

Modulation von Kalziumsignalen durch B7

Kostimulation in humanen T-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades

des Doktors der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III

Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften

der Universität des Saarlandes

von

Melodie-Jo Wolfs

Saarbrücken, 2008

Tag des Kolloquiums: 24. Juni 2008

Dekan: Prof. Dr. U. Müller

Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Hoth

Prof. Dr. Mathias Montenarh

I Inhaltsverzeichnis

II	Abkürzungsverzeichnis.....	III
1	Zusammenfassung	1
1.1	Summary.....	2
2	Einleitung	3
2.1	Die Funktion der T-Zellen im Immunsystem.....	3
2.2	Rolle der Kostimulation für die T-Zell Aktivierung	4
2.3	Die Immunologische Synapse	8
2.4	Kalzium-abhängige Signaltransduktion in T-Zellen	9
2.5	Bedeutung des CRAC/Orai1 Kanals in humanen T-Zellen.....	13
2.6	Der molekulare Aufbau des CRAC-Kanals.....	14
2.6.1	STIM1.....	14
2.6.2	Orai1	16
2.6.3	Die TRP-Proteine	18
2.7	Zielsetzung der Arbeit	22
3	Material und Methoden	23
3.1	Material.....	23
3.1.1	Chemikalien.....	23
3.1.2	Medien und Puffer	24
3.1.3	Antikörper.....	25
3.1.3.1	Direkt markierte Antikörper	25
3.1.3.2	Primäre Antikörper	25
3.1.3.3	Sekundäre Antikörper.....	25
3.1.4	Fusionsproteine.....	26
3.1.5	Small interfering RNAs (siRNAs).....	26
3.1.6	Geräte	27
3.2	Methoden.....	28
3.2.1	Kultur der verwendeten Zelllinien.....	28
3.2.2	CD33-Färbung der CHO-Zellen.....	29
3.2.3	Isolation peripherer Monozyten aus humanem Vollblut.....	30
3.2.4	Negativ-Bead-Isolation von CD3 ⁺ - bzw. CD4 ⁺ - Zellen	31
3.2.5	anti-CD3 bzw. anti-CD4 Färbung isolierter T-Zellen	32

3.2.6	Herstellung der anti-CD3/CD28 gecoateten Beads.....	33
3.2.7	Vorstimulation der T-Zellen.....	33
3.2.8	Transfektion CD4 ⁺ T-Zellen durch Elektroporation	34
3.2.9	Immunfluoreszenz	35
3.2.10	STIM1-Tranlokationsmessung	36
3.2.11	Messung intrazellulärer Kalziumkonzentrationen.....	37
3.2.11.1	Messung der Kalziumkonzentrationen nach TG-Stimulation	38
3.2.11.2	Messungen der Kalziumkonzentrationen nach B7-Stimulation	39
3.2.11.3	Messung des basalen Kalziums bei 37°C	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Arbeitshypothese und Aufbau der Methode.....	41
4.1.1	Die Arbeitshypothese	41
4.1.2	CD33-Expression der CHO-Zellen	44
4.1.3	Anteil an CD4 ⁺ bzw. CD3 ⁺ T-Zellen nach Bead-Negativ-Isolation.....	45
4.1.4	Messung des Kalziumsignals isolierter T-Zellen nach Stimulation mittels Fusionsprotein-beladener CHO-Zellen.....	47
4.2	Die B7-Kostimulation	52
4.2.1	Einfluss der B7 Kostimulation auf das Kalziumsignal.....	52
4.2.2	Die Blockade von CD28 und ihr Einfluss auf das Kalziumsignal	55
4.2.3	Einfluss der B7 Kostimulation auf die Kalziumfreisetzung und den Kalziumeinstrom.....	57
4.3	Beteiligte Proteine	60
4.3.1	STIM1.....	60
4.3.2	Orai1	65
4.3.3	TRPC3	66
5	Diskussion.....	68
6	Literatur	78
7	Anhang.....	90
7.1	Unbedenklichkeitserklärung der Ethikkommission	90
7.2	Veröffentlichungen.....	90
8	Danksagung.....	91

II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AP-1	Aktivator Protein 1
APC	Antigen präsentierende Zelle
BAPTA	1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
CHO	Chinese Hamster Ovary
CRAC	Ca ²⁺ release-activated Ca ²⁺ channel
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DAG	Diazylglyzerin
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
HEK	Human Embryonic Kidney
hIL	Humanes Interleukin
ICOS	Inducible T-cell costimulator system
Ig	Immunglobulin
IκB	Inhibitory protein κB
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP ₃ R	IP ₃ -Rezeptor
IS	Immunologischen Synapse
ITAMs	immunoreceptor tyrosin-based activation motifs
K _{Ca}	Kalzium-abhängige Kaliumkanäle
KD	Kilodalton
Lck	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1
MAP-Kinase	mitogen-activated protein kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	„messenger“ RNA

NF-AT	Nuclear Faktor of Activatet T-cell
NFκB	Nuclear Faktor κB
ns	Non silencing
par	Parental
PBLs	Periphere Blutlymphozyten
PBMCs	Periphere Blutmonozyten
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	programmed cell death 1
PHA	Phytohämagglutinin
PKC	Phosphokinase C
PIP ₂	Inositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasmamembran Ca ²⁺ -ATPase
RBL	rat basophilic leukemia
R-PE	R-Phycoerythrin
RT	Raumtemperatur
SAM	sterile-alpha motif
SCID	Severe combined immunodeficiency
SERCA	Sarco-endoplasmatic-reticulum Ca ²⁺ -ATPase
SiRNA	small interfering RNA
SMAC	supra-molecular activation complex
SOC	Store-operated channel
STIM	Stromal interaction molecule
TCR	T-Zell Rezeptor
TG	Thapsigargin
TK	Tyrosinkinase
TNFR	Tumor Necrosis Factor Rezeptor
TRP	Transient receptor potential
ü/N	über Nacht
ZAP-70	ζ-chain-associated protein of 70 kD

1 Zusammenfassung

Neben der Stimulation des TCR ist eine Interaktion von B7-1 und/oder B7-2 mit CD28 und/oder CTLA-4 (= Kostimulation) notwendig, um eine effektive T-Zellaktivierung zu gewährleisten. Um zu klären, ob dies die Folge veränderter Kalziumsignale ist, wurde eine Methode etabliert, die es ermöglicht, Kalziumsignale in Einzelzellen nach Kostimulation zu messen. Dabei wurden die Zellen mittels bispezifischer Fusionsproteine über den TCR/CD3 stimuliert und über CD28 bzw. CTLA-4 kostimuliert. Es wurde gezeigt, dass eine B7-2 nicht aber eine B7-1 Kostimulation in vorstimulierten CD4⁺ T-Zellen zu einem stark erhöhten Kalziumsignal führt. Nicht vorstimulierte T-Zellen und Jurkat T-Zellen zeigen diesen Unterschied im Vergleich zu einer reinen CD3 Stimulation nicht. Wurde hingegen CD28 auf den vorstimulierten T-Zellen blockiert, hatte eine B7-2 Kostimulation keinen Effekt mehr auf die Kalziumsignale. Es wurde gezeigt, dass die erhöhten Kalziumsignale nicht auf eine vermehrte Speicherentleerung zurückzuführen sind. Die Applikation von 10 µM 2-APB hob den Unterschied jedoch auf (2-APB wirkt in dieser Konzentration potenzierend auf den STIM2- und hemmend auf den STIM1-abhängigen Kalziumeinstrom). Das lässt darauf schließen, dass die B7-2 Kostimulation direkt auf die Aktivität des CRAC/Orai1-Kanals wirkt. Die Daten deuten darauf hin, dass die Effizienz der Kostimulation und die Regulation der Immunreaktion unter anderem direkt über Kalzium reguliert werden.

1.1 Summary

In addition to T-cell receptor engagement, the interaction between B7-1 (CD80) and/or B7-2 (CD86) with CD28 and/or CTLA4 receptors (= co-stimulation) is required for an effective T-cell activation. To analyze if the molecular mechanism of co-stimulation involves calcium signals, we developed a single cell assay to analyze Ca^{2+} signals following co-stimulation with bispecific antibodies. B7-2 but not B7-1 costimulation was followed by an increase of Ca^{2+} influx in prestimulated T-cells. This effect was not seen in unstimulated T-cells or in Jurkat T-cells. The enhanced Ca^{2+} influx following B7-2 co-stimulation was abrogated by an antibody interfering with CD-28 function. The differences in Ca^{2+} influx between B7-1 and B7-2 co-stimulation were not dependent on depletion of Ca^{2+} stores but were eliminated by the application of 10 μM 2-APB (this concentration has to be shown to initially potentiate Ca^{2+} influx through CRAC channels). Our data indicate that B7 costimulation directly influences the CRAC/Orai1 channel. The data from this thesis indicate that the efficiency of co-stimulation and the regulation of the immunoreaction is among other things regulated by differences of intracellular Ca^{2+} signals.

2 Einleitung

2.1 Die Funktion der T-Zellen im Immunsystem

Das Immunsystem dient der Abwehr potentiell pathogener Keime und der Erkennung und Eliminierung infizierter und entarteter Zellen. Die T-Zellen spielen dabei eine ausschlaggebende Rolle. Ca. 65 % der T-Zellen sind T-Helferzellen ($CD4^+$), die an der Vermittlung der zellulären Immunreaktion und an der Differenzierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen beteiligt sind. Die anderen 35 % sind zytotoxische T-Zellen (T-Killerzellen, $CD8^+$), die virusinfizierte Zellen nach Antigen-spezifischer Erkennung lysieren können.

Damit T-Zellen ihre Aufgaben erfüllen können, bedarf es einer Stimulation. Diese geschieht vor allem durch Wechselwirkungen mit professionell Antigen-präsentierenden Zellen (APC), zu denen dendritische Zellen, B-Zellen und Monozyten bzw. Makrophagen gezählt werden. Die wichtigsten Moleküle in diesem Aktivierungsprozess sind die T-Zell-Rezeptoren (TCR) auf den T-Zellen und die Histokompatibilitätsantigene (MHC-Moleküle = Major Histocompatibility Complex) auf den APCs. Mit dem TCR ist nicht-kovalent der CD3-Molekülkomplex assoziiert, der die eigentliche Signalübertragung ins Zellinnere übernimmt. Zusammen werden TCR und CD3-Molekülkomplex als funktioneller TCR-Komplex bezeichnet. Darüber hinaus sind mit dem TCR kostimulatorische Moleküle wie CD28 und CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) (s. Punkt 2.2) assoziiert. Fehlen diese kostimulatorischen Signale bei der Antigenerkennung, so geht die T-Zelle in die Anergie, d.h. sie lebt zwar weiter, kann jedoch nicht mehr aktiviert werden, auch nicht durch spätere Antigenpräsentation durch eine APC. Dies dient der Elimination von T-Zellen, deren TCR mit körpereigenen Strukturen interagieren und ist somit ein wichtiger Mechanismus zur Vermeidung von Autoimmunreaktionen. Die ebenfalls mit dem TCR assoziierten Korezeptoren CD4 bzw. CD8 sind notwendig für die Stabilisierung des Kontaktes zwischen T-Zelle und APC.

2.2 Rolle der Kostimulation für die T-Zell Aktivierung

Eine alleinige TCR-Stimulation ist nicht ausstreichend für eine effiziente T-Zellaktivierung. Das Immunsystem muss zudem auf sehr viele verschiedene Reize reagieren können und benötigt daher eine Feinregulation. Hierzu verfügen T-Zellen über verschiedene, mit dem TCR assoziierte, kostimulatorische Moleküle. Die kostimulatorischen Moleküle können zwei Familien zugeordnet werden: der Familie der Immunglobuline und der der „Tumor Necrosis Factor Rezeptoren“ (TNFR). Die bekanntesten Mitglieder der ersten Familie sind CD28, ein positiver Kostimulator, und CTLA-4 (CD152), das ein inhibitorisches Signal vermittelt (s. Abb. 2.1). Weiterhin gehören in diese Familie das positiv kostimulatorisch wirkende Immunglobulin ICOS (inducible T-cell costimulator system) und das negativ kostimulatorisch wirkende PD-1 (programmed cell death 1). In die Familie der TNFR gehört zum Beispiel der positive Kostimulator OX40. Neben den hier aufgeführten gibt es noch weitere kostimulatorischen Moleküle, von denen zum Teil die Wirkung noch nicht bekannt ist.

In dieser Arbeit wurde der Effekt der Kostimulation über B7/CD28 und B7/CTLA-4 auf die T-Zell Aktivierung und das Kalziumsignal untersucht, weswegen diese Moleküle mit ihren Signalwegen und ihren Liganden hier genauer beschrieben werden sollen. Trotz ihrer unterschiedlichen Wirkungsweisen haben beide einige Gemeinsamkeiten: CD28 und CTLA-4 haben eine Sequenzhomologie von 30 % und die gleichen Liganden, B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86), die auf den APCs exprimiert werden. Beide sind durch eine extrazelluläre Immunglobulindomäne (Ig-Domäne), einen Transmembranbereich und eine zytoplasmatische Domäne mit verschiedenen Motiven, über die Signale vermittelt werden können, charakterisiert (Schwartz et al., 2002). Ihre auf den APCs exprimierten Liganden B7-1 und B7-2 haben eine Sequenzhomologie von 33 % und sind durch zwei extrazelluläre Ig-Domänen, einen Transmembranbereich und eine kurze zytoplasmatische Domäne gekennzeichnet. Die Bindungsaffinität von CTLA-4 für beide Liganden ist höher als die von CD28 (Collins et al., 2002; Linsley et al., 1994; van der Merwe et al., 1997), allerdings wurde auch gezeigt, dass CTLA-4 B7-1 als Bindungspartner bevorzugt, während CD28 B7-2 favorisiert (Manzotti et al., 2006; Manzotti et al., 2002; Pentcheva-Hoang et al., 2004; Zheng et al., 2004). Auffallend ist, dass die Expressionsmuster von CD28 und B7-2 bzw. von CTLA-4 und B7-1 sehr ähnlich sind. Während CD28 konstitutiv auf unstimulierten T-Zellen exprimiert wird und nach Stimulation hochreguliert wird, ist

CTLA-4 auf unstimulierten Zellen nicht detektierbar und wird erst mehrere Stunden bis Tage nach Stimulation auf der Zelloberfläche exprimiert. B7-2 ist, wie CD28, konstant auf APCs exprimiert und wird nach Kontakt mit einer T-Zelle lediglich hochreguliert. B7-1 dagegen ist, wie CTLA-4, nicht konstitutiv exprimiert und wird erst ein bis zwei Tage nach Kontakt zwischen APC und T-Zelle hochreguliert und exprimiert (Alegre et al., 1996; Hathcock et al., 1994; Lenschow et al., 1993; Perkins et al., 1996). Aber selbst zum Zeitpunkt des Expressionsmaximums von CTLA-4 und B7-1 ist die Expression von CD28 und B7-2 auf der T-Zelle bzw. der APC höher (Hathcock et al., 1994; Lenschow et al., 1993; Linsley et al., 1992).

Auch wenn über CD28 bei weitem am meisten bekannt ist, ist der genaue Signalmechanismus noch nicht endgültig aufgeklärt. Es scheint so, dass manche von CD28 ausgehende Signale TCR unabhängig sind, da sie sich im Gegensatz zu den TCR-Signalen nicht von Cyclosporin A blockieren lassen. Allerdings hat CD28 auch direkte Wirkung auf den TCR, indem es die Zahl der TCRs reduziert, die durch ein Antigen gebunden werden müssen, um zur Aktivierung der T-Zelle zu führen. Damit erniedrigt CD28 die Reizschwelle der T-Zelle (Itoh and Germain, 1997; Viola and Lanzavecchia, 1996). Es wird angenommen, dass CD28 zu einer Ansammlung sogenannter „lipid rafts“ an der Kontaktstelle zwischen APC und T-Zelle (Immunologischen Synapse) führt und damit die dortige Konzentration von Enzymen und Adaptermolekülen erhöht wird (Viola et al., 1999).

Die Untersuchung von CTLA-4 wird dadurch erschwert, dass seine Oberflächenexpression über Endozytose reguliert wird. Vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) wird CTLA-4 in den Golgi-Apparat transportiert. Dort interagiert der zytoplasmatische Teil von CTLA-4 mit AP-1, das den Transport zur Zelloberfläche vermittelt. Wird CTLA-4 an der Oberfläche nicht von B7 gebunden, bindet die Untereinheit AP-50 des Endozytose vermittelnden Clathrin Adaptorproteins AP-2 an einem Tyrosinreste von CTLA-4, was zu einer schnellen Endozytose führt. Dieser Vorgang erklärt die geringe Expression von CTLA-4 auf der T-Zell Oberfläche (Bradshaw et al., 1997; Shiratori et al., 1997; Zhang and Allison, 1997). Selbst nach Aktivierung ist es 30- bis 50 mal schwächer auf der Zelloberfläche exprimiert als CD28 (Linsley et al., 1992).

Es wurde gezeigt, dass CTLA-4 auf zwei unterschiedliche Weisen inhibierend auf die T-Zelle wirkt: Einerseits scheint es kompetitiv das CD28 Signal zu antagonisieren, andererseits aber auch ein direktes, negatives Signal ins T-Zellinnere zu leiten (Carreno et al., 2000). Der kompetitive Mechanismus gegenüber CD28 ist unabhängig vom

zytoplasmatischen Teil von CTLA-4 (Carreno et al., 2000; Cinek et al., 2000). Mäuse, die CTLA-4 exprimieren, dem der zytoplasmatische Teil fehlt und die damit unfähig sind selbst ein Signal zu generieren, entwickeln einen lymphoproliferativen Phänotyp. Das Krankheitsbild ist allerdings weniger aggressiv, als das in CTLA-4^{-/-} Mäusen. Dies spricht dafür, dass CTLA-4 neben dem CD28-Antagonismus noch einen weiteren Mechanismus zur Inhibition der T-Zellaktivität besitzt (Cinek et al., 2000; Fallarino et al., 1998; Masteller et al., 2000). Dies wird durch die Fähigkeit von CTLA-4, auch in Abwesenheit von CD28 die T-Zellantwort zu inhibieren, untermauert (Fallarino et al., 1998; Lin et al., 1998). Auf welche Weise dies genau geschieht, ist noch unklar.

Für das Verständnis des Immunsystems und der Entstehung verschiedener Erkrankungen ist die Aufklärung der genauen kostimulatorischen Mechanismen unumgänglich. Neue Erkenntnisse ermöglichen darüber hinaus die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden. Bereits heute wird die Behandlung mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmoleküle der T-Zellen oder der APCs sowohl in der Transplantationsmedizin, als auch in der Therapie onkologischer Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen eingesetzt und es ist davon auszugehen, dass diese Therapieart an Bedeutung gewinnen wird. Dabei besteht die Möglichkeit einer generalisierten, unspezifischen Immunstimulation, z. B. durch Gabe eines anti-CTLA-4 Antikörpers (Maker et al., 2005; Maker et al., 2006; Phan et al., 2003; Robinson et al., 2004), als auch einer Immunsuppression, z. B. durch Gabe eines anti-CD3 Antikörpers (z. B. OKT3) in der Transplantationsmedizin (Goldstein et al., 1986; Hirsch et al., 1987; Thistlethwaite et al., 1987). Großer Nachteil dabei sind die starken Nebenwirkungen einer solchen Therapie. Diese Nebenwirkungen gilt es zu minimieren. Eine Möglichkeit bietet hierbei unter Umständen eine spezifische Therapie mit bispezifischen Antikörpern. Dabei werden Antikörper mit zwei verschiedenen Bindungsspezifitäten verwendet, von denen eine beispielsweise gegen die Tumorzelle gerichtet ist und die zweite ein Oberflächenmolekül einer T-Zelle bindet (Gall et al., 2005; Grosse-Hovest et al., 2003; van Spriël et al., 2000).

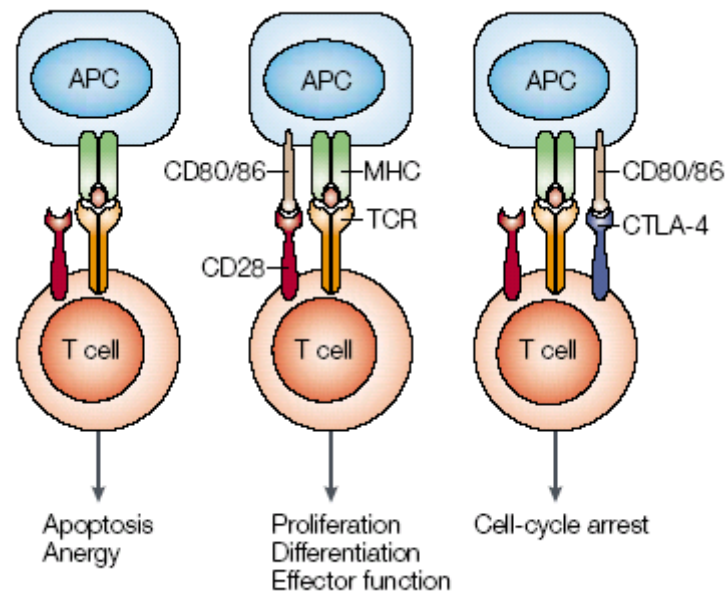


Abb. 2.1: Abhängigkeit der T-Zell-Reaktion von verschiedenen kostimulatorischen Signalen.

Wird der TCR ohne zusätzliche Stimulation von CD28 stimuliert, leitet die T-Zelle die Apoptose ein oder wird anerg. Nur eine zusätzliche CD28-Kostimulation führt zur einer Proliferation, Differenzierung und der Entstehung von Effektor-Zellen. Nach T-Zell-Stimulation und CTLA-4 Hochregulation resultiert eine CTLA-4-Kostimulation in einem Zellzyklusarrest (Alegre et al., 2001).

2.3 Die Immunologische Synapse

Der Begriff der Immunologischen Synapse wurde von M. Norcross und der Arbeitsgruppe von W. Paul eingeführt um die Interaktion zwischen T-Zelle und APC zu beschreiben (Norcross, 1984; Paul et al., 1987). Schon 1984 wurde mit löslichen Antikörpern, die TCRs miteinander vernetzen, gezeigt, dass sich anschließend Zelloberflächenrezeptoren, Aktinfilamente und bestimmte Lipide in einem bestimmten Teil der Zellmembran konzentrieren. Dieses Phänomen wurde als „capping“ bezeichnet (Spiegel et al., 1984). Diese Molekülkonzentration liegt im Fall der T-Zell Stimulation mittels APC im Kontaktbereich dieser beiden Zellen (Kupfer and Dennert, 1984; Kupfer et al., 1983). Erst die dreidimensionale Darstellung dieser Kontaktzone ermöglichte es zu erkennen, dass die Verteilung nach einem bestimmten Muster erfolgt (Monks et al., 1998). Heute unterteilt man die IS in drei Bereiche. Im Zentrum liegt die zentrale Region des „supra-molecular activation complex“ (cSMAC), in der sich TCRs, kostimulatorische Moleküle wie CD28 und CTLA-4, PKC- θ und Agrin konzentrieren. Um diesen Bereich liegt der periphere Ring (pSMAC), indem sich unter anderem CD4, Talin, LFA1, Lck und CD2 anreichern. Im äußersten, distalen Ring (dSMAC) findet man CD43, CD44 und CD45 (s. Abb. 2.2) (zusammengefasst in (Bromley et al., 2001; Huppa and Davis, 2003)). Durch die Konzentration von Rezeptoren und Zelladhäsionsmolekülen in einem Bereich der Zellmembran und von weiteren Signalmolekülen im Zytoplasma der Zelle direkt unterhalb der Kontaktstelle können wichtige Signale zwischen Zellen sehr effektiv ausgetauscht werden. Diese Form der Stimulation nennt man fokale Stimulation. Fokal, mit anti-CD3/anti-CD28-beschichteten Beads stimulierte Zellen weisen eine höhere Proliferationsrate und eine erhöhte IL-2 Synthese auf als Zellen, die mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert wurden (Schwarz et al., 2007a). Die Stimulation mit Beads ist wesentlich physiologischer als die mit Thapsigargin (blockiert die SERCA-Pumpe des ER), PHA oder Antikörpern in Lösung. Allerdings fehlen hier die Zelladhäsionsmoleküle, die bei einer Stimulation mittels APC an der Bildung der IS beteiligt sind. Eines der Ziele dieser Arbeit war es eine Methode zu etablieren, die es ermöglicht die T-Zellen möglichst physiologisch, d.h. in einem Zell-Zell-Kontakt mittels unterschiedlicher Antikörper zu stimulieren. Diese physiologischere Stimulation ermöglicht die Erforschung des komplexen Zusammenspiels aller beteiligten Moleküle und ist somit auch der Bead-Stimulation überlegen.

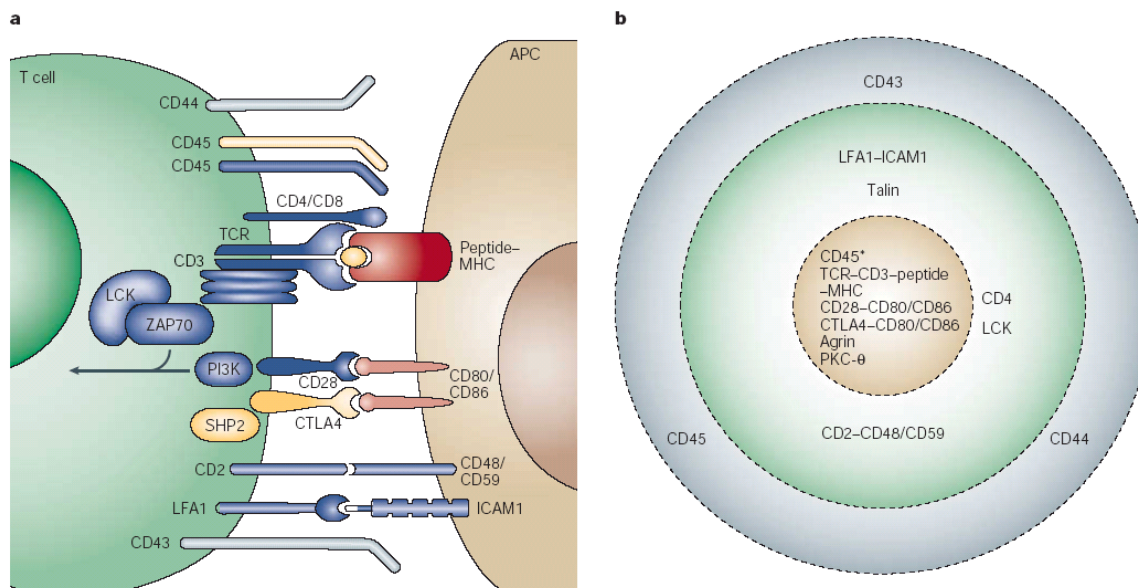


Abb. 2.2: Übersicht über die Immunologische Synapse (IS).

Abb. a zeigt eine Auswahl von Molekülen, die an der Bildung der IS beteiligt sind essentiell für die T-Zell Aktivierung sind. Kostimulatorische Peptide und der MHC-Komplex auf der APC sind in rot dargestellt, positive Kostimulatoren auf der T-Zelle in blau, negative in gelb. Grau sind die Moleküle, die nicht zur Signalübertragung beitragen. Der Pfeil steht für Signale die gemeinsam zur T-Zell Aktivierung führen. Abb. b zeigt einen Querschnitt durch die IS mit den typischen Zonen (cSMAC (orange), pSMAC (grün) und dSMAC (blau)) und den darin angereicherten Molekülen (Huppa and Davis, 2003).

2.4 Kalzium-abhängige Signaltransduktion in T-Zellen

Die Bindung des MHC/Antigen-Komplexes an den TCR-Komplex führt unter Mitwirkung der Korezeptoren zu einer Aktivierung der Src-Kinasen Fyn und Lck, die ihrerseits die „immunoreceptor tyrosin-based activation motifs“ (ITAMs) auf den ζ -Ketten des CD3-Komplexes phosphorylieren (Gauen et al., 1994; Straus and Weiss, 1992). Diese Phosphorylierung führt zur Anlagerung und nachfolgender Phosphorylierung der assoziierten Tyrosinkinase ZAP-70. ZAP-70 aktiviert über die Phosphorylierung mehrerer

Adapterproteine die Phospholipase C γ (PLC γ) und Ras (zusammengefasst in (Samelson, 2002)). Ras aktiviert eine Kaskade von MAP-Kinasen, die wiederum Fos induzieren, einen Bestandteil des Transkriptionsfaktors Aktivator Protein 1 (AP-1). Die Phospholipase C (PLC) ihrerseits spaltet das membranständige Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in die „second messenger“ Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ induziert durch Bindung an den IP₃-Rezeptor (IP₃R) des endoplasmatischen Retikulums (ER) eine Freisetzung von Kalziumionen aus dem intrazellulären Kalziumspeicher und damit eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Crabtree and Clipstone, 1994). Die Entleerung dieser Speicher führt zu einer STIM1 (stromal interaction molecule)-abhängigen Aktivierung des CRAC-Kanals (Ca²⁺ release-activated Ca²⁺) in der Plasmamembran (s. Punkt 2.5). Dieser zu den „speicheraktivierten Kanälen“ (SOCs = store-operated channels) gehörende Kanal in T-Zellen wurde nach dem gleichen, ursprünglich in Mastzellen gefundenen Kanal benannt (Hoth and Penner, 1992). Er unterscheidet sich von anderen SOC's durch seine hohe Selektivität für Kalziumionen gegenüber anderen Kationen. Der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration wirkt aktivierend auf Kalzium-abhängige Kaliumkanäle (K_{Ca}) und die Ca²⁺-ATPase in der Plasmamembran (PMCA). Gleichzeitig hemmt der lokale Konzentrationsanstieg den CRAC-Kanal. Dies hätte zur Folge, dass das Kalziumsignal schnell wieder abfallen würde. Verhindert wird dies unter anderem dadurch, dass Mitochondrien, welche nahe an der Plasmamembran liegen, das einströmende Kalzium über einen Uniporter aufnehmen und so die Rückkopplungshemmung des CRAC-Kanals verhindern (Hoth et al., 1997; Lewis, 2001). Erst nach und nach geben die Mitochondrien das Kalzium über einen Na⁺/Ca²⁺-Austauscher wieder an das Zytosol ab (Hoth et al., 1997; Lewis, 2001). Ein Teil des Kalziums wird vom ER über die SERCA-Pumpe (sarco-endoplasmatic-reticulum Ca²⁺-ATPase) aktiv aus dem Zytosol aufgenommen. Ein Überblick über die Kalzium-abhängige Signaltransduktion in T-Zellen ist in Abb. 2.3 zu sehen.

Die über den CRAC-Strom (I_{CRAC}) induzierte langanhaltende Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ist ein ausschlaggebender Bestandteil der im Folgenden beschriebenen Regulation der wichtigsten Transkriptionsfaktoren. Beeindruckend ist, dass 75 % aller durch T-Zell-Aktivierung regulierten Gene eine Abhängigkeit von der Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration über den I_{CRAC} zeigen (Feske et al., 2001).

Der erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel führt zu einer Aktivierung des Ca^{2+} -bindenden Proteins Calmodulin, das wiederum Calcineurin (Serin/ Threoninphosphatase) aktiviert. Dieses dephosphoryliert wiederum den Transkriptionsfaktor NF-AT (Nuclear Factor of Activated T-cells), der dann in den Zellkern wandert, wo er an den Promotor des IL-2-Gens bindet und zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 und NF- κ B, die Expression von IL-2 induziert (Crabtree and Clipstone, 1994).

