 7nM
si771#E	9 \pm 1nM	nd	25 \pm 1nM

Tab.:4. NAADP-Messungen in den CD38 Knock down-Klonen. Darstellung der NAADP-Messungen aus Abbildung 4.11 nd = nicht bestimmt

Die Basalwerte der WT-Zellen und der CD38 Knock down-Zellen wiesen, ebenso wie die Kontroll-Klone, Werte von ca.10nM auf. Durch eine OKT3-Stimulation von 10 Sekunden, stiegen die NAADP-Konzentrationen vom Jurkat-WT auf 91nM und vom Knock down-Klon si270#1 auf 93nM an. Nach einer fünf minütigen Stimulation mit OKT3 wurde in den Klonen si270#1 und si771#9 im Vergleich zum Jurkat-WT und zu den Kontrollklonen leicht erhöhte NAADP-Konzentrationen gemessen. Im JMP-WT wurden Werte von 22nM, im Klon si270#1 von 35nM und im Klon si771#9 von 35nM gemessen. Die beiden Kontroll-Klone lagen mit Konzentrationen von 22nM (si270scramble#A) und 25nM (si771scramble#E) im Konzentrationsbereich der JMP WT-Zellen.

4.3.2 CD38 Knock out-Mäuse weisen in Milz und Thymus erhöhte NAADP-Konzentrationen auf

Durch die Western Blot-Experimente und die Bestimmung der Glycohydrolase-Aktivität in den CD38 Knock down-Klonen stellte sich heraus, dass die Expression des Enzyms nicht vollständig vermindert ist. Um auszuschließen, dass die Restexpression von CD38 in den Klonen für die NAADP-Bildung verantwortlich ist, wurden NAADP-Bestimmungen in Thymus- und Milzgeweben von WT-Mäusen und CD38 Knock out-Mäusen durchgeführt. Die Gewebe wurden ausgewählt, weil es sich bei Milz und Thymus um Organe handelt, die für Reifung und Differenzierung von Lymphozyten eine wichtige Rolle spielen. Die Abwesenheit von CD38 in den Geweben der ko-Tieren wurde mit Hilfe der Durchfluss-Cytometrie von Prof. Mittrücker bestätigt (Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Institut für Immunologie).

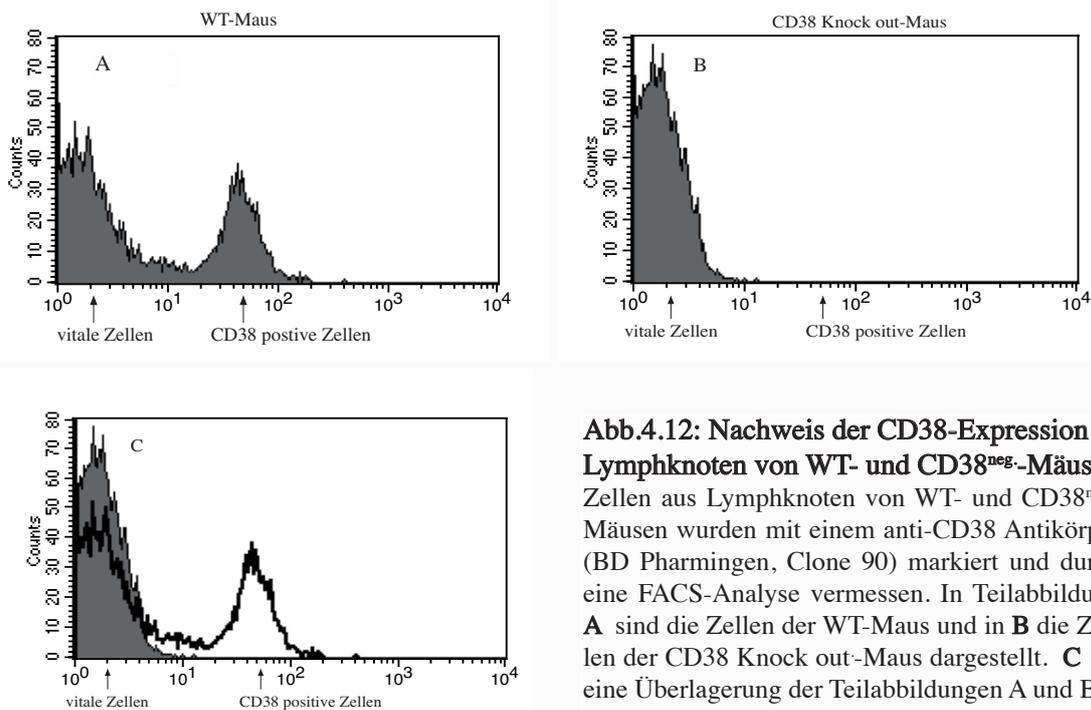


Abb.4.12: Nachweis der CD38-Expression in Lymphknoten von WT- und CD38^{neg.}-Mäusen
 Zellen aus Lymphknoten von WT- und CD38^{neg.}-Mäusen wurden mit einem anti-CD38 Antikörper (BD Pharmingen, Clone 90) markiert und durch eine FACS-Analyse vermessen. In Teilabbildung A sind die Zellen der WT-Maus und in B die Zellen der CD38 Knock out-Maus dargestellt. C ist eine Überlagerung der Teilabbildungen A und B.

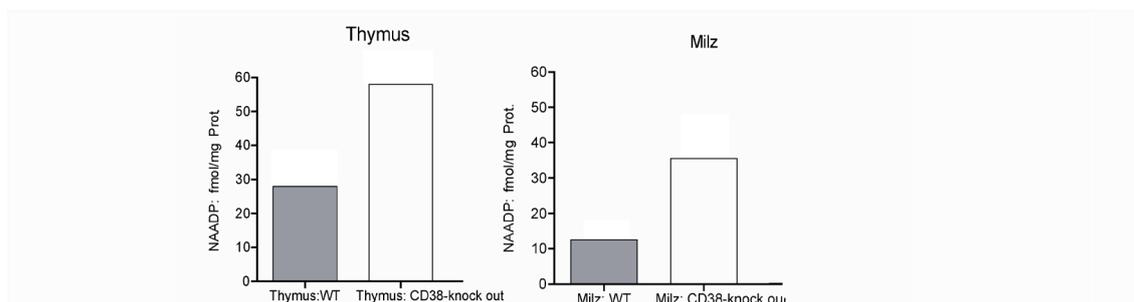


Abb. 4.13: Milz und Thymus von CD38^{neg}-Tieren zeigen erhöhte NAADP-Konzentrationen. Milz- und Thymusgewebe von WT-Mäusen (graue Balken) und CD38^{neg}-Mäusen (weisse Balken) wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und dann im Mörser pulverisiert. Endogenes NAADP wurde extrahiert und mit dem NAADP Cycling-Assay bestimmt. n = 2

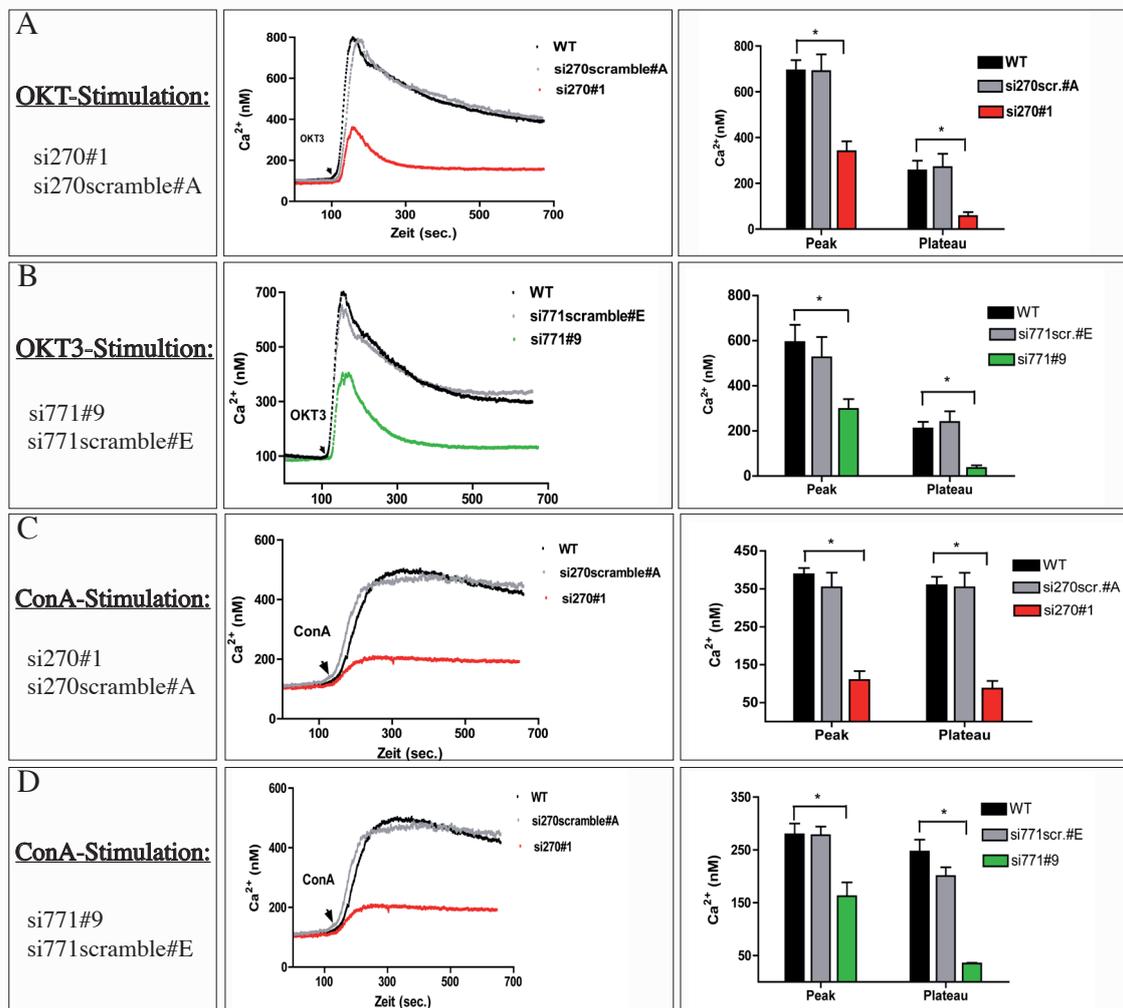
Die NAADP-Messungen in Milzen und Thymie zeigten, dass die CD38 Knock out-Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren deutlich erhöhte NAADP-Konzentrationen aufwiesen. In den WT-Thymie wurden NAADP-Konzentrationen von 27 fmol/mg Protein gemessen, während in CD38 Knock out-Tieren Konzentrationen von 55 fmol/mg Protein gemessen wurden. In den Milzen der CD38 Knock out-Tiere wurden im Vergleich zu den WT-Tieren dreifach erhöhte NAADP-Konzentrationen ermittelt. In den WT-Geweben wurden Konzentrationen von 12 fmol/mg Protein gefunden und in den CD38 Knock out-Milzen 37 fmol/mg Protein.

4.4 Expressionsverminderung von CD38 wirkt sich auf das Agonist-induzierte Calciumsignal aus

Um den Einfluss von CD38 auf die Signaltransduktionsvorgänge näher zu untersuchen, wurden $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen in den CD38 Knock down-Klonen und im JMP-WT durchgeführt. Obwohl die in dieser Arbeit durchgeführten NAADP-Bestimmungen gezeigt haben, dass die CD38-Expressionsverminderung in den T-Lymphozyten und der CD38 Knock out in den Mäusen zu keiner Reduktion in der NAADP-Konzentration geführt haben, ist davon auszugehen, dass sich eine Verminderung der CD38-Expression auf das $[Ca^{2+}]_i$ auswirkt. Es konnte durch unterschiedliche Arbeiten dargestellt werden, dass die Bildung des $[Ca^{2+}]_i$ -mobilisierenden Botenstoff cADPR über CD38 verläuft (Howard et al, 1993 und Bruzzone et al, 2001). Die in vitro-Synthese von ADPR, ein Botenstoff, der für Ca^{2+} -Einströme durch den Ionenkanal TRPM2 sorgt (Heiner I et al, 2006), ist ebenfalls mehrfach beschrieben worden. Die Bildung von ADPR erfolgt unter einer CD38 vermittelten Abspaltung der Nikotinamid-Gruppe von NAD (Metha et al, 1996 und Lund et al, 1999). Ein kausaler Zusammenhang zwischen der endogenen Konzentration des Botenstoffes und der CD38-Expression muss für ADPR allerdings noch erbracht werden. Um zu bestimmen welchen Einfluss CD38 auf die Calciumsignale in T-Lymphozyten hat, wurden die Zellen zum einen mit dem Antikörper OKT3, welcher an den CD3-Komplex des T-Zellrezeptors bindet, stimuliert. Dies führt zu einer Aktivierung der Zellen und somit zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ (Gasser et al, 2006B). Der entstehende Calciumanstieg

Ergebnisse

setzt sich zum einen aus einer Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern und aus einem Calciumeinstrom über die Plasmamembran zusammen (Berridge et al, 2000). Um zu differenzieren welcher Teil durch den CD38 Knock down beeinflusst ist, wurde unter anderem mit einem Protokoll gearbeitet, in dem die Stimulation der Zellen in calcium-freier Umgebung abläuft, so, dass die Calciumfreisetzung aus zytosolischen Speichern gemessen werden konnte (Ca^{2+} -free/ Ca^{2+} -readdition-Protokoll). Durch Zugabe von extrazellulärem Calcium konnte dann der Einstrom über die Plasmamembran ermittelt werden. Durch eine Stimulation mit dem Lektin Concanavalin A, welches als Agonist für ADP-Ribose (ADPR) beschrieben ist (Gasser et al.2006A), sollte der durch ADPR



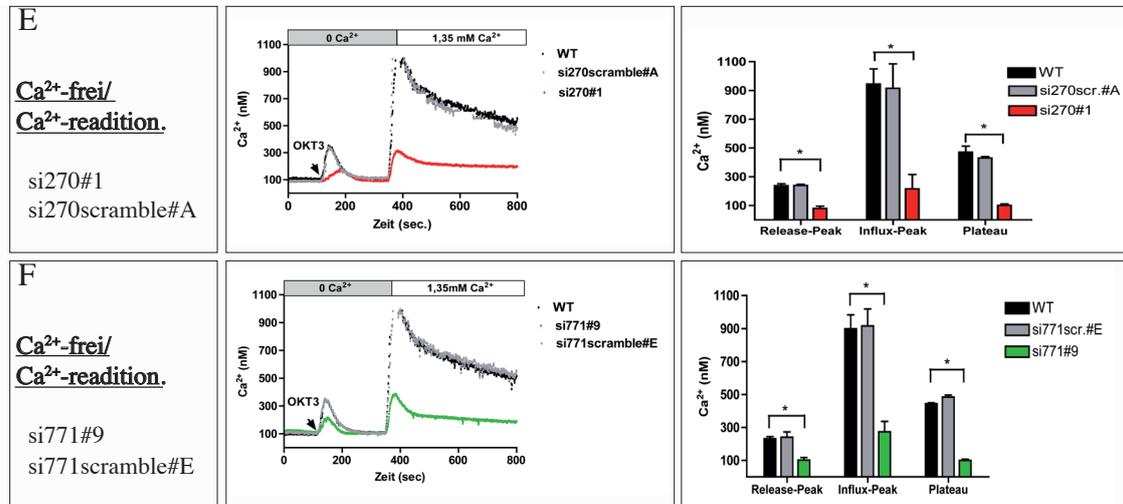


Abb. 4.14: Bestimmung zytosolischer Calciumkonzentrationen. Auf der linken Seite sind in **A** und **B** die Calciumverläufe Fura-2/AM beladener Zellen nach Stimulation mit OKT3 (10 μ g/ml) dargestellt. Auf der rechten Seite sind die Peak- und Plateauwerte der Messung 160 Sekunden und 500 Sekunden nach Messbeginn zu sehen. In allen Teilabbildungen sind der Jurkat-WT in schwarz, Klon si270#1 in rot, Klon si771#9 in grün und die Kontrollklone si270scramble#A und si771scramble#E in grau abgebildet. Die linken Teilabbildungen **C** und **D** zeigen Fura-2/AM beladene Zellen, die mit ConA (100 μ M) stimuliert wurden. Auf der rechten Seite sind die Peak- und Plateauwerte 280 Sekunden und 500 Sekunden nach Messbeginn dargestellt. In Teilabbildungen **E** und **F** (links) wurde die Calciumfreisetzung und der Calciumeinstrom durch das Ca²⁺-frei/Ca²⁺-readition-Protokoll bestimmt. Auf der rechten Seite sind der Release-Peak, der Influx-Peak und das Ca²⁺-Plateau 180 Sekunden, 380 Sekunden und 700 Sekunden nach Messbeginn dargestellt (n = 4, Mittelwerte \pm SEM, * < 0,05 im Vergleich zum Wildtyp.).

Wie in Abbildung 4.14 (A-D) zu sehen ist, zeigten die CD38 Knock down Klone nach Stimulation mit OKT3 und ConA im Vergleich zum Jurkat-WT eine stark erniedrigte [Ca²⁺]_i. Die Klone, welche mit den Kontrollvektoren transfiziert wurden, lieferten Konzentrationen, die dem JMP-WT entsprachen. Die Experimente, in denen die Zellen in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium stimuliert wurden (E und F), zeigten im Vergleich zu den WT-Zellen und zu den Kontrollklonen eine erniedrigte Ca²⁺-Freisetzung (Release-Peak). Diese Reduktion war auch nach Zugabe von extrazellulärem Calcium im Influx-Peak und im Ca²⁺-Plateau vorhanden. Der Klon 270#1 wies im Calcium-Peak nach OKT3-Stimulation eine Konzentration von 335nM auf, während im JMP-WT ein Calcium-Peak von 700nM gemessen wurde (Abb 4.13/A). Die Calciumkonzentrationen des Kontrollklons si270scramble#A entsprachen den Konzentrationen der JMP WT-Zellen. In den Experimenten in denen die Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern und der Calciumeinstrom über die Plasmamembran ermittelt wurde, ist im JMP-WT ein Release-Peak von 220nM und im Klon si771#9 von 96nM gemessen worden (Abbildung 4.13/F). Der Calciumeinstrom über die Plasmamembran hatte im JMP-WT ein Maximum bei 890nM, während die Konzentration im Klon si771#9 bei 270nM lag. Die durchschnittliche Calciumkonzentration des Plateaus betrug im JMP-WT 440nM und im Knock down Klon 771#9 102nm.

In Teilabbildung D ist zu sehen, dass der Kontrollklon si771scramble#E Ca^{2+} -Plateau-Werte von 200nM aufwies und im Jurkat-WT Konzentrationen von 240nM gemessen wurden. Dieser Unterschied stellte sich jedoch als nicht signifikant heraus.

