

Aus der Fachrichtung Physiologie
Bereich Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Untersuchung von Kalziumsignalen in T-Lymphozyten
der Lamina propria von Mensch und Maus
mit der Zwei-Photonen Mikroskopie**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2006

vorgelegt von: Eberhard Tutsch
geboren am 05.12.1976 in Pforzheim

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen

<u>1. Zusammenfassung</u>	7
Summary	9
<u>2. Einleitung</u>	11
2.1 Kalziumsignale in T-Lymphozyten und T-Zellaktivierung	11
2.2 Intestinales Immunsystem und LP Lymphozyten	15
2.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	17
2.4 Tiermodelle chronisch entzündlicher Darmerkrankungen	18
2.5 Fragestellungen	19
<u>3. Material und Methodik</u>	21
3.1 Isolierung humaner Zellen	21
3.1.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut	21
3.1.2 Präparation von Biopsien aus Kolon und Rektum zur Untersuchung gewebständiger LP Lymphozyten	21
3.2 Isolierung muriner Zellen	22
3.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut	22
3.2.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus Darmresektat	23
3.2.3 Präparation von Darmresektaten zur Untersuchung gewebständiger LP Lymphozyten	24
3.3 Zwei-Photonen-Mikroskopie	25
3.4 Kalziummessung mit Fluoreszenzfarbstoffen	27
3.5 Der Zwei-Photonen-Messplatz	30
3.6 Zur Durchführung der Experimente	31
3.7 Material	37
3.7.1 Chemikalien	37
3.7.2 Antikörper	38
3.7.3 Präparationslösungen	38

3.7.4	Versuchslösungen	39
3.7.5	Geräte	40
3.7.6	Steuerungs- und Auswertungsprogramme	40
4.	<u>Ergebnisse</u>	41
4.1	Entwicklung und Validierung der Methodik	41
4.1.1	Messung zytosolischer Kalziumkonzentrationen in gewebsständigen LP Lymphozyten	41
4.1.2	Validierung der Messung zytosolischer Kalziumkonzentrationen in Lymphozyten mit der Zwei-Photonen- Mikroskopie	44
4.2	Kalziumsignale in PB Lymphozyten und LP Lymphozyten vom Menschen	46
4.2.1	Kalziumsignale in PB Lymphozyten	46
4.2.2	Kalziumsignale in gewebsständigen LP Lymphozyten	51
4.2.3	Vergleich der Kalziumsignale in PB Lymphozyten und LP Lymphozyten vom Menschen	58
4.3	Kalziumsignale in PB Lymphozyten und LP Lymphozyten der Maus	61
4.3.1	Kalziumsignale in PB Lymphozyten	61
4.3.2	Kalziumsignale in dissoziierten Darmlymphozyten	64
4.3.3	Kalziumsignale in gewebsständigen LP Lymphozyten	68
4.3.4	Vergleich der Kalziumsignale in PB Lymphozyten und dissoziierten Darmlymphozyten der Maus	69
5.	<u>Diskussion</u>	72
5.1	Zur Entstehung unterschiedlicher Kalziumsignale	72
5.2	Zur Wirkung unterschiedlicher Kalziumsignale	76
5.3	Einfluss des Mikroenvironments	79
5.4	Kalziummessungen in murinen LP Lymphozyten und Tiermodelle für CED	82
5.5	Zur Methode	84

<u>6.</u>	<u>Literatur</u>	87
<u>7.</u>	<u>Anhang</u>	96
7.1	Publikationen und Preise	96
7.1.1	Paper	96
7.1.2	Abstracts	96
7.1.3	Preise	97
7.2	Danksagung	97
7.3	Lebenslauf	99

Verzeichnis der Abkürzungen

AM	Azetoxymethylester
AP-1	activator protein-1
APC	antigen presenting cell
ATP	Adenosintrisphosphat
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Kalziumkonzentration
CD	cluster of differentiation
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CRAC	calcium release-activated calcium
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(aminoethylether-)tetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanat
GM-CSF	granulocyte/macrophage-colony stimulating factor
IBD	inflammatory bowel disease
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon- γ
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LP	Lamina propria
LPL	Lamina propria T-Lymphozyten
MAdCAM	mucosal addressin cell-adhesion molecule
MHC	major histocompatibility complex

Verzeichnis der Abkürzungen

NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NFκB	nuclear factor-κB
PB	peripheres Blut
PBL	periphere Blut T-Lymphozyten
PIP ₂	Phosphatidylinositoldiphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC-γ	Phospholipase C-γ
PMCA	plasma membran calcium ATPases
PP	Peyersche Plaques
R-PE	R-Phycoerythrin
SCID	severe combined immunodeficiency
sd	standard deviation
sem	standard error of the mean
SERCA	sarco-endoplasmatic reticulum calcium ATPases
SOC	store operated channel
TCR	T-cell receptor
TG	Thapsigargin
TGF-β	transforming growth factor-β
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRP	transient receptor potential

1. Zusammenfassung

Lamina propria T-Lymphozyten und das intestinale Immunsystem, dessen Bestandteil sie sind, zeigen physiologischerweise eine Hyporeaktivität gegenüber nichtpathogenen Darmantigenen. Die Interaktion mit diesen Antigenen führt nicht zur Ausbildung einer Immunantwort, sondern vielmehr zur Induktion einer lokalen und systemischen immunologischen Toleranz. Die Mechanismen, die zur Aufrechterhaltung dieser Hyporeaktivität beitragen, werden bis jetzt nur teilweise verstanden. Vor allem der Einfluss des intestinalen Mikroenvironments auf die verminderte T-Zellreaktivität ist unklar.

Unter dem Begriff der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen werden die Krankheiten Colitis ulcerosa und Morbus Crohn zusammengefasst. Trotz jahrzehntelanger Forschungsanstrengungen wird die Frage nach der Ursache und dem Entstehungsmechanismus dieser Krankheitsbilder nach wie vor kontrovers diskutiert. Weitgehend Einigkeit herrscht lediglich in der Annahme, dass die verschiedenen potentiellen Ursachen und Entstehungsmechanismen in eine Hyperreaktivität des darmeigenen Immunsystems als gemeinsame Endstrecke der Pathogenese münden.

Kalziumsignale spielen eine essentielle Rolle für die Aktivierung von T-Lymphozyten. Trotz der potentiellen Bedeutung des Microenvironments für die physiologische Hyporeaktivität des intestinalen Immunsystems bei Gesunden bzw. die pathologische Hyperreaktivität bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurden Messungen der Kalziumsignale in Lamina propria T-Lymphozyten bisher ausschließlich mit dissoziierten Zellen durchgeführt – wohl auch aufgrund der Schwierigkeit von Messungen im intakten Gewebeverband. Bei der Isolierung dissoziierter Zellen werden diese jedoch aus ihrer natürlichen Umgebung herausgelöst, das Microenvironment der Lamina propria wird zerstört. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung der Zwei-Photonen-Mikroskopie erstmals eine Methode entwickelt, mit welcher es möglich ist, zytosolische Kalziumsignale in identifizierten T-Lymphozyten in der intakten Lamina propria von Mensch und Maus zu messen. Hierdurch wurde der Einfluss der Präparation auf das zelluläre Mikroenvironment minimiert. Die Validierung

dieser neuen Methode erfolgte durch einen Vergleich mit einem konventionellen Imagingverfahren.

Die Messergebnisse der Untersuchungen mit humanen T-Lymphozyten zeigen, dass die Lamina propria T-Zellen aus dem Darm von Patienten ohne chronisch entzündliche Darmerkrankungen nach Stimulation mit Thapsigargin signifikant niedrigere Kalziumantworten ausbilden als die peripheren Blut T-Lymphozyten. Dies korreliert mit der physiologischen Hyporeaktivität des intestinalen Immunsystems. Die Messdaten zeigen jedoch auch, dass die Lamina propria T-Zellen aus entzündeten Darmabschnitten von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen höhere Kalziumsignale generieren als die Lamina propria T-Lymphozyten aus nicht entzündetem Gewebe. Die Kalziumantworten der Lamina propria T-Zellen aus entzündeten Darmabschnitten liegen dabei nur geringfügig und nicht signifikant unter denen der peripheren Blut T-Zellen, was wiederum gut mit der pathologisch gesteigerten Reaktivität des intestinalen Immunsystems im Rahmen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen korreliert.

Damit bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Befunde vorangegangener Untersuchungen mit dissoziierten Lamina propria T-Zellen, an denen der Verfasser der vorliegenden Arbeit ebenfalls beteiligt war [Schwarz A et al., 2004]. Aus der Vergleichbarkeit der Daten dissoziierter und gewebständiger Lamina propria T-Lymphozyten ergibt sich, dass der unmittelbare Einfluss des Mikroenvironments der Lamina propria auf die Ausbildung der Kalziumsignale in den Lamina propria T-Zellen, wenn überhaupt, nur von geringer Bedeutung sein kann. Nicht ausgeschlossen werden darf anhand dieser Ergebnisse allerdings ein langfristiger Effekt des Mikroenvironments auf die Generierung der Kalziumantworten, z.B. durch die Induktion einer langanhaltende Reduktion der Kalziumkanalaktivität in der Plasmamembran von Lamina propria T-Zellen.

Im Gegensatz zu den humanen T-Zellen generieren die dissoziierten Darmlymphozyten der Maus nach Stimulation mit Thapsigargin höhere Kalziumsignale als die peripheren Blut T-Zellen der Maus. Es stellt sich dabei die Frage nach dem Einfluss, welchen das Mikroenvironment des Darmes im intestinalen Immunsystem der Maus auf die Kalziumantworten der Lamina propria T-Lymphozyten ausübt. Die Untersuchung von Kalziumsignalen in geweb-

ständigen Lamina propria T-Zellen der Maus könnte hierauf eine Antwort geben. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb auch eine Methode entwickelt, mit der es möglich ist, Kalziummessungen in gewebständigen Lamina propria T-Zellen der Maus durchzuführen. Eine der Aufgaben zukünftiger Arbeiten wird es sein, die anhand nativer muriner T-Zellen gewonnen Erkenntnisse für Untersuchungen mit Tiermodellen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zu nutzen.

Summary

Analysis of calcium signals in human and murine T lymphocytes in the intact lamina propria with two photon microscopy

Lamina propria T lymphocytes and the intestinal immune system show a physiological hyporeactivity towards non-pathogenic antigens of the intestine. The interaction with these antigens does not initiate a productive immune response but instead leads to the induction of local and systemic immunological tolerance. The mechanisms which maintain this hyporeactivity are not fully understood. In particular, the importance of the intestinal microenvironment for the reduced T cell activity remains unclear.

Inflammatory bowel disease is the term collectively used to describe Colitis ulcerosa and Morbus Crohn, which are both chronic intestinal immune diseases. Despite tremendous efforts, the origin of both diseases remains still controversial. It is however agreed that, whatever the origin may be, it leads to a hyperreactivity of the intestinal immune system which is responsible for the intestinal inflammation.

Calcium signals play an essential role for the activation of T lymphocytes. Despite the potential importance of the intestinal microenvironment, measurements of the intracellular calcium concentration of lamina propria T cells have so far only been carried out with dissociated cells (probably because measurements in the intact tissue are difficult), a technique that does destroy the microenvironment.

Using the two photon technology, I developed a method for the measurement of cytosolic calcium signals in identified human and murine T lymphocytes in the

intact lamina propria. Thereby the influence of the cell preparation on the cellular microenvironment was minimized. For validation this new method was compared with a conventional imaging technique.

The results with the human T cells show that lamina propria T cells of the intestine of patients without inflammatory bowel disease have significantly lower calcium responses as peripheral blood T lymphocytes when stimulated with thapsigargin. This correlates well with the physiological hyporeactivity of the intestinal immune system. Lamina propria T cells of the intestine from patients with inflammatory bowel disease were found to generate higher calcium signals as lamina propria T cells of non-inflamed tissue. The calcium responses of lamina propria T cells of inflamed intestine were in fact only slightly lower than the calcium signals of peripheral blood T cells. This correlates well with the pathologically increased reactivity of the intestinal immune system in case of inflammatory bowel disease.

The results of my thesis confirm the findings of earlier experiments with dissociated lamina propria T cells in which I was also involved [Schwarz A et al., 2004]. Since we did not find major differences regarding the calcium signals between dissociated lamina propria T cells and lamina propria T cells within the intact tissue, a direct influence of the lamina propria microenvironment on the generation of the calcium signals should only be of lower importance if it exists at all. However, a long term effect of the microenvironment on the calcium signals can not be excluded, for instance through the induction of a long term reduction of the calcium channel activity in the plasma membrane of lamina propria T cells.

In contrast to human lamina propria T cells, murine lamina propria T-cells generated higher calcium signals following stimulation than murine peripheral blood T cells. In addition to analyzing dissociated murine lamina propria T cells, a protocol was developed that allowed the analysis of these cells within the intact tissue with two photon microscopy. In the future, we can therefore analyze the potential microenvironment influence of the lamina propria on calcium signals in murine lamina propria T cells. The establishment of the analysis of calcium signals in primary T cells from mice can also be extended to animal models with inflammatory bowel disease.

2. Einleitung

2.1 Kalziumsignale in T-Lymphozyten und T-Zell-aktivierung

T-Lymphozyten sind als Träger der zellvermittelten Immunität ein essentieller Bestandteil des Immunsystems. Es gibt zwei Haupttypen von T-Zellen, die sich durch die Zelloberflächenproteine CD4 und CD8 (cluster of differentiation, CD), hinsichtlich ihrer Effektorfunktionen sowie durch die Klasse der MHC-Moleküle (major histocompatibility complex, MHC), mit denen sie interagieren, unterscheiden. CD8⁺ T-Zellen spielen vor allem eine Rolle bei der Abwehr viraler Infekte. Viren vermehren sich intrazellulär, wobei sie den Syntheseapparat der infizierten Zellen benutzen. Es entstehen endogene Antigene, die über MHC-Klasse-I-Moleküle an die Zelloberfläche gelangen. CD8⁺ Zellen erkennen diese Antigene und töten die befallene Zelle. Sie werden deshalb auch als zytotoxische T-Lymphozyten bezeichnet. CD4⁺ T-Zellen übernehmen immunregulatorische Aufgaben. Sie interagieren mit Zellen, welche exogene Antigene über MHC-Klasse-II-Moleküle an der Zelloberfläche präsentieren. CD4⁺ T-Zellen können so u.a. Macrophagen aktivieren bzw. dazu befähigen, Bakterien zu eliminieren. Des Weiteren liefern sie z.B. wichtige costimulatorische Signale für die Proliferation und Ausdifferenzierung von naiven B-Lymphozyten zu Antikörper produzierenden Plasmazellen. CD4⁺ T-Lymphozyten werden daher auch T-Helferzellen genannt. Die Erhöhung der intrazellulären Konzentration an freiem Kalzium ist dabei ein Schlüsselsignal für die Aktivierung von T-Lymphozyten nach Stimulation des T-Zellen Rezeptors (T-cell receptor, TCR) durch Antigene oder andere Substanzen, die an den T-Zellen Rezeptor binden können [Lewis RS, 2001; Winslow MM et al., 2003].

Der TCR-Komplex besteht zum einen aus variablen Proteinen, welche der Antigenerkennung dienen, zum anderen aus unveränderlichen Proteinen, die für die Signaltransduktion in das Zellinnere verantwortlich sind. Der zentrale Teil des TCR-Komplexes wird dabei gewöhnlich von einem $\alpha\beta$ -Heterodimer gebildet, das in der Lage ist, den zu ihm passenden Antigen/MHC-Komplex zu erkennen und an

ihn zu binden. Assoziiert mit dem $\alpha\beta$ -Heterodimer sind ein Homodimer aus ζ -Ketten sowie der CD3-Komplex bestehend aus einer γ -, einer δ - und zwei ϵ -Ketten. Jede CD3-Kette sowie die ζ -Ketten verfügen über sog. ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs). Wird der TCR stimuliert kommt es zur Aktivierung von Kinasen der Src-Familie, welche Tyrosinreste der ITAMs phosphorylieren. Sind die ITAMs in den zytoplasmatischen Anteilen des TCR-Komplexes phosphoryliert, aktivieren sie das ζ -Ketten assoziierte Protein ZAP-70. ZAP-70 ist seinerseits eine Tyrosinkinase, welche u.a. das Adaptorprotein SLP76 phosphoryliert. SLP76 aktiviert letztlich sowohl Ras induzierte Kinasekaskaden als auch die Phospholipase C- γ (PLC- γ). PLC- γ spaltet plasmamembranständiges Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP₂) in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃). DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC). IP₃ dagegen bindet an IP₃-Rezeptoren in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), was zur Öffnung von Kalziumkanälen und zu einer Kalziumfreisetzung aus dem ER in das Zytosol führt [Qian D et al., 1997; van Leeuwen JE et al., 1999; Berridge MJ (et al.), 1993, 2003].

In Lymphozyten, wie auch in vielen anderen Zellen, führt IP₃ zu einer biphasischen Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Der beschriebenen Kalziumfreisetzung aus dem ER folgt ein Kalziumeinstrom über die Plasmamembran. Zu erklären ist dieses Phänomen durch den sogenannten kapazitiven Kalziumeinstrom. Hierbei kommt es durch die Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher zu einer Öffnung speichergesteuerter Kalziumkanäle (store operated channels, SOCs) in der Plasmamembran, durch die Kalzium aus dem Extrazellulärraum in die Zelle einströmen kann [Putney JW Jr., 1990; Lewis RS, 2001; Penner R et al., 2004; Quintana A et al., 2005]. Die Aktivierung der SOCs ist dabei nicht nur über eine Rezeptorstimulation mit anschließender Bildung von IP₃ möglich, sondern folgt auch auf eine rezeptorunabhängige Entleerung der Kalziumspeicher des ER, z.B. durch Thapsigargin (TG) [Thastrup O et al., 1989]. SOCs sind in vielen Zellpopulationen vorhanden und können in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden [Lewis RS, 1999]. Die in T-Lymphozyten vorzufindenden speichergesteuerten Kalziumkanäle werden auch als CRAC-Kanäle (calcium release activated calcium, CRAC) bezeichnet und unterscheiden

sich von anderen SOCs z.B. durch eine sehr hohe Selektivität für Kalzium über andere Kationen.

Eine wichtige Rolle bei der Generierung von Kalziumsignalen kommt auch den kalziumspeichernden Zellorganellen, wie dem endoplasmatischen Retikulum oder den Mitochondrien, zu [Duchen MR, 2000; Brini M, 2003]. Der Füllungszustand der Kalziumspeicher des ER ist dabei nach gegenwärtiger Auffassung die entscheidende Größe, welche den Aktivitätszustand der CRAC-Kanäle kontrolliert [Lewis RS, 2001]. Bezüglich der Mitochondrien konnte gezeigt werden, dass sie als eine Art Kalziumpuffer agieren. Steigt die zytosolische Kalziumkonzentration an, können sie Kalzium aufnehmen und so Kalziumpeaks abschwächen. In Ruhephasen wird das Kalzium wieder in das Zytosol abgegeben und so eine Rückkehr der zytosolischen Kalziumkonzentration zur Baseline verzögert [Hoth M et al., 1997, 2000]. Die Kalziumaufnahme in die Mitochondrien erfolgt über einen Uniporter in der inneren Membran der Mitochondrien. Die Kalziumabgabe geschieht über natriumabhängige und -unabhängige Austauscher [Gunter TE et al., 1990].

Neben dem Kalziumeinstrom sind für die Ausbildung der Kalziumsignale in T-Zellen auch die Mechanismen der Kalziumclearance von Bedeutung. In der Membran des ER sind Kalzium-ATPasen (sarco-endoplasmatic reticulum calcium ATPases, SERCA) lokalisiert, welche Kalzium aus dem Zytosol in das ER pumpen. Ihr Beitrag zur Kalziumclearance in menschlichen T-Zellen ist jedoch gering [Dolmetsch RE et al., 1994]. Die Aufgabe der SERCA besteht vielmehr darin, durch das Aufrechterhalten eines Kalziumkonzentrationsgefälles über der Membran des ER im Ruhezustand der Zelle erst die IP_3 induzierte Speicherentleerung nach Stimulation zu ermöglichen. Den entscheidenden Beitrag zur Kalziumclearance in menschlichen T-Lymphozyten liefern hingegen Kalzium-ATPasen in der Plasmamembran der Zellen (plasma membran calcium ATPases, PMCA) [Donnadieu E et al., 1992; Balasubramanyam M et al., 1993]. Na^+/Ca^{2+} -Austauscher spielen keine Rolle für die Kalziumclearance in T-Zellen [Donnadieu E et al., 1993].

Der Kalziumeinstrom über die CRAC-Kanäle in die T-Zellen führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, welche Minuten bis Stunden, evtl. sogar Tage, anhalten kann und über kalziumabhängige Signalmoleküle Einfluss

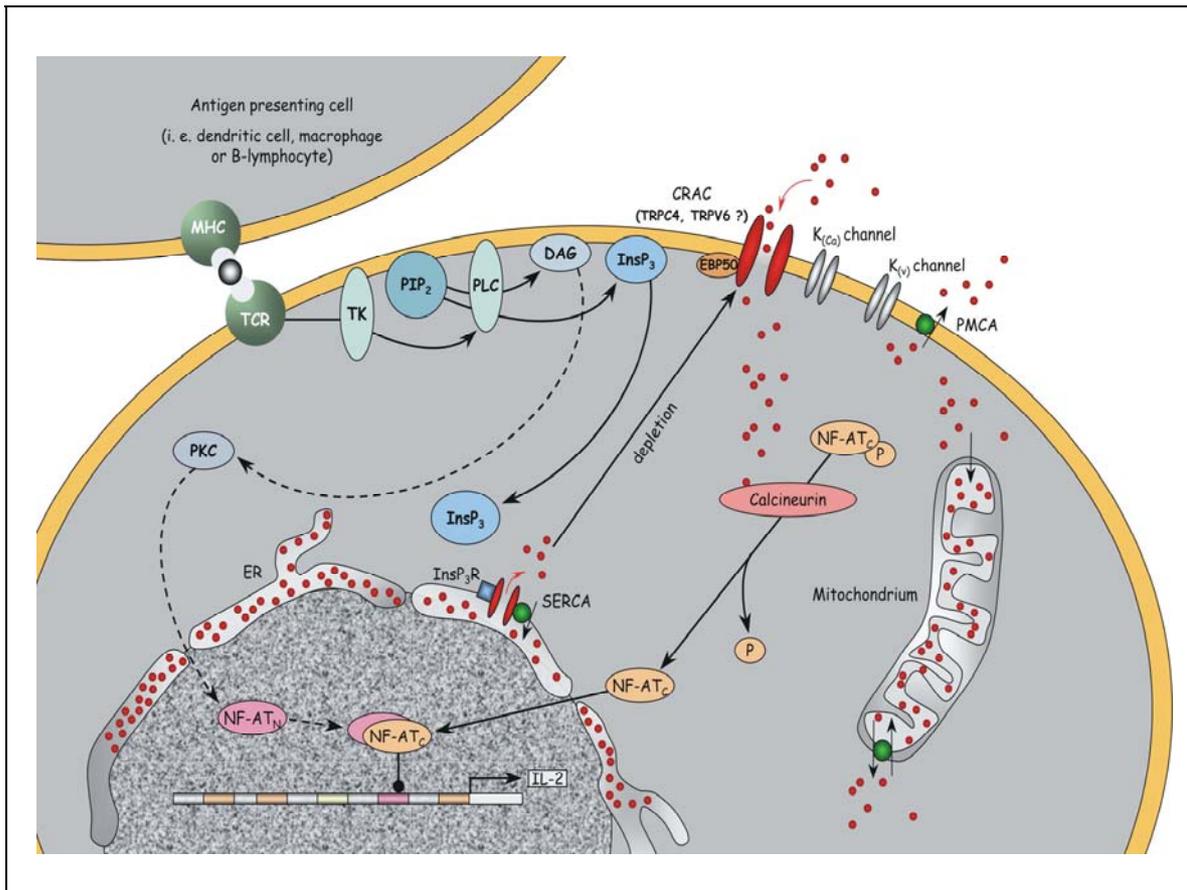


Abbildung 1: Modell der Kalziumsignalwege in T-Zellen (zur Verfügung gestellt von D. Griesemer). Die Stimulation des TCR-Komplexes durch den Antigen/MHC-Komplex einer antigenpräsentierenden Zelle führt über mehrere Zwischenschritte, an denen Tyrosinkinasen beteiligt sind, zur Aktivierung der PLC- γ . PLC- γ spaltet plasmamembranständiges PIP₂ in DAG und IP₃. DAG aktiviert die PKC. IP₃ dagegen bindet an IP₃-Rezeptoren in der Membran des ER, was zu einer Kalziumfreisetzung aus dem ER führt. Dadurch kommt es zur Öffnung von CRAC-Kanälen in der Plasmamembran, durch die Ca²⁺ aus dem Extrazellulärraum in die Zelle einströmt. Eines der Signalmoleküle, die durch Ca²⁺ aktiviert werden, ist Calcineurin. Über eine Dephosphorylierung kommt es zur Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT in den Nucleus, welcher eine Schlüsselrolle bei der Expression wichtiger Cytokine spielt. Weitere Transkriptionsfaktoren, die durch den Kalziumeinstrom über die CRAC-Kanäle aktiviert werden, sind NF κ B und AP-1.

auf den Aktivitätszustand und das Proliferationsverhalten der Zellen ausübt. Eines der Signalmoleküle, welche durch die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration aktiviert werden, ist die Phosphatase Calcineurin. Calcineurin ist in der Lage den Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated T-cells) zu dephosphorylieren, welchem eine Schlüsselrolle in der

Expression wichtiger Zytokine, z.B. IL-2 (Interleukin-2), zukommt [Timmerman LA et al., 1996; Crabtree GR et al., 2002]. Die Dephosphorylierung von NFAT führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors und zu seiner Translokation aus dem Zytosol in den Nucleus [Rao A et al., 1997]. Weitere Transkriptionsfaktoren, die durch den Kalziumeinstrom über die CRAC-Kanäle aktiviert werden, sind NFκB (nuclear factor-κB) [Li Q et al., 2002] und AP-1 (activator protein-1) [Rao A et al., 1997].

Wie wichtig die Kalziumsignale für die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten und damit auch für ein intaktes Immunsystem sind, wird am Beispiel des schweren kombinierten Immundefekts SCID (severe combined immunodeficiency) deutlich, bei dem ein vollständiges Fehlen der CRAC-Kanalaktivität gefunden wurde [Partiseti M et al., 1994; Le Deist F et al., 1995; Feske S et al., 2005]. Die T-Zellen der SCID-Patienten zeigen nach Stimulation über den TCR keinen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, dementsprechend keine Steigerung der Transkription und letztlich auch nicht die Ausbildung einer Immunantwort. Die Klinik des SCID äußert sich in der Manifestation schwerer, häufig systemisch verlaufender Infektionen bereits in den ersten Lebensmonaten. Die meisten Kinder mit SCID sterben bereits innerhalb des ersten Lebensjahres.

2.2 Intestinales Immunsystem und LP Lymphozyten

Das intestinale Immunsystem stellt einen der wichtigsten Teile des menschlichen Immunsystems dar. Die Schleimhautoberfläche des Gastrointestinaltraktes beträgt beim Menschen über 300 m² und ist mehr Antigenen ausgesetzt als jede andere Region des Körpers. Die Aufgabe des intestinalen Immunsystems ist es dabei, eine Unterscheidung vorzunehmen zwischen potentiell schädlichen Organismen einerseits und andererseits harmlosen Antigenen, wie Proteinen der Nahrung oder Bakterien der physiologischen Darmflora. Während gegen pathogene Keime eine wirkungsvolle Immunantwort zu initiieren ist, kann eine Überreaktion gegen nichtpathogene Antigene Ursache entzündlicher Erkrankungen sein. Aus diesem Grund zeigt das intestinale Immunsystem physiologischerweise eine Hyporeaktivität gegenüber harmlosen Darmantigenen bzw. führt die Auseinander-

setzung mit diesen Antigenen zur Induktion einer lokalen und systemischen immunologischen Toleranz [Strobel S et al., 1998].

Das intestinale Immunsystem besteht zum einen aus organisierten Strukturen, zu denen die Peyerschen Plaques (PP), die mesenterialen Lymphknoten sowie kleinere, isolierte Lymphfollikel zählen, zum anderen aus Lymphozyten, die verteilt über die Lamina propria (LP) und das Epithel vorzufinden sind. Die organisierten Strukturen zeichnen sich dabei vor allem für die Induktionsphase der Immunantwort verantwortlich, während die Lamina propria Lymphozyten und die intraepithelialen Lymphozyten vorwiegend an deren Ausführung beteiligt sein sollen [Mowat AM et al., 1997].

Welche Aufgaben die mukosalen T-Zellen dabei im einzelnen übernehmen, gilt es noch weiter aufzuklären. Dennoch konnten in Bezug auf die Lamina propria T-Lymphozyten einige besondere Eigenschaften nachgewiesen werden, aufgrund derer diesen Zellen in der Regulation der lokalen Immunantwort des intestinalen Immunsystems eine besondere Bedeutung zuzukommen scheint. So zeigen Lamina propria T-Lymphozyten nach Stimulation über den T-Zellrezeptor eine deutlich geringere Aktivierungs- und Proliferationsrate als T-Lymphozyten des peripheren Blutes (PB) [Qiao L et al., 1991]. Die Stimulierbarkeit der Lamina propria T-Lymphozyten über den akzessorischen CD2/CD28-Weg ist hingegen gesteigert [Targan SR et al., 1995]. Lamina propria T-Zellen zeigen darüber hinaus eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu Zellen aus dem peripheren Immunsystem. Sie weisen demnach eine erhöhte Bereitschaft auf, nach Aktivierung einen programmierten Zelltod einzugehen [Boirivant M et al., 1996]. Des Weiteren dominieren im gesunden Darm des Menschen von Lamina propria T-Lymphozyten gebildete antiinflammatorische Zytokine, wie IL-10 und TGF- β (transforming growth factor- β), gegenüber proinflammatorischen Zytokinen [Braunstein J et al., 1997].

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass durch das Zusammenspiel von Darminhalt, besonderen anatomischen Gegebenheiten, Zellen des Immunsystems und der Zellmatrix im Gastrointestinaltrakt ein Mikroenvironment geschaffen wird, welches die Bildung von IgA-Antikörpern (Immunglobulin, Ig) und einer T-zellabhängigen Toleranz begünstigt. In diesem Mikroenvironment gelingt es dem mukosalen Immunsystem, ein Gleichgewicht herzustellen zwischen einer effektiven Abwehr

pathogener Antigene einerseits und einer physiologischen Hyporeaktivität gegenüber harmlosen Antigenen andererseits - ein Gleichgewicht, welches die Integrität der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes gewährleistet.

2.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Unter dem Begriff der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) werden die Krankheiten Colitis ulcerosa und Morbus Crohn zusammengefasst. Die Inzidenz beträgt ca. 5/100.000/J für die Colitis ulcerosa und ca. 3/100.000/J für den Morbus Crohn. Zwischen beiden Erkrankungen bestehen einerseits deutliche Überschneidungen, z.B. hinsichtlich Manifestationsalter, Symptomatik und extraintestinaler Begleiterkrankungen, andererseits finden sich jedoch auch Unterschiede, z.B. was das makroskopische und histologische Erscheinungsbild oder das Verteilungsmuster betrifft. Die Frage, ob also zwei grundsätzlich verschiedene Krankheiten vorliegen, oder ob es sich lediglich um zwei unterschiedliche Ausprägungsformen eines zumindest im Ansatz gemeinsamen pathogenetischen Prozesses handelt, ist bis heute unbeantwortet.