Der Anstieg der Kalziumkonzentration führt ebenso, zusammen mit dem freigesetzten DAG, zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC, Serinkinase), was wiederum die Phosphorylierung mehrerer Proteinkomplexe, wie z. B. I κ B/NF- κ B induziert (Crabtree and Clipstone, 1994). Der I κ B/NF- κ B-Komplex dissoziiert, infolge seiner Phosphorylierung, in die beiden Untereinheiten I κ B und NF- κ B. Das phosphorylierte I κ B wird im Zytosol degradiert, während der nun aktivierte Transkriptionsfaktor NF- κ B in den Zellkern wandert (Baldwin, 1996; Partiseti et al., 1994).

Die zeitliche und räumliche Dynamik des Kalziumsignals, die sich durch das Zusammenspiel des intrazellulären und extrazellulären Kalziumeinstroms in das Zytosol ergibt, ermöglicht eine Modulation der Immunantworten. Eine Störung im Ablauf dieser Kalziumsignale kann Ursache einer Immundefizienz sein (Feske et al., 2001; Le Deist et al., 1995b; Partiseti et al., 1994) oder auch die Entstehung von Tumoren begünstigen. Für das Verständnis der Immunantwort mit ihren unterschiedlichen Ausprägungen und der Klärung der Entstehung immunologischer Erkrankungen ist es daher wichtig, die genauen Abläufe der Signalkaskaden, den Einfluss der Kostimulation und die Entstehung und Modulation des Kalziumsignale in T-Zellen aufzuklären.

Wie wichtig die korrekten Abläufe aller Mechanismen des Immunsystems, vom Zellkontakt bis zu den darauffolgenden Aktivierungs-Signalkaskaden (s. Abb. 2.3) sind, wird klar, wenn man Krankheiten betrachtet, die auf Störungen dieser Prozesse zurückzuführen sind. Dazu zählen Allergien, Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose, Rheuma, chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa, aber auch die Entartung körpereigener Zellen zu Tumorzellen.

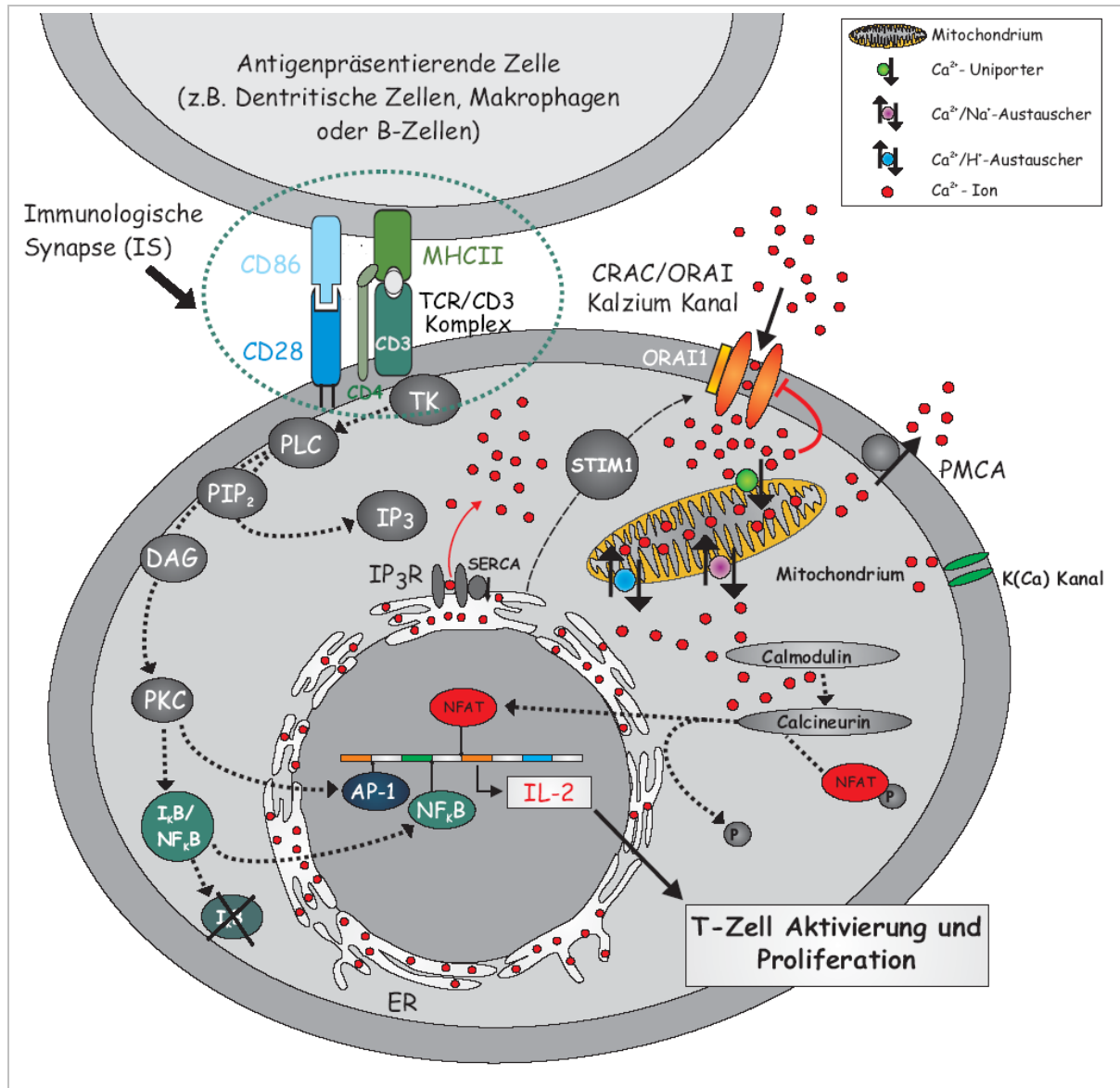


Abb. 2.3: Übersicht der Signaltransduktion in T-Zellen.

Die Bindung des MHC/Antigen-Komplexes an den TCR führt zur Induktion einer Signalkaskade. Durch die Aktivierung der PKC werden die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B aktiviert. IP₃ führt zur Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher (ER). Über STIM1 wird der CRAC/Orai1 Kanal aktiviert und Kalzium strömt aus dem Extrazellulärraum in die Zelle hinein. Das einströmende Kalzium hemmt den CRAC/Orai1 Kanal, aktiviert die K_{Ca}-Kanäle, erhöht die Aktivität der PMCA und aktiviert das Ca²⁺-bindende Protein Calmodulin. Calmodulin aktiviert Calcineurin, das wiederum den Transkriptionsfaktor NF-AT dephosphoryliert, der daraufhin in den Kern wandert. Alle Transkriptionsfaktoren zusammen führen zur IL-2-Synthese. Die Mitochondrien nehmen das durch den CRAC/Orai1-Kanal einströmende Kalzium auf und vermindern so dessen Inaktivierung.

2.5 Bedeutung des CRAC/Orai1 Kanals in humanen T-Zellen

Der CRAC/Orai1 Kanal ist, wie oben bereits beschrieben, ein Kalziumkanal in der Plasmamembran humaner T-Zellen, Mastzellen und vieler anderer Zelltypen. Er besitzt eine Selektivität für Kalziumionen gegenüber monovalenten Kationen von ungefähr 1000:1 (Hoth and Penner, 1993) und eine Einzelkanalleitfähigkeit von 10-20 fS (Prakriya and Lewis, 2002; Zweifach and Lewis, 1993). Bezüglich der Kalzium-Selektivität entspricht der CRAC/Orai1 Kanal fast der Selektivität spannungsgesteuerter Kalziumkanäle, die jedoch eine wesentlich höhere Einzelkanalleitfähigkeit besitzen. Im Gegensatz zu diesen spannungsgesteuerten Kalziumkanälen wird der CRAC/Orai1 Kanal nicht durch Potentialänderung sondern durch die Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher aktiviert. Der Kalziumeinstrom über die Plasmamembran ist notwendig, damit eine effektive Aktivierung der T-Zellen bis hin zur Expression von Interleukinen erfolgen kann. Trotz dieser eindeutig charakterisierten funktionellen Eigenschaften des CRAC/Orai1 Kanals konnten bis heute seine molekularen Eigenschaften nicht vollständig geklärt werden. Es gilt als sicher, dass Orai1 zumindest einen Teil des Kanals bildet (s. Punkt 2.5.2), allerdings wird kontrovers diskutiert, ob auch weitere Proteine, wie zum Beispiel Mitglieder der TRP-Proteine (TRP = transient receptor potential), an dessen Aufbau beteiligt sind (s. Punkt 2.5.3).

Die Entdeckung des CRAC/Orai1 Kanals, mit seiner wichtigen Rolle in der Signalkaskade der T-Zell-Aktivierung, lässt auf ein besseres Verständnis immunologischer Mechanismen und auf neue pharmakologische Angriffspunkte in der Therapie von Immunerkrankungen hoffen. Um diesem Ziel näher zu kommen, ist zunächst die Aufklärung der genauen molekularen Struktur und der am Aufbau des CRAC/Orai1 Kanals beteiligten Gene unabdingbar. Erst die vollständige molekulare Charakterisierung wird es ermöglichen, die Funktion des Kanals und die genauen Mechanismen, die zu seiner Aktivierung führen, zu klären.

2.6 Der molekulare Aufbau des CRAC-Kanals

2.6.1 STIM1

STIM1 (stromal interaction molecule), das schon vor mehreren Jahren entdeckt wurde (Oritani and Kincade, 1996), wurde als ein für die Aktivierung von I_{CRAC} notwendiges Protein von zwei Arbeitsgruppen etwa gleichzeitig mittels siRNA Screen gefunden (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005). Roos et al. führte einen siRNA Screen in *Drosophila* S2-Zellen durch, der alle Proteine beinhaltet, die mit dem speichergesteuerten Kalziumsignal in Verbindung gebracht wurden, sowie weitere Kanalproteinen und einige Proteine mit Transmembrandomänen. Von allen 170 untersuchten Genen war STIM das einzige, das für die CRAC-Strom Aktivierung essentiell war. Liou et al. untersuchten insgesamt 2304 Proteine in HeLa-Zellen und identifizierten die beiden Säugetierhomologe von STIM, STIM1 und STIM2 als am CRAC-Strom beteiligt, wobei der Effekt einer STIM2-Runterregulation nur schwach war. Roos et al. zeigten in Jurkat T-Zellen, dass ein „knock-down“ von STIM2 mittels siRNA, im Gegensatz zu dem von STIM1, keinen Effekt auf I_{CRAC} hat.

STIM1 hat eine Transmembrandomäne und mehrere konservierte Motive, darunter ein „sterile-alpha motif“ (SAM), zwei „coiled-coil“ Domänen und ein EF-Hand-Motiv, welches Kalzium binden kann (s. Abb. 2.4). Die Lokalisation von STIM1 wird kontrovers diskutiert. Neben den Entdeckern (Oritani and Kincade, 1996) haben es auch mehrere andere Gruppen in der Plasmamembran gefunden (Hauser and Tsien, 2007; Lopez et al., 2006; Spassova et al., 2006; Zhang et al., 2005). Während Zhang et al., Lopez et al. und Hauser et al. nach Stimulation der Zelle einen signifikanten Anstieg der STIM1-Konzentration in der Plasmamembran detektierten konnten, konnte dieser von Spassova et al. nicht festgestellt werden. Andere Arbeitsgruppen fanden zu keiner Zeit eine Lokalisation von STIM1 in der Plasmamembran (Liou et al., 2005; Mercer et al., 2006; Wu et al., 2006). Liou et al. und Wu et al. zeigten darüber hinaus, dass sich STIM1 in der Membran des ER nach Stimulation in sogenannten „punctae“, nahe der Plasmamembran, zusammenlagert. Aus den verschiedenen Ergebnissen wurden drei mögliche Modelle entwickelt. Gemeinsam haben alle drei Modelle die STIM1-Lokalisation in der ER-Membran vor Speicherentleerung und die Funktion des EF-Hand-Motivs als Kalziumsensor im Lumen des ER. Das erste Modell, indem STIM1 zu jeder Zeit sowohl in der ER-Membran als auch in der Plasmamembran lokalisiert ist, geht von einer Interaktion

des im ER lokalisierten STIM1 mit dem in der Plasmamembran lokalisierten STIM1 aus. Das in der Plasmamembran lokalisierte ist hierbei notwendig für die I_{CRAC} Aktivierung (Roos et al., 2005). Im zweiten Modell, das von Zhang et al. aufgestellt wurde, kommt es nach Zellaktivierung zu einer Translokation von STIM1 aus der Membran des ER in die Plasmamembran. Der Mechanismus für diese Translokation ist allerdings ungeklärt, wobei gezeigt wurde, dass Vesikeltransport nicht an der Aktivierung des I_{CRAC} beteiligt ist (Bakowski et al., 2001; Parekh and Putney, 2005). Das dritte, von Liou et al. favorisierte Modell, geht von einer reinen ER-Membran Lokalisation der STIM1-Moleküle aus, in der sich nach Stimulation die oben genannten „punctae“ nahe der Plasmamembran bilden. Der C-Terminus von STIM1 kann in diesem Modell mit Komponenten des CRAC/Orai1 interagieren oder selbst Teil des Kanals sein. Allerdings schließt dieses Modell nicht aus, dass STIM1 unter Umständen auch in der Plasmamembran gefunden werden kann.

Unabhängig von den unterschiedlichen Modellen sind sich alle einig, dass STIM1 eine essentielle Rolle für die Aktivierung des I_{CRAC} spielt. Seine Rolle als Kalziumsensor wurde anhand von Mutationen wichtiger Aminosäuren des EF-Hand-Motivs belegt. Zellen, die diese Mutanten exprimierten, die nicht mehr in der Lage waren Ca^{2+} zu binden, zeigten einen konstitutiv aktivierten CRAC-Strom (Liou et al., 2005; Spassova et al., 2006; Zhang et al., 2005). Aufzuklären bleibt, wie genau die Signalübertragung an den CRAC/Orai1 Kanal abläuft. Dabei steht eine direkte Verbindung von STIM1 und dem Kanal einer Signalübertragung über einen weiteren Faktor gegenüber. Weiterhin bleibt zu klären, welche Rolle STIM2 im Gegensatz zu STIM1 spielt. Erste Daten zeigen, dass STIM2 unter Umständen einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivierung des I_{CRAC} hat (Soboloff et al., 2006a).

2.6.2 Orai1

Das zweite Protein, das eine Komponente des CRAC/Orai1 Kanals zu sein scheint, wurde in kurzem zeitlichem Abstand von drei Arbeitsgruppen entdeckt. Feske et al. (Feske et al., 2006) nannten dieses Protein Orai1, nach den Wächtern der Himmelsporten in der griechischen Mythologie. In einer kurz darauf folgenden Veröffentlichung (Vig et al., 2006b) wurde es CRACM1 genannt. Die Orai-Familie in Säugetieren besteht aus drei Mitgliedern, Orai1, Orai2 und Orai3. Feske et al. führten eine Linkage-Gen-Analyse an SCID-Patienten durch, deren T-Zellen durch den Mangel an I_{CRAC} gekennzeichnet sind. In dieser Studie wurde eine Mutation in der Porenregion des Orai1-Gens entdeckt, die ursächlich für den stark verminderten CRAC-Strom in den T-Zellen dieser Patienten ist. Eine Transfektion dieser Zellen mit Wildtyp-Orai1 führte zu einer vollständig Regeneration des I_{CRAC} . Zudem zeigte sich in einem Screen nach Genen, die in Drosophilazellen für die Translokation von NFATc benötigt werden, dass Orai1 essentiell für den Kalziumeinstrom ist (Feske et al., 2005). Auch Vig et al. konnten mittels siRNA Screen in Drosophila- und in HEK293-Zellen zeigen, dass Orai bzw. Orai1 eine wichtige Komponente des I_{CRAC} ist (Vig et al., 2006b).

Alle Mitglieder der Orai-Familie sind Membranproteine mit vier Transmembrandomänen (Feske et al., 2006; Vig et al., 2006b; Zhang et al., 2006). Orai1 scheint im Gegensatz zu STIM1, nur in der Plasmamembran lokalisiert zu sein. Mehrere Arbeitsgruppen zeigten eine starke Erhöhung (50- bis 100-fach) des I_{CRAC} , wenn Orai1 zusammen mit STIM1 überexprimiert wurde (Peinelt et al., 2006; Soboloff et al., 2006b; Zhang et al., 2006). Wenn allerdings nur Orai1 überexprimiert wurde, führte dies zu einer Hemmung des I_{CRAC} in Jurkat-, RBL- und HEK293-Zellen (Peinelt et al., 2006; Soboloff et al., 2006b; Zhang et al., 2006). In Drosophila S2-Zellen führt auch eine alleinige Überexpression von Orai1 zu einem Anstieg des I_{CRAC} , der allerdings durch eine zusätzliche STIM1-Überexpression noch erheblich verstärkt wird (Zhang et al., 2006). Diese Daten zeigen, dass eine kombinierte STIM1- und Orai1-Überexpression notwendig und hinreichend ist, um die I_{CRAC} Amplitude drastisch zu erhöhen. Aber warum wirkt eine alleinige Orai1-Überexpression inhibitorisch in verschiedenen Zelltypen und warum entsprechen die durch STIM1- und Orai1-Überexpression entstehenden Ströme nicht exakt den bekannten Charakteristika des CRAC-Stroms (Cahalan et al., 2007; Vig et al., 2006a)? Eine mögliche Erklärung für die hemmende Wirkung einer alleinigen Orai1-Überexpression wäre, dass durch das verstärkte Vorkommen nur einer Komponente des CRAC/Orai1 Kanals eine

korrekte Zusammenlagerung verhindert wird. Oder aber der Kanal besteht neben Orai1 aus weiteren Komponenten, wie beispielsweise Orai2, Orai3 oder einem TRPC-Protein. Wenn dieses Protein mit STIM1 interagiert, könnte es in dieser Situation limitierend wirken. Sicher scheint zu sein, dass Orai1 an der Bildung der Pore beteiligt ist oder diese sogar alleine bildet. Mutationen im Bereich zwischen erster und zweiter Transmembrandomäne von Orai1 führten zu einer Aufhebung der Kalziumselektivität des Kanals (Prakriya et al., 2006; Vig et al., 2006a; Yeromin et al., 2006). Die Beteiligung anderer Proteine ebenso wie die Rolle der verschiedenen Orai Proteine müssen nun geklärt werden.

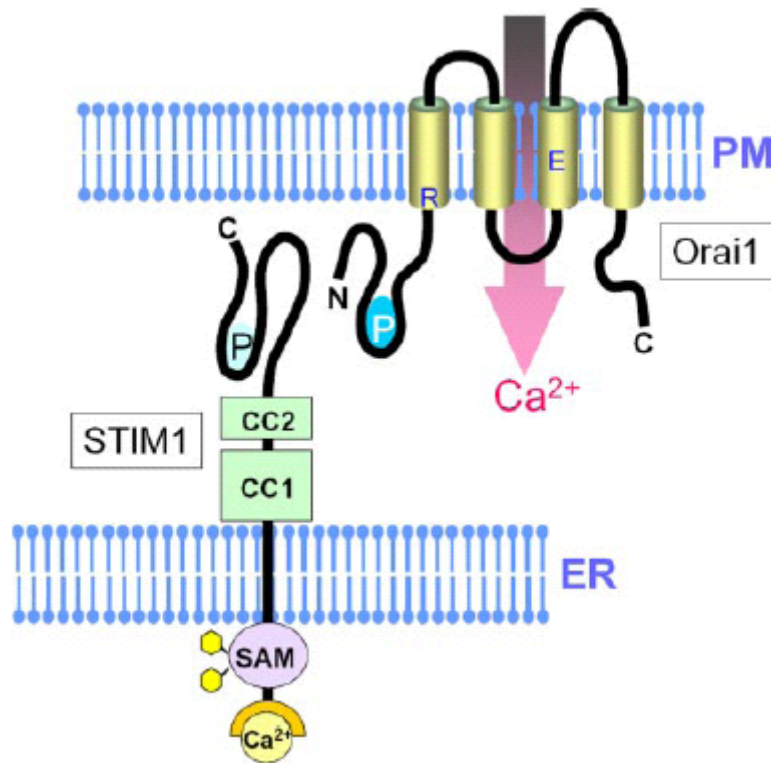


Abb. 2.4: Model von STIM1 und Orai1.

STIM1 hat eine Ca²⁺-bindende EF-Hand-Domäne und ein „sterile-alpha motif“ (SAM), eine Transmembrandomäne, zwei zytosolische „coiled coil“-Domänen (CC) und eine Prolinreiche-Region (P). Orai1 besteht aus vier Transmembrandomänen und eine Prolinreiche-Region am zytosolischen N-Terminus (Soboloff et al., 2006b).

2.6.3 Die TRP-Proteine

Lange bevor STIM1 und Orai1 entdeckt wurden, galten Mitglieder der TRP-Proteinfamilie als beste Kandidaten für den CRAC Kanal. Das erste TRP-Protein wurde in der Fruchtfliege *Drosophila* entdeckt. Fruchtfliegen bilden auf einen Lichtreiz hin ein konstantes Rezeptorpotential. Man entdeckte eine mutierte Fruchtfliege, die auf diesen Reiz hin ein transientes Rezeptorpotential bildete (Cosens and Manning, 1969). Nachdem das mutierte Gen entdeckt und sequenziert wurde (Montell and Rubin, 1989), zeigten Hardie und Minke 1992 (Hardie and Minke, 1992), dass es einen Kalziumkanal in den Rhabdomeren des Auges der Fruchtfliege kodiert. Die Ursache des veränderten Phänotyps war der fehlende Kalziueinstrom über die Plasmamembran in die Zelle. Der entsprechende Kanal besteht aus mehreren Proteine (TRP, TRPL und TRP γ) und er wird in einem PLC-abhängigen Prozess aktiviert.

Bei der Suche nach ähnlichen Sequenzen in unterschiedlichen Spezies stellte man fest, dass es sich um eine große Genfamilie handelt, die im Laufe der Evolution gut konserviert wurde. Allein im menschlichen Genom fand man bis heute 28 Mitglieder der TRP-Genfamilie (Clapham, 2007), die in den unterschiedlichsten Geweben exprimiert werden. Die verschiedenen TRPs können durch so unterschiedliche Signale wie zum Beispiel Hitze, Schmerz, Hormone, Licht und Osmolarität aktiviert werden (Montell et al., 2002).

Die humanen TRP-Proteine werden mittlerweile in sechs Unterfamilien eingeteilt (s. Abb.2.5) (Clapham, 2003; Clapham, 2007; Wissenbach et al., 2004), die der TRPCs, TRPVs, TRPMs, TRPPs, TRPMLs und TRPA1. Die Einteilung erfolgt anhand von Sequenzhomologien. Die Homologien zwischen manchen Unterfamilien beträgt nur 20 %. Aufgrund ihrer Eigenschaften waren die Mitglieder der TRPC-Unterfamilie, sowie TRPV5 und TRPV6 lange Zeit die wichtigsten Kandidatengene zur Bildung des CRAC/Orai1 Kanals (Clapham et al., 2001). Diese TRP-Proteine besitzen alle einen ähnlichen Aufbau aus sechs möglichen Transmembrandomänen, wobei zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne die porenbildende Domäne liegt. Die amino- und carboxyterminalen Enden der TRP-Proteine sind intrazellulär lokalisiert, was dafür spricht, dass sowohl das Aktivierungssignal als auch die Reaktion auf diese Aktivierung intrazellulär stattfinden (siehe Abb. 2.4). TRPC-Proteine besitzen mehrere „Ankyrin Repeats“ (AnkR) am Aminotermus und eine sogenannte „TRP-Box“ am Carboxyterminus. AnkR's dienen der Interaktion mit dem Zytoskelett (Michaely and Bennett, 1993). Bei der TRP-Box handelt es sich um den am höchsten konservierten

Bereich der TRPC-Proteine mit der Aminosäuresequenz EWKFAR. Die Mitglieder der TRPCs können aufgrund der Homologien und funktionellen Eigenschaften wiederum in Gruppen unterteilt werden. Homomere TRPC1-Kanäle haben ebenso wie TRPC4- und C5-Kanäle eine geringe Selektivität für Kalziumionen. Es werden sowohl Rezeptoraktivierung als auch die Aktivierung durch Entleerung der intrazellulären Speicher diskutiert. Homomere TRPC3-, sowie C6- und C7-Kanäle haben eine etwas höhere Selektivität für Kalziumionen und werden durch Diazylglyzerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃) aktiviert (Birnbauer et al., 2003; Clapham et al., 2001; Hofmann et al., 1999). Eine Aktivierung durch Entleerung der intrazellulären Speicher konnte bis heute nicht ausgeschlossen werden. Die TRPC3-Kanalfunktion auch hängt auch vom TRPC3-Expressionslevel ab. Während hohe Expression einen Rezeptorgesteuerten TRPC3-Kanal hervorbringt, wurde eine speicherabhängige Aktivierung nur bei niedriger Expression festgestellt (Vazquez et al., 2001; Vazquez et al., 2003). Endogene TRP-Kanäle bestehen wahrscheinlich aus verschiedenen TRP-Proteinen, die zusammen die für Kationen durchlässige Pore bilden. Die Eigenschaften der homomeren Kanäle sind nicht unbedingt auf endogen vorkommende TRPC-Kanäle übertragbar. Welche Proteine je nach Funktion am Aufbau des Kanals beteiligt sind ist noch unklar. Zudem scheinen die einzelnen Untereinheiten des Kanals sich unter bestimmten Umständen gegenseitig ersetzen zu können (Hofmann et al., 2002). Zudem kann der Aufbau der speichergesteuerten Kanäle in verschiedenen Zelltypen variieren.

Unser Interesse gilt dem endogenen Kanal in primären, humanen T-Zellen. Aus diesem Grund habe ich im Rahmen meiner Diplomarbeit und in Zusammenarbeit mit anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hoth eine Expressionsanalyse aller TRPCs, TRPVs und TRPMs in humanen, primären T-Zellen durchgeführt (Schwarz et al., 2007b). Von den oben beschriebenen Kandidaten sind nur TRPC1 und TRPC3 konstant in CD3⁺ T-Zellen exprimiert, weswegen ich auf diese noch etwas genauer eingehen möchte.

Wu et al. zeigten eine Reduktion im speichergesteuerten Ca²⁺ Einstrom in HEK293-Zellen, nachdem TRPC1 oder TRPC3 zusammen mittels antisense-RNA herunterreguliert wurden (Wu et al., 2000; Wu et al., 2004). Ebenso ein siRNA „knock-down“ beider Proteine zeigte einen deutlichen hemmenden Effekt auf den Ca²⁺ Einstrom (Zagranichnaya et al., 2005). TRPC1-Oberflächenexpression scheint direkt über STIM1 reguliert zu werden (Huang et al., 2006; Lopez et al., 2006; Yuan et al., 2007), während TRPC3 nur indirekt von STIM1, über eine Heteromultimerisierung mit TRPC1, reguliert wird. Liao et al. zeigten ebenso eine Interaktion zwischen TRPC3 und Orail. Darüber hinaus zeigten sie, dass eine

schwache Orai1-Überexpression den speichergesteuerten Ca^{2+} Einstrom in TRPC3 exprimierenden Zellen im Gegensatz zu Zellen, die kein TRPC3 exprimieren, erhöht (Liao et al., 2007). Der Komplex aus TRPC1, STIM1 und Orai1 scheint am SOC in humanen Speicheldrüsenzellen beteiligt zu sein (Ong et al., 2007). Die unterschiedlichen Möglichkeiten der Interaktion sind in Abb. 2.6 dargestellt. Dabei ist noch offen, ob die TRP-Proteine einen eigenen Kanal bilden, der Einfluss auf den I_{CRAC} nimmt oder, ob sie selbst an der Bildung des CRAC/Orai1 Kanals beteiligt sind.

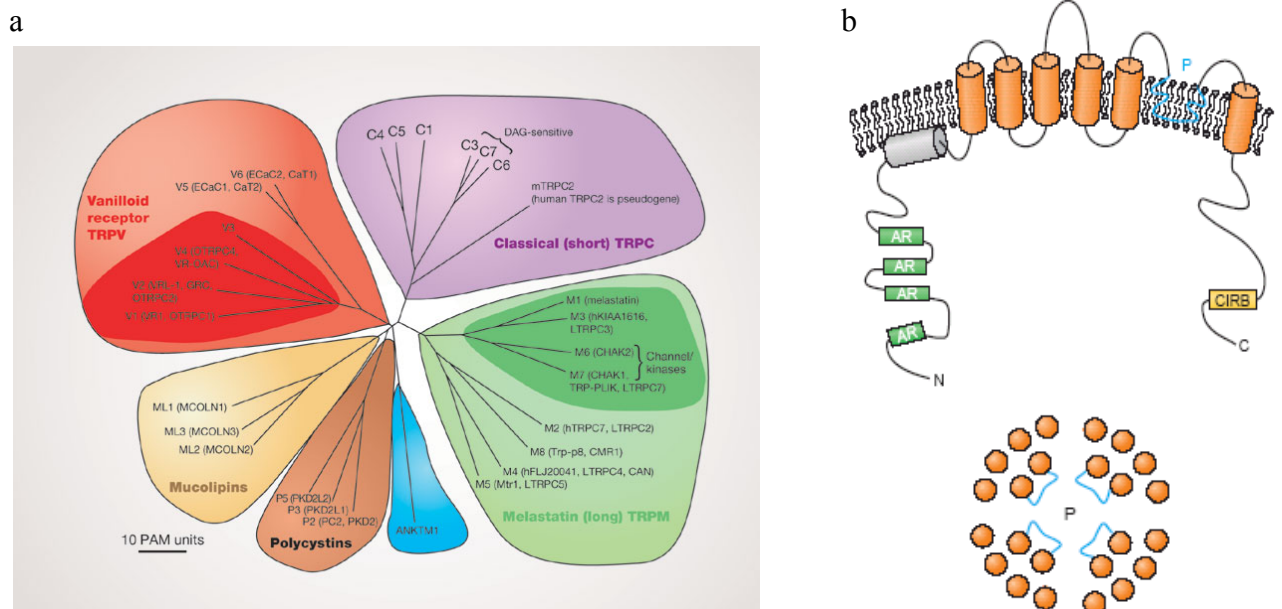


Abb. 2.5: Stammbaum der TRP-Familie (a) und Aufbau der TRPC-Proteine und -Kanäle (b). Angegeben ist die gängige Nomenklatur und in Klammern ältere Namen, die durch die gleichzeitige Entdeckung der Gene bzw. Proteine durch unterschiedliche Arbeitsgruppen entstanden sind (a) (Clapham, 2003). TRPC-Proteine bestehen aus sechs Transmembrandomänen, wobei zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne porenbildende Domäne liegt. Die amino- und carboxyterminalen Enden sind intrazellulär lokalisiert. Der N-Terminus enthält vier „ankyrin-like“ Einheiten („ankyrin-like repeats“, AR), der C-Terminus enthält die CIRB-Region, welche sowohl an Calmodulin als auch an den IP_3 -Rezeptor binden kann (calmodulin inositol-triphosphate-receptor binding region) (b, oben). In dem Modell der Kanalformation besteht dieser aus vier zusammenlagerten Untereinheiten. Die Abbildung zeigt, wie sich die Untereinheiten mit den Transmembran-Domänen und dem hydrophoben Segment in der Plasmamembran räumlich anordnen (b, unten) (Putney, 2004).