4.4.1 CD38 Knock down führt zu signifikanten Verminderungen in der $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Alle durchgeführten Messungen ergaben, dass die mit den CD38-Konstrukten transfizierten Klone Calciumsignaturen aufwiesen, die signifikant niedriger waren, als die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im JMP-WT oder in den Kontroll-Klonen.

Die Messungen, in denen die Zellen mit dem Antikörper OKT3 oder durch das Lektin Concanavalin A stimuliert wurden, zeigten, dass sich die Verminderung stärker im Ca^{2+} -Plateau als im Ca^{2+} -Peak bemerkbar machte. Die durchschnittliche Reduktion bei den Peakwerten lag bei 55%. Die Ca^{2+} -Plateaus sind bei den OKT3- und ConA-Messungen um 81% im Vergleich zum Wildtyp vermindert. Die verstärkte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Verminderung zu späteren Zeitpunkten der T-Zellaktivierung verdeutlicht die Bedeutung von cADPR für lang anhaltende Ca^{2+} -Einströme über die Plasma-Membran (Guse et al, 1995). Durch die Messungen mit dem Ca^{2+} -free/ Ca^{2+} -readdition-Protokoll stellte sich heraus, dass die Verminderung des Calciumsignals im Release-Peak mit durchschnittlich 60% etwas geringer ausfiel, als im Calcium-Plateau mit 77% und im Influx-Peak mit 74%.

4.5 Überexpression von CD38 führt zu einer Erniedrigung zytosolischer NAADP-Konzentrationen in HeLa-Zellen

Um eine mögliche Beteiligung von CD38 am Abbau von NAADP zu erhärten, wurden NAADP-Messungen in HeLa-WT und CD38^{pos.}-HeLa-Zellen (Zocchi et al, 1998) durchgeführt. Die CD38-Expression in den HeLa-Zellen wurde durch die Glykohydrolase-Aktivität und somit dem Umsatz von ethenoNAD zu ethenoADPR überprüft. Es zeigte sich, dass die CD38^{pos.}-HeLa-Zellen durch Hydrolyse von ethenoNAD einen deutlichen Fluoreszenz-Anstieg auslösen, während in den Messungen mit dem HeLa-WT kein Substratumsatz messbar war. Es war also davon auszugehen, dass der verwendete CD38^{pos.}-Zellklon bei allen durchgeführten Experimenten funktionelles CD38 exprimiert. Die Enzymaktivität in den CD38^{pos.}-HeLa-Zellen betrug $7 \times 10^{-4} \mu\text{mol}/10^6 \text{ Zellen}/\text{Min}$.

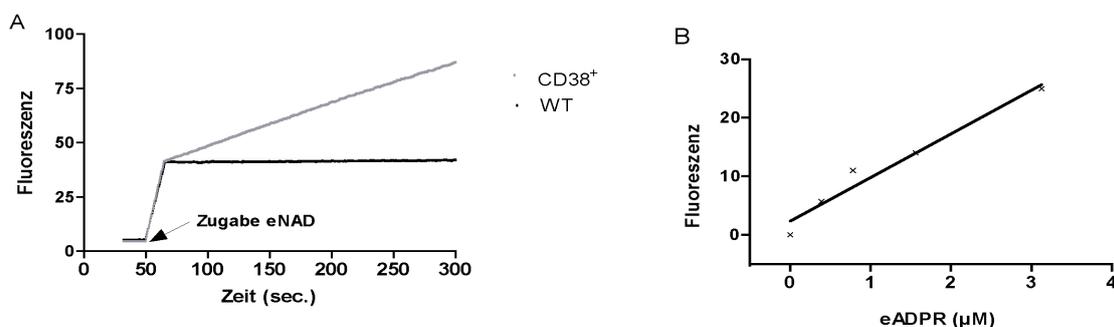


Abb. 4.15: Überprüfung der Glykohydrolase-Aktivität in HeLa-WT und CD38^{pos.}-HeLa-Zellen. (A) 2×10^6 Zellen wurden mit ethenoNAD ($100 \mu\text{M}$) inkubiert und die Umwandlung von ethenoNAD zu ethenoADPR fluorimetrisch (300nm = Emission, 410nm = Extinktion) für 300 Sekunden verfolgt. Schwarz = HeLa-WT, grau = HeLa³⁸⁺ (B) zeigt die Vermessung ansteigender Konzentrationen an ethenoADPR bei einer Extinktion von 300nm und einer Emission von 410nm .

Die NAADP-Messungen in den HeLa-Zellen machten deutlich, dass auch HeLa-WT-Zellen, die kein CD38 exprimieren, NAADP aufwiesen. In den CD38^{pos.}-HeLa-Zellen wurden im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen erniedrigte Basalwerte gemessen. In den WT-Zellen wurden Konzentrationen von 12nM und in den CD38 transfizierten Zellen von 6nM gefunden (Abbildung 4.16). Zur Stimulation der HeLa-Zellen wurde das Acetylcholin Struktur analogon Carbachol eingesetzt, welches nach Bindung an die muscarinischen Rezeptoren zu einer Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration führt (Abbildung 4.16).

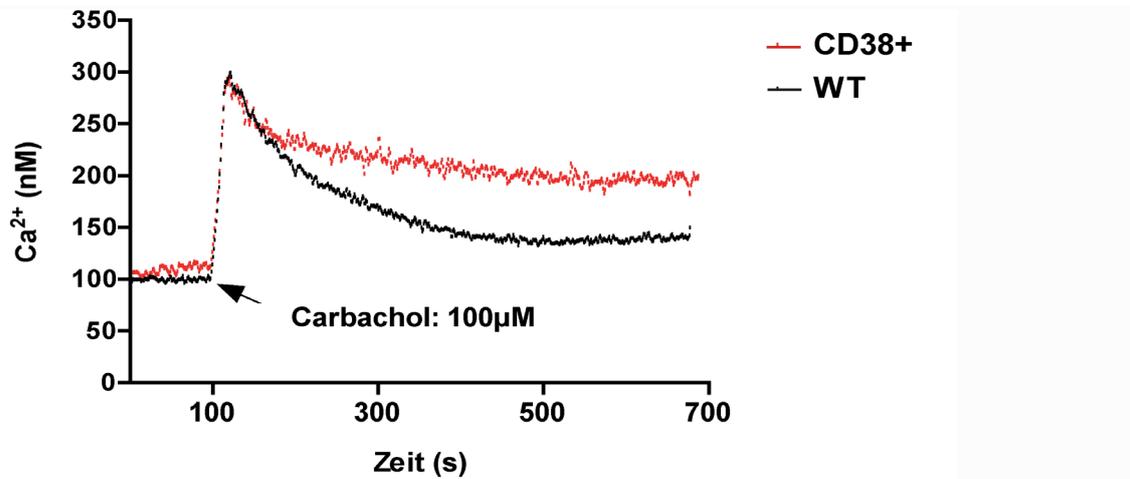


Abb. 4.16: Ca²⁺-Messung in HeLa-Zellen. Bestimmung von [Ca²⁺]_i in 10⁶ Fura2-beladener HeLa-WT-Zellen (schwarz) und HeLa-CD38^{pos.}-Zellen (rot) in Gegenwart von 1mM extrazellulärem Ca²⁺. Die Zellen wurden nach Ablauf von 100 Sekunden mit Carbachol (100μM) stimuliert.

Abbildung 4.17 zeigt, dass es zu signifikanten Differenzen in der NAADP-Konzentration zwischen dem HeLa-WT und den CD38^{pos.}-HeLa-Zellen nach einer kurzen Carbachol-Stimulation von 10 Sekunden (Endkonzentration 100μM) kommt. Während der HeLa-WT unter diesen Bedingungen NAADP-Anstiege von 100nM erreichte, lagen in den CD38^{pos.}-HeLa-Zellen Konzentrationen unter 30nM vor.

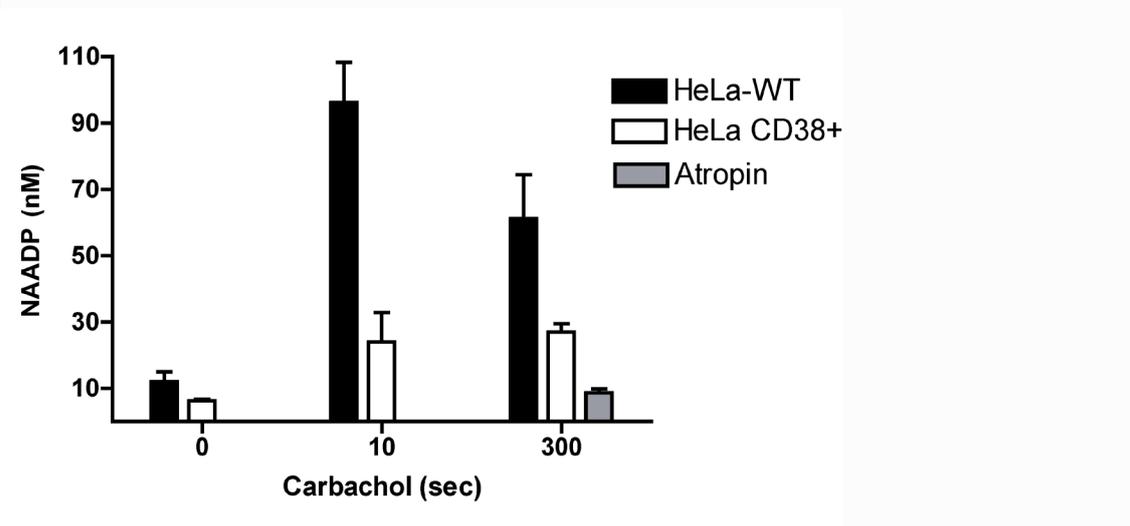


Abb. 4.17: CD38-Expression reduziert in HeLa-Zellen die zytosolische NAADP-Konzentration. Es wurden NAADP-Messungen in HeLa-WT (schwarze Balken) und CD38^{pos.}-HeLa-Zellen (weisse Balken) durchgeführt. Die Zellen wurden entweder unstimuliert oder für 10 Sekunden und 300 Sekunden mit Carbachol (100μM) stimuliert. In einigen Experimenten wurde HeLa-WT vor der Carbachol-Stimulation für 10 Minuten mit Atropin (10μM) inkubiert (graue Balken). Endogenes NAADP wurde extrahiert und mit dem NAADP Cycling-Assay vermessen. n = 3 - 8, Mittelwerte ± S.E.M, * p < 0,05.

Nach einer Stimulation von 5 Minuten lagen in den WT-Zellen die NAADP-Konzentrationen bei 70nM und in den CD38 transfizierten Zellen bei 32nM. Um die Spezifität der Carbachol-Stimulation über die muskarinischen Rezeptoren zu überprüfen, wurden Messungen durchgeführt, in denen HeLa-WT vor der Stimulation für 10 Minuten mit Atropin inkubiert wurden. Atropin wurde in unterschiedlichen Veröffentlichungen als Antagonist der muskarinischen Rezeptoren M_1 , M_2 und M_3 beschrieben (Walch et al, 2000 und Trovero et al, 1998). Wie in Abbildung 4.17 zu sehen ist, stieg in den Atropin vorbehandelten Zellen die NAADP-Konzentration nach einer fünf minütigen Stimulation mit Carbachol nicht an und erreichte Werte unter 10nM, die den Messungen in den nicht stimulierten Zellen entsprachen.

5 Diskussion der Ergebnisse

5.1 Methoden zur Bestimmung von NAADP

Mit der Entdeckung von NAADP vor mehr als 10 Jahren, wurde eine der potentesten Calcium freisetzenden Substanzen beschrieben (Lee HC und Aarhus R, 1995). Im Gegensatz zu den etablierten Botenstoffen des Calcium-Signalsystems wie $InsP_3$ und cADPR sind mehrere Aspekte beim NAADP noch immer ungeklärt. Grundvoraussetzung für das Verständnis von NAADP im Calcium-Signalsystem ist das Wissen über die zellulären Konzentrationen des Botenstoffes. Zur Bestimmung endogener Konzentrationen stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Die Detektion kann mit dem in dieser Arbeit verwendeten NAADP Cycling-Assay (Gasser et al, 2006), mit dem Radio-Rezeptor-Assay (Patel et al, 2000) oder mit der Weiterentwicklung des Radio-Rezeptor-Assays nach Lewis et al (2007) durchgeführt werden. Weitere Systeme zur Bestimmung von NAADP sind der Cycling-Assay nach Graeff und Lee (2002) und der Cycling-Assay nach Yamaguchi et al (2007).

Im folgenden Abschnitt werden zunächst die unterschiedlichen Methoden vorgestellt und die Vor- und Nachteile kurz dargestellt.

5.1.1 Der NAADP Cycling-Assay nach Graeff und Lee

Die im Jahr 2002 veröffentlichte Methode war der erste Cycling-Assay, mit dem es möglich war, NAADP im nanomolaren Bereich zu detektieren. Der erste Schritt bei diesem Verfahren ist die Umwandlung von NAADP durch die Alkalische Phosphatase zu NAAD. Es folgt dann die Überführung des gebildeten NAAD durch die NMN-Adenylattransfera-

se (NMN-AT) in Gegenwart von Nikotinmononukleotid (NMN) zu NAD. Das NAD wird dann unter Verbrauch von Ethanol durch die Alkoholdehydrogenase zu $\text{NADH}+\text{H}^+$ reduziert und durch die Diaphorase zu NAD reoxidiert. Dieser letzte Schritt ist an eine Indikatorreaktion gekoppelt, bei der der Farbstoff Resazurin zu dem fluoreszierenden Resorufin reduziert wird. Der Cycling Assay nach Graeff und Lee zeichnet sich dadurch aus, dass neben NAADP durch kleine Modifikationen auch cADPR und Nikotinsäure bestimmt werden können. Als nachteilig wirkt sich der hohe Arbeits- und Zeitaufwand aus, der durch die Inkubation mit der Alkalischen Phosphatase und den hydrolytischen Enzymen entsteht. Ein weiterer Nachteil ist, dass die in diesem System verwendete NMN-AT selber aufgereinigt oder kloniert und eprimiert werden muss. Das Detektionslimit (bezogen auf ein Volumen von $200\mu\text{l}$) liegt bei von 900fmol. Da durch Mikroinjektionsexperimente gezeigt werden konnte, dass niedrige, nanomolare NAADP-Injektionen in der Lage sind globale Ca^{2+} -Signale einzuleiten (Berg et al, 2000), sollte mindestens ein Detektionslimit von 100fmol erreicht werden, um bei der Vermessung von Suspensionszellen, wie z.B Jurkat T-Lymphozyten, das Volumen der einzusetzenden Zellsuspension auf ca. 2 Liter zu beschranken. Das Detektionslimit dieses Cycling-Assays ermöglicht aus diesen Gründen lediglich das Vermessen von Standards.

5.1.2 Der NAADP Cycling-Assay nach Yamaguchi et al (2007)

Im von Yamaguchi und Kollegen veröffentlichte NAADP Cycling-Assay (Yamaguchi et al, 2007) wird zunächst das zu messende NAADP durch eine Inkubation mit Alkalischer Phosphatase in NAAD überführt, welches dann durch eine NH_3 -spezifische NAD-Synthetase aus dem Bakterium *Geobacillus stearothermophilus* unter Verbrauch von ATP und NH_3 zu NAD umgesetzt wird. Das NAD wird dann durch die G6P-DH unter Verbrauch von Glucose-6-Phosphat zu $\text{NADH}+\text{H}^+$ reduziert und durch die Diaphorase zu NAD reoxidiert. Bei der an diesen Schritt gekoppelten Indikator-Reaktion wird als Elektronenakzeptor das farblose p-Iodonitrotetrazolium-Violett verwendet. Durch die Diaphorase wird dieses Molekül dann zum farbigen p-Iodonitrotetrazolium-Formazan reduziert. Das gebildete p-Iodonitrotetrazolium-Formazan wird photometrisch bei 450nm gemessen. Der 2007 veröffentlichte Cycling-Assay ist das einzige System, bei dem alle benötigten Substanzen von öffentlichen Anbietern zu beziehen sind. Mit dem Detektionslimit von 4pmol (bezogen auf ein Volumen von $200\mu\text{l}$) sind NAADP-Bestimmungen, aus den unter 5.1.1 erwähnten Gründen, auf zellulärer Ebene nicht möglich.

5.1.3 Der Radio-Rezeptor-Assay nach Patel et al (2000)

Der Radio-Rezeptor-Assay ist die erste Methode, mit der sich NAADP auf zellulärer Ebene nachweisen ließ. Bei dieser Methode werden NAADP-Bindungsstellen aus Seeigeleihomogenaten verwendet. Diese NAADP-Bindungsstellen, die noch nicht molekular

definiert sind, binden spezifisch das zu messende NAADP. Es handelt sich hierbei um eine irreversible Wechselwirkung (Patel et al, 2000). Die zu messenden Zellen werden mit TCA aufgeschlossen und mit wassergesättigtem Diethylether neutralisiert. Es folgt eine Aufreinigung durch eine Anionen-Austauschchromatographie mit anschließender Gefriertrocknung. Die Quantifizierung des zellulären NAADP aus den hergestellten Zell- oder Gewebeeextrakten erfolgt durch eine Kalibrierung mit $[^{32}\text{P}]$ NAADP. Für die Erstellung der Kalibrierkurve sind folgende Arbeitsschritte erforderlich:

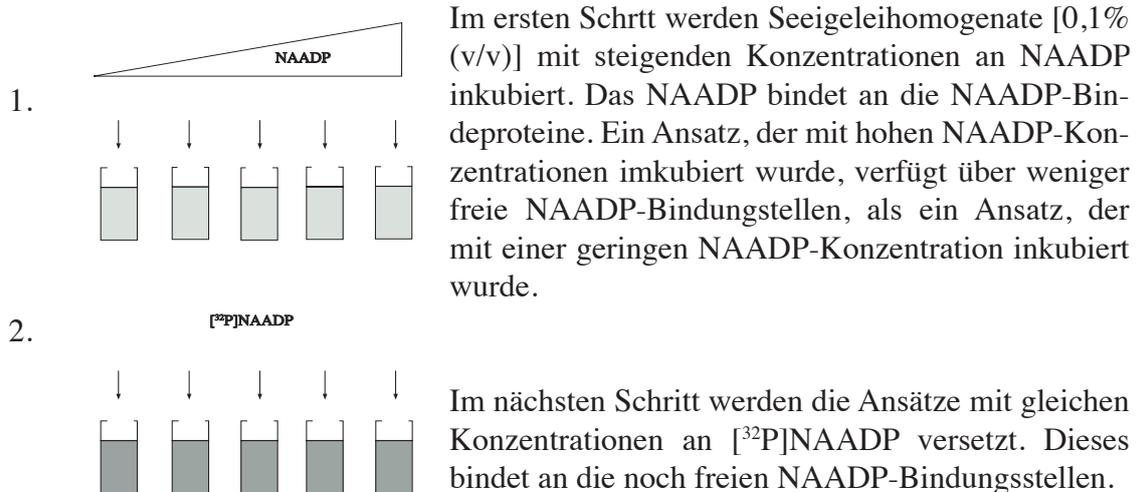


Abb.5.1: Erstellung der Kalibrierkurve

Das gebundene $[^{32}\text{P}]$ NAADP wird durch eine Zentrifugation vom nicht gebundenen $[^{32}\text{P}]$ NAADP getrennt. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt werden die NAADP-Bindungsstellen auf einen proteinbindenden Filter überführt, und das $[^{32}\text{P}]$ NAADP kann durch eine Scintillations-Messung ermittelt werden, wodurch eine sigmoidale Kalibrierkurve entsteht. Zur Vermessung der Proben, werden die Zell- oder Gewebeeextrakte ebenfalls mit Seeigeleihomogenaten [0,1% (v/v)] inkubiert. Das endogene NAADP bindet an die Bindeproteine. Es wird eine bekannte Konzentration $[^{32}\text{P}]$ NAADP zugesetzt, was zu einer Bestzung der noch freien Bindestellen führt. Das gebundene $[^{32}\text{P}]$ NAADP wird durch Zentrifugation auf einen proteinbindenden Filter übertragen und durch eine Scintillationsmessung quantifiziert. Mit Hilfe der erstellten Kalibrierkurve, kann die endogene NAADP-Konzentration aus der Probe ermittelt werden.