Dies liegt auch daran, dass die Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen letztlich noch nicht geklärt ist. Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre weisen jedoch darauf hin, dass genetischen Faktoren, Umwelteinflüssen und bakteriellen Antigenen eine wichtige Rolle in der Genese dieser Erkrankungen zukommt [Podolsky DK, 1991, 2002]. So haben Verwandte ersten Grades eines CED-Patienten ein gegenüber der Normalbevölkerung vier- bis zwanzigfach erhöhtes Risiko, an CED zu erkranken [Orholm M et al., 1991; Tysk C et al., 1998]. Auch ist die Krankheitskonkordanz, insbesondere beim Morbus Crohn, bei eineiigen Zwillinge deutlich höher als bei zweieiigen [Tysk C et al., 1998]. Was den Einfluss von Umweltfaktoren betrifft, so sind vor allem nichtsteroidale Antiphlogistika und eine früh in der Biographie durchgeführte Appendektomie aufzuführen, die sich unter den zahlreichen untersuchten Einflussgrößen durch ihrer Beständigkeit auszeichnen. Nichtsteroidale Antiphlogistika können demnach einen Erkrankungsschub auslösen, wohingegen eine frühe Appendektomie mit einer reduzierten Inzidenz für Colitis ulcerosa

einhergeht [Evans JM et al., 1997; Andersson RE et al., 2001]. Rauchen scheint den Phenotyp zu beeinflussen, indem es vor Colitis ulcerosa schützt, das Risiko für Morbus Crohn jedoch erhöht [Lindberg E et al., 1988; Cosnes J et al., 2001]. Dass auch die luminale Bakterienflora eine Rolle in der Entstehung der CED spielen könnte, legen u.a. Tierexperimente nahe, bei denen verschiedene Mutantenstämme nur dann die Entwicklung einer „spontanen“ Colitis zeigen, wenn sie mit kommensalen Bakterien kollonisiert werden, während sie in einem keimfreien Milieu gesund bleiben [Rath HC et al., 2001]. Andere Studien konnten zeigen, dass im Kolonepithel von Patienten mit CED eine erhöhte Anzahl von intrazellulären und oberflächenadhärenten Bakterien vorzufinden ist [Darfeuille-Michaud A et al., 1998; Swidsinski A et al., 2002]. Auch der klinische Nachweis der Wirksamkeit von Breitspektrumantibiotika und Probiotika bei bestimmten Untergruppen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen.

Genetische Faktoren, Umwelteinflüsse und bakterielle Antigene, womöglich zusammen mit anderen noch nicht entdeckten Einflussgrößen, scheinen im Rahmen der Pathogenese der CED in eine gemeinsame Endstrecke zu münden. Sie führen zu einer anhaltenden Aktivierung des intestinalen Immunsystems, in deren Rahmen den T-Zellen eine u.U. tragende Rolle zukommt. Diese Aktivierung des mukosalen Immunsystems kann als Effektormechanismus die klinisch zu beobachtenden Entzündungsreaktionen der CED erklären [Holtmann M et al., 2002]. Die Frage, wie es letztlich durch die verschiedenen pathogenetischen Faktoren zu einer anhaltenden Aktivierung des physiologischerweise hypo-reaktiven intestinalen Immunsystems kommt, gilt es jedoch noch zu beantworten.

2.4 Tiermodelle chronisch entzündlicher Darm- erkrankungen

Zahlreiche Erkenntnisse in Bezug auf Physiologie und Pathophysiologie des intestinalen Immunsystems, welche in den letzten Jahren gewonnen wurden, sind auf die Entwicklung von Tiermodellen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen zurückzuführen [Elson CO et al., 1995; Strober W et al., 1998]. Die Ansätze

dieser Modelle sind heterogen. So können z.B. Modelle mit spontanen oder induzierbaren Kolitiden, immunologisch gesunden oder immunkompromittierten Tieren unterschieden werden [Hibi T et al., 2002]. Trotz dieser Heterogenität münden jedoch viele der Tiermodelle in einen gemeinsamen Phenotyp: eine Entzündungsreaktion der Schleimhaut vermittelt durch T-Zellen, die durch bakterielle Antigene in der Schleimhaut aktiviert werden [Wirtz S et al., 2000]. Dies erinnert an die für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beim Menschen beschriebene Situation, bei denen viele verschiedene pathogenetische Faktoren in eine womöglich T-zellvermittelte anhaltende Aktivierung des mukosalen Immunsystems als gemeinsame Endstrecke der Pathogenese zu münden scheinen.

Auch wenn durch die Entwicklung der Tiermodelle wesentliche Fortschritte beim Verständnis der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erzielt werden konnten, bleibt jedoch festzuhalten, dass keines der aktuell zu Verfügung stehenden Modelle in allen Aspekten den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beim Menschen entspricht. So findet sich z.B. in keinem Tiermodell ein wirklich chronischer Verlauf mit akuten Krankheitsschüben wieder, und auch die extraintestinalen Manifestationen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen werden im Modell noch nicht wie beim Menschen abgebildet [Wirtz S et al., 2000]. Einerseits spiegeln die Tiermodelle also nicht die Komplexität der Erkrankung beim Menschen wider und können Untersuchungen mit Proben von Patienten nicht ersetzen, andererseits stellen sie jedoch reproduzierbare in vivo Systeme dar, an denen verschiedene Krankheitsaspekte sehr genau untersucht werden können. Vor allem aber auch für die Entwicklung und Erprobung neuer therapeutischer Strategien kommt den Tiermodellen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eine entscheidende Bedeutung zu.

2.5 Fragestellungen

Wenn also erstens Kalziumsignale für die Aktivierung von T-Lymphozyten so wichtig sind, zweitens Lamina propria T-Zellen für die Regulation des intestinalen Immunsystems eine entscheidende Rolle spielen und sich drittens das intestinale

Immunsystem physiologischerweise durch eine Hypoaktivität auszeichnet, welche im Falle der CED pathologisch gesteigert ist, so stellt sich die Frage: Gibt es eine Korrelation zwischen den in Lamina propria T-Lymphozyten messbaren Kalziumsignalen und dem Aktivitätszustand des mukosalen Immunsystems, aus dem die untersuchten Lamina propria Lymphozyten stammen? Da diese Frage bisher nur an dissoziierten Zellen untersucht wurde, ein intakter Gewebeverband bzw. das Mikroenvironment für die Funktion des intestinalen Immunsystems jedoch eine wichtige Rolle spielen, ergaben sich für die vorliegende Promotionsarbeit folgende Aufgabenstellungen:

- Entwicklung einer Methode zur Messung der Kalziumsignale in identifizierten T-Lymphozyten in der intakten Lamina propria in Gewebeproben von Menschen mit und ohne CED mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie.
- Anwendung der Methode und Vergleich der Kalziumsignale von LP T-Lymphozyten und PB T-Lymphozyten vom Menschen.
- Entwicklung einer Methode zur Messung der Kalziumsignale in identifizierten PB T-Lymphozyten, dissoziierten Darm T-Lymphozyten sowie gewebständigen LP T-Lymphozyten der Maus.
- Anwendung der Methode und Vergleich der Kalziumsignale von dissoziierten Darm T-Lymphozyten und PB T-Lymphozyten der Maus.

3. Material und Methodik

3.1 Isolierung humaner Zellen

Alle Experimente mit menschlichem Untersuchungsmaterial sind von der Ethikkommission des Saarlandes begutachtet und genehmigt worden. Für die Experimente mit menschlichen Biopsien wurden nur Gewebeproben verwendet, die nicht für die feingewebliche pathologische Untersuchung benötigt wurden.

3.1.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Die Isolierung von PB Lymphozyten wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation aus heparinisiertem venösem Blut durchgeführt. Die Blutentnahme erfolgte aus den venösen Gefäßen im Bereich der Ellenbeuge (V. cephalica, V. basilica und deren Seitenäste). Anschließend wurden 10 ml Blut in ein 50 ml Tube überführt, mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt und mit 14 ml Ficoll-Paque Plus unterschichtet. Die Zentrifugation erfolgte mit 2100 U/min, Beschleunigung/Bremse 2, für 20 min bei Raumtemperatur (Zentrifuge: Hettich Universal 32 R). Der Interphasenring mit den Lymphozyten wurde abgenommen (ca. 5 ml) und zweimal in ca. 30 ml RPMI-Medium gewaschen. Die Zellzählung erfolgte in der Neubauerkammer, wobei der Zusatz von Trypanblau der Markierung nicht vitaler Zellen diene. Die so gewonnenen Zellen wurden für die weitere Verwendung in RPMI-Medium (37°C, 5% CO₂) aufbewahrt.

3.1.2 Präparation von Biopsien aus Kolon und Rektum zur Untersuchung gewebsständiger LP Lymphozyten

Die Mukosabiopsien wurden im Rahmen endoskopischer Untersuchungen von Kolon und Rektum entnommen und dreimal in HBSS gewaschen. Um die Entfernung des Epithels zu erleichtern, wurde die zum Darmlumen weisende Seite

der Biopsien mit einem Skalpell unter dem Mikroskop an zwei bis drei Stellen oberflächlich eingeritzt und die Biopsien anschließend in EDTA-DTT-Lösung 1-2 h bei 37°C mit 250 U/min geschüttelt (Schüttler: GFL 3005). Danach wurden die Biopsien in RPMI-Medium überführt. Verbliebener Schleim und größere Epithelreste wurden durch Scherkräfte entfernt, wozu die Biopsien mehrmals in eine Pipette hineingesaugt bzw. aus dieser herausgespült wurden. Im Weiteren wird dieser Reinigungsvorgang als „purgen“ bezeichnet werden (etw. reinigen, englisch to purge). Hiernach noch vorhandene kleinere Epithelreste wurden mit Pinzette und Skalpell unter dem Mikroskop abgelöst. Nach ausreichender Entfernung des Epithels wurden aus den Biopsien mit dem Skalpell Gewebstücke zurechtgeschnitten, welche in die Messkammer passten.

Die Kalziummessungen in gewebständigen LP T-Zellen wurden immer noch am Tag der Biopsieentnahme durchgeführt. Um den Zeitraum zwischen Biopsieentnahme und Versuchsbeginn so kurz wie möglich zu halten, wurde unmittelbar im Anschluss an die Präparation mit der Färbung der Gewebeprobe für das erste Imagingexperiment eines Tages begonnen (s. Kapitel 3.6).

3.2 Isolierung muriner Zellen

3.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Die Blutentnahme zur Isolierung mononukleärer Zellen der Maus erfolgte aus dem retrobulbären Venenplexus. Die Versuchstiere (Balb/c Mäuse, weiblich, 12 Wochen, Gewicht 18-24 g) wurden hierfür durch peritoneale Injektion einer Avertin-Lösung (Avertin-Gebrauchslösung, 25 µl/gKG) narkotisiert. Zur Blutentnahme wurden die Halsgefäße mit Daumen und Zeigefinger gestaut und eine heparinisierte Glaskapillare am nasalen Augenwinkel in Richtung auf das gegenüberliegende Kiefergelenk bis zum Erreichen der knöchernen Orbita eingeführt. Hierauf wurde die Kapillare geringfügig zurückgezogen und die Stauung der Halsgefäße gelockert. Das austretende Blut wurde in einem Eppendorfhütchen mit Heparin (50 µl) aufgefangen. Die gewonnene Blutmenge

betrug ca. 700-800 μ l/Versuchstier. Nach erfolgter Blutentnahme wurden die narkotisierten Versuchstiere durch Genickbruch getötet.

Das frische Heparinblut wurde anschließend in ein 5 ml Tube überführt, 1:1 mit PBS verdünnt und mit 1,5 ml Ficoll-Paque Plus unterschichtet. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte mit 2100 U/min, Beschleunigung/Bremse 2, für 20 min bei Raumtemperatur (Zentrifuge: Hettich Universal 32 R). Der Interphasenring mit den Lymphozyten wurde abgenommen (ca. 0,5 ml) und einmal in 5 ml RPMI-Medium gewaschen. Die Zellzählung erfolgte in der Neubauerkammer, wobei der Zusatz von Trypanblau der Markierung nicht vitaler Zellen diente. Die so gewonnenen Zellen wurden für die weitere Verwendung in RPMI-Medium (37°C, 5% CO₂) aufbewahrt.

3.2.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus Darmresektat

Die Versuchstiere (Balb/c Mäuse, weiblich, 12 Wochen, Gewicht 18-24 g) wurden nach Narkotisierung mit Kohlendioxid durch Genickbruch getötet. Nach Eröffnung des Abdomens erfolgte die Resektion des Darmes, wobei der orale Schnitt distal des ileozökalen Übergangs, der aborale oberhalb des Analkanals gesetzt wurde. Zur Weiterverarbeitung wurde das Darmresektat in RPMI-Medium gegeben. Bindegewebsreste und Fettanhängsel wurden entfernt, das Resektat der Länge nach eröffnet und durch Abspülen mit RPMI-Medium vom Darminhalt befreit. Das gereinigte Darmresektat wurde in ca. 5-10 mm² große Stücke geschnitten, nochmals in RPMI-Medium gewaschen und anschließend in der EDTA-DTT-Lösung 15 min bei 37°C mit 250 U/min geschüttelt (Schüttler: GFL 3005). Danach wurden die Darmstückchen in 30 ml Collagenasemedium überführt, 90 min bei 37°C mit 250 U/min geschüttelt (Schüttler: GFL 3005) und dann mit einer Glaspipette gepurged. Der Überstand des Collagenasemediums wurde abgenommen, mit 1200 U/min für 7 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge: Hettich Universal 30 F), das Pellet in 15 ml DNase-Medium aufgenommen und zweimal filtriert (100 μ m- bzw. 70 μ m-Filter). Parallel dazu wurden die Darmstücke in 30 ml DNase-Medium für weitere 30 min bei 37°C mit 250 U/min auf den Schüttler (Schüttler: GFL 3005) gegeben und anschließend

erneut gepurged. Mit dem Überstand des DNase-Mediums wurde wie mit dem Überstand des Collagenasemediums verfahren. Nach Zusammenführen der filtrierten Lösungen wurden diese mit 1200 U/min für 7 min bei Raumtemperatur, zentrifugiert (Zentrifuge: Hettich Universal 30 F), das Pellet zur Dichtegradientenzentrifugation in 5 ml 40%iges Percoll aufgenommen und mit 5 ml 100%igem Percoll unterschichtet. Die Gradientenzentrifugation erfolgte mit 2100 U/min, Beschleunigung/Bremse 2, für 20 min bei Raumtemperatur (Zentrifuge: Hettich Universal 32 R). Der Interphasenring mit den Lymphozyten wurde abgenommen (ca. 2 ml) und einmal in 10 ml RPMI-Medium gewaschen. Die Zellzählung erfolgte in der Neubauerkammer, wobei der Zusatz von Trypanblau der Markierung nicht vitaler Zellen diente. Die so gewonnenen Zellen wurden für die weitere Verwendung in RPMI-Medium (37°C, 5% CO₂) aufbewahrt.

3.2.3 Präparation von Darmresektaten zur Untersuchung gewebständiger LP Lymphozyten

Die Entnahme, Eröffnung und Reinigung des Darmresektats erfolgte, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Das gereinigte Resektat wurde in ca. 8-16 mm² große Stücke geschnitten und die Gewebstücke anschließend in EDTA-DTT-Lösung 30 min bei Raumtemperatur mit 250 U/min geschüttelt (Schüttler: GFL 3005). Danach wurden die Resektatstücke in RPMI-Medium überführt. Verbleibender Schleim und Epithelreste wurden wie bei der Präparation der humanen Biopsien durch Scherkräfte bzw. unter dem Mikroskop mit Pinzette und Skalpell abgelöst. Insgesamt gestaltete sich die Entfernung des Epithels bei den Darmresektaten der Maus leichter als bei den Biopsien vom Menschen. Zuletzt wurden aus den Resektatstücken mit dem Skalpell Gewebeproben zurechtgeschnitten, welche in die Messkammer passten.

Um den Zeitraum zwischen Darmentnahme und Versuchsbeginn so kurz wie möglich zu halten, wurde unmittelbar im Anschluss an die Präparation mit der Färbung der Gewebeprobe für das erste Imagingexperiment eines Tages begonnen (s. Kapitel 3.6).

3.3 Zwei-Photonen-Mikroskopie

Die konventionelle Lichtmikroskopie stößt bei der Untersuchung von Vorgängen im Inneren eines Gewebes an ihre Grenze, da die vielfache Streuung und Brechung des Lichts an den unterschiedlichen Strukturen eines Gewebes das Auflösungsvermögen und den Kontrast erheblich verringern. Für die Untersuchung von Gewebeproben werden daher vor allem die Verfahren der konfokalen Mikroskopie und der Zwei-Photonen-Mikroskopie verwendet (s. Abbildung 2). Mit beiden Methoden ist es möglich, die Detektion von Emissionssignalen außerhalb der Fokusebene zu minimieren und dadurch eine Art optischen Schnitt durch eine Gewebeprobe zu führen. Auf diese Weise gelingt es, Vorgänge in Gewebeproben zu untersuchen, ohne diese tatsächlich zerschneiden zu müssen. Bei der konfokalen Mikroskopie wird dies dadurch erreicht, dass Fluoreszenzlicht, welches nicht aus der Fokusebene stammt, durch eine Blende weitestgehend ausgeblendet wird. Das Ausblenden von Fluoreszenzsignalen außerhalb der Fokusebene bedeutet jedoch auch, dass bei der konfokalen Mikroskopie nur die Fluoreszenz einer geringen Menge aller angeregten Moleküle genutzt wird, das ganze Präparat also ausbleicht und photochemisch geschädigt wird, während sich der Informationsgewinn auf eine dünne Schicht der Probe beschränkt.

Grundlage der Zwei-Photonen-Mikroskopie ist der Prozess der Zwei-Photonen-Absorption, welcher bereits 1931 durch Goeppert-Mayer theoretisch vorhergesagt wurde und 30 Jahre später durch die Entwicklung der Lasertechnologie experimentell nachgewiesen werden konnte. Unter Zwei-Photonen-Absorption versteht man dabei den Vorgang, dass ein Fluoreszenzmolekül durch die „gleichzeitige“ (innerhalb von 10^{-18} sec stattfindende) Absorption zweier Photonen in denselben Anregungszustand versetzt werden kann wie durch die Absorption eines einzelnen Photons mit der doppelten Energie. Hieraus ergeben sich eine Reihe von Vorteilen für die Zwei-Photonen-Mikroskopie.

Durch die Verwendung von im Vergleich zur Ein-Photonen-Mikroskopie energieärmerem Licht wird das zu untersuchende Gewebe geschont. Da sich Energie und Wellenlänge des Lichts umgekehrt proportional zueinander verhalten, ist das bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie benutzte Licht langwelliger und wird als solches im Gewebe weniger stark gestreut. Dies erlaubt die Abbildung tiefer

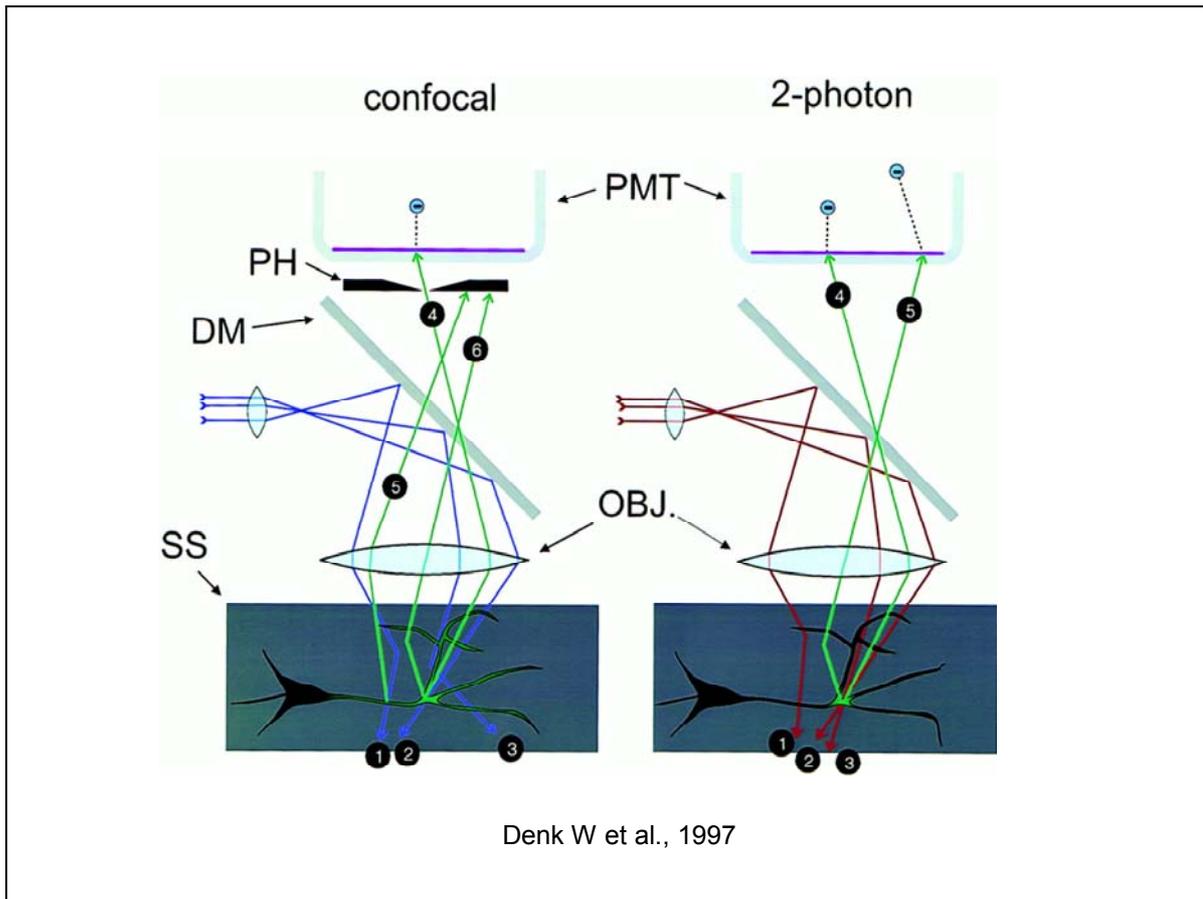


Abbildung 2: Vergleich der konfokalen Mikroskopie mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie.

Bei beiden Verfahren wird das Anregungslicht von einem Laser erzeugt. Über einen dichroischen Spiegel (DM) und eine Objektivlinse (OBJ.) erfolgt die Fokussierung auf die Probe (SS). Das Emissionslicht wird von einem Photodetektor registriert und das Signal von einem Photomultiplier (PMT) verstärkt. Bei der konfokalen Mikroskopie wird Fluoreszenzlicht, welches nicht aus der Fokusebene stammt, durch eine Blende ausgeblendet (PH). Dies ist bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie nicht notwendig. Nur in der Fokusebene ist die Photonendichte hoch genug, um die für die Anregung eines Farbstoffmoleküls benötigte zeitgleiche Absorption zweier Photonen zu gewährleisten. Sämtliches Fluoreszenzlicht aus der Probe kann daher der Fokusebene zugeordnet und detektiert werden.

liegender Gewebeschichten. Das benötigte zeitgleiche Eintreten der Absorption zweier Photonen hat zur Folge, dass die resultierende Fluoreszenzemission abhängig vom Quadrat der Anregungsenergie ist. Eine ausreichend hohe Photonendichte, um eine nennenswerte Zwei-Photonen-Absorption zu erzielen, wird dabei nur in dem Punkt erreicht, auf den der Laser durch den optischen

Apparat des Mikroskops fokussiert wird. Auf diese Weise werden Bleicheffekte außerhalb der Fokusebene und Überlagerungsphänomene minimiert. In der Praxis wird das Auftreten der Zwei-Photonen-Absorption nicht nur durch eine räumliche Fokussierung der Photonen durch die Optik des Mikroskops erreicht, sondern auch durch eine zeitliche Konzentrierung der Photonen durch die Verwendung eines gepulsten Lasers. Da die Dauer eines Laserpulses gemessen an der Zeit zwischen den Pulsen sehr kurz ist, können die notwendigen Anregungsintensitäten mit einer durchschnittlichen Inputleistung erzeugt werden, welche nur geringfügig größer ist als die bei der konfokalen Mikroskopie.

3.4 Kalziummessung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Durch die Messung der Fluoreszenz von Indikatorfarbstoffen ist es möglich, die Kalziumkonzentration in lebenden Zellen zu bestimmen. Der in allen mit dem Zwei-Photonen-Mikroskop durchgeführten Experimenten dieser Arbeit verwendete Farbstoff war Indo-1/AM. Bei den Versuchen mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop, welche im Rahmen der Validierung der Zwei-Photonen-Kalziumimagingmethode vorgenommen wurden, diente Fura-2/AM als Farbstoff. Im Folgenden sollen einige grundlegende Dinge zur Kalziummessung mit Fluoreszenzfarbstoffen im Allgemeinen sowie zu Fura-2 und Indo-1 im Besonderen dargestellt werden.

Entwickelt wurden die Kalziumindikatoren Fura-2 und Indo-1 in den 1980er Jahren von Tsien [Grynkiewicz G et al., 1985]. Beide Farbstoffe weisen negative Ladungen auf, an die Kalzium gebunden werden kann. Die Anbindung des Liganden führt dabei zu einer Veränderung der optischen Eigenschaften der Indikatoren. Im Falle von Fura-2 ändert sich vor allem das Anregungsspektrum, wobei das Anregungsmaximum der kalziumfreien Form bei einer Wellenlänge von 380 nm, das der kalziumgesättigten Form bei 340 nm liegt. Bei Indo-1 unterscheiden sich kalziumfreie und kalziumgesättigte Form dagegen weniger hinsichtlich der Absorptionsspektren, sondern vielmehr hinsichtlich der Emissionsspektren. Das Emissionsmaximum für kalziumfreies Indo-1 befindet sich bei 485 nm, für mit Kalzium beladenes Indo-1 bei 405 nm (s. Abbildung 3 und 4).

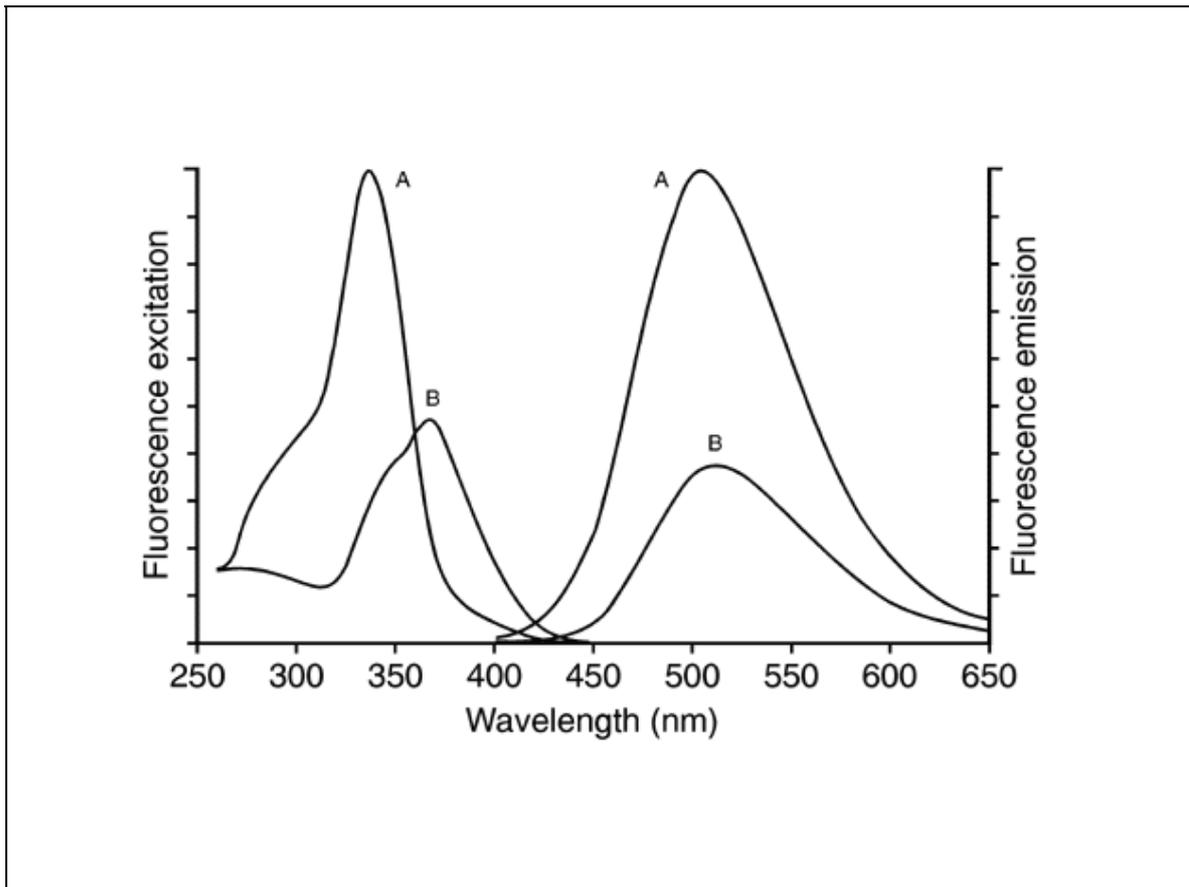


Abbildung 3: Fluoreszenzspektren der Exzitation (Detektion bei 510 nm) und der Emission (Anregung bei 340 nm) von kalziumgesättigtem (A) und kalziumfreiem (B) Fura-2 (pH 7.2).

Diese optischen Eigenschaften der Farbstoffe ermöglichen es, Ratiomessungen von Kalziumkonzentrationen durchzuführen. Im Falle von Fura-2 werden hierfür nach Anregung mit zwei unterschiedlichen Anregungswellenlängen die Emissionsintensitäten der Farbstoffmoleküle bei einer Emissionswellenlänge gemessen und zueinander ins Verhältnis (Ratio) gesetzt. Für die Anregung des Fura-2 sind dabei Wellenlängen zu wählen, bei denen sich kalziumfreie und kalziumgesättigte Form des Fluoreszenzfarbstoffs hinsichtlich der Exzitabilität gegensätzlich zueinander verhalten. In den mit Fura-2 durchgeführten Experimenten dieser Arbeit wurden als Anregungswellenlängen die Anregungsmaxima von 340 nm bzw. 380 nm gewählt und das aus den Emissionssignalen bei diesen Wellenlängen gebildete Ratio 340/380 für die Berechnung der Kalziumkonzentration verwendet.

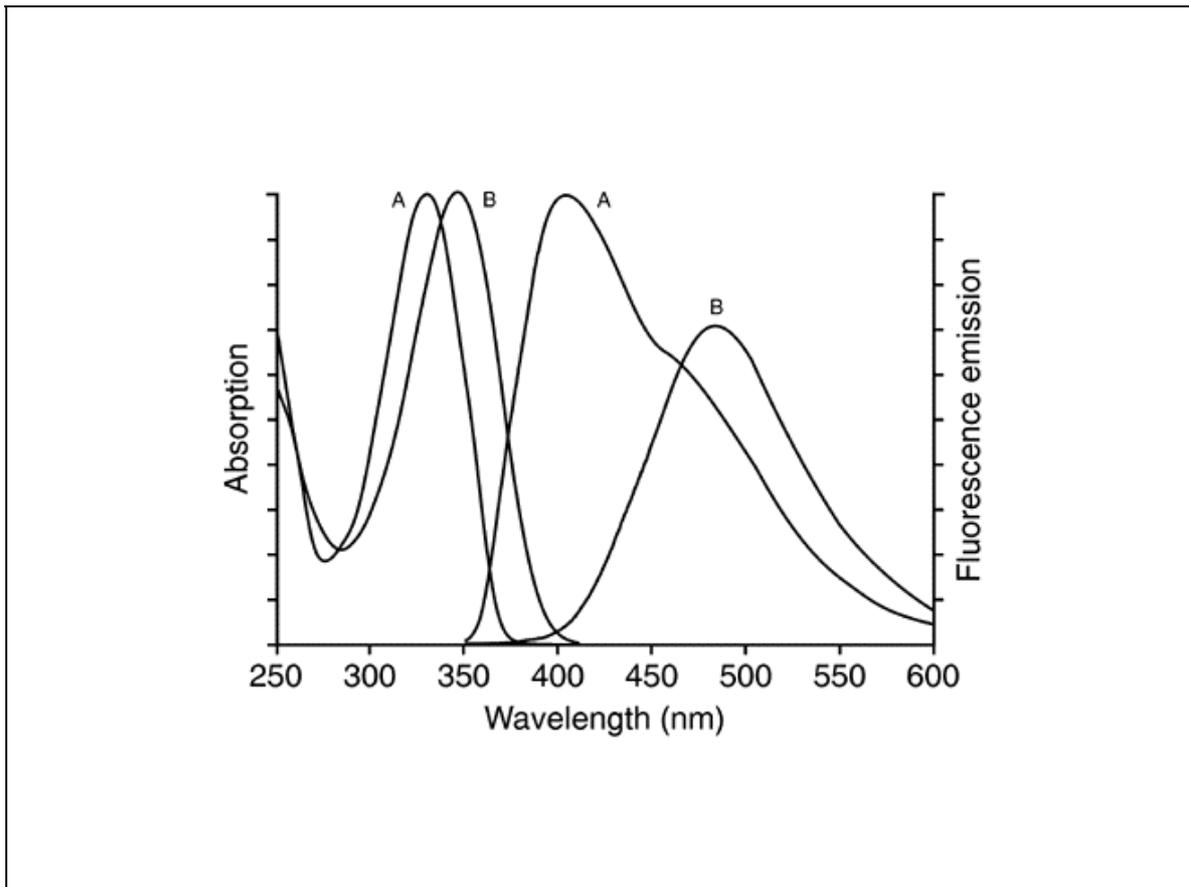


Abbildung 4: Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektrum (Anregung bei 338 nm) von kalziumgesättigtem (A) und kalziumfreiem (B) Indo-1 (pH 7.2).