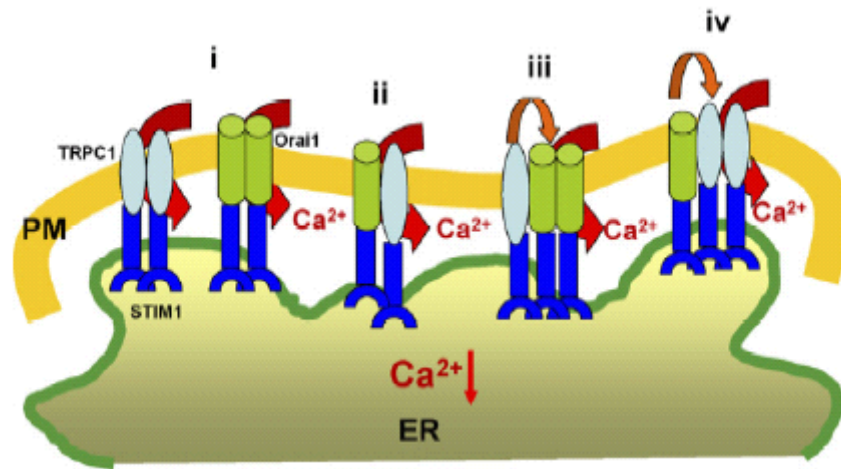


Abb.2.6: Möglich Rolle von TRPC-Proteinen und Orai1 im speichergesteuerten Kalziumeinstrom. (i) TRPC und Orai1 bilden unabhängige Kanäle, (ii) TRPC und Orai1 gehören zu demselben Kanal, (iii) TRPC1 ist ein Regulator des Orai1-Kanals (gekennzeichnet durch den orangenen Pfeil) oder Orai1 reguliert den TRPC-Kanal (iv) (modifiziert nach (Ambudkar et al., 2007)).

2.7 Zielsetzung der Arbeit

Die AG Hoth beschäftigt sich schon lange mit der Erforschung von Kalziumsignalen und ihrer Bedeutung und Modulation in T-Zellen. Unter anderem ist bekannt, dass die Proliferation ein kalziumabhängiger Prozess ist (Schwarz et al., 2007a; Zitt et al., 2004). Die AG Renner hat gezeigt, dass eine Kostimulation mit B7-1 die Proliferation von T-Zellen leicht und eine Kostimulation mit B7-2 die Proliferation sogar erheblich gegenüber einer reinen Stimulation des TCR/CD3 erhöht. Das Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob die durch eine B7 Kostimulation verstärkte T-Zellaktivierung über Kalziumsignale vermittelt wird. Das im Rahmen dieser Arbeit gefundene erhöhte Kalziumsignal nach B7-2 Kostimulation sollte dann weitergehend untersucht werden. Eine zentrale Fragestellung war dabei welcher der beiden B7 Bindungspartner, CD28 oder CTLA-4, die Modulation des Kalziumsignals bewirkt. Zudem galt es herauszufinden, ob sich durch B7 Kostimulation die Entleerung der Kalziumspeicher verändert oder ob der Kalziumeinstrom über die Plasmamembran beeinflusst wird. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, beteiligte Proteine zu charakterisieren, von denen bekannt ist, dass sie im Kalziumsignal von T-Zellen eine Rolle spielen. Dazu gehören Orai1 (Bestandteil des CRAC-Kanals), STIM1 (Kalziumsensor im ER) und TRPC3 (Rolle bei der Proliferation). Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen zur vollständigen Aufklärung des Kalziumsignals in primären, humanen T-Zellen und der möglichen Modulation dieses Signalweges durch eine B7-Kostimulation beitragen und in Zukunft vielleicht die Entwicklung neuer Therapien im Bereich der Onkologie und der Autoimmunerkrankungen ermöglichen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Hier nicht aufgeführte Standardlaborchemikalien wurden von den Firmen VWR oder Sigma in der Qualität „zur Analyse“ bezogen.

Chemikalie	Bestellnummer	Firma
2-APB (2-Aminoethoxydiphenyl borate)	D-9754	Sigma
Borsäure	4035-01	J. T. Baker
BSA	A-7906	Sigma
EDTA (Ethyl-Diamin-Tetraacetic Acid)	E-6758	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxide)	D-8418	Sigma
FCS (fetales Kälberserum)	10270-106	Invitrogen
Percoll™	17-0891	Amersham Biosciences
Fura-2 AM “cell permanent”	F-1221	Molecular Probes
Glycin	3908.2	Roth
Hepes	H-7523	Sigma
HT-Supplement 50x	41065-012	Invitrogen
Interleukin-2, human (hIL-2)	1204700	Roche
Penicillin-Streptomycin	15140-122	Invitrogen
PFA (Paraformaldehyd)	F-1635	Sigma
PHA-P (Phytohemagglutinin-P)	L-9132	Sigma
Polyornithin	P-3655	Sigma
Puromycin, Dihydrochloride	540222	Calbiochem
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	327315000	Acros Organics
Thapsigargin	T-7458	Molecular Probes
Triton X100	018774	Eurobio

3.1.2 Medien und Puffer

Erythrozytenlyse-Puffer	pH 7,3	155 mM 10 mM 0,1 mM	NH ₄ Cl KHCO ₃ EDTA
Lösung 1 (0 mM Kalziumlösung)	pH 7,4	155 mM 4,5 mM 3 mM 1 mM 10 mM 5 mM	NaCl KCL MgCl ₂ EGTA Glukose Hepes
Lösung 2 (0,25 mM Kalziumlösung)	pH 7,4	155 mM 4,5 mM 2,75 mM 0,25 mM 10 mM 5 mM	NaCl KCL MgCl ₂ Ca Cl ₂ Glukose Hepes
Lösung 3 (0,5 mM Kalziumlösung)	pH 7,4	155 mM 4,5 mM 2,5 mM 0,5 mM 10 mM 5 mM	NaCl KCL MgCl ₂ Ca Cl ₂ Glukose Hepes
Lösung 4 (1 mM Kalziumlösung)	pH 7,4	155 mM 4,5 mM 2 mM 1 mM 10 mM 5 mM	NaCl KCL MgCl ₂ Ca Cl ₂ Glukose Hepes

AIM-V [®]	Invitrogen, # 12055
HBSS	PAA Laboratories GmbH, # H15-009
RPMI-1640	Invitrogen, # 21875
D-PBS	Invitrogen, # 14190

3.1.3 Antikörper

Soweit nicht anders vermerkt, richten sich alle verwendeten Antikörper gegen humane Antigene.

3.1.3.1 Direkt markierte Antikörper

Antikörper	Fluorophor	Firma	Verdünnung
anti-CD3	R-PE	Dako	1:10
anti-CD4	R-PE	Dako	1:10
anti-CD8	Cy5	Dako	1:10
anti-CD19	FITC	Dako	1:10
anti-CD28	R-PE	Ebioscience	1:10
anti-CD33	R-PE	BD Pharmingen™	1:10
anti-CD125 (CTLA-4)	R-PE	BD Pharmingen™	1:10

3.1.3.2 Primäre Antikörper

Antikörper	Firma	Verdünnung	Methode
anti-CD3	Serotec	s. Punkt 3.2.6	Beads
anti-CD28	BD Pharmingen™	s. Punkt 3.2.6	Beads
anti-CD28 (blocking)	eBioscience	1:20	Ca ²⁺ -Imaging
anti-Orai1	ProSci	1:20	Immunfluoreszenz
anti-STIM1	BD Pharmingen™	1:20	Immunfluoreszenz

3.1.3.3 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Fluorophor	Firma	Verdünnung
anti-Kaninchen-IgG	Alexa-488	Molecular Probes	1:1000
anti-Maus-IgG	Alexa-488	Molecular Probes	1:2000

3.1.4 Fusionsproteine

Alle Fusionsproteine wurden uns von der Arbeitsgruppe Renner (USZ, Zürich) zur Verfügung gestellt. Die Bindungsaffinitäten aller verwendeten Fusionsproteine wurden vorab von der Arbeitsgruppe Renner untersucht. Alle Fusionsproteine richten sich auf einer Seite gegen das von den CHO-Zellen exprimierte CD33. Die andere Seite besteht aus einem anti-CD3 Antikörper oder der extrazellulären Domäne von B7-1 (CD80) oder B7-2 (CD86). In Abb. 3.1 sind die Fusionsproteine schematisch dargestellt.

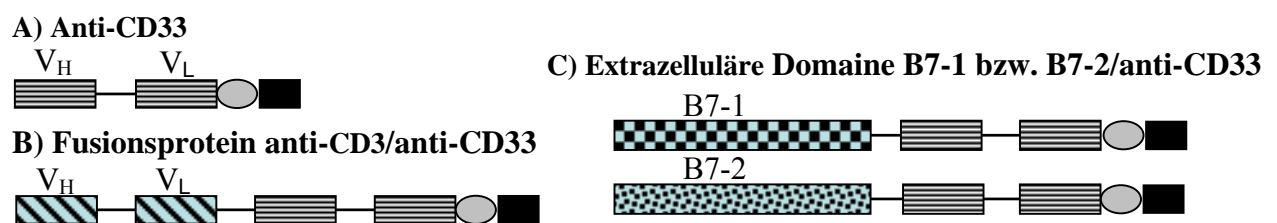


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des anti-CD33 Abschnittes und der verwendeten Fusionsproteine. Die Fusionsproteine bestehen auf der einen Seite alle aus dem anti-CD33 Molekül (A). Die andere Seite der Fusionsproteine besteht entweder aus einem anti-CD3 Molekül (B) oder aus der extrazellulären Domäne von B7-1 bzw. B7-2 (C).

3.1.5 Small interfering RNAs (siRNAs)

Die siRNA Sequenzen wurden aus den DNA-Sequenzen entnommen, deren „accession number“ angegeben ist. Die beiden siRNAs con_b1 (Produkt Nummer: D-001210-02-05) und non-silencing (ns) (Katalog Nummer: 1022076) werden von den Firmen Dharmacon bzw. Qiagen vertrieben und haben kein RNA-Target in der humanen DNA.

Name [accession number]	Gen	siRNA Sequenz Sense und Anti-Sense	Konz.	Firma
STIM1 [NM_003156]	STIM1	5' GGCUCUGGAUACAGUGCUCdTdT 3' 5' GAGCACUGUAUCCAGAGCCdTdT 3'	20µM	Qiagen
TRPC3 [NM_003305]	TRPC3	5' CGGUAUCGCUAGCAACUGAdTdT 3' 5' UCAGUUGCUGAGCGAUACCGdTdT 3'	20µM	Qiagen
TRPC7 [NM_020389]	TRPC7	5' GGCCAAAAGCUGUGAAAAUdTdT 3' 5' AUUUUCACAGCUUUUGGCCdTdT 3'	20µM	Qiagen
con_b1	/	5' UAGCGACUAAACACAUCA UU 3' 5' UUGAUGUGUUUAGUCGCUA 3'	20µM	Dharmacon
non-silencing (ns)	/	5' UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT 3' 5' ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT 3'	20µM	Qiagen

3.1.6 Geräte

Mikroskope	IX 70 CK 30 E600	Olympus Olympus Nikon
Rotator	REAX 2	Heidolph
Schüttler	3005 Thriller® Thermo-Inkubationsmischer	GFL Peqlab
Zentrifugen	Centrifuge 5415 C Centrifuge 5415 R Sorvall Ultrazentrifuge Universal 32 R	Eppendorf Eppendorf DuPont Hettich

3.2 Methoden

3.2.1 Kultur der verwendeten Zelllinien

Alle Zellen wurden bei 37°C mit 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Der Jurkat T-Zellklon E6-1 (ATCC-Nr.: TIB-152) und die davon abstammende Diphtherietoxin-resistente parentale Zelllinie (par) wurden in RPMI-1640 Medium unter Zugabe von 10 % fetalem Kälberserum (FCS, Invitrogen), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage verdünnt.

Die CD33 exprimierenden CHO (Chinese Hamster Ovary) Zellen wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Renner (USZ, Zürich) zur Verfügung gestellt. Die stabil transfizierten, adhärenen CHO Zellen wurden in RPMI-1640 Medium, unter Zugabe von 10 % fetales Kälberserum (FCS, Invitrogen), 1 x HT-Supplement und dem Selektionsantibiotikum Puromycin (2 µg/ml), kultiviert. Puromycin wurde direkt in die Zellkulturflaschen, zu den Zellen, und nicht in die Mediumflasche gegeben, um zu verhindern, dass wiederholtes Aufwärmen das Antibiotikum zerstört. Die CHO Zellen wurden 5 min mit 15 ml PBS/0,5 mM EDTA (Zellkultur getestet) abgelöst und anschließend einmal gewaschen. Nach der fünfminütigen Zentrifugation bei 200 x g wurden die Zellen je nach Bedarf 1:5 bis 1:10 verdünnt. Die CHO-Zellen wurden nur bis maximal zur 30ten Passage verwendet. Wurden die Zellen für Zytologie (s. Punkt 3.2.2) oder Kalziummessungen (s. Punkt 3.2.11.2) benötigt, wurden 2×10^5 bis 5×10^5 Zellen in 3 ml Medium verdünnt und in ein Well einer 6-well-Platte (Falcon) gegeben. In jedes Well wurde zuvor ein autoklaviertes Deckglas (Ø 25 mm, Stärke 1, Kindler) gegeben, auf dem die Zellen dann adhäreren.

3.2.2 CD33-Färbung der CHO-Zellen

Zunächst wurden die mit CHO-CD33⁺ Zellen bewachsenen Deckglas (s. Punkt 3.2.1) in eine eigens dafür angefertigte Kammer (s. Abb. 3.2) eingesetzt und mit einem zweiten Deckglas (Ø 12 mm, Stärke 1, Kindler) abgedeckt. Die Kammer wurde mittels Silikon-Fett (VWR) dicht verschlossen. Zwei Öffnungen in der Kammer ermöglichen einen Lösungswechsel und ein Spülen während des Versuchs. Die Zellen wurden mit einem 20 x Objektiv (Olympus, Uplan/Apo, Numerische Apparatur (NA) = 1,0) im Mikroskop betrachtet und die Kammer mit Medium durchgespült. Die Zellen wurden zunächst im Durchlicht bei einer Belichtungszeit von 10 ms aufgenommen. Der gleiche Bereich wurde anschließend mit einem für Farbstoff R-Phycoerythrin (R-PE) geeigneten Filter (Part No: F 41-007; Cy3, Anregungsfilter: HQ 610/75, Dichroischer Spiegel: Q 570 LP, Emissionsfilter: HQ 545/30, A.H.F. Analysetechnik AG), einer Belichtungszeit von 1000 ms und einer Anregungswellenlänge von 550 nm (Polychrom IV Monochromator von Till Photonics) aufgenommen um die Hintergrundfluoreszenz der Zellen zu bestimmen. Anschließend wurden 40 µl einer 1:10 Verdünnung des R-PE markierten anti-CD33 Antikörpers in die Kammer gesaugt und 15 min im Dunklen inkubiert. Nach diesen 15 min wurde die Kammer kräftig mit Medium gespült um den nicht-gebundenen Antikörper zu entfernen. Im Anschluss wurden die oben beschriebenen Bilder noch einmal aufgenommen.



Abb. 3.2: Abbildung der zum Mikroskopieren verwendeten Kammer.

Wie in Bild A zu sehen, besteht die Kammer aus zwei Teilen, die ineinander gesetzt werden können (s. Bild B). Zwischen beide Kammerteile kommt das Deckglas mit den Zellen. Die zusammengesetzte Kammer wird mit einem kleinen Deckglas verschlossen. Die Kammer wird, wie in Bild C und D zu sehen, am Messplatz eingespannt und mit zwei Schläuchen verbunden, die einen Lösungswechsel während der Messung ermöglichen.

3.2.3 Isolation peripherer Monozyten aus humanem Vollblut

Zur Isolation humaner, peripherer Blutmonozyten (PBMCs) wurden Leukozyten-Depletionsfilter aus der Blutbank verwendet, die uns vom Blutspendedienst der Universitätskliniken des Saarlandes (Abteilung für klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin) zur Verfügung gestellt wurden. Alle Zentrifugationen wurden bei Raumtemperatur (RT) in der Hettich-Zentrifuge durchgeführt. Die Depletionsfilter (Fresenius) wurden zunächst wie in Abb. 3.3 dargestellt, befestigt und mit 60-70 ml HBSS gegen die Laufrichtung des Blutes in eine Zellkulturflasche gespült. Zwei Leucosep-Röhrchen (Greiner) wurden mit je 15 ml Ficoll beladen und 30 s bei 1000 x g zentrifugiert. Das Ficoll befindet sich anschließend unter dem Filter. Das Zell-Puffergemisch wurde auf diese Leucosep-Röhrchen verteilt. Die Gradientenzentrifugation wurde 30 min bei 450 x g (ohne Bremse) durchgeführt. Daraufhin wurden beide Leukozytenringe abgenommen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde mit HBSS auf 50 ml aufgefüllt und 15 min bei 250 x g zentrifugiert. Wenn nötig (rote Farbe des Sediments), wurde eine Erythrozytenlyse mit 1-2 ml Erythrozytenlyse-Puffer für 1-2 min durchgeführt. Um die Lyse zu stoppen, wurde mit HBSS auf 50 ml aufgefüllt und 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10-20 ml PBS/0,5 % BSA aufgenommen. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauer-Kammer gezählt. Hierzu wurden sie 1:1 mit Trypanblau (Sigma) gemischt, um sie auf ihre Vitalität zu testen. Aus diesen Zellen wurden dann direkt entweder CD3⁺- oder CD4⁺- Zellen isoliert (s. Punkt 3.2.4).

Ein positives Votum der Erthikkommission zur Verwendung humaner Blutzellen lag vor (s. Punkt 7.1).

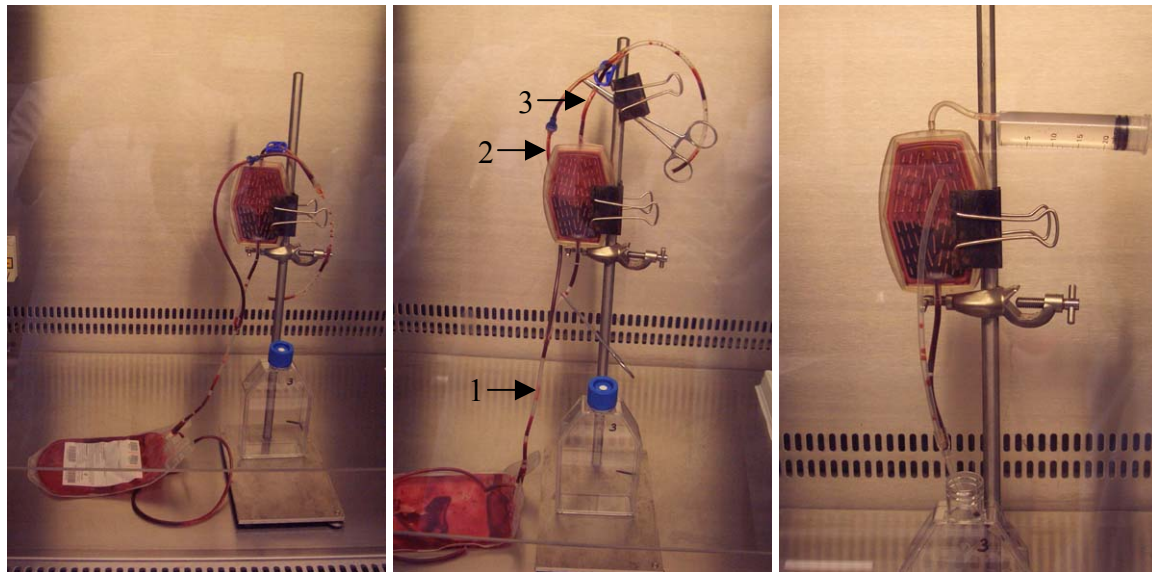


Bild 1

Bild 2

Bild 3

Abb. 3.3: Ausspülung der PBMCs aus einem Leukozyten-Depletionsfilter.

Der Filter wird, wie in Bild 1 und 2 gezeigt, befestigt. Anschließend wird zunächst der mit Pfeil 1 markierte Schlauch durchgeschnitten und des Ende in die Zellkulturflasche gesteckt. Dann erfolgt ein Schnitt durch den mit Pfeil 2 markierten Schlauch. Daraufhin werden die Klemmen entfernt und der mit Pfeil 3 markierte Schlauch durchgeschnitten. Abschließend wird der Filter, wie in Bild 3 zu sehen, gegen die Laufrichtung mit einer mit HBSS gefüllten Spritze durchgespült. Das Blut/HBSS-Gemisch wird in der Flasche aufgefangen (modifiziert nach (Ebner et al., 2001).

3.2.4 Negativ-Bead-Isolation von CD3⁺- bzw. CD4⁺- Zellen

Die Bead-Isolation der CD3⁺- bzw. CD4⁺- Zellen wurde mit dem Dynal[®] T Cell Negative Isolation Kit bzw. Dynal[®] CD4 Negative Isolation Kit von Dynal Biotech durchgeführt. Alle Zentrifugationen wurden bei 4°C in der Eppendorf-Zentrifuge 5415 R durchgeführt. Die Isolation wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt, allerdings wurde statt des angegebenen Puffers 1 (PBS w/0,1 % BSA und 2 mM EDTA) PBS mit 0,5 % BSA und ohne EDTA verwendet. Es wurden auch keine „Buffy coats“ oder kompletten Blutproben, sondern zuvor isolierten PBMCs verwendet (s. Punkt 3.2.3). Da diese während der Isolation schon gewaschen wurden, wurde die entsprechende Zellzahl PBMCs nach einmaliger Sedimentierung von 8 min bei 220 x g direkt in einem dem Protokoll entsprechendem Volumen PBS/0,5 % BSA resuspendiert und entsprechend des Protokolls weiterbehandelt.

3.2.5 anti-CD3 bzw. anti-CD4 Färbung isolierter T-Zellen

Im Anschluss an die Isolation (s. Punkt 3.2.4) wurde die Population mittels Antikörperfärbung auf ihre Reinheit untersucht. Hierzu wurden ca. $0,5 \times 10^6$ T-Zellen kurz in der Eppendorf-Zentrifuge 5415 C zentrifugiert und anschließend in 40 μl AIM-V[®] Medium resuspendiert. 15 μl der Zellen wurden dann auf ein Deckglas (\varnothing 25 mm, Stärke 1, Kindler) gegeben, das wie folgt vorbehandelt wurde damit die Zellen haften: Ein Tropfen Polyornithin (0,1 mg/ml) wurde auf das Deckglas gegeben und 30 min inkubiert, bevor das restliche, noch flüssige Polyornithin, abgesaugt wurde. Die Zellen wurden dann 10 min absitzen gelassen, bevor die Messkammer wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben zusammengebaut wurde (siehe auch Abb. 3.2). Die Zellen wurden mit einem 20 x Objektiv (Olympus, Uplan/Apo, Numerische Apparatur (NA) = 1,0) im Mikroskop betrachtet und die Kammer solange mit Medium durchgespült, bis nur noch die haftenden Zellen übrig waren. Die Zellen wurden zunächst im Durchlicht bei einer Belichtungszeit von 10 ms aufgenommen. Der gleiche Bereich wurde anschließend mit einem für Farbstoff R-PE geeigneten Filter (Part No: F 41-007; Cy3, Anregungsfilter: HQ 610/75, Dichroischer Spiegel: Q 570 LP, Emissionsfilter: HQ 545/30, A.H.F. Analysetechnik AG), einer Belichtungszeit von 1000 ms und einer Anregungswellenlänge von 550 nm (Polychrom IV Monochromator von Till Photonics) aufgenommen um die Hintergrundfluoreszenz zu bestimmen. Anschließend wurden 40 μl einer 1:10 Verdünnung des R-PE markierten anti-CD3/anti-CD4 Antikörpers in die Kammer gesaugt und 15 min im Dunklen inkubiert. Nach diesen 15 min wurde die Kammer kräftig mit Medium gespült um den überschüssigen Antikörper zu entfernen. Im Anschluss wurden die oben beschriebenen Bilder noch einmal aufgenommen. Die Auswertung dieser beiden Bilder ermöglicht die Berechnung des Anteils der CD3⁺- bzw. CD4⁺-Zellen an der gesamten Zellpopulation.

3.2.6 Herstellung der anti-CD3/CD28 gecoateten Beads

Alle Zentrifugationen wurden bei RT entweder in der Eppendorf-Zentrifuge 5415 C oder in der Heraeus-Zentrifuge durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zentrifugationen für 10 min bei 8000 x g durchgeführt. Zunächst wurden 100 µl Beads (Polybead[®] polystyrene 6.0 micron Microspheres, Polysciences, Inc.) mit 900 µl 0,1 M Boratpuffer (0,1 M Borsäure, pH 8,5 mit NaOH eingestellt) gemischt und anschließend 5 min zentrifugiert. Die Beads wurden dann zweimal in je 1 ml Boratpuffer gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Beads in 450 µl Boratpuffer resuspendiert und 12,5 µl anti-CD3 Antikörper und 37,5 µl anti-CD28 Antikörper zugegeben. Die Beads wurden über Nacht auf dem Rotator mit den Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Beads erneut zentrifugiert, dann in 500 µl Boratpuffer mit 10 mg/ml BSA resuspendiert und 30 min auf dem Rotator inkubiert. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal wiederholt, bevor die Beads in 500 µl Storage Puffer (Bottle #7 des Carbodiimide Kit for Carboxylate Beads von Polysciences, Inc.) resuspendiert und dann bei 4°C gelagert wurden. Bevor die Beads verwendet wurden, wurde die entsprechende Menge zunächst 2 x mit Medium gewaschen.

3.2.7 Vorstimulation der T-Zellen

Die Zellen wurden ein oder vier Tage nach Isolation und eventueller Transfektion stimuliert. Handelte es sich um transfizierte Zellen wurden diese zunächst einmal gewaschen (Zentrifugation für 5 min bei 100 x g in der Eppendorf-Zentrifuge 5415 R) und in frischem AIM-V[®] Medium aufgenommen. Die Stimulation erfolgte entweder durch Zugabe von 3 µg/ml PHA und 12 U/ml humanes IL-2 (hIL-2) oder durch Zugabe von anti-CD3/anti-CD28 gecoateten Beads (Herstellung s. Punkt 3.1.6) im Verhältnis 1:2 (Beads : Zellen). Wenn die Zellen zu dicht oder das Medium zu gelb wurde, wurde frisches Medium zugegeben und, im Fall der Stimulation mit PHA und hIL-2, auch die entsprechende Menge dieser Substanzen.

3.2.8 Transfektion CD4⁺ T-Zellen durch Elektroporation

Zunächst wurden, pro Transfektion, 5×10^6 CD4⁺ T-Zellen 5 min bei 100 x g zentrifugiert und in 100 µl T-Cell Nucleofector Solution (Amaxa) aufgenommen. Ab diesem Zeitpunkt wurde jede Transfektion einzeln bis zum Ende durchgeführt. Die Durchführung aller Transfektionen sollte eine Dauer von 20 min nicht überschreiten, da die T-Cell Nucleofector Solution sonst zytotoxisch wirkt. Zunächst wurden 100 µl Zellen mit der entsprechenden Menge DNA bzw. siRNA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt. Die siRNAs wurden entsprechend des Herstellerprotokolls vorbehandelt und besitzen eine Konzentration von 20 µM. Es wurde ca. 1 µg siRNA (= 3 µl) eingesetzt. Die gemischte Probe wurde in eigens dafür vorgesehene Küvetten (Amaxa) überführt und die Zellen mit dem Programm U-14 in dem Elektroporator von Amaxa transfiziert. Anschließend wurde zu jeder Transfektion 500 µl warmes AIM-V[®] Medium zugegeben und die Zellen mit eigens dafür vorgesehenen Plastikpipetten (Amaxa) in ein Well einer 24-well-Platte (Falcon) überführt. In jedes Well wurden weitere 1,5 ml AIM-V[®] Medium gegeben und die Zellen bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % H₂O inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen einmal gewaschen und in frischem Medium resuspendiert, um die restliche T-Cell Nucleofector Solution und die toten Zellen zu entfernen und bis zur weiteren Verwendung bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % H₂O inkubiert.

3.2.9 Immunfluoreszenz

Zunächst wurde je ein Deckglas (Ø 12 mm, Stärke 1, Kindler) in ein Well einer 4-well Platte (Multidish 4 wells von Nunc A/S) gegeben und 500 µl Polyornithin (0,1 mg/ml) zugegeben. Nach 30 min wurde das Polyornithin abgesaugt und die Deckgläser 2 x 5 min mit je 1 ml 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden ca. $0,5-1 \times 10^6$ T-Zellen in jedes Well gegeben und 60 min absitzen gelassen. Nach zweimaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die Zellen auf dem Deckglas fixiert, indem in jedes Well für 20 min 500 µl PBS/3 % PFA gegeben wurden. Um das restliche PFA zu inaktivieren wurden die Deckgläser anschließend mit 500 µl PBS/0,1 M Glycin 3 min inkubiert. Sollten CTLA-4, STIM1 oder Orail gefärbt werden, wurden die Zellen nach einmaligem Waschen 20 min in PBS/0,1 % Triton permeabilisiert. Für die Färbungen von CD3 und CD28 war eine Permeabilisierung der Zellen nicht notwendig. Diese Deckgläser wurden nur einmal gewaschen. In allen folgenden Schritten wurde Triton nur dann zu den Lösungen hinzugefügt, wenn die Zellen permeabilisiert wurden. Im Anschluss wurden die Deckgläser 20 min mit „blocking buffer“ (PBS/2 % BSA/mit oder ohne 0,1 % Triton) inkubiert. Für die anschließende Antikörperfärbung, die in einer feuchten Kammer im Dunklen durchgeführt wurde, wurden direkt markierte bzw. unmarkierte Primärantikörper (s. Punkt 3.1.3) mit „blocking buffer“ verdünnt und je 50 µl auf ein Stück Parafilm getropft. Die Deckgläser wurden dann vorsichtig, mit den Zellen nach unten, auf den jeweiligen Antikörpertropfen gelegt und 60 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Deckgläser 3 x 5 min in PBS/ mit oder ohne 0,1 % Triton gewaschen. Wenn ein nicht direkt markierter Primärantikörper verwendet wurde, folgte nun eine zweite Antikörperfärbung mit dem entsprechenden Zweitantikörper. Diese erfolgte auf die gleiche Weise wie die Färbung zuvor. Nach anschließendem Waschen wurden die Deckgläser kurz in Wasser getaucht und auf einem Deckglas (Ø 25 mm, Stärke 1, Kindler) eingebettet. Als Einbettmedium wurde der ProLong® Antifade Kit von Molecular Probes™ verwendet. Für die konfokalen Aufnahmen wurde das Mikroskop E600 (Nikon) mit einem 100 x Öl Objektiv (PlanApo, NA 1.4, Pk3 DM, Nikon) verwendet. Als Lichtquelle dienten Laser der Wellenlänge 488 nm (Coherent Sapphire 488 30) bzw. 561 nm (Melles Griot 85-YCA-015). Die Aufnahmen wurden mit der VoxCellScan Software aufgenommen und mit dem Programm ImageJ ausgewertet.