Der Radio-Rezeptor-Assay zeichnet sich durch seine Empfindlichkeit von 25fmol aus, die es ermöglicht NAADP mit relativ geringem Materialverbrauch auf zellulärer Ebene zu detektieren. Diese Methode setzt voraus, dass eine ständige Versorgung mit Seeigeleiern gewährleistet ist, was durch das komplizierte Fortpflanzungsverhalten der Tiere erschwert wird (Campell NA, 2000). Weiterhin muss für das Erstellen der sigmoidalen Kalibrierkurve $[^{32}\text{P}]$ NAADP synthetisiert werden. Um ein reines Produkt zu erhalten, ist es erforderlich alle Substanzen dieser enzymatischen Synthese über ein HPLC-Verfahren aufzureinigen (Galione et al, 2000).

.5.1.4 Der Radio-Rezeptor-Assay nach Lewis et al (2007)

Der Radio-Rezeptor-Assay nach Lewis ist eine Weiterentwicklung der Methode von Patel (Lewis et al, 2007). Die Zellen, die mit dem Assay vermessen werden sollen, werden vor der Messung in Medium gehalten, das mit 1mM Kaliumacetat versetzt wurde. Die Anwesenheit der K⁺-Ionen erhöht die Anlagerung der NAADP-Bindungsstellen an den Protein-bindenden Filter um das Dreifache (Lewis et al, 2007), wodurch Detektionen von 100amol NAADP möglich sind. Zur Herstellung der Zell- oder Gewebeextrakte werden die Zellen mit HClO₄ aufgeschlossen und mit KHCO₃ neutralisiert. Die so vorbereiteten Proben können dann vermessen werden. Die Durchführung des Assays verläuft analog zu der unter 5.1.3 beschriebenen Methode. Als besonders vorteilhaft erweist sich bei dieser Methode, dass die hergestellten Zell- oder Gewebeextrakte direkt vermessen werden können, ohne eine Anionen-Austauschchromatographie oder Gefriertrocknung durchzuführen. Dieser Assay ist mit einem Detektionslimit von 100amol die empfindlichste Methode zur Quantifizierung von zellulärem NAADP. Die Messung ist jedoch abhängig von der Verfügbarkeit von Seeigeleiern und von der Synthese und Aufreinigung von [³²P] NAADP.

5.1.5 Der NAADP Cycling-Assay nach Gasser et al (2006)

Der in dieser Arbeit verwendete Cycling-Assay (Gasser et al, 2006) ist der einzige Cycling-Assay, mit dem es möglich ist NAADP auf zellulärer Ebene zu messen. Für die Bestimmung eines Messpunktes sind ca 1.5 Liter einer dichtgewachsenen Jurkat-Zellsuspension erforderlich, was auch eine routinemäßige Messung ermöglicht. Diese Methode zeichnet sich, wie auch die Cycling-Assays nach Lee und Yamaguchi, dadurch aus, dass sie unabhängig sind von [³²P] NAADP und Seeigelei-Homogenaten. Durch die Verwendung der Seeigelei-Homogenate kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass es während der Inkubation mit den NAADP-Bindungsstellen zu einer zusätzlichen Synthese durch NAADP-bildende Enzyme oder zu einem Abbau durch NAADP-degradierende Enzyme kommt. Weil es sich bei dem verwendeten NAADP Cycling-Assay um ein zellfreies System handelt ist die Gefahr eines möglichen NAADP-Metabolismus geringer. Es kann jedoch auch hier nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass das System durch die in der Messung verwendeten Enzyme mit NAADP-metabolisierenden Enzymen verunreinigt wird.

Der nächste Punkt, der die intensive Quantifizierung zellulärer NAADP-Konzentrationen erschwert, betrifft sowohl die Cycling-Assays, als auch die Radio-Rezeptor-Assays. Es handelt sich hierbei um die Aufreinigung oder rekombinante Expression einer ADP-Ribosylcyclase, da der Vertrieb der Cyclase aus *Aplysia californica* von der Firma Sigma-Aldrich eingestellt wurde, und auch kein vergleichbares Produkt erhältlich ist. Ähnlich sieht es bei der NADase aus *Neurospora crassa* aus, die ebenfalls nicht mehr von Sigma-Aldrich vertrieben wird.

Autoren	System	Extraktion der Proben	Detektionslimit	Art der bisher vermessenen Proben
Graeff und Lee (2002)	Cycling-Assay	keine Angabe	900fmol	Standards
Yamaguchi et al (2007)	Cycling-Assay	keine Angabe	4pmol	Standards
Gasser et al (2006)	Cycling-Assay	TCA	50fmol	Zellextrakte
Patel et al (2000)	Radio-Rezeptor-Assay	TCA	25fmol	Zellextrakte
Lewis et al (2007)	Radio-Rezeptor-Assay	HClO ₄	100amol	Zellextrakte

Tab. 5: Übersicht der Methoden zur NAADP-Detektion

5.2 NAADP als Ca²⁺-freisetzender Botenstoff

Im nächsten Teil des folgenden Abschnitts wird diskutiert, ob NAADP dem Status eines sekundären Botenstoffes gerecht wird. Um diese Funktion für NAADP in T-Lymphozyten nachzuweisen müssen nach Chini und Toledo (2002) folgende Kriterien erfüllt sein:

- a) die Konzentration des Botenstoffes muss sich nach der Stimulation der Zellen ändern
- b) es muss der Zusammenhang zwischen einer Erhöhung der NAADP-Konzentration nach einer physiologischen Stimualtion der Zellen und der Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern nachgewiesen werden

Unter Verwendung des Cycling-Assays wurden NAADP-Konzentrationen in zunächst nicht stimulierten Jurkat T-Lymphozyten gemessen. Es wurde davon ausgegangen, dass NAADP gleichmäßig in der Zelle verteilt ist. Feste, zyotosolische Bestandteile der Zellen wurden bei der Berechnung der Konzentration nicht berücksichtigt. Es wurde eine basale Konzentration von $4 \pm 1\text{nM}$ (0,055pmol/mg) ermittelt. Dieser Wert liegt im gleichen Konzentrationsbereich, wie die Messungen, die mit dem Radio-Rezeptor-Assay durchgeführt wurden. So wurden in humanen Erythrozyten NAADP-Konzentrationen von 16nM gefunden. In Hepathozyten der Ratte wurden Werte von 4.5nM und in *E.coli* von 2,5nM ermittelt (Churamani et al, 2004). Es wurden auch Messungen in pflanzlichen Zellen durchgeführt. So ergab sich in den Zellen des Blumenkohls eine NAADP-Konzentration von 125pmol/mg Gewebe (Navazio et al, 2000). Diese Ergebnisse im niedrigen nanomolaren Bereich passen gut mit bereits veröffentlichten Dosis-Wirkungskurven für NAADP zusammen. Durch Mikroinjektion in T-Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass die Dosis-Wirkungskurve für NAADP einen glockenförmigen Verlauf mit einem Maximum bei 100nM aufweist. Injektionen von 50 bis 100nM NAADP lösen in T-Lymphozyten Ca²⁺-Signale aus, die sich schnell über die ganze Zelle ausbreiten und als globale Ca²⁺-Signale bezeichnet werden (Berg et al, 2000). Injektionen von 30nM führen zunächst zur Bildung von lokal begrenzten Signalen, die als subzelluläre Signale

bezeichnet werden und auch zu globalen Ca^{2+} -Signalen. Der in dieser Arbeit ermittelte Basalwert für T-Lymphozyten liegt mit einer Konzentration von $4\pm 1nM$ unterhalb der Konzentration, die noch in der Lage ist ein subzelluläres Ca^{2+} -Signal auszulösen und liegt somit in einem biologisch sinnvollen Bereich. NAADP-Messungen in unstimulierten HeLa-Zellen, die ebenfalls mit dem Cycling-Assay nach Gasser et al (2006) durchgeführt wurden, ergaben eine basale Konzentration von $12nM$ (Diplomarbeit Westphal, 2007). In den Spermien des Seeigels wurden NAADP-Konzentrationen von $4,0\pm 2,3\mu M$ gefunden (Billington et al, 2002). Diese sehr hohen zytosolischen NAADP-Konzentrationen werden vermutlich aufrechterhalten, weil es bei der Entleerung des Zytosols in die Eizelle zu einer sehr starken Verdünnung kommt. Die NAADP-Konzentration ist in dem Bereich der Fusion trotz des Verdünnungseffekts hoch genug, um eine Ca^{2+} -Kaskade einzuleiten und die folgenden Ereignisse nach der Verschmelzung von Eizelle und Spermium zu initiieren (Billington et al, 2002). Weitere Messungen basaler NAADP-Konzentrationen wurden in Acinus-Zellen der Maus durchgeführt, wobei sich Konzentrationen von $0,25pmol/mg$ Prot. ergaben (Yamasaki et al, 2005). In MIN6-Zellen der Maus wurden NAADP-Konzentrationen von $11,9pmol/mg$ Prot. gefunden (Masgrau et al, 2003). Die Messungen basaler NAADP-Konzentrationen haben verdeutlicht, dass dieser Botenstoff in humanen Zellen (Gasser et al, 2006) und in Bakterien und Tierzellen (Billington et al, 2002) nachweisbar ist. Die Ergebnisse von Navazio und Kollegen (2000) weisen darauf hin, dass NAADP auch in Pflanzen an der Ca^{2+} -Regulation beteiligt ist. Weiterhin befinden sich die Werte, mit Ausnahme der Seeigelspermien und der MIN6-Zellen, im niedrigen nanomolaren Bereich. Dies zeigt auch, dass der in dieser Arbeit verwendete NAADP Cycling-Assay und der Radio-Rezeptor-Assay vergleichbare Ergebnisse liefern.

Zellen	Konzentration	Autoren
HeLa	12nM	Westphahl (2007)
Jurkat T-Lymphozyten	4nM (0,05pmol/mg Prot.)	Gasser et al (2006)
humane Erythrozyten	16nM	Churamani et al (2004)
Hepthozyten (Ratte)	4,5nM	Churamani et al (2004)
<i>E.coli</i>	2,5nM	Churamani et al (2004)
Seeigel-Spermium	4 μM	Billington et al (2002)
Blumenkohl	125pmol/mg Prot.	Navazio et al (2000)
Acinus-Zellen (Maus)	0,25pmol/mg Prot.	Yamasaki et al (2005)
MIN6-Zellen (Maus)	11,9pmol/mg Prot.	Masgrau et al (2003)

Tab 5.1: Zusammenfassung der basalen NAADP-Konzentrationen

5.2.1 Stimulation von Zellen führt zur Entstehung schneller NAADP-Signale

Durch Inkubation mit Agonisten konnten in unterschiedlichen Zellsystemen Anstiege in der zellulären NAADP-Konzentration gemessen werden. In MIN6-Zellen, einer Insulin sezernierenden Zelllinie des Pankreas aus der Maus, wurde in nicht stimulierten Zellen eine NAADP-Konzentration von $11,9\pm 1,4pmol/mg$ Protein gefunden. Durch eine Inkubation von 10 Minuten mit 20mM Glucose stieg die NAADP-Konzentration auf den dop-

pelten Wert an. Es handelt sich hierbei um das erste Experiment mit dem gezeigt werden konnte, dass die zelluläre NAADP-Konzentration nach einem physiologischen Stimulus ansteigt (Masgrau et al, 2003). In glatten Muskelzellen aus Blutgefäßen der Ratte wurden basale NAADP-Konzentrationen von $0,21 \pm 0,04 \mu\text{mol/mg}$ Protein gefunden. Durch eine Stimulation von 30 Sekunden mit Endothelin-1 ($1 \mu\text{M}$) über den Endothelin-Rezeptor ET_A kam es zu einem signifikanten NAADP-Anstieg. Die Konzentration erhöhte sich auf $1,33 \pm 0,2 \mu\text{mol/mg}$ Prot, Dies entspricht einem 6,3 fachen Anstieg (Kinnear et al, 2004). Messungen von Macgregor und Kollegen am Herzen des Meerschweinchens ergaben NAADP-Werte von $220 \pm 27 \mu\text{mol/mg}$ Prot. Die Kontroll-Organen wurden in diesen Experimenten vor der NAADP-Bestimmung für 5 Minuten mit einem physiologischen Puffer perfundiert. Durch eine fünf minütige Perfusion mit einem Puffer, versetzt mit Isoprenalin (Endkonzentration 60nM), stieg die NAADP-Konzentration auf $337 \pm 43 \mu\text{mol/mg}$ Prot, was einem 1,5 fachen Anstieg entspricht. Von Churchill und seinen Mitarbeitern wurden die NAADP-Konzentrationen in Seeigeleiern und Seeigelspermien im Ruhezustand und während des Vorgangs der Befruchtung untersucht. Im nicht stimulierten Zustand ergab sich für die Seeigeleier eine NAADP-Konzentration von $0,29 \mu\text{M}$ und in den Spermien von $54 \mu\text{M}$. Durch die Befruchtung der Seeigeleier kam es zu einem 4,3 fachen Anstieg in der NAADP-Konzentration. Die durch Seeigeli-Membranen induzierte Aktivierung der Seeigelspermien führte zu einer 5 fachen Erhöhung ($n = 4$) der NAADP-Konzentration. Es wurde postuliert, dass die NAADP-Erhöhung im Spermium durch den direkten Kontakt des Spermiums mit der Eizelle eingeleitet wird und dass die Übertragung von NAADP in die Eizellen dort das Ca^{2+} - Signalsystem initiiert und beeinflusst (Churchill et al, 2003).

Die Stimulation der T-Lymphozyten über den T-Zellrezeptor/CD3-Komplex führte innerhalb von 10 Sekunden zu einer 7,6 fachen Erhöhung der basalen NAADP-Konzentration (Abbildung 4.A). Die NAADP-Konzentration sank dann innerhalb weniger Sekunden auf fast basales Niveau wieder ab. Die Messungen in den T-Lymphozyten ergaben neben dem frühen NAADP-Peak eine zweite, länger anhaltende NAADP-Erhöhung (Abbildung 4.A). Dieser Anstieg in der späten Phase der Aktivierung eröffnet die Möglichkeit, dass NAADP zusammen mit dem in diesem Zeitraum aktiven Ca^{2+} -Modulator cADPR (Guse et al, 1999), das Calciumsignal beeinflusst. Dies konnte durch den Einsatz eines spezifischen Antagonisten bestätigt werden (Dammermann, 2007 Dissertation). Die Stimulation der HeLa-Zellen für 10 Sekunden mit $100 \mu\text{M}$ Carbachol führte zu einer Erhöhung der NAADP-Konzentration auf 100nM . Ein schneller Anstieg in der NAADP-Konzentration wurde auch in pankreatischen Acinuszellen der Maus gemessen. Die Zellen wurden 8 - 10 Wochen alten CD1-Mäusen entnommen. Die Tiere wurden 6 Stunden vor Beginn des Experiments auf Nahrungsentzug gestellt, weil Nahrungsreste im Zwölffingerdarm eine starke Sekretion von Cholecystokinin einleiten (Yamasaki et al, 2005). Eine Stimulation mit einer physiologischen Konzentration Cholecystokinin (10pM) leitete innerhalb von 10 Sekunden einen 5,7 fachen Anstieg in der NAADP-Konzentration ein. Es wurden Konzentrationen von $1,44 \mu\text{mol NAADP/mg}$ Protein erreicht, die nach 60 Sekunden wieder auf basale Konzentrationen ($0,25 \pm 0,08 \mu\text{mol/mg}$ Prot.) abfielen. Es wurde postuliert, dass diese schnelle NAADP-Erhöhung nach Stimulation der Zellen an

der Bildung von frühen subzellulären Ca^{2+} -Signalen beteiligt ist (Yamasaki et al, 2005). Auch in humanen myometrischen Zellen konnten Soares und Kollegen einen schnellen Anstieg in der NAADP-Konzentration nach einer Histamin-Stimulation messen. In nicht stimulierten Zellen wurde eine NAADP-Konzentration von 0,01pmol/mg Prot. gemessen, die nach Stimulation von 10 Sekunden mit 100 μ M Histamin anstieg und bei 30 Sekunden ein Maximum von 0,14pmol/mg Protein erreichte. Nach einer Stimulationsdauer von 60 Sekunden sank der Wert auf fast basales Niveau von 0,02pmol/mg Protein (Soares et al, 2006).

Zellen	Basalwert	Agonist	Stimulationswert	Faktor
JMP / T-Lymphozyt / Mensch	4nM 0,055pmol/mg Prot.	OKT3 (5 μ g/ml)	34,3nM 0,25pmol/mg Prot.	7,6
JMP / T-Lymphozyt / Mensch	4nM 0,055pmol/mg Prot.	ConA (100 μ g/ml)	7nM	/
HeLa	10nM	Carbachol (100 μ M)	100nM	10
Acinuszellen / Pancreas / Maus	0,25pmol/mg Prot.	Cholecystokinin (10pM)	1,44pmol/mg Prot.	5,7
Myometrische Zellen / Uterus / Mensch	0,01pmol/mg Prot.	Histamin (100 μ M)	0,14pmol/mg Prot.	14
glatte Muskelzellen / Ratte	0,21pmol/mg Prot.	Endothelin (1 μ M)	1,33pmol/mg Prot.	6,3
Seeigelspermium	54 μ M	Seeigelei-Membran	270 μ M	5
Seeigelei	0,29 μ M 4pmol/mg Prot.	Spermium	1,247 μ M 17,2pmol/mg Prot.	4,3
MIN6 / Pancreas / Maus	11,9pmol/mg Prot.	Glucose (20mM)	24pmol/mg Prot.	2
Herzzellen / Meerschweinchen	220pmol/mg Prot.	Isoprenalin (60nM)	337pmol/mg Prot.	1,5

Tab.5.2: Zusammenfassung der Agonist-induzierten NAADP-Veränderung in der Konzentration. In der Tabelle sind alle zur Zeit bekannten Stimulationswerte für NAADP dargestellt. Für die T-Lymphozyten und die Acinuszellen wurden die Stimulationswerte aus den Zeitverläufen verwendet.