Bei den Ratiomessungen mit Indo-1 erfolgt die Anregung mit Licht einer Wellenlänge. Für die Ratiobildung werden die Emissionssignale durch Spiegel und Filtersätze so auf die zwei Kanäle eines Detektors aufgeteilt, dass auf dem einen Kanal das Emissionsmaximum für die kalziumfreie Form des Indo-1 (485 nm), auf dem anderen Kanal das Emissionsmaximum für die kalziumgesättigte Form des Indo-1 (405 nm) abgebildet wird. Zur Berechnung der Kalziumkonzentration dient entsprechend des Ratio 405/485. Bezüglich der in dieser Arbeit verwendeten Filtersätze wird auf das Kapitel 3.5 verwiesen.

Die Berechnung der Kalziumkonzentrationen aus den Ratiowerten erfolgt mit Hilfe folgender Gleichung [Grynkiewicz G et al., 1985]:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d Q (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

R steht für das Fluoreszenzintensitätsratio ($F_{\lambda 1}/F_{\lambda 2}$) gemessen zum jeweils betrachteten Zeitpunkt eines Experiments. R_{\min} entspricht dem Ratio des vollständig kalziumfreien Indikators, R_{\max} dem Ratio der kalziumgesättigten Form des Farbstoffs. K_d ist die effektive Dissoziationskonstante des Indikators. Q ergibt sich aus dem Ratio F_{\min}/F_{\max} gemessen bei $\lambda 2$, wobei F_{\min} die Fluoreszenzintensität unter kalziumfreien Bedingungen und F_{\max} die Fluoreszenzintensität unter kalziumgesättigten Bedingungen ist. Für die Bestimmung der einzelnen Werte sind Kalibrationsexperimente mit dem jeweiligen Farbstoff durchzuführen. Die Verwendung eines Fluoreszenzintensitätsratios zur Bestimmung von Kalziumkonzentrationen hat den Vorteil, dass Faktoren wie die Farbstoffverteilung im Untersuchungsmaterial oder das Photobleaching als Einflussgrößen auf die Messergebnisse minimiert werden, da diese Faktoren beide Werte des Ratios gleichermaßen beeinflussen sollten.

Wie einleitend erwähnt, wurden für die Experimente dieser Arbeit ausschließlich die Fluoreszenzfarbstoffe Indo-1/AM und Fura-2/AM verwendet. Der Zusatz AM bedeutet, dass es sich um Azetoxymethylesterderivate der Fluoreszenzindikatoren handelt. Durch die Modifikation der Carbonsäuregruppen der Fluoreszenzfarbstoffe mit den Azetoxymethylestergruppen entstehen ungeladene, lipophile Moleküle, die über die Plasmamembran der Zellen diffundieren können. Im Zytosol der Zellen werden die Azetoxymethylestergruppen durch unspezifische Esterase vom eigentlichen Farbstoffmolekül abgespalten. Hierdurch werden die Carboxylatgruppen wieder frei. Diese sind zum einen essentiell für die Bindung des Zielions an das Indikatormolekül, zum anderen erhöhen sie die Polarität des Farbstoffs, so dass dieser nur sehr viel langsamer als die AM-Form wieder aus der Zelle hindurchdiffundieren kann.

3.5 Der Zwei-Photonen-Messplatz

Der Zwei-Photonen-Messplatz, an dem die Experimente der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, war mit folgenden Geräten ausgestattet: Der Pumplaser Coherent Verdi V-5 ist ein solid-state, diode-pumped, frequency-doubled Neodymium:Vanadate (Nd:YVO₄) Laser, der grünes Licht mit einer Wellenlänge

von 532 nm auf einem Leistungsniveau von über 5 Watt erzeugt. Als Zwei-Photonen-Laser diente der Coherent Mira 900-F, ein ultraschneller im modelocked Modus arbeitender Laser mit einem Titan:Saphire-Kristall als Gainmedium und einem Output von 700-1000 nm. Die Einstellung der für die Experimente gewünschten Wellenlängen erfolgte manuell und wurde mit Hilfe des Programms Aventes Spectrawin-Full (Version 4.2) kontrolliert. Als Scaneinheit stand die galvanometrische TILL Photonics Yanus Einheit zur Verfügung. Zwei Photomultiplier erlaubten die gleichzeitige Signalaufnahme auf zwei Kanälen während des Scanprozesses.

Als Mikroskop diente ein aufrechtes Olympus BX50WI Mikroskop mit einem Wasserimmersionsobjektiv (60x/0.90W). Entsprechend den Emissionsmaxima von Indo-1 (405 nm für die kalziumgesättigte Form, 485 nm für die kalziumfreie Form des Indikators) wurden die Emissionssignale durch einen dichroischen Langpassspiegel (DCLP 440) auf die zwei Kanäle des Photomultipliers aufgeteilt. Um Streulicht und Hintergrundsignale zu minimieren, wurde zwischen dichroischem Spiegel und Photomultiplier jeweils noch ein Bandpassfilter angebracht (Kanal 1: BP 480/40, Kanal 2: BP 405/30). Die Identifizierung der Lymphozyten (s. Kapitel 3.6 und 4.1.1) erfolgte mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper. Gemäß den Spektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein-5-Isothiocyanat (FITC) und R-Phycoerythrin (R-PE) wurde hierbei folgender Filtersatz verwendet: ein dichroischer Langpassspiegel (DCLP 565), dem auf Kanal 1 ein Bandpassfilter (BP 610/70) bzw. auf Kanal 2 ein Langpassfilter (LP 500) nachgeschaltet war.

Die Steuerung des Messplatzes und die Erfassung der gemessenen Daten erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms Olympus Fluoview (Version 3.0) sowie durch einen handelsüblichen PC und den Olympus FV5-PSU Scan Ace als Hardwarekomponenten.

3.6 Zur Durchführung der Experimente

In diesem Kapitel sollen einzelne Arbeitsschritte beschrieben werden, welche sich an die Isolierung der dissoziierten Zellen bzw. die Präparation der Biopsien anschlossen und im Rahmen der Vorbereitung bzw. Durchführung der Kalzium-

imagingexperimente mit der Zwei-Photonen-Technologie vorgenommen wurden. Eine ausführlichere Besprechung der Kalziummessungen selbst sowie der hierbei erhaltenen Konzentrationskurven erfolgt im Ergebnisteil dieser Arbeit. Die im Rahmen der Validierung der Zwei-Photonen-Kalziumimagingmethode vorgenommenen Versuche mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop wurden wie von Schwarz et al. beschrieben durchgeführt [Schwarz A et al., 2004].

Beladung des Untersuchungsmaterials mit Fluoreszenzfarbstoff: Zur Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration in dissoziierten Zellen wurden diese für 20 min bei Raumtemperatur in 1 μ M Indo-1/AM in RPMI-Medium (mit 10 mM HEPES) inkubiert und anschließend einmal mit RPMI-Medium gewaschen (Zentrifuge: Eppendorf 5415 R). Die Beladung der Biopsien bzw. Resektatstücke erfolgte über 1.5 bis 2 h bei 37°C in 25 μ M Indo-1/AM in RPMI-Medium (mit 10 mM HEPES). Anschließend wurden die Gewebeproben einmal mit RPMI-Medium gewaschen.

Bestückung der Messkammer mit Untersuchungsmaterial: Für alle Experimente wurde eine selbstgebaute Sandwich-Kammer aus Plexiglas mit einem Volumen von ca. 200 μ l verwendet. Die Kammer verfügte über einen Zu- und einen Ablauf, wobei dem Ablaufbecken ein Auffangbecken vorgeschaltet war. Die Lösungswechsel wurden manuell mit einer Perfusionsgeschwindigkeit von ca. 100 μ l/sec durchgeführt. Für den Boden der Kammer wurden 24x32 mm große rechteckige Deckgläser verwendet, auf welchen die Untersuchungsmaterialien platziert werden konnten, für die Kammerdecke runde Deckgläser mit einem Durchmesser von 18 mm.

Für Versuche mit dissoziierten Zellen wurde das Bodendeckglas mit Polyornithin (0.1 mg/ml, 30 min) beschichtet. Anschließend wurden die mit Indo-1/AM beladenen Zellen auf dem Deckglas ausplattiert und für 15 min absetzen gelassen. Das so präparierte Deckglas wurde mit Hilfe von Silikonfett als Dichtungs- und Haftmaterial in die Sandwichkammer eingebaut. Bei Versuchen mit Gewebeproben erfolgte zuerst der Einbau des Bodendeckglases in die Messkammer. Dann wurde die Probe mit der zum Darmlumen weisenden Seite nach oben auf dem Kammerboden platziert und mittels eines Grids (ein über einen Platinrahmen gespanntes Nylonnetz) fixiert. Nach der Bestückung mit dem Untersuchungsmaterial wurde die Kammer verschlossen, indem das runde Deckglas für die Kammerdecke mit Silikonfett angebracht wurde.

Stimulation der Lymphozyten: Ziel aller Experimente dieser Arbeit war die Untersuchung intrazellulärer Kalziumsignale in T-Lymphozyten, welche nach Stimulation der Zellen durch einen Kalziumeinstrom über die CRAC-Kanäle der Plasmamembran generiert werden (s. auch Kapitel 2.1). Die Aktivierung der CRAC-Kanäle erfolgt dabei durch die Entleerung des endoplasmatischen Retikulums [Putney JW et al., 1990; Lewis RS, 2001; Penner R et al., 2004; Quintana A et al., 2005]. Dies kann auf unterschiedliche Art und Weise herbeigeführt werden. Eine aktive Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum wird durch IP_3 initiiert, welches nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors gebildet wird. Eine passive Entleerung der Kalziumspeicher des endoplasmatischen Retikulums erfolgt hingegen nach Applikation von Thapsigargin. Diese Wirkung des Thapsigargin beruht auf einer Hemmung der SERCA. Die SERCA sind in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert und pumpen Kalzium, welches über einen konstitutiven Ausstromweg langsam aber beständig aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol leckt, wieder in das endoplasmatische Retikulum zurück. Eine Hemmung der SERCA zieht dementsprechend eine Entleerung der Kalziumspeicher nach sich.

Thapsigargin (1 μ M, Stock 1 mM in DMSO) wurde in allen Experimenten dieser Arbeit für die Stimulation der Lymphozyten verwendet. Die erste Applikation von Thapsigargin und damit die eigentliche Stimulation erfolgte mit der Gabe der 0Ca/1TG-Lösung 100 sec nach Beginn der Aufzeichnung der Messdaten. Auch alle anderen Lösungen, die im weiteren Verlauf eines Experimentes verwendet wurden, enthielten 1 μ M Thapsigargin, um mögliche durch ein Absinken der Thapsigarginkonzentration erzeugte Effekte auszuschließen.

Erfassung der Fluoreszenzintensität: Der zeitliche Abstand zwischen den Aufnahmen des Untersuchungsmaterials betrug bei Experimenten mit nur einer Bildebene in der Regel 5 sec, ansonsten 10 sec. Die Auflösung der Bilder lag bei 512x512 Pixel. Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes Indo-1 zur ratiometrischen Erfassung der intrazellulären Kalziumkonzentration erfolgte durch den Zwei-Photonen-Laser mit einer Wellenlänge von 720 nm.

Identifizierung der Lymphozyten: Die Identifizierung der Lymphozyten erfolgte mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen T-Zell-Oberflächenmarker im Anschluss an die Kalziumimagingexperimente. Mit dem für diese Arbeit

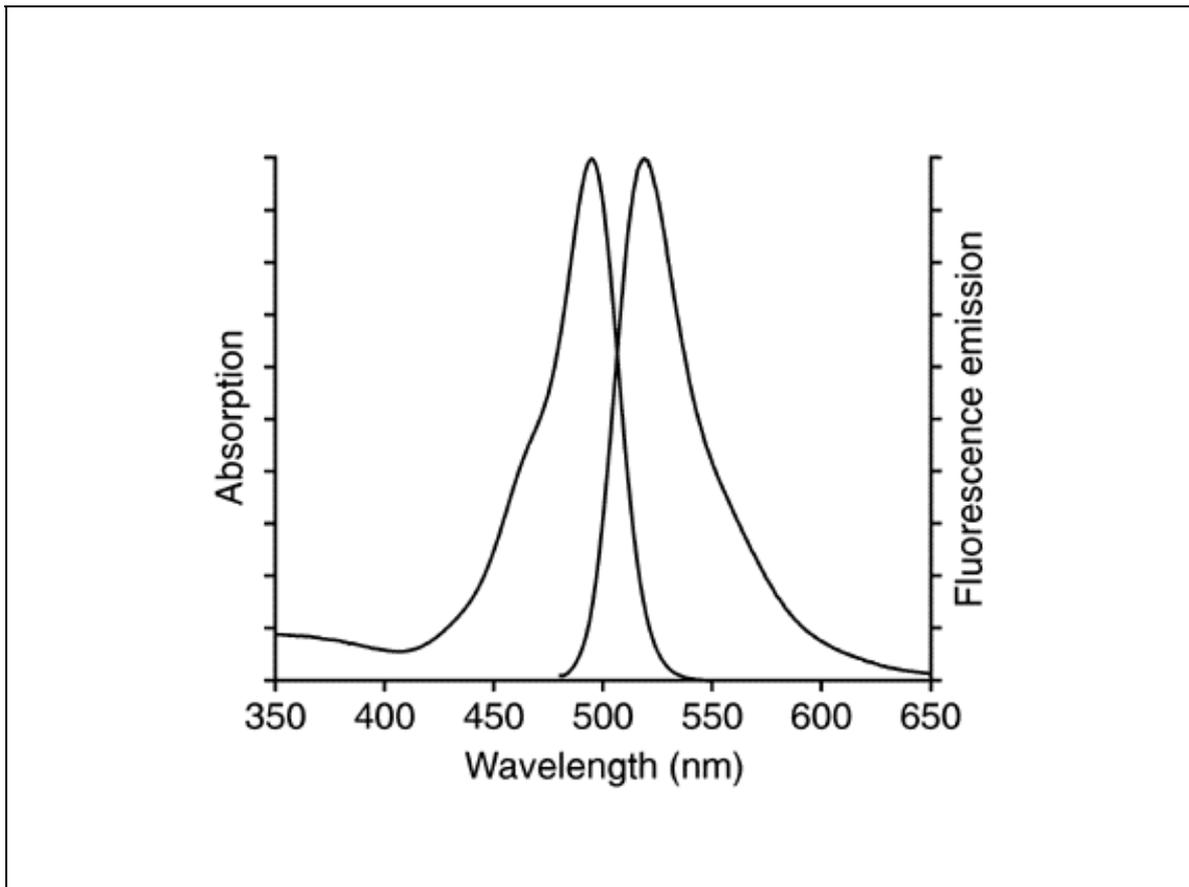


Abbildung 5: Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektrum eines mit Fluorescein-5-Isothiocyanat-konjugierten Ziegen anti-Maus IgG-Antikörpers (pH 8.0).

eingesetzten optischen Gerät war es dabei möglich, die Fluoreszenzsignale zweier unterschiedlich markierter Antikörper parallel zu erfassen (s. Kapitel 3.5). Die Spektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe FITC und R-PE sind den Abbildungen 5 und 6 zu entnehmen. Für die Exzitation dieser Farbstoffe wurde der Laser manuell auf eine Wellenlänge von 920 nm eingestellt.

Die zur Identifizierung der Lymphozyten benutzten Antikörper richteten sich sowohl bei den Experimenten mit Untersuchungsmaterial vom Menschen als auch bei den Versuchen mit Untersuchungsmaterial der Maus gegen die Oberflächenmarker CD3 und CD4. Als CD3 bezeichnet man vier invariante Proteine (zwei ϵ -, eine δ - und eine γ -Kette), die zusammen mit der ζ -Kette und den hochvariablen TCR α - und TCR β -Ketten den funktionstüchtigen TCR-Komplex bilden. Der Oberflächenmarker CD3 befindet sich auf allen T-Zellen. Das CD4-

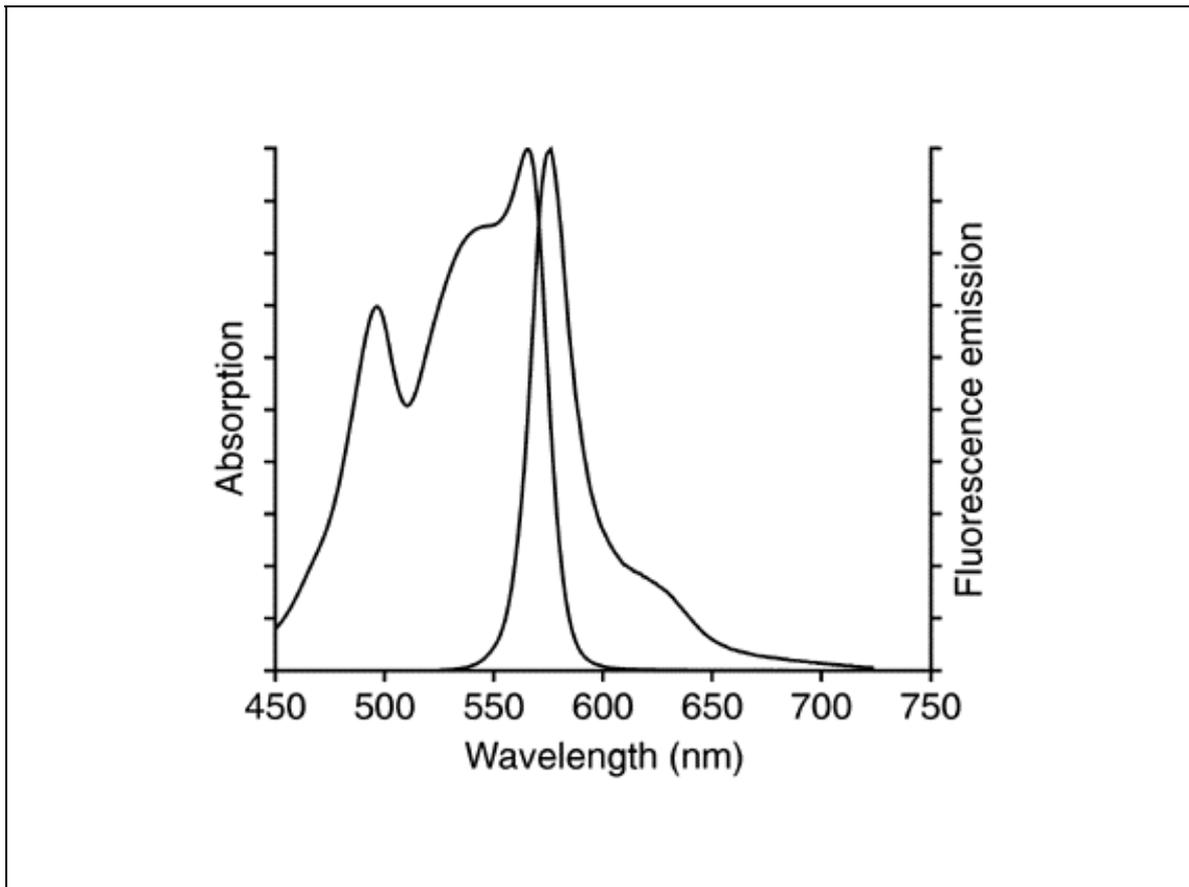


Abbildung 6: Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektrum von R-Phycoerythrin (pH 7.5).

Molekül, welches vier immunglobulinartige Domänen enthält, ist ein Co-Rezeptor für die MHC-Klasse-II-Moleküle und u.a. auf den T-Helferzellen zu finden. Die Färbung mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD3 und CD4 erlaubte also die Identifizierung CD3⁺ Zellen (T-Zellen) und innerhalb dieser Population die Unterscheidung zwischen CD3⁺CD4⁺ (T-Helferzellen) und CD3⁺CD4⁻ Zellen (v.a. zytotoxische T-Lymphozyten). In die Analyse wurden nur Daten von Zellen mit einbezogen, die nach der Antikörperfärbung eine klare Ringstruktur aufwiesen.

Die für die Experimente mit Untersuchungsmaterial vom Menschen verwendeten Antikörper waren FITC-konjugierte Maus anti-Human-CD3 Antikörper und R-PE-konjugierte Maus anti-Human-CD4 Antikörper. Für die Identifizierung der murinen Zellen wurden FITC-konjugierte Hamster anti-Maus-CD3e Antikörper sowie R-PE-konjugierte Ratten anti-Maus-CD4 Antikörper eingesetzt.

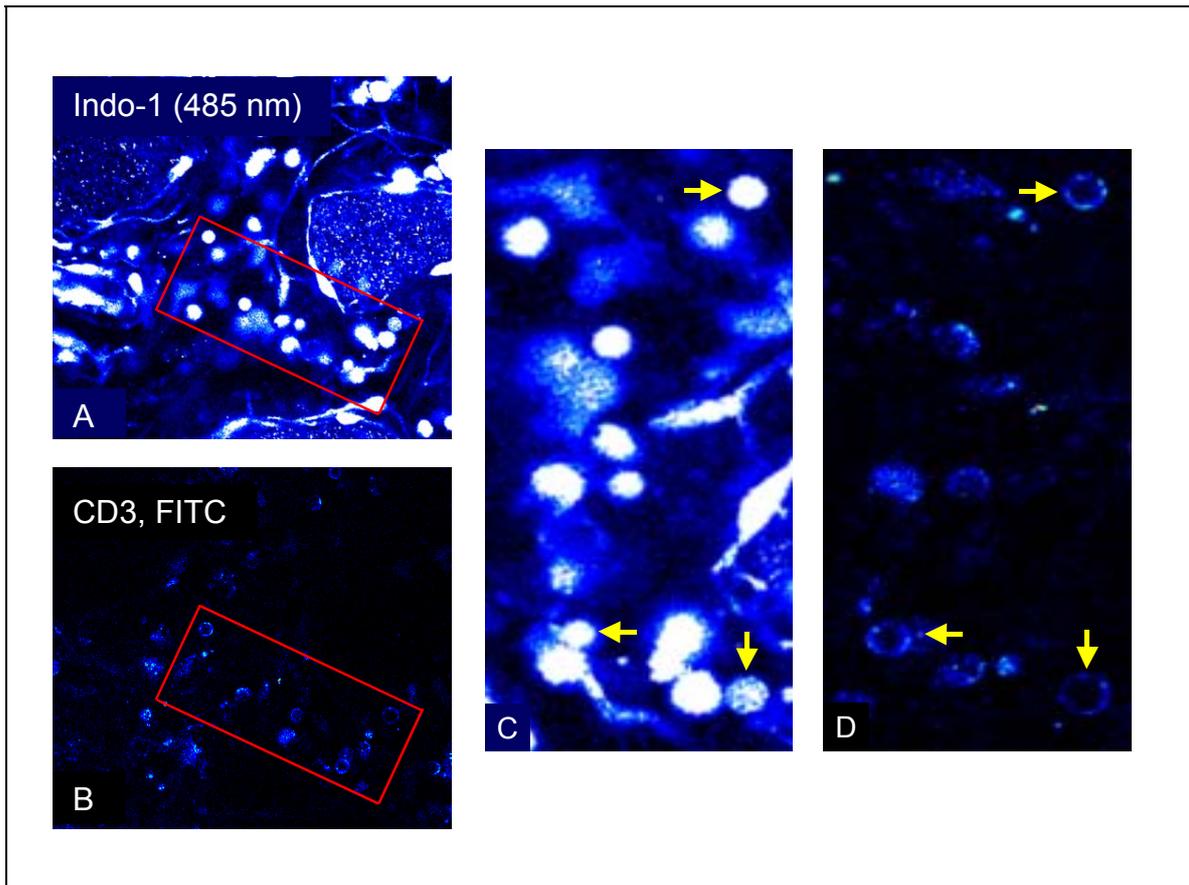


Abbildung 7: Identifikation gewebständiger LP T-Zellen vom Menschen.

(A, B) Die Aufnahmen zeigen denselben Bereich einer Gewebeprobe nach Färbung mit Indo-1 (A) bzw. mit FITC-konjugierten anti-CD3 Antikörpern (B). (C, D) Vergrößerte Darstellung der in (A) und (B) rot umrandeten Bildausschnitte. Die mit einem Pfeil markierten und mit Indo-1 beladenen Zellen sind nach Antikörperfärbung als CD3+ Zellen respektive T-Lymphozyten zu identifizieren.

Um eine Stimulation der Lymphozyten bzw. Beeinflussung der Kalziumsignale durch die Markierung mit den Antikörpern zu vermeiden, wurde die Antikörperfärbung erst nach der Durchführung der Kalziummessungen vorgenommen. Hierzu wurden unmittelbar nach Beendigung der Aufzeichnung der Kalziumsignale unter Beibehaltung der exakten Position der Messkammer auf dem Tisch des Zwei-Photonen-Mikroskops FITC-konjugierte anti-CD3 und R-PE-konjugierte anti-CD4 Antikörper (Verdünnung 1:20, in 0.9% NaCl mit Zusatz von 10% FCS) in die Messkammer appliziert. Nach 15 min wurde die Antikörperlösung mit der 1Ca/OTG-Lösung ausgewaschen. Zur Identifizierung der CD3+ bzw. CD4+ Zellen erfolgten nun Aufnahmen von derselben Stelle der Zell- bzw.

Gewebeprobe, die zuvor hinsichtlich der Kalziumkonzentrationen untersucht worden war. Abbildung 7 verdeutlicht den Vorgang der Zellidentifizierung.

Analyse der Daten: Die Daten wurden analysiert unter Verwendung der Programme Olympus Fluoview (Version 3.0), TILL Photonics Vision (Version 3.0 und 4.0), Wavemetrics Igor Pro und Microsoft Excel. Die graphische Darstellung der Messdaten dieser Arbeit in Form von Balkendiagrammen erfolgt als Mittelwert \pm sem (standard error of the mean). Für die statistische Auswertung wurde ein ungepaarter zweiseitiger student t-test verwendet. Die Daten wurden bei einem Wert von $p < 0.01$ als signifikant unterschiedlich betrachtet.

3.7 Material

3.7.1 Chemikalien

Amphotericin B (Boehringer, 14977600)
Amylalkohol, tertiärer (Merck, 999.1000)
CaCl₂ (J. T. Baker, 0504)
Collagenase III (Biochrom, CIII-22)
DMSO (Sigma, A-0808)
DNase I (Roche, 1284932)
DTT (Sigma, D-9779)
EDTA (Sigma, E-9884)
EGTA (Sigma, E-4378)
FCS (Gibco, 10270-106)
Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, 17-1440-03)
Fura-2/AM (Molecular Probes, F1221)
Gentamycin (Biochrom, A2410)
Glucose (Merck, 1.08342.1000)
HBSS (PAA Laboratories, H15-009)
Heparin (Biochrom, L6510)
Hepes (Sigma, H-7523)
Indo-1/AM (Molecular Probes, I1223)

KCl (Merck, 104933)
2-Mercaptoethanol (Acros, 125472500)
MgCl (Merck, 105833)
NaCl (Merck, 106404)
NaOH (J. T. Backer, 0402)
PBS (Invitrogen, 14190-094)
Pen/Strep (Gibco, 15140-122)
Percoll (Amersham Biosciences, 17-0891-01)
Polyornithin (Sigma, P3655)
RPMI-1640 (Invitrogen, 21875-034)
Silikon-Fett (Merck, 107746)
Thapsigargin (Molecular Probes, T7459)
2,2,2-Tribromomethanol (Fluka, 90710)
Trypanblau (Sigma, T8154)

3.7.2 Antikörper

FITC conjugated monoclonal mouse anti-human-CD3 antibody [Clone UCHT1] (DAKO, F0818)
R-PE conjugated monoclonal mouse anti-human-CD4 antibody [Clone MT310] (DAKO, R0805)
FITC conjugated monoclonal hamster anti-mouse-CD3e antibody [Clone 145-2C1] (PharMingen, 553062)
R-PE conjugated monoclonal rat anti-mouse-CD4 (L3T4) antibody [Clone RM4-5] (PharMingen, 553048)

3.7.3 Präparationslösungen

Avertin-Stocklösung:

1g 2,2,2-Tribromomethanol 99% + 0.63 ml tertiärer Amylalkohol

Avertin-Gebrauchslösung:

600 µl Stocklösung + 50 ml NaCl 0.9%

Collagenase-Medium:

30 ml DNase-Medium, 5 mg Collagenase III

DNase-Medium:

98 ml RPMI-Medium, 2 ml Hepes, 10 mg DNase I

HBSS-DTT-Lösung:

500 ml HBSS, 5.5 ml Pen/Strep, 12.5 ml Hepes (1M Stammlösung),
2.5 ml Gentamycin, 1ml Amphotericin B, 0.5 ml Mercaptoethanol
(0.05 M Stammlösung) + 1 mM DTT

HBSS-EDTA-Lösung:

500 ml HBSS, 5.5 ml Pen/Strep, 12.5 ml Hepes (1M Stammlösung),
2.5 ml Gentamycin, 1ml Amphotericin B, 0.5 ml Mercaptoethanol
(0.05 M Stammlösung) + 5 mM EDTA

EDTA-DTT-Lösung:

3 Teile HBSS-DTT-Lösung + 1 Teil HBSS-EDTA-Lösung:

Percoll 100%:

10 ml Percoll + 90 ml 1.5 M NaCl

Percoll 40%:

40 ml Percoll 100% + 60 ml 0.9% NaCl

RPMI-Medium:

500 ml RPMI-1640, 5.5 ml Pen/Strep, 55 ml FCS

3.7.4 Versuchslösungen

0Ca/1TG-Lösung:

155 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 10 mM Glucose, 5 mM Hepes, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1µM Thapsigargin, pH 7.4 mit NaOH

1Ca/0TG-Lösung:

155 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 10 mM Glucose, 5 mM Hepes, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, pH 7.4 mit NaOH

2Ca/1TG-Lösung:

155 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 10 mM Glucose, 5 mM Hepes, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 1 μM Thapsigargin, pH 7.4 mit NaOH

Antikörper-Lösungen:

Antikörper-Verdünnung 1:20 in 0.9% NaCl mit Zusatz von 10% FCS

3.7.5 Geräte

Mikroskope:

Olympus BX50WI (Zwei-Photonen-Messplatz)

Olympus CK30 (Präparation)

Olympus IX70 (konventioneller Messplatz)

Geräte der Zwei-Photonen-Technik:

Coherent Verdi V-5 (Pumplaser)

Coherent Mira 900-F (Zwei-Photonen-Laser)

TILL Photonics Yanus (Scaneinheit)

Olympus FV5-PSU Scan Ace (Bildverarbeitung)

Zentrifugen, Schüttler:

Eppendorf 5415 R

GFL 3005

Hettich Universal 30 F

Hettich Universal 32 R

3.7.6 Steuerungs- und Auswertungsprogramme

Aventes Spectrawin-Full (Version 4.2)

Microsoft Excel

Olympus Fluoview (Version 3.0)

TILL Photonics Vision (Version 3.0 und 4.0)

Wavemetrics Igor Pro

4. Ergebnisse

4.1 Entwicklung und Validierung der Methodik

4.1.1 Messung zytosolischer Kalziumkonzentrationen in gewebständigen LP Lymphozyten

Eine der Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer Methode, mit der es möglich ist, ratiometrische Messungen der zytosolischen Kalziumkonzentration in identifizierten T-Lymphozyten der intakten Lamina propria mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie durchzuführen. Bei der Entwicklung der Methode kristallisierten sich dabei zwei zentrale Fragestellungen heraus: 1. Wie ist es möglich, den Fluoreszenzfarbstoff Indo-1 tief genug in die Gewebeproben einzubringen, um die Lamina propria Lymphozyten mit einer ausreichenden Menge des Kalziumindikators zu beladen? 2. Wie ist es möglich, die Zellbewegungen bei der Untersuchung einer vitalen Gewebeprobe in hinreichendem Maße zu minimieren bzw. auszugleichen, um die Kalziumsignale über das gesamte Experiment hinweg verfolgen und identifizierten Zellen zuordnen zu können?