3.2.10 STIM1-Translokationsmessung

Die Zellen wurden zunächst wie unter Punkt 3.2.8 beschrieben mit STIM1-YFP Vektor (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Tobias Meyer) transfiziert. Einen Tag nach Transfektion wurden ca. $0,5-1 \times 10^6$ T-Zelle kurz in der Eppendorf-Zentrifuge 5415 C zentrifugiert und anschließend in 40 μ l AIM-V[®] Medium resuspendiert. 15 μ l der Zellen wurden dann auf ein Deckglas (\varnothing 25 mm) gegeben, das wie unter Punkt 3.2.5 mit Polyornithin vorbehandelt wurde. Die Zellen wurden 10 min absitzen gelassen, bevor die Messkammer wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben zusammengebaut wurde (siehe auch Abb. 3.2). Die Zellen wurden mit einem 40 x Öl-Objektiv (Olympus, Uplan/Apo, Numerische Apparatur (NA) = 1,0) im Mikroskop betrachtet und die Kammer solange mit Medium durchgespült, bis nur noch die haftenden Zellen übrig waren. Mit einem für den Farbstoff YFP geeigneten Filter (Part No: F41-028; YFP, Anregungsfilter: HQ 535/30, Dichroischer Spiegel: Q 515 LP, Emissionsfilter: HQ 500/20, A.H.F. Analysetechnik AG), einer Belichtungszeit von 1000 ms und einer Anregungswellenlänge von 480 nm (Polychrom IV Monochromator von Till Photonics) wurde zunächst ein Bereich gesucht, indem sich möglichst viele STIM-YFP positive T-Zellen befanden. Dieser Bereich wurde dann sowohl mit einem YFP Filter, als auch im Durchlicht bei einer Belichtungszeit von 10 ms photographiert. Anschließend wurde die Translokationsmessung gestartet und mit dem Programm TILL Vision (TILL Photonics) aufgenommen. Es wurde alle 10 s ein Infrarotbild aufgenommen und eines mit dem YFP Filter (Belichtungszeit: 500 ms). Direkt nachdem die Messung gestartet wurde, wurden, zur fokalen Stimulation der T-Zellen, ca. 2×10^5 anti-CD3/CD28 gecoatete Beads in 50 μ l AIM-V[®] Medium in die Kammer zurückgesaugt. Die Messung dauert 1500 s und wurde anschließend mit den Programmen TILL Vision (TILL Photonics) und IGOR pro ausgewertet.

3.2.11 Messung intrazellulärer Kalziumkonzentrationen

Alle Zentrifugationen wurden in der Eppendorf-Zentrifuge 5450 C durchgeführt. Die T-Zellen wurden vor Messbeginn 30 min mit 2 μM des Fura-2 (Ester)/AM (gelöst in DMSO, Stock 1 mM) in AIM-V[®] Medium geladen, Jurkat T-Zellen mit 1 μM des Fura-2 (Ester)/AM (gelöst in DMSO, Stock 1 mM) in RPMI Medium geladen. Das Fura-2/AM enthaltende Medium wurde 15 s bei maximaler Geschwindigkeit mittels eines Vortexers gemischt, bevor es zu den Zellen gegeben wurde. Ca. $0,5-1 \times 10^6$ T-Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und kurz abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml Fura-2-Medium resuspendiert und 30 min im Dunklen inkubiert. Fura-2 ist ein Kalzium-bindender Farbstoff, der dazu verwendet wird, die intrazellulären Kalziumkonzentrationen zu bestimmen. Die Zellen wurden im Anschluss an die Inkubation kurz abzentrifugiert und einmal mit 1 ml Medium gewaschen. Dann wurden die Zellen in 40 μl der jeweiligen Messlösung resuspendiert und gemessen. Bei den Messungen wurde der Farbstoff Fura-2/AM bei den Wellenlängen 340 nm und 380 nm über einen dichroischen Spiegel (DLCP 410) angeregt, welche von einem Monochromator (Polychrom IV Monochromator von Till Photonics) generiert werden. Die Kalzium-abhängige Emission des Farbstoffs bei 520 nm wird durch das jeweilige Objektiv (siehe Punkte 3.2.11.1 – 3.2.11.3) mittels einer CCD Kamera gemessen. Alle Messungen wurden mit dem Programm TILL Vision (TILL Photonics) aufgenommen und anschließend mit diesem und mit IGOR pro ausgewertet. Die Ratio 340/380 ist dabei direkt proportional zur Kalziumkonzentration in der Zelle und wird mit folgender Formel abgeschätzt: $[\text{Ca}^{2+}]_i = K \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$ (Grynkiewicz et al., 1985).

3.2.11.1 Messung der Kalziumkonzentrationen nach TG-Stimulation

Von den wie unter Punkt 3.2.11 beschriebenen Jurkat T-Zellen wurden etwa 10-20 μl auf ein vorbereitetes Deckglas (\O 25 mm, Stärke 1, Kindler) gegeben und 5-10 min im Dunklen absitzen gelassen. Das Deckglas wurde in eine eigens dafür angefertigte Kammer (s. Abb. 3.2) eingesetzt und mit einem kleineren Deckglas (\O 12 mm, Stärke 1, Kindler) abgedeckt. Die Kammer wurde mittels Silikon-Fett (VWR) dicht verschlossen. Zwei Öffnungen in der Kammer ermöglichten einen Lösungswechsel und ein Spülen während des Versuchs. Zunächst wurden die Zellen im Mikroskop mit einem 20 x Objektiv (Olympus, Uplan/Apo, Numerische Apparatur (NA) = 1,0) betrachtet und die Kammer solange mit Lösung 3 (155 mM NaCl, 4,5 mM KCL, 10 mM Glukose, 5 mM Hepes, 2,5 mM MgCl_2 , 0,5 mM CaCl_2 , pH 7,4) durchgespült, bis möglichst keine Zellen mehr übereinander lagen. Anschließend wurde die Kalziummessung gestartet und mit dem Programm TILL Vision (TILL Photonics) aufgenommen. Die Messung erfolgte abwechselnd bei 340 nm und 380 nm. Alle 5 s wurde ein Ratio-Bild aufgenommen. Zunächst wurde der Wert des Ruhekalziums gemessen. Nach 100 s wurde die Kammer mit Lösung 1 (155 mM NaCl, 4,5 mM KCL, 10 mM Glukose, 5 mM Hepes, 3 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, pH 7,4), zu der 1 μM Thapsigargin (TG) zugegeben wurden, durchgespült. TG führt zu einer Entleerung der intrazellularen Kalziumspeicher, d. h. in den Zellen steigt das Kalziumssignal leicht an. Nach weiteren 500 s wurde die Kammer mit Lösung 4 (155 mM NaCl, 4,5 mM KCL, 10 mM Glukose, 5 mM Hepes, 2 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , pH 7,4), der ebenfalls 1 μM TG zugegeben wurde, durchgespült. Nach weiteren 500 s erfolgte der letzte Lösungswechsel mit Lösung 2. Die Messung wurde über einen Zeitraum von 1400 s durchgeführt. Um den Hintergrund berechnen und bei der Auswertung miteinbeziehen zu können, wurde ein Ausschnitt gesucht, indem keine Zellen lagen und dieser wie folgt aufgenommen: Je ein Bild mit $\lambda = 340 \text{ nm}$ beziehungsweise $\lambda = 380 \text{ nm}$ mit dem für Fura geeigneten Filter und einer Belichtungszeit von 20 ms und bei den gleichen Wellenlängen je ein Bild im Durchlicht und mit einer Belichtungszeit von ca. 10 ms.

3.2.11.2 Messungen der Kalziumkonzentrationen nach B7-Stimulation

Zunächst wurden die mit CHO-CD33⁺ Zellen bewachsenen Deckglas (s. Punkt 3.2.1) in ein neues „well“ einer 6-well-Platte überführt und mit 200 µl der entsprechenden Fusionsproteine überschichtet. Die Fusionsproteine wurden zuvor in dem für die CHO-Zellen geeigneten Medium entsprechend verdünnt. Während der 30 minütigen Inkubation wurden die T-Zellen wie oben beschrieben mit Fura-2 beladen. Das Deckglas mit den Fusionsprotein-beladenen CHO-Zellen wurde in die Messkammer eingelegt und diese wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben zusammengebaut (siehe auch Abb. 3.2). Anschließend wurden die Zellen im Mikroskop mit einem 20 x Objektiv (Olympus, Uplan/Apo, Numerische Apparatur (NA) = 1,0) betrachtet und die Kammer gründlich mit der entsprechenden Messlösung durchgespült, um die nicht gebundenen Fusionsproteine auszuwaschen. Die Zellen wurden dann im Durchlicht bei einer Belichtungszeit von 10 ms aufgenommen. Der gleiche Bereich wurde anschließend mit einem für Farbstoff Fura-2 geeigneten Filter, einer Belichtungszeit von 50 ms und einer Anregungswellenlänge von 360 nm (Polychrom IV Monochromator von Till Photonics) aufgenommen. Um die Hintergrundfluoreszenz der CHO-Zellen zu bestimmen, wurde der gleiche Bereich noch mit 340 bzw. 380 nm und einer Belichtungszeit von 20 ms aufgenommen. Anschließend wurde die Kalziummessung gestartet. Die Messung erfolgte indem alle 5 s abwechselnd bei 340 nm und 380 nm ein Bild aufgenommen wurde. Zusätzlich wurde alle 5 s ein Infrarotbild aufgenommen. Kurz vor Messbeginn wurden die T-Zellen gewaschen und in 40 µl Messlösung resuspendiert. Direkt nach Start der Messung wurden die T-Zellen dann in die Kammer gesaugt, wo sie sich innerhalb kurzer Zeit auf den CHO-Zellrasen absetzen. In manchen Fällen wurden während der Messungen verschiedene Lösungswechsel, zum Teil mit Thapsigargin und/oder mit 2-APB, durchgeführt.

Sollte das CD28 Molekül auf den T-Zelle vor der Messung blockiert werden (s. Punkt 4.3.2), wurden die Zellen nach Fura-Ladung 10 min in 40 µl der entsprechenden Verdünnung des blockierenden anti-CD28 Antikörpers in Messlösung inkubiert und dann in die Kammer eingesaugt.

Bei der Auswertung musste beachtet werden, dass die T-Zellen sich zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf den CHO-Zellrasen absetzten und sie sich durch die nicht vorhandene Fixierung zum Teil stark bewegten. Aus diesem Grund wurde jede Zelle einzeln ausgewertet und nur verwendet, wenn es möglich war, sie während der gesamten Messung zu verfolgen. Dies war besonders wichtig wenn während der Messung ein Lösungswechsel

stattfind. Um das Kalziumsignal der Zellen zu mitteln wurden die Kurven der einzelnen Zellen im Programm IGOR Pro dahingehend bearbeitet, dass der Beginn ihrer Reaktion zeitgleich auf null gesetzt wurde.

3.2.11.3 Messung des basalen Kalziums bei 37°C

Alle Schritte wurden soweit möglich bei 37°C durchgeführt. Zunächst wurde ein Deckglas (Ø 25 mm, Stärke 1, Kindler) wie unter Punkt 3.2.5 mit Polyornithin vorbehandelt. Das Fura-Medium wurde auf 37°C erwärmt und die Zellen bei 37°C 30 min im Brutschrank damit inkubiert. Nach einmaligem Waschen wurden die Zellen in 40 µl AIM-V[®] Medium resuspendiert. Etwa 15 µl Zellen wurden auf ein vorbereitetes Deckglas (Ø 25 mm) gegeben und 5-10 min im Dunklen bei 37°C absitzen gelassen. Anschließend wurde die Messkammer wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben zusammengebaut (siehe auch Abb. 3.2). Zunächst wurden die Zellen im Mikroskop mit einem 20 x Objektiv (Olympus, Uplan/Apo, Numerische Apparatur (NA) = 1,0) betrachtet und die Kammer solange mit AIM-V[®] Medium durchgespült, bis möglichst keine Zellen mehr übereinander lagen. Anschließend wurde die Kalziummessung gestartet. Die Messung erfolgte abwechselnd bei 340 nm und 380 nm, wobei alle 5 s je ein Bild aufgenommen wurde. Insgesamt dauerte die Messung 10 min. Um den Hintergrund berechnen und bei der Auswertung miteinbeziehen zu können, wurde ein Ausschnitt gesucht, indem keine Zellen lagen, und dieser wie folgt aufgenommen: Je ein Bild mit $\lambda = 340$ nm beziehungsweise $\lambda = 380$ nm mit dem für Fura geeigneten Filter und einer Belichtungszeit von 20 ms und bei den gleichen Wellenlängen je ein Bild im Durchlicht und mit einer Belichtungszeit von ca. 10 ms.

4 Ergebnisse

4.1 Arbeitshypothese und Aufbau der Methode

4.1.1 Die Arbeitshypothese

Die Arbeitsgruppe von Christoph Renner und insbesondere sein Mitarbeiter Markus Thiel haben gezeigt, dass die T-Zellproliferation von der CD3 Konzentration abhängig ist. (s. Abb. 4.1, Daten der Arbeitsgruppe Renner, USZ, Zürich). Darüber hinaus haben sie gezeigt, dass bei submaximaler CD3 Stimulation (2 µg/ml anti-CD3/anti-CD33-Fusionsprotein) eine Kostimulation über B7-1 bzw. B7-2 die Proliferation in unterschiedlicher Weise modulieren kann. Dabei wirkte B7-1 leicht proliferationsfördernd, B7-2 dagegen erhöhte die Proliferation erheblich (s. Abb. 4.2). Die Frage, die sich stellte, war über welchen Mechanismus dieser Effekt gesteuert wird. Unsere Arbeitsgruppe hat bereits gezeigt, dass die Proliferation und das intrazelluläre Kalziumsignal miteinander korrelieren (Schwarz et al., 2007a; Zitt et al., 2004). Aus diesem Grund sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Hypothese untersucht werden, dass der Effekt der B7 Kostimulation über eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums gesteuert wird.

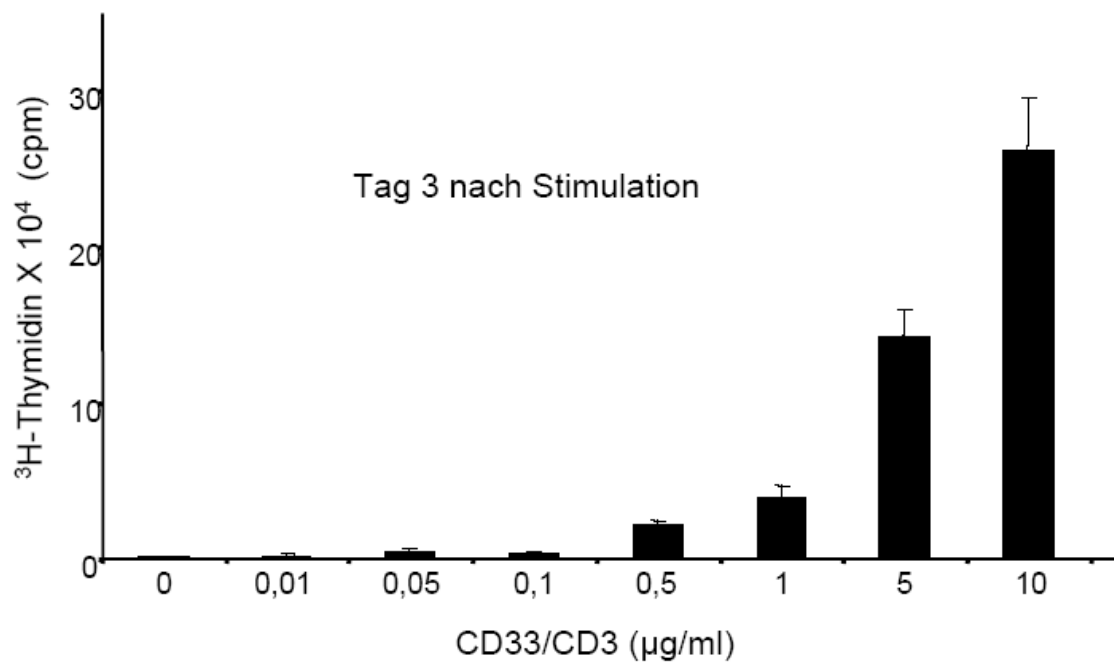


Abb. 4.1: Konzentrationsabhängige Proliferation nach Stimulation mit anti-CD3/anti-CD33-Fusionsprotein. 96-well-Platten wurden mit 2 µg/ml CD33 Antigen beschichtet. Nach anschließender Inkubation mit der angegebenen Konzentration des anti-CD3/anti-CD33-Fusionsproteins wurden 100.000 PBMCs in jedes Well gegeben. Die Proliferation wurde an Tag 3 anhand des in die DNA eingebauten ³H-Thymidins gemessen. Die Daten wurden mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Renner, USZ zur Verfügung gestellt.

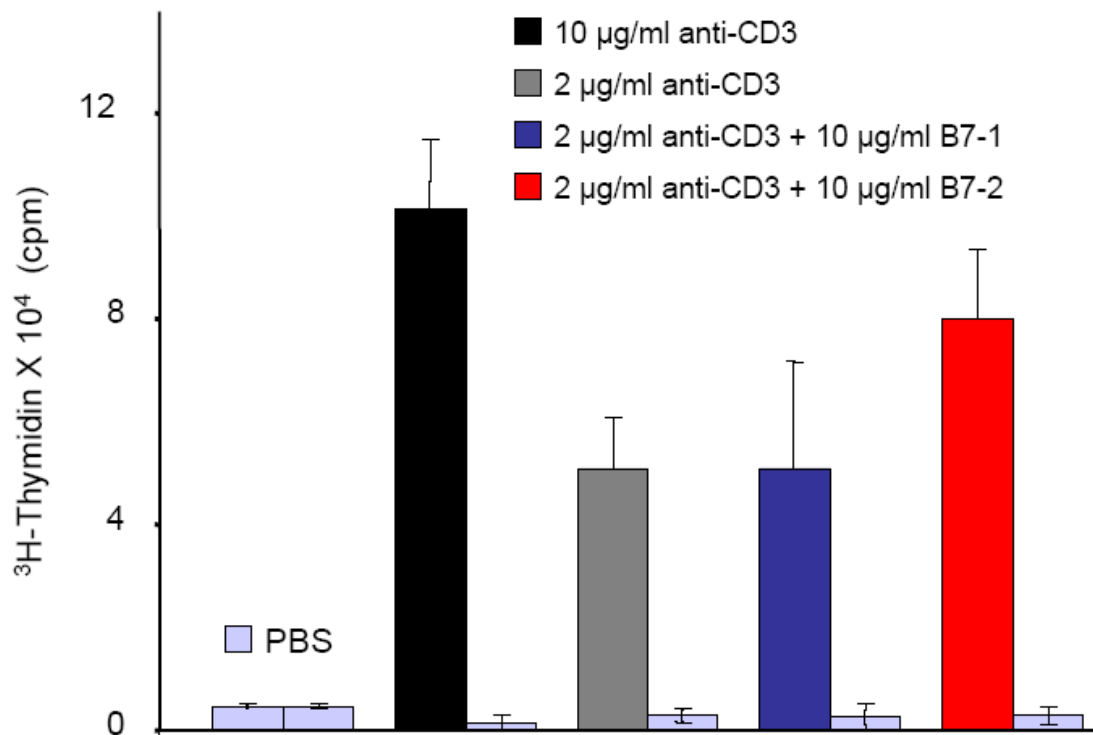


Abb. 4.2: Einfluss der B7 Kostimulation auf die Proliferation.

96-well-Platten wurden mit 2 µg/ml CD33 Antigen beschichtet. Nach anschließender Inkubation mit der angegebenen Konzentration der entsprechenden Fusionsproteine wurden 100.000 PBMCs in jedes Well gegeben. Die Proliferation wurde an Tag 3 anhand des in die DNA eingebauten $^3\text{H-Thymidins}$ gemessen. Die Daten wurden mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Renner, USZ zur Verfügung gestellt.

4.1.2 CD33-Expression der CHO-Zellen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Kalziumsignale in humanen T-Zellen nach Kostimulation zu untersuchen. Die T-Zellen wurden dabei mittels der unter Punkt 3.1.4 beschriebenen bispezifischen Fusionsproteinen stimuliert. Ein Teil dieser Fusionsproteine besteht immer aus einem anti-CD33 Molekül. Als Träger der Fusionsproteine wurden aus diesem Grund CD33 exprimierenden CHO-Zellen verwendet. Durch das Binden der Fusionsproteine an die CHO-Zellen, sollte eine fokale und damit möglichst physiologische Stimulation der T-Zellen erreicht werden. Um vergleichbare Messbedingungen zu garantieren, ist es entscheidend, dass alle CHO Zellen CD33 exprimieren. Hierzu wurde eine CD33-Antikörperfärbung mittels R-PE markierten anti-CD33 Antikörpern von unterschiedlichen Passagen der CHO-Zellen durchgeführt (s. Punkt 3.2.2). Abbildung 4.3 zeigt die zwölfte Passage der CHO-Zellen im Durchlicht (linkes Bild) und die CD33-Färbung des entsprechenden Ausschnitts (rechtes Bild). Alle CHO-Zellen exprimieren CD33 auf ihrer Oberfläche. Die Färbungen zu anderen Zeitpunkten sahen vergleichbar aus und sind deshalb nicht abgebildet.

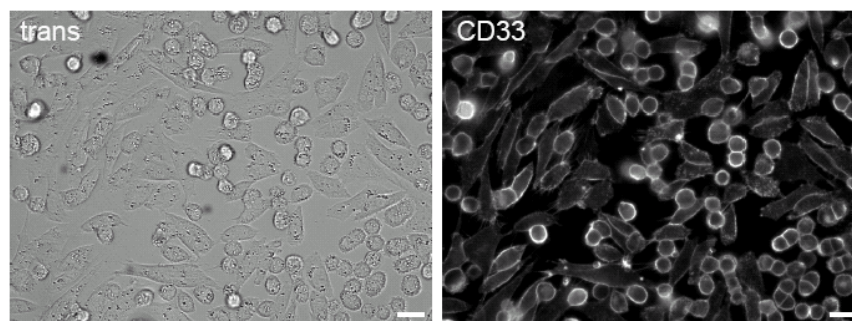


Abb. 4.3: CD33-Färbung der CHO-Zellen (Passage 12)

Die beiden Bilder zeigen CD33⁺ CHO-Zellen im Durchlicht (links) und die anti-CD33 (rechts) Färbung. Beide Bilder wurden mit einem 20 x Objektiv aufgenommen. Bar = 20 μ m

4.1.3 Anteil an CD4⁺ bzw. CD3⁺ T-Zellen nach Bead-Negativ-Isolation

In der vorliegenden Arbeit wurden CD3⁺- bzw. CD4⁺-T-Zellen verwendet, die aus zuvor isolierten PBMCs mittels Negativ-Bead-Isolation isoliert wurden. Die Negativ-Bead-Isolation stellt sicher, dass die T-Zellen während der Isolation nicht stimuliert werden. Die Reinheit dieser Isolationen stellt eine wichtige Voraussetzung für die anschließenden Experimente dar. Aus diesem Grund wurden alle verwendeten Populationen auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Um die Anteile der verschiedenen Lymphozytenpopulationen in den PBMCs zu bestimmen, wurden die Zellen mit unterschiedlich markierten Antikörpern gegen CD4 (R-PE) bzw. CD8 (Cy5) und CD19 (FITC) gefärbt. CD8 und CD4 sind Oberflächenmarker für T-Zellen. CD8 ist ein Marker für zytotoxische T-Zellen, CD4 für T-Helferzellen. CD19 ist ein Oberflächenmarker für B-Zellen. Abb. 4.4 A zeigt einen repräsentativen Ausschnitt der PBMCs, die sowohl im Durchlicht aufgenommen wurden, als auch mit den entsprechenden Färbungen. Im Mittelwert ergab sich eine Zusammensetzung der PBMCs aus 75 % CD3⁺ T-Zellen (Addition der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen) und 14 % CD19⁺ B-Zellen. Die CD3⁺ T-Zellen setzen sich wiederum aus zwei Drittel CD4⁺ T-Zellen und einem Drittel CD8⁺ T-Zellen zusammen. Nach dem gleichen Prinzip wurde die Reinheiten der CD3⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen nach Negativ-Bead-Isolation untersucht. Abb. 4.4 B bzw. C zeigen repräsentative Ausschnitte isolierter CD3⁺ bzw. CD4⁺ positiver T-Zellen, sowohl im Durchlicht als auch mit den entsprechenden Färbungen. Die isolierten Populationen wiesen eine Reinheit von mindestens 95 % auf.

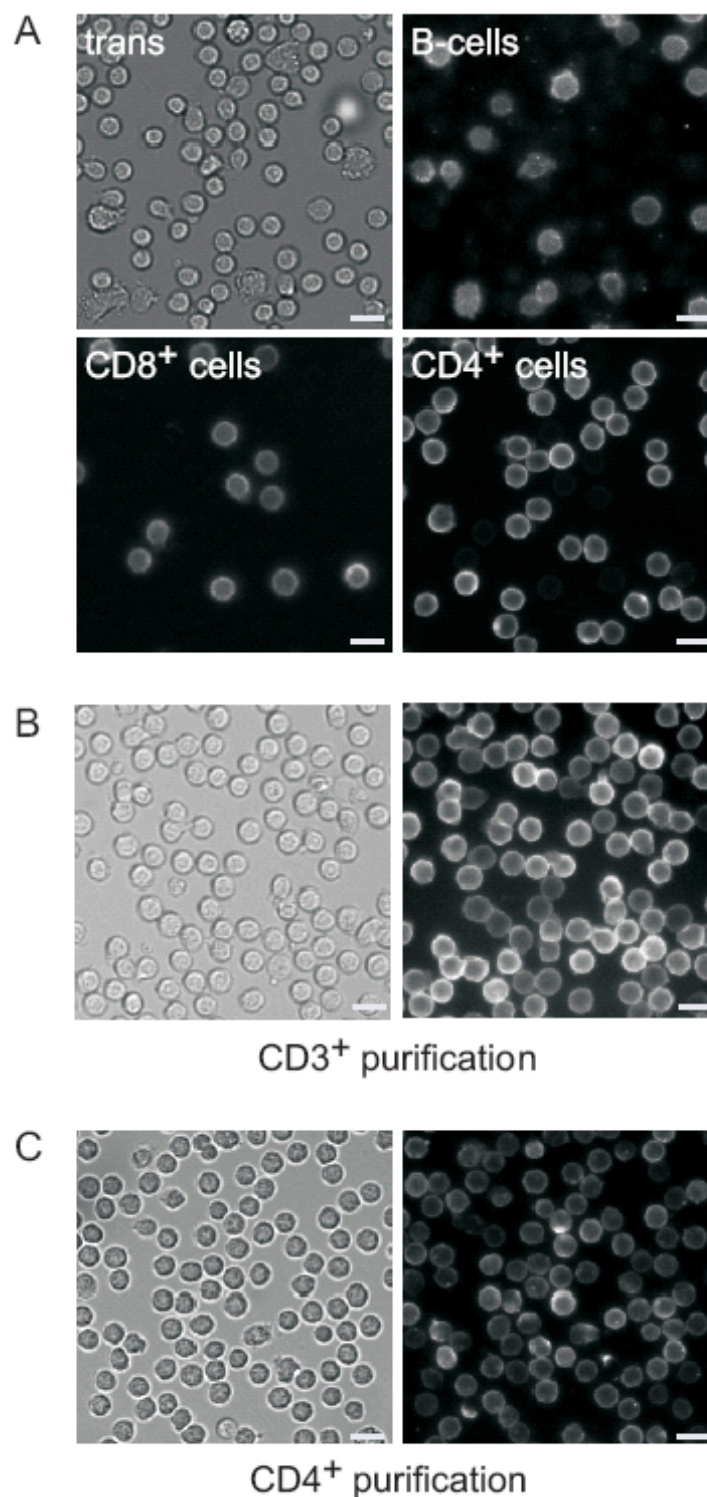


Abb. 4.4: Zusammensetzung der PBMCs und Anteil CD3⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen nach Negativ-Bead-Isolation. A zeigt einen repräsentativen Ausschnitt der PBMCs sowohl im Durchlicht, als auch mit den entsprechenden Färbungen (anti-CD3→R-PE; CD8→Cy5; CD19→FITC). B bzw. C zeigen repräsentative Ausschnitte isolierter CD3⁺ bzw. CD4⁺ positiver T-Zellen sowohl im Durchlicht, als auch mit der entsprechenden CD3- bzw. CD4-Färbung. Bar = 10 µm.

4.1.4 Messung des Kalziumsignals isolierter T-Zellen nach Stimulation mittels Fusionsprotein-beladener CHO-Zellen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode etabliert, T-Zellen während Kalziummessungen zu stimulieren. Abb. 4.5 stellt eine solche Messung dar. In A sind repräsentative Bilder eines Ausschnitts zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Messung abgebildet. Die obere Abb. zeigt eine Infrarot-Aufnahme, die untere die parallele Kalziummessung mit Fura-2. In den Ratio 340/380 Bilder bedeutet ein blauer Farbton eine niedrige intrazelluläre Kalziumkonzentration und ein wärmer werdender Farbton eine höhere Kalziumkonzentration. Zum Zeitpunkt null sind nur mit 2 µg/ml anti-CD3/anti-CD33 Fusionsproteinen beladenen CHO-Zellen in der Messkammer. Diese sind nicht mit Fura-2 geladen und somit auch nicht in dem Ratio 340/380 Bild zu sehen. Sobald die Messung gestartet wird, werden Fura-2 geladenen T-Zellen in die Kammer eingesaugt. Diese setzen sich zunächst ab und haben bis zum Zeitpunkt des Kontaktes mit einer CHO-Zelle ein niedriges Ruhekalzium. Zum Zeitpunkt 1000 s nach Messbeginn bekommt Zelle 1 Kontakt zu einer CHO-Zelle und reagiert innerhalb von 50 s mit einem starken Anstieg der Kalziumkonzentration. Zelle 2 hat während der ganzen Messung keinen Kontakt zu einer CHO-Zelle und zeigt erwartungsgemäß damit auch keine Änderung der Kalziumkonzentration. Abb. 4.5 B zeigt die Kurvenverläufe der Kalziumkonzentration der beiden in A markierten Zellen während der ganzen Messung. Die Ratio 340/380 ist dabei direkt proportional zur Kalziumkonzentration in der Zelle und wird mit folgender Formel abgeschätzt: $[Ca^{2+}]_i = K \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$ (Grynkiewicz et al., 1985).

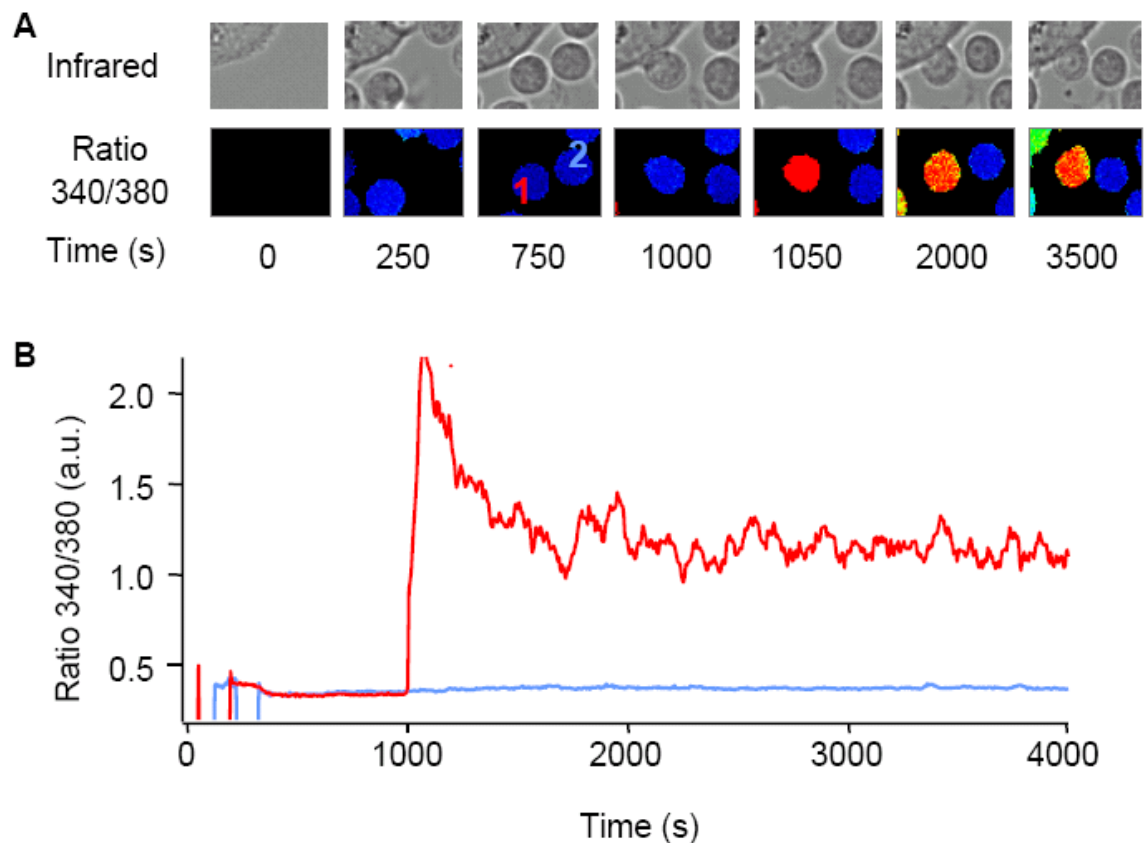


Abb. 4.5: Messung des Kalziumsignals isolierter T-Zellen nach Stimulation mit Fusionsprotein-beladenen CHO-Zellen. In A sind repräsentative Bilder eines Ausschnitts zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Messung abgebildet. Die oberen Bildern wurden mit Infrarotlicht aufgenommen und die unteren mit einem für Fura-2 geeigneten Filter. In den Ratio 340/380 Bilder bedeutet ein blauer Farbton eine niedrige intrazelluläre Kalziumkonzentration und ein wärmer werdender Farbton eine höhere Kalziumkonzentration. B zeigt die Kurvenverläufe der Kalziumkonzentration der beiden in A markierten Zellen während der ganzen Messung. Die Ratio 340/380 ist dabei direkt proportional zur Kalziumkonzentration in der Zelle und wird mit folgender Formel abgeschätzt: $[Ca^{2+}]_i = K \cdot (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$ (Grynkiewicz et al., 1985).

