

Die Bedeutung von NAADP für die
Ca²⁺-Signalgebung von T-Zellen der Ratte (*Rattus
norvegicus*, Berkenhout, 1769) und ventrikulären
Cardiomyozyten der Maus (*Mus musculus*,
Linnaeus, 1758)

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Merle Nebel

aus Kiel

Hamburg 2011

1 Zusammenfassung

Ca^{2+} ist ein universeller sekundärer Botenstoff, der eine entscheidende Rolle bei der Signalgebung der verschiedensten Zelltypen spielt. Die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern erfolgt über die sekundären Botenstoffe NAADP, IP_3 und cADPR. Die Besonderheit von NAADP ist, dass es bereits in nanomolaren Konzentrationen wirksam ist und eine *Trigger*-Funktion für die Entwicklung des globalen Ca^{2+} -Signals einer Zelle einnehmen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung von NAADP für die Ca^{2+} -Signalgebung in zwei unterschiedlichen pathophysiologischen Zellmodellen für T-Zellen und Cardiomyozyten untersucht.

Zunächst wurde ein neues System zur Aktivierung und zur Bestimmung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in T-Zellen *in vitro* erfolgreich etabliert. Dabei wurde die gängige Stimulation über Antikörper durch die Aktivierung mit Antigen-präsentierenden Zellen ersetzt. Der Zell-Zell-Kontakt ermöglicht das Ausbilden einer Immunologischen Synapse, in der es zur definierten räumlichen Anordnung der an der Signalgebung beteiligten Proteine kommt. Das Modell ist an die Multiple Sklerose, eine Autoimmunerkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS), angelehnt. Für das sogenannte Zweizellsystem wurden primäre MBP-spezifische T-Zellen der Ratte und eine Astrozytenzelllinie als Antigen-präsentierende Zellen verwendet. MBP-spezifische T-Zellen können durch den Transfer ins Tier eine Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) auslösen, ein bekanntes Tiermodell für die Multiple Sklerose in der Ratte. Astrozyten sind als vorherrschende Gliazellen des ZNS nicht-professionelle Antigen-präsentierende Zellen, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sein können.

Es konnte gezeigt werden, dass die T-Zellen in der Anwesenheit des spezifischen Antigens innerhalb weniger Minuten ein starkes, lang anhaltendes Ca^{2+} -Signal entwickeln. Im Verlauf des Ca^{2+} -Signals kam es zur Abrundung der T-Zellen und zu einer festen Kontaktausbildung mit den Astrozyten, wodurch die T-Zellen immobilisiert wurden. In der Abwesenheit des Antigens traten hingegen nur schwache und zeitlich stark verzögerte Ca^{2+} -Signale auf, während derer die T-Zellen mobil blieben. Eine gleichzeitige Untersuchung des Ca^{2+} -Signals in den Astrozyten ergab, dass sich in diesen während der Kontaktbildung zur T-Zelle keine globalen Ca^{2+} -Signale entwickelten. Durch den Einsatz des spezifischen NAADP-Antagonisten BZ194 konnte das mittlere, globale Ca^{2+} -Signal in den T-Zellen deutlich reduziert werden. Dies führte im Mittel zu einer erhöhten Motilität der Zellen. Außerdem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass NAADP auch bei der Entstehung Antigen-unabhängiger Ca^{2+} -Signale beteiligt sein könnte und so eine Sensitivierung von T-Zellen ermöglicht, um ein leichteres Ansprechen auf das

spezifische Antigen zu erlauben. In der Arbeitsgruppe von Prof. Flügel (Universitätsklinikum Göttingen) mit BZ194 durchgeführte *in vitro*- und *in vivo*-Studien belegen, dass die Unterdrückung des NAADP-induzierten Ca^{2+} -Signals eine verminderte T-Zellaktivierung und Proliferation, sowie eine erhebliche Abschwächung der klinischen Symptome der EAE zur Folge hatte.