Es zeigte sich, dass es für die Beladung der Gewebeproben mit Indo-1 in einem ersten Schritt nötig ist, die Biopsien von Schleim zu befreien, welcher die dem Darmlumen zugewandte Seite der Proben bedeckt. Der Grund hierfür sind die lipophilen Lösungseigenschaften des verwendeten Azetoxymethylesterderivats des Indo-1, Indo-1/AM. Diese führen dazu, dass sich der Farbstoff in nicht unerheblichem Maße in der Schleimschicht löst und somit nicht für die Beladung des Gewebes zur Verfügung steht. Für die Ablösung des Schleimes wurde in der vorliegenden Arbeit eine Lösung mit Dithiothreitol (DTT) verwendet, ein Thioalkohol mit zwei SH-Gruppen. DTT stellt ein mildes Reduktionsmittel dar, welches in der Lage ist, die Disulfidbrücken, z.B. von Proteinen, zu spalten und so den Ablösungsvorgang der Schleimschicht zu beschleunigen.

Die Beladung der Gewebeprobe mit Indo-1/AM erfordert in einem zweiten Schritt auch die Entfernung des Schleimhautepithels. Dieser Umstand ergibt sich aus der

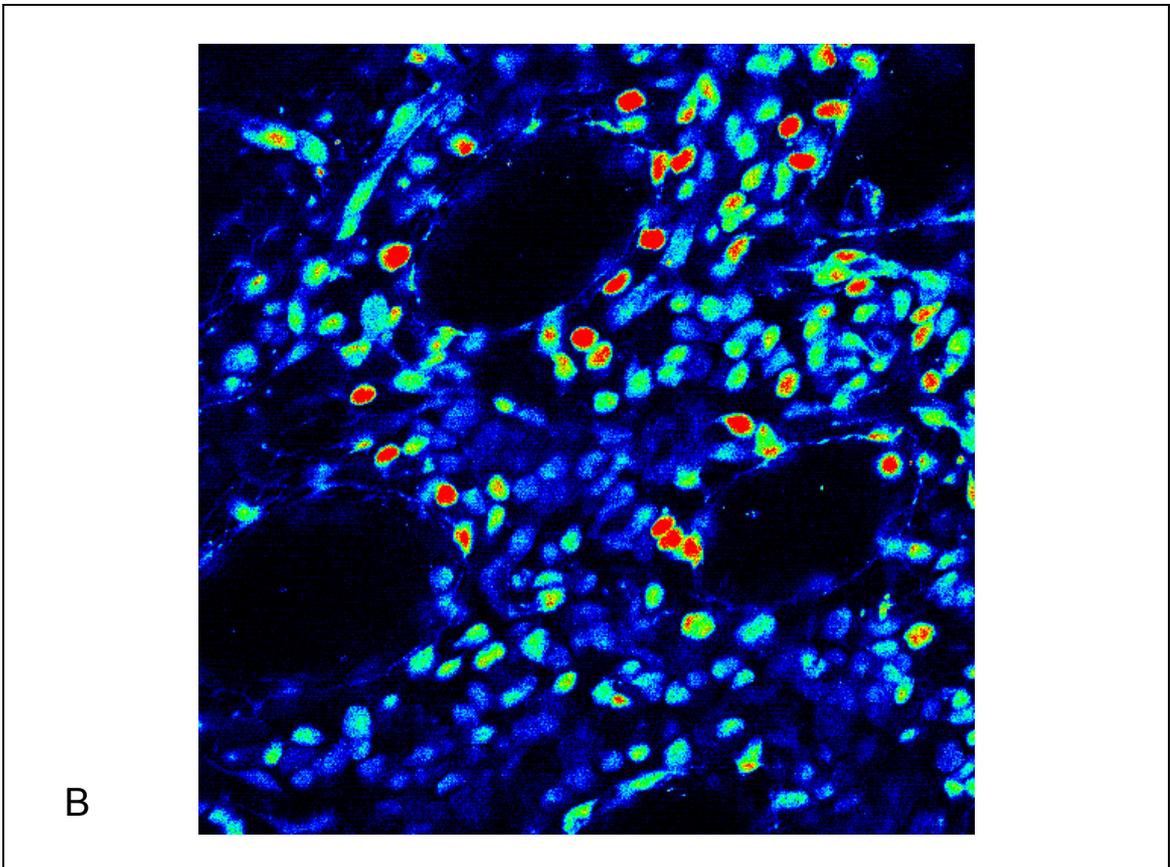
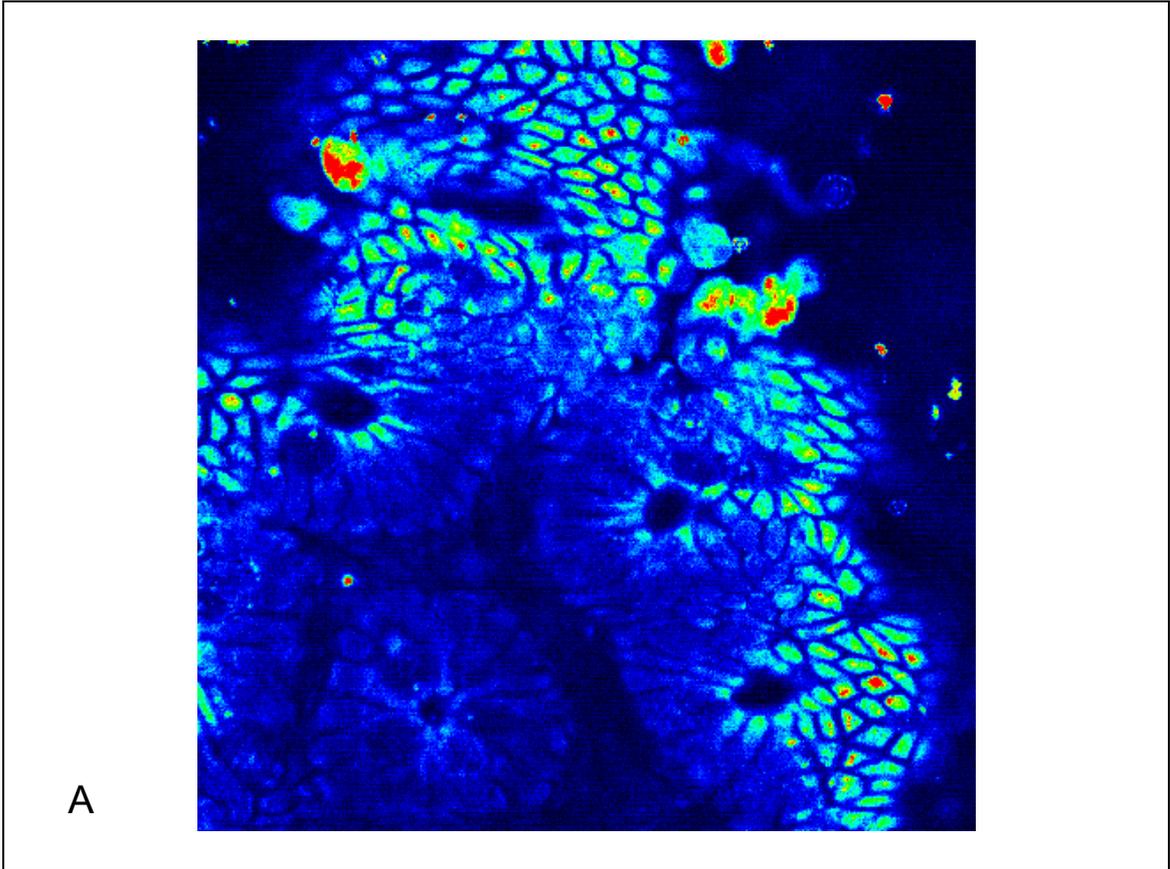


Abbildung 8: Beladung der Gewebeproben mit Indo-1/AM.

(A) Farbcodierte Zwei-Photonen-Aufnahme einer mit Indo-1 gefärbten Gewebeprobe der Maus mit vorhandener Epithelschicht. Der optische Schnitt verläuft schräg durch die Probe. In der oberen Bildhälfte, aber auch am rechten unteren Rand, ist die zusammenhängende Oberfläche des Epithels zu erkennen. In der unteren Bildhälfte finden sich hingegen quer angeschnittene Krypten, welche mit einer Epithelschicht ausgekleidet sind. Die Zellen des Epithels haben den größten Teil des Fluoreszenzfarbstoffs aufgenommen. Das übrige Gewebe kommt kaum zur Darstellung.

(B) Farbcodierte Zwei-Photonen-Aufnahme einer mit Indo-1 gefärbten Gewebeprobe vom Menschen nach Entfernung des Epithels. Die Krypten sind leer. Die zwischen den Krypten liegenden Zellen der Lamina propria sind mit Fluoreszenzfarbstoff beladen.

Tatsache, dass nach Beseitigung der Schleimschicht der Farbstoff von den Zellen des darunter befindlichen Epithels aufgenommen und nach Abspaltung des Azetoxymethylesterrests nicht mehr freigegeben wird. Auf diese Weise wird der Kalziumindikator durch die Epithelzellen abgefangen, bevor er die Lymphozyten der tiefer liegenden Lamina propria erreichen kann. Abbildung 8 (A) zeigt eine mit Indo-1 gefärbte Darmschleimhaut der Maus mit intakter Epithelschicht. Es ist deutlich zu erkennen, wie stark das Fluoreszenzsignal der Epithelzellen ist. Die tiefer liegenden Bereiche des Gewebes haben nur wenig Indo-1 geladen und kommen kaum zur Darstellung. Für die Ablösung des Epithels von der Lamina propria der Darmschleimhaut wurde eine Präparationslösung mit dem Kalziumchelator Ethylendiamintetraacetat (EDTA) verwendet. Das durch den Zusatz von EDTA erzeugte kalzium- und magnesiumfreie Milieu trägt dazu bei, dass es zu einer Lösung von Zell-Zell- bzw. Zell-Matrixkontakten kommt, durch die die Epithelzellen untereinander bzw. mit der extrazellulären Matrix, z.B. der Basalmembran, verankert sind. In Abbildung 8 (B) ist eine Kolonbiopsie vom Menschen abgebildet, die nach Entfernung des Epithels mit Indo-1 gefärbt wurde. Das zwischen den leeren Krypten befindliche Gewebe zeigt eine ausreichende Beladung mit dem Fluoreszenzfarbstoff.

Was die Zellbewegungen bei der Untersuchung vitaler Gewebeproben betrifft, so ist darauf hinzuweisen, dass Bewegungen einzelner Lymphozyten innerhalb des Gewebeverbandes ein Zeichen der Vitalität des Untersuchungsmaterials und somit unvermeidbar sind. Das Ziel bei der Entwicklung der Methode war deshalb, die Bewegungen des Gewebeverbandes als Ganzes zu minimieren. Hierzu

wurden die Gewebeproben durch einen sogenannten Grid fixiert. Minimale Bewegungen um wenige Mikrometer v.a. in Richtung der z-Achse der Probe wurden jedoch auch unter Verwendung des Grids gelegentlich beobachtet. Traten solche Verschiebungen während eines Experiments auf, wurden sie unmittelbar durch Anpassen der Höhe des Mikroskoptisches im Zeitfenster zwischen zwei Fluoreszenzaufnahmen ausgeglichen. Hierzu konnte der Mikroskoptisch über einen Elektromotor bis auf $1/10 \mu\text{m}$ genau justiert werden. Um eine eventuelle Bewegung des Gewebes während der im Anschluss an die Kalziummessungen durchgeführten T-Zellidentifizierung zu erkennen, wurden vor, während und nach der Antikörperfärbung gegen T-Zelloberflächenmarker wiederholt Abbildungen des untersuchten Gewebeausschnitts bei 720 nm , also unter den gleichen Bedingungen wie während der Kalziummessungen, aufgezeichnet und mit den Kalziumimagingaufnahmen verglichen. Eventuell auftretende Verschiebungen konnten so ebenfalls durch Anpassen der Höhe des Mikroskoptisches ausgeglichen werden.

4.1.2 Validierung der Messung zytosolischer Kalziumkonzentrationen in Lymphozyten mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie

Die Validierung der Messung zytosolischer Kalziumkonzentrationen in Lymphozyten mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie erfolgte durch einen Vergleich von am Zwei-Photonen-Messplatz erhobenen Daten mit Messwerten, die mit einem etablierten konventionellen Imagingverfahren gewonnen wurden. Hierfür wurden Kalziumimagingexperimente mit beiden Verfahren zeitgleich und nach demselben Protokoll (s. Kapitel 3.6 und 4.2.1) mit Zellen derselben Probe eines gesunden Spenders durchgeführten. Als Zellen wurden aufgrund der leichteren Verfügbarkeit PB T-Zellen und nicht LP T-Zellen verwendet. Als Kalziumindikator diente am konventionellen Messplatz Fura-2, am Zwei-Photonen-Messplatz Indo-1. Die zytosolische Kalziumkonzentration wurde wie in Kapitel 3.4 berechnet.

Abbildung 9 zeigt die Messkurven der Kalziumkonzentrationen je eines Validierungsexperimentes, das mit einem konventionellen Imagingverfahren bzw. der Zwei-Photonen-Technologie durchgeführt wurde. Es besteht kein signifikanter

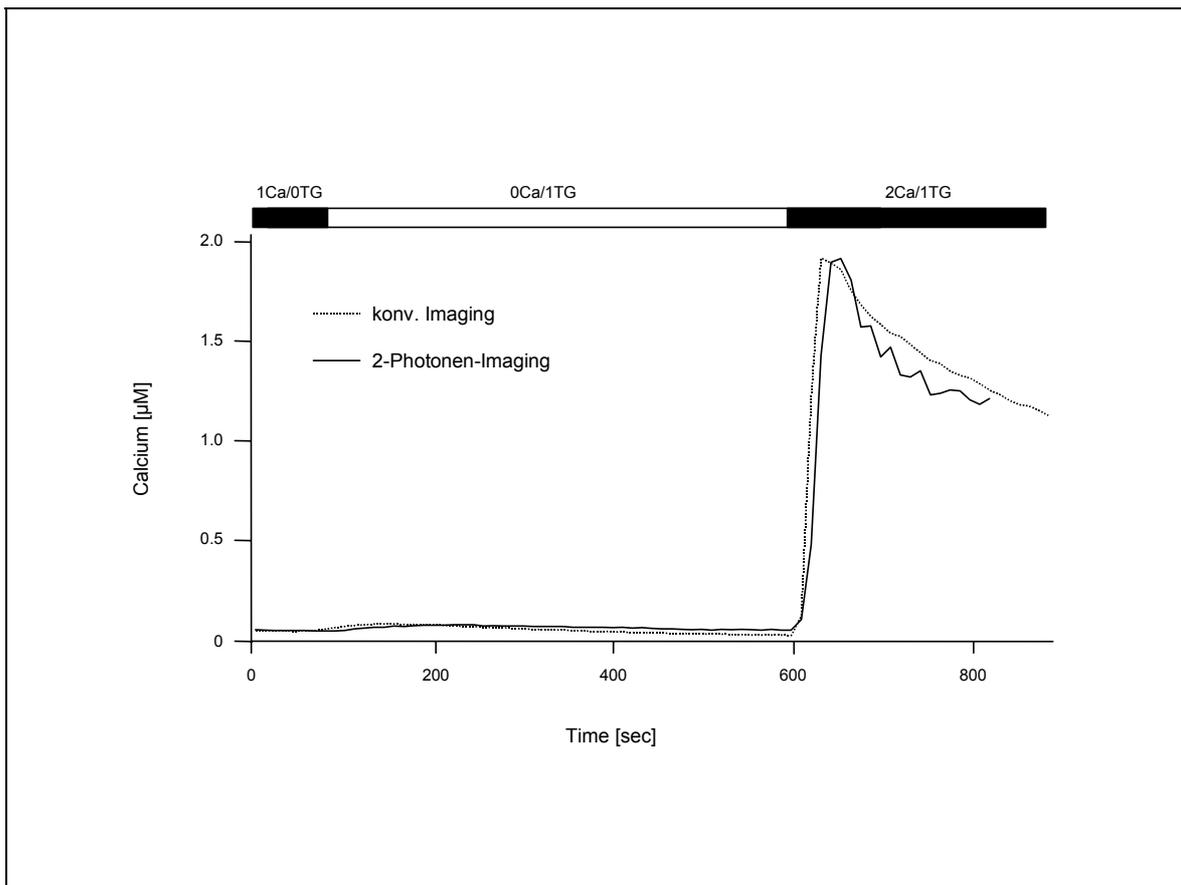


Abbildung 9 und Tabelle 1: Vergleich der $[Ca^{2+}]_i$ Messung mit einem konventionellen Imagingverfahren und der Zwei-Photonen-Technologie.

Abbildung 9: Dargestellt sind die Messkurven der $[Ca^{2+}]_i$ in PB T-Zellen vom Menschen je eines Validierungsexperimentes, das mit einem konventionellen Imagingverfahren bzw. der Zwei-Photonen-Technologie durchgeführt wurde. Als Kalziumindikator diente am konventionellen Imagingmessplatz Fura-2, am Zwei-Photonen-Messplatz Indo-1. Die Messungen erfolgten an beiden Messplätzen zeitgleich und nach demselben Protokoll (s. Kapitel 3.6 und 4.2.1) mit PB T-Zellen aus derselben Probe eines Spenders. Die $[Ca^{2+}]_i$ wurde wie in Kapitel 3.4 berechnet.

Tabelle 1: Messdaten der Validierungsexperimente.

sd: standard deviation. sem: standard error of the mean.

	Konv. Imaging $[Ca^{2+}]_i$ in [nm] (sd • sem)	2-Photonen-Imaging $[Ca^{2+}]_i$ in [nm] (sd • sem)
Ruhekalzium	41.5 (18.2 • 1.5)	41.9 (30.5 • 2.0)
Kalziumpeak	2310.4 (933.3 • 75.9)	2267.8 (1630.4 • 108.0)
Kalziumplateau	1033.3 (483.3 • 39.3)	1070.9 (660.6 • 43.8)

Unterschied zwischen den mit beiden Methoden erhobenen Daten hinsichtlich der Kalziumkonzentration unter Ruhebedingungen, des Kalziumpeaks und des Kalziumplateaus. Die Zahlenwerte dieser drei zum Vergleich der Methoden herangezogenen Messbereiche sind in Tabelle 1 mit der Standardabweichung (standard deviation, sd) und dem standard error of the mean aufgeführt. Der in Abbildung 9 zu erkennende, geringfügig langsamere Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration nach Zugabe der 2Ca/1TG-Lösung bei den Messungen mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie kann dadurch erklärt werden, dass der Lösungswechsel am Zwei-Photonen-Messplatz aufgrund des größeren Volumens der dort verwendeten Messkammer etwas langsamer erfolgte.

4.2 Kalziumsignale in PB Lymphozyten und LP Lymphozyten vom Menschen

4.2.1 Kalziumsignale in PB Lymphozyten

Die Untersuchung der zytosolischen Kalziumsignale in peripheren Blut T-Lymphozyten des Menschen mit der Zwei-Photonen-Technologie wird in den Abbildungen 10 und 11 am Beispiel typischer Kalziumimagingexperimente graphisch dargestellt. Abbildung 10 zeigt mit Indo-1 beladene PB T-Zellen (A, B), farbcodierte Ratio 405/485-Bilder (Ratio 405/485 \approx intrazelluläre Kalziumkonzentration) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1) und (2) des Experiments (C, D) sowie die Identifizierung der T-Zellen mittels Antikörperfärbung im Anschluss an die Kalziummessungen (E, F). Abbildung 11 zeigt die Kurve des Durchschnittsratio 405/485 aller CD3+ Zellen eines Kalziumimagingexperiments. Die Zahlen in Klammern weisen auf die Zeitpunkte (1) und (2) hin, an denen die in Abbildung 10 (C, D) dargestellten Ratio 405/485-Bilder aufgenommen wurden. Für die Durchführung der Kalziummessungen wurden die PB Lymphozyten, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, isoliert, mit dem Kalziumindikator Indo-1 beladen und in die Messapparatur eingebracht. Zu Beginn eines Experiments wurde über einen Zeitraum von 100 sec der Ruhekalziumwert

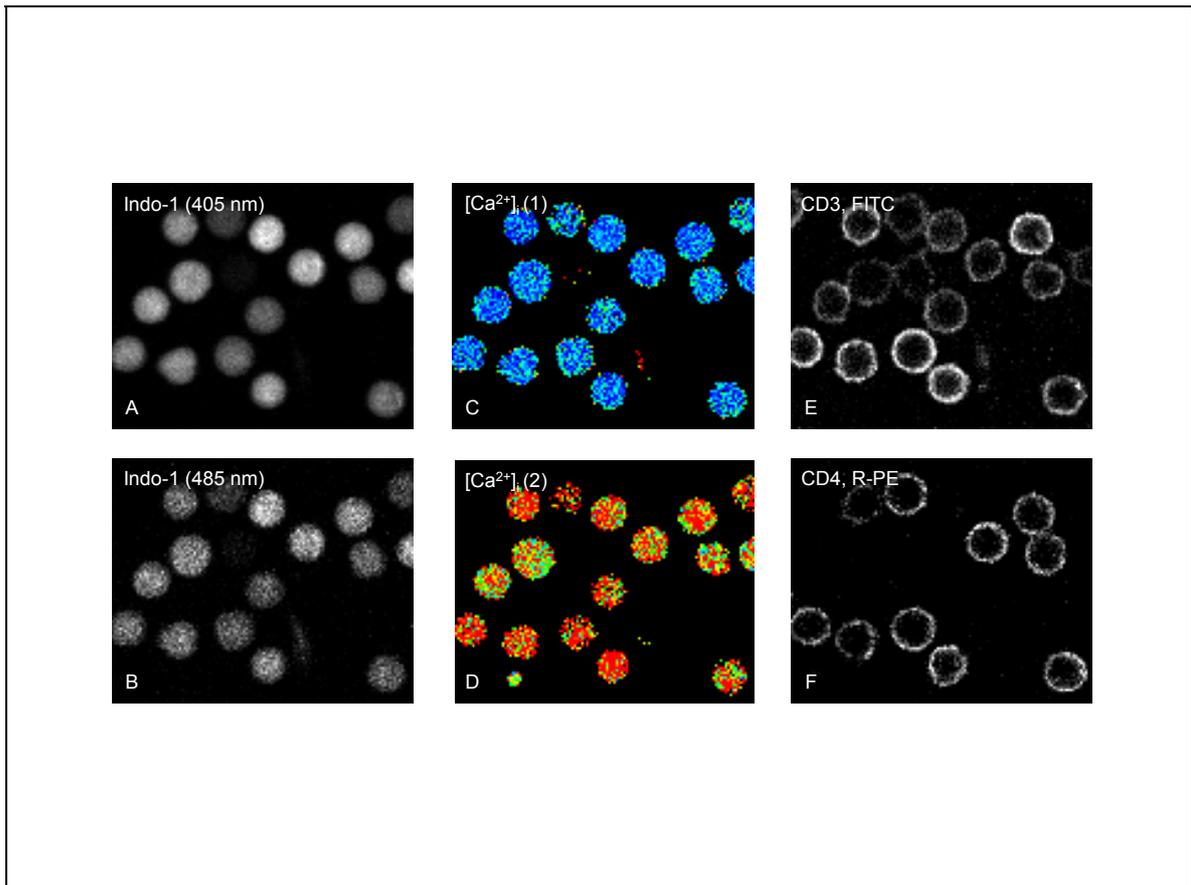


Abbildung 10: Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in PB T-Lymphozyten des Menschen – experimentelles Setting. (A, B) Mit Indo-1 gefärbte PB T-Zellen vom Menschen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen, 405 nm und 485 nm. (C, D) Farbcodierte Ratiobilder der $[Ca^{2+}]_i$ derselben Zellen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (1) und (2) während des Experiments: Blaue Farben stehen für ein niedriges Ratio entsprechend einer niedrigen $[Ca^{2+}]_i$, rote Farben für ein hohes Ratio bzw. eine hohe $[Ca^{2+}]_i$. (E, F) T-Zellidentifizierung im Anschluss an das Kalzium-imagingexperiment: Die Zellen wurden auf dem Mikroskopisch mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. CD3+CD4+ und CD3+CD4- Zellen sind zu unterscheiden.

der Zellen bei einer extrazellulären Kalziumkonzentration von 1 mmol/l bestimmt (1Ca/0TG-Lösung). Die Stimulation der Zellen erfolgte durch Thapsigargin (1 μ M) in kalziumfreier Lösung (0Ca/1TG-Lösung). Thapsigargin blockiert irreversibel die Kalzium-ATPasen des endoplasmatischen Retikulums, die SERCA, welche Kalzium aus dem Zytosol in das Zellkompartiment pumpen. Nach Hemmung der SERCA kommt es über einen konstitutiven Ausstromweg zu einer passiven Entleerung der Kalziumspeicher. Hierdurch werden CRAC-Kanäle in der Plasma-

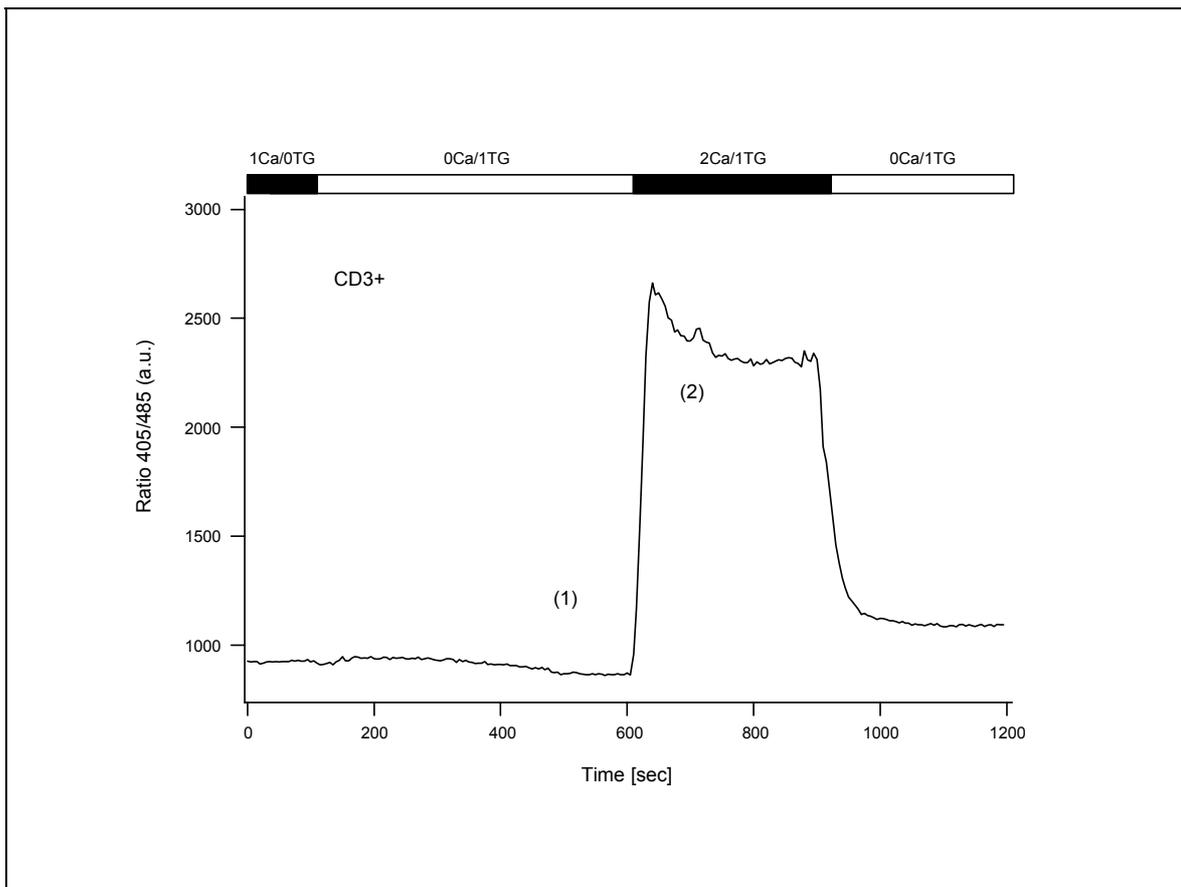


Abbildung 11: Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in PB T-Lymphozyten des Menschen – Messkurve.

Durchschnitts-Ratio 405/485 aller CD3+ Zellen eines Experiments mit PB T-Zellen vom Menschen. Die Stimulation der Zellen erfolgte nach 100 sec mit 1 μ M TG in kalziumfreier Lösung. Nach 600 sec wurde die extrazelluläre Kalziumkonzentration auf 2 mmol/l erhöht, nach 900 sec wieder auf 0 mmol/l gesenkt. Die Entleerung der Kalziumspeicher, der speichergesteuerte Kalziumeinstrom und die Kalziumclearance wurden erfasst. Die Zahlen in Klammern zeigen die Zeitpunkte (1) und (2), an denen die in Abbildung 10 (C, D) dargestellten Ratiobilder aufgenommen wurden.

membran der Lymphozyten aktiviert (s. Kapitel 2.1 und 3.6). Der Kalziumausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum nach Zugabe der 0Ca/1TG-Lösung zeigte sich in einer diskreten, transienten Erhöhung des Ratio 405/485. Da die Applikation des TG in kalziumfreier extrazellulärer Lösung erfolgte, muss das für die Erhöhung des Ratio 405/485 verantwortliche Kalzium aus den intrazellulären Speichern der PB T-Zellen stammen. Bei weiterhin kalziumfreier Lösung fiel das Ratio in der Folge langsam wieder ab. Das freigesetzte Kalzium gelangt dabei über Kalziumpumpen in der Plasmamembran, die PMCA, in den Extrazellulärraum.

Tabelle 2: Messdaten der PB T-Lymphozyten vom Menschen

CD3+ Zellen	$[Ca^{2+}]_i$ (a.u.)	sd	sem
Ruhekalzium	979.5	122.2	2.5
Kalziumpeak	2748.7	862.6	17.4
Kalziumplateau	1954.6	723.1	14.6

CD3+CD4+ Zellen	$[Ca^{2+}]_i$ (a.u.)	sd	sem
Ruhekalzium	979.6	122.2	3.1
Kalziumpeak	2885.7	838.4	21.3
Kalziumplateau	2090.0	704.5	17.9

CD3+CD4- Zellen	$[Ca^{2+}]_i$ (a.u.)	sd	sem
Ruhekalzium	979.5	122.1	4.1
Kalziumpeak	2512.5	852.6	28.5
Kalziumplateau	1721.0	694.7	23.2

Messdaten der peripheren Blut T-Lymphozyten vom Menschen:

n (CD3+ Zellen) = 2444. n (CD3+CD4+ Zellen) = 1547. n (CD3+CD4- Zellen) = 897.

Die Werte der $[Ca^{2+}]_i$ sind angegeben in arbitrary units (a.u.) = Ratio 405/485 * 1000.

sd: standard deviation. sem: standard error of the mean.