In Abb. 4.5 ist eine Kalziummessung von T-Zellen gezeigt, die nur mit anti-CD3/anti-CD33-Fusionsproteinen stimuliert wurden. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zur Kostimulation wurden die Fusionsproteine auf CHO-Zellen gebunden. Dadurch wird erreicht, dass die T-Zellen fest an die CHO-Zellen gebunden werden und eine fokale Stimulation erreicht wird. Da nicht auszuschließen ist, dass sich während der Messung die Fusionsproteine von der Zelle lösen, war es von Interesse, ob das anti-CD3/anti-CD33-Fusionsprotein auch in Lösung einen Effekt auf das Kalziumsignal der T-Zelle hat. Von allen ausgewerteten Zellen zeigten nur etwa 50 % eine Reaktion auf die Stimulation mit 10 µg/ml anti-CD3/anti-CD33-Fusionsprotein in Lösung (Daten nicht gezeigt). Die dargestellten Einzelzellen zeigen sehr unterschiedliche Verläufe des Kalziumsignals, bei denen sich kein langanhaltend erhöhtes Kalziumplateau einstellt (s. Abb. 4.6, unten). Die Kalziumsignale der Einzelzellen unterscheiden sich stark von denen, die bei einer fokalen Stimulation gefunden wurden. In den Auswertungen der durchgeführten Messungen wäre es folglich möglich, zwischen einer Stimulation der T-Zellen durch Fusionsproteine in Lösung und einer Stimulation mittels gebundener Fusionsproteinen zu unterscheiden. Da aber gleichzeitig in allen durchgeführten Messungen T-Zellen ohne Kontakt zu einer CHO-Zelle kein erhöhtes Kalziumsignal aufwiesen, ist davon auszugehen, dass Fusionsproteine in Lösung für diese Versuchsdurchführung keine Rolle spielen.

Ein weiterer wichtiger Punkt, den die Arbeitsgruppe Renner bereits für die Proliferation von T-Zellen gezeigt hat ist, dass die Verwendung von B7-1/anti-CD33- bzw. B7-2/anti-CD33-Fusionsproteinen alleine keinen Effekt hat (Daten nicht gezeigt). In der vorliegenden Arbeit wurden allerdings keine Proliferations- sondern Kalzium-Imaging-Experimente durchgeführt. Folglich war es notwendig zu untersuchen, ob eine alleinige CD28 bzw. CTLA-4 Stimulation einen Effekt auf das Kalziumsignal hat. Für dieses Experiment wurden vorstimulierte T-Zellen (4 Tage mit 2 µg/ml PHA und 25 U/ml IL-2) verwendet, da diese sowohl CD28, als auch CTLA-4 exprimieren (s. Abb. 4.8). Zum Vergleich ist die Reaktion auf Stimulation mit 2 µg/ml anti-CD3/anti-CD33-Fusionsprotein gezeigt (Abb. 4.7, schwarze Kurve). Abb. 4.7 zeigt, dass weder eine alleinige Stimulation mit 10 µg/ml B7-1/anti-CD33-Fusionsprotein (dunkelblaue Kurve) noch eine Stimulation mit B7-2/anti-CD33-Fusionsprotein (rote Kurve) das Kalziumsignal in vorstimulierten CD4⁺ T-Zellen verändert. Es zeigt den gleichen Verlauf wie das Kalziumsignal in nicht stimulierten Zellen (ohne Kontakt zu einer CHO-Zelle).

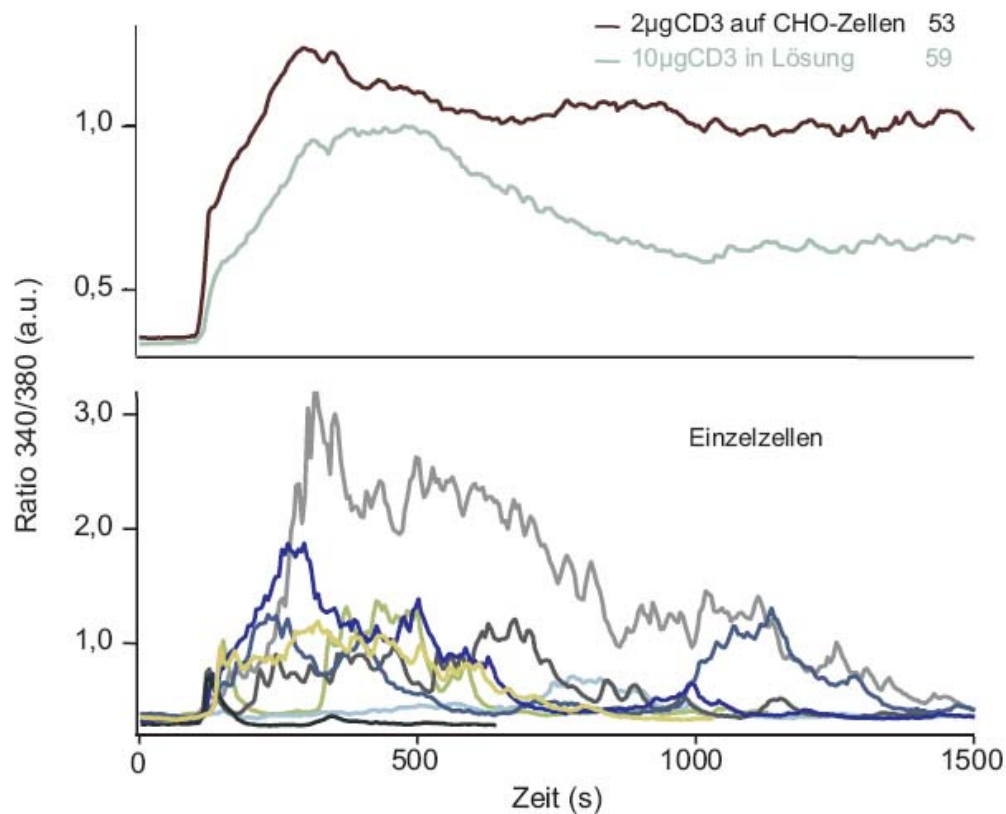


Abb. 4.6: Wirkung von 10 µg/ml anti-CD3/anti-CD33-Fusionsproteinen in Lösung.

Es sind die Messungen der Ratio 340/480 über die Zeit angegeben. Bei den angegebenen Werten handelt es sich entweder um die Mittelwerte aller gemessenen Zellen, die eine Reaktion zeigten (n = Zellzahl, obere Abbildung) oder um die Werte einzelner Beispielizehen (unten) aus der Messung mit 10 µg anti-CD3/anti-CD33-Fusionsprotein in Lösung (blaue Kurve, obere Abbildung). Die $CD4^+$ T-Zellen wurden einen Tag nach Isolation 4 Tage mit 2 µg/ml PHA und 25 U/ml IL-2 vorstimuliert, bevor die Messungen durchgeführt wurden.

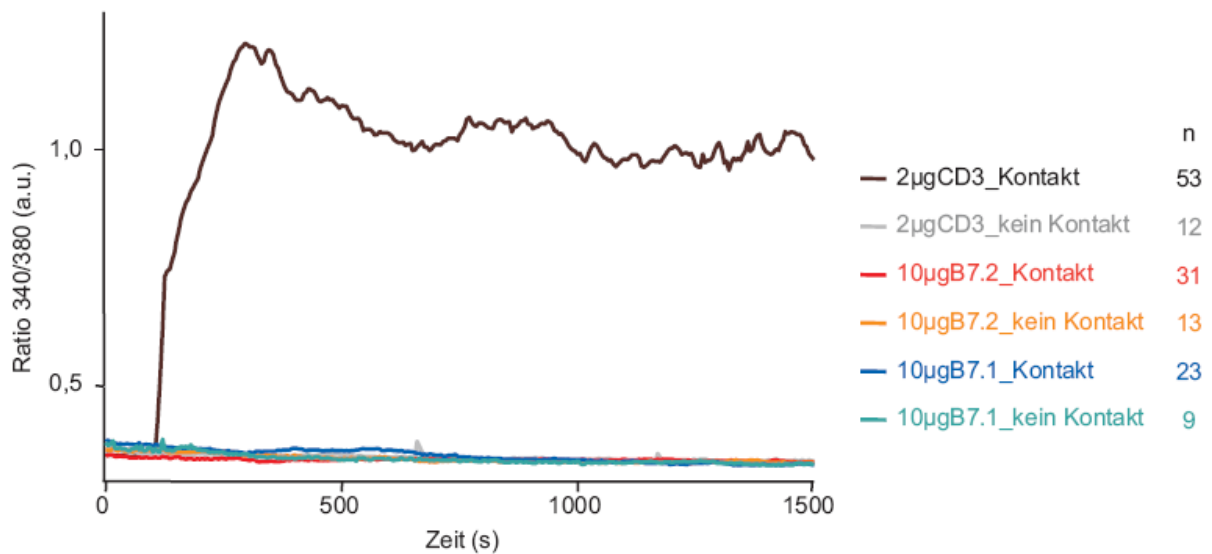


Abb. 4.7: B7-Stimulation alleine zeigt keinen Einfluss auf das Kalziumsignal in T-Zellen.

Es sind die Messungen der Ratio 340/480 über die Zeit angegeben. Bei den angegebenen Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte aller gemessenen Zellen ($n = \text{Zellzahl}$). Die CD4^+ T-Zellen wurden einen Tag nach Isolation 4 Tage mit $2 \mu\text{g/ml}$ PHA und 25 U/ml IL-2 vorstimuliert, bevor die Messungen auf unterschiedlich beladenen CHO-Zellen durchgeführt (s. Punkt 3.2.11.1) wurden.

4.2 Die B7-Kostimulation

4.2.1 Einfluss der B7 Kostimulation auf das Kalziumsignal

Eine reine TCR Stimulation führt dazu, dass die T-Zelle in einen anergen Zustand übergeht. Eine B7-Kostimulation ist daher essentiell für eine effiziente Aktivierung der T-Zellen. Die Mechanismen der Kostimulation sind noch nicht genau aufgeklärt. Die Arbeitshypothese der vorliegenden Arbeit war, dass die B7-Kostimulation das Kalziumsignal in den T-Zellen beeinflusst. Um dies zu untersuchen, wurden Imaging-Experimente mit dem Kalziumfarbstoff Fura-2 unter verschiedenen Stimulationsbedingungen durchgeführt. In Abbildung 4.8 A-D sind diese Messungen dargestellt. Die Zellen wurden entweder mit 2 µg/ml anti-CD3/anti-CD33-Fusionsprotein alleine oder zusätzlich mit 10 µg/ml B7-1/anti-CD33- bzw. B7-2/anti-CD33-Fusionsprotein stimuliert. Parentale und E6.1 Jurkat T-Zellen (Abb. 4.8 A und B) und nicht vorstimulierte T-Zellen (Abb. 4.8 C) zeigten keinen Unterschied im Kalziumsignal, unabhängig davon, wie sie stimuliert wurden. Primäre T-Zellen, die drei bis fünf Tage mit anti-CD3/anti-CD28 beschichteten Beads (fokale Stimulation) bzw. PHA und Interleukin-2 vorstimuliert wurden, reagierten gegenüber einer reinen Stimulation mit anti-CD3/anti-CD33-Fusionsprotein mit einem leicht erhöhten Kalziumsignal, wenn sie mit B7-1/anti-CD33 kostimuliert wurden, und mit einer starken Erhöhung nach Kostimulation mit B7-2/anti-CD33 (Abb. 4.8 D). Für jede Messung und Stimulationsbedingung wurden mindestens 25 Einzelzellen ausgewertet. Die Messungen in den T-Zelllinien wurden je einmal durchgeführt. Die Messungen der unstimulierten primären T-Zellen wurden dreimal in zwei verschiedenen Spendern durchgeführt. Die statistische Analyse dieser Experimente ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen einer reinen CD3 Stimulation und einer zusätzlichen B7 Kostimulation. Die Messung der vorstimulierten T-Zellen wurde in sieben verschiedenen Spendern mehrfach durchgeführt. Die abgebildete Messung ergab einen signifikanten Unterschied im Kalziumsignal zwischen einer Stimulation mit 2 µg anti-CD3/anti-CD33-Fusionsprotein alleine und einer zusätzlichen Kostimulation mit B7-2/anti-CD33-Fusionsprotein (p-Wert = 0,00001). Der Unterschied zwischen der reinen CD3 Stimulation und einer B7-1/anti-CD33 Kostimulation war dagegen nicht signifikant (p-Wert = 0,24). Da B7-1 und B7-2 auf T-Zellen an CD28 und CTLA-4 binden, wurden im folgenden die Expressionsmuster von CD3 und den B7-Bindungspartner, CD28 und CTLA-4, mittels Immunfluoreszenz untersucht. Abb. 4.8 E-H zeigen repräsentative Bilder dieser Färbungen

aller vier T-Zellpopulationen, die im Durchlicht (obere Bilder) und mit einem für R-PE geeigneten Filter (untere Bilder) aufgenommen wurden. Alle vier Zellpopulationen exprimieren CD3 auf ihrer Oberfläche (E-H, links). CD28 dagegen wird nur in sehr geringen Maße von unstimulierten primären Zellen (G, Mitte) und stark von vorstimulierten primären Zellen (H, Mitte) und E6.1 Jurkat T-Zellen (E, Mitte) exprimiert. Parentale Jurkat Zellen exprimieren kein oder kaum CD28. CTLA-4 wird nur von stimulierten primären T-Zellen exprimiert (E-H, rechts).

Diese Daten legen den Schluss nahe, dass der Unterschied im Kalziumsignal in vorstimulierten primären T-Zellen durch die Expression von CTLA-4 auf diesen Zellen zustande kommt. Verwunderlich ist dabei, dass CTLA-4 in der Literatur eher eine inhibitorische Wirkung zugeschrieben wird. Bleibt also zu klären, ob das erhöhte Kalziumsignal nach B7-2 Kostimulation tatsächlich über CTLA-4 vermittelt wird.

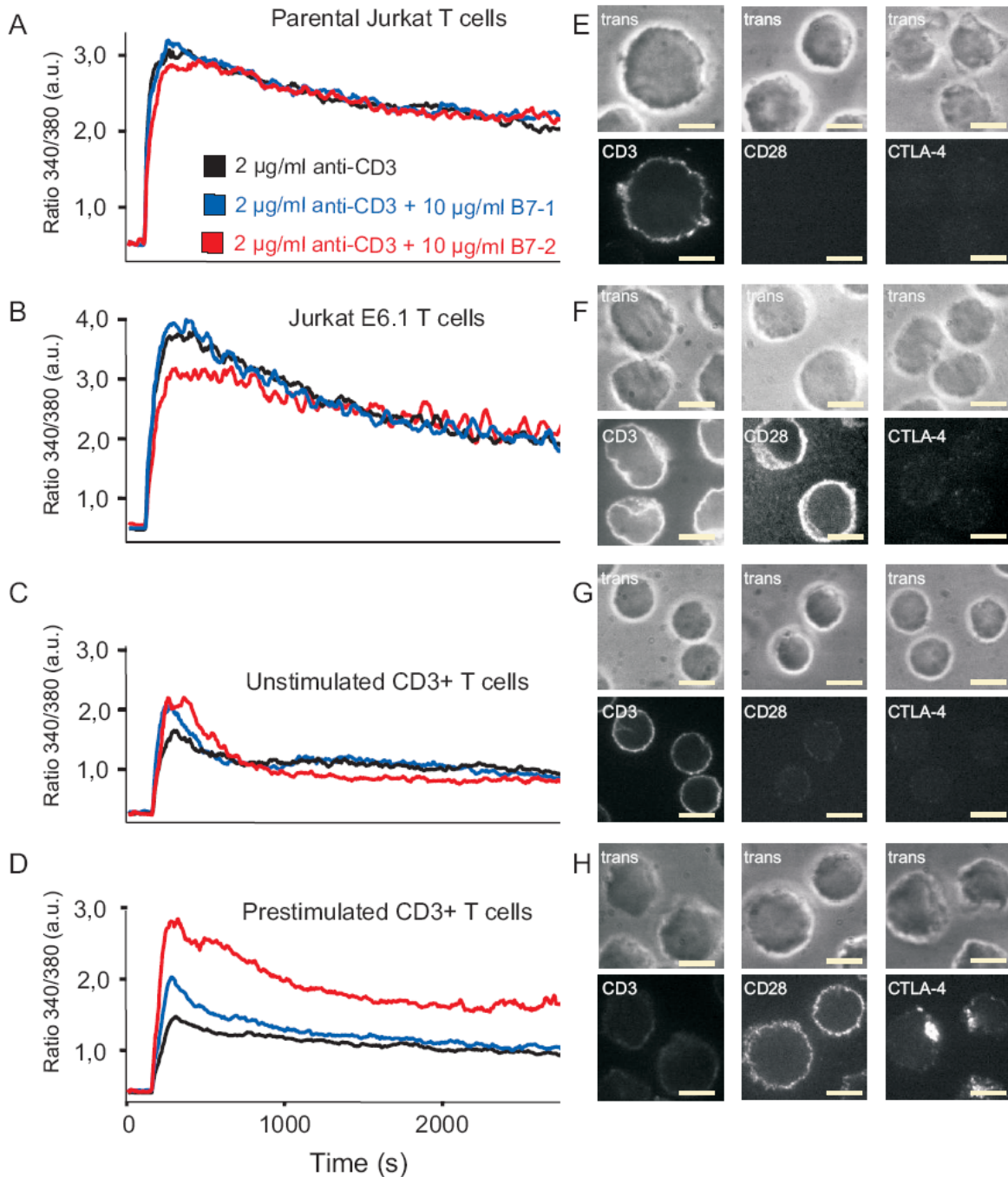


Abb. 4.8: Effekt der B7-Kostimulation auf verschiedene T-Zell Populationen.

Abb. A-D zeigen die Kinetiken der intrazellulären Kalziumkonzentrationen (als Ratio 340/480) von parentalen und E6.1 Jurkat T-Zellen (A und B), nicht vorstimulierten CD3⁺ T-Zellen (C), und CD3⁺ T-Zellen, die vier Tage mit PHA und IL-2 vorstimuliert wurden (D). Die Zellen wurden in den Messungen mit CHO-Zellen stimuliert, die mit 2 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3/anti-CD33-Fusionsprotein alleine oder zusätzlich mit 10 $\mu\text{g/ml}$ B7-1/anti-CD33- bzw. B7-2/anti-CD33-Fusionsprotein beladen wurden. In den Abb. E-H sind repräsentative Ausschnitte der Immunfluoreszenzen mittels anti-CD3, anti-CD28 und anti-CTLA-4 Antikörpern dargestellt (untere Bilder). Die unteren Bilder zeigen die dazugehörigen Durchlichtaufnahmen. Bar = 5 μm

4.2.2 Die Blockade von CD28 und ihr Einfluss auf das Kalziumsignal

Beide Bindungspartner der B7-Moleküle, CD28 und CTLA-4, werden von den primären T-Zellen nach Stimulation hochreguliert (Abb. 4.8 G und H). Aus der Immunfluoreszenz (s. Abb.4.8 E-H) lässt sich jedoch ableiten, dass sich die vorstimulierten T-Zellen hauptsächlich durch ihre Expression von CTLA-4 von den anderen T-Zellpopulationen unterscheiden. Um herauszufinden ob der Unterschied im Kalziumplateau tatsächlich über CTLA-4 vermittelt wird, wurden Kalziummessungen mit T-Zellen durchgeführt, bei denen CD28 zuvor mit einem blockierenden anti-CD28 Antikörper (Schlossman et al., 1995) in seiner Funktion inhibiert wurde. Der Unterschied im Kalziumplateau müsste gleich bleiben oder sich sogar vergrößern, wenn CTLA-4 dafür verantwortlich ist. Abb. 4.9 zeigt Kalziummessungen von Zellen, deren CD28 nicht blockiert wurde (durchgezogenen Kurven) und im Vergleich Zellen, deren CD28 blockiert wurde (gestrichelten Kurven). Das normalerweise nach B7-2 Kostimulation signifikant höhere Kalziumplateau entsprach nach der Blockade von CD28 dem Kalziumplateau der Zellen, die alleine mit anti-CD3/anti-CD33-Fusionsprotein stimuliert wurden (rote und schwarze Kurven). Wurden die Zellen dagegen mit B7-1 kostimuliert, zeigte die Blockade von CD28 keine Wirkung (blauen Kurven). Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die nur mit dem anti-CD3/anti-CD33-Fusionsprotein stimuliert wurden (schwarze Kurven). Wie erwartet, zeigte eine CD28 Blockade hier keinen Effekt. Diese Messung wurde nur einmal durchgeführt. Die ausgewerteten Zellzahlen n pro Messbedingung sind in Abb. 4.9 angegeben.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass nicht CTLA-4 sondern CD28 das höhere Kalziumsignal nach B7-2 Kostimulation vermittelt. Da Jurkat E6.1 Zellen, die viel CD28 aber kein CTLA-4 exprimieren (s. Abb. 4.8 F), diesen Unterschied jedoch nicht aufweisen, scheint eine zusätzliche Expression von CTLA-4 notwendig für diesen Effekt zu sein.

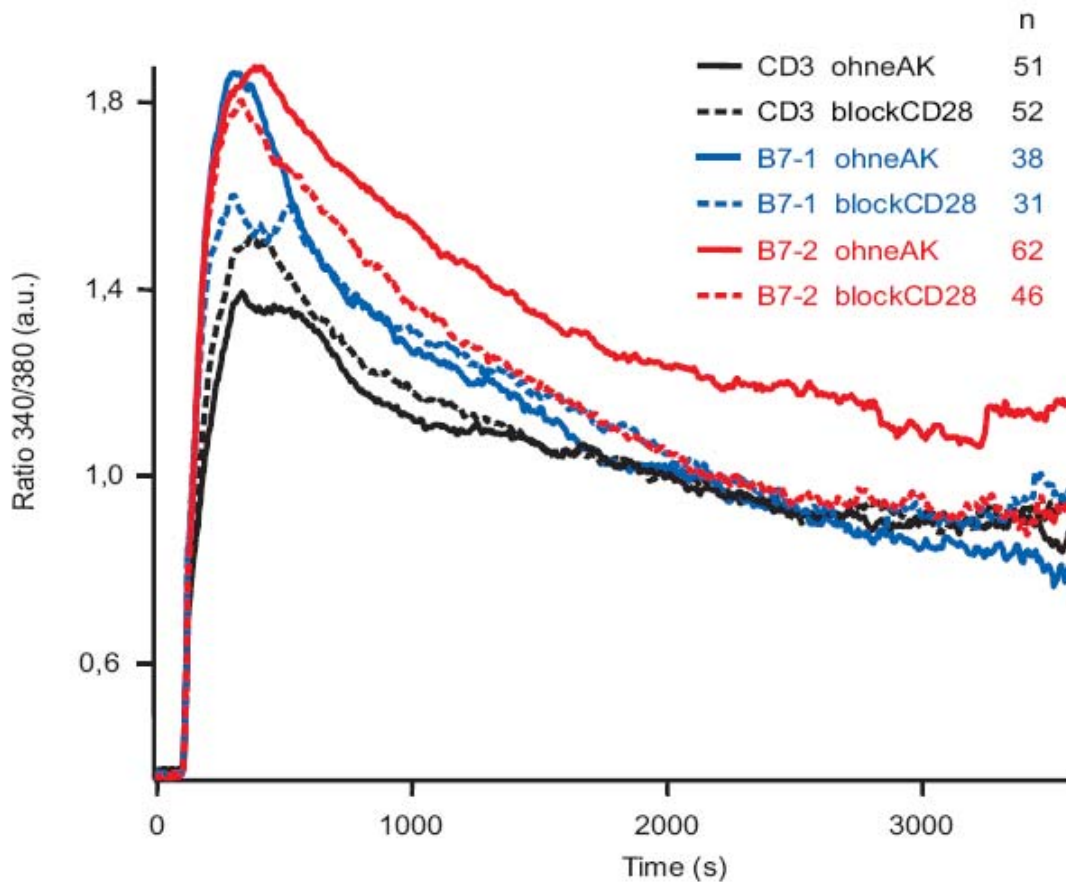


Abb. 4.9: Effekt einer CD28 Blockade auf das Kalziumsignal.

Dargestellt sind die Kinetiken der intrazellulären Kalziumkonzentrationen (als Ratio 340/480). Bei den angegebenen Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte aller gemessenen Zellen ($n = \text{Zellzahl}$). Der Mittelwert des Kalziumplateaus (als Ratio 340/480) zwischen 2005 und 2500 s betrug für die Messung mit einer B7-2 Kostimulation ohne CD28 Blockade 1214 und mit CD28 Blockade 997. Damit entsprach das Plateau nach CD28 Blockade dem der anderen Messungen ohne Kostimulation bzw. mit B7-1 Kostimulation mit und ohne Blockade von CD28 (Plateau zwischen 957 und 997, keine statistische Signifikanz untereinander). Die gemessenen CD4^+ T-Zellen wurden vier Tage mit anti-CD3/anti-CD28 beschichteten Beads vorstimuliert. Die Zellen wurden in den Messungen mit CHO-Zellen stimuliert, die mit $2 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3/anti-CD33-Fusionsprotein alleine oder mit $2 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3/anti-CD33 und $10 \mu\text{g/ml}$ B7-1/anti-CD33- oder B7-2/anti-CD33-Fusionsprotein beladen wurden. Die Blockade von CD28 erfolgte, indem die Zellen vor Messbeginn 10 min mit einer 1:20 Verdünnung dieses Antikörpers inkubiert.

4.2.3 Einfluss der B7 Kostimulation auf die Kalziumfreisetzung und den Kalziumeinstrom

In den bisher durchgeführten Experimenten konnte nicht gezeigt werden, ob das nach B7-2 Kostimulation erhöhte Kalziumsignal durch eine verstärkte Freisetzung von Kalzium aus dem ER oder durch einen erhöhten Kalziumeinstrom über die PM zustande kommt. Um beide Prozesse nach Kostimulation getrennt zu untersuchen, wurde zunächst analysiert, ob die Kostimulation einen Einfluss auf die Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher hat. Um dies herauszufinden, wurden die T-Zellen in einer kalziumfreien Lösung auf unterschiedlich beladenen CHO-Zellen absitzen gelassen und anschließend wurde die Speicherentleerung verglichen (siehe Abb. 4.10 A). Für die Auswertung war es notwendig, dass die Speicherentleerung bei alle Zellen zeitgleich begann. Hierzu wurden die Kurven der Einzelzellen alle zehn Messpunkte (= 50 s) vor Beginn der Speicherentleerung abgeschnitten. Bei der in Abb. 4.10 A dargestellten Kurve handelt es sich um die Mittelwerte aller Zellen. In den Messungen konnte meist ein kleiner Unterschied festgestellt werden, der jedoch nicht signifikant war (insgesamt wurden die Zellen von vier verschiedenen Spendern gemessen, wobei die Zellen eines Spenders zweimal gemessen wurden). Abb. 4.10 B zeigt alle Zellen, die vor Zugabe von TG schon eine Speicherentleerung nach Kontakt mit einer CHO-Zelle hatten (n (B7-1) = 25, n (B7-2) = 37). Diese Zellen reagierten nicht mehr auf die Zugabe von TG, was bedeutet, dass ihre Speicher schon vollständig entleert waren. In Abb. 4.10 C sind die Zellen abgebildet, die erst nach TG Applikation eine Speicherentleerung zeigten (n (B7-1) = 5, n (B7-2) = 8). Nur die Zellen, deren Speicher noch nicht vollständig durch Kontakt mit einer CHO-Zelle entleert waren, reagierten mit einer weiteren Entleerung nach TG Applikation (Daten nicht gezeigt). Dabei handelte es sich immer nur um sehr wenige Zellen (in der abgebildeten Messung nur um eine Zelle pro Messung), deren Kalziumplateau dann meist relativ niedrig ausfiel.

Wurde nach Erreichen des Kalziumplateaus, nach B7-1 bzw. B7-2 Kostimulation, 10 μ M 2-APB (wirkt in diesen Konzentrationen aktivierend auf CRAC/Orai1 Kanäle) appliziert, bewirkte dies einen Anstieg des Kalziumsignal auf sehr ähnliche Werte (s. Abb. 4.10 A und B). Der zuvor signifikante Unterschied (t-Test aller Messwerte aller in 4.10 B und C zusammengefassten Zellen im Bereich zwischen 2950s - 2995s ergibt einen p-Wert von 0,0008) ist nach Applikation von 2-APB nicht mehr signifikant (t-Test aller Messwerte

aller in 4.10 B und C zusammengefassten Zellen im Bereich zwischen 3225s - 3270s bzw. 3450s - 3495s ergibt einen p-Wert von 0,35 bzw. 0,36).

Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass der Einfluss der B7-2 Kostimulation auf das Kalziumsignals nicht auf der Beeinflussung der Speicherentleerung, sondern auf einer Erhöhung Kalziumeinstrom über die Zellmembran basiert.