In Tabelle 5.1 sind alle Messungen dargestellt, in denen durch Agonisten eine Erhöhung in der NAADP-Konzentration gemessen werden konnte. Durch den Vergleich der basalen Konzentrationen lassen sich die Ergebnisse in zwei Gruppen einteilen. Die Messungen in den humanen T-Lymphozyten, den Acinus-Zellen, den myometrischen Zellen und in den Muskelzellen der Ratte ergaben NAADP-Konzentrationen, die unter 1pmol/mg Protein lagen. Die basalen Konzentrationen aus den Seeigelspermien, den Seeigeleiern und den MIN6-Zellen ergaben Werte, die über 1pmol/mg Protein lagen und somit eine mindestens 60 mal höhere NAADP-Konzentration als die anderen Zellen besaßen. Eine genaue Übereinstimmung ist durch die Vermessung von Zellen aus unterschiedlichen Spezies jedoch nicht zu erwarten. Es wäre möglich, dass einige Signaltransduktionswege

aus bestimmten Zellen einer Art höhere endogene NAADP-Konzentrationen erfordern, als Zellen aus einem anderen Organismus. Trotz der unterschiedlichen Zellsysteme und Agonisten liegen die Faktoren der NAADP-Erhöhungen ungefähr im selben Bereich. Eine Ausnahme bilden die MIN6-Zellen der Maus und die Herzzellen aus den Meer-schweinchchen, bei denen nach Stimulation nur ein etwa zweifacher Anstieg in der NAADP-Konzentration gemessen wurde. Alle beschriebenen Experimente haben verdeutlicht, dass die endogene NAADP-Konzentration nach einer physiologischen Stimu-lation ansteigt. Weiterhin konnte durch die Bestimmung in den glatten Muskelzellen der Ratte (Kinneer et al, 2004) und durch die gemessenen Zeitverläufe aus den Acinuszellen (Yamasaki et al, 2005), den myometrischen Zellen (Soares et al, 2006), und aus den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen in humanen T-Lymphozyten dargestellt werden, dass es sich um ein kurzes, zeitlich begrenztes Signal handelt, das vermutlich an der In-itiierung fühler, subzellulärer Ca^{2+} -Signale beteiligt ist. Im Fall der T-Lymphzyten wird nach 5 Minuten ein zweites Maximum erreicht, das möglicherweise die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration auch zu diesen späten Zeitpunkten der Zellaktivierung beeinflusst.

5.2.2 Konzentration und Spezifität des Stimulus sind entscheidend für die NAADP-Bildung

Die Stimulation der T-Lymphozyten mit steigenden OKT3-Konzentrationen ergab für NAADP eine glockenförmige Konzentrations-Wirkungskurve (Abbildung 4.1). Der größte NAADP-Anstieg wurde durch eine Inkubation mit einer Antikörperkonzentration von $0,1\mu\text{g/ml}$ erreicht. Die Werte stiegen unter diesen Bedingungen auf 20nM , was einem 4,3 fachen Anstieg, im Vergleich zum Basalwert, entspricht. Stimulationen mit $10\mu\text{g/ml}$ OKT3 führte zur Bildung von NAADP-Konzentrationen, die nur unwesentlich über den Basalwerten lagen. Die Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ mit OKT3-Konzentrationen von $0,01\mu\text{g/ml}$ bis $10\mu\text{g/ml}$ führte im Ca^{2+} -Peak und im Ca^{2+} -Plateau zu sigmoidal verlaufenden Dosis-Wirkungskurven. Eine Stimulation mit $0,1\mu\text{g/ml}$ OKT3 erhöhte die Ca^{2+} -Konzentration nur auf halbmaximale Werte und eine Stimulation mit $10\mu\text{g/ml}$ führte sowohl im Peak als auch im Plateau zu maximalen Ca^{2+} -Konzentrationen. Die biologische Bedeutung dieser unterschiedlichen Konzentrationenverläufe ist ohne weitere Experimente nicht zu erklären. Bekannt ist, dass unterschiedliche Antikörperkonzentrationen, gerichtet gegen den CD3-Komplex des T-Zellrezeptors, zu unterschiedlichen Reaktionen in primären T-Zellen führen. Hohe anti-CD3 Konzentrationen leiten die Apoptose ein, während geringe Konzentrationen zur Proliferation, oder in Abwesenheit von Co-stimulierenden Signalen die Zelle in Richtung Anergie treiben. Somit könnte es sein, dass NAADP als Ca^{2+} freisetzender Botenstoff nach einer Stimulation Entwicklungsprozesse wie Proliferation, Anergie und Apoptose beeinflusst. Auch in den pankreatischen Acinuszellen der Maus konnte durch unterschiedliche Konzentrationen an Cholecystokin eine Dosisabhängigkeit festgestellt werden. Bereits Konzentrationen von 10pM Cholecystokin führten zu einem deutlichen Anstieg in der NAADP-Konzentration. Durch Inkubationen mit 10nM stellte

sich eine maximale NAADP-Konzentration von $6,11 \pm 2,03 \mu\text{mol/mg Protein}$ ein, die auch durch eine weitere Erhöhung der Cholecystokin-Konzentration auf $1 \mu\text{M}$ nicht weiter anstieg. Die maximale Konzentrationserhöhung im Vergleich zum Basalwert, der bei $0,688 \pm 0,16 \mu\text{mol/mg Protein}$ lag, entspricht einem Faktor von 8,8.

Die Experimente, die klären sollten, welche Art von Stimulus erforderlich ist, um eine zytosolische NAADP-Erhöhung in T-Lymphozyten auszulösen, zeigten, dass nur Signale über den T-Zellrezeptor / CD3-Komplex dazu in der Lage sind. Weder eine Stimulation über das ADPR/TRPM2-Signalsystem durch das Lektin Concanavalin A (Gasser et al, 2006b) noch die pharmakologisch induzierte Entleerung zytosolischer Ca^{2+} -Speicher durch Thapsigargin führte zu einer signifikanten Erhöhung der NAADP-Konzentration (Abbildung 4.2). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Bildung von NAADP in T-Lymphozyten über Tyrosin-Phosphorylierungen zu laufen scheint. Eine unspezifische Blockierung der Tyrosin-Kinasen durch Genistein inhibierte die NAADP-Bildung. Eine spezifische Inhibition der Tyrosin-Kinasen $p56^{\text{lck}}$ und $p59^{\text{fyn}}$ durch PP2 wirkte sich nicht auf die Rezeptor vermittelte NAADP-Bildung aus und lässt daraus schließen, dass diese Enzyme nicht in den Signaltransduktionsweg involviert sind, der nach Stimulation über den T-Zellrezeptor zur Bildung von NAADP führt. Die Spezifität der Rezeptor vermittelten NAADP-Bildung konnte auch in den Messungen der Acinuszellen gezeigt werden. Es stellte sich heraus, dass Acetylcholin, ein Agonist für die cADPR-Bildung in Acinuszellen, im Gegensatz zu Cholecystokin keinen Einfluss auf die endogene NAADP-Konzentration hat. Es konnte auch nach sehr hohen Acetylcholin-Zugaben ($10 \mu\text{M}$) keine Erhöhung in der NAADP-Konzentration gemessen werden. (Yamasaki et al, 2005). Der Histamin induzierte NAADP-Anstieg in humanen, myometrischen Zellen ließ sich durch eine Blockierung des H_1 -Rezeptors unter Verwendung von Diphenhydramin ($100 \mu\text{M}$) unterdrücken (Soares et al, 2006).

Die Entwicklung sensitiver Nachweissysteme hat die Quantifizierung niedriger, nanomolarer NAADP-Konzentrationen auf zellulärer Ebene ermöglicht. Durch die Verwendung des NAADP Cycling-Assays konnte in T-Lymphozyten eine basale Konzentration von $4,5 \pm 2 \text{nM}$ ermittelt werden. Eine Stimulation der Zellen führte zu einer schnellen, 7,6 fachen Erhöhung der NAADP-Konzentration. Weiterhin konnte dargestellt werden, dass die NAADP-Erhöhung nur dann eintrat, wenn die Stimulation der T-Lymphozyten über den T-Zellrezeptor/CD3-Komplex erfolgte. Somit sind mehrere der am Anfang des Kapitels erwähnten Kriterien erfüllt, um NAADP zu den bereits etablierten Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffen in T-Lymphozyten wie InsP_3 und cADPR hinzuzufügen. Hierzu gehören unter anderem die Kenntnisse um die basalen Konzentrationen des Botenstoffes, und die Änderungen in der Konzentration nach physiologischer Stimulation der Zellen.

5.3 Einfluss der CD38-Expression auf das endogene NAADP

Im folgenden Abschnitt wird erläutert welchen Einfluss die ADP-Ribosylcyclase CD38 auf die zelluläre NAADP-Konzentration hat. Die Messungen basaler NAADP-Konzentrationen in den CD38 Knock down-Klonen zeigte, dass diese Zellen Konzentrationen aufwiesen, die mit WT T-Lymphozyten vergleichbar waren. Wäre CD38 an der Bildung von NAADP beteiligt, müsste sich in den Knock down-Klonen eine deutliche Reduktion in der NAADP-Konzentration zeigen, da nachgewiesen werden konnte, dass die CD38-Expression und die Glykohydrolase-Aktivität in diesen Zellen im Vergleich zum JMP-WT stark vermindert waren (Abbildungen 4.9 und 4.10). Die Messungen zeigten jedoch, dass die basalen Konzentrationen in beiden verwendeten Klonen sogar leicht erhöht waren. Auch die schnelle Bildung von NAADP nach einer OKT3-Stimulation von 10 Sekunden führte mit Konzentrationen von ca. 90nM zu Werten, die mit den WT-Zellen vergleichbar waren. Diese Messungen legen nahe, dass die NAADP-Synthese unabhängig von CD38 verläuft. In den Zellen, die für 5 Minuten mit OKT3 stimuliert wurden, verstärkte sich der Eindruck, dass durch die Expressionsverminderung von CD38 höhere NAADP-Konzentrationen in der Zelle aufrecht erhalten wurden. Dies zeigt sich auch in den Messungen, die in den Geweben von CD38 Knock out-Mäusen durchgeführt wurden. In den CD38 Knock out-Milzen wurden mit einer Konzentration von 37fmol/mg Prot. NAADP-Werte gemessen, die dreimal höher waren, als in WT-Mäusen. In den Thymie der KO-Tiere ergaben sich mit einer Konzentration von 55fmol/mg Prot. Konzentrationen, die zweimal höher waren, als in den WT-Tieren. Ähnliche Ergebnisse sind von Soares und Kollegen publiziert worden, die ebenfalls NAADP-Messungen in Geweben von CD38 Knock out-Mäusen und WT-Mäusen durchgeführt haben.

Gewebe	WT-Maus	CD38 Knock out-Maus	Faktor	Autoren
Uterus	100fmol/mg Prot.	200fmol/mg Prot.	2	Soares et al (2006)
Herz	400fmol/mg Prot.	400fmol/mg Prot.	/	Soares et al (2006)
Leber	80fmol/mg Prot.	160fmol/mg Prot.	2	Soares et al (2006)
Niere	82fmol/mg Prot.	80fmol/mg Prot.	/	Soares et al (2006)
Milz	200fmol/mg Prot.	640fmol/mg Prot.	3,2	Soares et al (2006)
Thymus	27fmol/mg Prot.	55fmol/mg Prot.	2	eigene Daten
Milz	12fmol/mg Prot.	37fmol/mg Prot.	3	eigene Daten

Tab.5.3: NAADP-Bestimmungen in Geweben von CD38 Knock out- und WT-Mäusen

Wie in Tabelle 5.3 zu sehen ist, weisen einige der CD38 Knock out-Gewebe im Vergleich zu den WT-Geweben erhöhte NAADP-Konzentrationen auf (Soares et al, 2006). Dies ist in den Zellen des Uterus, der Leber und der Milz der Fall. Die NAADP-Werte, die von Soares und Mitarbeitern in den Milzen bestimmt wurden, liegen sowohl in den WT-Mäusen, als auch in den CD38 Knock out-Mäusen um einen Faktor von 20 höher, als die in dieser Arbeit bestimmten Konzentrationen.

Die in dieser Arbeit verwendeten CD38 Knock out-Mäuse und die von Soares verwendeten Tiere haben einen identischen, genetischen Hintergrund und können somit nicht der Grund für die Abweichungen sein. Es wäre möglich, dass die Art der Präparation der Organe oder ein unterschiedliches Alter der Tiere am Tag des Experiments zu abweichenden NAADP-Werten führt. Die NAADP-Konzentrationen in den CD38 Knock out-Milzen sind in beiden Arbeiten im Vergleich zu den WT-Organen dreifach erhöht. Soares und Kollegen haben die Erhöhung der NAADP-Konzentration durch eine erniedrigte cADPR-Konzentration erklärt. Es ist mehrfach beschrieben worden, dass die Bildung von cADPR durch CD38 vermittelt wird (Munshi et al, 2000 und Podesta et al, 2000). Soares und Kollegen konnten zeigen, dass die CD38 Knock out-Gewebe im Gegensatz zu den Geweben der WT-Mäuse kein detektierbares cADPR aufweisen. Es wurde postuliert, dass die NAADP-Konzentration in den Knock out-Geweben erhöht ist, um die Reduktion in der endogenen cADPR-Konzentration zu kompensieren (Soares et al, 2006). Die erhöhten NAADP-Konzentrationen in den CD38 Knock down-Klonen und in den CD38 Knock out-Geweben lassen sich auch durch die Abwesenheit der CD38-Enzymaktivität erklären.

CD38 ist zur Zeit das einzige bekannte Enzym, das in der Lage ist NAADP zu hydrolysieren. NAADP wird dabei zu ADPRP und Nikotinsäure umgesetzt. Das pH-Optimum der CD38-vermittelten NAADPase-Reaktion liegt bei 5 (Graeff et al, 2006). Es liegen jedoch noch keine Daten vor, die die Hypothese des CD38-vermittelten NAADP-Abbaus auf zellulärer Ebene bestätigen. Somit kann der biologische Hintergrund der NAADP-Erhöhung, die durch die Expressionsverminderung von CD38 in den T-Lymphozyten entsteht, ohne zusätzliche Erkenntnisse nicht erklärt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die Daten von Soares und Kollegen schließen eine Beteiligung von CD38 an der Synthese von NAADP aus, da sowohl die etablierten Knock down-Klone als auch die Gewebe aus den Knock out-Mäusen keine verminderten NAADP-Konzentrationen aufwiesen. Es gibt neben den durchgeführten NAADP-Messungen auch andere Punkte, die gegen eine Beteiligung von CD38 bei der Bildung von NAADP sprechen. CD38 gehört zur Gruppe der Ektoenzyme (Metha et al, 1996 und Deaglio et al, 2001). Dies bedeutet, dass sich der katalytisch aktive Teil des Enzyms auf der Oberfläche der Zelle befindet. Nach Stimulation der Zellen müssten die Substrate NADP und Nikotinsäure durch Transportsysteme über die Plasma-Membran in den Extrazellularraum überführt werden. Dort würde es durch die von CD38 ausgeführte Basenaustausch-Reaktion zur Bildung von NAADP kommen. Das entstandene NAADP müsste dann durch geeignete Transportsysteme wieder in das Zytosol der Zelle gelangen. Diese Abläufe, welche die Vorgänge von der Stimulation der Zelle bis zur zytosolischen NAADP-Erhöhung umfassen, müssten innerhalb weniger Sekunden ablaufen (Gasser et al, 2006; Soares et al, 2006 und Yamasaki et al, 2005). Weiterhin liegt das pH-Optimum der Basenaustausch-Reaktion mit einem pH von 5 in einem eher unphysiologischen Bereich und erfordert hohe Nikotinsäure-Konzentrationen, die in Zellen so nicht vorkommen (Graeff et al, 1998). Im Zusammenhang mit der Bildung von NAADP sind neben der Beteiligung von CD38 auch andere Synthesewege diskutiert worden. So könnte die NAADP-Bildung durch eine Desaminase ausgeführt werden, die an der Nikotinamid-

Gruppe von NADP den Austausch der Amino-Gruppe gegen eine Hydroxyl-Gruppe katalysiert (Chini et al, 1995). Ein entsprechendes Enzym, das NADP als Substrat akzeptiert ist jedoch noch nicht identifiziert worden. Eine andere Möglichkeit wäre die direkte Phosphorylierung von NAAD⁺ durch eine 2'-NAD-Kinase unter Verbrauch von ATP. Auch für diese Reaktion konnten Lerner und Kollegen keine Bedingungen beschreiben unter denen humane NAD-Kinasen NAAD⁺ als Substrat für eine mögliche NAADP-Synthese verwenden (Lerner et al, 2001).

5.4 CD38 und das globale Ca²⁺-Signal

Die Bestimmung der [Ca²⁺]_i in den CD38 Knock down-Zellen nach Stimulation mit OKT3 ergab eine starke Verminderung der Ca²⁺-Signale (Abbildung 4.8 A und B). Die Stimulation mit OKT3 induziert die Bildung der Ca²⁺-freisetzenden Botenstoffe NAADP, InsP₃ und cADPR (Gasser et al, 2006; Guse et al, 1993 und Guse et al, 1999). Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte dargelegt werden, dass durch eine Expressionsverminderung von CD38 die endogene NAADP-Konzentration nicht reduziert wird. NAADP kann somit nicht die Ursache der erniedrigten [Ca²⁺]_i sein. Eine Beteiligung von InsP₃ an der Verminderung des [Ca²⁺]_i ist eher unwahrscheinlich, da die Bildung des Botenstoffs aufgeklärt ist und unabhängig von CD38 verläuft (Berridge et al, 2000). Die CD38 vermittelte Bildung von cADPR ist sehr detailliert beschrieben worden (Howard et al, 1993; Bruzzone et al, 2001 und Guida et al, 2002) und die Ca²⁺-freisetzende Wirkung dieses Botenstoffes ist allgemein akzeptiert. Ein direkter Zusammenhang zwischen der endogenen cADPR-Konzentration und der CD38-Expression konnte durch unterschiedliche Experimente bestätigt werden. Die Messungen von Soares und Kollegen in den CD38 Knock out-Geweben der Maus zeigten, dass die CD38 negativen Tiere über kein nachweisbares cADPR verfügen (Partida-Sanchez et al, 2001 und Soares et al, 2006). In THP-1 Zellen, einer humanen, leukämischen Zelllinie konnten Takahashi und Kollegen die CD38-Expression durch eine Inkubation der Zellen mit Retinsäure erhöhen. In diesen Zellen wurden im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen eine dreifach erhöhte cADPR-Konzentration gemessen (Takahashi et al, 1995). Graeff und Kollegen konnten in HL60-Zellen zeigen, dass Inkubationen mit Retinsäure die ADP-Ribosylcyclase-Aktivität und auch die cADPR-Hydrolaseaktivität erhöht (Graeff et al, 1994).