In ventrikulären Cardiomyozyten sorgt das Ca^{2+} -Signal für die Verknüpfung der elektrischen Erregung der Zelle mit der Kontraktion. Die Ca^{2+} -Signalgebung kann durch die Stimulation des β -Adrenozeptors mit Isoprenalin moduliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Ca^{2+} -Signal muriner, ventrikulärer Cardiomyozyten während der elektrischen Stimulation analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass es in der Gegenwart von Isoprenalin zur Entstehung zusätzlicher Ca^{2+} -Transienten kam, woraus arrhythmische Kontraktionen entstanden. Für die folgenden Versuche dienten diese zusätzlichen Ca^{2+} -Transienten als vereinfachtes Modell für Rhythmusstörungen im Herzen. Die Ergebnisse belegen, dass der proarrhythmische Effekt des Isoprenalins wahrscheinlich über die Proteinkinase A vermittelt wird. Bemerkenswerterweise konnte durch den Einsatz von BZ194 die Bildung zusätzlicher Ca^{2+} -Transienten verhindert und somit eine Beteiligung von NAADP aufgezeigt werden. Die weiteren Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass NAADP Ca^{2+} aus lysosomalen Speichern freisetzt. Dies könnte zu einer Überladung des sarcoplasmatischen Retikulums mit Ca^{2+} und schließlich zur Entstehung zusätzlicher Ca^{2+} -Transienten führen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass NAADP nicht nur entscheidend für die Aktivierung von T-Zellen ist, sondern auch an der Entstehung arrhythmischer Ereignisse in Cardiomyozyten beteiligt zu sein scheint. Die Inhibition der NAADP-vermittelten Ca^{2+} -Signalgebung konnte die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen verhindern und das Auftreten zusätzlicher Ca^{2+} -Transienten in ventrikulären Cardiomyozyten unterbinden. Der NAADP-Signalweg stellt somit ein viel versprechendes Ziel für zukünftige pharmakologische Interventionen dar.

2 Abstract

Ca^{2+} is a universal second messenger, playing an important role for signaling in a variety of different cell types. Ca^{2+} is released from intracellular stores by the second messengers NAADP, IP_3 and cADPR. A special feature of NAADP is its effective concentration in the low nanomolar range and its function as trigger for the development of global Ca^{2+} signals inside the cell. In the present work the role of NAADP for Ca^{2+} signaling in two different pathophysiological cell models for T cells and cardiomyocytes was analyzed.

First, a new system for activation and determination of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in T cells *in vitro* was successfully established. In this system the common stimulation with antibodies was replaced by the activation with antigen-presenting cells. Cell-cell contact allows the formation of an immunological synapse, which leads to a defined spatial arrangement of proteins participating in signaling. The model follows multiple sclerosis (MS), an autoimmune disease of the central nervous system (CNS). For the so-called two cell system primary MBP-specific T cells of the rat and an astrocyte cell line as antigen-presenting cells were used. Transferred into animals, MBP-specific T cells are able to induce an Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) - a prominent animal model for MS in the rat. Astrocytes, the prevalent glia cells in the CNS, are non professional antigen-presenting cells and participate in inflammation.

It was shown, that T cells develop a strong, long lasting Ca^{2+} signal in a few minutes in the presence of the specific antigen. During Ca^{2+} signaling T cells rounded up and made stable contacts with the astrocytes, which led to immobilization of the T cells. In the absence of the antigen only weak and delayed Ca^{2+} signals appeared, and the T cells stayed mobile. A simultaneous analysis of Ca^{2+} signaling in astrocytes showed no global Ca^{2+} signaling in these cells during contact to T cells. Incubation with the specific NAADP-antagonist BZ194 considerably reduced the mean global Ca^{2+} signal in T cells. In average, this led to a higher motility of the cells. Additionally, the results indicate a participation of NAADP in the development of antigen-independent Ca^{2+} signals, which may allow sensitization of T cells and therefore an easier response to the specific antigen. *In vitro* and *in vivo* studies with BZ194, conducted by the group of Prof. A. Flügel, showed, that suppression of the NAADP-induced Ca^{2+} signal results in a reduced T cell activation and proliferation as well as an attenuation of clinical symptoms of EAE.

In ventricular cardiomyocytes Ca^{2+} signaling is the link between electrical excitation and contraction of the cell. Ca^{2+} signaling can be modulated by stimulating the β -adrenoceptor with isoprenaline. In the present work the Ca^{2+} signal of murine, ventricular cardiomyocytes

was analyzed during electrical stimulation. In the presence of isoprenalin additional Ca^{2+} transients were observed, leading to arrhythmogenic contractions. In following experiments these additional Ca^{2+} transients were used as a model for arrhythmia in the heart. The proarrhythmic effect of isoprenalin is most probably mediated by protein kinase A. Notably, administration of BZ194 blocked the appearance of additional Ca^{2+} transients and demonstrated a participation of NAADP. Further results indicate, that NAADP releases Ca^{2+} from lysosomal stores. This might lead to a Ca^{2+} overload of the sarcoplasmic reticulum and finally to the appearance of additional Ca^{2+} transients.

The present work shows that NAADP is not only crucial for activation of T cells, but may also participate in the development of arrhythmic events in cardiomyocytes. Inhibiting NAADP-mediated Ca^{2+} signaling prevented the activation of autoreactive T cells and reduced the number of additional Ca^{2+} transients in ventricular cardiomyocytes. The NAADP signaling pathway is therefore a promising target for pharmacological interventions in the future.