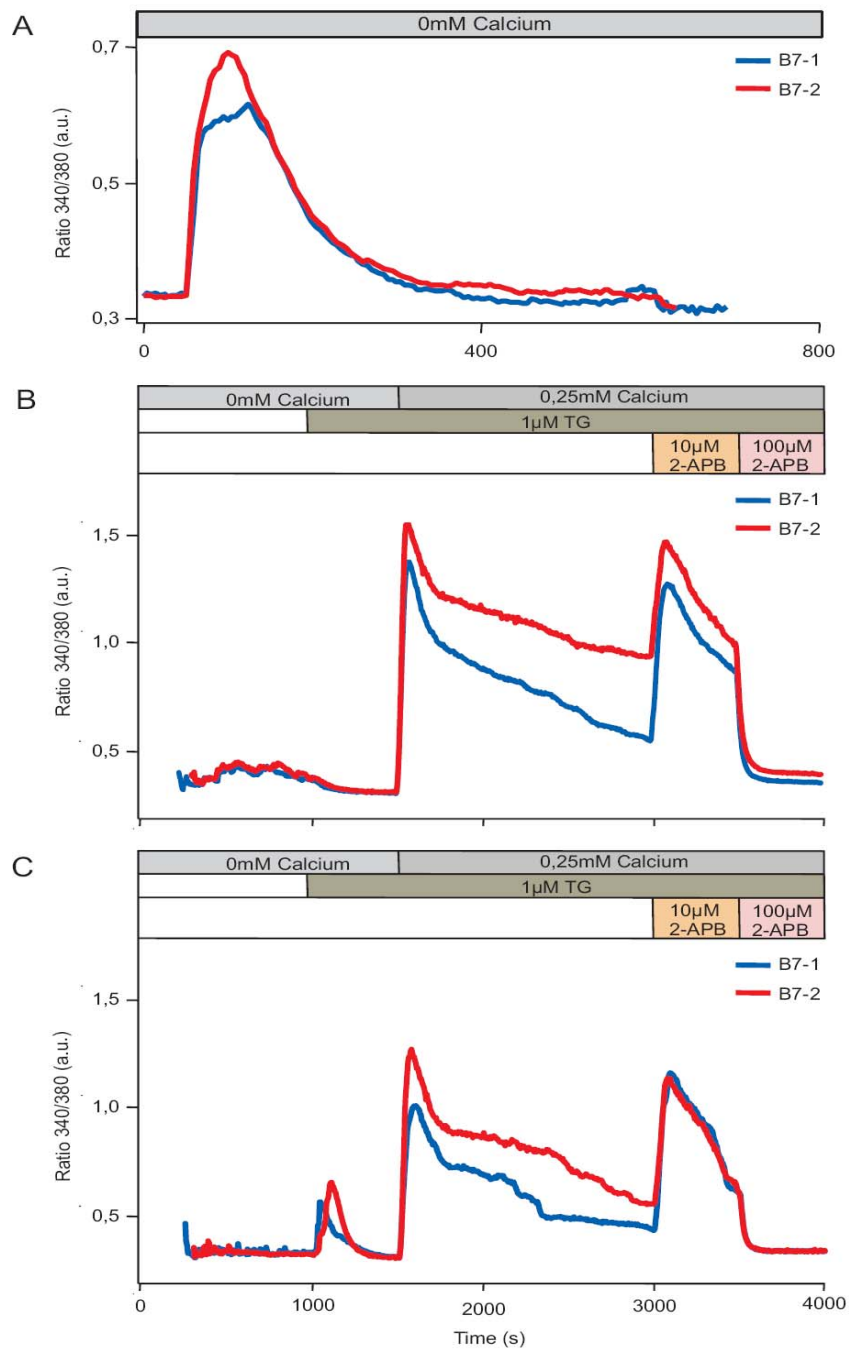


Abb. 4.10: Einfluss der B7 Kostimulation auf die Speicherentleerung und den CRAC-Strom.

Dargestellt sind die Kinetiken der intrazellulären Kalziumkonzentrationen (als Ratio 340/480). Es handelt sich um die Mittelwerte aller gemessenen Zellen. Die $CD4^+$ T-Zellen wurden fünf Tage mit anti-CD3/anti-CD28 beschichteten Beads vorstimuliert. Die Zellen wurden in den Messungen mit CHO-Zellen stimuliert, die mit $2 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3/anti-CD33 und $10 \mu\text{g/ml}$ B7-1/anti-CD33- oder B7-2/anti-CD33-Fusionsprotein beladen wurden. In Abb. A ist die Speicherentleerung nach B7-1 bzw. B7-2 Kostimulation dargestellt. Abb. B bzw. C zeigen das Kalziumplateau vor und nach Applikation von 2-APB in Zellen, deren Speicher mittels Fusionsprotein beladenen CHO-Zellen (B) bzw. TG (C) entleert wurden.

4.3 Beteiligte Proteine

Die Kostimulation scheint ein bedeutender Faktor für die Entstehung und Modulation des Kalziumsignals in humanen T-Zellen zu sein. Dennoch ist sie nur der erste Schritt im Ablauf einer Reihe wichtiger Signalwege, an denen sehr viele Moleküle beteiligt sind. Die nach Stimulation folgenden Abläufe sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Es ist aber eindeutig gezeigt, dass STIM1 (Liou et al., 2005; Spassova et al., 2006; Zhang et al., 2005) und ORAI1 (Feske et al., 2006; Mercer et al., 2006; Peinelt et al., 2006; Prakriya et al., 2006; Soboloff et al., 2006b; Vig et al., 2006a; Zhang et al., 2006) am CRAC-Strom beteiligt sind. Ferner hat Anna Wenning (AG Hoth) im Rahmen ihrer Doktorarbeit gezeigt, dass TRPC3 die Proliferation von T-Zellen beeinflusst. Aus diesem Grund wurden auch diese Proteine und ihr Einfluss auf das Kalziumsignal in primären T-Zellen untersucht.

4.3.1 STIM1

Das Transmembranprotein STIM1 dient als Kalziumsensor im ER und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion in T-Zellen. Zunächst wurde die Expression von STIM1 in allen verwendeten T-Zellpopulationen mittels Immunfluoreszenz untersucht. Abb. 4.11 zeigt repräsentative Ausschnitte unstimulierter und vorsimulierter primärer CD4⁺ T-Zellen, sowie parentaler und E6.1 Jurkat T-Zellen dieser Färbungen (untere Bilder) und die entsprechende Durchlichtaufnahmen (obere Bilder). Alle vier verwendeten T-Zell Populationen exprimieren STIM1 in unterschiedlichen Mengen. Die Immunfluoreszenz der E6.1 Jurkat T-Zellen wurde nicht zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt wie die der anderen T-Zell Populationen. Eine Einschätzung der quantitativen Expression von STIM1 im Vergleich zu den anderen Populationen ist also nur bedingt möglich.

Wurden vorstimulierte STIM1-YFP transfizierte CD4⁺ T-Zellen mittels anti-CD3/anti-CD28 beschichteten Beads stimuliert, konnte eine Translokation des STIM1-YFP hin zur Immunologischen Synapse (Kontaktbereich zwischen T-Zelle und Bead) beobachtet werden. In Abb. 4.12 sind einzelne Aufnahmen einer solchen Messung im zeitlichen Verlauf dargestellt. Der Ausschnitt wurde sowohl mit Infrarotlicht (obere Bilder) als auch mit einem für YFP geeigneten Filter (untere Bilder) aufgenommen.

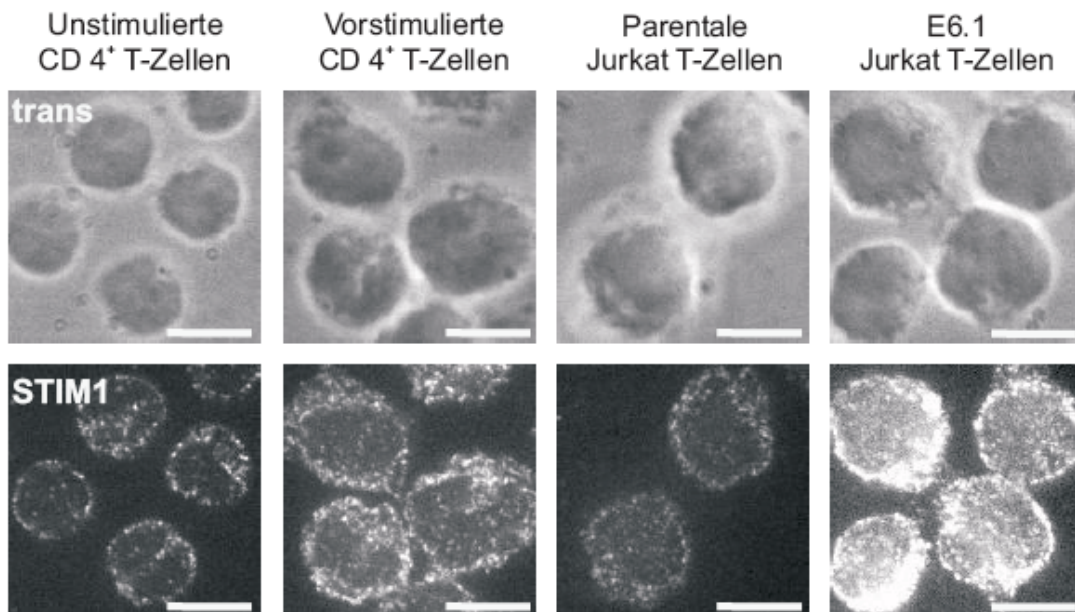


Abb. 4.11: STIM1 Expression in verschiedenen T-Zellpopulationen.

Die Abbildung zeigt repräsentative Ausschnitte der verschiedenen T-Zell Populationen (von links nach rechts: unstimulierte und stimulierte CD4⁺ T-Zellen und parentale, sowie E6.1 Jurkat T-Zellen) nach Färbung der Zellen mit einem anti-STIM1 Antikörper (untere Bilder). Die oberen Bilder zeigen die entsprechenden Aufnahmen im Durchlicht. Bar = 5 µm

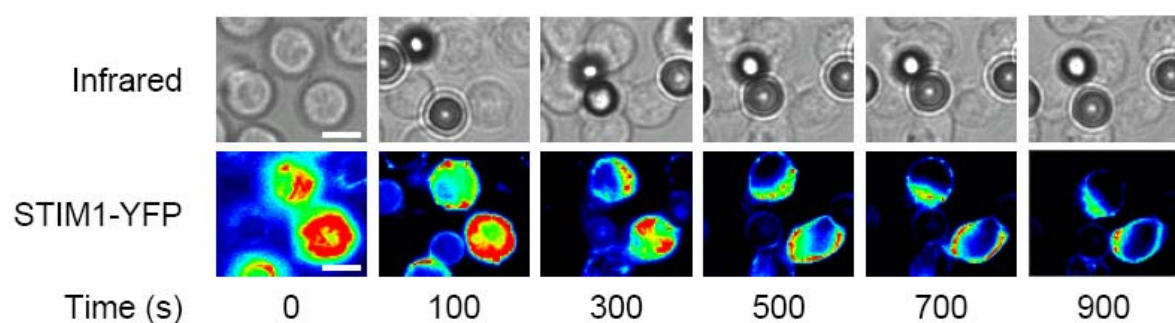


Abb. 4.12: STIM-YFP Translokation zur Immunologischen Synapse.

Dargestellt sind unterschiedliche Zeitpunkte eines repräsentativen Ausschnitts, die sowohl mit Infrarotlicht als auch mit einem für Alexa-568 geeigneten Filter aufgenommen wurde. Die CD4⁺ T-Zellen wurden einen Tag vor der Messung mit STIM-YFP transfiziert und während der Messung mit anti-CD3/anti-CD28 beschichteten Beads stimuliert. Bar = 10 µm

Wurden parentale Jurkat T-Zellen mit einer siRNA gegen STIM1 transfiziert, zeigten diese nach Stimulation mit Thapsigargin ein signifikant niedrigeres Kalziumplateau als Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Abb. 4.13 zeigt eine solche Messung, die an Tag 3 nach Transfektion durchgeführt wurde. Für die Statistik wurden von jeder Zelle die 20 Messpunkte zwischen 950 s und 1095 s gewählt, da diese dem Plateauwert am nächsten kommen. Der Unterschied im Kalziumplateau stellt sich als signifikant dar (p-Wert: 0,0007). Mitarbeiter der AG Hoth konnten die Wirksamkeit der STIM1-siRNA in diesen Zellen auch mittels quantitativer PCR nachgewiesen werden (Abb. 4.14).

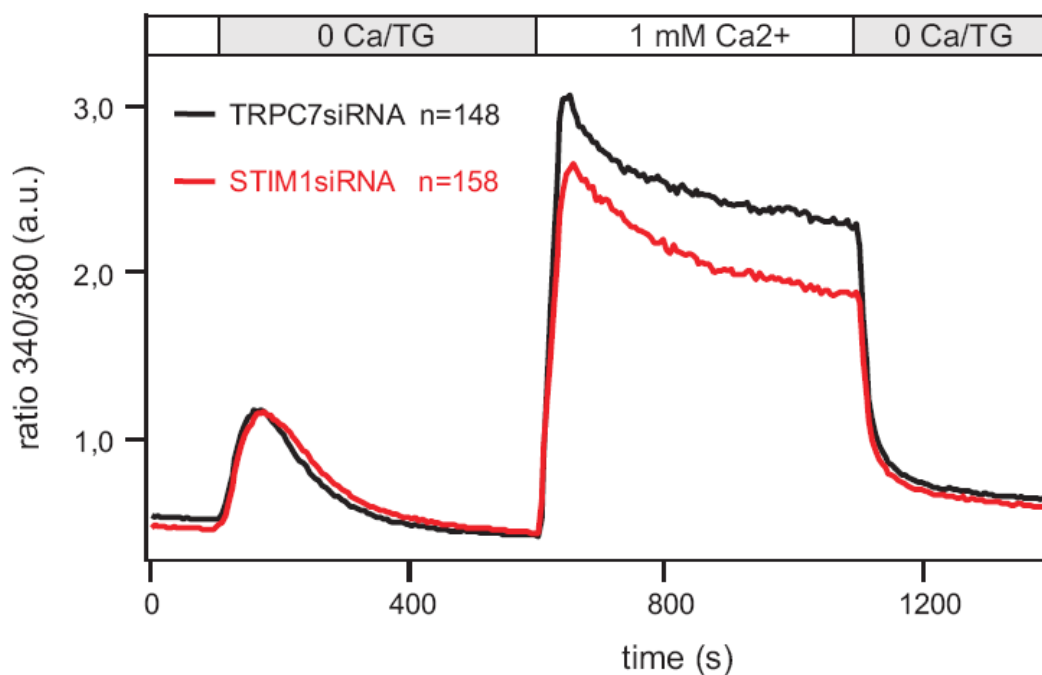


Abb. 4.13: Kalziumsignal in STIM1 siRNA transfizierten parentalen Jurkat T-Zellen. Dargestellt sind die Kinetiken der intrazellulären Kalziumkonzentrationen (als Ratio 340/480). Bei den angegebenen Kurven handelt es sich jeweils um die Mittelwerte aller gemessenen Zellen (n = Zellzahl). Die Messungen wurden drei Tage nach Transfektion durchgeführt. Vor dem ersten Lösungswechsel befanden sich die Zellen in einer 0,5 mM Kalziumlösung.

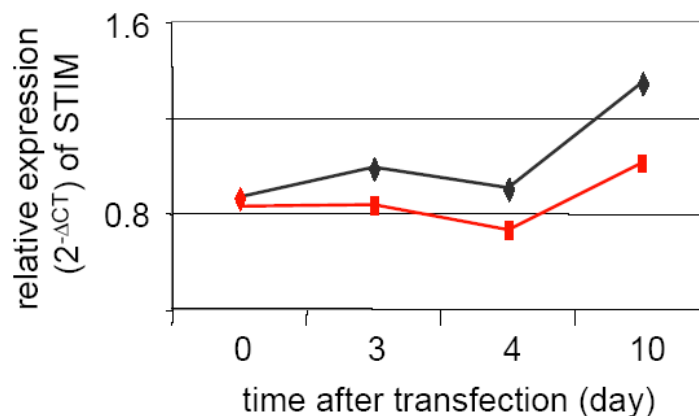


Abb. 4.14: Wirksamkeit der STIM1 siRNA in parentalen Jurkat T-Zellen.

Dargestellt ist die Expression von STIM1 in parentalen Jurkat T-Zellen nach Transfektion mit einer siRNA gegen STIM1 (rote Kurve) bzw. einer Kontroll-siRNA (schwarze Kurve). Die Expression wurde mittels quantitativer qRT-PCR ermittelt und ist als relative Expression ($2^{-\Delta CT}$) zu dem Kontrollgen TBP ausgedrückt. (Daten der AG Hoth)

In primären T-Zellen zeigten die mit einer gegen STIM1 gerichteten siRNA transfizierten Zellen ein niedrigeres Kalziumsignal als die Zellen, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden (s. Abb. 4.15). Allerdings erwies sich dieser Unterschied als nicht signifikant, unabhängig davon, ob die Zellen mit TG (Daten nicht gezeigt) oder mit den Fusionsprotein beladenen CHO-Zellen stimuliert wurden. Die in Abb. 4.15 dargestellten Messungen wurden an $CD4^+$ T-Zellen durchgeführt, die nach Transfektion vier Tage mit anti-CD3/anti-CD28 beschichteten Beads vorstimuliert wurden. In den Messungen wurden die Zellen mit CHO-Zellen stimuliert, die mit 2 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3/anti-CD33 und 10 $\mu\text{g/ml}$ B7-1/anti-CD33- oder B7-2/anti-CD33-Fusionsprotein beladen wurden.

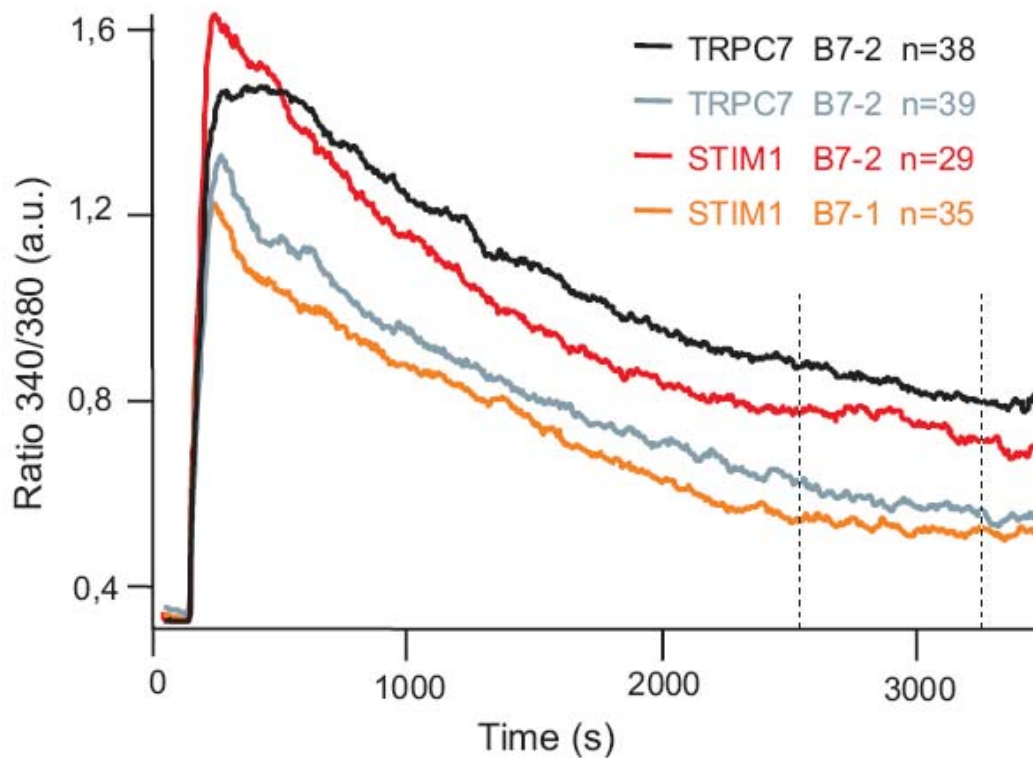


Abb. 4.15: Kalziumsignal in STIM1 siRNA transfizierten primären T-Zellen.

Dargestellt sind die Kinetiken der intrazellulären Kalziumkonzentrationen (als Ratio 340/480). Bei den angegebenen Kurven handelt es sich jeweils um die Mittelwerte aller gemessenen Zellen ($n = \text{Zellzahl}$). Die CD4^+ T-Zellen wurden nach Transfektion vier Tage mit anti-CD3/anti-CD28 beschichteten Beads vorstimuliert. In den Messungen wurden die Zellen mit CHO-Zellen stimuliert, die mit $2 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3/anti-CD33 und $10 \mu\text{g/ml}$ B7-1/anti-CD33- oder B7-2/anti-CD33-Fusionsprotein beladen wurden.

4.3.2 Orai1

Das Transmembranprotein Orai1 ist an der Bildung des CRAC/Orai1-Kanals beteiligt. Aus diesem Grund wurde auch seine Expression mittels Immunfluoreszenz untersucht. Abb. 4.16 zeigt repräsentative Ausschnitte der Orai1 Färbungen unstimulierter und vorstimulierter primärer CD4⁺ T-Zellen, sowie parentaler und E6.1 Jurkat T-Zellen (untere Bilder). Die oberen Bilder zeigen die selben Ausschnitte, die im Durchlicht aufgenommen wurden. Orai1 wird von allen vier untersuchten T-Zell Populationen exprimiert. Die Immunfluoreszenz der E6.1 Jurkat T-Zellen wurde nicht zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt wie die der anderen T-Zell Populationen. Eine Einschätzung der quantitativen Expression von Orai1 im Vergleich zu den anderen Populationen ist also nur bedingt möglich.

Auch für das Protein Orai1 wurde der Einfluss einer Erniedrigung der Orai1-Expression mittels siRNA untersucht. Das Ergebnis entsprach dem der STIM1-siRNA Transfektionen in primären Zellen: Das Kalziumsignal zwar tendenziell niedriger als in Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, jedoch ergab die statistische Analyse keine Signifikanz (Daten nicht gezeigt).

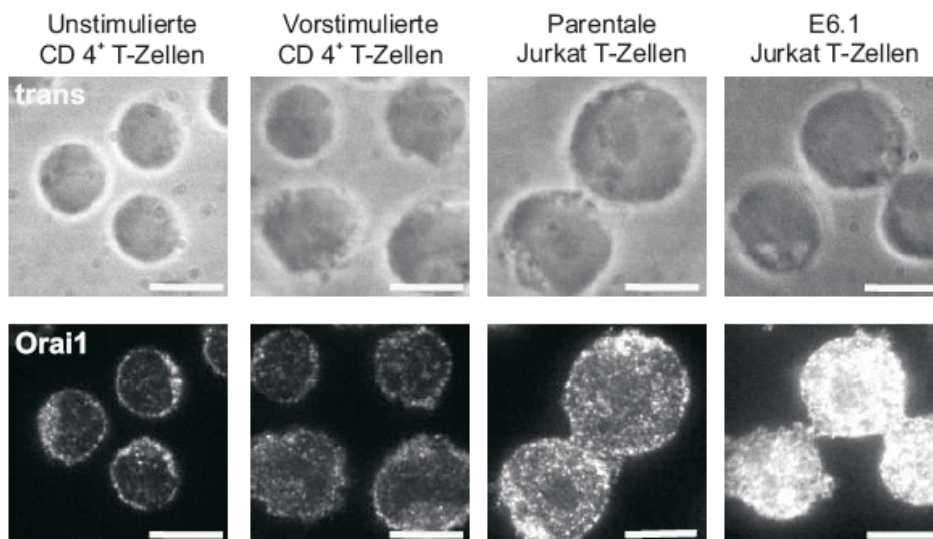


Abb. 4.16: Orai1 Expression in verschiedenen T-Zellpopulationen.

Die Abbildung zeigt repräsentative Ausschnitte der verschiedenen T-Zell Populationen (von links nach rechts: unstimulierte und stimulierte CD4⁺ T-Zellen und die parentale und E6.1 Jurkat T-Zelllinien) nach Färbung der Zellen mit einem anti-Orai1 Antikörper (untere Bilder). Die gleichen Ausschnitte wurden ebenso im Durchlicht aufgenommen (obere Bilder). Bar = 5 μ m

4.3.3 TRPC3

Es konnte von Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe mittels quantitativer RT-PCR gezeigt werden, dass die Expression der TRPC3-mRNA nach Stimulation der T-Zellen deutlich zunimmt (Daten nicht gezeigt). Dies lässt eine wichtige Funktion dieses Proteins in stimulierten T-Zellen vermuten. Für die in dieser Arbeit verwendete siRNA gegen TRPC3 konnte Mitarbeiter der AG Hoth zeigen, dass sie die entsprechende mRNA in TRPC3 überexprimierenden HEK293-Zellen herunterreguliert (Abb. 4.17)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, ob TRPC3 einen Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration nach Stimulation hat. Hierzu wurden T-Zellen mit der siRNA gegen TRPC3 bzw. einer Kontroll-siRNA gegen TRPC7 transfiziert und mehrere Tage nach Stimulation wurden Kalziummessungen durchgeführt. Diese Messungen zeigten keinen Unterschied zwischen TRPC3 bzw. TRPC7 siRNA transfizierten Zellen (Daten nicht gezeigt). Daten von Anna Wenning aus der AG Hoth zeigen, dass eine Runterregulation von TRPC3 in primären Zellen die Proliferationsrate hemmt. Die Proliferation ist ein kalziumabhängiger Prozess. Eine weitere Möglichkeit über die TRPC3 wirken könnte ist, indem es das basale Kalzium in vorstimulierten T-Zellen beeinflusst. Um diese Hypothese zu testen, wurden primäre T-Zellen mit einer siRNA gegen TRPC3 bzw. mehreren Kontroll-siRNAs transfiziert und anschließend mit anti-CD3/anti-CD28 beschichteten Beads vorstimuliert. Drei bis vier Tage nach Stimulation wurde bei 37°C über 10 min die intrazelluläre Kalziumkonzentration gemessen. In der in Abb. 4.18 dargestellten Auswertung wurden jeweils 2 Messungen unterschiedlicher Spendern zusammengefasst (Tag 3 ns-siRNA nur eine Messung). Die Zahl der ausgewerteten Zellen n ist in den entsprechenden Säulen angegeben. Darunter ist zu sehen wie viele Zellen je Messung ausgewertet wurden. Jede Messung dauerte 10 min, in denen alle 5 s ein ratio 340/380 Bild aufgenommen wurde. D. h. jede Messung besteht aus 120 Einzelmesswerten, die alle gleichwertig in die statistische Auswertung miteinbezogen wurden. An Tag drei nach Stimulation zeigten die Zellen, die mit der siRNA gegen TRPC3 transfiziert wurden ein gegenüber allen Kontrollen signifikant niedrigere basale Kalziumkonzentration. An Tag vier nach Stimulation war die Kalziumkonzentration noch signifikant niedriger als in den mit con_b1 und ns siRNAs transfizierten Kontrollen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass TRPC3 über einen noch unbekanntem Mechanismus das basale Kalzium verändert und damit eine Rolle in der Kalziumhomöostase der T-Zelle spielt.

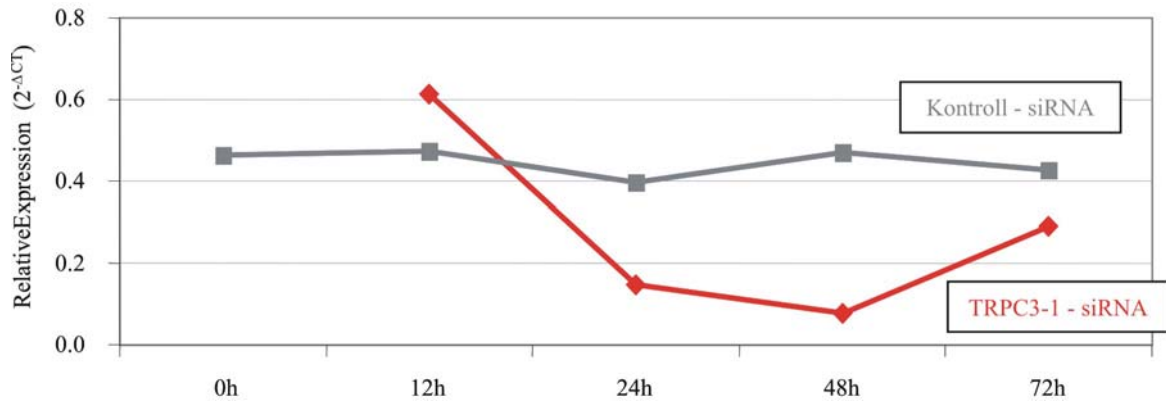


Abb. 4.17: Wirksamkeit der TRPC3 siRNA in TRPC3-überexprimierenden HEK293-Zellen.

Dargestellt ist die Expression von TRPC3 in TRPC3-überexprimierenden HEK293-Zellen nach Transfektion mit einer siRNA gegen TRPC3 (rote Kurve) bzw. einer Kontroll-siRNA (schwarze Kurve). Die Expression wurde mittels quantitativer qRT-PCR ermittelt und ist als relative Expression ($2^{-\Delta CT}$) zu dem Kontrollgen HUP0 ausgedrückt. (Daten der AG Hoth, HEK293-Zellen wurden freundlicherweise von Mike Zhu zur Verfügung gestellt).

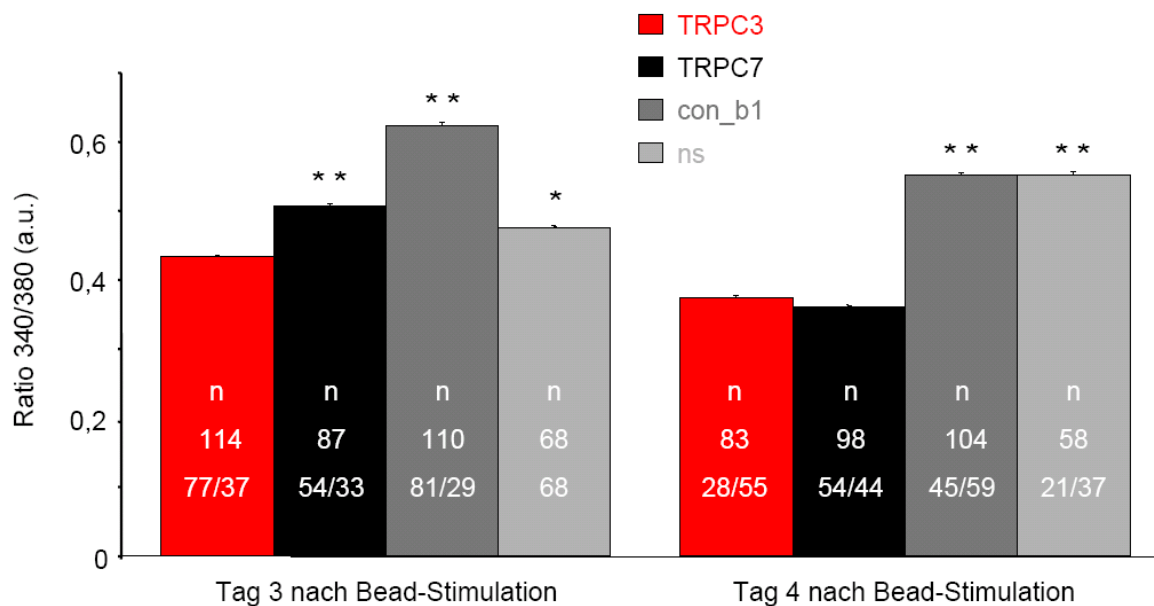


Abb. 4.18: Ruhekalzium in TRPC3 siRNA transfizierten Zellen.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der Ratio 340/380 aller Messpunkte aller gemessenen Zellen. In den jeweiligen Säulen steht die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen und darunter die Zellzahl der einzelnen in die Auswertung aufgenommenen Experimente ($n = \text{Zellzahl}$). Die Signifikanz (\star bedeutet $p < 0,5$, $\star\star$ bedeutet $p < 0,1$) bezieht sich immer auf die Messungen mit den Zellen, die mit der siRNA gegen TRPC3 transfiziert wurden (roter Balken).

5 Diskussion

Die Stimulation von T-Zellen mittels Antigen präsentierender Zellen (APC) ist ein komplexer Vorgang, an dem eine Vielzahl von Molekülen beteiligt ist. Nach Stimulation ist die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration eines der für die T-Zellaktivierung entscheidenden Ereignisse. Dabei führen mehrere Signalkaskaden zu einer Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher und zu einer Aktivierung speicheraktivierter CRAC/Orai1 Kanäle in der Plasmamembran. Die Speicherentleerung reicht dabei aus, um diese Kanäle und damit die T-Zelle zu aktivieren (Putney, 1990). Aus diesem Grund und wegen der relativ leichten Handhabung werden zur experimentellen Zellstimulation Substanzen wie Thapsigargin (TG), Kalziumchelatoren wie BAPTA oder Ionophore wie Ionomycin verwendet. All diese Substanzen führen über verschiedene aktive oder passive Mechanismen zur Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher und damit zur Aktivierung der CRAC/Orai1 Kanäle. Diese Substanzen haben jedoch einen entscheidende Nachteil: alle Signalkaskaden, die durch die Stimulation des TCR und der kostimulatorischen Rezeptoren ausgelöst werden und der Speicherentleerung vorausgehen, werden nicht aktiviert. Diese Signalkaskaden haben neben der Speicherentleerung aber noch weitere Konsequenzen, die das Kalziumsignal und damit die Zellaktivierung beeinflussen. Mit TG stimulierte T-Zellen zeigen eine andere Kinetik der Speicherentleerung und des Kalziumeinstroms über die Plasmamembran als solche, die mittels Antikörper über den TCR stimuliert wurden (Quintana et al., 2007). Ebenso wurde gezeigt, dass der Ca^{2+} -Einstrom über den CRAC/Orai1 Kanal wesentlich höher ist, wenn die Antikörper an einen Bead gebunden sind und nicht einfach zur extrazellulären Lösung dazugegeben werden. Der Unterschied liegt hier in der fokalen Stimulation und damit der Simulation einer Immunologischen Synapse (IS). Dass sich eine IS ausbildet, kann anhand einer ZAP-70 Translokation zur Kontaktstelle hin (Bunnell et al., 2002; Sloan-Lancaster et al., 1998; Sloan-Lancaster et al., 1997) und einer CD43 Translokation von der IS weg (Allenspach et al., 2001; Delon et al., 2001; Sperling et al., 1998) nachgewiesen werden. Das höhere Kalziumsignal kann unter anderem dadurch entstehen, dass bei der fokalen Stimulation die Mitochondrien näher an die Plasmamembran und die IS heran kommen. Mitochondrien verhindern, durch die Aufnahme des einströmenden Kalziums, die Feedback-Hemmung der CRAC/Orai1-Kanal und haben somit einen entscheidenden Einfluss auf die Höhe des CRAC-Stroms (Hoth et al., 1997; Quintana et al., 2006;

Quintana et al., 2007). Durch eine Annäherung der Mitochondrien und der Plasmamembran können die Mitochondrien mehr Kalzium aufnehmen und dadurch eine Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung des CRAC-Stroms verhindern. Ein Mechanismus, der die Mitochondrien näher an die Plasmamembran und die IS bringt ist die Formveränderung der T-Zelle beim Kontakt mit der APC (Delon et al., 1998a). Nocodazol, das die Funktion der Mikrotubuli inhibiert, hemmt auch die Translokation der Mitochondrien. Aus diesem Grund scheint auch ein aktiver Transport der Mitochondrien zur IS wahrscheinlich (Quintana et al., 2006; Quintana et al., 2007). Beads stellen eine gute und einfache Möglichkeit dar, die Bildung der IS zu simulieren. Nachteile der Beads sind jedoch die fehlenden Zelladhäsionsmoleküle und, dass ein sogenanntes „Umordnen“ der Oberflächenmoleküle auf dem Bead nicht möglich ist. Es wurde gezeigt, dass die APC selbst Einfluss auf das Kalziumsignal der T-Zelle hat (Averbeck et al., 2004). Selbst nach Stimulation mit verschiedenen APCs, wie B-Zellen oder dendritischen Zellen (DC), weisen T-Zellen unterschiedlich starke Kalziumsignale auf (Delon et al., 1998b). Diese Unterschiede kommen unter anderem durch die verschiedenen Größen der APCs zustande. Die wesentlich größeren DCs ermöglichen die Ausbildung einer größeren und damit scheinbar effektiveren IS. Diesen Vorteil weisen auch die, in dieser Arbeit verwendeten, CHO-Zellen gegenüber den Antikörper-gekoppelten Beads auf. Die unterschiedliche Effektivität der Stimulation mittels verschiedener APCs kommt aber auch dadurch zustande, dass DCs mehr MHC- und kostimulatorischen Molekülen exprimieren als B-Zellen (Delon et al., 1998b). Eine Stimulation mittels DC stellt somit die effektivste und physiologischste Art der T-Zell Stimulation dar. Für die Fragestellung dieser Arbeit war es allerdings notwendig, die Expression verschiedener stimulatorischer und kostimulatorischer Moleküle zu kontrollieren, was mittels DC nicht ohne weiteres möglich ist. Aus diesem Grund wurde die Stimulationsmethode mittels der CD33 exprimierenden CHO-Zellen und bispezifischen Fusionsproteinen etabliert. Diese Methode ermöglichte es zum einen, die Expression der an der T-Zell Stimulation beteiligten Moleküle zu kontrollieren und zum anderen, die IS in Form eines Zell-Zell Kontaktes zu simulieren. Sie ist damit physiologischer als die Bead-Stimulation und besser kontrollierbar als eine Stimulation mittels APCs. Diese Art der T-Zell Stimulation stellt somit einen sehr guten Kompromiss zwischen der Stimulation mittels Beads bzw. APCs dar, indem sie die Vorteile beider Methoden in sich vereint.

Wie komplex die Signalübertragung mittels Kalzium ist, wird deutlich, wenn man bedenkt, dass die Signale nicht nur in der Höhe der Kalziumkonzentration, sondern auch durch zeitliche und räumliche Dynamik kodiert werden (Clapham, 1995). So ist z. B. die Kalziumkonzentration im Zellkern an der Steuerung der Proliferation beteiligt (Rodrigues et al., 2007), während die mitochondriale Kalziumkonzentration entscheidend für die Einleitung der Apoptose ist (Mendes et al., 2005; Minagawa et al., 2005). Kleine Änderungen in der intrazellulären Kalziumkonzentration scheinen einen großen Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose zu haben (Schwarz et al., 2007a). Neben der Höhe der Kalziumkonzentration ist es auch von Bedeutung, ob eine konstante Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration oder ein oszillierendes Kalziumsignal entsteht (Dolmetsch and Lewis, 1994; Donnadieu et al., 1992; Donnadieu et al., 1994; Hoth et al., 1997; Lewis and Cahalan, 1989). Die Expression der Transkriptionsfaktoren NFAT, AP-1 und NF κ B wird in Jurkat T-Zellen ebenfalls über verschiedene Muster von Kalziumsignalen gesteuert, wobei Amplitude, Dauer und Frequenz des Signals eine Rolle spielen (Dolmetsch et al., 1997; Dolmetsch et al., 1998; Li et al., 1998). Etwa 75 % aller durch Aktivierung regulierten Gene sind vom Kalziumeinstrom über die CRAC/Orai1 Kanäle abhängig (Feske et al., 2001). Die Wichtigkeit dieses Kalziumeinstroms in die Zelle für den Ablauf einer normalen Immunantwort wird auch dadurch deutlich, dass Patienten ohne nennenswerte CRAC-Aktivität SCID ausbilden (Feske et al., 2005; Le Deist et al., 1995a; Partiseti et al., 1994). Auch die kostimulatorischen Moleküle CD28 und CTLA-4 beeinflussen die Kalziumkonzentration in der Zelle und werden selbst durch Kalzium reguliert. In der Literatur gibt es mehrere Hinweise auf einen Einfluss von CD28 auf das Kalziumsignal in T-Zellen: In nicht vorstimulierten CD4⁺CD8⁺ T-Zellen der Maus erhöht eine CD28 Kostimulation den Kalziumeinstrom signifikant. Auch zeigen diese Zellen unter CD28 Kostimulation mehr sogenannte „Spikes“ im Verlauf des Kalziumeinstroms (Freedman et al., 1999). In vorstimulierten murinen CD4⁺ T-Zellen konnte ebenfalls ein positiver Effekt einer CD28 Kostimulation auf das Kalziumsignal festgestellt werden (Gatta et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Kostimulation mit B7-2 (CD86) zu einem signifikant erhöhten Kalziumeinstrom in vorstimulierten, primären, humanen T-Zellen führt. Primäre, nicht vorstimulierte T-Zellen sowie parentale und E6.1 Jurkat T-Zellen zeigten diese Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach B7-2 Kostimulation nicht. Die Immunfluoreszenz hat gezeigt, dass von allen in dieser

Arbeit verwendeten T-Zellen nur die vorstimulierten primären T-Zellen CTLA-4 exprimieren. Die parentalen Jurkat T-Zellen exprimieren darüber hinaus nur wenig bis kein CD28. In diesen Zellen wäre also kein oder zumindest nur ein sehr geringer Effekt durch eine B7 Kostimulation zu erwarten, da die Bindungspartner auf der T-Zelle fehlen. Sie eignen sich daher gut als Negativkontrolle. Die nicht vorstimulierten T-Zellen exprimieren CD28 nur schwach. Möglicherweise reicht die Zahl der CD28 Moleküle also nicht aus, ein hinreichend starkes Signal an die Zelle weiterzuleiten, um eine Veränderung des Kalziumsignals zu bewirken. Das könnte dann auch einer der Gründe sein, warum die Zelle nach Stimulation die CD28 Expression stark erhöht. Dieses Argument wird allerdings dadurch entkräftet, dass E6.1 Jurkat T-Zellen ebenfalls kein erhöhtes Kalziumsignal nach B7-2 Kostimulation zeigen. E6.1 Jurkat T-Zellen exprimieren zwar kein CTLA-4, ihre CD28 Expression ist jedoch sogar höher als die in vorstimulierten primären CD4⁺ T-Zellen. Das E6.1 Jurkat T-Zellen kein CTLA-4 aber CD28 exprimieren, wurde auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt (Baroja et al., 2000; Freeman et al., 1992). In den E6.1 Jurkat T-Zellen könnte das alleinige Vorhandensein von CD28, als einziger Bindungspartner der B7 Moleküle, eine mögliche Erklärung für den fehlenden Unterschied im Kalziumstrom nach B7-1 und B7-2 Kostimulation sein. Sowohl B7-1 als auch B7-2 können CD28 binden und aktivieren. Durch die fehlende Konkurrenz von CD28 und CTLA-4 um die B7 Moleküle wird CD28 in beiden Fällen in gleichem Maße gebunden. Zu erwarten wäre dennoch, dass eine CD28 Kostimulation gegenüber einer reinen CD3 Stimulation einen positiven Effekt auf das Kalziumsignal hat. Aber die E6.1 Jurkat T-Zellen reagierten auch nach reiner CD3 Stimulation mit einem ebenso hohen Kalziumsignal. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass eine CD28 Kostimulation das Kalziumsignal erst nach effektiver Stimulation und den damit verbundenen Änderungen in der Zelle, wie zum Beispiel die Expression von CTLA-4, beeinflusst. Freedman et al. konnten einen positiven kostimulatorischen Effekt von CD28 in nicht vorstimulierten CD4⁺CD8⁺ T-Zellen von C57B1/6 Mäusen nachweisen (Freedman et al., 1999; Gatta et al., 2002). Es wurde allerdings nicht untersucht, ob diese Zellen CTLA-4 exprimieren. Es ist allerdings bekannt, dass unstimulierte CD4⁺ T-Zellen dieser Mäuse CTLA-4 in sehr geringem Maße exprimieren (Gatta et al., 2002). Es könnte sein, dass diese geringe Expression von CTLA-4 schon ausreicht, das Kalziumsignal nach CD28 Kostimulation zu erhöhen. Gatta et al. haben gezeigt, dass eine CD28 Kostimulation in vorstimulierten Zellen das Kalziumsignal erhöht. In den durchgeführten Experimenten wurde dieser Effekt jedoch durch zusätzliche Stimulation von CTLA-4 inhibiert. CTLA-4 Kostimulation

reduzierte sogar das Kalziumsignal gegenüber Zellen, die nur über CD3 stimuliert wurden. Die Ergebnisse von Gatta et al. sprechen also für eine direkte inhibitorische Wirkung von CTLA-4 auf das Kalziumsignal. Dieser Effekt konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden. Im Gegensatz zu den Experimenten in der vorliegenden Arbeit wurden allerdings nicht die B7 Moleküle zur Kostimulation verwendet, die um CTLA-4 und CD28 konkurrieren, sondern monoklonale Antikörper, die spezifisch nur CD28 oder CTLA-4 binden. Nun ist bei der Stimulation mittels der B7 Moleküle nicht klar abzugrenzen, ob die Zelle über CTLA-4, über CD28 oder über beide gleichzeitig kostimuliert wird. Die Blockade von CD28 auf vorstimulierten primären T-Zellen, die dazu führt, dass B7-1 und B7-2 nur noch an CTLA-4 binden können, hatte jedoch auch kein erniedrigtes Kalziumsignal gegenüber einer reinen CD3 Stimulation zur Folge.

Die Blockade von CD28 mittels blockierenden anti-CD28 Antikörpern führte jedoch dazu, dass der positive kostimulatorische Effekt einer B7-2 Kostimulation auf das Kalziumsignal aufgehoben wird. Das Kalziumsignal nach B7-1 Kostimulation wurde durch die Blockade nicht beeinflusst. Das spricht zum einen dafür, dass das Erhöhte Kalziumsignal nach B7-2 Kostimulation über CD28 vermittelt wird. Zum anderen spricht es dafür, dass B7-1 eher CTLA-4 bindet, während B7-2 CD28 als Bindungspartner vorzieht. Obwohl die Bindungsaffinität von CTLA-4 für beide B7 Moleküle höher ist als die von CD28 (Collins et al., 2002; Linsley et al., 1994; van der Merwe et al., 1997), kommen mehrere Arbeitsgruppen zu dem Ergebnis, dass B7-1 eher CTLA-4 und B7-2 eher CD28 bindet (Manzotti et al., 2006; Manzotti et al., 2002; Pentcheva-Hoang et al., 2004; Zheng et al., 2004). Zusammen sprechen die Ergebnisse aus den Expressionsanalysen und den Kalziummessungen in den verschiedenen T-Zellpopulationen dafür, dass der positiv kostimulatorische Effekt einer B7-2 Kostimulation über CD28 vermittelt wird, die gleichzeitige Expression von CTLA-4 für diesen Effekt aber ebenfalls notwendig ist. Wurden die Zellen nur mit B7-1, dem bevorzugten Bindungspartner von CTLA-4, kostimuliert, konnte kein Effekt gegenüber Zellen festgestellt werden, die mit anti-CD3 Antikörpern alleine stimuliert wurden. So scheint CTLA-4 auf der einen Seite den positiven kostimulatorischen Effekt einer B7-2 Kostimulation erst zu ermöglichen, auf der anderen Seite sorgt die Expression von B7-1 auf der APC und die Expression von CTLA-4 auf stimulierten T-Zellen dafür, dass dieser Effekt und damit die Stimulation der T-Zelle nicht überhand nimmt. Das Immunsystem scheint also einen sehr komplexen Mechanismus entwickelt zu haben, der durch zeitliche und räumliche Koordination von Molekülen in der Lage ist die Immunreaktion den Gegebenheiten anzupassen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass selbst nach vollständiger Entleerung des ER durch TG der Unterschied im darauffolgenden Kalziumplateau nach Kostimulation mit B7-1 bzw. B7-2 erhalten bleibt. Der Unterschied im Kalziumplateau wird folglich nicht durch unterschiedliche starke Speicherentleerung verursacht. Dafür spricht auch, dass nur der Anteil der T-Zellen, deren Speicherentleerung durch B7-1 bzw. B7-2 Kostimulation noch nicht vollständig ist, eine weitere Speicherentleerung nach Applikation von TG zeigt. Zellen, deren Speicher vor TG-Applikation vollständig entleert waren, reagierten nicht mehr mit einer weiteren Kalziumfreisetzung. Sowohl B7-1 als auch B7-2 Kostimulation scheinen also eine vollständige Entleerung des ER zu bewirken. Interessant ist auch, dass die T-Zellen nach Entleerung des ER mittels TG ein niedrigeres Kalziumplateau erreichen als T-Zellen, deren Speicher mittels B7-1 bzw. B7-2 Kostimulation entleert wurden. Dies zeigt, dass die eingeleiteten Signalkaskaden das Kalziumsignal nicht nur durch die Speicherentleerung beeinflussen und macht deutlich wie wichtig eine möglichst physiologische Stimulation der Zellen ist, wenn man die Komplexität der T-Zellaktivierung und die Rolle von Kalzium in diesem Prozess verstehen möchte.

Die Applikation von 10 μM 2-APB (wirkt in diesen Konzentrationen aktivierend auf CRAC/Orai1 Kanäle), nach Erreichen des Kalziumplateaus, hebt den signifikanten Unterschied im Kalziumplateau nach B7-1 bzw. B7-2 Kostimulation auf. Die beiden B7 Moleküle beeinflussen folglich die Öffnungswahrscheinlichkeit bzw. die Zahl der aktivierten CRAC/Orai1 Kanäle. Es ist gezeigt, dass 50 μM 2-APB den STIM2 abhängigen Kalziumeinstrom in Orai1 überexprimierenden HEK293-Zellen erhöht, während es den STIM1 abhängigen erniedrigt (Soboloff et al., 2006b). In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten stieg die Kalziumkonzentration nach der Applikation von 10 μM 2-APB sowohl nach B7-1, als auch nach B7-2 Kostimulation auf einen ähnlichen Wert an. Es ist also nicht auszuschließen, dass die beiden B7 Moleküle über unterschiedliche Aktivierung der STIM1 bzw. STIM2 abhängigen Kalziumeinströmen wirken. Für STIM2 wurde gezeigt, dass es nicht nur speicherabhängig, sondern auch unabhängig von der Speicherentleerung den CRAC/Orai1 Kanal aktivieren kann (Parvez et al., 2007). Parvez et al. haben auch gezeigt, dass die speicherunabhängige Aktivierung über 2-APB aktiviert werden kann. Scheinbar verdrängt 2-APB den natürlichen Inhibitor Calmodulin- Ca^{2+} von seiner Bindungsstelle am STIM2/CRAC/Orai1 Komplex. Folglich könnte die zusätzliche Aktivierung der CRAC/Orai1 Kanäle zur Aufhebung des Unterschiedes im Kalziumplateau nach den verschiedenen B7 Kostimulationen führen.

Dies würde allerdings voraussetzen, dass Zellen die mit B7-1 kostimuliert wurden mehr CRAC/Orai1 Komplexe haben, die an STIM2 gebunden sind. Erklären könnte man dies dadurch, dass sich weniger STIM1/CRAC/Orai1 Komplexe bilden, was sich durch das schwächere Kalziumsignal zeigt.

Parentalen Jurkat Zellen zeigten nach STIM-siRNA Transfektion ein signifikant niedrigeres Kalziumplateau als Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA gegen TRPC7 transfiziert wurden. Eine Herunterregulation von STIM1 mittels siRNA in primären humanen T-Zellen hatte keinen signifikant niedrigeren Kalziumeinstrom in die Zellen zur Folge. Ein Grund hierfür könnte sein, dass sich die primären Zellen auch nach Stimulation erst spät anfangen zu teilen, während sich die Jurkat T-Zellen alle 24 h einmal teilen. Das hat zur Folge, dass die Jurkat T-Zellen ihre Proteine wahrscheinlich täglich verdoppeln und die siRNA, die auf mRNA Ebene agiert, so sehr gut wirken kann. In primären Zellen gestaltet sich diese Technik wesentlich schwieriger, da man nicht weiß, in welchem zeitlichen Abstand sich Proteine wie STIM1 verdoppeln. Was aber deutlich gezeigt werden konnte, ist das STIM1-YFP nach Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern beladenen Beads zur IS transloziert wird. Auch andere Arbeitsgruppen haben dies mittels dendritischer Zellen für primäre und Jurkat T-Zellen gezeigt (Lioudyno et al., 2008). In STIM1 überexprimierenden HEK293-Zellen wurde gezeigt, dass der Effekt von 50 μ M 2-APB davon abhängt, ob Orai1, 2 oder 3 zusätzlich überexprimiert wird. Wird Orai1 überexprimiert, wirkt 2-APB in dieser Konzentration blockierend auf den I_{CRAC} , wird Orai2 überexprimiert, wirkt es inhibierend und wird Orai3 zusätzlich zu STIM1 überexprimiert, wirkt 2-APB potenzierend (Lis et al., 2007). Zu bedenken ist bei diesen Experimenten, dass HEK293-Zellen auch endogen alle drei Orai-Proteine exprimieren (Gwack et al., 2007) und somit die Überexpression nicht gezwungenermaßen homomere Kanäle zur Folge hat. Für die Wirkung von 2-APB, dessen genauer Wirkmechanismus ungeklärt ist, scheint also wichtig zu sein welches STIM- mit welchem Orai-Protein interagiert. Es ist gezeigt, dass alle drei Orai-Proteine mit STIM1 (DeHaven et al., 2007; Mercer et al., 2006) und STIM2 (Parvez et al., 2007) SOCs bilden können und dass Orai1 mit sich selbst sowie mit Orai2 und Orai3 Multimere bilden kann (Lis et al., 2007). Allerdings bewirkt die Mutation in der Porendomäne von Orai1 (E106Q) (Prakriya et al., 2006; Vig et al., 2006a) eine Inhibition des I_{CRAC} in allen Multimeren (Lis et al., 2007). Folglich könnte es auch sein, dass die B7 Kostimulation die Zusammensetzung der Kanäle beeinflusst und 2-APB aus diesem Grund in beiden Fällen, wenn auch nicht im gleichen Maße, potenzierend wirkt. Dazu kommt, dass die in dieser Arbeit durchgeführten

Experimente alle in primären, humanen T-Zellen ohne Überexpression durchgeführt wurden. In diesen Zellen sind alle drei Orai- und die beiden STIM-Proteine in sehr unterschiedlicher Quantität exprimiert, wie mittels quantitativer PCR innerhalb unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Es steht mittlerweile außer Frage, dass Orai1 (Feske et al., 2006; Mercer et al., 2006; Peinelt et al., 2006; Prakriya et al., 2006; Soboloff et al., 2006b; Vig et al., 2006a; Zhang et al., 2006) und evtl. Orai2 und Orai3 (Gwack et al., 2007; Mercer et al., 2006) den CRAC-Kanal bilden. Vor der Entdeckung der Orai-Proteine galten die TRPC-Proteine und TRPV5 und TRPV6 als beste Kandidaten, um diesen Kanal zu bilden. Bis heute ist aber noch nicht ausgeschlossen, dass diese Proteine SOCs bilden und unter Umständen sogar an der Bildung des CRAC-Kanals beteiligt sind oder diesen zumindest beeinflussen. Unser Interesse gilt den primären humanen Zellen und von den oben genannten Kandidaten sind nur TRPC1 und TRPC3 konstant in humanen CD3⁺ T-Zellen exprimiert (Schwarz et al., 2007b). Aus diesem Grund sollen nur diese beiden Proteine hier diskutiert werden.

Es wurde gezeigt, dass eine Überexpression von TRPC3 in Jurkat T-Zellen keinen Effekt auf den Kalziumeinstrom nach Speicherentleerung mittels Thapsigargin hat. Im Gegensatz dazu, zeigen diese Zellen aber einen stärkeren Kalziumeinstrom über die Plasmamembran nach Stimulation mit PHA oder OKT-3 (Philipp et al., 2003). Wenn TRPC3 in HEK293-Zellen überexprimiert wird, fungiert es als ein nicht-selektiver Kanal für monovalente Kationen mit einer hohen Leitfähigkeit (Hofmann et al., 1999; Hurst et al., 1998; Kiselyov et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass in DT40 Zellen, einer B-Zelllinie aus dem Huhn, die Funktion von TRPC3-Kanälen als SOC vom Expressionslevel abhängt. Nur bei niedriger Expression fungiert TRPC3 als SOC (Kiselyov et al., 1998), bei hoher Expression ist seine Aktivität unabhängig von der Speicherentleerung (Vazquez et al., 2001; Vazquez et al., 2003). Vasquez et al. benutzten neben anderen Stimulationsmethoden auch Thapsigargin zur Speicherentleerung und zeigten, dass nur bei niedriger Expression von TRPC3 ein anschließender Kalziumeinstrom über die Plasmamembran detektierbar war. Demzufolge konnten Philipp et al. (2003) in ihrem Überexpressionsmodell gar kein verändertes Kalziumsignal nach dieser Stimulation nachweisen. Eine Stimulation mit PHA oder OKT-3 wurde von Vasquez et al. leider nicht durchgeführt. Die Überexpression einzelner TRP-Proteine hat erheblich dazu beigetragen die Funktionen der einzelnen Proteine aufzuklären. Allerdings geht man davon aus, dass die natürlich gebildeten Kanäle nicht nur aus einem Protein bestehen, sondern sich aus verschiedenen Proteinen zusammensetzen. Um die Funktion von TRPC1 und TRPC3 zu erforschen, scheint es eine

vielversprechendere Möglichkeit zu sein, die Expression zu verringern. Wenn ein Protein eine wichtige Rolle im Kalziumstrom spielt, sollte die verringerte Expression sich auf dieses Signal auswirken. In HEK293-Zellen wurde gezeigt, dass eine Runterregulation von TRPC3 mittels Antisense-RNA oder siRNA zu einer Reduktion des Kalziumstroms führt (Wu et al., 2000; Wu et al., 2004; Zagranichnaya et al., 2005). Zagranichnaya et al. untersuchten auch TRPC1 und stellten fest, dass ein „knock-down“ von TRPC3 und TRPC1 den Kalziumstrom nicht stärker inhibiert als die alleinige Herunterregulation von TRPC1. Auch in anderen Zellen führte eine Suppression von TRPC3 zu einer Inhibition des SOC (Kaznachejeva et al., 2007; Thebault et al., 2005). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob ein „knock-down“ von TRPC3 mittels siRNA einen Effekt auf den Kalziumstrom in primären, humanen CD4⁺ T-Zellen hat. Allerdings brachten diese Messungen kein eindeutiges Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Die Funktionalität der verwendeten siRNA wurde in TRPC3 überexprimierenden HEK293-Zellen getestet. Da das exprimierte TRPC3 an ein Fluorochrom gekoppelt war, könnte anhand der verringerten Fluoreszenz in TRPC3-siRNA transfizierten Zellen gezeigt werden, dass diese siRNA TRPC3 tatsächlich herunterreguliert. Auch hier stellt sich wiederum die Frage, ob der fehlende Effekt auf die sehr geringen Teilungsraten der primären Zellen, und der damit evtl. sehr geringe Neusynthese von Proteinen, zurückzuführen ist. Erste Messungen, in denen die Zellen nicht stimuliert wurden, zeigten jedoch einen Einfluss von TRPC3 auf das Ruhekalzium in vorstimulierten T-Zellen. Sollte sich dieser Effekt in kommenden Experimenten bestätigen, könnte es auch sein, dass TRPC3 den CRAC-Strom dadurch beeinflusst, dass es die intrazelluläre Kalziumkonzentration reguliert. Ein Indiz dafür, dass TRPC3 eine wichtige Rolle für die Zelle spielt, ist die Steigerung der TRPC3 Expression nach Stimulation der Zellen. Dies wurde innerhalb der AG Hoth mittels quantitativer PCR gezeigt. Ein solcher Effekt wurde für TRPC1 nicht gefunden (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus konnte Anna Wenning (AG Hoth) zeigen, dass die Proliferation nach Transfektion primärer humaner T-Zellen mittels TRPC3-siRNA reduziert ist (Daten nicht gezeigt).

Sowohl für TRPC1, als auch für TRPC3, gibt es Daten, die diese mit den Proteinen STIM1 und Orai1 in Verbindung bringen. Die Oberflächenexpression von TRPC1 wird scheinbar direkt über STIM1 reguliert (Huang et al., 2006; Lopez et al., 2006; Yuan et al., 2007), während TRPC3 indirekt, über eine Heteromultimärisierung mit TRPC1, von STIM1 reguliert wird (Yuan et al., 2007). Auch eine Interaktion zwischen TRPC3 und Orai1 konnte nachgewiesen werden (Liao et al., 2007). Zudem wurde gezeigt, dass eine

schwache Orai1-Überexpression den speichergesteuerten Ca^{2+} Einstrom in TRPC3 exprimierenden Zellen, im Gegensatz zu Zellen, die kein TRPC3 exprimieren, erhöht (Liao et al., 2007). Der Komplex aus TRPC1, STIM1 und Orai1 scheint am SOC in humanen Speicheldrüsenzellen beteiligt zu sein (Ong et al., 2007). All diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die TRP-Proteine einen Einfluss auf den I_{CRAC} ausüben. Ob sie einen eigenen Kanal bilden oder an der Bildung des CRAC/Orai1 Kanals beteiligt sind, konnte bis heute nicht gezeigt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, das Kalziumsignal in primären humanen T-Zellen besser zu verstehen. Hierzu wurde sowohl der Einfluss einer B7 Kostimulation untersucht, als auch die Rolle verschiedener Proteine, wie STIM1, Orai1 und TRPC3. Die Ergebnisse machen deutlich, dass die B7 Kostimulation auch über die Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration agiert. Es wurde jedoch auch deutlich, dass an diesem Prozess viele Moleküle beteiligt sind, die räumlich und zeitlich auf komplexe Weise interagieren. Die vollständige Aufklärung dieses Prozesses eröffnet neue Möglichkeiten in der Therapie verschiedener Erkrankungen. So könnten bispezifische Antikörper, die auf der einen Seite ein Tumorantigen erkennen und auf der anderen Seite Antikörper oder Peptide zur gezielten T-Zell Stimulation tragen zu einer sehr nebenwirkungsarmen Tumorthherapie eingesetzt werden. Auch in der Transplantationsmedizin und der Bekämpfung von Autoimmunerkrankungen gibt es die Hoffnung neue gezieltere Therapieformen zu entwickeln, die nicht nur die Heilungschancen erhöhen, sondern auch die Lebensqualität der Patienten durch Minderung der Nebenwirkungen immunsuppressiver Therapien zu steigern.

6 Literatur

- Alegre, M.L., K.A. Frauwirth, and C.B. Thompson. 2001. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol.* 1:220-8.
- Alegre, M.L., P.J. Noel, B.J. Eisfelder, E. Chuang, M.R. Clark, S.L. Reiner, and C.B. Thompson. 1996. Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells. *J Immunol.* 157:4762-70.
- Allenspach, E.J., P. Cullinan, J. Tong, Q. Tang, A.G. Tesciuba, J.L. Cannon, S.M. Takahashi, R. Morgan, J.K. Burkhardt, and A.I. Sperling. 2001. ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity.* 15:739-50.
- Ambudkar, I.S., H.L. Ong, X. Liu, B. Bandyopadhyay, and K.T. Cheng. 2007. TRPC1: The link between functionally distinct store-operated calcium channels. *Cell Calcium.*
- Averbeck, M., T. Braun, G. Pfeifer, J. Sleeman, J. Dudda, S.F. Martin, B. Kremer, K. Aktories, J.C. Simon, and C. Termeer. 2004. Early cytoskeletal rearrangement during dendritic cell maturation enhances synapse formation and Ca²⁺ signaling in CD8(+) T cells. *Eur J Immunol.* 34:2708-19.
- Bakowski, D., M.D. Glitsch, and A.B. Parekh. 2001. An examination of the secretion-like coupling model for the activation of the Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current I(CRAC) in RBL-1 cells. *J Physiol.* 532:55-71.
- Baldwin, A.S., Jr. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 14:649-83.
- Baroja, M.L., D. Luxenberg, T. Chau, V. Ling, C.A. Strathdee, B.M. Carreno, and J. Madrenas. 2000. The inhibitory function of CTLA-4 does not require its tyrosine phosphorylation. *J Immunol.* 164:49-55.
- Birnbaumer, L., E. Yildirim, and J. Abramowitz. 2003. A comparison of the genes coding for canonical TRP channels and their M, V and P relatives. *Cell Calcium.* 33:419-32.
- Bradshaw, J.D., P. Lu, G. Leytze, J. Rodgers, G.L. Schieven, K.L. Bennett, P.S. Linsley, and S.E. Kurtz. 1997. Interaction of the cytoplasmic tail of CTLA-4 (CD152) with a clathrin-associated protein is negatively regulated by tyrosine phosphorylation. *Biochemistry.* 36:15975-82.
- Bromley, S.K., W.R. Burack, K.G. Johnson, K. Somersalo, T.N. Sims, C. Sumen, M.M. Davis, A.S. Shaw, P.M. Allen, and M.L. Dustin. 2001. The immunological synapse. *Annu Rev Immunol.* 19:375-96.