Die Ca²⁺-mobilisierende Wirkung von cADPR konnte in unterschiedlichen Zellsystemen wie Tier (Runsko N und Lee HC, 1989), Pflanze (Leckie et al, 1998) und Mensch (Takahawa et al, 1993) nachgewiesen werden. In der Arbeit von Munoz und Kollegen wurde die CD38-Expression in Jurkat T-Lymphozyten durch einen siRNA-Ansatz transient vermindert. Die Stimulation der Jurkat T-Lymphozyten erfolgte durch Antigen-präsentierende Zellen, die auf der Oberfläche das Staphylococcus Enterotoxin E (SEE) gebunden haben. Als Antigen-präsentierende Zellen wurden Raji B-Zellen verwendet. Durch den CD38 Knock down reduzierte sich die [Ca²⁺]_i im Vergleich zu den Kontroll-Zellen im Ca²⁺-Peak und im Ca²⁺-Plateau um ca. 50% (Munoz et al, 2008). Von Munoz und Kolle-

gen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Verminderung der $[Ca^{2+}]_i$ auf eine erniedrigte cADPR-Konzentration zurückzuführen ist. Bruzzone und Kollegen konnten zeigen, dass in PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) die CD38 vermittelte ADP-Ribosylcyclase-Aktivität durch eine Inkubation der Zellen mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) erhöht wird. Es konnte auch ein Anstieg in der endogenen cADPR-Konzentration und eine Erhöhung in der $[Ca^{2+}]_i$ gemessen werden (Bruzzone et al, 2003).

Daraus folgt dass, der Zusammenhang zwischen der CD38-Expression, der Bildung von cADPR und der $[Ca^{2+}]_i$ von unterschiedlichen Arbeitsgruppen hergestellt werden konnte, so dass die in dieser Arbeit gemessene Verminderung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit OKT3 nicht unerwartet kommt. Die Reduktion der $[Ca^{2+}]_i$ machte sich mit 81% in der Plateau-Phase stärker bemerkbar als in der Peak-Phase, wo die Verminderung 55% betrug. Dies passt gut mit den cADPR-Zeitverläufen aus den T-Lymphozyten (Guse et al, 1999) und den Acinus-Zellen (Yamasaki et al, 2005) zusammen, die zeigen, dass cADPR-Erhöhungen zu späteren Zeitpunkten der Zell-Aktivierung aufrecht erhalten werden. ADPR ist ein weiterer Ca^{2+} -freisetzender Botenstoff, dessen Synthese von CD38 katalysiert wird (Metha et al, 1996 und Lund et al, 1999). Die Reaktion findet bei neutralem bis alkalischem pH statt (Lee HC, 2006). Für die Bildung von ADPR wird von dem Substrat NAD die Nikotinamid-Gruppe freigesetzt. Ein weiterer möglicher Syntheseweg für ADPR ist die Hydrolyse von cADPR. CD38 ist das einzige Enzym, dass in der Lage ist cADPR auf diese Weise umzusetzen (Lee HC, 2006 und Lund et al, 1999). ADPR ist an der Regulation des Ionenkanals TRPM2 beteiligt, über den es zum Ca^{2+} -Einstrom in das Zytosol kommt (Gasser et al, 2006 und Heiner et al, 2006). Gasser und Kollegen konnten zeigen, dass in Jurkat T-Lymphozyten basale ADPR-Konzentrationen von $44 \pm 11 \mu M$ vorliegen (Gasser A und Guse AH, 2005). Durch eine Stimulation mit dem Lektin Concanavalin A konnte ein 1,5 facher Anstieg in der ADPR-Konzentration gemessen werden. Die Erhöhung in der ADPR-Konzentration war auch nach 15 Minuten Stimulation noch messbar (Gasser et al, 2006 A). Die Ca^{2+} -Messungen in den CD38 Knock down-Klonen ergaben, dass die $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit Concanavalin A stark erniedrigt war (Abbildung 4C und D). Es stellte sich heraus, dass die $[Ca^{2+}]_i$ wie bei der Stimulation mit OKT3 stärker in der Plateau-Phase vermindert war. Ursache für diesen Effekt ist die zytosolische ADPR-Konzentration. Die Expressionsverminderung von CD38 führt zu einer Reduktion der endogenen ADPR-Konzentration, die sich dann in einer erniedrigten $[Ca^{2+}]_i$ äußert. Der direkte Zusammenhang zwischen der CD38-Expression und der endogenen ADPR-Konzentration muss jedoch durch weitere Messungen bestätigt werden. Die Messungen, die nach dem Ca^{2+} -free/ Ca^{2+} -readdition-Protokoll durchgeführt wurden, ergaben, dass die Klone im Release-Peak, im Influx-Peak und im Ca^{2+} -Plateau vermindert waren. Es stellte sich heraus, dass $[Ca^{2+}]_i$ stärker im Influx-Peak und im Plateau erniedrigt war. Dies lässt sich, wie bei den anderen Messungen auch, durch eine mögliche, CD38 abhängige Verminderung der cADPR und ADPR-Konzentration erklären. Warum beide vermessenen Klone einen um ca 60% erniedrigten Release-Peak aufweisen, ist weniger offensichtlich. Die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern ist nach der Stimulation der T-Lymphozyten ein eher frühes Ereignis und sollte mehr von NAADP und $InsP_3$ reguliert werden. Da das NAADP-Signal durch den CD38 Knock down nicht

vermindert war und CD38 vermutlich nicht in den InsP_3 -vermittelten Signaltransduktionsweg involviert ist, sollte der Release-Peak eigentlich nicht erniedrigt sein. Es wurde jedoch auch beschrieben, dass cADPR in humanen T-Lymphozyten an der Bildung subzellulärer Ca^{2+} -Signale in der Schrittmacherphase des Ca^{2+} -Signals beteiligt ist (Kunerth et al, 2004). Der reduzierte Release-Peak in den CD38 Knock down-Klonen kann durch eine verminderte zytosolische cADPR-Konzentration entstehen.

5.5 NAADP: Vom lokalen zum globalen Ca^{2+} -Signal

Durch die Vermessung der Zeitverläufe für NAADP, InsP_3 und cADPR sind die Ereignisse nach der Stimulation von Jurkat T-Lymphozyten über den T-Zellrezeptor bekannt. Die NAADP-Messungen dieser Arbeit haben gezeigt, dass nach Stimulation mit OKT3 ein biphasisches Signal entsteht. Dieses Signal besteht aus einem schnellen Anstieg wenige Sekunden nach der Stimulation und einer länger anhaltenden Erhöhung, die in dem Zeitraum zwischen einer Minute und 20 Minuten nach der Stimulation aufrecht erhalten wird (Gasser et al, 2006). InsP_3 erreicht drei Minuten nach der Stimulation ein Maximum und fällt nach sechs Minuten wieder auf basale Werte zurück (Guse et al, 1993). Stimulationen mit OKT3 führen in Jurkat T-Lymphozyten zu langanhaltenden Erhöhungen in der cADPR-Konzentration. Es handelt sich dabei im Vergleich zum Basalwert um vierfache Erhöhungen, die auch eine Stunde nach der Stimulation noch messbar sind (Guse et al, 1999).

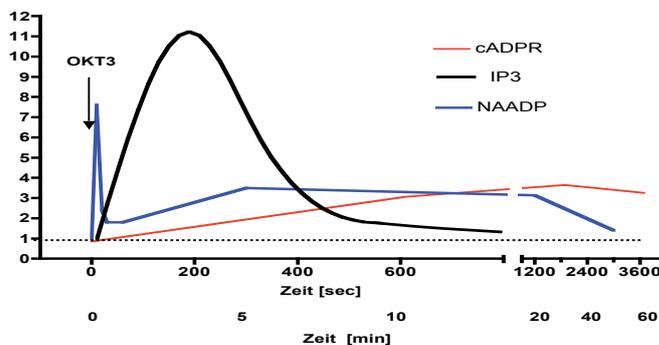


Abb.5.1: Darstellung der Zeitverläufe von InsP_3 , cADPR und NAADP

Jurkat T-Lymphozyten wurden mit OKT3 stimuliert und die Zeitverläufe von cADPR (Guse et al, 1999), InsP_3 (Guse et al, 1993) und NAADP (Gasser et al, 2006) vermessen. Die Zeitverläufe sind als relative Anstiege abgebildet. Zur Verfügung gestellt von A.H. Guse.

In Abbildung 5.1 sind die Zeitverläufe aus Jurkat T-Lymphozyten nach OKT3-Stimulation von InsP_3 , cADPR und NAADP dargestellt. Die schnelle Bildung von NAADP unmittelbar nach der Stimulation der Zellen deutet daraufhin, dass dieser Botenstoff an der Initiierung der Ca^{2+} -Signale beteiligt ist. Dies zeigt sich auch durch den Vergleich der endogenen NAADP-Konzentration und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unmittelbar nach der Aktivierung der T-

Lymphozyten. Die NAADP-Erhöhung lief der globalen $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung zeitlich etwas vorraus, was ebenfalls daraufhin deutet, dass NAADP an der Bildung lokal begrenzter, subzellulärer Ca^{2+} -Signale beteiligt ist. Auch Mikroinjektionsexperimente in T-Lymphozyten mit niedrigen, nanomolaren NAADP-Konzentrationen legten die Beteiligung von NAADP an der Bildung von kleinen, subzellulären Ca^{2+} -Signalen in der Entstehungsphase, der sogenannten Schrittmacher-Phase des Ca^{2+} -Signals nahe (Dammermann W und Guse AH, 2005). Diese Ca^{2+} -Signale bewirken die Sensibilisierung von $InsP_3$ -Rezeptoren und Ryanodin-Rezeptoren, was eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern einleitet (Cancela et al, 2000). Die Ca^{2+} -Freisetzung wird durch die Wechselwirkung von $InsP_3$ und cADPR mit den durch NAADP sensibilisierten Rezeptor-Kanälen eingeleitet. Dieser Vorgang, bei dem ein kleines und lokal begrenztes Ca^{2+} -Signal die Freisetzung von weiterem Calcium einleitet, wird als *Ca²⁺ induced Ca²⁺ release* (CICR) bezeichnet (Bak et al, 2002). Die Entleerung der zytosolischen Speicher führt zu einer Aktivierung von Ca^{2+} -permeablen Ionenkanälen, die als Orai1 / CRACM1 bezeichnet werden und sich in der Plasma-Membran befinden (Feske et al, 2006 und Cai X, 2007). Der Signalweg, welcher von der Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher bis zur Öffnung der in der Membran sitzenden Orai1-Kanäle führt, war bis vor kurzer Zeit unklar. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Membran-Kanäle über einen Ca^{2+} -Sensor verläuft, der sich im ER befindet. Der STIM1 benannte Ca^{2+} -Sensor besitzt im Lumen des ER eine Ca^{2+} -bindende Domäne, die als EF-Hand bezeichnet wird (Lewis RS, 2007). Die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER führt zu einer Relokalisation von STIM1, so dass der Membran-Kanal Orai1 durch direkte Wechselwirkung mit Stim1 geöffnet wird (Spasova et al, 2005). Aufgrund der Tatsache, dass Orai1 durch die Entleerung zytosolischer Speicher aktiviert wird, wurde dieser Kanal auch als CRAC (Ca^{2+} -release activated channel) bezeichnet (Donald et al, 2006). Der resultierende Ca^{2+} -Einstrom über die Plasma-Membran führt dazu, dass aus dem unmittelbar nach der Stimulation gebildetem lokalem Ca^{2+} -Signal durch die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER und dem Ca^{2+} -Einstrom über die Membran ein globales Ca^{2+} -Signal entsteht (Gennazzani AA und Thorn P, 2002).

Abbildung 5.1 deutet an, dass der Verlauf des Ca^{2+} -Signals durch die zeitlich differenzierte Synthese unterschiedlicher Ca^{2+} -freisetzender Botenstoffe präzise reguliert werden kann. Unmittelbar nach Stimulation werden durch NAADP subzelluläre Ca^{2+} -Signale initiiert. Nachdem NAADP wieder auf fast basale Werte abfällt steigt die endogene $InsP_3$ -Konzentration an und trägt durch weitere Ca^{2+} -Freisetzung zur Bildung eines globalen Signals bei. Zwischen 10 und 20 Minuten nach der Stimulation befindet sich das $InsP_3$ wieder auf basalen Konzentrationen und es kommt zu einem erneuten Anstieg der NAADP-Konzentration. In diesem Zeitraum steigt auch die cADPR-Konzentration an und ermöglicht es T-Lymphozyten, einen langanhaltenden Ca^{2+} -Einstrom über die Membran aufrecht zu erhalten.

5.6 CD38 und die Hydrolyse von NAADP

Die NAADP-Messungen in den HeLa-CD38^{pos.}-Zellen ergaben im Vergleich zum HeLa-WT erniedrigte Konzentrationen. Dieser Effekt wurde besonders deutlich in den Stimulationsexperimenten. Somit wurde durch die Expressionsverminderung von CD38 in den Jurkat T-Lymphozyten ein Anstieg in der NAADP-Konzentration und durch eine Überexpression von CD38 in den HeLa-Zellen eine Verminderung gemessen. Dieser Zusammenhang zwischen der CD38-Expression und der endogenen NAADP-Konzentration ist auch von Soares et al (2006) beschrieben worden. Wie zuvor erwähnt, wurden in Uterus, Leber und Milz von CD38 Knock out-Mäusen erhöhte NAADP-Konzentrationen gemessen. Um den Einfluss von CD38 auf NAADP näher zu untersuchen, wurden HL60-Zellen mit 1 μ M Retinsäure inkubiert. Es ist beschrieben worden, dass Retinsäure an der Regulation von Proliferation und Differenzierung beteiligt ist und die Expression von CD38 verstärkt (Graeff et al, 1994 und Lamkin et al, 2006). Eine Westernblot-Analyse ergab, dass die Retinsäure behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine erhöhte CD38-Expression aufwiesen. Durch Messungen der basalen NAADP-Konzentration stellte sich heraus, dass die HL60-Zellen ohne Inkubation mit Retinsäure 20 fmol NAADP /mg Protein aufwiesen. In den Zellen, in denen durch Inkubation mit Retinsäure eine erhöhte CD38-Expression auftrat, lagen die NAADP-Konzentrationen bei 14 fmol NAADP /mg Prot. Weiterhin wurde dargestellt, dass die Retinsäure behandelten Zellen im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen eine signifikant erhöhte CD38-Enzymaktivität aufwiesen (Soares et al, 2006). Somit wurde eine mögliche Beteiligung von CD38 am Abbau von NAADP in verschiedenen Zellsystemen postuliert. Für einen möglichen Zusammenhang zwischen CD38 und einer Degradation von NAADP spricht auch, dass CD38 zur Zeit das einzige bekannte Enzym ist, das in der Lage ist, spezifisch NAADP zu hydrolysieren (Graeff et al, 2006). Die CD38 katalysierte NAADPase-Aktivität hat ein Optimum bei pH 5. Bei der Reaktion wird NAADP zu ADPRP und Nikotinsäure hydrolysiert. Das CD38 eine zentrale Rolle im Abbau von NAADP hat, ist jedoch eher unwahrscheinlich. Zum einen ist CD38, wie bereits erwähnt, ein Ecto-Enzym. Es treten somit einige der Probleme auf, die eine Beteiligung von CD38 an der Synthese unwahrscheinlich machten. Hierzu gehört zum einen der Transportmechanismus, der die Substrate innerhalb weniger Sekunden über die Plasmamembran transportieren müsste und auch das pH-Optimum im sauren Bereich. Möglich wäre, dass CD38 eine Art Notfall-System im NAADP-Abbau übernimmt, falls das eigentliche Enzym, welches die Degradierung durchführt, ausfällt. Im Zusammenhang mit dem NAADP-Abbau ist auch über eine Dephosphorylierung diskutiert worden (Berridge et al, 2002). Galione und Kollegen konnten in Acinus-Zellen der Maus zeigen, dass die Dephosphorylierung von NAADP einer Ca²⁺-Abhängigkeit unterliegt. Durch Inkubation mit dem membrangängigen Ca²⁺-Chelator BABTA-AM konnte nach Stimulation mit Cholecystokinin (10 pM) ein kontinuierlicher NAADP-Anstieg gemessen werden. Ohne Vorinkubation mit BABTA-AM fiel die NAADP-Konzentration wenige Sekunden nach der Stimulation wieder auf basale Konzentrationen ab (Galione et al, 2006). Ein Enzym, das die Dephosphory-

lierung von NAADP durchführt, ist auf zellulärer Ebene noch nicht identifiziert worden. Welche Funktion CD38 im Metabolismus von NAADP genau einnimmt, ist ohne weitere Experimente nicht zu klären.

Die Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ in den HeLa-WT und den HeLa-CD38^{pos.}-Zellen ergaben eine erhöhte Plateau-Phase in den CD38^{pos.}-Zellen. Eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde auch von Zocchi et al (1998), die das gleiche Zellsystem verwendeten, publiziert. Das erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ konnte in direkten Zusammenhang mit einer Erhöhung der cADPR-Konzentration und der daraus resultierenden Sensibilisierung der Ryanodin-Rezeptoren gebracht werden (Zocchi et al, 1998). Die Ca^{2+} -Peak-Werte der HeLa-CD38^{pos.}-Zellen sind trotz der signifikant verminderten NAADP-Konzentration (Abbildung 4.17) identisch mit den Ca^{2+} -Peak-Werten aus dem HeLa-WT. Da NAADP eine Funktion in der frühen Phase der Ca^{2+} -Freisetzung zugesprochen wird (Cancela et al, 2001; Lee, 2001; Yamasaki et al, 2005 und Gasser et al, 2006), wäre eine Verminderung im Ca^{2+} -Peak zu erwarten gewesen. Die NAADP-Messungen haben gezeigt, dass nach Stimulationen mit 100 μ M Carbachol in den HeLaCD38^{pos.}-Zellen verminderte NAADP-Signale entstehen. Es wäre jedoch möglich, dass trotz der Reduktion immer noch genug NAADP in den Zellen gebildet wird um subzelluläre Ca^{2+} -Signale einzuleiten, die zu einem dem WT vergleichbaren Ca^{2+} -Peak führen. Um einen Unterschied zwischen dem HeLa-WT und den HeLa CD38^{pos.}-Zellen im Ca^{2+} -Peak zu messen, müssten die Stimulation der Zellen mit unterschiedlichen Carbachol-Konzentrationen durchgeführt werden, um eine Bedingung zu finden, die sich stärker in den CD38 transfizierten Zellen bemerkbar macht als in den WT-Zellen.