Nach 600 sec (gerechnet vom Zeitpunkt des Beginns des Experimentes) erfolgte die Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration auf 2 mmol/l durch Applikation der 2Ca/1TG-Lösung. In der Messkurve zeigte sich nach dem Lösungswechsel ein drastischer Anstieg des Ratio 405/485 bzw. der zytosolischen Kalziumkonzentration. Nach dem Erreichen eines Kalziumpeaks folgte ein moderateres Absinken der Ratiowerte und die Ausbildung eines Kalziumplateaus. Der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration entsteht durch den Kalziumeinstrom über die nach der Stimulation mit Thapsigargin aktivierten CRAC-Kanäle. Die Ausbildung

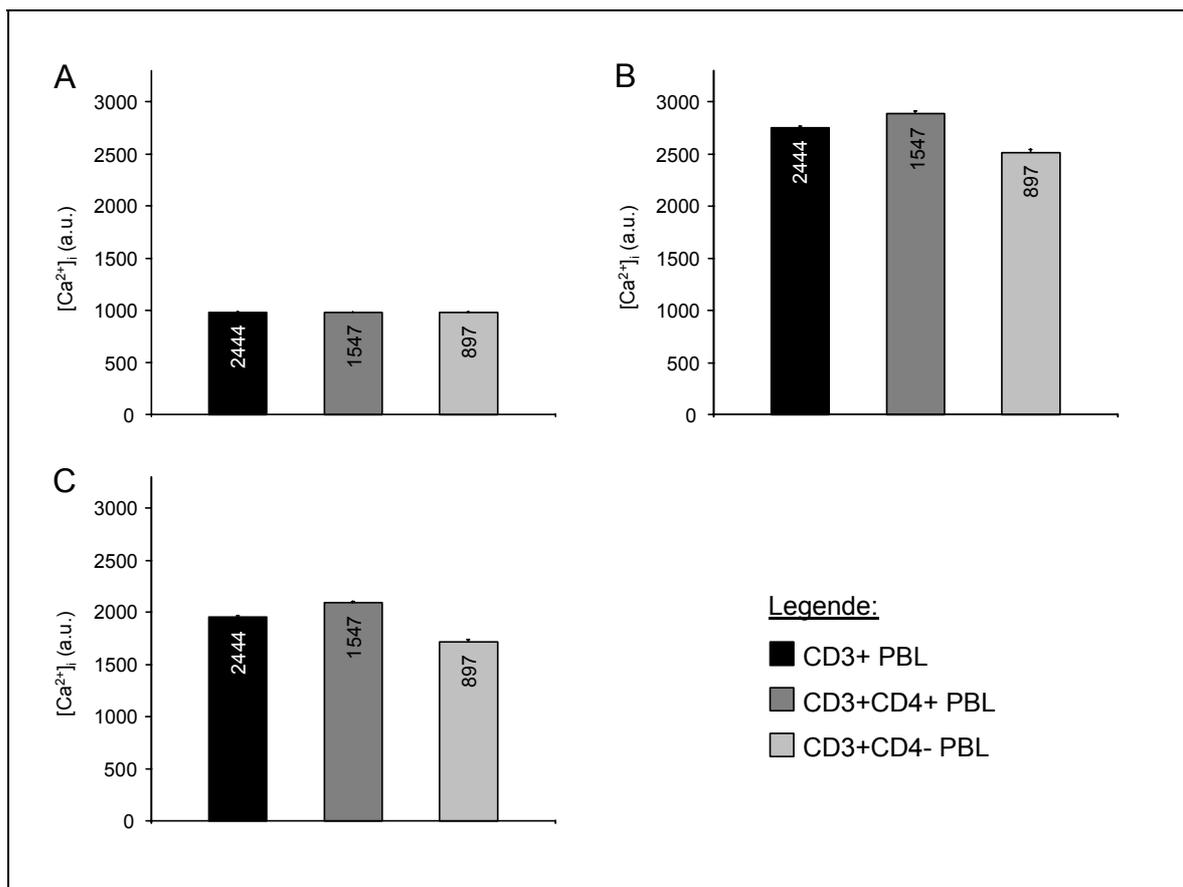


Abbildung 12: Statistische Analyse der $[Ca^{2+}]_i$ Messungen in PB T-Lymphozyten vom Menschen. Die Experimente wurden, wie in Abbildung 11 beschrieben, durchgeführt. Die Nummern in den Balken stehen für die Anzahl der analysierten Zellen pro Zellpopulation. Die T-Balken zeigen den sem. Die Werte der $[Ca^{2+}]_i$ sind angegeben in arbitrary units (a.u.) = Ratio 405/485 * 1000. (A) Ruhekalzium. (B) Kalziumpeak: Der Mittelwert des Kalziumpeaks der CD4+ Zellen liegt signifikant über dem der CD4- Zellen. (C) Kalziumplateau: Der Mittelwert des Kalziumplateaus der CD4+ Zellen liegt signifikant über dem der CD4- Zellen.

des Kalziumplateaus ist das Ergebnis eines Fließgleichgewichts zwischen Kalziumeinstrom und Kalziumausstrom, welches sich nach der verzögert einsetzenden Tätigkeit von Kalziumpumpen in der Plasmamembran bildet.

Der Zeitpunkt für den nächsten Lösungswechsel wurde mit 900 sec (gerechnet vom Beginn des Experimentes) so gewählt, dass ausreichend Zeit für die Messung des Kalziumplateaus bestand. Durch die Applikation der 0Ca/1TG-Lösung wurde die extrazelluläre Kalziumkonzentration wieder auf 0 mmol/l gesenkt und die Kalziumclearance aus dem Zytosol gemessen. Zur Quantifizierung

der Kalziumclearance diente die Zeitkonstante des Rückgangs der zytosolischen Kalziumkonzentration. Die Bestimmung der Zeitkonstante erfolgte dabei durch Anpassen einer einfachen Exponentialfunktion an den Bereich der Messkurve, durch den das Absinken der intrazellulären Kalziumkonzentration abgebildet wurde. Im Anschluss an die Kalziummessungen wurden die T-Lymphozyten mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper identifiziert, wie im Kapitel 3.6 und 4.1.1 beschrieben.

Die statistische Analyse der Daten aus allen Experimenten mit humanen PB Lymphozyten ist in Tabelle 2 und Abbildung 12 dargestellt. Insgesamt wurden 10 Experimente mit menschlichen PB Lymphozyten durchgeführt und dabei die Kalziumsignale von 2444 T-Lymphozyten erfasst. Die aufgeführten Messdaten der intrazellulären Kalziumkonzentration sind Ratiowerte. Die Ratio 405/485 Werte wurden aus Gründen der besseren Handhabbarkeit mit dem Faktor 1000 multipliziert und sind entsprechend als a.u. (arbitrary units = willkürliche Einheiten = Ratio 405/485 * 1000) gekennzeichnet. Beim Vergleich der Messergebnisse von CD3+CD4+ und CD3+CD4- Zellen zeigt sich, dass die CD4+ Zellen im Mittel sowohl einen signifikant höheren Kalziumpeak ($p < 10^{-24}$) als auch ein signifikant höheres Kalziumplateau ($p < 10^{-35}$) als die CD4- Zellen aufweisen. Der Nachweis dieses Unterschiedes in Bezug auf das Kalziumplateau steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Arbeit von Schwarz et al. [Schwarz A et al., 2004]. Darüber hinaus zeigen die bei der Untersuchung der PB Lymphozyten gewonnenen Daten, dass es mit der Zwei-Photonen-Technologie möglich ist, auch kleine Unterschiede in der zytosolischen Kalziumkonzentration von T-Zellen aufzulösen.

4.2.2 Kalziumsignale in gewebständigen LP Lymphozyten

Für die Untersuchung der zytosolischen Kalziumsignale in gewebständigen Lamina propria T-Lymphozyten vom Menschen wurden die Gewebeproben, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, präpariert, mit Indo-1 beladen und in die Messkammer eingebracht. Der Ablauf der Experimente mit Gewebeproben entsprach dem der Versuche mit peripheren Blut T-Zellen (s. Kapitel 4.2.1). Die

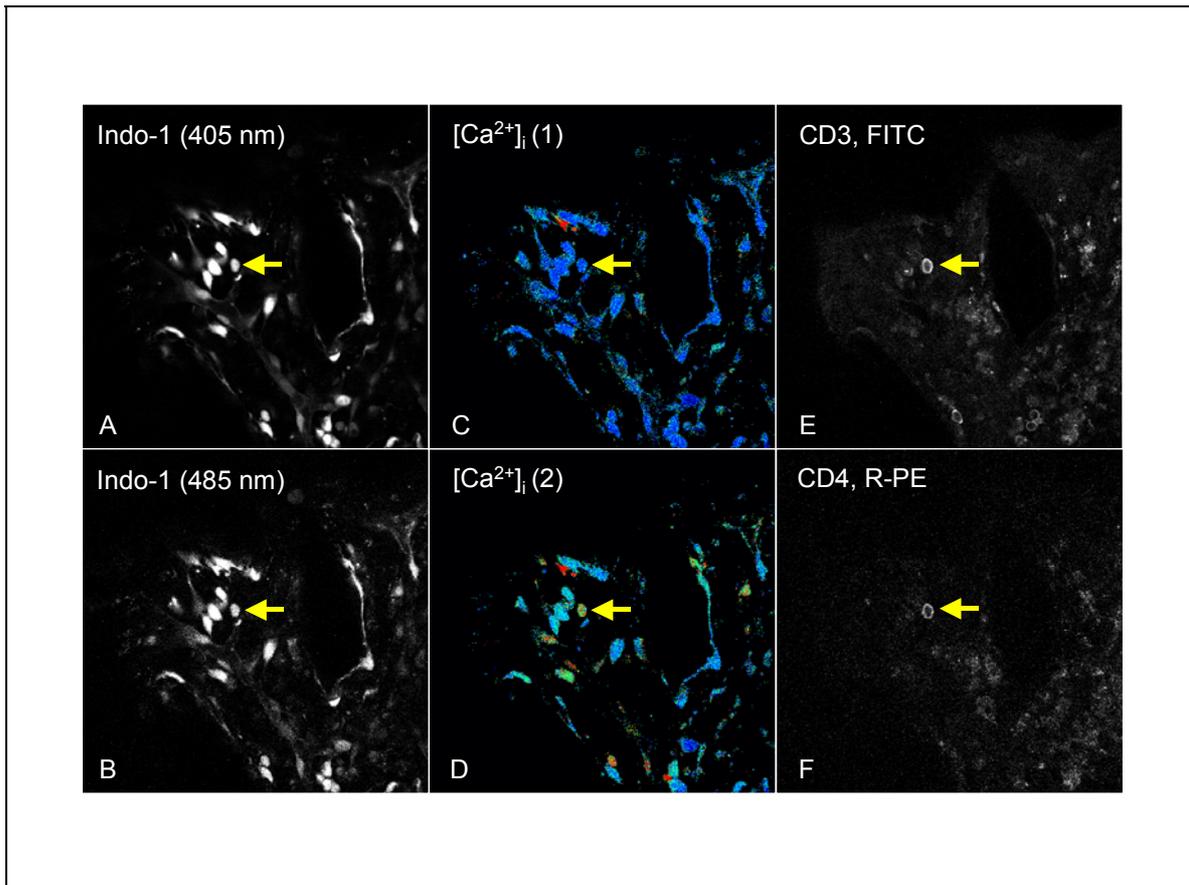


Abbildung 13: Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in gewebständigen LP T-Lymphozyten des Menschen – experimentelles Setting.

(A, B) Mit Indo-1 gefärbte Biopsie. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei zwei unterschiedlichen Emissionswellenlängen, 405 nm und 485 nm. (C, D) Farbencodierte Ratiobilder der $[Ca^{2+}]_i$ derselben Zellen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (1) und (2) während des Experiments: Blaue Farben stehen für ein niedriges Ratio entsprechend einer niedrigen $[Ca^{2+}]_i$, rote Farben für ein hohes Ratio bzw. eine hohe $[Ca^{2+}]_i$. (E, F) T-Zellidentifizierung im Anschluss an das Kalziumimagingexperiment: Die Zellen wurden auf dem Mikroskopisch mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Der gelbe Pfeil zeigt auf eine CD3+CD4+ Zelle.

Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration erfolgte ratiometrisch mit Indo-1. Die anschließende Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD3 und CD4 ermöglichte die Identifizierung der T-Zellen. In Abbildung 13 wird das Vorgehen an einem Beispiel verdeutlicht. Es sind Ausschnitte aus einer mit Indo-1 beladenen Gewebeprobe dargestellt (A, B) sowie Ratiobilder dieses Ausschnittes zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (1) und (2)

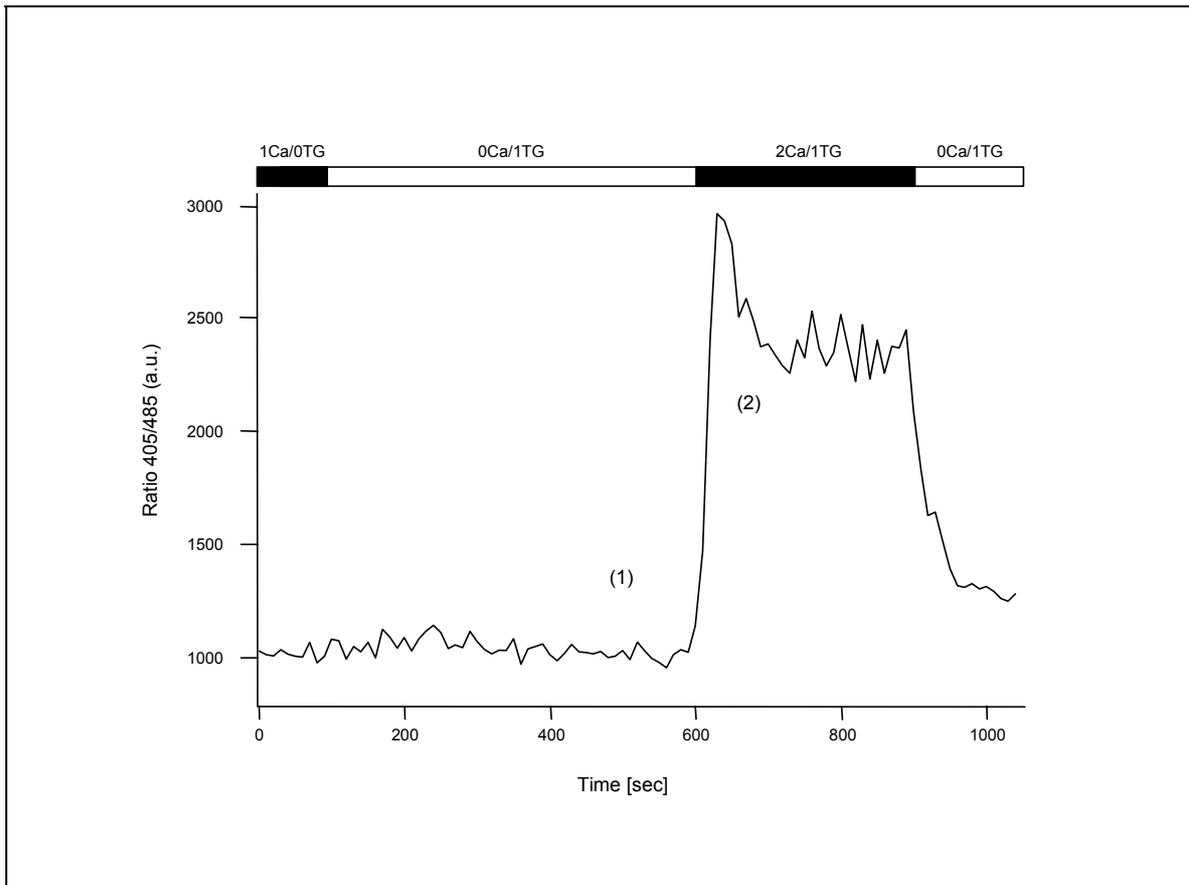


Abbildung 14: Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in gewebständigen LP T-Lymphozyten des Menschen – Messkurve.

Ratio 405/485 der in Abbildung 13 mit dem gelben Pfeil markierten Zelle. Die Stimulation der Zelle erfolgte mit TG, wie in Abbildung 11 beschrieben. Die Zahlen in Klammern zeigen die Zeitpunkte (1) und (2), an denen die in Abbildung 13 (C, D) dargestellten Ratiobilder aufgenommen wurden.

während der Kalziummessung (C, D). Die Bilder E und F wurden nach der Antikörperfärbung zur T-Zellidentifizierung angefertigt. Die mit einem gelben Pfeil markierte Zelle zeigt dabei sowohl bei der Färbung mit FITC-konjugierten anti-CD3 Antikörpern als auch bei der Färbung mit R-PE-konjugierten anti-CD4 Antikörpern eine Ringstruktur und ist als CD3+CD4+ T-Lymphozyt zu identifizieren. Die Kalziumkinetik der markierten Zelle ist in Abbildung 14 aufgeführt. Die Applikation von TG bewirkt über eine Hemmung der SERCA eine passive Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher, was als transiente Erhöhung des Ratio 405/485 zu erkennen ist. Die Entleerung der Kalziumspeicher aktiviert die CRAC-Kanäle in der Plasmamembran. Nach Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration

Tabelle 3: Messdaten der non-IBD LP T-Lymphozyten vom Menschen

CD3+ Zellen	$[Ca^{2+}]_i$ (a.u.)	sd	sem
Ruhekalzium	1194.3	298.0	50.4
Kalziumpeak	2212.2	806.1	136.3
Kalziumplateau	1272.0	664.3	112.3

CD3+CD4+ Zellen	$[Ca^{2+}]_i$ (a.u.)	sd	sem
Ruhekalzium	1255.3	306.3	65.3
Kalziumpeak	2173.6	790.4	168.5
Kalziumplateau	1339.3	681.2	145.2

CD3+CD4- Zellen	$[Ca^{2+}]_i$ (a.u.)	sd	sem
Ruhekalzium	1098.9	294.6	104.2
Kalziumpeak	2561.6	761.5	269.2
Kalziumplateau	1330.5	715.7	253.1

Messdaten der gewebsständigen Lamina propria T-Lymphozyten in Biopsien von Menschen ohne CED (non-IBD LP T-Lymphozyten):

n (CD3+ Zellen) = 35. n (CD3+CD4+ Zellen) = 22. n (CD3+CD4- Zellen) = 8.

Die Werte der $[Ca^{2+}]_i$ sind angegeben in arbitrary units (a.u.) = Ratio 405/485 * 1000.

sd: standard deviation. sem: standard error of the mean.

auf 2 mmol/l kommt es daher zu einem Kalziumeinstrom durch die CRAC-Kanäle in das Zytosol. In der Messkurve zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Ratiowerte mit der Ausbildung eines Kalziumpeaks gefolgt von einem Kalziumplateau. Die Senkung der extrazellulären Kalziumkonzentration zurück auf 0 mmol/l ermöglicht die Erfassung der Kalziumclearance. Die Bestimmung der Zeitkonstante der Kalziumclearance erfolgte durch Anpassen einer einfachen Exponentialfunktion an den abfallenden Bereich der Messkurve, der das Absinken der intrazellulären Kalziumkonzentration nach dem letzten Lösungswechsel abbildet.

Tabelle 4: Messdaten der IBD_{inflamed} LP T-Lymphozyten vom Menschen

CD3+ Zellen	[Ca ²⁺] _i (a.u.)	sd	sem
Ruhekalzium	1153.9	166.9	74.7
Kalziumpeak	2712.1	357.2	159.7
Kalziumplateau	1733.6	632.2	282.7

CD3+CD4+ Zellen	[Ca ²⁺] _i (a.u.)	sd	sem
Ruhekalzium	1073.3	49.1	24.5
Kalziumpeak	2634.9	360.1	180.1
Kalziumplateau	1745.3	706.3	353.1

CD3+CD4- Zellen	[Ca ²⁺] _i (a.u.)	sd	sem
Ruhekalzium	1476.0	-	-
Kalziumpeak	3020.8	-	-
Kalziumplateau	1686.6	-	-

Messdaten der gewebsständigen Lamina propria T-Lymphozyten in Biopsien aus entzündeten Darmabschnitten von Menschen mit CED (IBD_{inflamed} LP T-Lymphozyten):

n (CD3+ Zellen) = 5. n (CD3+CD4+ Zellen) = 4. n (CD3+CD4- Zellen) = 1.

Die Werte der [Ca²⁺]_i sind angegeben in arbitrary units (a.u.) = Ratio 405/485 * 1000.

sd: standard deviation. sem: standard error of the mean.

In Kapitel 4.1.1 wurde bereits auf die Schwierigkeiten hingewiesen, welche sich bei der Entwicklung der Methode zur Messung zytosolischer Kalziumkonzentrationen in gewebsständigen Lamina propria Lymphozyten vom Menschen ergaben. Auch wenn es gelang, die genannten Probleme zu lösen, so war die Erhebung der Daten für diese Zellpopulation dennoch mit einem erheblichen Material- und Zeitaufwand verbunden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher bei den Messungen mit gewebsständigen LP T-Zellen jeweils nur relativ kleine Zellzahlen analysiert. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Daten aus

Tabelle 5: Messdaten der IBD_{non-inflamed} LP T-Lymphozyten vom Menschen

CD3+ Zellen	[Ca ²⁺] _i (a.u.)	sd	sem
Ruhekalzium	956.8	119.5	26.1
Kalziumpeak	1579.6	708.9	154.7
Kalziumplateau	1118.8	505.2	110.2

CD3+CD4+ Zellen	[Ca ²⁺] _i (a.u.)	sd	sem
Ruhekalzium	941.9	113.4	26.7
Kalziumpeak	1548.8	691.0	162.9
Kalziumplateau	1073.8	481.4	113.5

CD3+CD4- Zellen	[Ca ²⁺] _i (a.u.)	sd	sem
Ruhekalzium	1046.1	93.4	53.9
Kalziumpeak	1764.3	667.7	385.5
Kalziumplateau	1389.1	475.1	274.3

Messdaten der gewebsständigen Lamina propria T-Lymphozyten in Biopsien aus nicht entzündeten Darmabschnitten von Menschen mit CED (IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen):

n (CD3+ Zellen) = 21. n (CD3+CD4+ Zellen) = 18. n (CD3+CD4- Zellen) = 3.

Die Werte der [Ca²⁺]_i sind angegeben in arbitrary units (a.u.) = Ratio 405/485 * 1000.

sd: standard deviation. sem: standard error of the mean.

allen Experimenten mit gewebsständigen LP T-Lymphozyten vom Menschen ist in den Tabellen 3, 4 und 5 sowie in Abbildung 15 dargestellt. Die Messdaten sind dabei aufgeschlüsselt nach den drei unterschiedlichen Arten von Gewebeproben, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden: Biopsien aus Kolon oder Rektum von Patienten ohne CED (non-IBD LP T-Zellen), Biopsien aus entzündeten Darmabschnitten von Patienten mit CED (IBD_{inflamed} LP T-Zellen) und Biopsien aus nicht entzündeten Darmabschnitten von Patienten mit CED (IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen). Aufgrund der z.T. geringen Zellzahlen wurde in Abbildung 15 von einer

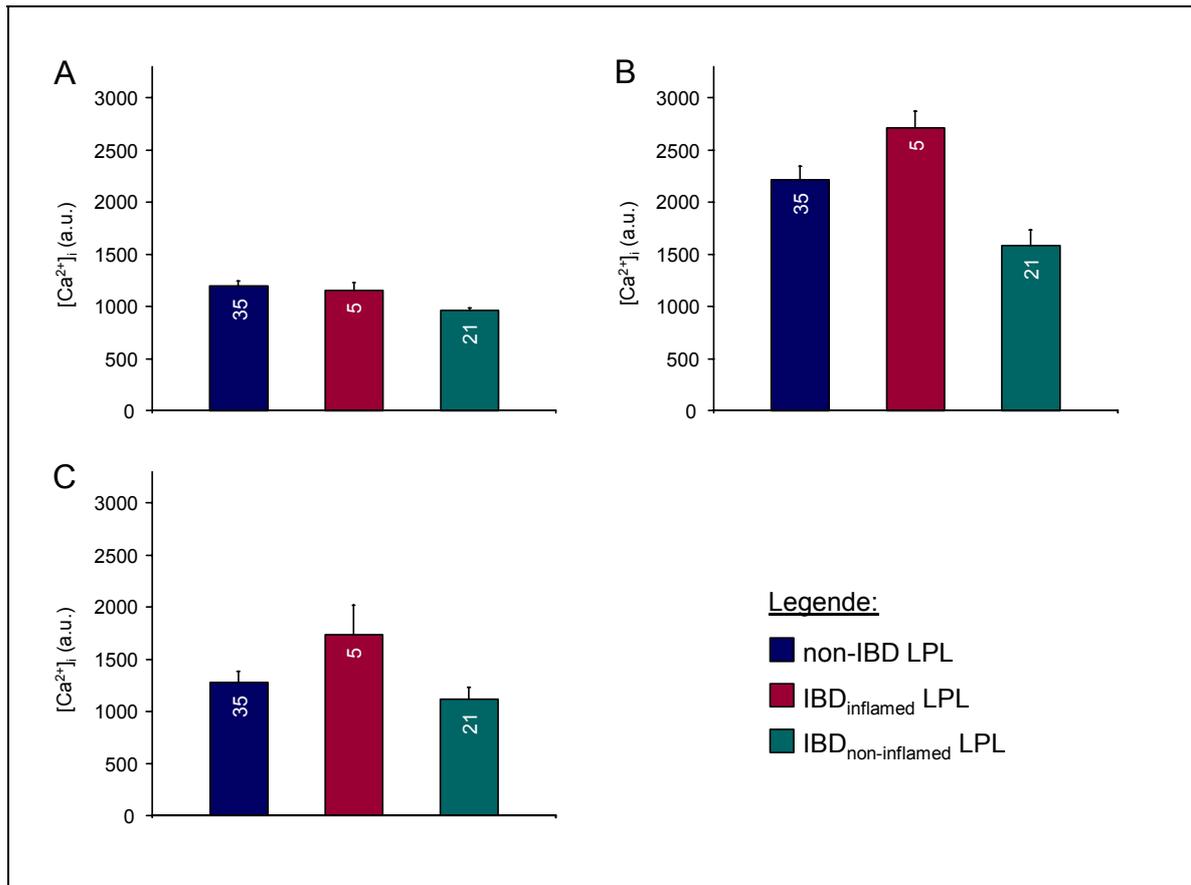


Abbildung 15: Statistische Analyse der $[Ca^{2+}]_i$ Messungen in LP T-Lymphozyten vom Menschen. Die gezeigten Daten beziehen sich auf die Gesamtheit der CD3+ LP T-Zellen. Von einer getrennten Darstellung der CD3+CD4+ bzw. CD3+CD4- Zellen wurde abgesehen. Die Experimente wurden, wie in Abbildung 11 beschrieben, durchgeführt. Die Nummern in den Balken stehen für die Anzahl der analysierten Zellen pro Zellpopulation. Die T-Balken zeigen den sem. Die Werte der $[Ca^{2+}]_i$ sind angegeben in arbitrary units (a.u.) = Ratio 405/485 * 1000. (A) Ruhekalzium. (B) Kalziumpeak. (C) Kalziumplateau. Bzgl. der Signifikanz der Unterschiede s. Kapitel 4.2.2 u. 4.2.3.

getrennten Darstellung der Subpopulationen der CD3+CD4+ bzw. CD3+CD4- Zellen abgesehen. Die Analyse der Daten der Lamina propria T-Lymphozyten zeigt, dass Kalziumpeak und Kalziumplateau in den LP T-Zellen aus entzündetem Gewebe (IBD_{inflamed} LP T-Zellen) höher ausfallen als in LP T-Zellen aus nicht entzündetem Gewebe (non-IBD LP T-Zellen und IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen). Signifikant ist dieser Unterschied jedoch nur für den Vergleich Kalziumpeak IBD_{inflamed} LP Zellen vs. IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen ($p < 10^{-3}$).

4.2.3 Vergleich der Kalziumsignale in PB Lymphozyten und LP Lymphozyten vom Menschen

Zum Vergleich der Kalziumsignale von peripheren Blut T-Lymphozyten und Lamina propria T-Lymphozyten vom Menschen sind in Abbildung 16 die Messdaten aller untersuchten T-Zellpopulationen aufgeführt: PB T-Zellen, non-IBD LP T-Zellen, IBD_{inflamed} LP T-Zellen und IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen. Die Darstellung der Daten erfolgt in Form von Balkendiagrammen. Die Nummern in den Balken stehen für die Anzahl der analysierten Zellen pro Zellpopulation. Die T-Balken zeigen den sem. Eine Analyse der Subpopulationen der CD3+CD4+ bzw. CD3+CD4- Zellen wurde nur für die PB T-Zellen vorgenommen und ist dem Kapitel 4.2.1 zu entnehmen.

Der Kalziumpeak und das Kalziumplateau sind in non-IBD LP T-Zellen um 20% bzw. 35% niedriger als in peripheren Blut T-Lymphozyten (Vergleich Kalziumpeak non-IBD LP T-Zellen vs. PB T-Zellen, $p < 10^{-3}$; Vergleich Kalziumplateau non-IBD LP T-Zellen vs. PB T-Zellen, $p < 10^{-6}$). Der durch die Speicherentleerung gesteuerte Netto-Kalziumeinstrom (= Kalziumeinstrom – Kalziumausstrom) ist folglich in den non-IBD LP T-Zellen im Vergleich zu den PB T-Lymphozyten deutlich vermindert.

Für einen abschätzenden Vergleich des Brutto-Kalziumeinstroms (= Kalziumeinstrom ohne Abzug des Kalziumausstroms) beider Zellpopulationen anhand der Messwerte des Kalziumplateaus ist die Kalziumclearance zu berücksichtigen. Die Zeitkonstante der Kalziumclearance liegt in non-IBD LP T-Zellen dabei leicht über der in PB T-Lymphozyten (Unterschied nicht signifikant). Die Kalziumclearance erfolgt in non-IBD LP T-Zellen also tendenziell langsamer, der Kalziumausstrom ist geringer. Während des Kalziumplateaus befinden sich Brutto-Kalziumeinstrom und Kalziumausstrom in einem Fließgleichgewicht. Je geringer der Kalziumausstrom ist, desto niedriger wird auch der Brutto-Kalziumeinstrom sein, der vorliegen muss, um ein bestimmtes Niveau des Kalziumplateaus zu erreichen. Dass bei den non-IBD LP T-Zellen der Kalziumausstrom, wenn auch nicht signifikant, niedriger ist als bei den PB T-Lymphozyten, bedeutet also, dass die Differenz zwischen diesen beiden Zellpopulationen hinsichtlich des Brutto-Kalziumeinstroms als eher noch

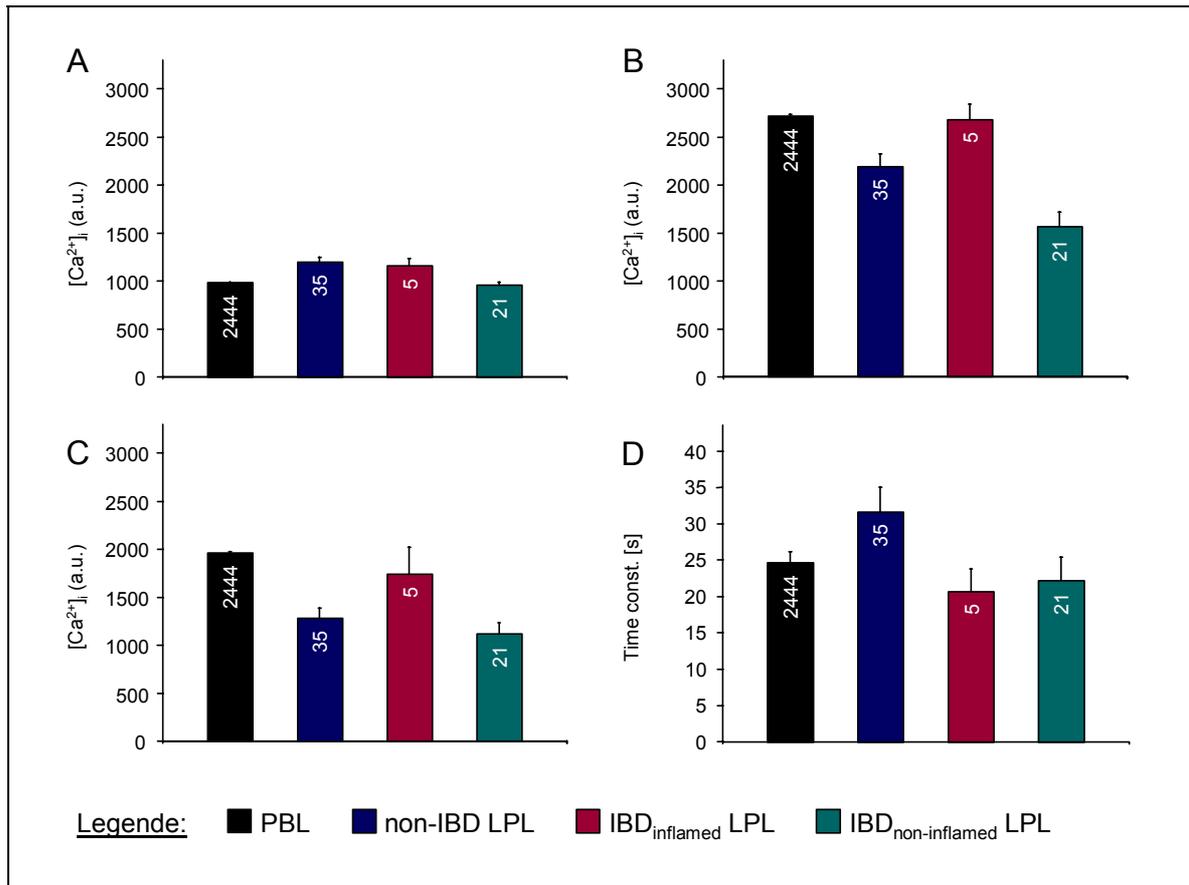


Abbildung 16: Statistische Analyse der $[Ca^{2+}]_i$ Messungen in PB und LP T-Lymphozyten vom Menschen.