- Bunnell, S.C., D.I. Hong, J.R. Kardon, T. Yamazaki, C.J. McGlade, V.A. Barr, and L.E. Samelson. 2002. T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. *J Cell Biol.* 158:1263-75.
- Cahalan, M.D., S.L. Zhang, A.V. Yeromin, K. Ohlsen, J. Roos, and K.A. Stauderman. 2007. Molecular basis of the CRAC channel. *Cell Calcium.*
- Carreno, B.M., F. Bennett, T.A. Chau, V. Ling, D. Luxenberg, J. Jussif, M.L. Baroja, and J. Madrenas. 2000. CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J Immunol.* 165:1352-6.
- Cinek, T., A. Sadra, and J.B. Imboden. 2000. Cutting edge: tyrosine-independent transmission of inhibitory signals by CTLA-4. *J Immunol.* 164:5-8.
- Clapham, D.E. 1995. Calcium signaling. *Cell.* 80:259-68.
- Clapham, D.E. 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 426:517-24.
- Clapham, D.E. 2007. SnapShot: mammalian TRP channels. *Cell.* 129:220.
- Clapham, D.E., L.W. Runnels, and C. Strubing. 2001. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci.* 2:387-96.
- Collins, A.V., D.W. Brodie, R.J. Gilbert, A. Iaboni, R. Manso-Sancho, B. Walse, D.I. Stuart, P.A. van der Merwe, and S.J. Davis. 2002. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity.* 17:201-10.
- Cosens, D.J., and A. Manning. 1969. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature.* 224:285-7.
- Crabtree, G.R., and N.A. Clipstone. 1994. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem.* 63:1045-83.
- DeHaven, W.I., J.T. Smyth, R.R. Boyles, and J.W. Putney, Jr. 2007. Calcium inhibition and calcium potentiation of Orai1, Orai2, and Orai3 calcium release-activated calcium channels. *J Biol Chem.* 282:17548-56.
- Delon, J., N. Bercovici, R. Liblau, and A. Trautmann. 1998a. Imaging antigen recognition by naive CD4⁺ T cells: compulsory cytoskeletal alterations for the triggering of an intracellular calcium response. *Eur J Immunol.* 28:716-29.
- Delon, J., N. Bercovici, G. Raposo, R. Liblau, and A. Trautmann. 1998b. Antigen-dependent and -independent Ca²⁺ responses triggered in T cells by dendritic cells compared with B cells. *J Exp Med.* 188:1473-84.
- Delon, J., K. Kaibuchi, and R.N. Germain. 2001. Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity.* 15:691-701.

- Dolmetsch, R.E., and R.S. Lewis. 1994. Signaling between intracellular Ca²⁺ stores and depletion-activated Ca²⁺ channels generates [Ca²⁺]_i oscillations in T lymphocytes. *J Gen Physiol.* 103:365-88.
- Dolmetsch, R.E., R.S. Lewis, C.C. Goodnow, and J.I. Healy. 1997. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature.* 386:855-8.
- Dolmetsch, R.E., K. Xu, and R.S. Lewis. 1998. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature.* 392:933-6.
- Donnadieu, E., G. Bismuth, and A. Trautmann. 1992. Calcium fluxes in T lymphocytes. *J Biol Chem.* 267:25864-72.
- Donnadieu, E., G. Bismuth, and A. Trautmann. 1994. Antigen recognition by helper T cells elicits a sequence of distinct changes of their shape and intracellular calcium. *Curr Biol.* 4:584-95.
- Ebner, S., S. Neyer, S. Hofer, W. Nussbaumer, N. Romani, and C. Heufler. 2001. Generation of large numbers of human dendritic cells from whole blood passaged through leukocyte removal filters: an alternative to standard buffy coats. *J Immunol Methods.* 252:93-104.
- Fallarino, F., P.E. Fields, and T.F. Gajewski. 1998. B7-1 engagement of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 inhibits T cell activation in the absence of CD28. *J Exp Med.* 188:205-10.
- Feske, S., J. Giltnane, R. Dolmetsch, L.M. Staudt, and A. Rao. 2001. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol.* 2:316-24.
- Feske, S., Y. Gwack, M. Prakriya, S. Srikanth, S.H. Puppel, B. Tanasa, P.G. Hogan, R.S. Lewis, M. Daly, and A. Rao. 2006. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature.*
- Feske, S., M. Prakriya, A. Rao, and R.S. Lewis. 2005. A severe defect in CRAC Ca²⁺ channel activation and altered K⁺ channel gating in T cells from immunodeficient patients. *J Exp Med.* 202:651-62.
- Freedman, B.D., Q.H. Liu, S. Somersan, M.I. Kotlikoff, and J.A. Punt. 1999. Receptor avidity and costimulation specify the intracellular Ca²⁺ signaling pattern in CD4⁺CD8⁺ thymocytes. *J Exp Med.* 190:943-52.
- Freeman, G.J., D.B. Lombard, C.D. Gimmi, S.A. Brod, K. Lee, J.C. Laning, D.A. Hafler, M.E. Dorf, G.S. Gray, H. Reiser, and et al. 1992. CTLA-4 and CD28 mRNA are coexpressed in most T cells after activation. Expression of CTLA-4 and CD28 mRNA does not correlate with the pattern of lymphokine production. *J Immunol.* 149:3795-801.

- Gall, J.M., P.A. Davol, R.C. Grabert, M. Deaver, and L.G. Lum. 2005. T cells armed with anti-CD3 x anti-CD20 bispecific antibody enhance killing of CD20+ malignant B cells and bypass complement-mediated rituximab resistance in vitro. *Exp Hematol.* 33:452-9.
- Gatta, L., G. Calviello, F. Di Nicuolo, L. Pace, V. Ubaldi, G. Doria, and C. Pioli. 2002. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 inhibits integrin-mediated stimulation. *Immunology.* 107:209-16.
- Gauen, L.K., Y. Zhu, F. Letourneur, Q. Hu, J.B. Bolen, L.A. Matis, R.D. Klausner, and A.S. Shaw. 1994. Interactions of p59fyn and ZAP-70 with T-cell receptor activation motifs: defining the nature of a signalling motif. *Mol Cell Biol.* 14:3729-41.
- Goldstein, G., D.J. Norman, C.F. Shield, 3rd, H. Kreis, J. Burdick, M.W. Flye, E. Rivolta, T. Starzl, and A. Monaco. 1986. OKT3 monoclonal antibody reversal of acute renal allograft rejection unresponsive to conventional immunosuppressive treatments. *Prog Clin Biol Res.* 224:239-49.
- Grosse-Hovest, L., I. Hartlapp, W. Marwan, G. Brem, H.G. Rammensee, and G. Jung. 2003. A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing. *Eur J Immunol.* 33:1334-40.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260:3440-50.
- Gwack, Y., S. Srikanth, S. Feske, F. Cruz-Guilloty, M. Oh-hora, D.S. Neems, P.G. Hogan, and A. Rao. 2007. Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *J Biol Chem.* 282:16232-43.
- Hardie, R.C., and B. Minke. 1992. The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in Drosophila photoreceptors. *Neuron.* 8:643-51.
- Hathcock, K.S., G. Laszlo, C. Pucillo, P. Linsley, and R.J. Hodes. 1994. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med.* 180:631-40.
- Hauser, C.T., and R.Y. Tsien. 2007. A hexahistidine-Zn²⁺-dye label reveals STIM1 surface exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:3693-7.
- Hirsch, R.L., P.C. Layton, L.A. Barnes, A.B. Kremer, and G. Goldstein. 1987. Orthoclone OKT3 treatment of acute renal allograft rejection in patients receiving maintenance cyclosporine therapy. *Transplant Proc.* 19:32-6.
- Hofmann, T., A.G. Obukhov, M. Schaefer, C. Harteneck, T. Gudermann, and G. Schultz. 1999. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature.* 397:259-63.

- Hofmann, T., M. Schaefer, G. Schultz, and T. Gudermann. 2002. Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:7461-6.
- Hoth, M., C.M. Fanger, and R.S. Lewis. 1997. Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol*. 137:633-48.
- Hoth, M., and R. Penner. 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*. 355:353-6.
- Hoth, M., and R. Penner. 1993. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol*. 465:359-86.
- Huang, G.N., W. Zeng, J.Y. Kim, J.P. Yuan, L. Han, S. Muallem, and P.F. Worley. 2006. STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol*. 8:1003-1010.
- Huppa, J.B., and M.M. Davis. 2003. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol*. 3:973-83.
- Hurst, R.S., X. Zhu, G. Boulay, L. Birnbaumer, and E. Stefani. 1998. Ionic currents underlying HTRP3 mediated agonist-dependent Ca²⁺ influx in stably transfected HEK293 cells. *FEBS Lett*. 422:333-8.
- Itoh, Y., and R.N. Germain. 1997. Single cell analysis reveals regulated hierarchical T cell antigen receptor signaling thresholds and intraclonal heterogeneity for individual cytokine responses of CD4⁺ T cells. *J Exp Med*. 186:757-66.
- Kaznacheeva, E., L. Glushankova, V. Bugaj, O. Zimina, A. Skopin, V. Alexeenko, L. Tsiokas, I. Bezprozvanny, and G.N. Mozhayeva. 2007. Suppression of TRPC3 leads to disappearance of store-operated channels and formation of a new type of store-independent channels in A431 cells. *J Biol Chem*. 282:23655-62.
- Kiselyov, K., X. Xu, G. Mozhayeva, T. Kuo, I. Pessah, G. Mignery, X. Zhu, L. Birnbaumer, and S. Muallem. 1998. Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature*. 396:478-82.
- Kupfer, A., and G. Dennert. 1984. Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J Immunol*. 133:2762-6.
- Kupfer, A., G. Dennert, and S.J. Singer. 1983. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center within cloned natural killer cells bound to their targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 80:7224-8.
- Le Deist, F., C. Hivroz, M. Partiseti, C. Thomas, H.A. Buc, M. Oleastro, B. Belohradsky, D. Choquet, and A. Fischer. 1995a. A primary T-cell immunodeficiency associated with defective transmembrane calcium influx. *Blood*. 85:1053-62.

- Le Deist, F., C. Hivroz, M. Partiseti, C. Thomas, H.A. Bue, M. Oleastro, B. Belohradsky, D. Choquet, and A. Fischer. 1995b. A primary T-cell immunodeficiency associated with defective transmembrane calcium influx. *Blood*. 85:1053-62.
- Lenschow, D.J., G.H. Su, L.A. Zuckerman, N. Nabavi, C.L. Jellis, G.S. Gray, J. Miller, and J.A. Bluestone. 1993. Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:11054-8.
- Lewis, R.S. 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 19:497-521.
- Lewis, R.S., and M.D. Cahalan. 1989. Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca²⁺ and transmembrane Ca²⁺ current in human leukemic T cells. *Cell Regul*. 1:99-112.
- Li, W., J. Llopis, M. Whitney, G. Zlokarnik, and R.Y. Tsien. 1998. Cell-permeant caged InsP₃ ester shows that Ca²⁺ spike frequency can optimize gene expression. *Nature*. 392:936-41.
- Liao, Y., C. Erxleben, E. Yildirim, J. Abramowitz, D.L. Armstrong, and L. Birnbaumer. 2007. Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:4682-7.
- Lin, H., J.C. Rathmell, G.S. Gray, C.B. Thompson, J.M. Leiden, and M.L. Alegre. 1998. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4) blockade accelerates the acute rejection of cardiac allografts in CD28-deficient mice: CTLA4 can function independently of CD28. *J Exp Med*. 188:199-204.
- Linsley, P.S., J.L. Greene, W. Brady, J. Bajorath, J.A. Ledbetter, and R. Peach. 1994. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity*. 1:793-801.
- Linsley, P.S., J.L. Greene, P. Tan, J. Bradshaw, J.A. Ledbetter, C. Anasetti, and N.K. Damle. 1992. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med*. 176:1595-604.
- Liou, J., M.L. Kim, W. Do Heo, J.T. Jones, J.W. Myers, J.E. Ferrell, Jr., and T. Meyer. 2005. STIM Is a Ca²⁺ Sensor Essential for Ca²⁺-Store-Depletion-Triggered Ca²⁺ Influx. *Curr Biol*. 15:1235-41.
- Lioudyno, M.I., J.A. Kozak, A. Penna, O. Safrina, S.L. Zhang, D. Sen, J. Roos, K.A. Stauderman, and M.D. Cahalan. 2008. Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:2011-6.
- Lis, A., C. Peinelt, A. Beck, S. Parvez, M. Monteilh-Zoller, A. Fleig, and R. Penner. 2007. CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties. *Curr Biol*. 17:794-800.

- Lopez, J.J., G.M. Salido, J.A. Pariente, and J.A. Rosado. 2006. Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *J Biol Chem.* 281:28254-64.
- Maker, A.V., P. Attia, and S.A. Rosenberg. 2005. Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade. *J Immunol.* 175:7746-54.
- Maker, A.V., J.C. Yang, R.M. Sherry, S.L. Topalian, U.S. Kammula, R.E. Royal, M. Hughes, M.J. Yellin, L.R. Haworth, C. Levy, T. Allen, S.A. Mavroukakis, P. Attia, and S.A. Rosenberg. 2006. Inpatient dose escalation of anti-CTLA-4 antibody in patients with metastatic melanoma. *J Immunother (1997).* 29:455-63.
- Manzotti, C.N., M.K. Liu, F. Burke, L. Dussably, Y. Zheng, and D.M. Sansom. 2006. Integration of CD28 and CTLA-4 function results in differential responses of T cells to CD80 and CD86. *Eur J Immunol.* 36:1413-1422.
- Manzotti, C.N., H. Tipping, L.C. Perry, K.I. Mead, P.J. Blair, Y. Zheng, and D.M. Sansom. 2002. Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25⁺ regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 32:2888-96.
- Masteller, E.L., E. Chuang, A.C. Mullen, S.L. Reiner, and C.B. Thompson. 2000. Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. *J Immunol.* 164:5319-27.
- Mendes, C.C., D.A. Gomes, M. Thompson, N.C. Souto, T.S. Goes, A.M. Goes, M.A. Rodrigues, M.V. Gomez, M.H. Nathanson, and M.F. Leite. 2005. The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor preferentially transmits apoptotic Ca²⁺ signals into mitochondria. *J Biol Chem.* 280:40892-900.
- Mercer, J.C., W.I. Dehaven, J.T. Smyth, B. Wedel, R.R. Boyles, G.S. Bird, and J.W. Putney, Jr. 2006. Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *J Biol Chem.* 281:24979-90.
- Michaely, P., and V. Bennett. 1993. The membrane-binding domain of ankyrin contains four independently folded subdomains, each comprised of six ankyrin repeats. *J Biol Chem.* 268:22703-9.
- Minagawa, N., E.A. Kruglov, J.A. Dranoff, M.E. Robert, G.J. Gores, and M.H. Nathanson. 2005. The anti-apoptotic protein Mcl-1 inhibits mitochondrial Ca²⁺ signals. *J Biol Chem.* 280:33637-44.
- Monks, C.R., B.A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, and A. Kupfer. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature.* 395:82-6.
- Montell, C., L. Birnbaumer, and V. Flockerzi. 2002. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell.* 108:595-8.

- Montell, C., and G.M. Rubin. 1989. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*. 2:1313-23.
- Norcross, M.A. 1984. A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann Immunol (Paris)*. 135D:113-34.
- Ong, H.L., K.T. Cheng, X. Liu, B.C. Bandyopadhyay, B.C. Paria, J. Soboloff, B. Pani, Y. Gwack, S. Srikanth, B.B. Singh, D. Gill, and I.S. Ambudkar. 2007. Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components. *J Biol Chem*. 282:9105-16.
- Oritani, K., and P.W. Kincade. 1996. Identification of stromal cell products that interact with pre-B cells. *J Cell Biol*. 134:771-82.
- Parekh, A.B., and J.W. Putney, Jr. 2005. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*. 85:757-810.
- Partiseti, M., F. Le Deist, C. Hivroz, A. Fischer, H. Korn, and D. Choquet. 1994. The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency. *J Biol Chem*. 269:32327-35.
- Parvez, S., A. Beck, C. Peinelt, J. Soboloff, A. Lis, M. Monteilh-Zoller, D.L. Gill, A. Fleig, and R. Penner. 2007. STIM2 protein mediates distinct store-dependent and store-independent modes of CRAC channel activation. *Faseb J*.
- Paul, W.E., M. Brown, P. Hornbeck, J. Mizuguchi, J. Ohara, E. Rabin, C. Snapper, and W. Tsang. 1987. Regulation of B-lymphocyte activation, proliferation, and differentiation. *Ann N Y Acad Sci*. 505:82-9.
- Peinelt, C., M. Vig, D.L. Koomoa, A. Beck, M.J. Nadler, M. Koblan-Huberson, A. Lis, A. Fleig, R. Penner, and J.P. Kinet. 2006. Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol*. 8:771-3.
- Pentcheva-Hoang, T., J.G. Egen, K. Wojnoonski, and J.P. Allison. 2004. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity*. 21:401-13.
- Perkins, D., Z. Wang, C. Donovan, H. He, D. Mark, G. Guan, Y. Wang, T. Walunas, J. Bluestone, J. Listman, and P.W. Finn. 1996. Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation. *J Immunol*. 156:4154-9.
- Phan, G.Q., J.C. Yang, R.M. Sherry, P. Hwu, S.L. Topalian, D.J. Schwartzentruber, N.P. Restifo, L.R. Haworth, C.A. Seipp, L.J. Freezer, K.E. Morton, S.A. Mavroukakis, P.H. Duray, S.M. Steinberg, J.P. Allison, T.A. Davis, and S.A. Rosenberg. 2003. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:8372-7.

- Philipp, S., B. Strauss, D. Hirnet, U. Wissenbach, L. Mery, V. Flockerzi, and M. Hoth. 2003. TRPC3 mediates T-cell receptor-dependent calcium entry in human T-lymphocytes. *J Biol Chem.* 278:26629-38.
- Prakriya, M., S. Feske, Y. Gwack, S. Srikanth, A. Rao, and P.G. Hogan. 2006. Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature.*
- Prakriya, M., and R.S. Lewis. 2002. Separation and characterization of currents through store-operated CRAC channels and Mg²⁺-inhibited cation (MIC) channels. *J Gen Physiol.* 119:487-507.
- Putney, J.W., Jr. 1990. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium.* 11:611-24.
- Putney, J.W., Jr. 2004. The enigmatic TRPCs: multifunctional cation channels. *Trends Cell Biol.* 14:282-6.
- Quintana, A., E.C. Schwarz, C. Schwindling, P. Lipp, L. Kaestner, and M. Hoth. 2006. Sustained activity of calcium release-activated calcium channels requires translocation of mitochondria to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 281:40302-9.
- Quintana, A., C. Schwindling, A.S. Wenning, U. Becherer, J. Rettig, E.C. Schwarz, and M. Hoth. 2007. T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:14418-23.
- Robinson, M.R., C.C. Chan, J.C. Yang, B.I. Rubin, G.J. Gracia, H.N. Sen, K.G. Csaky, and S.A. Rosenberg. 2004. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma: a new cause of uveitis. *J Immunother (1997).* 27:478-9.
- Rodrigues, M.A., D.A. Gomes, M.F. Leite, W. Grant, L. Zhang, W. Lam, Y.C. Cheng, A.M. Bennett, and M.H. Nathanson. 2007. Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *J Biol Chem.* 282:17061-8.
- Roos, J., P.J. Digregorio, A.V. Yeromin, K. Ohlsen, M. Lioudyno, S. Zhang, O. Safrina, J.A. Kozak, S.L. Wagner, M.D. Cahalan, G. Velicelebi, and K.A. Stauderman. 2005. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol.* 169:435-45.
- Samelson, L.E. 2002. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu Rev Immunol.* 20:371-94.
- Schlossman, S., L. Bloumsell, et al. eds (1995). Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. Oxford University Press. New York.
- Schwartz, J.C., X. Zhang, S.G. Nathanson, and S.C. Almo. 2002. Structural mechanisms of costimulation. *Nat Immunol.* 3:427-34.

- Schwarz, E.C., C. Kummerow, A.S. Wenning, K. Wagner, A. Sappok, K. Waggerhauser, D. Griesemer, B. Strauss, M.J. Wolfs, A. Quintana, and M. Hoth. 2007a. Calcium dependence of T cell proliferation following focal stimulation. *Eur J Immunol.* 37:2723-33.
- Schwarz, E.C., M.J. Wolfs, S. Tonner, A.S. Wenning, A. Quintana, D. Griesemer, and M. Hoth. 2007b. TRP channels in lymphocytes. *Handb Exp Pharmacol*:445-56.
- Shiratori, T., S. Miyatake, H. Ohno, C. Nakaseko, K. Isono, J.S. Bonifacino, and T. Saito. 1997. Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Immunity.* 6:583-9.
- Sloan-Lancaster, J., J. Presley, J. Ellenberg, T. Yamazaki, J. Lippincott-Schwartz, and L.E. Samelson. 1998. ZAP-70 association with T cell receptor zeta (TCRzeta): fluorescence imaging of dynamic changes upon cellular stimulation. *J Cell Biol.* 143:613-24.
- Sloan-Lancaster, J., W. Zhang, J. Presley, B.L. Williams, R.T. Abraham, J. Lippincott-Schwartz, and L.E. Samelson. 1997. Regulation of ZAP-70 intracellular localization: visualization with the green fluorescent protein. *J Exp Med.* 186:1713-24.
- Soboloff, J., M.A. Spassova, T. Hewavitharana, L.P. He, W. Xu, L.S. Johnstone, M.A. Dziadek, and D.L. Gill. 2006a. STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca²⁺ Entry. *Curr Biol.* 16:1465-70.
- Soboloff, J., M.A. Spassova, X.D. Tang, T. Hewavitharana, W. Xu, and D.L. Gill. 2006b. Orai1 and STIM Reconstitute Store-operated Calcium Channel Function. *J Biol Chem.* 281:20661-5.
- Spassova, M.A., J. Soboloff, L.P. He, W. Xu, M.A. Dziadek, and D.L. Gill. 2006. STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca(2+) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:4040-5.
- Sperling, A.I., J.R. Sedy, N. Manjunath, A. Kupfer, B. Ardman, and J.K. Burkhardt. 1998. TCR signaling induces selective exclusion of CD43 from the T cell-antigen-presenting cell contact site. *J Immunol.* 161:6459-62.
- Spiegel, S., S. Kassis, M. Wilchek, and P.H. Fishman. 1984. Direct visualization of redistribution and capping of fluorescent gangliosides on lymphocytes. *J Cell Biol.* 99:1575-81.
- Straus, D.B., and A. Weiss. 1992. Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell.* 70:585-93.
- Thebault, S., A. Zholos, A. Enfissi, C. Slomianny, E. Dewailly, M. Roudbaraki, J. Parys, and N. Prevarskaya. 2005. Receptor-operated Ca²⁺ entry mediated by TRPC3/TRPC6 proteins in rat prostate smooth muscle (PS1) cell line. *J Cell Physiol.* 204:320-8.

- Thistlethwaite, J.R., Jr., A.O. Gaber, B.W. Haag, A.J. Aronson, C.E. Broelsch, J.K. Stuart, and F.P. Stuart. 1987. OKT3 treatment of steroid-resistant renal allograft rejection. *Transplantation*. 43:176-84.
- van der Merwe, P.A., D.L. Bodian, S. Daenke, P. Linsley, and S.J. Davis. 1997. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med*. 185:393-403.
- van Spriël, A.B., H.H. van Ojik, and J.G. van De Winkel. 2000. Immunotherapeutic perspective for bispecific antibodies. *Immunol Today*. 21:391-7.
- Vazquez, G., J.P. Lievreumont, J.B.G. St, and J.W. Putney, Jr. 2001. Human Trp3 forms both inositol trisphosphate receptor-dependent and receptor-independent store-operated cation channels in DT40 avian B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:11777-82.
- Vazquez, G., B.J. Wedel, M. Trebak, G. St John Bird, and J.W. Putney, Jr. 2003. Expression level of the canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channel determines its mechanism of activation. *J Biol Chem*. 278:21649-54.
- Vig, M., A. Beck, J.M. Billingsley, A. Lis, S. Parvez, C. Peinelt, D.L. Koomoa, J. Soboloff, D.L. Gill, A. Fleig, J.P. Kinet, and R. Penner. 2006a. CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr Biol*. 16:2073-9.
- Vig, M., C. Peinelt, A. Beck, D.L. Koomoa, D. Rabah, M. Koblan-Huberson, S. Kraft, H. Turner, A. Fleig, R. Penner, and J.P. Kinet. 2006b. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science*. 312:1220-3.
- Viola, A., and A. Lanzavecchia. 1996. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science*. 273:104-6.
- Viola, A., S. Schroeder, Y. Sakakibara, and A. Lanzavecchia. 1999. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science*. 283:680-2.
- Wissenbach, U., B.A. Niemeyer, and V. Flockerzi. 2004. TRP channels as potential drug targets. *Biol Cell*. 96:47-54.
- Wu, M.M., J. Buchanan, R.M. Luik, and R.S. Lewis. 2006. Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol*. 174:803-13.
- Wu, X., G. Babnigg, and M.L. Villereal. 2000. Functional significance of human trp1 and trp3 in store-operated Ca(2+) entry in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 278:C526-36.
- Wu, X., T.K. Zagranichnaya, G.T. Gurda, E.M. Eves, and M.L. Villereal. 2004. A TRPC1/TRPC3-mediated increase in store-operated calcium entry is required for differentiation of H19-7 hippocampal neuronal cells. *J Biol Chem*. 279:43392-402.

- Yeromin, A.V., S.L. Zhang, W. Jiang, Y. Yu, O. Safrina, and M.D. Cahalan. 2006. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature*.
- Yuan, J.P., W. Zeng, G.N. Huang, P.F. Worley, and S. Muallem. 2007. STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol.* 9:636-45.
- Zagranichnaya, T.K., X. Wu, and M.L. Villereal. 2005. Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins combine to form native store-operated channels in HEK-293 cells. *J Biol Chem.* 280:29559-69.
- Zhang, S.L., A.V. Yeromin, X.H. Zhang, Y. Yu, O. Safrina, A. Penna, J. Roos, K.A. Stauderman, and M.D. Cahalan. 2006. Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:9357-62.
- Zhang, S.L., Y. Yu, J. Roos, J.A. Kozak, T.J. Deerinck, M.H. Ellisman, K.A. Stauderman, and M.D. Cahalan. 2005. STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature.* 437:902-5.
- Zhang, Y., and J.P. Allison. 1997. Interaction of CTLA-4 with AP50, a clathrin-coated pit adaptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:9273-8.
- Zheng, Y., C.N. Manzotti, M. Liu, F. Burke, K.I. Mead, and D.M. Sansom. 2004. CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J Immunol.* 172:2778-84.
- Zitt, C., B. Strauss, E.C. Schwarz, N. Spaeth, G. Rast, A. Hatzelmann, and M. Hoth. 2004. Potent inhibition of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2. *J Biol Chem.* 279:12427-37.
- Zweifach, A., and R.S. Lewis. 1993. Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:6295-9.

7 Anhang

7.1 Unbedenklichkeitserklärung der Ethikkommission

In dieser Arbeit wurden Leukozyten-Reduktions-Filter von Vollblutspendern zur Aufreinigung der T-Zellen weiterverwendet. Dieses Vorgehen wurde von der Ethikkommission begutachtet und gestattet (Unbedenklichkeitserklärung vom 05. 04. 2005, Kenn-Nummer: Prof. Schie/Gn, Projektfinanzierung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 530, Projekt A3)).

7.2 Veröffentlichungen

Schwarz, E.C., **M.J. Wolfs**, S. Tonner, A.S. Wenning, A. Quintana, D. Griesemer, and M. Hoth. TRP channels in lymphocytes. *Handb Exp Pharmacol.* 2007;(179):445-56.

Schwarz EC, Kummerow C, Wenning AS, Wagner K, Sappok A, Waggerhauser K, Griesemer D, Strauß B, **Wolfs MJ**, Quintana A, Hoth M. Calcium dependence of T cell proliferation following focal stimulation. *Eur J Immunol.* 2007 Oct;37(10):2723-2733.

Wolfs M-J, Thiel M, Bauer S, Wenning A, Wadle A, Schwarz EC, Scott AM, Renner C & Hoth M. T-cell co-stimulation by CD80 or CD86 induces distinct calcium signals. (in Vorbereitung).

Schwarz EC, **Wolfs M-J**, Wenning AS, Strauß B & Hoth M. Endogenous TRP channels in primary human T-cells. (in Vorbereitung).

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Markus Hoth danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Themas und die Übernahme des Erstgutachtens. Ich habe mich die ganzen Jahre in seiner Arbeitsgruppe sehr wohl gefühlt.

Herrn Prof. Dr. Montenarh danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Dem Graduiertenkolleg „Zelluläre Regulation und Wachstum“ möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken und für die Möglichkeit nationale und internationale Kongresse zu besuchen. Bei Herrn Prof. Dr. Montenarh und besonders auch bei Frau Buchholz möchte ich mich für die gute Betreuung in dieser Zeit bedanken.

Prof. Dr. Renner danke für die Bereitstellung der CD33 exprimierenden CHO-Zellen und die Fusionsproteine. Weiterhin danke ich ihm und Markus Thiel für die gute Zusammenarbeit.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich Frau Dr. Eva Schwarz aussprechen. Ohne ihre Betreuung, ihr großes Interesse und ihrer Freude an der Forschung wären die letzten Jahre weniger schön gewesen. Ich möchte mich auch dafür bedanken, dass sie immer ein offenes Ohr hatte, auch wenn es mal nicht um die neusten Ergebnisse und Experimente ging. Sie hat sehr viel dazu beigetragen, dass ich jeden Tag gerne ins Labor gekommen bin.

Bettina Strauß und Anja Ludes möchte ich für ihre Unterstützung danken und dafür, dass sie das Labor nie im Chaos haben versinken lassen ;-)! Frau Strauß möchte ich zudem für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Immunfluoreszenzen danken.

Bin Qu möchte ich für ihre Hilfe am konfokalen Mikroskop danken.

Ich möchte mich auch bei all meinen anderen Kollegen für die letzten Jahre danken. Ich bin mir sicher, dass ich in meinem Leben noch oft mit Freude an die gemeinsame Zeit zurück denken werde.

Der größte Dank gebührt meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, meinen beiden Schwestern und meinen Großmüttern! Ihre Liebe und ihr Glaube an mich, auch in den Zeiten, in denen ich nicht immer weiter wusste, haben mich bis hierhin gebracht. Es ist ein großes Geschenk solche Menschen um sich zu wissen.

Marc Schwer danke ich für seine Unterstützung und für seine Liebe.

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, April 2008