Seit der Aufklärung der Struktur von NAADP vor mehr als 10 Jahren (Lee und Aarhus, 1995) konnten durch die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen viele Informationen zum Verständnis der NAADP vermittelten Signaltransduktion zusammengetragen werden. Die Ca^{2+} -freisetzende Wirkung von NAADP konnte durch Mikroinjektionsexperimente relativ früh bestätigt werden (Aarhus et al, 1996). Für die Bestimmung basaler NAADP-Konzentrationen mussten zunächst Systeme etabliert werden, mit denen es möglich war NAADP auf zellulärer Ebene zu messen. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die NAADP-Konzentration nach physiologischer Stimulationen in der Zelle ansteigt und dass diese Erhöhungen durch spezifische Pharmaka inhibierbar waren, wurde NAADP als Ca^{2+} -freisetzender Botenstoff allgemein akzeptiert. Die Frage nach der molekularen Identität des NAADP-Rezeptors wird zur Zeit kontrovers diskutiert. So wird zum einen das Modell vertreten, nachdem NAADP an einen noch unbekanntes NAADP-Rezeptor bindet und so eine Ca^{2+} -Freisetzung aus sauren, lysosomartigen Kompartimenten induziert (Kinnear et al, 2004; Yamasaki et al, 2004 und Churchill et al, 2002). Es gibt aber auch Daten, die belegen, dass die NAADP vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung über den Ryanodin-Rezeptor verläuft (Hohenegger et al, 2002 und Dammermann und Guse, 2005). Der Metabolismus von NAADP ist noch unklar. Durch die in dieser Arbeit vorgestellten Daten kann CD38 als NAADP-bildendes Enzym ausgeschlossen werden. Über welches Enzym die Synthese von NAADP verläuft und wie der Botenstoff abgebaut wird, ist noch unklar. Abbildung 5.1 fasst die Abläufe des NAADP-Signalsystems in T-Lymphozyten zusammen.

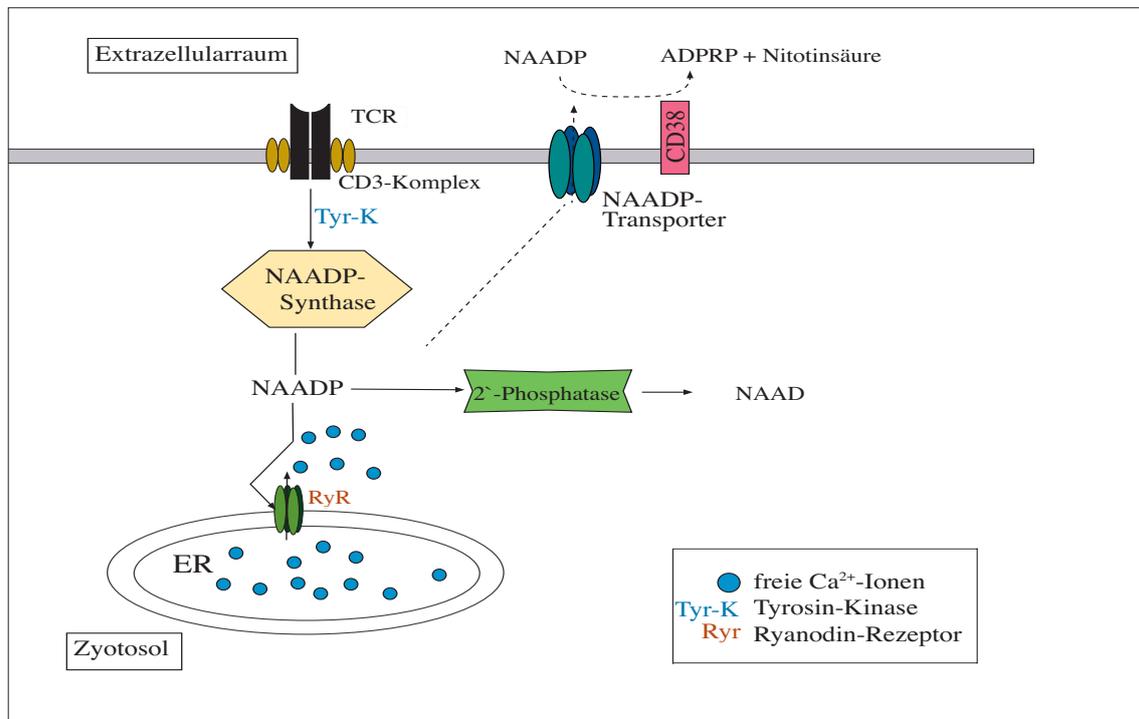


Abb.5.1: Modell des NAADP vermittelten Signalsystems. Nach Stimulation der T-Lymphozyten über den T Zellrezeptor/CD3-Komplex kommt es zur Aktivierung eines noch unbekanntes NAADP bildenden Enzyms (NAADP-Synthase). Das gebildete NAADP bindet an den Ryanodin-Rezeptor des Endoplasmatischen Reticulums. Durch Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER entstehen kleine, subzelluläre Ca²⁺-Signale. Der Abbau von NAADP ist noch unklar. Eine Möglichkeit wäre die Umsetzung von NAADP durch eine 2'-Phosphatase zu NAAD. Es könnte auch sein, dass NAADP über ein Transportsystem vom Zytosol in den Extrazellulärraum gelangt. Dort setzt CD38 NAADP zu ADPRP und Nikotinsäure um.

6 Zusammenfassung der Ergebnisse

1987 machten Clapper und Kollegen durch Experimente an Seeiglelei-Mikrosomen die Entdeckung, dass Injektionen von Nikotinamidadenindinukleotid-2'-phosphat (NADP) starke Ca^{2+} -Signale auslösen (Clapper et al, 1987). Es war schnell klar, dass nicht NADP selbst, sondern eine Verunreinigung des Produkts für die Wirkung verantwortlich sein musste. Die Struktur des Botenstoffs, welcher sich als Nikotinsäureadenindinukleotid-2'-phosphat (NAADP) herausstellte, wurde 1995 veröffentlicht (Lee und Aarhus, 1995). NAADP ist bis heute die potenteste Ca^{2+} -freisetzende Substanz. Durch Mikroinjektionsexperimente konnte gezeigt werden, dass NAADP im niedrigen nanomolaren Bereich wirksam ist. Um zu klären welche Funktion NAADP in der Ca^{2+} -vermittelten Signaltransduktion hat und ob es sich vielleicht sogar um einen sekundären Botenstoff handelt, war es erforderlich, die zellulären Konzentration von NAADP zu bestimmen. Dies war erst durch die Etablierung sensitiver Nachweissysteme möglich.

Die Messungen in dieser Arbeit wurden mit einem enzymatischen Cycling-Assay durchgeführt, mit dem die Bestimmung endogener NAADP-Konzentrationen in Suspensionszellen, in adhärent wachsenden Zellen und in Geweben durchführbar ist (Gasser et al, 2006). Durch die Bestimmung von basalen NAADP-Konzentrationen in Jurkat T-Lymphozyten ergaben sich Konzentrationen von 4nM. Stimulation des T-Zellrezeptor/CD3-Komplexes führte zu einem biphasischen NAADP-Verlauf. Unmittelbar nach der Stimulation stieg die NAADP-Konzentration um das 7,6 fache an und sank dann auf fast basale Werte wieder ab. Nach fünf Minuten erreichte die NAADP-Konzentration ein zweites Maximum und fiel 50 Minuten nach der Stimulation auf basale Werte zurück. Der schnelle NAADP-Anstieg wird mit der Einleitung der Ca^{2+} -vermittelten Signaltransduktion in Verbindung gebracht (Kinnear et al, 2004; Yamasaki et al, 2005; Gasser et al, 2006 B und Soares et al, 2006). Der biologische Hintergrund der zweiten Erhöhung ist noch unklar. Möglicherweise wird $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Kombination mit dem auch zu dieser Zeit aktiven Second Messenger zyklische Adenosindiphosphatbose (cADPR) reguliert (Guse et al, 1999). Durch die Blockierung von Tyrosinkinase mit Genistein konnte die NAADP-Erhöhung unterdrückt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es nur zu einem NAADP-Anstieg kam, wenn über den T-Zellrezeptor/CD3-Komplex stimuliert wurde. Eine pharmakologische Entleerung der zellulären Calciumspeicher und eine Aktivierung des Ca^{2+} -permeablen Ionenkanals TRPM2 mit dem Lektin Concanavalin A (Gasser et al, 2006 B) führten zu keiner signifikanten NAADP-Erhöhung. Der NAADP-Anstieg in den Jurkat T-Lymphozyten unterlag einer Konzentrations-Abhängigkeit.

Zu den noch offenen Fragen im NAADP-Signalsystem gehören die Synthese und der Abbau des Botenstoffes. In der Literatur wurde häufig postuliert, dass die NAADP-Bildung über das Ecto-Enzym CD38 verläuft (Liu et al, 2005 und Graeff et al, 2006). Zur Überprüfung der Hypothese wurde in Jurkat T-Lymphozyten die Expression von CD38 vermindert. Der Knock down wurde mit Hilfe von shRNA durchgeführt. Durch eine Zellvereinzlung wurden dann stabile Klone erhalten. Der Erfolg der CD38-Expressionsverminderung wurde durch Western Blot-Analyse und durch die Bestimmung

der CD38 vermittelten NAD-Glykohydrolase-Aktivität überprüft. Überraschenderweise stellte sich heraus, dass die NAADP-Konzentration in den Klonen nicht erniedrigt war. Die CD38 Knock down-Klone wiesen im Vergleich zum Jurkat-WT sogar leicht erhöhte NAADP-Konzentrationen auf. Um eine CD38-Restaktivität als Ursache für die NAADP-Bildung auszuschließen, wurden Messungen in CD38 Knock out-Mäusen durchgeführt. Es wurden die Milzen und Thymi von WT-Mäusen und den Knock out-Mäusen vermessen. Auch hier zeigte sich, dass die Abwesenheit von CD38 zu erhöhten NAADP-Werten führt. Die Bestimmung der NAADP-Konzentration in HeLa-Zellen, die CD38 überexprimieren, führten im Vergleich zum HeLa-WT zu verminderten NAADP-Konzentrationen. Durch die Experimente konnte somit gezeigt werden, dass CD38 nicht an der Synthese von NAADP beteiligt ist.

Die Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ in den CD38 Knock down-Klonen ergaben Verminderungen, die sich stärker in der Plateau-Phase der Ca^{2+} -Signale bemerkbar machten. Es ist bekannt, dass die Bildung der Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffe cADPR und Adenosindiphosphatribose (ADPR) über CD38 verläuft (Howard et al, 1993 und Metha et al, 1996). Die Expressionsverminderung von CD38 führt also wahrscheinlich zu einer Erniedrigung dieser Botenstoffe, was sich dann in einer erniedrigten $[Ca^{2+}]_i$ äussert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben zu neuen Erkenntnissen in der NAADP vermittelten Signaltransduktion beigetragen. NAADP wird in T-Lymphozyten dem Status eines Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffes gerecht. Hierzu zählen die Kenntnisse um die basalen NAADP-Konzentrationen und der Anstieg nach der Stimulation über den T-Zellrezeptor, sowie die Spezifität und die Konzentrationsabhängigkeit der Stimulation. CD38 konnte als NAADP bildendes Enzym ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass NAADP nach heutigen Kenntnissen als erster Ca^{2+} -freisetzender Botenstoff nach Stimulation der Zellen gebildet wird und an der Einleitung der Ca^{2+} -Signale, der sogenannten Schrittmacher-Phase, beteiligt ist, macht NAADP auch aus pharmakologischer Sicht zu einem interessanten Ziel. Das gleiche gilt für CD38, dass durch die Bildung der Botenstoffe cADPR und ADPR eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion einnimmt. Um mehr über die Regulation von cADPR und ADPR zu erfahren, ist es wichtig auch von diesen Botenstoffen zukünftig detaillierte Zeitverläufe in den CD38 Knock down-Klonen zu messen.

7 Abstract

In 1987, Clapper and colleagues discovered that microinjection of Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) into sea urchin microsomes induced Ca^{2+} -transients (Clapper et al, 1987). Because of the high endogenous concentration of NADP it became clear that an impurity must be responsible for Ca^{2+} -mobilisation. The compound was Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) and is the most potent Ca^{2+} -releasing messenger known today. The structure was published in 1995 (Lee and Aarhus, 1995). Microinjection experiments revealed that NAADP is active in the low nanomolar range. To understand the function of NAADP in Ca^{2+} -signaling cellular NAADP concentrations had to be determined. Measurement of endogenous NAADP was possible after development of sensitive methods. The results described here were performed with custom-made NAADP Cycling-Assay. This method allows NAADP detection in suspension cells, adherent cells and animal tissues with a detection limit of 50 fmol (Gasser et al, 2006). In unstimulated T cells the NAADP concentration amounted to 4 ± 1 nM. Stimulation of the cells via the T cell receptor/CD3 complex, resulted in a biphasic elevation kinetics of cellular NAADP levels. Seconds after stimulation NAADP concentration increased 7,6 fold. The second increase in NAADP had its maximum 5 minutes after stimulation and reached basal levels after 50 minutes of stimulation. The fast increase of NAADP may be involved in the initiation of Ca^{2+} -signals in the very early phase of the signaling event (Kinnear et al, 2004; Yamasaki et al, 2005; Gasser et al, 2006 B and Soares et al, 2006). The biological meaning of the second elevation is not yet clear. It is possible that at this time Ca^{2+} -signaling is shaped in cooperation with the established modulator of the ryanodine receptor, cADPR (Guse et al, 1999). A broad band inhibition of Tyrosine kinases using genistein completely abolished NAADP elevation. An increase in NAADP only occurred after stimulating the cells via the T cell receptor/CD3 complex. An increase in NAADP was neither found upon a pharmacologically induced rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ using thapsigargin nor upon stimulation of T lymphocytes via the ADPR/TRPM2 signaling system (Gasser et al, 2006B). A bell-shaped concentration-response curve was found.

Metabolism of NAADP is still unclear today. The ectoenzyme CD38 has often been discussed in the literature for being involved in NAADP formation (Liu et al, 2005 and Graeff et al, 2006). To investigate whether CD38 is responsible for NAADP synthesis we performed a CD38 knock down in Jurkat T-lymphocytes, using shRNA induced gene silencing. After generation of stable clones we confirmed the success of the CD38 knock down by western blot-analysis and measurement of glycohydrolase-activity. NAADP measurements revealed that there is no decrease in NAADP concentration in the knock down clones. In fact, NAADP levels in CD38 knock down clones seemed to be slightly elevated compared to Jurkat-WT. To exclude the possibility that NAADP formation occurred because of the remaining CD38 molecules in the CD38 Knock down clones, we also performed NAADP measurements in CD38^{-/-} mice. NAADP measurements were performed in thymus and spleen of WT-mice and CD38^{-/-} mice and revealed that NAADP

levels in CD38^{-/-}-tissues were elevated.

NAADP levels in CD38^{pos}-HeLa were strongly reduced compared to HeLa-WT. All experiments suggest that CD38 is not involved in NAADP synthesis. The increase in NAADP in the CD38 knock down clones and CD38^{-/-}-tissues may be a consequence of the decrease of cADPR.

Ca²⁺-measurements showed reduced [Ca²⁺]_i in CD38 knock down clones as compared to Jurkat-WT. The reduction was more pronounced in the plateau phase of the Ca²⁺-signal. The experiments, using OKT3 for stimulation, indicated that Cyclic adenosine diphosphate-ribose (cADPR) and Adenosine diphosphate-ribose (ADPR) is reduced. Stimulation with the lectin Concanavalin A pointed out that ADPR is decreased. Both Ca²⁺-measurements support the hypothesis that NAADP is increased to compensate for a reduction in cADPR concentration.

All together, the results of the current PhD thesis provide new insights into NAADP mediated Ca²⁺-signaling. According to Lee (Lee, 2003) and Rutter (Rutter, 2003) most of the criteria for the establishment for NAADP as second messenger are now fulfilled. Basal NAADP concentrations were determined. Stimulation resulted in a biphasic elevation in NAADP concentration. Increase in NAADP specifically occurred after stimulation via the T cellreceptor/CD3-complex. Gene silencing and KO-mice suggest that CD38 is not involved in NAADP formation. The fact that NAADP is the initial Ca²⁺-releasing messenger after stimulation of the cells makes this compound a valuable target for pharmacological research.

8 Literaturverzeichnis

- Aarhus R, Graeff RM, Dickey DM, Walseth TF, Lee HC. ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J Biol Chem.* 1995 Dec 22;270(51):30327-33.
- Aarhus R, Dickey DM, Graeff RM, Gee KR, Walseth TF, Lee HC. Activation and inactivation of Ca²⁺ release by NAADP+. *J Biol Chem.* 1996 Apr 12;271(15):8513-6.
- Alford S, Frenguelli BG, Schofield JG, Collingridge GL. Characterization of Ca²⁺ signals induced in hippocampal CA1 neurones by the synaptic activation of NMDA receptors. *J Physiol.* 1993 Sep;469:693-716.
- Bak J, Billington RA, Genazzani AA. Effect of luminal and extravesicular Ca²⁺ on NAADP binding and release properties. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jul 26;295(4):806-11.
- Baskin TI, Wilson JE. Inhibitors of protein kinases and phosphatases alter root morphology and disorganize cortical microtubules. *Plant Physiol.* 1997 Feb;113(2):493-502.
- Bentley GA, Mariuzza RA. The structure of the T cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:563-90.
- Berg I, Potter BV, Mayr GW, Guse AH. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate NAADP is an essential regulator of T-lymphocyte Ca⁽²⁺⁾-signaling. *J Cell Biol.* 2000 Aug 7;150(3):581-8.
- Berridge G, Cramer R, Galione A, Patel S. Metabolism of the novel Ca²⁺-mobilizing messenger nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate via a 2'-specific Ca²⁺-dependent phosphatase. *Biochem J.* 2002 Jul 1;365(Pt 1):295-301.
- Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium.* 2002 Nov-Dec;32(5-6):235-49.
- Besset V, Scott RP, Ibáñez CF. Signaling complexes and protein-protein interactions involved in the activation of the Ras and phosphatidylinositol 3-kinase pathways by the c-Ret receptor tyrosine kinase. 2000 Dec 15;275(50):39159-66.
- Billington RA, Ho A, Genazzani AA. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) is present at micromolar concentrations in sea urchin spermatozoa. *J Physiol.* 2002 Oct 1;544(Pt 1):107-12.
- Bjorkman PJ. MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions. *Cell.* 1997 Apr 18;89(2):167-70.