Die gezeigten Daten beziehen sich auf die Gesamtheit der CD3⁺ Zellen. Von einer getrennten Darstellung der CD3⁺CD4⁺ bzw. CD3⁺CD4⁻ Zellen wurde abgesehen. Die Experimente wurden, wie in Abbildung 11 beschrieben, durchgeführt. Die Nummern in den Balken stehen für die Anzahl der analysierten Zellen pro Zellpopulation. Die T-Balken zeigen den sem. Die Werte der $[Ca^{2+}]_i$ sind angegeben in arbitrary units (a.u.) = Ratio 405/485 * 1000. (A) Ruhekalzium. (B) Kalziumpeak. (C) Kalziumplateau. (D) Kalziumclearance. Kalziumpeak und Kalziumplateau sind in non-IBD LP T-Zellen signifikant niedriger als in PB T-Lymphozyten. Die Kalziumsignale in IBD_{inflamed} LP T-Zellen erreichen hingegen Werte, die nur geringfügig und nicht signifikant unter denen der PB T-Lymphozyten liegen.

größer einzuschätzen ist als der Unterschied, welcher für das Kalziumplateau respektive den Netto-Kalziumeinstrom gemessen wurde.

Die Analyse der Daten von 5 Lamina propria T-Zellen aus entzündeten Dickdarmabschnitten eines Patienten mit CED (IBD_{inflamed} LP T-Zellen) zeigt, dass Kalziumpeak und Kalziumplateau in diesen Zellen höher ausfallen als in Lamina

propria T-Lymphozyten aus nicht entzündetem Gewebe (non-IBD LP T-Zellen und IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen) (signifikant nur für den Vergleich Kalziumpeak IBD_{inflamed} LP T-Zellen vs. IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen, $p < 10^{-3}$). Die Zeitkonstante der Kalziumclearance der IBD_{inflamed} LP T-Zellen ist niedriger als die der Lamina propria T-Lymphozyten aus nicht entzündetem Gewebe (non-IBD LP T-Zellen und IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen) (Unterschiede nicht signifikant). Die Kalziumclearance in den Lamina propria T-Zellen aus entzündetem Gewebe erfolgt also tendenziell schneller. Der Unterschied hinsichtlich des speichergesteuerten Brutto-Kalziumeinstroms zwischen IBD_{inflamed} LP T-Zellen und Lamina propria T-Lymphozyten aus nicht entzündetem Gewebe (non-IBD LP T-Zellen und IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen) ist demnach eher noch größer als der Unterschied in Bezug auf den Netto-Kalziumeinstrom. Im Vergleich mit den peripheren Blut T-Lymphozyten liegen die Mittelwerte für den Kalziumpeak und das Kalziumplateau in den IBD_{inflamed} LP T-Zellen nur geringfügig unterhalb der Mittelwerte der PB T-Lymphozyten, so dass hinsichtlich dieser Parameter kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zellpopulationen gefunden wurde.

Die Daten der 18 T-Zellen in Biopsien aus nicht entzündeten Darmabschnitten von 2 Probanden mit CED (IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen) zeigen einen Mittelwert für den Kalziumpeak, der signifikant unter den Mittelwerten der anderen untersuchten T-Zellpopulationen liegt (IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen vs. PB T-Zellen, $p < 10^{-6}$; IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen vs. non-IBD LP T-Zellen, $p < 0.01$; IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen vs. IBD_{inflamed} LP T-Zellen, $p < 10^{-3}$). Hinsichtlich des Kalziumplateaus findet sich ein signifikanter Unterschied nur beim Vergleich mit den PB T-Lymphozyten, wobei das Kalziumplateau der IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen signifikant niedriger als das der PB T-Lymphozyten ist ($p < 10^{-6}$). Für den Vergleich der IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen mit den IBD_{inflamed} LP T-Zellen ist hinsichtlich der nicht vorliegenden Signifikanz des gemessenen Unterschiedes für das Kalziumplateau die geringe Zellzahl dieser Zellpopulationen zu berücksichtigen, liegt doch der Mittelwert für das Kalziumplateau der IBD_{inflamed} LP T-Zellen um mehr als 50% über dem der IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen. Deutlich geringer hingegen fällt der ebenfalls nicht signifikante Unterschied zwischen den Kalziumplateaus der beiden LP T-Zellpopulationen aus nicht entzündetem Gewebe aus, den IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen und den non-IBD LP T-Zellen. Da das Kalziumplateau der IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen dabei unter dem

der non-IBD LP T-Zellen liegt, die Kalziumclearance in den IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen jedoch schneller erfolgt als in den non-IBD LP T-Zellen, ist zwischen diesen beiden Zellpopulationen der Unterschied hinsichtlich des Brutto-Kalziumeinstroms als noch geringer einzuschätzen als die in Bezug auf das Kalziumplateau respektive den Netto-Kalziumeinstrom gemessene Differenz.

4.3 Kalziumsignale in PB Lymphozyten und LP Lymphozyten der Maus

4.3.1 Kalziumsignale in PB Lymphozyten

Die Isolierung und Beladung der peripheren Blut T-Lymphozyten wurde, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, durchgeführt. Die Messung der Kalziumsignale nach Stimulation mit TG erfolgte sowohl was den zeitlichen Ablauf betrifft als auch hinsichtlich der verwendeten Lösungen nach demselben Protokoll wie die Untersuchung der PB T-Lymphozyten vom Menschen (s. Kapitel 4.2.1). Zur Identifizierung der T-Zellen dienten wie bei den Versuchen mit Untersuchungsmaterial vom Menschen fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen T-zellspezifische Oberflächenstrukturen (CD3, CD4) (s. Kapitel 3.6 und 4.1.1). Abbildung 17 verdeutlicht die ratiometrische Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration mit Indo-1 in identifizierten PB T-Zellen der Maus anhand eines für diese Zellpopulation typischen Imagingexperiments. Dargestellt sind mit Indo-1 beladene PB T-Zellen der Maus (A, B) sowie die zur T-Zellidentifizierung nach der Antikörperfärbung gemachten Bilder (C, D). Darüber hinaus zeigt Abbildung 17 (E) die Kinetik des Durchschnittsratios aller in diesem Experiment erfassten CD3⁺ Zellen. Die statistische Analyse der Daten aus allen Experimenten mit murinen peripheren Blut T-Lymphozyten ist in Tabelle 6 und in Abbildung 18 dargestellt. Insgesamt wurden 6 Experimente mit murinen PB T-Lymphozyten durchgeführt und dabei die Kalziumsignale von 542 T-Lymphozyten erfasst und statistisch ausgewertet. Die Zeitkonstante des Rückgangs der zytosolischen Kalziumkonzentration wurde bei den Experimenten mit murinen Zellen nicht bestimmt.

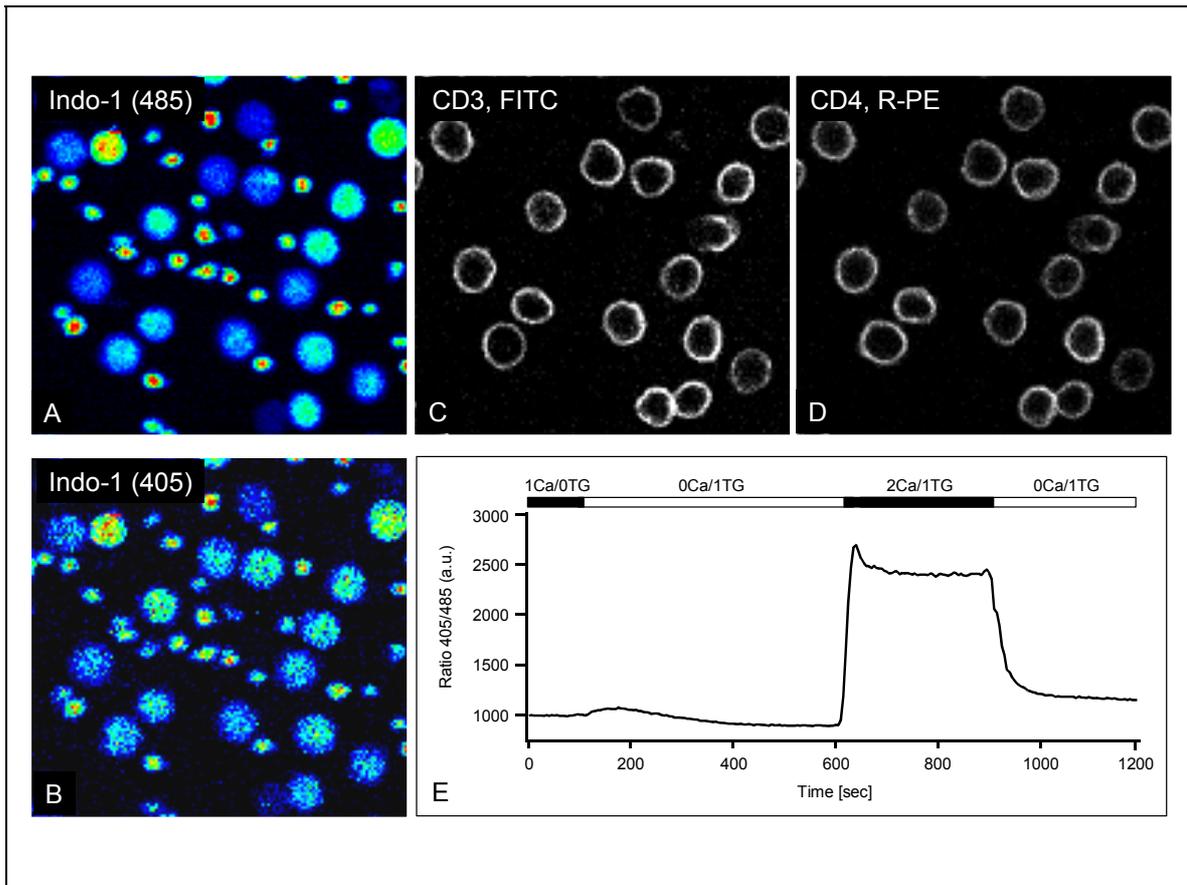


Abbildung 17: Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in peripheren Blut T-Lymphozyten der Maus.

(A, B) Mit Indo-1 gefärbte PB T-Zellen der Maus. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen, 405 nm und 485 nm. (C, D) T-Zellidentifizierung im Anschluss an das Kalziumimagingexperiment: Die Zellen wurden auf dem Mikroskoptisch mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. (E) Durchschnittsratio 405/485 aller CD3+ Zellen eines Experiments mit PB T-Zellen der Maus. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit TG, wie in Abbildung 11 beschrieben.

Die Aufschlüsselung nach CD3+CD4+ und CD3+CD4- Zellen zeigt, dass der überwiegende Anteil der untersuchten CD3+ Zellen auch CD4+ positiv war (92.3% CD3+CD4+ vs. 7.7% CD3+CD4-). Es ist dabei darauf hinzuweisen, dass die Qualität der gewonnenen Ratiosignale, z.B. hinsichtlich Hintergrundrauschen oder Verlust von Signalen, für die CD3+CD4+ Zellen besser war als für die CD3+CD4- Zellen. Beim Vergleich der Messwerte der Subpopulationen der murinen PB T-Zellen findet sich für die CD3+CD4- Zellen sowohl ein leicht höherer Kalziumpeak als auch ein etwas höheres Kalziumplateau als für die CD3+CD4+ Zellen.

Tabelle 6: Messdaten der PB T-Lymphozyten der Maus

CD3+ Zellen	[Ca ²⁺] _i (a.u.)	sd	sem
Ruhekalzium	1013.3	134.6	5.8
Kalziumpeak	1848.3	604.8	26.0
Kalziumplateau	1388.6	479.0	20.6

CD3+CD4+ Zellen	[Ca ²⁺] _i (a.u.)	sd	sem
Ruhekalzium	1005.5	127.4	5.7
Kalziumpeak	1833.6	612.4	27.4
Kalziumplateau	1385.3	480.2	21.5

CD3+CD4- Zellen	[Ca ²⁺] _i (a.u.)	sd	sem
Ruhekalzium	1100.1	163.1	25.2
Kalziumpeak	1997.3	475.5	73.4
Kalziumplateau	1417.1	444.3	68.6

Messdaten der peripheren Blut T-Lymphozyten der Maus:

n (CD3+ Zellen) = 542. n (CD3+CD4+ Zellen) = 500. n (CD3+CD4- Zellen) = 42.

Die Werte der [Ca²⁺]_i sind angegeben in arbitrary units (a.u.) = Ratio 405/485 * 1000.

sd: standard deviation. sem: standard error of the mean.

Diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu hatte die Analyse der humanen PB T-Zellen sowohl einen signifikant höheren Kalziumpeak als auch ein signifikant höheres Kalziumplateau für die CD3+CD4+ Zellen erbracht (s. Kapitel 4.2.1).

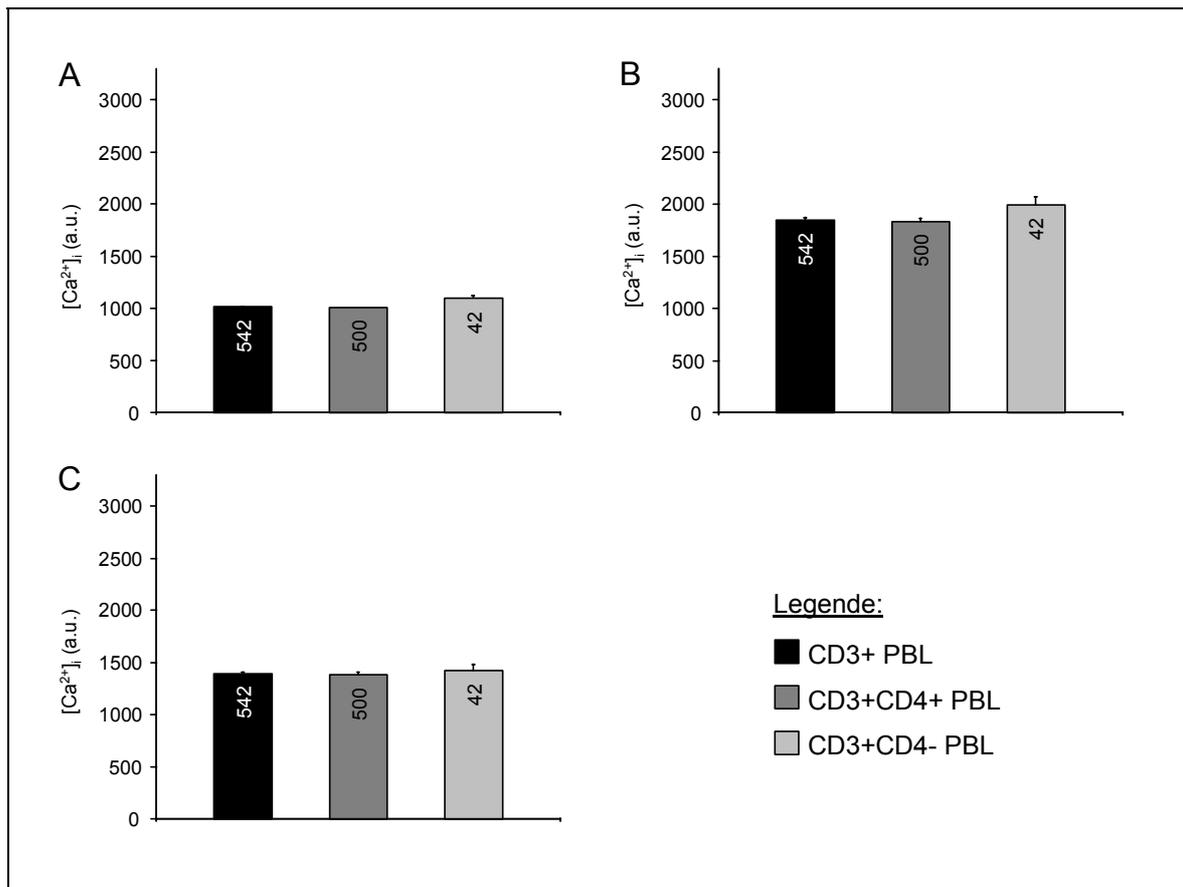


Abbildung 18: Statistische Analyse der $[Ca^{2+}]_i$ Messungen in PB T-Lymphozyten der Maus.

Die Experimente wurden, wie in Abbildung 11 beschrieben, durchgeführt. Die Nummern in den Balken stehen für die Anzahl der analysierten Zellen pro Zellpopulation. Die T-Balken zeigen den sem. Die Werte der $[Ca^{2+}]_i$ sind angegeben in arbitrary units (a.u.) = Ratio 405/485 * 1000. (A) Ruhekalzium. (B) Kalziumpeak. (C) Kalziumplateau. Anders als bei den PB T-Zellen vom Menschen generieren bei den murine PB T-Zellen die CD3+CD4- Zellen höhere Kalziumantworten als die CD3+CD4+ Zellen. Die Unterschiede zwischen den beiden Subpopulationen sind jedoch sowohl hinsichtlich des Kalziumpeaks als auch des Kalziumplateaus nicht signifikant.

4.3.2 Kalziumsignale in dissoziierten Darmlymphozyten

Für die Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration in dissoziierten Darm T-Lymphozyten der Maus wurden die Zellen, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, isoliert. Die Durchführung der Experimente erfolgte dabei nach demselben Protokoll wie die Versuche mit den PB T-Zellen vom Menschen bzw.

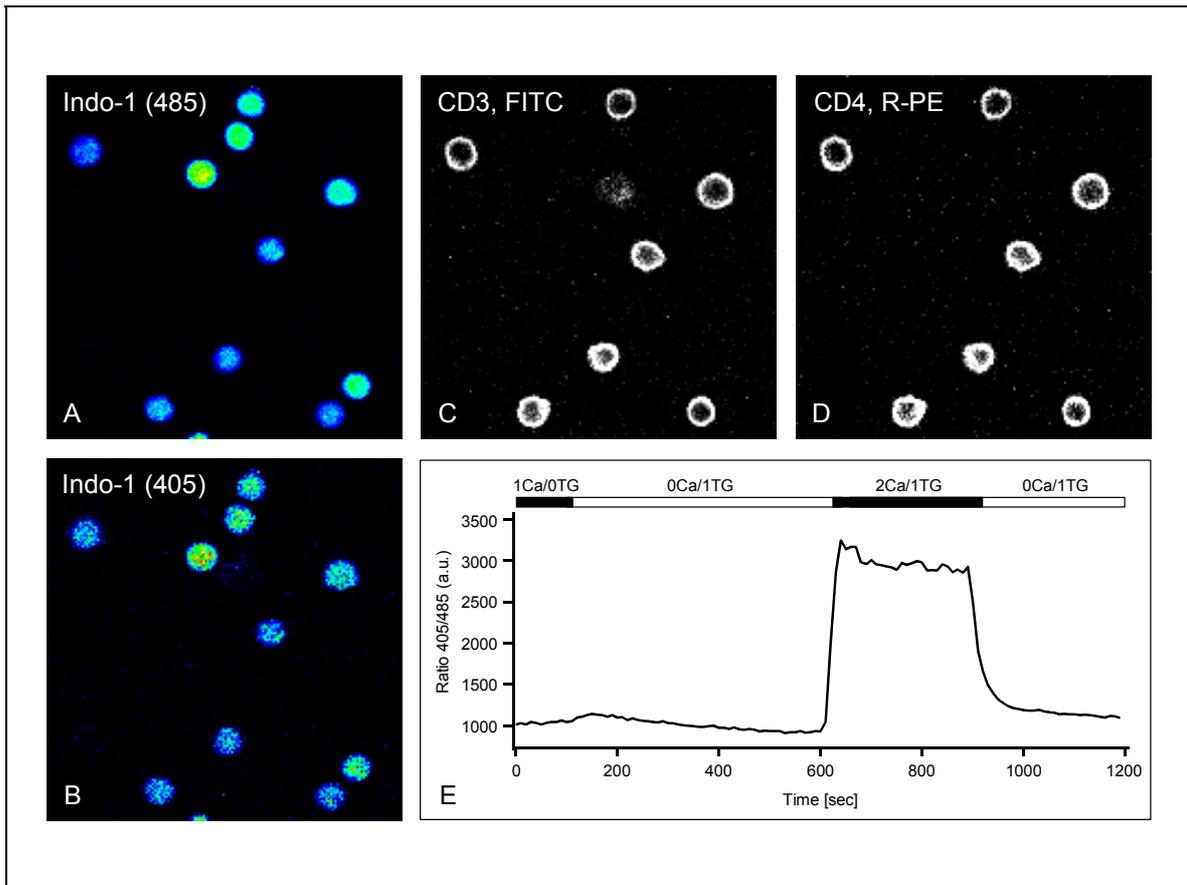


Abbildung 19: Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in dissoziierten Darm T-Zellen der Maus.

(A, B) Mit Indo-1 gefärbte Darm T-Zellen der Maus. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen, 405 nm und 485 nm. (C, D) T-Zellidentifizierung im Anschluss an das Ca^{2+} -Imaging-Experiment: Die Zellen wurden auf dem Mikroskoptisch mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Alle Zellen des gezeigten Bildausschnitts sind $CD3+CD4+$. Insgesamt waren 91.9% aller untersuchten Darm T-Zellen der Maus $CD3+CD4+$. (E) Durchschnittsratio 405/485 aller $CD3+$ Zellen eines Experiments mit dissoziierten Darm T-Zellen der Maus. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit TG, wie in Abbildung 11 beschrieben.

den PB T-Zellen der Maus (s. Kapitel 4.2.1 bzw. 4.3.1). Abbildung 19 verdeutlicht das Vorgehen anhand eines Beispiels. Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen der mit Indo-1 beladenen (A, B) bzw. mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbten Zellen (C, D). Abbildung 19 (E) zeigt die Kinetik des Durchschnittsrates aller $CD3+$ Zellen eines Experiments mit dissoziierten Darm T-Zellen der Maus.

Tabelle 7: Messdaten der dissoziierten Darm T-Lymphozyten der Maus

CD3+ Zellen	[Ca ²⁺] _i (a.u.)	sd	sem
Ruhekalzium	975.8	114.1	7.2
Kalziumpeak	2920.6	771.4	49.0
Kalziumplateau	2119.0	540.2	34.3

CD3+CD4+ Zellen	[Ca ²⁺] _i (a.u.)	sd	sem
Ruhekalzium	974.5	115.1	7.6
Kalziumpeak	2936.5	754.8	50.0
Kalziumplateau	2126.0	526.9	34.9

CD3+CD4- Zellen	[Ca ²⁺] _i (a.u.)	sd	sem
Ruhekalzium	986.3	95.9	21.4
Kalziumpeak	2635.2	915.9	204.8
Kalziumplateau	2044.4	694.6	155.3

Messdaten der dissoziierten Darm T-Lymphozyten der Maus:

n (CD3+ Zellen) = 248. n (CD3+CD4+ Zellen) = 228. n (CD3+CD4- Zellen) = 20.

Die Werte der [Ca²⁺]_i sind angegeben in arbitrary units (a.u.) = Ratio 405/485 * 1000.

sd: standard deviation. sem: standard error of the mean.

Statistisch ausgewertet wurden die Daten aus 7 Experimenten mit insgesamt 248 dissoziierten murinen Darm T-Lymphozyten. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 7 und Abbildung 20 zusammengefasst. Die Zeitkonstante des Rückgangs der zytosolischen Kalziumkonzentration wurde bei den Experimenten mit murinen Zellen nicht ermittelt.

Die Aufschlüsselung nach CD3+CD4+ und CD3+CD4- Zellen erbrachte, dass wie bei den peripheren Blut T-Lymphozyten der Maus der überwiegende Anteil der Zellen CD3+CD4+ war (91,9% CD3+CD4+ vs. 8,1% CD3+CD4-) und die Qualität der gewonnenen Ratiosignale, z.B. hinsichtlich Hintergrundrauschen oder Verlust

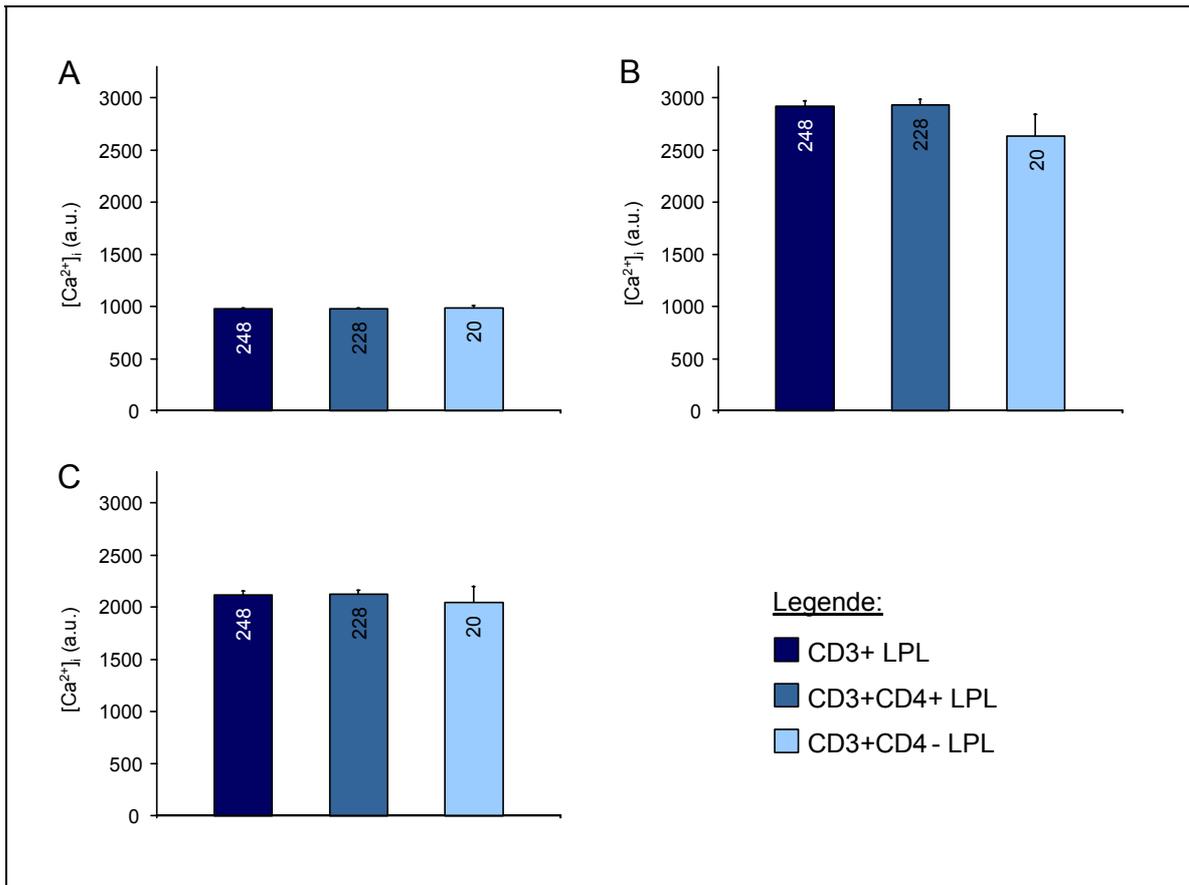


Abbildung 20: Statistische Analyse der $[Ca^{2+}]_i$ Messungen in dissoziierten Darm T-Zellen der Maus. Die Experimente wurden, wie in Abbildung 11 beschrieben, durchgeführt. Die Nummern in den Balken stehen für die Anzahl der analysierten Zellen pro Zellpopulation. Die T-Balken zeigen den sem. Die Werte der $[Ca^{2+}]_i$ sind angegeben in arbitrary units (a.u.) = Ratio 405/485 * 1000. (A) Ruhekalzium. (B) Kalziumpeak. (C) Kalziumplateau. Im Gegensatz zu den murinen PB T-Zellen liegen bei den dissoziierten Darm T-Zellen der Maus die Mittelwerte des Kalziumpeaks und des Kalziumplateaus der CD3+CD4+ Zellen über denen der CD3+CD4- Zellen. Die beobachteten Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

von Signalen, für die CD3+CD4+ Zellen besser ausfiel als für die CD3+CD4- Zellen. Anders als bei den PB T-Lymphozyten der Maus zeigt sich in der Analyse der Kalziumsignale jedoch, dass bei den dissoziierten Darm T-Zellen der Maus die Subpopulation der CD3+CD4+ Zellen sowohl einen höheren Kalziumpeak als auch ein leicht höheres Kalziumplateau generiert als die Subpopulation der CD3+CD4- Zellen. Die beobachteten Unterschiede sind allerdings nicht signifikant.