- Bruzzone S, De Flora A, Usai C, Graeff R, Lee HC. Cyclic ADP-ribose is a second messenger in the lipopolysaccharide-stimulated proliferation of human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem J.* 2003 Oct 15;375(Pt 2):395-403.
- Brummelkamp TR, Fabius AW, Mullenders J, Madiredjo M, Velds A, Kerkhoven RM, Bernards R, Beijersbergen RL. An shRNA barcode screen provides insight into cancer cell vulnerability to MDM2 inhibitors. *Nat Chem Biol.* 2006 Apr;2(4):202-6.
- Burnet FM. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J Clin.* 1976 Mar-Apr;26(2):119-21.
- Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science.* 1996 Apr 5;272(5258):60-6.
- Cai X. Molecular evolution and structural analysis of the Ca⁽²⁺⁾ release-activated Ca⁽²⁺⁾ channel subunit, Orai. *J Mol Biol.* 2007 May 18;368(5):1284-91.
- Cancela JM, Charpentier G, Petersen OH. Co-ordination of Ca²⁺ signalling in mammalian cells by the new Ca²⁺-releasing messenger NAADP. *Pflugers Arch.* 2003 Jun;446(3):322-7.
- Cancela JM, Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Tepikin AV, Petersen OH. Two different but converging messenger pathways to intracellular Ca²⁺ release: the roles of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, cyclic ADP-ribose and inositol trisphosphate. *EMBO J.* 2000 Jun 1;19(11):2549-57.
- Cancela JM, Petersen OH. The cyclic ADP ribose antagonist 8-NH₂-cADP-ribose blocks cholecystinin-evoked cytosolic Ca²⁺ spiking in pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch.* 1998 Apr;435(5):746-8.
- Chemykh AM, Dolgacheva LP, Kaimachnikov NP, Zinchenko VP: Analysis of the kinetics of Ca²⁺ signals in Ehrlich ascites tumor cells upon the inhibition of the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Biofizika.* 2004 May-Jun;49(3):511-8.
- Chini EN, Beers KW, Dousa TP. Nicotinate adenine dinucleotide phosphate (NAADP) triggers a specific calcium release system in sea urchin eggs. *J Biol Chem.* 1995 Feb 17;270(7):3216-23.
- Chini EN, Chini CC, Kato I, Takasawa S, Okamoto H. CD38 is the major enzyme responsible for synthesis of nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate in mammalian tissues. *Biochem J.* 2002 Feb 15;362(Pt 1):125-30.

- Churamani D, Carrey EA, Dickinson GD, Patel S. Determination of cellular nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate (NAADP) levels. *Biochem J.* 2004 Jun 1;380(Pt 2):449-54.
- Churchill GC, O'Neill JS, Masgrau R, Patel S, Thomas JM, Genazzani AA, Galione A. Sperm deliver a new second messenger: NAADP. *Curr Biol.* 2003 Jan 21;13(2):125-8.
- Churchill GC, Okada Y, Thomas JM, Genazzani AA, Patel S, Galione A. NAADP mobilizes Ca²⁺ from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell.* 2002 Nov 27;111(5):703-8.
- Churchill GC, Galione A. NAADP induces Ca²⁺ oscillations via a two-pool mechanism by priming IP₃- and cADPR-sensitive Ca²⁺ stores. *EMBO J.* 2001 Jun 1;20(11):2666-71.
- Clapper DL, Walseth TF, Dargie PJ, Lee HC. Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J Biol Chem.* 1987 Jul 15;262(20):9561-8.
- Communi D, Vanweyenberg V, Erneux C. Molecular study and regulation of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Cell Signal.* 1995 Sep;7(7):643-50.
- Cyster JG. Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. *J Exp Med.* 1999 Feb 1;189(3):447-50.
- Dammermann W, Guse AH. Functional ryanodine receptor expression is required for NAADP-mediated local Ca²⁺ signaling in T-lymphocytes. *J Biol Chem.* 2005 Jun 3;280(22):21394-9.
- Daulhac L, Kowalski-Chauvel A, Pradayrol L, Vaysse N, Seva C. Ca²⁺ and protein kinase C-dependent mechanisms involved in gastrin-induced Shc/Grb2 complex formation and P44-mitogen-activated protein kinase activation. *Biochem J.* 1997 Jul 15;325 (Pt 2):383-9.
- Deaglio S, Mehta K, Malavasi F. Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leuk Res.* 2001 Jan;25(1):1-12.
- De Flora A, Zocchi E, Guida L, Franco L, Bruzzone S. Autocrine and paracrine calcium signaling by the CD38/NAD⁺/cyclic ADP-ribose system. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1028:176-91.
- De Koninck P, Schulman H. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science.* 1998 Jan 9;279(5348):227-30.

- Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*. 1998 Apr 30;392(6679):933-6.
- Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*. 1996 Apr 5;272(5258):50-3.
- Ferrari MB, Rohrbough J, Spitzer NC. Spontaneous calcium transients regulate myofibrillogenesis in embryonic *Xenopus* myocytes. *Dev Biol*. 1996 Sep 15;178(2):484-97.
- Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A. A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):179-85.
- Forsdyke DR. The origins of the clonal selection theory of immunity as a case study for evaluation in science. *FASEB J*. 1995 Feb;9(2):164-6.
- Franco L, Guida L, Bruzzone S, Zocchi E, Usai C, De Flora A. The transmembrane glycoprotein CD38 is a catalytically active transporter responsible for generation and influx of the second messenger cyclic ADP-ribose across membranes. *FASEB J*. 1998 Nov;12(14):1507-20.
- Fugmann SD, Lee AI, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:495-527.
- Gasser A, Bruhn S, Guse AH. Second messenger function of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate revealed by an improved enzymatic cycling assay. *J Biol Chem*. 2006 Jun 23; 281(25):16906-13.
- Gasser A, Glassmeier G, Fliegert R, Langhorst MF, Meinke S, Hein D, Krüger S, Weber K, Heiner I, Oppenheimer N, Schwarz JR, Guse AH. Activation of T cell calcium influx by the second messenger ADP-ribose. *J Biol Chem*. 2006 Feb 3;281(5):2489-96.
- Gasser A, Guse AH. Determination of intracellular concentrations of the TRPM2 agonist ADP-ribose by reversed-phase HPLC. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005 Jul 25;821(2):181-7.
- Genazzani AA, Mezna M, Dickey DM, Michelangeli F, Walseth TF, Galione A. Pharmacological properties of the Ca²⁺-release mechanism sensitive to NAADP in the sea urchin egg. *Br J Pharmacol*. 1997 Aug;121(7):1489-95.
- Genazzani AA, Thorn P. Calcium signalling: calcium goes global. *Curr Biol*. 2002 Jun 25;12(12):R432-3.

- Graeff RM, Franco L, De Flora A, Lee HC. Cyclic GMP-dependent and -independent effects on the synthesis of the calcium messengers cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *J Biol Chem.* 1998 Jan 2;273(1):118-25.
- Graeff R, Liu Q, Kriksunov IA, Hao Q, Lee HC. Acidic residues at the active sites of CD38 and ADP-ribosyl cyclase determine nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) synthesis and hydrolysis activities. *J Biol Chem.* 2006 Sep 29;281(39):28951-7.
- Graeff RM, Mehta K, Lee HC. GDP-ribosyl cyclase activity as a measure of CD38 induction by retinoic acid in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Nov 30;205(1):722-7.
- Guida L, Bruzzone S, Sturla L, Franco L, Zocchi E, De Flora A. Equilibrative and concentrative nucleoside transporters mediate influx of extracellular cyclic ADP-ribose into 3T3 murine fibroblasts. *J Biol Chem.* 2002 Dec 6;277(49):47097-105.
- Guse AH. Biochemistry, biology, and Pharmacology of Cyclic Adenosine Diphosphoribose. *Current Medical Chemistry. Curr Med Chem.* 2004 Apr;11(7):847-55.
- Guse AH, da Silva CP, Berg I, Skapenko AL, Weber K, Heyer P, Hohenegger M, Ashamu GA, Schulze-Koops H, Potter BV, Mayr GW. Regulation of calcium signaling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature.* 1999 Mar 4;398(6722):70-3.
- Guse AH, da Silva CP, Emmrich F, Ashamu GA, Potter BV, Mayr GW. Characterization of cyclic adenosine diphosphate-ribose induced-Ca²⁺ release in T lymphocyte cell line. *J Immunol.* 1995 Oct 1;155(7):3353-9.
- Guse AH, Roth E, Emmrich F. Intracellular Ca²⁺ pools in Jurkat T-lymphocytes. *Biochem J.* 1993 Apr 15;291 (Pt 2):447-51.
- Hegedûs Z, Chitu V, Tóth GK, Finta C, Váradi G, Andó I, Monostori E. Contribution of kinases and the CD45 phosphatase to the generation of tyrosine phosphorylation patterns in the T-cell receptor complex zeta chain. *Immunol Lett.* 1999 Mar 15;67(1):31-9.
- Heidemann AC, Schipke CG, Kettenmann H. Extracellular application of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate induces Ca²⁺ signaling in astrocytes in situ. *J Biol Chem.* 2005 Oct 21;280(42):35630-40.
- Heiner I, Eisfeld J, Warnstedt M, Radukina N, Jüngling E, Lückhoff A. Endogenous ADP-ribose enables calcium-regulated cation currents through TRPM2 channels in neutrophil granulocytes. *Biochem J.* 2006 Sep 1;398(2):225-32.

- Hernandez E, Leite MF, Guerra MT, Kruglov EA, Bruna-Romero O, Rodrigues MA, Gomes DA, Giordano FJ, Dranoff JA, Nathanson MH. The spatial distribution of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms shapes Ca²⁺ waves. *J Biol Chem*. 2007 Mar 30;282(13):10057-67.

- Higashida H, Salmina AB, Olovyannikova RY, Hashii M, Yokoyama S, Koizumi K, Jin D, Liu HX, Lopatina O, Amina S, Islam MS, Huang JJ, Noda M. Cyclic ADP-ribose as a universal calcium signal molecule in the nervous system. *Neurochem Int*. 2007 Jul-Sep;51(2-4):192-9.

- Hohenegger M, Suko J, Gscheidlinger R, Drobny H, Zidar A. Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate activates the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochem J*. 2002 Oct 15;367(Pt 2):423-31.

- Hoth M, Button DC, Lewis RS. Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Sep 12;97(19):10607-12.

- Howard M, Grimaldi JC, Bazan JF, Lund FE, Santos-Argumedo L, Parkhouse RM, Walseth TF, Lee HC. Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science*. 1993 Nov 12;262(5136):1056-9.

- Hudecova S, Stefanik P, Macejova D, Brtko J, Krizanova O: Retinoic acid increased expression of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in the heart and brain. *Gen Physiol Biophys*. 2004 Dec;23(4):417-22.

- Hussain AM, Lee HC, Chang CF. Functional expression of secreted mouse BST-1 in yeast. *Protein Expr Purif*. 1998 Feb;12(1):133-7.

- Ikeda Y, Adachi Y, Ishibashi K, Miura N, Ohno N. Activation of toll-like receptor-mediated NF-kappa beta by zymosan-derived water-soluble fraction: possible contribution of endotoxin-like substances. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2005;27(2):285-98.

- Ikuta K, Uchida N, Friedman J, Weissman IL. Lymphocyte development from stem cells. *Annu Rev Immunol*. 1992;10:759-83.

- Imaizumi T, Kay SA, Schroeder JI. Circadian rhythms. Daily watch on metabolism. *Science*. 2007 Dec 14;318(5857):1730-1.

- Irvine RF, McNulty TJ, Schell MJ. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate as a second messenger--a special role in neurones? *Chem Phys Lipids*. 1999 Apr;98(1-2):49-57.

- Jouaville LS, Ichas F, Holmuhamedov EL, Camacho P, Lechleiter JD. Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature*. 1995 Oct 5;377(6548):438-41.
- Kasai M, Kawasaki T, Yamaguchi N. Regulation of the ryanodine receptor calcium release channel: a molecular complex system. *Biophys Chem*. 1999 Dec 13;82(2-3):173-81.
- Kinnear NP, Boittin FX, Thomas JM, Galione A, Evans AM. Lysosome-sarcoplasmic reticulum junctions. A trigger zone for calcium signaling by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and endothelin-1. *J Biol Chem*. 2004 Dec 24;279(52):54319-26.
- Kirchberger T, Wagner G, Xu J, Cordiglieri C, Wang P, Gasser A, Fliegert R, Bruhn S, Flügel A, Lund FE, Zhang LH, Potter BV, Guse AH. Cellular effects and metabolic stability of N1-cyclic inosine diphosphoribose and its derivatives. *Br J Pharmacol*. 2006 Oct;149(4):337-44.
- Koppenheffer TL, Chan SW, Higgins DA. The complement system of the duck. *Avian Pathol*. 1999 Feb;28(1):17-25.
- Kunerth S, Langhorst MF, Schwarzmann N, Gu X, Huang L, Yang Z, Zhang L, Mills SJ, Zhang LH, Potter BV, Guse AH. Amplification and propagation of pacemaker Ca²⁺ signals by cyclic ADP-ribose and the type 3 ryanodine receptor in T cells. *J Cell Sci*. 2004 Apr 15;117(Pt 10):2141-9.
- Lamkin TJ, Chin V, Varvayanis S, Smith JL, Sramkoski RM, Jacobberger JW, Yen A. Retinoic acid-induced CD38 expression in HL-60 myeloblastic leukemia cells regulates cell differentiation or viability depending on expression levels. *J Cell Biochem*. 2006 Apr 15;97(6):1328-38.
- Leckie CP, McAinsh MR, Allen GJ, Sanders D, Hetherington AM. Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 22;95(26):15837-42.
- Lee HC. Structure and enzymatic functions of human CD38. *Mol Med*. 2006 Nov-Dec;12(11-12):317-23.
- Lee HC, Aarhus R. A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem*. 1995 Feb 3;270(5):2152-7.
- Lee HC, Aarhus R, Levitt D. The crystal structure of cyclic ADP-ribose. *Nat Struct Biol*. 1994 Mar;1(3):143-4.

- Lee WJ, Robinson JA, Holman NA, McCall MN, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR : Antisense mediated inhibition of the plasma membrane calcium-ATPase suppresses proliferation of MCF-7 Cells. *J Biol Chem.* 2005 Jul 22;280(29):27076-84.
- Lewis AM, Masgrau R, Vasudevan SR, Yamasaki M, O'Neill JS, Garnham C, James K, Macdonald A, Ziegler M, Galione A, Churchill GC. Refinement of a radioreceptor binding assay for nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *Anal Biochem.* 2007 Dec 1;371(1):26-36.
- Li L, Tucker RW, Hennings H, Yuspa SH. Chelation of intracellular Ca²⁺ inhibits murine keratinocyte differentiation in vitro. *J Cell Physiol.* 1995 Apr;163(1):105-14.
- Li Y, Sarkar FH. Down-regulation of invasion and angiogenesis-related genes identified by cDNA microarray analysis of PC3 prostate cancer cells treated with genistein. *Cancer Lett.* 2002 Dec 5;186(2):157-64.
- Lichtman AH, Abbas AK. T-cell subsets: recruiting the right kind of help. *Curr Biol.* 1997 Apr 1;7(4):R242-4.
- Liu Q, Kriksunov IA, Graeff R, Munshi C, Lee HC, Hao Q. Crystal structure of human CD38 extracellular domain. *Structure.* 2005 Sep;13(9):1331-9.
- Lund FE, Muller-Steffner HM, Yu N, Stout CD, Schuber F, Howard MC. CD38 signaling in B lymphocytes is controlled by its ectodomain but occurs independently of enzymatically generated ADP-ribose or cyclic ADP-ribose. *J Immunol.* 1999 Mar 1;162(5):2693-702.
- Masgrau R, Churchill GC, Morgan AJ, Ashcroft SJ, Galione A. NAADP: a new second messenger for glucose-induced Ca²⁺ responses in clonal pancreatic beta cells. *Curr Biol.* 2003 Feb 4;13(3):247-51.
- Meldolesi J, Pozzan T. The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci.* 1998 Jan;23(1):10-4.
- Mehta K, Shahid U, Malavasi F. Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB J.* 1996 Oct;10(12):1408-17.
- Moreschi I, Bruzzone S, Nicholas RA, Fruscione F, Sturla L, Benvenuto F, Usai C, Meis S, Kassack MU, Zocchi E, De Flora A. Extracellular NAD⁺ is an agonist of the human P2Y₁₁ purinergic receptor in human granulocytes. *J Biol Chem.* 2006 Oct 20;281(42):31419-29.

- Moreschi I, Bruzzone S, Bodrato N, Usai C, Guida L, Nicholas RA, Kassack MU, Zocchi E, De Flora A. NAADP⁺ is an agonist of the human P2Y₁₁ purinergic receptor. *Cell Calcium*. 2008 Apr;43(4):344-55.
- Morgan AJ, Galione A. Fertilization and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate induce pH changes in acidic Ca²⁺ stores in sea urchin eggs. *J Biol Chem*. 2007 Dec 28;282(52):37730-7.
- Mueller P, Massner J, Jayachandran R, Combaluzier B, Albrecht I, Gatfield J, Blum C, Ceredig R, Rodewald HR, Rolink AG, Pieters J. Regulation of T cell survival through coronin-1-mediated generation of inositol-1,4,5-trisphosphate and calcium mobilization after T cell receptor triggering. *Nat Immunol*. 2008 Apr;9(4):424-31.
- Munshi C, Aarhus R, Graeff R, Walseth TF, Levitt D, Lee HC. Identification of the enzymatic active site of CD38 by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*. 2000 Jul 14;275(28):21566-71.
- Nakano T, Watanabe H, Ozeki M, Asai M, Katoh H, Satoh H, Hayashi H. Endoplasmic reticulum Ca²⁺ depletion induces endothelial cell apoptosis independently of caspase-12. *Cardiovasc Res*. 2006 Mar 1;69(4):908-15.
- Navazio L, Bewell MA, Siddiqua A, Dickinson GD, Galione A, Sanders D. Calcium release from the endoplasmic reticulum of higher plants elicited by the NADP metabolite nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jul 18;97(15):8693-8.
- Haag F, Adriouch S, Braß A, Jung C, Möller S, Scheuplein F, Bannas P, Seman M, Koch-Nolte F. Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. *Purinergic Signal*. 2007 Mar;3(1-2):71-81.
- Oancea E, Meyer T. Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell*. 1998 (95) 307-318.
- Partida-Sánchez S, Cockayne DA, Monard S, Jacobson EL, Oppenheimer N, Garvy B, Kusser K, Goodrich S, Howard M, Harmsen A, Randall TD, Lund FE. Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat Med*. 2001 Nov;7(11):1209-16.
- Patel S, Churchill GC, Galione A. Unique kinetics of nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate (NAADP) binding enhance the sensitivity of NAADP receptors for their ligand. *Biochem J*. 2000 Dec 15;352 Pt 3:725-9.

- Patel S, Churchill GC, Galione A. Coordination of Ca²⁺ signalling by NAADP. *Trends Biochem Sci.* 2001 Aug;26(8):482-9.
- Podestà M, Zocchi E, Pitto A, Usai C, Franco L, Bruzzone S, Guida L, Bacigalupo A, Scadden DT, Walseth TF, De Flora A, Daga A. Extracellular cyclic ADP-ribose increases intracellular free calcium concentration and stimulates proliferation of human hemopoietic progenitors. *FASEB J.* 2000 Apr;14(5):680-90.
- Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Levey RH, Schlossman SF. Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Mar;77(3):1588-92.
- Rusinko N, Lee HC. Widespread occurrence in animal tissues of an enzyme catalyzing the conversion of NAD⁺ into a cyclic metabolite with intracellular Ca²⁺-mobilizing activity. *J Biol Chem.* 1989 Jul 15;264(20):11725-31.
- Scherer WF, Syverton JG, Gey GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med.* 1953 May;97(5):695-710.
- Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. Characterization of EBV-genome negative „null“ and „T“ cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer.* 1977 May 15;19(5):621-6.
- Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:821-61.
- Spassova MA, Soboloff J, He LP, Xu W, Dziadek MA, Gill DL. STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Mar 14;103(11):4040-5.
- Sprent J. Immunological memory. *Curr Opin Immunol.* 1997 Jun;9(3):371-9.
- Steen M, Kirchberger T, Guse AH. NAADP mobilizes calcium from the endoplasmic reticular Ca²⁺ store in T-lymphocytes. *J Biol Chem.* 2007 Jun 29;282(26):18864-71.
- Syed MM, Lee S, He S, Zhou ZJ. Spontaneous waves in the ventricular zone of developing mammalian retina. *J Neurophysiol.* 2004 May;91(5):1999-2009.
- Szyman'ska E, Sobota A, Czury'ło E, Kwiatkowska K. Expression of PI(4,5)P₂-binding proteins lowers the PI(4,5)P₂ level and inhibits FcγRIIA-mediated cell spreading and phagocytosis. *Eur J Immunol.* 2008 Jan;38(1):260-72.

- Takahashi K, Kukimoto I, Tokita K, Inageda K, Inoue S, Kontani K, Hoshino S, Nishina H, Kanaho Y, Katada T. Accumulation of cyclic ADP-ribose measured by a specific radioimmunoassay in differentiated human leukemic HL-60 cells with all-trans-retinoic acid. *FEBS Lett.* 1995 Sep 4;371(2):204-8.

- Takasawa S, Nata K, Yonekura H, Okamoto H. Cyclic ADP-ribose in insulin secretion from pancreatic beta cells. *Science.* 1993 Jan 15;259(5093):370-3
- Tomlinson S. Complement defense mechanisms. *Curr Opin Immunol.* 1993 Feb;5(1):83-9.

- Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature.* 1983 Apr 14;302(5909):575-81.

- Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature.* 2000, (405), 647-655.

- Whitaker L, Renton AM. On the plausibility of the clonal expansion theory of the immune system in terms of the combinatorial possibilities of amino-acids in antigen and self-tolerance. *J Theor Biol.* 1993 Oct 21;164(4):531-6.

- Xia HJ, Yang G: Inositol 1,4,5-trisphosphate -kinases: functions and regulations. *Cell Res.* 2005 Feb;15(2):83-91.

- Yamasaki M, Masgrau R, Morgan AJ, Churchill GC, Patel S, Ashcroft SJ, Galione A. Organelle selection determines agonist-specific Ca²⁺ signals in pancreatic acinar and beta cells. *J Biol Chem.* 2004 Feb 20;279(8):7234-40.

- Yamasaki M, Thomas JM, Churchill GC, Garnham C, Lewis AM, Cancela JM, Patel S, Galione A. Role of NAADP and cADPR in the induction and maintenance of agonist-evoked Ca²⁺ spiking in mouse pancreatic acinar cells. *Curr Biol.* 2005 May 10;15(9):874-8.

- Zinkernagel RM, Bachmann MF, Kündig TM, Oehen S, Pirchet H, Hengartner H. On immunological memory. *Annu Rev Immunol.* 1996 (14): 333-67.

- Zocchi E, Usai C, Guida L, Franco L, Bruzzone S, Passalacqua M, De Flora A. Ligand-induced internalization of CD38 results in intracellular Ca²⁺ mobilization: role of NAD⁺ transport across cell membranes. *FASEB J.* 1999 Feb;13(2):273-83.

- Zocchi E, Daga A, Usai C, Franco L, Guida L, Bruzzone S, Costa A, Marchetti C, De Flora A. Expression of CD38 increases intracellular calcium concentration and reduces doubling time in HeLa and 3T3 cells. *J Biol Chem.* 1998 Apr 3;273(14):8017-24.

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Andreas H Guse für die Überlassung des Themas und für die Bereitstellung der finanziellen und technischen Mittel bedanken. Zusätzlich möchte ich mich für die zahlreichen Diskussionen und die engagierte Betreuung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang W Deppert spreche ich meinen Dank aus für die Übernahme der Betreuung seitens des Fachbereichs Chemie.

Prof. Dr. Hans W Mittrücker danke ich für die Präparationen der WT-Mäuse und der CD38^{ko}-Mäuse.

Eine grosse Hilfe waren auch alle ehemaligen und heutigen Arbeitskollegen, insbesondere Ralf Fliegert, Karin Weber, Angelika Harneit, und Andreas Gasser durch die vielen Gespräche über experimentelle und wissenschaftliche Probleme. Mein Dank gilt auch den ehemaligen TA-Schülerinnen und Schülern Katharina Oldenburger, Lena Bönke und Andreas Prescher für die Unterstützung bei der experimentellen Durchführung.

10 Anhang

10.1 Veröffentlichungen

- A. Gasser, S. Bruhn und AH. Guse: Second Messenger Function of Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate Revealed by an Improved Enzymatic Cycling Assay. *J Biol Chem.* Juni 2006, 281(25): 16906-13
- T. Kirchberger, G. Wagner, J. Xu, C. Cordiglieri, P. Wang, A. Gasser, R. Fliegert, S. Bruhn, A. Flügel, FE. Lund, LH. Zhang, BV. Potter und AH. Guse: Cellular effects and metabolic stability of N1-cyclic inosine diphosphoribose and its derivatives. *Br J Pharmacol.* Oktober 2006, 149(4): 337-44

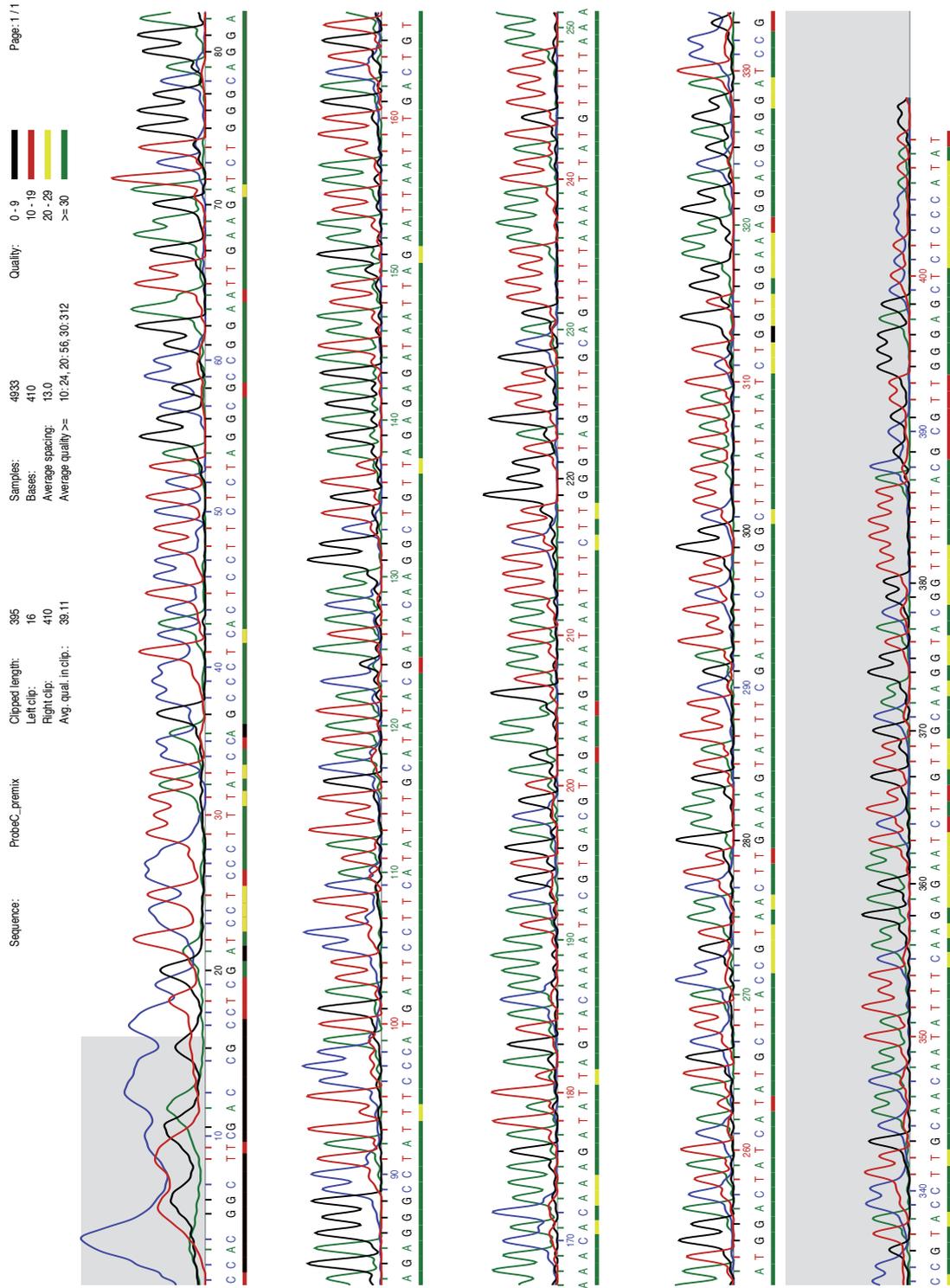
Veröffentlichungen in Vorbereitung

- S. Bruhn, K. Weber, HW. Mittrücker, T. Westphal, E. Zocchi, A. De Flora, FE.. Lund und AH. Guse: Expression of CD38, Endogenous NAADP concentrations and Calcium Signalling: A Complex Relation.

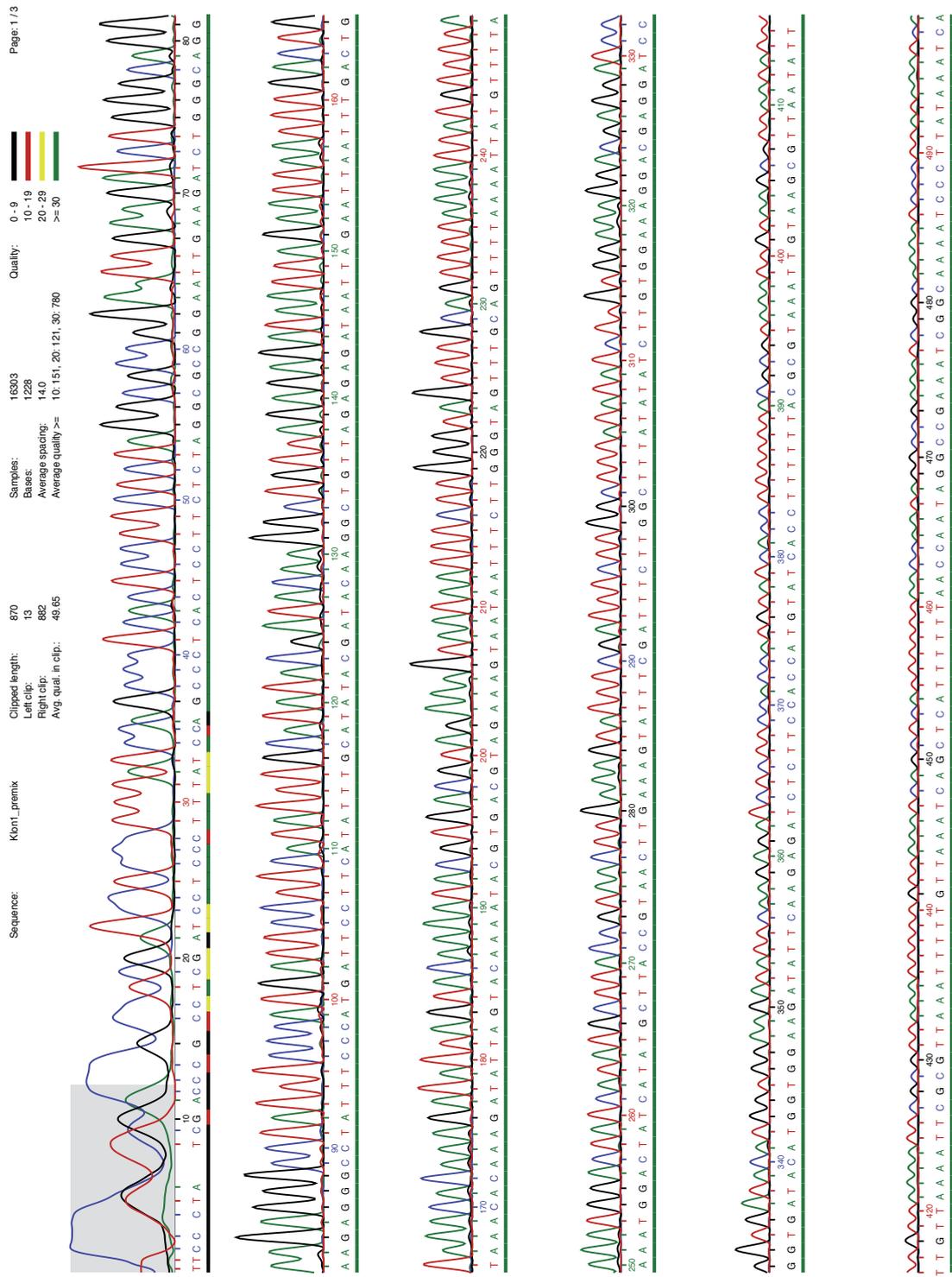
10.2 Poster-Beiträge zu Kongressen

- S. Bruhn, A. Gasser und AH. Guse: Second Messenger Function of Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) In Human T-Lymphocytes. The CD38 Ectoenzyme Family. 8 - 10 Juni 2006, Turin
- T. Westphal, S. Bruhn, K. Oldenburger, R. Fliegert und AH. Guse: NAADP measurement in eucaryotic cells. Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie. 16 - 19 September 2007, Hamburg

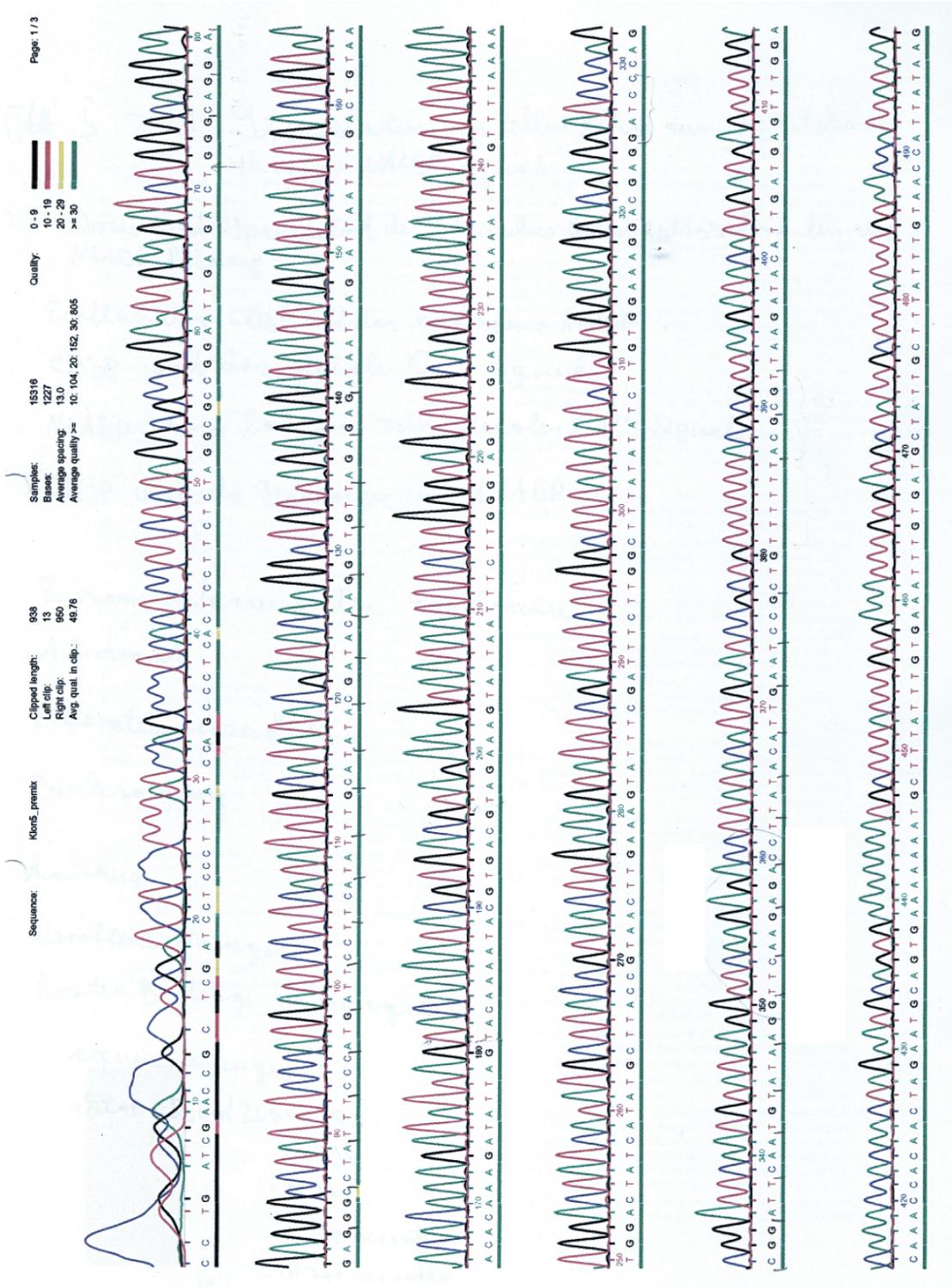
10.3.2 Vektor pDsRed2U6-si394



10.3.3 Vektor pDsRed2U6-si771



10.3.4 Vektor pDsRed2U6-si270scramble



10.3.5 Vektor pDsRed2U6-si771scramble