4.3.3 Kalziumsignale in gewebsständigen LP Lymphozyten

Das Ziel der Arbeit mit Gewebeproben aus dem Intestinaltrakt der Maus war, die Entwicklung einer Methode, die es ermöglicht, mit Hilfe der Zwei-Photonen-Mikroskopie die Messung zytosolischer Kalziumkonzentration in identifizierten T-Zellen im Gewebeverband der Lamina propria vorzunehmen. Die Aufgabenstellung beschränkte sich auf den Nachweis der prinzipiellen Durchführbarkeit der Messungen und beinhaltete nicht die Erhebung einer für eine statistische Analyse

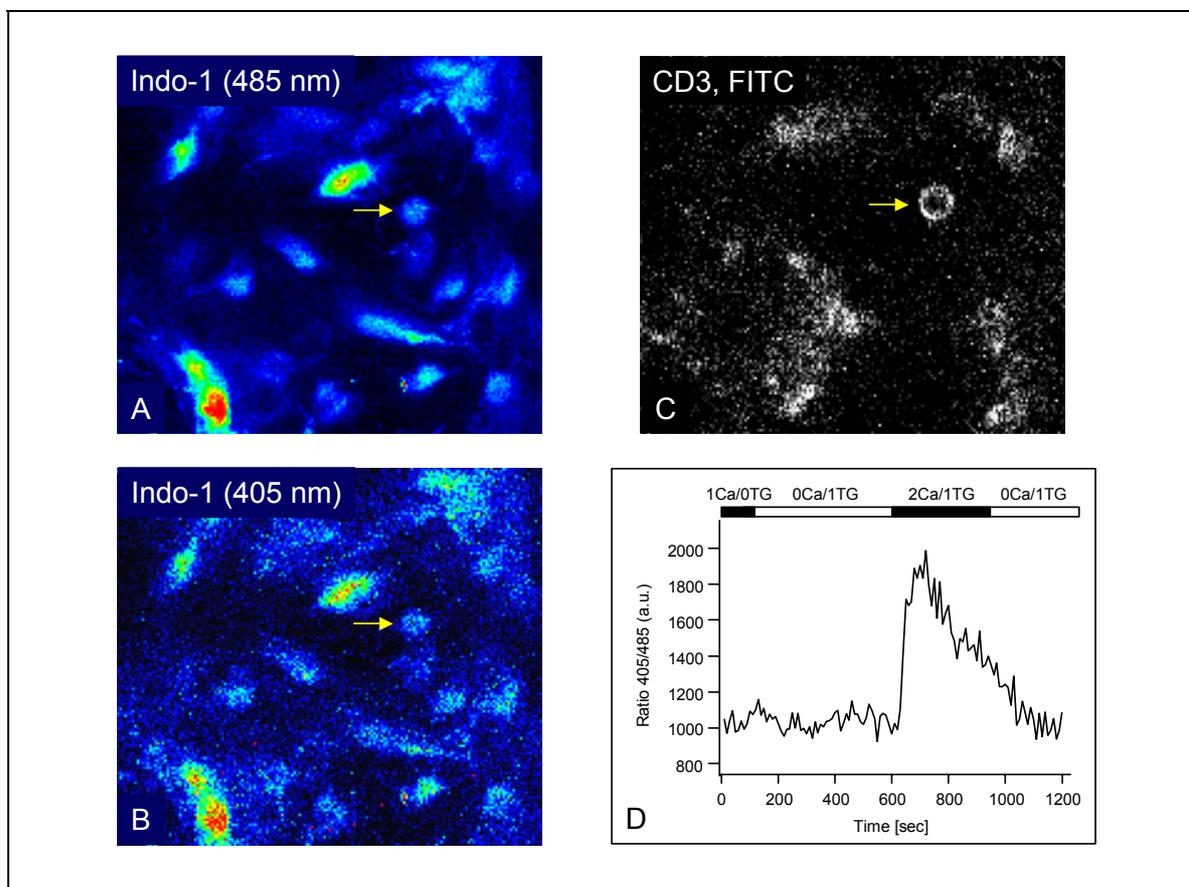


Abbildung 21: Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in gewebsständigen LP T-Zellen der Maus.

(A, B) Ausschnitt aus einer mit Indo-1 gefärbten Gewebeprobe. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei zwei unterschiedlichen Emissionswellenlängen, 405 nm und 485 nm. (C) T-Zellidentifizierung im Anschluss an das Kalziumimagingexperiment: Die Zellen wurden auf dem Mikroskopisch mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Der gelbe Pfeil zeigt auf eine CD3+ Zelle. (D) Kinetik des Ratio 405/485 der mit dem gelben Pfeil markierten Zelle. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit TG, wie in Abbildung 11 beschrieben.

ausreichenden Datenmenge. In diesem Kapitel wird deshalb ein Beispiel-experiment vorgestellt, in dessen Rahmen es gelang, die Kalziumsignale in einer identifizierten gewebsständigen Lamina propria T-Zelle der Maus zu erfassen.

Die Gewebeprobe der Maus wurde, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, präpariert, mit Indo-1 beladen und in die Messapparatur eingebracht. Die Messung der Kalziumsignale nach Stimulation mit Thapsigargin erfolgte hinsichtlich des zeitlichen Ablaufs und der verwendeten Lösungen nach demselben Protokoll wie bei den Untersuchungen der gewebsständigen Lamina propria Lymphozyten vom Menschen (s. Kapitel 4.2.2). Der Identifizierung der T-Lymphozyten dienten die auch bei den Versuchen mit dissoziierten Zellen der Maus verwendeten fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen T-zellspezifische Oberflächenstrukturen (s. z.B. Kapitel 4.3.1).

In Abbildung 21 ist das Vorgehen graphisch dargestellt. Abbildung 21 (A) und (B) zeigen den untersuchten Ausschnitt aus einer mit Indo-1 beladenen Gewebeprobe. Ebenfalls abgebildet ist die Fluoreszenzaufnahme desselben Ausschnittes nach Färbung mit FITC-konjugierten anti-CD3 Antikörpern (C). Der gelbe Pfeil markiert einen CD3+ Zelle, die als LP T-Lymphozyt zu identifizieren ist. Die Kalziumkinetik dieser Zelle findet sich in Abbildung 21 (D).

4.3.4 Vergleich der Kalziumsignale in PB Lymphozyten und dissoziierten Darmlymphozyten der Maus

Zum Vergleich der Kalziumsignale in PB T-Lymphozyten und dissoziierten Darm T-Lymphozyten der Maus sind in Abbildung 22 die Messdaten aller CD3+ Zellen der beiden Zellpopulationen in Form von Balkendiagrammen aufgeführt. Auf eine getrennte Darstellung der Werte der CD3+CD4+ bzw. CD3+CD4- Zellen wurde aufgrund der verhältnismäßig geringen Zellzahlen für die Subpopulation der CD3+CD4- Zellen verzichtet, so dass diesbezüglich auf die Kapitel 4.3.1 und 4.3.2 verwiesen wird.

Die Mittelwerte des Kalziumpeaks bzw. des Kalziumplateaus der murinen peripheren Blut T-Lymphozyten sind signifikant niedriger als die der dissoziierten Darm T-Zellen der Maus (Kalziumpeak, $p < 10^{-58}$; Kalziumplateau, $p < 10^{-54}$). Der

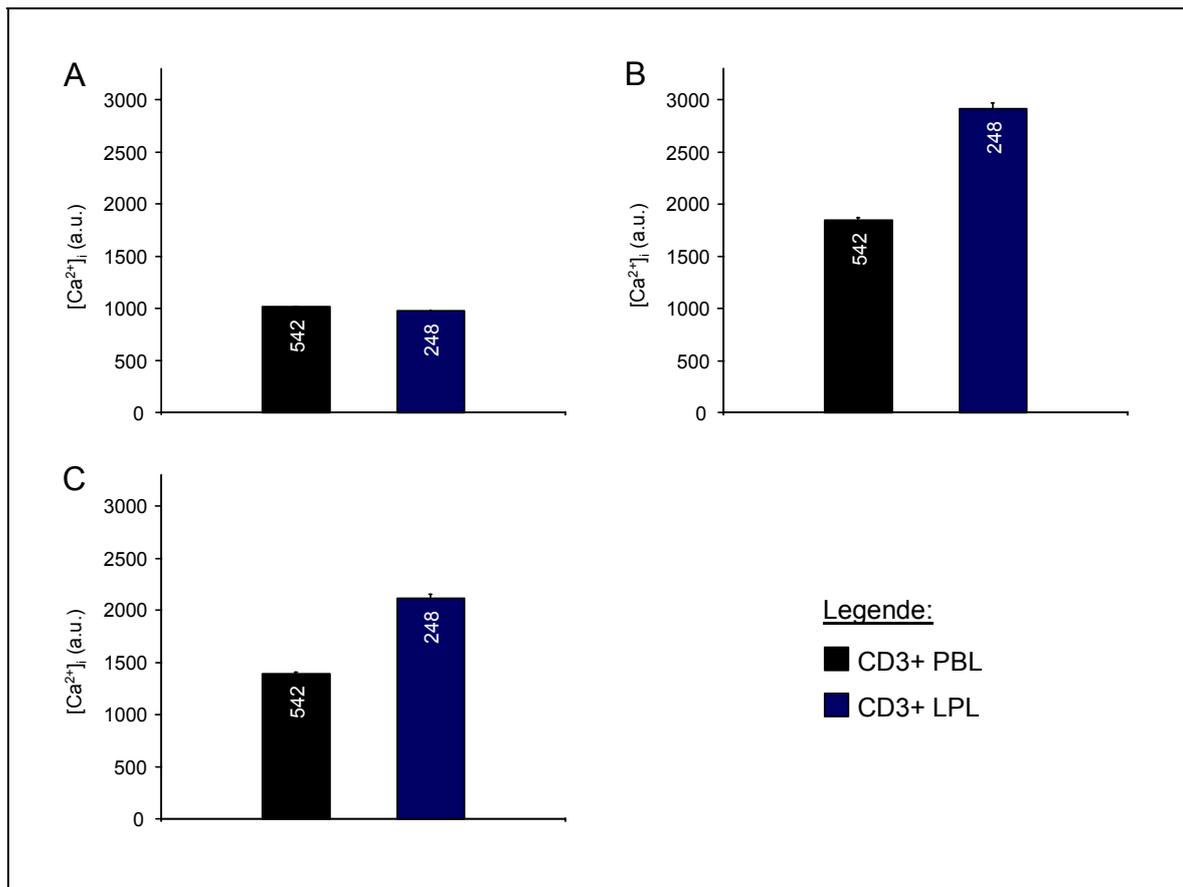


Abbildung 22: Statistische Analyse der $[Ca^{2+}]_i$ Messungen in PB T-Lymphozyten und dissoziierten Darm T-Zellen der Maus.

Die gezeigten Daten beziehen sich auf die Gesamtheit der CD3+ Zellen. Von einer getrennten Darstellung der CD3+CD4+ bzw. CD3+CD4- Zellen wurde abgesehen. Die Experimente wurden, wie in Abbildung 11 beschrieben, durchgeführt. Die Nummern in den Balken stehen für die Anzahl der analysierten Zellen pro Zellpopulation. Die T-Balken zeigen den sem. Die Werte der $[Ca^{2+}]_i$ sind angegeben in arbitrary units (a.u.) = Ratio 405/485 * 1000. (A) Ruhekalzium. (B) Kalziumpeak. (C) Kalziumplateau. Die Mittelwerte des Kalziumpeaks bzw. des Kalziumplateaus der murinen peripheren Blut T-Lymphozyten sind signifikant niedriger als die der dissoziierten Darm T-Zellen der Maus. Die Versuche mit PB T-Lymphozyten und gewebständigen LP T-Zellen des Menschen hatten diesbezüglich sich umgekehrt verhaltende Daten erbracht.

durch die Speicherentleerung gesteuerte Netto-Kalziumeinstrom (= Kalziumeinstrom – Kalziumausstrom) fällt demnach in den murinen PB T-Lymphozyten signifikant kleiner aus als in den Darm T-Lymphozyten. Die Versuche mit PB T-Zellen und gewebständigen LP T-Lymphozyten des Menschen erbrachten diesbezüglich sich umgekehrt verhaltende Daten (s. Kapitel 4.2.3).

Die Zeitkonstante des Rückgangs der zytosolischen Kalziumkonzentration nach Reduktion der extrazellulären Kalziumkonzentration auf 0 mmol/l wurde bei den Experimenten mit murinen Zellen nicht ermittelt. Ein abschätzender Vergleich des Brutto-Kalziumeinstroms der peripheren Blut T-Lymphozyten und Darm T-Lymphozyten der Maus, wie er in Kapitel 4.2.3 im Rahmen der Analyse der Messergebnisse für die humanen Zellen durchgeführt wurde, ist daher nicht möglich.

5. Diskussion

5.1 Zur Entstehung unterschiedlicher Kalziumsignale

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Messung von Kalziumsignalen in PB T-Zellen, in LP T-Zellen in Gewebeproben von Patienten ohne CED (non-IBD LP T-Zellen), in LP T-Zellen in Gewebeproben aus entzündeten Darmabschnitten von Patienten mit CED (IBD_{inflamed} LP T-Zellen) und in LP T-Zellen in Gewebeproben aus nicht entzündeten Darmabschnitten von Patienten mit CED (IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen) sowie der Vergleich der so gewonnen Messdaten in Hinblick auf eine mögliche Korrelation zwischen der Höhe der Kalziumsignale und dem Aktivitätszustand der untersuchten Zellpopulationen. Die im Kapitel „Ergebnisse“ dargestellten Daten zeigen, dass die Kalziumsignale von non-IBD LP T-Zellen nach Stimulation mit Thapsigargin signifikant niedriger sind als die Kalziumsignale der PB T-Zellen. IBD_{inflamed} LP T-Zellen generieren hingegen Kalziumantworten, die nur geringfügig unter denen der PB T-Zellen liegen (Unterschiede nicht signifikant), jedoch deutlich höher ausfallen als die der LP T-Zellen aus nicht entzündeten Darmabschnitten (non-IBD LP T-Zellen und IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen) (Unterschiede z.T. signifikant). Diese Befunde korrelieren sowohl mit der physiologischen Hyporeaktivität von LP T-Zellen gegenüber PB T-Zellen als auch mit der pathologischen Hyperreaktivität des mukosalen Immunsystems bei den CED. Im Folgenden soll diskutiert werden, wie es zum einen zur Ausbildung unterschiedlicher Kalziumsignale in T-Lymphozyten kommen kann (dieses Kapitel), und wie zum anderen diese unterschiedlichen Kalziumsignale den Aktivitätsgrad von T-Zellen bzw. das Entzündungsgeschehen beeinflussen können (Kapitel 5.2).

Die Aktivierung von T-Lymphozyten über den T-Zellrezeptor und über co-stimulatorische Signale führt wie bereits in Kapitel 2.1 dargestellt über verschiedene Signalkaskaden zu einem Kalziumeinstrom über die Plasmamembran in die Zellen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird davon ausgegangen, dass der Kalziumeinstrom nach der T-Zellrezeptorstimulation ausschließlich durch die sogenannten CRAC-Kanäle erfolgt. Hierfür spricht u.a. die Tatsache, dass die Ströme, welche dem Kalziumeinstrom nach Stimulation des TCR einerseits bzw.

dem speichergesteuerten Kalziumstrom andererseits zugrunde liegen, identische Eigenschaften aufweisen [Zweifach A et al., 1993]. Des Weiteren hemmt der spezifische CRAC-Kanalblocker BTP2 gleichermaßen TCR-induzierte Kalziumsignale und T-Zellaktivierung bzw. -proliferation [Zitt C et al., 2004]. Nicht zuletzt sei an dieser Stelle noch einmal auf das bereits im Kapitel 2.1 erwähnte Krankheitsbild des schweren kombinierten Immundefekts SCID hingewiesen, bei dem die CRAC-Kanalaktivität vollständig fehlt. Die T-Zellen der SCID-Patienten zeigen nach Stimulation über den TCR keinen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration [Partiseti M et al., 1994; Le Deist F et al., 1995; Feske S et al., 2005]. Es ist offensichtlich, dass die CRAC-Kanäle demnach eine wichtige Komponente in Bezug auf die Ausbildung unterschiedlich hoher Kalziumsignale darstellen. Während jedoch die Eigenschaften der CRAC-Kanäle relativ gut charakterisiert sind, besteht hinsichtlich des molekularen Aufbaus weiterhin Unklarheit. Es gilt als wahrscheinlich, dass die sogenannten TRP-Proteine (transient receptor potential, TRP) am molekularen Aufbau der CRAC-Kanäle beteiligt sind. In welcher Weise die verschiedenen TRP-Proteine in den unterschiedlichen Zellpopulationen exprimiert werden, ist jedoch nach wie vor Gegenstand der Forschung [Clapham DE, 2003; Prakriya M et al., 2003; Nilius B, 2004]. Es bleibt daher abzuwarten, inwiefern es durch unterschiedliche Kombinationen von TRP-Proteinen und eventuellen anderen Kandidatenproteinen in den verschiedenen Zellpopulationen zur Bildung von CRAC-Kanälen mit unterschiedlichen Eigenschaften und damit letztlich auch zur Ausbildung unterschiedlicher Kalziumsignale kommt.

Eine weitere wichtige Einflussgröße in Bezug auf den Kalziumstrom stellt das Membranpotential dar. Das Membranpotential kann dabei als treibende Kraft für den Kalziumstrom betrachtet werden, wobei eine Hyperpolarisation zu einer Verstärkung, eine Depolarisation hingegen zu einer Abschwächung dieser Triebkraft führt. In T-Zellen wird die Ausbildung des Membranpotentials vor allem durch verschiedene Kaliumkanäle beeinflusst. In CD4⁺ T-Zellen sind in diesem Zusammenhang zwei Kaliumkanäle hervorzuheben, die spannungsabhängigen Kv1.3 Kanäle und die kalziumaktivierten IKCa1 Kanäle. Kv1.3 Kanäle werden nach Stimulation der T-Zellen über den TCR zur immunologischen Synapse hin lokalisiert und treten dort in Interaktion mit β_1 -Integrinen, was darauf hinweisen

könnte, dass ihnen eine zur Zeit noch unklare Rolle im Rahmen der T-Zellaktivierung zukommt [Panyi G et al., 2003; Chandy KG et al., 2004]. IKCa1 Kanäle werden bei der Aktivierung von T-Zellen hochreguliert [Ghanshani S et al., 2000]. Sie könnten Teil eines positiven Feed-back-Regelkreises sein, in dem ein Kalziueinstrom über die CRAC-Kanäle in einem ersten Schritt zu einer gesteigerten Aktivität der IKCa1 Kanäle führen würde, die in einem zweiten Schritt eine Hyperpolarisation des Membranpotentials mit sich brächte, welche ihrerseits in einem dritten Schritt eine weitere Verstärkung des Kalziueinstroms über die CRAC-Kanäle zur Folge hätte. Es wird daher zu überprüfen sein, inwieweit unterschiedliche Aktivitäten von Kaliumkanälen für die unterschiedlichen Kalziumsignale in PB und LP T-Zellen verantwortlich sind.

Auf die Rolle der Mitochondrien bei der Generierung von Kalziumsignalen in T-Zellen wurde bereits in Kapitel 2.1 hingewiesen. Die Mitochondrien scheinen als eine Art Kalziumpuffer zu agieren. Indem sie Kalzium in unmittelbarer Nähe der CRAC-Kanäle aufnehmen, wirken sie einer kalziumabhängigen Inaktivierung der CRAC-Kanäle entgegen und ermöglichen auf diese Weise letztlich einen größeren Kalziueinstrom in die Zelle. Umgekehrt kann in Ruhephasen aus den Mitochondrien Kalzium in das Zytosol abgegeben und so eine Rückkehr der zytosolischen Kalziumkonzentration zum Ausgangswert verzögert werden [Hoth M et al., 1997, 2000]. Um diese Funktionen ausüben zu können, ist die Lokalisation der Mitochondrien in Bezug auf die CRAC-Kanäle in der Plasmamembran von entscheidender Bedeutung. Insofern könnte darüber spekuliert werden, inwiefern nicht auch unterschiedliche Lokalisationen der Zellorganellen in den verschiedenen Zellpopulationen einen Beitrag zur Generierung unterschiedlich hoher Kalziumsignale leisten.

Neben dem Kalziueinstrom ist für die Ausbildung der Kalziumsignale in T-Zellen natürlich auch der Vorgang der Kalziumclearance von entscheidender Bedeutung. Den größten Beitrag zur Kalziumclearance in menschlichen T-Zellen leisten dabei Kalzium-ATPasen in der Plasmamembran der Zellen, die PMCA [Donnadieu E et al., 1992; Balasubramanyam M et al., 1993]. Die Pumpleistung der PMCA wird nach einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration mit einer zeitlichen Verzögerung hochreguliert [Bautista DM et al., 2002]. Daraus ergibt sich einerseits, dass im Rahmen einer nur kurz andauernden Aktivierung der CRAC-

Kanäle hohe Kalziumsignale erreicht werden können, wohingegen andererseits bei einem lang anhaltenden Kalziumeinstrom die Amplitude der intrazellulären Kalziumkonzentration durch die dem Einstrom entgegenarbeitenden PMCA limitiert wird. Auch wenn also die Bedeutung der PMCA für die Kalziumhomöostase der T-Lymphozyten unbestreitbar ist, so kommen sie doch als ursächlicher Faktor für die in dieser Arbeit gemessenen höheren Kalziumsignale der PB T-Zellen und IBD_{inflamed} LP T-Zellen bzw. die niedrigeren Kalziumantworten der non-IBD LP T-Zellen und IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen eher nicht in Frage. Von Schwarz et al. [Schwarz A et al., 2004] ebenso wie in der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Zeitkonstante der Kalziumclearance sowohl in PB T-Zellen als auch in IBD_{inflamed} LP T-Zellen niedriger war als in den LP T-Lymphozyten aus nicht entzündetem Gewebe (non-IBD LP T-Zellen und IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen) (Unterschiede nicht signifikant). Demnach erfolgt die Kalziumclearance durch die PMCA in PB T-Zellen und in IBD_{inflamed} LP T-Zellen eher schneller als in den LP T-Lymphozyten aus nicht entzündetem Gewebe. Die PMCA arbeiten also in PB T-Zellen und IBD_{inflamed} LP T-Zellen dem Kalziumeinstrom und damit der Ausbildung höherer Kalziumsignale entgegen. Sie können demnach nicht deren Ursache sein.

Ein Unterschied der Ruhekalziumkonzentration als Ursache für die Hyporeaktivität der LP T-Zellen wurde von de Maria et al. [De Maria R et al., 1993] postuliert. Es ist diesbezüglich jedoch darauf hinzuweisen, dass die Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen von de Maria et al. mittels FACS-Analysen (fluorescence activated cell sorter, FACS) durchgeführt wurden. Diese Methode bringt zwei Nachteile mit sich. Erstens sind mit ihr keine kinetischen Einzelzellanalysen möglich. Zweitens müssen die Zellen zur Identifizierung der T-Lymphozyten vor der Untersuchung mit einem FACS-Gerät mit Antikörpern beladen werden, wodurch die Zellen u.U. voraktiviert werden könnten. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode weist diese Nachteile nicht auf (siehe „Material und Methoden“). Unterschiede im Ruhekalzium zwischen LP T-Zellen und PB T-Zellen konnten mit ihr nicht bestätigt werden.

Ein weiterer Aspekt, der im Zusammenhang mit den Kalziumantworten und der Hyporeaktivität von LP T-Zellen aus nicht entzündetem Darm zu diskutieren ist, betrifft die unterschiedliche Stimulierbarkeit der verschiedenen T-Zellpopulationen

über den TCR. Qiao et al. kamen mittels FACS-Analysen zu dem Ergebnis, dass LP T-Zellen im Gegensatz zu PB T-Zellen generell nicht mit einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration auf eine Stimulation über den TCR antworten (zu den Nachteilen der FACS-Analyse s. oben) [Qiao L et al., 1991]. Im Gegensatz dazu zeigten Schwarz et al. anhand von Experimenten mit dissoziierten T-Lymphozyten zwar, dass non-IBD LP T-Zellen prinzipiell in der Lage sind, auf eine Stimulation des TCR mit OKT-3 zu antworten, dennoch wurde auch in diesen Untersuchungen eine unterschiedliche Stimulierbarkeit von non-IBD LP T-Zellen und PB T-Zellen über den TCR gemessen. Der Anteil der LP T-Zellen, die während der 500 sec andauernden Stimulation mit OKT-3 eine eindeutige Kalziumfreisetzung aus den intrazellulären Kalziumspeichern zeigte, war deutlich niedriger als der der PB T-Zellen (16% LP T-Zellen vs. 44% PB T-Zellen) [Schwarz A et al., 2004]. Zum einen generieren also LP T-Zellen, wenn sie stimuliert werden, niedrigere Kalziumantworten als PB T-Zellen, zum anderen scheint aber auch die Wahrscheinlichkeit, dass LP T-Zellen überhaupt auf eine TCR-Stimulation mit der Ausbildung eines Kalziumsignals reagieren, geringer zu sein als bei den PB T-Zellen.

5.2 Zur Wirkung unterschiedlicher Kalziumsignale

Aus den bisherigen Ausführungen geht hervor, dass eine Vielzahl von Mechanismen und Zellorganellen in den Kalziumhaushalt der T-Zellen eingebunden sind. Durch das Zusammenspiel der verschiedenen Komponenten können zahlreiche unterschiedliche Kalziumsignale erzeugt werden. Sie reichen von einzelnen Kalziumspikes und Kalziumoszillationen [Lewis RS et al., 1989; Dolmetsch RE et al., 1994] über plötzliche, aber länger andauernde Änderungen der Kalziumkonzentration [Hoth M et al., 1997] bis hin zu anhaltend erhöhten Kalziumspiegeln [Donnadieu E et al., 1992; Hoth M et al., 1997; Lewis RS, 2001]. Auch vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit gemessenen Unterschiede in den Kalziumsignalen von PB T-Zellen, non-IBD LP T-Zellen, IBD_{inflamed} LP T-Zellen und IBD_{non-inflamed} LP T-Zellen stellt sich dabei jedoch die Frage, wie die Zellen überhaupt in der Lage sind, diese unterschiedlichen Kalziumsignale zu

entschlüsseln. Unter einem etwas anderen Blickwinkel könnte die Frage auch lauten, wie ein dergestalt universeller Botenstoff wie Kalzium, der auf so viele Targets in den Zellen einwirkt [Lewis RS, 2001; Berridge MJ et al., 2003; Quintana A et al., 2005], dazu verwendet werden kann, selektive Antworten seitens der Zellen zu generieren.

Die bisher beobachteten Effekte der Kalziumsignale auf die T-Zellen sind vielfältig. Es finden sich innerhalb von Sekunden bis Minuten auftretende Veränderungen in der Motilität der Zellen und der Struktur des Zytoskeletts, genauso wie sich über Minuten bis Stunden zeigende Auswirkungen auf die Genexpression [Lewis RS, 2001]. Die Veränderungen hinsichtlich Motilität und Zytoskelett sind z.B. von Bedeutung, wenn die im Körper zirkulierenden T-Lymphozyten auf eine antigenpräsentierende Zelle (antigen presenting cell, APC) mit dem passenden Antigen treffen. In in vitro Experimenten konnte gezeigt werden, dass es in T-Zellen innerhalb von 30 sec., nachdem sie mit APCs in Kontakt getreten waren, zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration kam und die T-Zellen wenig später eine rundere Form annahmen bzw. ihre Fortbewegung einstellten [Donnadieu E et al., 1994; Neglescu PA et al., 1996]. Dass das Kalziumsignal für diesen Prozess von entscheidender Bedeutung ist, wurde zum einen dadurch nachgewiesen, dass eine Blockade des Kalziumanstiegs durch BAPTA/AM und hohe Kaliumkonzentrationen die Motilitätsänderungen der T-Zellen verhinderte. Zum anderen führten Erhöhungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen durch TG und Ionomycin auch unabhängig von einer Stimulation des TCR zu den beobachteten Form- und Motilitätsveränderungen der T-Lymphozyten [Neglescu PA et al., 1996]. Anhand von Experimenten, bei denen der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration blockiert wurde, konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Kalziumsignale auch für die Ausrichtung des Zytoskeletts hin zur Kontaktstelle zwischen T-Zelle und antigenpräsentierender Zelle notwendig sind. Eine entsprechende Ausrichtung des Zytoskeletts spielt für das Heranbringen von Co-Rezeptoren und damit für die Stabilisierung der immunologischen Synapse eine wichtige Rolle [Wülfing C et al., 1998].

Der Einfluss, den unterschiedliche intrazelluläre Kalziumkonzentrationen auf die Genexpression der T-Zellen haben, lässt sich u.a. dadurch erklären, dass es durch Kalzium aktivierte Transkriptionsfaktoren gibt, die eine unterschiedliche

Bindungsaffinität zu Kalzium aufweisen. Dolmetsch et al. [Dolmetsch RE et al., 1997] führten diesbezüglich Versuche mit HEL-spezifischen transgenen B-Zellen von Mäusen durch. Eine Applikation von HEL führt in diesen Zellen zu einer biphasischen Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration, die sich aus einem hohen transienten Kalziumsignal und einem anschließenden niedrigeren Kalziumplateau zusammensetzt. Diese biphasische Veränderung der Kalziumkonzentration bewirkt die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT, NF κ B und JNK (c-Jun N-terminal kinase). Es konnte dabei gezeigt werden, dass durch das kurze transiente Kalziumsignal nur NF κ B und JNK aktiviert werden, während das Kalziumplateau lediglich das Aktivitätsniveau von NFAT beeinflusst. Dieses Phänomen ist dadurch zu erklären, dass NF κ B und JNK zwar eine niedrigere Kalziumaffinität aufweisen, also höhere Kalziumkonzentrationen für ihre Aktivierung benötigen, dafür aber auch nach der Entfernung des Kalziums noch länger in einem aktivierten Zustand bleiben, während NFAT aufgrund einer höheren Kalziumaffinität schon durch niedrigere Kalziumkonzentrationen aktiviert wird, dieser Vorgang aber wesentlich schneller reversibel ist.

Die Transkriptionsfaktoren NFAT und NF κ B sind nicht nur deshalb interessant, weil sie eine unterschiedliche Affinität gegenüber Kalzium aufweisen und damit unterschiedlich auf Kalziumsignale reagieren, sondern auch, weil die Gene, deren Expression sie beeinflussen, für die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten eine wichtige Rolle spielen. NFAT kann dabei sowohl alleine als auch in einem Komplex mit dem Bindungspartner AP-1 an die DNA binden. Demnach können zwei Gruppen von NFAT-abhängigen Genen in T-Zellen unterschieden werden. Zu den durch den NFAT/AP-1 Komplex gesteuerten Genen gehören die Gene für IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF (granulocyte/macrophage-colony stimulating factor) und INF- γ (Interferon- γ). Durch NFAT alleine kontrolliert wird die Expression des TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) [Rao A et al., 1997; Macian F et al., 2001; Hogan PG et al., 2003]. Allen hier aufgeführten Genprodukten kommen vielfältige regulatorische Aufgaben im komplexen Netzwerk des Immunsystems zu.

NF κ B führt zu einer vermehrten Produktion vor allem proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. den TNF- α [Schottelius AJ et al., 1999; Tak PP et al., 2001]. Die erhöhten Kalziumsignale in LP T-Zellen von Patienten mit CED könnten also, auch

indem sie zu einer vermehrten Aktivierung von NFκB führen, die Induktion einer proinflammatorischen Immunantwort des darmassoziierten Immunsystems bewirken. Dass NFκB in den Zusammenhang mit entzündlichen Erkrankungen zu bringen ist, wird unter anderem z.B. daran deutlich, dass hohe NFκB-Aktivitäten in den Entzündungsherden verschiedenster Erkrankungen, wie Rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose oder CED, gefunden wurden. Umgekehrt konnten durch die spezifische Blockierung von NFκB Entzündungserkrankungen behandelt werden [Schottelius AJ et al., 1999; Tak PP et al., 2001; Quintana A et al., 2005].

Die in diesem Kapitel diskutierten Befunde machen deutlich, dass es in der Tat möglich ist, über unterschiedliche Kalziumsignale auf differenzierte Weise Informationen zu kodieren und vielfältige zelluläre Reaktionen zu steuern. Inwiefern dabei die Amplitude oder die Dauer der Kalziumsignale oder auch die Frequenz von Kalziumoszillationen die entscheidenden Komponenten sind, oder wie ein Zusammenspiel all dieser Faktoren sich im einzelnen auswirkt, ist Gegenstand der Forschung und soll in dieser Arbeit nicht weiter erörtert werden [Dolmetsch RE et al., 1998; Tomida T et al., 2003; Quintana A et al., 2005].

5.3 Einfluss des Mikroenvironments

Bereits in der Einleitung wurde darauf hingewiesen, dass durch das Zusammenspiel von Darminhalt, besonderen anatomischen Gegebenheiten, Zellen des Immunsystems und der Zellmatrix im Gastrointestinaltrakt ein besonderes Mikroenvironment entsteht. Unter diesen Bedingungen gelingt es dem darmassoziierten Immunsystem, eine Balance herzustellen zwischen der effektiven Abwehr pathogener Antigene einerseits und der notwendigen Toleranz harmloser Antigene andererseits. Obwohl also das darmassoziierte Immunsystem durch ein besonderes natürliches Umfeld gekennzeichnet ist, wurden bei seiner Erforschung aufgrund technischer Schwierigkeiten bisher fast ausschließlich Arbeiten mit isolierten Lymphozyten durchgeführt. Die Isolierung der Zellen bedeutet jedoch gerade eine Zerstörung des Microenvironments, die Auflösung von Zell-zu-Zellkontakten und die drastische Verdünnung oder vollständige Auswaschung löslicher mukosaler Faktoren. Aus diesem Grunde wurde in der

vorliegenden Arbeit erstmals eine Methode entwickelt, mit welcher es möglich ist, zytosolische Kalziumkonzentrationen in identifizierten T-Lymphozyten in der intakten Lamina propria zu messen. Eines der Ziele war dabei zu untersuchen, inwieweit sich die Kalziumantworten dissoziierter und gewebsständiger LP T-Zellen unterscheiden, und so einen Beitrag zur Beantwortung der Frage zu leisten, welchen Einfluss das Microenvironment des Darmes auf die Kalziumsignale der Lamina propria T-Lymphozyten hat.

In Untersuchungen mit dissoziierten LP T-Zellen vom Menschen konnte gezeigt werden, dass die Höhe der Kalziumsignale der LP T-Lymphozyten gut mit der Reaktivität der verschiedenen Zellpopulationen korreliert, wobei hyporeaktive LP T-Zellen aus nicht entzündetem Gewebe niedrigere Kalziumsignale generieren als LP T-Zellen aus entzündeten Darmabschnitten und PB T-Zellen [Schwarz A et al., 2004]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Befunde auch für LP T-Zellen im Gewebeverband der intakten Lamina propria. Die Vergleichbarkeit der Daten dissoziierter und gewebsständiger Zellen bedeutet im Umkehrschluss jedoch auch, dass der unmittelbare Einfluss des Microenvironments der Lamina propria auf die Ausprägung der Kalziumsignale der LP T-Zellen nur von geringer Bedeutung sein kann. Es erscheint demnach unwahrscheinlich, dass o.g. Komponenten, wie z.B. lösliche mukosale Faktoren, direkt für die unterschiedlich hohen Kalziumsignale der verschiedenen Zellpopulationen nach Stimulation mit Thapsigargin verantwortlich sind. Es ist jedoch keinesfalls auszuschließen, dass das Microenvironment eine langanhaltende Reduktion der Kalziumkanalaktivität in der Plasmamembran von LP T-Zellen induziert, welche dann sowohl in gewebsständigen als auch in dissoziierten Zellen zu beobachten wäre.

Dass ein solch langanhaltender Einfluss des Microenvironments des Gastrointestinaltraktes auf LP T-Zellen durchaus vorstellbar ist, soll am Beispiel eines von Mowat et al. vorgestellten Funktionsmodells für das darmassoziierte Immunsystem des Dünndarms verdeutlicht werden [Mowat AM et al., 2003]. Die Induktion einer Immunantwort im Dünndarm beginnt mit der Aufnahme von Antigenen durch das intestinale Immunsystem, wobei vermutet wird, dass hierfür sogenannte M-Zellen eine womöglich entscheidende Rolle spielen [Kernéis S et al., 1997]. Da M-Zellen nicht über MHC-Klasse-II-Moleküle verfügen, ist es weniger wahrscheinlich, dass sie selbst ein Antigen-Processing vornehmen. Es

wird vielmehr vermutet, dass M-Zellen intakte Antigene an die antigen-präsentierenden Zellen im Epithel oder der Domeregion der Peyerschen Plaques weiterleiten. Die APCs, wie z.B. die dendritischen Zellen, wandern von dort in die T-Zellregionen oder B-Zellfollikel der PP, wo sie in Kontakt mit naiven Lymphozyten treten. B-Zellen durchlaufen in den PP einen Wechsel der Immunglobulinklasse von IgM zu IgA, wobei mehrere Faktoren, wie z.B. IL-10, TGF- β und zelluläre Signale der dendritischen Zellen, eine wichtige Rolle spielen. T-Zellen hingegen entwickeln unter dem Einfluss des Microenvironments in den PP eine verminderte Ansprechbarkeit auf verschiedene physiologische Stimuli, wie z.B. Chemokine, welche eine Schlüsselrolle bei der Initiierung einer Immunantwort spielen [Kellermann SA et al., 2001]. Die so geprägten Lymphozyten werden in die zugehörigen mesenterialen Lymphknoten drainiert, wo sie weitere Differenzierungen durchlaufen, bis sie über den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf und schließlich zurück in die Darmmukosa gelangen. Für den Austritt der Lymphozyten aus den Blutgefäßen in die Mukosa ist von Bedeutung, dass Lymphozyten, welche durch den Antigenkontakt im intestinalen Immunsystem geprägt wurden, die Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin hochregulieren. Der Ligand für $\alpha_4\beta_7$ -Integrin ist MAdCAM-1 (mucosal addressin cell-adhesion molecule) und wird in hoher Dichte auf den Gefäßoberflächen der Schleimhautgefäße gebildet [Berlin C et al., 1993]. Des Weiteren wird in T-Zellen, welche im Darm geprägt wurden, der Chemokinrezeptor CCR9 exprimiert, der es ihnen ermöglicht, mit CCL25 zu interagieren, einem Chemokin, das selektiv von den Epithelzellen des Dünndarms gebildet wird. In dieser Kombination der Expression von Adhäsionsmolekül- und Chemokinrezeptoren unterscheiden sich die im Darm geprägten T-Zellen von T-Zellen aus anderen lymphatischen Geweben, so dass letztere nicht in die Schleimhautoberflächen des Darmes einwandern können. Dieses Beispiel zeigt, wie eine im darmassoziierten Immunsystem stattfindende langfristige Prägung die Zusammensetzung und die Funktion der Population der Lymphozyten in der Lamina propria beeinflussen kann.

Zusammenfassend zeichnet sich das darmassoziierte Immunsystem also dadurch aus, dass es unter den besonderen Gegebenheiten des Gastrointestinaltraktes eine physiologische Toleranz gegenüber harmlosen Antigenen entwickelt. Niedrigere Kalziumsignale in LP T-Zellen als in PB T-Zellen korrelieren gut mit

dieser Hyporeaktivität. Ein unmittelbarer Einfluss auf die Ausbildung der Kalziumsignale in den LP T-Lymphozyten kann dem Microenvironment der Lamina propria zumindest auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit jedoch nicht zugesprochen werden. Langanhaltende Effekte des Microenvironments auf die Kalziumkanalaktivität in der Plasmamembran der LP T-Zellen sind allerdings durchaus möglich.

5.4 Kalziummessungen in murinen LP Lymphozyten und Tiermodelle für CED

Einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen lieferte in den letzten Jahren die Etablierung von Tiermodellen für CED. Aus diesem Grunde war eines der Ziele dieser Arbeit die Entwicklung einer Methode zur Messung von Kalziumsignalen in PB T-Lymphozyten, dissoziierten LP T-Lymphozyten sowie gewebständigen LP T-Lymphozyten der Maus. Die im Kapitel „Ergebnisse“ aufgeführten Messdaten zeigen, dass die Kalziumsignale der murinen PB T-Lymphozyten nach Stimulation mit Thapsigargin signifikant niedriger ausfallen als die der murinen dissoziierten LP T-Lymphozyten. Im Gegensatz dazu waren bei den Untersuchungen mit humanem Zellmaterial in den PB T-Lymphozyten höhere Kalziumsignale als in den gewebständigen LP T-Lymphozyten gemessen worden.

Bei der Diskussion dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, inwiefern im intestinalen Immunsystem der Maus das Mikroenvironment des Darmes vielleicht einen bedeutenderen und unmittelbareren Einfluss auf die Ausbildung der Kalziumsignale ausübt, als dies beim Menschen der Fall ist. Es gilt zu klären, ob die gewebständigen LP T-Lymphozyten der Maus ebenso wie die dissoziierten LP T-Lymphozyten höhere Kalziumsignale als die PB T-Lymphozyten generieren, oder ob die Kalziumantworten der gewebständigen LP T-Lymphozyten der Maus wie beim Menschen niedriger ausfallen als die der PB T-Lymphozyten. In Zukunft wird es daher nötig sein, Kalziummessungen auch in gewebständigen LP T-Zellen der Maus vorzunehmen. Der Nachweis der prinzipiellen Durchführbarkeit solcher Messungen wurde in der vorliegenden Arbeit bereits erbracht.

Ein weiterer Aspekt, welcher bei der Diskussion der Messergebnisse der Versuche mit murinen T-Zellen zu berücksichtigen ist, ergibt sich aus der Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit keine Untersuchungen mit Tiermodellen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen vorgenommen wurden. Auch wenn also die dissoziierten Darm T-Zellen aus nicht entzündetem Gewebe bei der Maus anders als beim Menschen höhere Kalziumantworten ausbilden als die peripheren Blut T-Zellen, so ist anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nicht auszuschließen, dass die Kalziumsignale der murinen Darm T-Zellen aus nicht entzündetem Gewebe möglicherweise immer noch niedriger sind als die der T-Zellen aus entzündeten Darmabschnitten. Dann jedoch würde bei der Maus wie beim Menschen eine Korrelation zwischen der Höhe der Kalziumsignale in den LP T-Zellen und der Hyperreaktivität des darmassoziierten Immunsystems bei den CED bestehen.

Nicht zuletzt sei nochmals darauf hingewiesen, dass im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Kalziumantworten der verschiedenen T-Zellpopulationen auch der Aspekt der unterschiedlichen Stimulierbarkeit dieser Zellen über den TCR zu diskutieren ist. Wie bereits in Kapitel 5.1 dargestellt, zeigten Schwarz et al. anhand von dissoziierten T-Lymphozyten vom Menschen, dass nur 16% Prozent der LP T-Zellen, aber immerhin 44% der PB T-Zellen während einer 500 sec andauernden Stimulation des TCR durch OKT-3 mit einer Kalziumfreisetzung aus den intrazellulären Kalziumspeichern reagierten [Schwarz A et al., 2004]. Es bleibt demnach zu prüfen, wie sich die Kalziumsignale der PB T-Zellen bzw. LP T-Zellen der Maus unter dem Einfluss anderer Stimuli als dem in dieser Arbeit verwendeten SERCA-Inhibitor Thapsigargin darstellen.

Auch wenn gegenwärtig keines der zur Verfügung stehenden Tiermodelle für CED die Verhältnisse beim Menschen exakt widerspiegelt, so stellen sie doch wichtige Instrumente der aktuellen Forschung dar, mit denen es möglich ist, verschiedene Krankheitsaspekte in reproduzierbaren in vivo Systemen zu untersuchen. Unter Berücksichtigung der in dieser Diskussion angesprochenen Aspekte wäre es daher für die Zukunft wünschenswert, Arbeiten durchzuführen, welche die Kalziumsignale in murinen LP T-Lymphozyten im Gewebeverband gesunder und chronisch entzündeter Mukosa unter Einbeziehung verschiedener, möglichst physiologischer Stimuli untersuchten.

5.5 Zur Methode

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, mit der Zwei-Photonen-Technologie zytosolische Kalziumsignale in identifizierten T-Lymphozyten in der intakten Lamina propria zu messen. Bisher finden sich in der Literatur in Bezug auf T-Zellen fast ausschließlich Arbeiten, bei denen die Lymphozyten aus dem lymphatischen Gewebe herausgelöst und isoliert untersucht wurden. Die technischen Schwierigkeiten, welche die in situ Messungen mit sich bringen, führten dazu, dass erst in jüngster Vergangenheit Arbeiten publiziert wurden wie die von Bhakta et al. zur Messung von Kalziumsignalen in T-Lymphozyten des Thymus [Bhakta NR et al., 2005].

Bereits im Kapitel 4.1.1 wurde darauf hingewiesen, dass es bei der Entwicklung der Methode der vorliegenden Arbeit zwei zentrale Fragestellungen zu beantworten galt: 1. Wie ist es möglich, den Fluoreszenzfarbstoff Indo-1 tief genug in die Gewebeproben einzubringen, um die Lamina propria Lymphozyten mit einer ausreichenden Menge des Kalziumindikators zu beladen? 2. Wie ist es möglich, die Zellbewegungen bei der Untersuchung einer vitalen Gewebeprobe in hinreichendem Maße zu minimieren bzw. auszugleichen, um die Kalziumsignale über das gesamte Experiment hinweg verfolgen und identifizierten Zellen zuordnen zu können? Um die Zwei-Photonen-Technologie als Routineverfahren zur in situ Messung intrazellulärer Kalziumsignale zu etablieren, wird es in Zukunft darauf ankommen, die Lösung dieser zwei Probleme weiter zu optimieren.

Bezüglich des Problems der Zellbewegungen ist dabei zwischen den Bewegungen einzelner Zellen innerhalb des Gewebeverbandes und solchen der gesamten Gewebeprobe zu unterscheiden. Bewegungen einzelner Zellen sind Ausdruck der Vitalität der Probe und sollten nach Möglichkeit nicht beeinflusst werden, da sie Teil der T-Zellaktivität bzw. T-Zellaktivierung sein könnten. Verschiebungen des Gewebeverbandes als Ganzes gilt es hingegen zu minimieren. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Grid verwendet, um die Schleimhautproben mechanisch zu fixieren. In den meisten Experimenten wurde damit eine ausreichende Stabilität erzielt. Experimente mit zu großen Bewegungsartefakten, die eine korrekte Auswertung der Einzelzellen nicht gewährleisteten, wurden bei der Analyse nicht berücksichtigt. Eine Möglichkeit, die Fixierung der Gewebeproben künftig noch

weiter zu verbessern, könnte z.B. darin bestehen, die Unterseite der Gewebestücke mit inerten Substanzen, wie Cell-Tak™, auf dem Boden der Untersuchungskammer gewissermaßen festzukleben.

Für das Problem der Farbstoffbeladung finden sich unterschiedliche Lösungsansätze. So wurden in der bereits zitierten Arbeit von Bhakta et al. zunächst isolierte Thymozyten außerhalb des Gewebeverbands mit Indo-PE3 beladen und anschließend auf das zu untersuchende Thymuspräparat aufgebracht, in das die beladenen Zellen innerhalb einiger Stunden bis zu einer Tiefe von über 100 µm einwanderten [Bhakta NR et al., 2005]. Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit die Gewebeproben als Ganzes in eine 25 µM Indo1/AM-Lösung gegeben, und der Farbstoff gelangte per Diffusion zu den Lamina propria T-Lymphozyten. Da der Vorgang der Diffusion ein eher langsamer Prozess ist, ist eine ausreichende Beladung tiefliegender Gewebsschichten auf diesem Weg womöglich nicht für jedes Untersuchungsmaterial zu gewährleisten. Im Falle der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes erscheinen die räumlichen Voraussetzungen für eine Beladung per Diffusion dabei günstiger als bei anderen lymphatischen Geweben, da die intestinalen Krypten weit in die Gewebeproben hineinreichen und so das Eindringen der Farbstoffmoleküle erleichtern.

Andererseits ergeben sich bei der Arbeit mit Darmgewebe auch spezifische Schwierigkeiten, welche z.B. aus der Barriereeigenschaft des Schleimhautepithels erwachsen. So wird ein Großteil des Indo-1/AM von den mukosalen Epithelzellen aufgenommen und nach Abspaltung des Azetoxymethylesterrestes nicht mehr an die tiefer liegenden Gewebsschichten freigegeben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine ausreichende Beladung der Lamina propria T-Zellen mit dem Kalziumindikator deshalb erst erreicht, nachdem die Epithelschicht vor der Färbung der Probe entfernt worden war. Eine neue und hinsichtlich dieses Problems interessante Methode zur Beladung von Gewebeproben mit membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoffen wurde 2003 von Stosiek et al. für Kalziumimagingexperimente in Gehirngewebe vorgestellt [Stosiek C et al., 2003]. Bei dieser Methode wird eine Mikropipette mit der Farbstofflösung bis zur gewünschten Tiefe in die Gewebeprobe eingeführt, und die Farbstofflösung unter Druck in das Gewebe appliziert (400 fl, 0.7 bar, 1 min). Auf diese Weise war es möglich, Zellen bis zu einer Tiefe von 300 µm unter der Kortexoberfläche zu

detektieren. Stosiek et al. testeten das Verfahren für die AM-Ester verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, u.a. auch für Indo1/AM. Sollte sich ein solches Vorgehen auch auf Untersuchungen mit Darmgewebe übertragen lassen, könnte es in Zukunft vielleicht möglich sein, die Kalziumsignale von LP T-Zellen in Gewebeproben zu messen, welche sich nicht nur durch eine intakte Lamina propria, sondern vielmehr durch das Zusammenspiel aller mukosalen Gewebsschichten auszeichnen.

6. Literatur

1. **Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbohm A** (2001) Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Eng J Med* 344:808-814
2. **Balasubramanyam M, Kimura M, Aviv A, Gardner JP** (1993) Kinetics of calcium transport across the lymphocyte plasma membrane. *Am J Physiol* 265:321-327
3. **Bautista DM, Hoth M, Lewis RS** (2002) Enhancement of calcium signalling dynamics and stability by delayed modulation of the plasma-membrane calcium-ATPase in human T cells. *J Physiol (Lond)* 541:877-894
4. **Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, Holzmann B, Weissmann IL, Hamann A, Butcher EC** (1993) $\alpha_4\beta_7$ integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74:185-195
5. **Berridge MJ** (1993) Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* 361:315-325
6. **Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL** (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517-529
7. **Bhakta NR, Oh DY, Lewis RS** (2005) Calcium oscillations regulate thymocyte motility during positive selection in the three-dimensional thymic environment. *Nature Immunology* 6:143-151
8. **Boirivant M, Pica R, De Maria R, Testi R, Pallone F, Strober W** (1996) Stimulated human lamina propria T cells manifest enhanced Fas-mediated apoptosis. *J Clin Invest* 98:2616-2622.

9. **Braunstein J, Qiao L, Autschbach F, Schumann G, Meuer S** (1997) T cells of the human intestinal lamina propria are high producers of interleukin-10. *Gut* 41:215-220
10. **Brini M** (2003) Ca^{2+} signalling in mitochondria: mechanism and role in physiology and pathology. *Cell Calcium* 34:399-405
11. **Chandy KG, Wulff H, Beeton C, Pennington M, Gutman GA, Cahalan MD** (2004) K^+ channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci* 25:280-289
12. **Clapham DE** (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517-524
13. **Cosens J, Beaugerie L, Carbornel F, Gendre JP** (2001) Smoking cessation and the course of Crohn`s disease: an intervention study. *Gastroenterology* 120:1093-1099
14. **Crabtree GR, Olson EN** (2002) NFAT signalling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109:67-79
15. **Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiez L, Joly B, Cortot A, Colombel JF** (1998) Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn`s disease. *Gastroenterology* 115:1405-1413
16. **De Maria R, Fais S, Silvestri M, Frati L, Pallone F, Santoni A, Testi R** (1993) Continuous in vivo activation and transient hyporesponsiveness to TcR/CD3 triggering of human gut lamina propria lymphocytes. *Eur J Immunol* 23:3104-3108
17. **Denk W, Svoboda K** (1997) Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron* 18:351-357

18. **Dolmetsch RE, Lewis RS** (1994) Signaling between intracellular Ca^{2+} stores and depletion-activated Ca^{2+} channels generates $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations in T lymphocytes. *J Gen Physiol* 103:365-388
19. **Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI** (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration. *Nature* 386:855-858
20. **Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS** (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392:933-936
21. **Donnadieu E, Bismuth G, Trautmann A** (1992) Calcium fluxes in T lymphocytes. *J Biol Chem* 267:25864-25872
22. **Donnadieu E, Trautmann A** (1993) Is there a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in macrophages and in lymphocytes? *Pflügers Arch* 424:448-455
23. **Donnadieu E, Bismuth G, Trautmann A** (1994) Antigen recognition by helper T cells elicits a sequence of distinct changes of their shape and intracellular calcium. *Curr Biol* 4:584-595
24. **Duchen MR** (2000) Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol (Lond)* 529:57-68
25. **Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH** (1995) Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109:1344-1367
26. **Evans JM, McMahon AD, Murray FE, McDevitt DG, MacDonald TM** (1997) Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease. *Gut* 40:619-622

27. **Feske S, Prakriya M, Rao A, Lewis RS** (2005) A severe defect in CRAC Ca^{2+} channel activation and altered K^{+} channel gating in T cells from immunodeficient patients. *J Exp Med* 202:651-662
28. **Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG** (2000) Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem* 275:37137-37149
29. **Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY** (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450
30. **Gunter TE, Pfeiffer DR** (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* 258:755-786
31. **Hibi T, Ogata H, Sakuraba A** (2002) Animal models of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 37:409-417
32. **Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A** (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17:2205-2232
33. **Holtmann M, Mudter J, Galle PR, Neurath MF** (2002) Das mukosale Immunsystem – wie klar ist die Pathophysiologie? *Internist* 43:1343-1353.
34. **Hoth M, Fanger CM, Lewis RS** (1997) Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol* 137:633-648
35. **Hoth M, Button DC, Lewis RS** (2000) Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10607-10612

36. **Kellermann SA, McEnvoy LM** (2001) The Peyer's patch microenvironment suppresses T cell responses to chemokines and other stimuli. *J Immunol* 167:682-690
37. **Kernéis S, Bogdanova A, Kraehenbuhl JP, Pringault E** (1997) Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* 277:949-952
38. **van Leeuwen JE, Samelson LE** (1999) T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol* 11:242-248
39. **Le Deist F, Hivroz C, Partiseti M, Thomas C, Bue HA, Oleastro M, Belohradsky B, Choquet D, Fischer A** (1995) A primary T-cell immunodeficiency associated with defective transmembrane calcium influx. *Blood* 85:1053-1062
40. **Lewis RS, Cahalan MD** (1989) Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca^{2+} and transmembrane Ca^{2+} current in human leukemic T cells. *Cell Regul* 1:99-112
41. **Lewis RS** (1999) Store-operated calcium channels. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 33:279-307
42. **Lewis RS** (2001) Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 19:497-521
43. **Li Q, Verma IM** (2002) NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2:725-734
44. **Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Jarnerot G** (1988) Smoking and inflammatory bowel disease: a case control study. *Gut* 29:352-357

45. **Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A** (2001) Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20:2476-2489
46. **Mowat AM, Viney JL** (1997) The anatomical basis of mucosal immune responses. *Immunol Rev* 156:145-166
47. **Mowat AM** (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3:331-341.
48. **Neglescu PA, Krasieva TB, Khan A, Kerschbaum HH, Cahalan MD** (1996) Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity* 4:421-430
49. **Nilius B** (2004) Store-operated Ca^{2+} entry channels: still elusive! *Sci STKE* 2004:36
50. **Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen TIA, Binder V** (1991) Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 324:84-88
51. **Panyi G, Bagdany M, Bodnar A, Vamosi G, Szentesi G, Jenei A, Matyus L, Varga S, Waldmann TA, Gaspar R, Damjanovich S** (2003) Colocalization and nonrandom distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2592-2597
52. **Partiseti M, Le Deist F, Hivroz C, Fischer A, Korn H, Choquet D** (1994) The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency. *J Biol Chem* 269:32327-32335
53. **Penner R, Fleig A** (2004) Store-operated calcium entry: a tough nut to CRAC. *Sci STKE* 2004:38

54. **Podolsky DK** (1991) Inflammatory Bowel Disease. *N Eng J Med* 325:928-937
55. **Podolsky DK** (2002) Medical Progress: Inflammatory Bowel Disease. *N Eng J Med* 347:417-429
56. **Prakriya M, Lewis RS** (2003) CRAC channels: activation, permeation, and the search for a molecular identity. *Cell Calcium* 33:311-321
57. **Putney JW Jr.** (1990) Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11:611-624
58. **Qian D, Weiss A** (1997) T cell antigen receptor signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 9:205-212
59. **Qiao L, Schumann G, Betzler M, Meuer SC** (1991) Activation and signaling status of human lamina propria lymphocytes. *Gastroenterology* 101:1529-1536
60. **Quintana A, Griesemer D, Schwarz EC, Hoth M** (2005) Calcium-dependent activation of T-lymphocytes. *Eur J Physiol* 450:1-12
61. **Rao A, Luo C, Hogan PG** (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15:707-747
62. **Rath HC, Schultz M, Freitag R, Dielman LA, Li F, Linde HJ, Scholmerich J, Sartor RB** (2001) Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun* 69:2277-2285
63. **Schwarz A, Tutsch E, Ludwig B, Schwarz EC, Stallmach A, Hoth M** (2004) Ca²⁺ signaling in identified T-lymphocytes from human intestinal mucosa: relation to hyporeactivity, proliferation, and inflammatory bowel disease. *J Biol Chem* 279:5641-5647

64. **Schottelius AJ, Baldwin AS Jr** (1999) A role for transcription factor NF- κ B in intestinal inflammation. *Int J Colorectal Dis* 14:18-28
65. **Stosiek C, Garaschuk O, Holthoff K, Konnerth A** (2003) In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *PNAS* 100:7319-7324
66. **Strobel S, Mowat AM** (1998) Immunoresponses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol Today* 19:173-181
67. **Strober W, Ludviksson BR, Fuss IJ** (1998) The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn disease. *Ann Intern Med* 128:848-856
68. **Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H** (2002) Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122:44-54
69. **Tak PP, Firestein GS** (2001) NF- κ B: a key role in inflammatory bowel diseases. *J Clin Invest* 107:7-11
70. **Targan SR, Deem RL, Liu M, Wang S, Nel A** (1995) Definition of a lamina propria T cell responsive state. Enhanced cytokine responsiveness of T cells stimulated through the CD2 pathway. *J Immunol* 154:664-675.
71. **Thastrup O, Dawson AP, Scharff O, Foder B, Cullen PJ, Drobak BK, Bjerrum PJ, Christensen SB, Hanley MR** (1989) Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions* 27:17-23
72. **Timmerman LA, Clipstone NA, Ho SN, Northrop JP, Crabtree GR** (1996) Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca^{2+} signals and immunosuppression. *Nature* 383:837-840

73. **Tomida T, Hirose K, Takizawa A, Shibasaki F, Iino M** (2003) NFAT functions as a working memory of Ca^{2+} signals in decoding Ca^{2+} oscillation. *EMBO J* 22:3825-3832
74. **Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B** (1998) Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins: a study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 29:990-996
75. **Winslow MM, Neilson JR, Crabtree GR** (2003) Calcium signalling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 15:299-307
76. **Wirtz S, Neurath MF** (2000) Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 15:144-160
77. **Wülfing C, Davis MM** (1998) A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* 282:2266-2269
78. **Zitt C, Strauss B, Schwarz EC, Spaeth N, Rast G, Hatzelmann A, Hoth M** (2004) Potent inhibition of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2. *J Biol Chem* 279:12427-12437
79. **Zweifach A, Lewis RS** (1993) Mitogen-regulated Ca^{2+} current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6295-6299

7. Anhang

7.1 Publikationen und Preise

7.1.1 Paper

Tutsch E, Griesemer D, Schwarz A, Stallmach A, Hoth M (2004) Two-photon analysis of calcium signals in T lymphocytes of intact lamina propria from human intestine. *Eur J Immunol* 34:3477-3484

Schwarz A, Tutsch E, Ludwig B, Schwarz EC, Stallmach A, Hoth M (2004) Ca²⁺ signaling in identified T-lymphocytes from human intestinal mucosa: relation to hyporeactivity, proliferation, and inflammatory bowel disease. *J Biol Chem* 279:5641-5647

7.1.2 Abstracts

Tutsch E, Griesemer D, Schwarz A, Wolfs M, Ludwig B, Stallmach A, Hoth M (2003) Calcium signals in human and murine T-lymphocytes from intestine and blood using conventional and 2-Photon micoroscopy: implications for inflammation. *Pflüg Arch Europ J Physiol* 445:S66 (Suppl. 1)

Tutsch E, Griesemer D, Schwarz A, Hoth M, Stallmach A (2004) Analyzing calcium signals of identified human T-lymphocytes in intact human intestinal tissue using two-photon microscopy. *Gastroenterology* 126:A151-A151 (Suppl. 2)

Stallmach A, Schwarz A, Tutsch E, Ludwig B, Hoth M (2003) Ca²⁺ signals in human and murine T-lymphocytes from intestine and blood using conventional and 2-Photon microscopy. *FASEB J* 17:C322-C322 (Suppl. S)

7.1.3 Preise

Posterpreis – Grundlagen – der Gastroenterologischen Arbeitsgemeinschaft Rheinland-Pfalz / Saarland (GARPS) verliehen anlässlich der 17. Jahrestagung der GARPS in Bad Kreuznach 19.10.2002 für die wissenschaftliche Arbeit: „Erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} Signale in mukosalen Lymphozyten bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen“ von A. Schwarz und E. Tutsch

Wissenschaftspreis 2005 der Kreis- und Universitätsstadt Homburg verliehen am 21.11.2005 in Homburg für die wissenschaftliche Arbeit „Calciumsignale in T-Lymphozyten aus der Lamina propria des menschlichen Darms: Ein neuer Ansatz zum Verständnis chronisch entzündlicher Darmerkrankungen“ von A. Schwarz und E. Tutsch

7.2 Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Hoth danke ich sehr für die Betreuung dieser Arbeit, für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes, seine stete Gesprächsbereitschaft, die daraus erwachsenden anregenden Diskussionen, die konstruktive Kritik sowie die vielen hilfreichen Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. A. Stallmach danke ich sehr für die unterstützende Begleitung dieser Arbeit im Allgemeinen sowie die Bereitstellung der Darmbiopsien vom Menschen im Besonderen.

Frau Dr. D. Griesemer danke ich für die Erlaubnis, die von ihr angefertigte Darstellung der Kalziumsignalwege in T-Zellen als Abbildung 1 dieser Arbeit verwenden zu dürfen.

Frau Dr. D. Griesemer und Frau M. Wolfs danke ich für die Zusammenarbeit bei der Präparation muriner Proben.

Herrn Prof. B. Lindemann danke ich für die anregenden Gespräche und wertvollen Ratschläge in Bezug auf die Zwei-Photonen-Technologie.

Herrn A. Schwarz danke ich für die Einarbeitung in die Zwei-Photonen-Technologie und die Zusammenarbeit bei der Präparation humaner Proben.

Frau B. Strauß danke ich für die tatkräftige Unterstützung in allen Belangen der Zellkultur.

Herrn Dr. C. Zawar danke ich für die Einarbeitung in die konventionelle Imaging-Technologie.

Frau U. Legler danke ich für die organisatorische Hilfe und ihr reges Interesse an dieser Arbeit.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Hoth möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit bedanken. Besonders hervorheben möchte ich die immerwährende Gesprächsbereitschaft, die vielen Ratschläge und auch die moralische Unterstützung seitens folgender Kolleginnen und Kollegen: Dr. D. Griesemer, U. Legler, A. Schwarz, B. Strauß.

Meiner lieben Frau, Daniela Tutsch, danke ich von ganzem Herzen für ihr großartiges Verständnis, ihre liebevolle Geduld und ihre tatkräftige Unterstützung, mit denen sie mich während der gesamten Arbeit begleitet hat.

Meinen Eltern, Adelheid und Rüdiger Tutsch, danke ich von ganzem Herzen dafür, dass sie es mir ermöglicht haben, das Studium der Humanmedizin zu absolvieren und diese Doktorarbeit zu ergreifen, und nicht minder danke ich ihnen dafür, dass sie mich während all dieser Jahre so unermüdlich und uneigennützig unterstützt haben.

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Eberhard Tutsch

geboren am 05.12.1976 in Pforzheim

Familienstand: verheiratet

Nationalität: deutsch

Schulbildung

1983-1996 Freie Waldorfschule Karlsruhe, Karlsruhe

21.06.1996 Abitur

Zivildienst

1996-1997 Filderklinik, Filderstadt

Studium der Humanmedizin

1997-1999 Universität des Saarlandes, Homburg

16.09.1999 Ärztliche Vorprüfung

1999-2000 Université de Rennes 1, Rennes/Frankreich, ECTS-Programm

2000-2003 Universität des Saarlandes, Homburg

22.03.2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

09.09.2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2003-2004 Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg, Praktisches Jahr

04.11.2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

09.12.2004 Approbation als Arzt

Beruflicher Werdegang

seit dem 01.05.2005 Assistenzarzt am Vinzenz von Paul Hospital, Rottweil

Diese Arbeit widme ich in demütiger Dankbarkeit all den Studenten der Humanmedizin, welchen das Schicksal weniger gewogen scheint, so dass es ihnen trotz großen Engagements und erheblicher persönlicher Entbehrungen nicht vergönnt ist, ihre Doktorarbeit zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen.