

1 Zusammenfassung	04
1.1 Zusammenfassung.....	04
1.2 Summary.....	05
2 Einleitung	07
2.1 Das Immunsystem.....	07
2.1.1 Die angeborene Immunantwort.....	07
2.1.2 Die spezifische Immunantwort.....	08
2.1.3 Makrophagen.....	09
2.1.4 T-Lymphozyten.....	10
2.1.5 T-Zell-Aktivierung.....	11
2.1.5.1 Aktivierung des CRAC-Kanals.....	12
2.1.5.2 STIM.....	13
2.1.5.3 Orai.....	13
2.1.6 Killing-Mechanismus von CD8 ⁺ -Effektor-T-Zellen.....	14
2.2 Redox-Status der Zelle.....	15
2.2.1 Redoxreaktionen.....	16
2.2.2 Redox-regulierte Zellfunktionen.....	17
2.2.3 Redox-Systeme der Zelle.....	19
2.2.3.1 Superoxiddismutase.....	20
2.2.3.2 Katalase.....	20
2.2.3.3 Glutathion.....	22
2.3 Reaktive Sauerstoffspezies.....	24
2.3.1 Die verschiedenen Arten von ROS.....	24
2.3.2 NAD(P)H Oxidasen.....	25
2.3.2.1 NOX2.....	25
2.3.3 ROS in Signalkaskaden.....	27
2.3.4.1 ROS und Calcium.....	27
2.3.4.2 ROS und Transkriptionsfaktoren.....	28

3 Material und Methoden	30
3.1 Materialien.....	30
3.1.1 Chemikalien.....	30
3.1.2 Medien und Lösungen.....	31
3.1.3 Antikörper.....	32
3.1.4 Geräte und Platten.....	33
3.2 Kultur der verwendeten Zelllinien.....	33
3.3 Isolation von humanen, peripheren Blutmonozyten.....	34
3.4 Isolation von CD4 ⁺ bzw. CD8 ⁺ naiven T-Zellen.....	35
3.5 Stimulation von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ naiven T-Zellen.....	35
3.6 Detektion von Wasserstoffperoxid.....	36
3.7 Messung der Glutathion-Levels.....	36
3.7.1 Vorbereitung der naiven und Effektor-T-zellen.....	36
3.7.2 Bestimmung des Gesamtglutathions mit Monochlorobimane (MCB).....	37
3.7.3 Glutathionbestimmung mit o-Pthaldehyde.....	38
3.8 Messung der Katalase Aktivität in CD4 ⁺ T-Zellen.....	38
3.9 Killingassays.....	39
3.9.1 CD33-Färbung der CHO-Zellen.....	39
3.9.2 CHO/T-Zell Verbindung mittels Fusionsprotein.....	40
3.9.3 Vorbereitung der CHO- und T-Zellen.....	40
3.9.4 Durchführung.....	41
3.9.5 Kontrollexperimente.....	41
4 Ergebnisse	42
4.1 ROS Messung in T-Zell/Makrophagen Populationen mit DCF.....	42
4.1.1 Stimulation von Makrophagen mit PMA.....	42
4.1.2 Konzentrationsbestimmung von ROS in T-Zellen und Makrophagen.....	42
4.2 Wirkungen von ROS auf den Calciumhaushalt von CD4 ⁺ -T-Zellen.....	44
4.2.1 Aktivierung von Kationenströmen via TRPM2.....	45
4.2.2 Hemmung der CRAC-Kanäle.....	46
4.2.3 Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher.....	47
4.2.4 Unterschiede zwischen CD4 ⁺ naiven und Effektor-T-Zellen.....	48
4.3 Vergleich des Reduktionspotentials von CD4 ⁺ naiven und Effektor-T-Zelle.....	50

4.3.1 Glutathion.....	50
4.3.2 Katalase.....	52
4.4 Wirkungen von ROS auf die zytotoxische Aktivität von CD8 ⁺ -T-Zellen.....	53
4.4.1 Kontrolleexperimente mit CD8 ⁺ -T-Zellen und CHO-Zellen.....	54
4.4.2 „Killing-Effektivität“ in Abhängigkeit der H ₂ O ₂ -Konzentration.....	55
5 Diskussion.....	57
5.1 ROS Produktion in Makrophagen und T-Zellen.....	57
5.1.1 Probleme der Messung von ROS.....	58
5.2 ROS und Calcium.....	59
5.3 Die Dualität von naiven und Effektor-T-Zellen.....	61
5.3.1 Glutathion und Reduktionspotentiale.....	61
5.3.2 Wirkungen von ROS im Immunsystem.....	66
5.4 ROS und T-Zell vermitteltes Killing.....	67
5.5 Ausblick.....	68
Literaturverzeichnis.....	70
Verzeichnis der Abkürzungen.....	77
Anhang.....	80

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

T-Zellen übernehmen im menschlichen Immunsystem wichtige regulatorische Funktionen. Als Vermittler zwischen humoraler und zellulärer Immunabwehr sind sie unabdingbarer Bestandteil der adaptiven Immunantwort. Dabei haben $CD4^+$ T-Zellen neben der Bildung von Zytokinen die Aufgabe, durch Interaktion mit B-Lymphozyten die Antikörperproduktion anzuregen. Die Antigenpräsentation und die Ausbildung der immunologischen Synapse führt zu einer T-Zell-Rezeptor vermittelten Signalkaskade, in deren Folge sich CRAC (Calcium released-activated Calcium) -Kanäle öffnen. Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ist eine notwendige Voraussetzung für die Aktivierung der T-Zelle. Im Verlauf der T-Zellaktivierung, werden Transkriptionsfaktoren vermehrt exprimiert und damit die Immunantwort induziert.

$CD8^+$ T-Zellen nehmen eine andere Aufgabe im Immunsystem wahr. Sie verfügen über sekretorische Vesikel, welche nach Ausschüttung zytotoxisch auf ihre Zielzellen wirken. Deshalb werden sie auch als zytotoxische T-Lymphozyten oder T-Killerzellen bezeichnet.

Makrophagen sind als Teil der zellulären Immunantwort in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu bilden. Die Effekte von ROS sind vielfältig. Neben der bakteriziden Wirkung wird ROS über die letzten Jahre immer mehr als „second messenger“ verstanden, welcher die Fähigkeit hat intrazelluläre Signalkaskaden zu beeinflussen.

Im ersten Teil der vorliegenden Dissertation wurde die Hypothese untersucht, ob das von Makrophagen gebildete ROS von T-Zellen aufgenommen wird und wie ROS den Calciumhaushalt der T-Zellen beeinflusst. Schwerpunkt wurde dabei auf die Unterschiede zwischen naiven und Effektor-T-Zellen gelegt. Aus den Experimenten mit gemischten Makrophagen/T-Zell Populationen ergab sich ein signifikanter Anstieg von ROS in T-Zellen nach vorhergegangener Stimulation der Makrophagen. Weiterhin war die Beeinflussung des Calciumhaushaltes auf verschiedenen Wegen durch ROS feststellbar, wobei sich die intrazelluläre Calciumkonzentration der T-Effektorzellen wesentlich unempfindlicher gegen H_2O_2 (Wasserstoffperoxid) zeigte, als die von naiven T-Zellen. Der Grund hierfür wurde in einer gesteigerten zytosolischen Glutathion-Konzentrationen bzw. der erhöhten enzymatischen Katalase-Aktivität gefunden. Dieses Resultat kann dahingehend interpretiert werden, dass die Effektor-T-Zellen besser vor oxidativen Angriffen geschützt sind als naive

T-Zellen. Aus physiologischer Sicht könnte ROS daher eine Selektion fördern, welche die Effizienz des Immunsystems steigert.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit widmet sich der Frage, ob CD8⁺ T-Zellen funktionell ebenfalls von ROS beeinflusst werden können. Dafür wurden Killing-Experimente mit CHO-Zellen durchgeführt. Gemessen wurde der Anteil überlebender CHO-Zellen in Abhängigkeit der zugeführten Menge Wasserstoffperoxid. Als Resultat ergab sich hier ein für bestimmte Konzentrationen nachweisbarer Effekt, der die zytolytische Wirkung des Systems begünstigt, allerdings schwer interpretierbar ist.

ROS haben in den letzten Jahren ein beträchtliches wissenschaftliches Interesse geweckt und erwiesen sich als überaus vielfältig im Wirkungsspektrum. Zukünftig werden zahlreiche Fragestellungen bezüglich Calciumsignalen und Kaskaden allgemein hinsichtlich ihres Redox-Charakters untersucht werden. Mit den vorliegenden Ergebnissen war es möglich zumindest Teilaspekte dessen aufzuklären und Interpretationen für physiologische Modelle zu entwickeln.

1.2 Summary

T-cells have an important regulatory function in the human immune system. As mediators between cellular and humoral factors in immune defense, they are elementary part of the adaptive immune response. Antigen presenting cells present antigen peptides to T-cell receptors (TCR), forming an immunological synapse. TCR engagement induces a signalling cascade, which leads to activation of Calcium release-activated calcium channels (CRAC) and subsequent increase of intracellular Ca²⁺ concentration [Ca²⁺], necessary for Th-cell activation. Once activated, T-cells proliferate and differentiate into effector Th-cells, migrate to the site of inflammation, produce cytokines and help locally infiltrated B-cells and macrophages to generate antibodies and eliminate pathogens.

In contrast to Th-cells, cytotoxic CD8⁺ T killer cells (CTL) directly eliminate pathogen engulfing (target) cells. They contain secretory vesicles with cytotoxic granules in order to kill their target-cells by distribution.

Macrophages are part of the cellular immune system and have the possibility to create reactive oxygen species (ROS). The effects of ROS are manifold. Next to its bactericidal force it became obvious to be a sort of “second messenger”, that is able to modulate cellular signal cascades.

In the first part of this study we tested if T-cells are affected by ROS produced by macrophages and how this ROS affect T-cell Ca²⁺ signalling. To determine if stimulated

THP-1 monocytes (MC) may affect Jurkat T-cells in the vicinity, we used the redox-sensitive dye H₂-DCFDA (DCF) and found that MC can produce high levels of H₂O₂ and induce an increase in the H₂O₂ concentration within the neighboring T-cells. Next we analysed the effects of ROS in primary T-cells. We found that H₂O₂ in a dose dependent manner affects several Ca²⁺ signalling pathways in Th-cells and that the non-activated (naive) Th-cells are much more susceptible to oxidation than the effector Th-cells. To determine the mechanism responsible for this difference we measured the expression of cellular antioxidants.

Both, measurements of cytosolic glutathione concentration and catalase activity showed upregulation in effector Th-cells compared to naive. Data thus obtained give evidence that effector Th-cells are better protected against oxidative stress than naive T-cells. From the physiological point of view this could mean that ROS are able to regulate cell selection and thereby improve the efficiency of the immune response.

In the second part of this work we tried to determine if CTL function is also redox regulated. For that purpose we performed so-called "killing essays" using antigen presenting CHO-cells. Although the interpretation is difficult, we found that certain concentrations of H₂O₂ enhance the cytolytic effect of CTLs.

2 Einleitung

2.1 Das Immunsystem, ein kurzer Überblick

Das menschliche Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk, bestehend aus verschiedenen Organen, Zelltypen und Molekülen, welche in ihrer Gesamtheit dazu dienen, die physische Unversehrtheit des Organismus zu gewährleisten. Dabei stellt die Abwehr von Umwelteinflüssen in Form von Mikroorganismen, wie zum Beispiel Bakterien, Viren, Pilze, einzellige (z.B. Protozoen wie Plasmodien) oder mehrzellige Parasiten (z.B. Bandwürmer) die Hauptaufgabe für das Immunsystem dar. Aber auch an der Zerstörung körpereigener, entarteter Zellen ist das Immunsystem maßgeblich beteiligt.

Um der Vielfalt der Erreger von Krankheiten gerecht werden zu können, bedient sich der menschliche Körper zweier verschiedener Abwehrsysteme, der angeborenen (unspezifischen) Abwehr beziehungsweise der erworbenen (adaptiven) Immunantwort.

2.1.1 Die angeborene Immunantwort

Die Komponenten der unspezifischen Abwehr sind neben den natürlichen Barrieren des Körpers (Epithelien, Säureschutzmantel der Haut, Magensäure) und dem Komplementsystem auch Zellen, welche in der Lage sind, Keime zu erkennen und zu bekämpfen, ohne vorher schon einmal mit ihnen in Kontakt getreten zu sein. Zelluläre Vertreter der angeborenen Immunantwort sind unter anderem Makrophagen, Granulozyten und natürliche Killerzellen. Für die Erkennung körperfremder Organismen spielt das sogenannte MHC-Molekül Klasse I (major histocompatibility complex), welches Membranbestandteil jeder kernhaltigen Zelle des Körpers ist, eine entscheidende Rolle. Es ist gewissermaßen als „Ausweis“ zu verstehen, um körpereigene von schädlichen Strukturen zu unterscheiden, wenn es fehlt oder fehlerhaft ist, wird eine Immunantwort induziert. Des Weiteren gibt es humorale Faktoren, wie zum Beispiel Interleukine, die Entzündungsreaktionen hervorrufen können, aber auch für die Kommunikation der Immunzellen untereinander unabdingbar sind. Die Vernichtung der eingedrungen Fremdstoffen (Antigene) erfolgt dann zumeist über Zellyse durch verschiedene chemisch wirksame Substanzen (Komplementsystem, Lysozym) und Phagozytose (Makrophagen).

2.1.2 Die spezifische Immunantwort

Bei der spezifischen Immunantwort ist der Schutz vor einem Antigen erworben. Die drei wichtigsten Eigenschaften der adaptiven Immunantwort sind die Spezifität, das Gedächtnis und die Diversität. Wird zum wiederholten Mal ein „bekanntes“ Antigen im Körper detektiert, erfolgt die Immunantwort aus dem immunologischen Gedächtnis mit großer Schnelligkeit und spezifisch. Die immense Vielfältigkeit der adaptiven Immunantwort ergibt sich aus dem Zusammenspiel verschiedener Zelltypen und humoraler Faktoren, den Antikörpern. Hervorzuheben ist hier die Kooperation von antigenpräsentierenden Zellen (APC; Makrophagen, dendritische Zellen, B-Lymphozyten) mit T-Helfer Zellen, die im weiteren Verlauf mit B-Lymphozyten interagieren und diese bei der Differentiation zu Plasmazellen unterstützen, welche für die Antikörperbildung verantwortlich sind. Die Funktion der Antikörper besteht dann darin, Antigene zu binden und somit für andere Zellen des Immunsystems zu opsonieren. Dabei hat jeder Antikörper eine einzige antigene Determinante (Epitop). Die enorme Vielfalt der Epitope wird durch unterschiedlich Kombination von leichten und schweren Proteinketten beziehungsweise durch genetisches Rearrangement erreicht. Nach dem ersten Kontakt mit dem Antigen verbleiben ruhende B- und T-Lymphozyten als Gedächtniszellen, die die immunologische Erinnerungsfähigkeit gewährleisten und damit ermöglichen, dass ein wiederholtes Auftreten des Antigens gezielt bekämpft werden kann.

Ähnlich wie die Antikörper sind auch Lymphozyten spezifisch für ein Antigen, was hier ebenfalls durch genetische Rekombination des B- bzw. T-Zell Rezeptors erreicht wird.

Es muss betont werden, dass zahlreiche Verbindungen zwischen den beiden Systemen, also adaptiver und unspezifischer Immunantwort bestehen, was erklärt, dass die Trennung mehr aus didaktischen Gesichtspunkten erfolgt. Die tatsächlichen immunologischen Vorgänge sind folglich immer als eine Überlappung der verschiedenen Strategien zu begreifen. Im Folgenden soll die Funktion und Interaktion von Makrophagen und T-Zellen genauer betrachtet werden.

2.1.3 Makrophagen

Makrophagen entstehen im Knochenmark aus Stammzellen der myeloischen Reihe. Mit Hilfe von Interleukin 4 (IL4) bilden sich Monoblasten, die im weiteren Verlauf durch IL3 und einen Wachstumsfaktor GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) zu Monozyten ausdifferenzieren. Diese wandern in die Blutgefäße und mit dem Blutstrom in die Peripherie, wo sie im Körper zirkulieren. Gelangen sie in Gebiete mit Entzündungen oder Infektionen, sind sie in der Lage, durch Diapedese vermehrt in das betroffene Gewebe einzudringen und dort als Gewebsmakrophagen ihre Wirkung zu entfalten. Voraussetzung dafür sind Entzündungsmediatoren (IL1, TNF α), auf die das Endothel jenes Areals mit der Bildung von Adhäsionsmolekülen reagiert, mit deren Hilfe eine ausreichende Leukozyten-Endothel-Interaktion ermöglicht wird. Nach Durchdringung der Gefäßwand bewegen sich die Makrophagen chemotaktisch gesteuert zum Ort des Geschehens. Die Hauptaufgabe der Makrophagen besteht in der Phagozytose von potentiell schädlichen Strukturen und Organismen. Dabei werden Moleküle wie etwa Glykoproteine auf der Oberfläche von Bakterien oder Viren erkannt, als körperfremd befunden und durch Pseudopodien in einem Prozess des aktiven „Umfließens“ (Phagosomenbildung) in den Phagen aufgenommen. Dieser Vorgang wird durch Antikörperbindung bzw. Anlagerung von Komplement an das Antigen enorm erleichtert. Anschließend verschmelzen diese Phagosomen mit den Lysosomen der phagozytierenden Zelle und es beginnt der Abbau der aufgenommenen Strukturen durch lysosomale Enzyme, wie Proteasen, Lipasen, Desoxyribonukleasen, etc. Sind die exogenen Moleküle verdaut, d.h. prozessiert und in kleine antigene Abschnitte (Epitope) zerlegt, werden diese an der Oberfläche der Phagenzellmembran mit Hilfe der MHC-Moleküle Klasse II präsentiert. Diese Präsentation dient nun der Interaktion mit T-Helfer Zellen, die den MHCII/Antigenpeptid-Komplex mit ihrem T-Zell-Rezeptor und dem CD4-Molekül (cluster of differentiation) erkennen können. Außerdem besitzen Makrophagen die Fähigkeit, reaktive Sauerstoffmetabolite (Wasserstoffperoxid, Peroxidationen, Hydroxylradikale) zu bilden („oxidative burst“), welche bei der Abtötung von Bakterien und Viren nützlich sind, aber auch ein breites Spektrum anderer Wirkungen aufweisen.

2.1.4 T-Zellen

Ebenso wie Makrophagen werden auch T-Zellen im Knochenmark gebildet. Die Vorläuferzelle ist in diesem Fall eine lymphatische Stammzelle, aus der ein Lymphoblast hervorgeht. Diese Lymphoblasten wandern anschließend in den Thymus, wo sie einer weiteren, durch Interleukine und Wachstumsfaktoren vermittelten Differentiation unterliegen. Dabei entstehen zwei funktionell unterschiedliche Haupttypen von T-Lymphozyten, die $CD4^+$ - und die $CD8^+$ -Zellen. CD4 und CD8 sind Oberflächenproteine der T-Zellen, welche mit den MHC-Molekülen der Klasse I und II interagieren. $CD8^+$ -T-Lymphozyten erkennen Antigensequenzen in Verbindung mit MHC Klasse I Molekülen. Sie sind besonders bei der Abwehr viraler Infekte beteiligt und werden aufgrund ihrer Fähigkeit, von Viren befallene Zellen zu töten auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Bindet eine zytotoxische T-Zelle an ein MHC I -Protein, das das passende Antigenepitop präsentiert, werden Perforine und Granzyme ausgeschüttet, die zum programmierten Zelltod (Apoptose) führen. In der Tumorbekämpfung, d.h. bei der Vernichtung entarteter körpereigener Zellen sind die $CD8^+$ -T-Lymphozyten ebenso von großer Bedeutung. Ein nicht gewünschter Effekt spiegelt sich auch in der Abstoßung von Transplantaten wieder.

Im Gegensatz zu $CD8^+$ -T-Zellen haben $CD4^+$ -T-Lymphozyten Aufgaben im Bereich der Immunregulation und der Kommunikation verschiedener Zellsysteme. Neben der Wechselwirkung mit antigenpräsentierenden Zellen (APCs) sekretieren sie stimulatorische Signalsubstanzen, die eine Aktivierung von weiteren Makrophagen, B-Lymphozyten und NK-Zellen (natural killer cells) zur Folge haben. Zur Signalverstärkung proliferieren die aktivierten $CD4^+$ -T-Lymphozyten monoklonal und regen über Wachstumsfaktoren sowohl sich selbst, als auch andere Zelltypen (B-Lymphozyten) weiter zur Proliferation an. Diese Funktion ist von entscheidender Bedeutung, da die B-Lymphozyten auf diesem Wege zu Antikörper bildenden Plasmazellen ausdifferenzieren, weswegen man die $CD4^+$ -T-Lymphozyten auch als T-Helfer-Zellen bezeichnet. Hierbei kooperiert das mit Antigen beladene MHCII-Protein der B-Zelle mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und stabilisierenden Proteinen des CD-Typs (CD4, CD3, CD28, etc.), was in seiner Gesamtheit die Aktivierung der T-Zelle initiiert. Diese produziert und sezerniert daraufhin zuvor erwähnte stimulierende und wachstumsfördernde Faktoren (z.B. IL4), welche die B-Zelle zur klonalen Expansion und Antikörperproduktion befähigen. Außerdem entwickeln sich einige $CD4^+$ -Zellen nach primärem Antigenkontakt zu T-Gedächtniszellen, um bei wiederholter Exposition mit effizienter Antikörperproduktion reagieren zu können.

2.1.5. Die T-Zellaktivierung

Wird die T-Helferzelle auf oben beschriebenem Weg durch Wechselwirkung mit einer antigenpräsentierenden Zelle aktiviert, spricht man von einer „fokalen Stimulation“. Die dabei entstehende immunologische Synapse (IS) ist der Bereich der Zell-Zell-Interaktion, welcher durch eine Zusammenlagerung von Signal und Adhäsionsmolekülen gebildet wird.[Grakoui et al.,1999] Diese Verbindung der beiden Zellen, in deren Mitte der TCR auf Seite der CD4⁺-Zelle und der MHCII-Antigen-Komplex auf Seite der APC liegen, hat zentrale Bedeutung für eine effiziente Immunantwort [Dustin,2002].

Der TCR setzt sich aus mehreren Bestandteilen zusammen. Das zentral liegende Heterodimer besteht aus α - und β -Ketten, die einen konstanten, in die Membran hineinragenden, verankernden Teil und einen variablen, für die Bindung und Erkennung von Antigenen wichtigen Teil besitzen. Mit dem variablen Teil sind Homodimere aus ζ -Ketten und einige andere Proteine assoziiert, die in ihrer Gesamtheit CD3 genannt werden. Weiterhin gibt es neben dem CD4-Corezeptor, welcher direkt mit dem MHCII-Molekül interagiert und für die Antigenerkennung nötig ist, einen das Signal verstärkenden Costimulator, CD28 [Leeuwen and Samelson,1999; Quian and Weiss,1997].

Bei Kontakt zwischen Antigen und TCR entsteht eine Phosphorylierungskaskade, die mit den ITAMs (immunreceptor tyrosin-based activation motifs), welche auf den CD3- und ζ -Ketten liegen, beginnt. Adapterproteine und eine Ras induzierte Kinasekaskade führen schließlich zur Aktivierung der Phospholipase C- γ (PLC- γ). Die aktivierte PLC- γ spaltet das in die Plasmamembran eingelagerte Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP₂) in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃), wobei im weiteren Verlauf DAG die Proteinkinase C aktiviert und IP₃ durch die Bindung an den IP₃-Rezeptor des Endoplasmatischen Retikulums (ER) die Entleerung des intrazellulären Calciumspeichers bewirkt [Mikoshiya,2007]. Die Erhöhung der zytosolischen Konzentration von freiem Calcium (Ca²⁺) ermöglicht die Öffnung des CRAC-Kanals (calcium release activated calcium). Er gehört in die Gruppe der speichergesteuerten Kanäle (SOCs, store-operated channels) und hat eine besonders hohe Ca²⁺ Selektivität. Wird der CRAC-Kanal geöffnet, nimmt die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration zu [Hoth and Penner,1992; Parekh,2006]. Die Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration ist ein Schlüsselsignal der T-Zellaktivierung. Im Zuge dessen wird Calcineurin aktiviert, das Calmodulin bindet und die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFAT (nuclear factor of activated T-cells) bedingt [Jain et al.,1992; Timmerman et al.,1996; Crabtree and Olson,2002]. 1991 gelang es Liu et al. zu zeigen, dass

die Inhibition dieses Schrittes (Hemmung von Calcineurin durch Cyclosporin A und FK506) eine schwere Immunsuppression hervorruft, was die fundamentale Wichtigkeit dieser Ca^{2+} -abhängigen Kaskade beweist. Der dephosphorylierte Transkriptionsfaktor NFAT wird nun in den Zellkern transloziert, wo die Assoziation mit einem weiteren Transkriptionsfaktor, dem AP-1 (activator protein - 1) stattfindet. Die Aktivierungskaskade kulminiert in der sich anschließenden Transkription des für die Immunantwort wichtigen Interleukin-2 (IL-2), welches bereits Sekunden oder wenige Minuten nach Aktivierung der T-Zelle produziert wird. IL-2 fungiert als Stimulus für die Proliferation weiterer T- und B-Zellen im Sinne einer positiven Rückkopplungsreaktion über den IL-2-Rezeptor. Zusätzlich werden neben NFAT auch andere Transkriptionsfaktoren wie NF κ B (nuclear factor- κ B), AP-1, SP1, CTF und Gal4 aktiviert [Li and Verma,2002]. Aufgrund der Produktion und Sekretion der Chemokine werden weitere Zellen rekrutiert und zur Beseitigung des Antigens eingesetzt. Diese Kaskade ist durch die Öffnung der CRAC-Kanäle limitiert. Sind die CRAC-Kanäle geschlossen, fällt die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration und die Produktion der Chemokine kommt zum Erliegen.

Der CRAC-Kanal ist durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus reguliert, was zur Folge hat, dass sich bei starker Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration der CRAC-Kanal schließt und der Ca^{2+} -Einstrom unterbricht [Hoth and Penner,1992]. Um das zu verhindern bewegen sich Mitochondrien auf die immunologische Synapse zu und puffern die Konzentrationserhöhung im Sinne einer Aufnahme von Ca^{2+} . [Quintana et al.,2007] Auf diese Weise kann insgesamt mehr Ca^{2+} aufgenommen werden. Gleichzeitig verzögern die Mitochondrien eine Rückkehr zur Ruhe- Ca^{2+} -Konzentration, da sie das aufgenommene Ca^{2+} langsam wieder ans Zytosol abgeben und so ein Plateau generieren, in dem die Ca^{2+} -Konzentration gleichmäßig erhöht bleibt [Hoth et al.,2000].

2.1.5.1 Aktivierung des CRAC-Kanals

Die molekulare Beschaffenheit und der genaue Aktivierungsmechanismus des CRAC-kanals wurden lange Zeit kontrovers diskutiert. Erst mit der Entdeckung von zwei Proteinen, STIM (stromal interaction molecule) und Orai, konnte die Aufklärung der molekularen Zusammensetzung und die des Aktivierungsmechanismus entscheidend vorangetrieben werden.

2.1.5.2 STIM

Das schon vor mehreren Jahren als Phosphoprotein bekannt gewordene STIM [Williams et al., 2001], konnte von Roos et al. 2005 als ein essentielles Aktivierungsmolekül des I_{CRACs} identifiziert werden. Mit einem 170 Gene, darunter TRP-Kanäle sowie sämtliche mit spannungsgesteuertem Ca^{2+} -Einstrom in Verbindung stehende Proteine, umfassenden siRNA-Screen in Drosophila S2-Zellen, konnte STIM als einziges für die Aktivierung des CRAC-Stroms unabdingbares Protein identifiziert werden. Eine parallel laufende Studie von Liou et al. erfasste 2034 Proteine und konnte zwei Säugetier-Homologe (STIM1 und STIM2) aufzeigen, deren Herunterregulation den Ca^{2+} -Einstrom senkte. Obwohl diese Experimente die wesentliche Rolle für den Ca^{2+} -Einstrom belegen, führte eine Überexpression nur zu geringer Steigerung des selbigen [Smyth et al., 2006; Peinelt et al., 2006]. Essentiell war die Feststellung, dass das Protein, welches über eine Transmembran-Domäne verfügt, sowohl im ER als auch in der Plasmamembran vorkommt, wobei der N-Terminus ins Lumen des ER beziehungsweise in den Extrazellularraum ragt. Der N-Terminus trägt ein als EF-Hand-Motif bezeichneten Teil, welcher ebenfalls 2005 von Roos et al. als Ca^{2+} -Sensor identifiziert werden konnte. Ferner verfügt STIM über „protein-protein interaction domains“, die eventuell eine Assoziation mit Teilen des CRAC-Kanals arrangieren.

Der momentan favorisierte Mechanismus, entwickelt von der Arbeitsgruppe um T. Meyer, stützt sich auf Versuche mit zusammengelagerten YFP- (yellow fluorescent protein) STIM1 Molekülen. Danach befinden sich STIM1-Moleküle im ER und akkumulieren nach Speicherentleerung als „punctae“ sehr nah an der Plasmamembran, werden dort aber nicht eingebaut, sondern interagieren, wie neueste Ergebnisse von Penna et al. nahe legen, direkt mit Teilen des CRAC-Kanals, nämlich dem Orai-Protein [Penna et al., 2008].

2.1.5.3 Orai

Der Stellenwert der Orai-Familie (wörtlich übersetzt: Wächter des Himmels) (Orai1, -2, -3) für die Genese des I_{CRACs} wurde 2006 von Feske et al. experimentell belegt, indem sie eine Linkage-Gen-Analyse an SCID-Patienten (severe combined immunodeficiency disorder) durchführten, von denen bekannt war, dass die Immundefizienz auf einem Mangel an I_{CRAC} in den T-Zellen der Patienten basiert. Es konnte eine Mutation in der Porenregion ausfindig gemacht werden, welche für den stark verminderten CRAC-Strom verantwortlich ist, überdies

fürte eine Transfektion der T-Zellen mit Wildtyp-Orai 1 zu einer vollständigen Regeneration des I_{CRAC} .

Die Aufklärung der Struktur hat gezeigt, dass alle Mitglieder der Orai-Familie Transmembranproteine sind, welche die Membran mit vier Transmembrandomänen durchspannen [Feske et al.,2006; Vig et al., 2006; Cahalan et al.,2007]. Die gleichzeitige Überexpression von Orai1, welches nur in der Plasmamembran zu finden ist, und STIM1 bewirkt eine immense Steigerung (50- bis 100-fach) des gemessenen I_{CRACs} [Peinelt et al., 2006; Zhang et al., 2006].

Interessanterweise resultiert ein ausschließliche Überexpression von Orai1 in einer Inhibition von I_{CRAC} , was darauf schließen lässt, dass Orai1 mit anderen Komponenten interagieren muss (STIM-Proteine). Die Begründung hierfür könnte sein, dass bei einem Überangebot an Orai1 die statistische Wahrscheinlichkeit für disfunktionale Komplexe in der Membran steigt.

Auch wenn das genaue Zusammenspiel und die exakten Funktionsmechanismen von STIM und Orai noch immer nicht vollständig geklärt sind, hat die Entdeckung der beiden Proteinfamilien die Forschung im Bereich der speichergesteuerten Ca^{2+} -Kanäle entscheidend voran gebracht. Nach wie vor gehören die den Ca^{2+} -Haushalt der T-Zelle regulierenden Prozesse zu den fundamentalen Gegenständen der immunologischen Forschung, da Ca^{2+} -Signale Kaskaden so zentraler Vorgänge wie Aktivierung, Proliferation und Apoptose der Lymphozyten ausschlaggebend regulieren.

2.1.6 Killing-Mechanismus von $CD8^+$ -Effektor-T-Zellen

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) zerstören viral infizierte und entartete, tumoröse Zellen durch einen Vorgang, bei dem speziell sekretorische Vesikel (lytische Granula) mit zytotoxischem Inhalt an der immunologischen Synapse ausgeschüttet werden. Diese hoch selektiven Interaktionen bedürfen in erster Linie eines engen Membran-Membran-Kontaktes, welcher zwischen dem MHC1-Komplex auf der Zielzelle und den T-Zell-Proteinen (TCR, CD8, CD28 und Lck) zustande kommt, aber auch Adhäsionsproteine wie ICAM1, LFA-1 und assoziiertes Talin einschließt [Stinchcombe und Griffiths, 2003]. In seiner Gesamtheit wird das als Adhäsionsring bezeichnet [Monk et al.,1998]. Während bei $CD4^+$ -T-Lymphozyten die Formation der IS bis zu einigen Stunden andauern kann, ist die synaptische Zell-Zell-Verbindung bei CTLs und deren Zielzellen eher von transientem Charakter. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich in der Verschiedenheit der Funktion der IS bei den beiden

Zelltypen zu suchen. So schlägt die Arbeitsgruppe um Griffiths als Erklärung vor, dass die IS beim „Killing-Prozess“ nicht die Weiterleitung von Signalen zur Hauptaufgabe hat, sondern vielmehr eine kontrollierte und direkte Tötung der Zielzelle erreicht werden soll [Stinchcombe et al.,2001; Vyas et al.,2002].

Der Kontakt mit der Zielzelle hat eine Umorganisation des Zytoskeletts der CTLs zur Folge. Dabei sammeln sich Zellorganellen wie Golgi-Apparat, Mitochondrien und die sekretorischen Lysosomen (SL) um das MTOC (microtubulus organisation center), welches sich anschließend in Richtung Plasmamembran des Zell-Zell-Kontaktes bewegt. Es ist nach wie vor strittig, wie genau der Mechanismus der Bewegung von MTOC und SLs zu erklären ist, allerdings scheint ein kleines GTP-bindendes Protein namens Rab27a involviert zu sein [Stinchcombe et al., 2001]. Sicher ist, dass die SLs entlang der Mikrotubuli, enzymatisch vermittelt von Motorproteinen wie Dynein und Kinesin, zur IS transportiert werden. Das „Andocken“ der Vesikel an die Plasmamembran findet direkt an der IS statt, welche dafür ein schmale Ausparung formt („cleft“), die innerhalb des Adhäsionsringes lokalisiert ist [Batista et al.,2001]. Die genaue Definition des Sekretionsortes hat große Vorteile, da durch die alleinige Exposition der Zielzelle die Nachbarzellen vor den zytotoxischen Substanzen geschützt werden und damit gleichzeitig an der Zielzelle eine möglichst hohe Konzentration der lytischen Stoffe verfügbar ist. Die sekretorischen Lysosomen beinhalten, wie oben bereits erwähnt, Perforine und eine spezifische Gruppe von Proteasen, die sogenannten Granzyme. Es wird angenommen, dass nach der Fusion mit der Plasmamembran die Perforine zu einer Perforation der Zellmembran der Zielzelle führen, woraufhin die Granzyme durch die entstandene Pore ins Zytosol der Zielzelle gelangen. Die dadurch ausgelöste Prozessierung von Procaspasen führt im Rahmen der Apoptose zum Zelltod.

2.2 Redox-Status von Zellen

Es ist schon lange bekannt, dass Redoxreaktionen eine fundamentale Rolle im Bereich der Stoffwechselfvorgänge von Zellen spielen. Beispiele sind etwa die Atmungskette oder die Glykolyse. Inzwischen ist jedoch immer besser verstanden, dass auch das Wachstum, die Entwicklung und die Signalverarbeitung betreffende zelluläre Prozesse empfindlich vom Redox-Milieu der Zelle abhängig sind. Im Folgenden soll beschrieben werden, was eine Redoxreaktion ist, welches die oxidierenden und reduzierenden Substanzen sind, die auf zellulärer Ebene eine Rolle spielen und schließlich was für Wirkungen die Änderungen in solchen Systemen mit sich bringen.

2.2.1 Redoxreaktion

Als Redoxreaktion werden im Allgemeinen chemische Reaktionen bezeichnet, bei denen eine Elektronenübertragung stattfindet. Es überträgt das Donor-Molekül ein oder mehrere Elektronen auf das Akzeptor-Molekül. Dabei ist eine Redoxreaktion immer die Verknüpfung einer Oxidation mit einer Reduktion. Das die Oxidation provozierende Oxidationsmittel nimmt hierbei Elektronen vom Reduktionsmittel auf und wird folglich selbst reduziert. Beispielhaft findet sich diese Reaktion bei Metallen wie Kupfer und Eisen. In diesem Fall ist das Kupfer das Oxidationsmittel und Eisen das Reduktionsmittel, da die beiden Elektronen des Eisens auf das Kupferatom transferiert werden.



Allerdings müssen die Elektronen nicht vollständig an das Oxidationsmittel abgegeben werden, wie es das Bohr'sche Atommodell und die Ionisationstheorie vorschlägt, vielmehr erhöht sich die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des „übertragenen“ Elektrons nahe dem Atomkern des Akzeptors. Die meisten der biochemisch also mit organischen Molekülen ablaufenden Redoxreaktionen sind dieser Art. Die hier zu Grunde liegenden Gesetzmäßigkeiten sind qualitativ mit der Oktettregel zu erklären, die darauf beruht, Valenzelektronen der letzten Schale aufzufüllen, um mehr Stabilität zu erlangen. Das Bestreben eines bestimmten Stoffes Elektronen zu absorbieren (d.h. dessen Oxidationsfähigkeit) spiegelt sich in seiner Elektronegativität wider. Je höher die Elektronegativität eines Elements ist, desto größer ist das Potential „fremde“ Elektronen an sich zu binden. Die treibende Kraft für eine solche Reaktion wird als Gibbs' freie Energie bezeichnet und setzt sich aus der freien Enthalpie und einer entropischen Komponente zusammen. Ein sehr bekannter Redox-Vorgang dieser Klasse ist die sogenannte Knallgasreaktion, bei der Wasserstoff und Sauerstoff im 2:1-Gemisch unter großer Wärmeentwicklung reagieren.



Koppelt man nun mehrere Redox-Paare in einer Reaktionskette miteinander, entsteht eine sogenannte Spannungsreihe. Auf diese Weise wird die oben beschriebene Reaktion, nämlich

die Bildung von Wasser aus Sauerstoff und Wasserstoff in den Mitochondrien zur Energiegewinnung genutzt. Dabei laufen die aus dem energiereichen Acetyl-CoA stammenden Elektronen über die verschiedenen Stationen der Komplexe der Atmungskette und werden schlussendlich auf Sauerstoff übertragen, was indirekt die Neuformation von Adenosintriphosphat (ATP) zur Folge hat.

Zwei Punkte sollen zusammenfassend hervorgehoben:

1. Die meisten biochemischen in der Zelle ablaufenden Reaktionen haben Redox-Charakter. Dabei sind die einzelnen Redox-Paare als elektrochemische Halbzellen aufzufassen, deren elektromotorisch treibende Reaktionskraft aus der Differenz ihrer Reduktionspotentiale erwächst.
2. Die aus den exothermen Redox-Reaktionen freiwerdende Energie kann enzymatisch genutzt werden, um energetisch ungünstige Reaktionen zu katalysieren und damit überhaupt zu ermöglichen.

2.2.2 Redox-regulierte Zellfunktionen

Um die Bedeutung von Redox-Systemen für Zellen nochmals hervorzuheben, sollen die wichtigsten Stoffwechselfvorgänge unter Redox-Kontrolle kurz beschrieben werden.:

1. Oxidative Phosphorylierung: Eine Zelle, oder ein biologisches Gewebe stellt ein Höchstmaß an Ordnung und „geordneten“ Abläufen dar, was einen ständigen Energieaufwand gegen entropische Kräfte bedeutet. Hierfür wird eine große Menge Energie gebraucht, welche die Zelle mehrheitlich aus der oben angesprochenen Atmungskette, der oxidativen Phosphorylierung, d.h. der Bildung von ATP aus Adenosindiphosphat und freien Phosphatgruppen (PO_4^{3-}) gewinnt. Die dabei entstehenden Säureanhydridbindungen sind durch eine hohe Dichte an Elektronen gekennzeichnet und setzen ihre Energie in Redoxreaktionen frei. Das wird von Enzymen vieler Klassen genutzt, um Reaktionen zu katalysieren, die nur unter Energieaufwand möglich, d.h. endotherm sind.
2. Signalkaskaden: Zwei wesentliche Zweige der zellulären Signalkaskaden beruhen auf Änderungen in entweder dem Phosphorylierungsstatus von Proteinen oder deren Thiolstatus [Schafer and Buettner,2001]. Das heißt, dass die Funktion bzw. die Aktivität von Proteinen oder Enzymen davon abhängig ist, ob wie im ersten Fall

Phosphatgruppen angelagert sind, oder wie im zweiten Fall die Sulfhydrylgruppe (SH) reduziert oder oxidiert ist. Die Aktivität ganzer Kaskaden hängt also vom Redox-Status der Zelle ab. Damit wird auch deutlich, dass Verschiebungen in der Balance zwischen intrazellulär oxidierenden und reduzierenden Substanzen die Signaltransduktion erheblich beeinflussen. Bedeutsam sind in diesem Zusammenhang Prozesse wie Proteinsynthese, DNA- und RNA-Synthese, Aktivität von Redox-abhängigen Transkriptionsfaktoren sowie die Translokation von z.B. Rezeptoren aus dem Kern [Simons et al,1995; Makino et al.,1999].

3. Proliferation und Differentiation: Eine weitere zwingende Konsequenz ist die Beteiligung von Redox-Prozessen an der Proliferation und Differentiation einer Zelle. Die Proliferation läuft in einem relativ reduzierendem Milieu ab, so wurden in pränatalen Geweben hohe Level an Glutathion (ein intrazelluläres Molekül mit reduzierender Wirkung) gefunden, wohingegen die Aktivitäten der antioxidativ arbeitenden Enzyme vergleichsweise niedrig waren. [Sohal et al., 1990; Allen et al.,1992] Dieses Verhältnis ändert sich zu Gunsten der Enzymaktivität nach der Geburt, wahrscheinlich in Vorbereitung auf höhere Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies. Tatsächlich ist ein genereller Wechsel zu eher oxidierenderen Bedingungen beobachtbar, wenn die Zelle differentiationsstimulierenden Impulsen ausgesetzt ist [Allen et al., 1985]. So konnte auch gezeigt werden, dass sich Konzentrationen antioxidativer Substanzen während des Zellzyklus dramatisch verändern. Ferner, so schlägt die Arbeitsgruppe um Li und Oberley vor, sind solche Veränderungen für den erfolgreichen Ablauf des Zellzyklus unabdingbar [Li und Oberley,1998]. Induktion oder Inhibition der Proliferation scheinen ebenfalls mit der Menge bzw. der Konzentration an Oxidantien zusammenzuhängen. So begünstigen niedrige Konzentrationen an Oxidantien zur Stimulation der Proliferation, während hohe Konzentrationen eher inhibierend wirken [Dybbukt et al,1994; Brown et al, 1999; Yang et al.,1996]. Oxidativer Stress könnte zudem ein wichtiger Faktor bei der Selektion von Zellen sein. Dementsprechend reagieren Zellen mit hohem Reduktionspotenzial toleranter auf oxidierende Radikale, im Gegensatz zu solchen mit niedrigem Reduktionspotential in denen die Apoptose induziert wird.
4. Zelltod: Für den Tod einer Zelle bestehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten. Beide gehen mit einer Änderung des Redox-Status hin zu oxidierenden Bedingungen einher.

Der Unterschied liegt in einer moderaten Umgestaltung des Redox-Status, welche zum apoptotischen Zelluntergang führt, beziehungsweise einer schwerwiegenden Form, die einen nekrotischen Untergang der Zelle zur Folge hat. Apoptose ist ein organisierter und energieaufwendiger Prozess. Wird die Zelle jedoch mit einer großen Menge von Radikalen belastet, wird die für den Ablauf der Apoptose notwendige Energie aufgebraucht, was eine Nekrose nach sich zieht. Zum Beispiel induzieren niedrige H_2O_2 -Konzentrationen in verschiedenen Zellen eine Apoptose (9-30 μM), während höhere Konzentrationen (>100 μM) unweigerlich zur Nekrose führen [Wagner et al.,2000; Schafer et al.,1999].

2.2.3 Redox-Systeme der Zelle

Nachdem im letzten Kapitel gezeigt wurde, welche Stoffwechselwege von einer genauen Regulation des Redox-Status einer Zelle abhängen, sollen nun Systeme dargestellt werden, mit denen die Zelle die Möglichkeit erhält auf radikalische Angriffe zu reagieren und die Redox-Kapazität konstant zu halten. Der Mechanismus eines solchen Systems besteht darin, Elektronen, Wasserstoffatome oder Protonen bereit zu stellen, die den Radikalen zur Reduktion beziehungsweise Protonierung dienen sollen. Dabei müssen die Quellen dieser zellulären Systeme ihre Elektronen beziehungsweise Protonen „leicht“ abgeben können, damit sich keine energetisch günstigeren Prozesse ergeben, wenn Radikale andere Zellstrukturen (z.B. DNA, Proteine, etc) oxidieren oder deprotonieren. Folglich sind Redox-Systeme als Schutz zu verstehen, die helfen, das intrazelluläre Milieu in konstanter Balance zwischen oxidierenden und reduzierenden Substanzen zu halten.

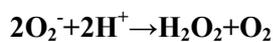
Wie schon weiter oben erwähnt, hat die lebende Zelle ein eher antioxidatives, also reduzierendes Milieu, das mit einer „Elektronenfülle“ gleichzusetzen ist. Man muss sich hier vergegenwärtigen, dass die Erzeugung einer elektronenreichen Umgebung mit hohem Energieaufwand verbunden ist, gleichzeitig aber zum Schutz, der durch Oxidation zerstörbaren Zellstrukturen, eine essentielle Bedeutung hat. Allerdings gibt es auch Radikale, die ihre Reaktivität durch ein ungepaartes Elektron erhalten. Zum Beispiel würde das Superoxid-Anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) würde nicht oxidieren, sondern eine Deprotonierung zur Folge haben, was ebenso zerstörerisch auf Strukturen und Moleküle in der Zelle wirken kann, da in diesen Fällen Protonen (H^+) aus den Verbindungen „gerissen“ werden.

Neben enzymatischen Abläufen, an denen hauptsächlich die Superoxiddismutase und die Katalase beteiligt sind, gibt es auch als Radikalfänger wirkende Substanzen die nicht-

enzymatisch funktionieren. Als bedeutende Vertreter sind hier Glutathion, Vitamin C und E oder Vitamin-ähnliche Substanzen wie Coenzym Q zu nennen.

2.2.3.1 Superoxiddismutase (SOD)

SODs sind alle Enzyme, die Superoxid-Anionen (O_2^-) in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und molekularen Sauerstoff umwandeln. Dafür besitzen die SODs metallische Cofaktoren in den aktiven Zentren. Diese sind familienpezifisch Kupfer/Zink, Nickel, Mangan oder Eisen. Die in Eukaryonten vorwiegend vorliegende Form ist die SOD1. Ihr aktives Zentrum beinhaltet ein Kupfer- und ein Zink-Ion, welche zusammen jeweils auf einer der beiden Untereinheiten des dimerischen Proteins liegen. Der Funktionsmechanismus der Dismutation von O_2^- wird als zweigeteilte Reaktion beschrieben. Zunächst liegt der metallische Cofaktor des Enzyms in oxidierter Form vor, wodurch ermöglicht wird, dass das erste O_2^- sein ungepaartes Elektron abgeben kann und selbst zu molekularem Sauerstoff (O_2) oxidiert wird. Das nun reduzierte Metall im aktiven Zentrum der SOD gibt im nächsten Schritt sein aufgenommenes Elektron wieder ab und erzeugt durch Kombination mit zwei Protonen und dem zweiten O_2^- ein Molekül Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Insgesamt sieht die Reaktion daher wie folgt aus:



2.2.3.2 Katalase

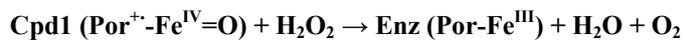
Der Name Katalase geht auf den Entdecker Oskar Loew zurück, der um 1900 postulierte, dass ein Enzym existieren muss, welches in jeder Pflanze und jedem tierischen Gewebe die Degradation von H_2O_2 bewerkstelligt. Es dauerte aber weitere zwanzig Jahre bevor Warburg mit der Antagonisierung des Effekts durch Cyanid nachweisen konnte, dass Katalase ein aktives Zentrum besitzt, welches Eisen enthält. Damit war man der Struktur und der Funktion der Katalase wesentlich näher gerückt.

Die im Menschen vorkommende Katalase ist ein tetrameres Enzym, wobei jede Untereinheit ein aktives Zentrum beinhaltet und ein Molekulargewicht von 60 kDa aufweist. Das aktive Zentrum selbst besteht aus einer Häm-Gruppe, die über ein Eisenprotoporphyrin verfügt, welches die Reaktion katalysiert. Besonders ist hierbei, dass das aktive Zentrum im Inneren des Enzyms liegt und nur über einen wenige Ångström breiten, nach unten enger werdenden

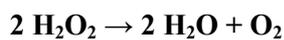
„Kanal“ zu erreichen ist. Das bietet den Vorteil, dass nur kleine Moleküle, wie H_2O_2 ins katalytische Zentrum gelangen können. Der Reaktionsmechanismus vollzieht sich in zwei Schritten und wieder muss er als Kombination einer Oxidationsreaktion mit einer Reduktion aufgefasst werden. Im ersten Schritt liegt die Eisenprotoporphyrin-Gruppe des Enzyms reduziert vor. Es wird ein H_2O_2 -Molekül gebunden und in Wasser und ein einzelnes Sauerstoffatom gespalten. Dabei oxidiert das Eisenatom von EisenIII zu EisenIV und gibt das freie Elektron an das neu entstehende Wassermolekül ab. Das verbleibende Sauerstoffatom bindet zunächst an die Porphyringruppe. Der oxidierte Enzymkomplex wird jetzt „Compound1“ genannt .



Anschließend oxidiert das Enzym (Compound1) ein zweites Molekül H_2O_2 , indem ein Elektron vom Wasserstoffperoxid auf das Compound1 fließt, dieses wieder in den Grundzustand reduziert und neben einem weiteren Wassermolekül molekularer Sauerstoff entsteht.



Der Gesamtumsatz der Reaktion lässt sich folgendermaßen ausdrücken:



Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass die Katalase mit einer Wechselzahl (Geschwindigkeitskonstante der Reaktion bei einer Enzymkonzentration von 1 mol/l) von mehr als $10^7/\text{s}$ zu den am schnellsten arbeitenden Enzymen gehört, die je gefunden wurden.

2.2.3.3 Glutathion

Das Glutathion/Glutathiondisulfid-System ist wohl der relevanteste Redox-Puffer über den die Zelle verfügt [Gilbert et al.,1990]. Durchschnittlich beträgt die Konzentration an Glutathion (GSH) 1-11 mM, was im Vergleich zu anderen redox-aktiven Substanzen in der Zelle sehr hoch ist [Smith et al.,1996]. Die Struktur des Glutathionmoleküls geht aus der Biosynthese mit den drei Aminosäuren Glycin, L-Glutamat und L-Cystein hervor. Es wird vornehmlich im Zytosol synthetisiert, wobei im ersten Schritt die Carboxylgruppe des

Glutamats mit der Aminogruppe des Cysteins unter Bildung einer Isopeptidbindung reagieren. Das daran beteiligte Enzym heißt Glutamatcysteinligase und braucht für diesen Vorgang ATP. Anschließend wird unter wiederholtem ATP-Verbrauch mit Hilfe der Glutathionsynthase das Glycin an das terminale Kohlenstoffende addiert.

Der Grund für die antioxidativen Eigenschaften des GSH ist die Thiol-Gruppe (SH), welche ursprünglich Teil der schwefelhaltigen Aminosäure L-Cystein war. Durch sie ist es möglich, ein Proton und ein Elektron in Form eines Wasserstoffatoms, das reduzierende Eigenschaften hat, für Stoffe mit potentiell schädlichen, oxidativen Merkmalen zur Verfügung zu stellen. Dabei finden sich zwei Moleküle oxidiertes Glutathion zusammen und erzeugen eine Disulfidbrücke. Diese Reaktion kann wie folgt beschrieben werden:



Entscheidend ist, dass die hier beschriebene Reaktion nicht-enzymatisch stattfinden kann, was den Prozess prinzipiell erleichtert und das System als Puffer kennzeichnet, der jedoch verbraucht werden kann. Das spiegelt sich in der Veränderung des Reduktionspotentials wider, welches sich mit der Nernst-Gleichung, die den Zwei-Elektronen-Übergang mathematisch beschreibt, beziffern lässt. Das Reduktionspotential ist dabei vom Verhältnis GSH/GSSG abhängig. Um der Verringerung dieses vor Oxidation bewahrenden Systems entgegenzutreten, hat die Zelle zwei Mechanismen entwickelt. Der erste ist enzymatisch und bedient sich der sogenannten Glutathion-Reduktase (GR). Dieses Enzym benötigt NADPH/H⁺ als Cofaktor und trägt FAD in seinem katalytischen Zentrum. Gibt das NADPH/H⁺ seine Elektronen ab, wird ein transientes FADH⁻-Anion in der GR gebildet, welches darauf die Disulfid-Bindung angreift und entzweit. Das Ergebnis sind zwei reduzierte GSH-Moleküle.



Der zweite Ansatz ist neben der Neusynthese von GSH auch der Export von GSSG, um das Verhältnis zwischen oxidierten und reduzierten Teilen Glutathion zu balancieren und damit den Redox-Status aufrechtzuerhalten. So konnte tatsächlich gezeigt werden, dass Zellen als Antwort auf „oxidativen Stress“ nach vermehrter intrazellulärer GSSG-Entwicklung dieses nach extrazellulär abtransportieren [Lu et al.,1999; Bray et al.,1993]. Ein solcher Efflux von GSSG scheint ein weiteres Werkzeug von Zellen zu sein sich gegen Radikale zu schützen [Schafer and Buettner,2001].

Bemerkenswert ist auch, dass verschiedene Kompartimente in der Zelle eigene GSH-Pools haben. Hervorzuheben ist hier der Zellkern, welcher damit unabhängig vom Zytosol seinen Redox-Status regeln kann. Bedenkt man, dass der gesamte DNA-RNA-Apparat mit Reparaturmechanismen usw. besonders vor Oxidation geschützt werden muss, wird die Notwendigkeit dessen verständlich [Bellomo et al.,1992; Arrigo,1999]. Im Gegensatz dazu liegt im endoplasmatischen Retikulum ein wesentlich geringerer Konzentrationsquotient [GSH]/[GSSG] vor. Während er normalerweise zwischen 30:1 bis 100:1 beträgt, ist das Verhältnis im ER kleiner als 3:1[Hwang et al.,1992] Das dadurch eher oxidierende Milieu wird genutzt, um Proteine zu transformieren, sowie zum Beispiel Disulfid-Bindungen zu erzeugen.

Einen besonderen Stellenwert im GSH-Kreislauf nimmt ein weiteres Enzym namens Glutathionperoxidase (GPx) ein. Das von Gordon C. Mills 1957 entdeckte Enzym ist ein tetrameres Glykoprotein, welches Selen als prosthetische Gruppe trägt. Die Aufgabe der GPx ist GSH mit organischen Peroxiden, wie z.B. auch H₂O₂ zur Reaktion zu bringen. Obwohl eine solche Reaktion auch ohne Enzym möglich wäre, ist in diesem Falle die Effektivität der GPx entscheidend, da es vornehmlich um den Schutz biologischer Membranen und deren Lipiden geht. So wird die GPx auch als Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathionperoxidase bezeichnet, weil sie in ihrer Hauptfunktion Hydroperoxid-Reste von Lipiden (R-O-O-H) zu den korrespondierenden Alkoholen reduziert. Dabei wird das Selen vorübergehend oxidiert und von GSH anschließend wieder in den reduzierten Zustand versetzt.



GSH ist nicht nur als Antioxidationsmittel wichtig, sondern erfüllt ebenso Funktionen in anderen Bereichen des Stoffwechsels: Zum einen die Speicherung von L-Cystein, eine sehr reaktionsfreudige Aminosäure, die gleichzeitig aber essentiell für den Körper ist und in Form von GSH am besten verfügbar bleibt; zum anderen die Konjugation mit GSH im Rahmen der Biotransformation, wodurch bestimmte Stoffe wasserlöslich gemacht und damit von Nieren ausgeschieden werden können.

2.3 Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies, oft auch als freie Radikale bezeichnet, können intra- und extrazellulär generiert werden. In den meisten Fällen sind daran Mechanismen beteiligt, die Enzyme der NOX-Familie (NADPH oxidase) involvieren. Zusätzlich können ROS aber auch aus dem Arachnoidonsäure-Zyklus, Mitochondrien oder der enzymatischen Aktivität der Xanthin-Oxidase entstehen [Dröge, 2002; Zorov et al.,2000; Bedard and Krause,2007]. Bis vor einigen Jahren wurden ROS überwiegend mit negativen, pathologischen Inhalten in Verbindung gebracht, womit sie als toxisches Nebenprodukt abgestempelt wurden, das schnellstmöglich zu eliminieren ist. Schlagworte sind hier oxidativer Stress und die daraus hervorgehenden kardiovaskulären Problematiken, sowie Morbus Parkinson oder Alzheimer [Abramov and Duchon,2005]. Ebenso wurde lange Zeit eine maßgebliche Beteiligung von ROS am Alterungsprozess diskutiert [Dröge,2005; Kregel and Zhang,2007].

Während der letzten zwanzig Jahre allerdings wurden ROS mehr und mehr „positive“ Effekte zugesprochen, die eine physiologische Funktion für den menschlichen Organismus beleuchten. Man begann ROS als „second messenger“ zu begreifen, der auf molekularer Ebene Signalkaskaden regulatorisch steuert. So sind zum Beispiel Patienten mit disfunktionalen NOX-Enzymen viel anfälliger für Autoimmunerkrankungen, wie chronische Granulomatose oder rheumatoide Arthritis [Gelderman et al.,2007; Hultqvist et al.,2004; Patino et al.,1999; Segal,1996].

2.3.1 Die verschiedenen Arten von ROS

Alle ROS produzierenden Quellen generieren primär ein Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), welches äußerst reaktiv ist. Dieses Superoxid wird in sehr kurzer Zeit entweder nicht-katalytisch von der Umgebung oder von einem Enzym namens Superoxiddismutase (SOD) in das weniger reaktive und damit stabilere Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt. Nicht unerwähnt bleiben sollen andere Formen von Radikalen, wie die Peroxyl- (RO_2^{\cdot}) und Alkoxy (RO^{\cdot}) Verbindungen, die aber in Signalprozessen noch keinen nachweislichen Platz einnehmen. Wasserstoffperoxid gehört zu den nicht-radikalen Formen der ROS und wurde erstmals 1818 von Louis Jacques Thenard aus einer Reaktion von Bariumperoxid mit Salpetersäure dargestellt. Dass es in organischen Geweben zu finden ist, ist inzwischen mehr als fünfzig Jahre bekannt. Es ist eine schwache Säure und ein sehr starkes Oxidationsmittel, deshalb wird es auch industriell unter anderem zum Bleichen und Desinfizieren genutzt. Im Körper entsteht

es neben dem oben beschriebenen Weg auch aus der Metabolisierung von Zucker sowie bei anderen biochemischen Stoffwechselfvorgängen. Im Beisein von Übergangsmetallen kann H_2O_2 in das hoch reaktive Hydroxylradikal ($\cdot OH$) konvertiert werden. Alternativ wird es jedoch durch reduzierende Prozesse in Wasser umgewandelt.

2.3.2 NAD(P)H-Oxidasen

Alle Mitglieder der NOX-Familie sind transmembrane Proteine, die den Transport von Elektronen über Membranen ermöglichen, um Sauerstoff zu einem Superoxidanion zu reduzieren. In Übereinstimmung mit ihrer allgemeinen Funktion verfügen alle NOX-Enzyme über bestimmte strukturelle Eigenschaften. Beginnend vom COOH-Terminus sind dies eine NADPH-bindende Region am terminalen COOH und einen FAD-bindenden Teil, neben der dem COOH-Terminus am nächsten liegenden Transmembranschlaufe. Es folgen sechs transmembrane Domänen und vier Häm-bindende Histidin-Gruppen, zwei davon in der dritten und zwei in der fünften Transmembrandomäne. Die meisten diesbezüglichen Daten legen eine Selektivität der NOX-Enzyme für NADPH gegenüber NADH nahe, trotzdem ist der Term NAD(P)H Oxidase nach wie vor gebräuchlich. Insgesamt sind fünf Isoformen der NOX-Familie plus zwei weitere DUOX-Proteine und deren Unterformen bekannt. An dieser Stelle soll das Augenmerk aber auf lediglich eine Form, NOX2, gelegt werden, da dieses Protein gewissermaßen als „Prototyp“ dieser Enzymgruppe verstanden werden kann und gleichzeitig die in Phagozyten vorliegende Form darstellt.

2.3.2.1 NOX2

Die biochemischen Besonderheiten dieses auch als gp91^{phox} bekannten Proteins sind in der Vergangenheit intensiv analysiert worden [Robinson et al.,2004; Nauseef,2004; Cross and Segal,2004]. So sind viele der topographischen und strukturellen Gesichtspunkte anderer NOX-Isoformen aus den Betrachtungen von NOX2 erwachsen. Die wichtigsten morphologischen Charakteristika des Enzyms sind neben dem oben Erwähnten die sechs Transmembrandomänen wobei COOH-Terminus und NH₂-Terminus ins Zytoplasma gerichtet sind und das Molekulargewicht von 70-90 kDa, dessen große Variabilität auf den unterschiedlichen Glykosylierungsgrad zurückzuführen ist und einige Kohlenstoffketten, die

Glukosamine und andere Zuckerderivate enthalten, welche in extrazellulären Domänen an Argininreste gebunden sind.

Die Aktivierung von NOX2 bedingt eine komplexe Serie von Proteininteraktionen. Zunächst muss die Translokation von zytosolischen Faktoren erfolgen, die im nächsten Schritt eine Proteinuntereinheit Namens p47^{phox}, die „organizer subunit“, phosphorylieren, was deren Konformation derart beeinflusst, dass eine Interaktion mit p22^{phox} möglich wird. p22^{phox} ist konstitutiv mit NOX2 verbunden und dient der Stabilisierung. Zudem werden noch zwei weitere Untereinheiten, nämlich p67^{phox}, die „activation subunit“ und p40^{phox} gebraucht, um schließlich einen GTPase/Rac-Mechanismus zu initialisieren, der die Assemblierung des Komplexes abschließt und ihn damit aktiviert.

Die Funktion von NOX2 kann als Redox-Kette aufgefasst werden, bei der ein Elektronendonator (NAD(P)H) transmembranal mit einem Elektronenakzeptor (O₂) gekoppelt ist. Im ersten Schritt werden Elektronen von NADPH auf ein FAD übertragen, ein von p67^{phox} regulierter Prozess. Anschließend wird ein einzelnes Elektron vom reduzierten Flavin (FADH₂) ins innere Häm-Eisen-Zentrum geschleust. Das nun partiell reduzierte Flavin (FADH) kann sein zweites e⁻ erst dann abgeben, wenn das erste das innere Häm-Zentrum verlassen hat und auf das äußere gewechselt ist. Da die elektromotorische Kraft für den Wechsel des e⁻ nach außen zu niedrig wäre, muss vorab Sauerstoff an das äußere Häm-Zentrum angelagert werden. Durch die hohe Elektronegativität des Sauerstoffatoms kann das e⁻ jetzt aufgenommen werden (O₂→O₂⁻).

NOX2 wurde als erstes in neutrophilen Granulozyten und in Makrophagen beschrieben und gilt als die typische Phagozyten-NADPH-Oxidase. Es ist in vielen Geweben zu finden, was aber eher das Vorhandensein ortsansässiger Makrophagen widerspiegelt, als die Expression des Enzyms im einzelnen. Phagozyten besitzen NOX2 sowohl in der Plasmamembran als auch in intrazellulären Membranen, immer in enger Assoziation mit p22^{phox}. In ruhenden Neutrophilen und Makrophagen ist ein Großteil des Enzyms in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert, werden sie jedoch stimuliert, erfolgt eine Translokation der Granula. Die nachfolgende Fusion von mit NOX2 gefüllten Vesikeln mit der phagosomalen Plasmamembran wird als Schlüsselereignis bei der mikrobiziden Wirkung des „oxidative burst“ gesehen [Bedard and Krause,2007]. NOX2 kann aber auch ohne Fusion mit der Membranoberfläche aktiviert werden, die hierbei entstehenden intrazellulären ROS funktionieren wahrscheinlich in Signalkaskaden (Aktivierung von Kinasen; Genexpression; Proliferation; Apoptose) [Karlsson and Dahlgren,2002].

2.3.4 ROS in Signalkaskaden

Im Kapitel 2.2 (Redox-regulierte Zellfunktionen) wurde gezeigt, dass fundamentale Zellfunktionen, von der Entwicklung der Zelle, über ihre Synthesephase bis hin zum Zelltod, von Redox-regulierten Prozessen abhängig sind. Weiterhin wurde oben der Begriff des second messengers für ROS eingeführt. Nachfolgend sollen die Mechanismen, mit denen reaktive Sauerstoffspezies als Mediator in Signalkaskaden wirken genauer betrachtet werden.

2.3.4.1 ROS und Calcium

Veränderungen in der zytosolischen Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) spielen bei der Modulation von Signalwegen eine große Rolle. Zumeist sind dies PKC- und Calmodulin-abhängige Kaskaden, die sowohl in Synthese und Proliferation aber auch in apoptotische Vorgänge integriert sind. ROS kann über zwei Wege zu einer Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ führen. So werden entweder intrazelluläre Calciumspeicher wie das ER entleert, oder es besteht ein Calciuminflux von extrazellulär über selektive Kanäle. Zusätzlich ist auch eine Hemmung der Ca^{2+} -ATPasen beschrieben, die verhindert, dass $[Ca^{2+}]_i$ wieder abfällt [Lajas et al.,2001; Zaidi and Michaelis,1999; Kaplan et al.,2003]. Für die Entleerung der intrazellulären Speicher wird eine Interaktion von ROS mit dem IP3-Rezeptor verantwortlich gemacht, der als redox-sensitiv charakterisiert worden ist.[Mikoshiya,2007] Die Oxidation des Rezeptorproteins, so das Modell, hat dann zur Folge, dass der Rezeptor sensitiver auf IP3 reagiert und ein Calciumefflux schon bei niedrigeren IP3-Konzentrationen induziert wird. [Hu et al.,2000; Waring,2005; Bootman et al.,1992]

Für den durch ROS hervorgerufenen Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum werden die sogenannten TRP-Ionenkanäle (Transient Rezeptor Potential) verantwortlich gemacht. Einige Arbeitsgruppen konnten eine direkte Aktivierung von TRPM2 mit Hilfe von H_2O_2 bzw. kooperative Effekte in Verbindung mit ADP-Ribose zeigen [Kraft et al.,2004; Kolisek et al.,2005; Hara et al.,2002].

2.3.4.2 ROS und Transkriptionsfaktoren

Dass der Redox-Status einer Zelle die Transkriptionsvorgänge entscheidend beeinflusst, ist im Kapitel 2 schon ausführlich dargelegt worden. Hier sollen nun noch mal zwei Transkriptionsfaktoren hervorgehoben werden, bei welchen ein direkter Zusammenhang zwischen ihrer Aktivierung und ROS gut belegt ist. Zum ersten ist dies der Transkriptionsfaktor AP-1, welcher typischerweise aus den beiden Proteinen c-Fos und c-Jun zusammengesetzt und an Prozessen der Differentiation beteiligt ist [Dröge,2002]. In T-Lymphozyten ist AP-1 in die Expression vom IL-2-Gen und anderer relevanter Immungene involviert [Matsuda et al.,1998; Su et al.,1994]. In zwei verschiedenen T-Zell-Linien konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit 200 μM H_2O_2 zu einer Aktivierung von AP-1 führte und eine Expression von c-Fos und c-Jun bzw. die Produktion von IL-2 nach sich zog [Los et al.,1995; Beiqing et al.,1996].

Zum zweiten handelt es sich um den Nuclear Faktor κB (NF- κB), der ebenfalls in die Produktion von Chemokinen involviert ist, aber auch eine breite Spektrum anderer Wirkungen in den Bereichen Immunantwort, Entzündungen, Wachstumskontrolle und Apoptose aufweist [Baeuerle and Baltimore,1996; Baeuerle and Henkel.,1994]. Nebenbei bemerkt ist NF- κB der erste Transkriptionsfaktor, bei welchem eine direkte Antwort auf oxidativen Einfluss gezeigt werden konnte [Schreck and Baeuerle,1991]. Er kann von mikromolaren Konzentrationen an H_2O_2 aktiviert werden, oder, wie in Jurkat-T-Zellen demonstriert, von einem moderaten pro-oxidativen Shift im Glutathion-System [Galter et al.,1994].

2.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Dissertation soll die Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies im Rahmen des Immunsystems hinsichtlich der Zell-Zell-Kommunikation und der Calcium-abhängigen T-Zell-Aktivierung genauer charakterisiert werden. Dabei interessiert an erster Stelle die Frage, ob T-Zellen in der Lage sind, von Makrophagen produzierte ROS aufzunehmen und zu verwerten. Weiterhin soll die Beeinflussung des Calciumhaushaltes von Jurkat- und CD4^+ -T-Zellen durch Wasserstoffperoxid untersucht werden. Anschließend werden Experimente durchgeführt, die das Reduktionspotential von naiven und Effektor-T-Zellen vergleichen sollen. Schließlich soll untersucht werden, ob auch CD8^+ -T-Zellen in ihrer zytotoxischen Funktion durch H_2O_2 beeinflussbar sind.

Die Arbeitshypothese ist, dass T-Zellen sensibel auf von Makrophagen produzierte reaktive Sauerstoffspezies reagieren, wobei untersucht werden soll, ob die beobachtete Reaktion Unterschiede aufweist, die mit dem Aktivierungsgrad der T-Zellen und der damit einhergehenden Änderung des zellulären Redox-Potentials zusammenhängen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Nicht aufgeführte Standardlaborchemikalien wurden soweit nicht anders erwähnt von den Firmen VWR oder Sigma in der Qualität „zur Analyse“ bezogen.

Substanz	Bestellnummer	Firma
2-APB (2-Aminoethoxydiphenyl borate)	D-9754	Sigma
BSA	A-7906	Sigma
Catalase from human erythrocytes	C-3556	Sigma
CM-H ₂ DCFDA (5;6-Chlormethyl-2;7-Dichlordihydrofluorescin)	C-6827	Invitrogen
EDTA (Ethyl-Diamin-Tetraacetic Acid)	E-6758	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxide)	D-8418	Sigma
FCS (fetales Kälberserum)	10270-106	Invitrogen
Fura-2 AM “cell permanent”	F-1221	Molecular Probes
Glutathione S-Transferase	G-6511	Sigma
Glycin	3908.2	Roth
Hepes	H-7523	Sigma
HT-Supplement 50x	41065-012	Invitrogen
L-Glutahtion reduced	G-6013	Sigma

MCB (Monochlorobimane)	69899	Sigma
OPA (o-Pthaldialdehyd)	79760	Sigma
PERDROGEN [®] 30% H ₂ O ₂	31642	Sigma
Penicillin-Streptomycin	15140-122	Invitrogen
PFA (Paraformaldehyd)	F-1635	Sigma
PHA-P (Phytohemagglutinin-P)	L-9132	Sigma
PMA (Phorbol 12-myristat 13-acetat)	P-1585	Sigma
Polyornithin	P-3655	Sigma
Puromycin, Dihydrochloride	540222	Calbiochem
Thapsigargin	T-7458	Molecular Probes
TrypanBlue Solution 0,4 %	T-8154	Sigma
Triton X100	018774	Eurobio

3.1.2 Medien und Lösungen

0mM Calciumlösung	pH 7,4	155 mM 4,5 mM 3 mM 1 mM 10 mM 5 mM	NaCl KCL MgCl ₂ EGTA Glukose Hepes
-------------------	--------	---	--

0,5mM Calciumlösung	pH 7,4	155 mM 4,5 mM 2,5 mM 0,5 mM 10 mM 5 mM	NaCl KCL Mg Cl ₂ Ca Cl ₂ Glukose Hepes
1mM Calciumlösung	pH 7,4	155 mM 4,5 mM 2 mM 1 mM 10 mM 5 mM	NaCl KCL Mg Cl 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

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 TM	1:10
anti-CD3/CD28	Beads	Dynabeads/ Invitrogen	s. 3.5

3.1.4 Geräte und Platten

Universal-Mikroplattenmessgerät: Genius Pro ELX800UV	Tecan
Mikroskope: Cell Observer® Filtersatz: 56 HE GFP Ds/Red	Zeiss
Spektrophotometer: Ultrospec™ 2100 pro UV/visible	GE Healthcare
Zentrifugen: Centrifuge 5415 R, Universal 32 R	Eppendorf Hettrich
6-Well-Zellkulturplatten transparenter/flacher Boden	BD Falcon # 353046
96-Well-Mikrotest™ -Platten schwarz, transparenter/flacher Boden	BD Falcon # 353948

3.2 Kultur der verwendeten Zelllinien

Alle Zellen wurden bei 37 °C mit 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Die vom Jurkat T-Zellklon E6-1 (ATCC-Nr.: TIB-152) abstammende Diphterietoxin-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 Verdünnung der Zellen erfolgte alle zwei bis drei Tage. Die Zelllinie der THP-1 Makrophagen, welche uns freundlicherweise die Arbeitsgruppe von Prof. Alexandra Kiemer (UdS Saarbrücken) zur Verfügung stellte, wurde auf die gleiche Weise in RPMI-1640 Medium mit den selben Zugaben kultiviert und bei mittlerer Wachstumsdichte gehalten. Weiterhin wurden CD33 exprimierende CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) verwendet, welche uns von der Arbeitsgruppe Renner (USZ Zürich) zur Verfügung gestellt wurden. Diese adhären und stabil transfizierten Zellen wurden ebenso in RPMI-1640 Medium, unter Zugabe von 10 % fetalem Kälberserum (FCS, Invitrogen) kultiviert. Allerdings kamen hierbei zusätzlich 1 x HT-Supplement und das Selektionsantibiotikum Puromycin in einer Konzentration von 2 µg/ml zum Einsatz. Vor der experimentellen Nutzung der CHO Zellen

wurden diese durch ein fünfminütiges Bad in 15 ml PBS/0,5 mM EDTA abgelöst, einmal gewaschen und anschließend 5 min bei 200 g zentrifugiert. Danach erfolgte eine Verdünnung der Zellen je nach Bedarf von 1:5 bis 1:10. Die CHO-Zellen wurden bis zur maximal 30ten Passage benutzt.

3.3 Isolation von humanen, peripheren Blutmonozyten

Grundlage für sämtliche Versuche mit menschlichen Lymphozyten ist ein positives Votum der Ethikkommission der Universität des Saarlandes. Für die Isolation wurden Leukozyten-Depletionsfilter aus der Blutbank verwendet, die uns vom Blutspendedienst der Universitätskliniken des Saarlandes zur Verfügung gestellt wurden. Alle Zentrifugationen wurden in der Hettich-Zentrifuge bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Befestigung der Filter wurden diese mit 60-70 ml HBSS-Puffer gegen die Filtrationsrichtung durchgespült, um aus der Blutkonserve gefilterte Leukozyten zu gewinnen. Anschließend wurden zwei mit je 15ml Ficoll beladene Leukosep-Röhrchen unter dem Filter platziert und das heruntergespülte Blut-Puffergemisch auf die beiden Leucosep-Röhrchen verteilt. Nach der nun folgenden Gradientenzentrifugation (30 min. bei 450 g; ohne Bremse), bei der sich mittels eines erzeugten Gradienten noch verbliebene Erythrozyten auf den Boden des Leukosep-Röhrchens absetzen und Leukozyten eine ringförmige Struktur etwa einen cm oberhalb des Leukosep-Filters bilden, wurden beide Leukozytenringe abgenommen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde nun mit 50 ml HBSS aufgefüllt und erneut 15 min bei 300 g zentrifugiert. Da das so erhaltene Zellsediment immer noch einige Erythrozyten enthält, wurden 2-3 ml Lysepuffer (155 mM NH₄Cl; 10 mM KH₂PO₄; 0,1 mM EDTA; pH 7,3) hinzugegeben, mit denen innerhalb der nächsten 2-3min eine vollständige Lyse der restlichen roten Blutkörperchen erreicht wurde. Zum Stoppen der Lysereaktion wurde wiederholt mit 50ml HBSS aufgefüllt und erneut 10 min bei 200 g zentrifugiert. Das jetzt hauptsächlich aus Leukozyten bestehende Zellsediment wurde in 10-20 ml RPMI Medium aufgenommen und anschließend die Zellkonzentration in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Vitalität der Zellen konnte mit einer Trypan-Blau-Färbung überprüft werden, wobei ca. 95 % der Zellen ungefärbt blieben, also vital waren. Die sich daraus ergebenden Zellkonzentrationen lagen bei ca. 2 mio Zellen/ml.

3.4 Isolation von CD4⁺ bzw. CD8⁺ naiven T-Zellen

Zur Isolation von CD4⁺ und CD8⁺ naiven T-Zellen wurde ein negativ isolierendes Verfahren genutzt, das mit Hilfe des Dynal CD4 bzw. Dynal CD8 Negative Isolation Kit von Dynal Biotech durchgeführt wurde. Alle anderen in PBLs enthaltenen Zellen werden an einen Antikörper gebunden wodurch sie aussortiert werden konnten. Die in RPMI aufgenommenen PBLs wurden zentrifugiert, anschließend das Zellpellet in kaltes PBS (0,5 % BSA) überführt und nach Zugabe des Antikörpermix zur Inkubation auf einen Rotator gebracht. Zur Vorbereitung der Beads wurden diese in kaltes PBS aufgenommen und damit gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension der Zellen in PBS wurden Beads und Zellen zusammengeführt, sorgfältig gemischt und nach einiger Zeit der Inkubation in das Feld eines Dauermagneten gebracht. Der Überstand, welcher jetzt nur noch CD4⁺ bzw. CD8⁺ naive T-Zellen enthielt, wurde abpipettiert und in ein neues Gefäß gefüllt, um schließlich die Zellen in AIMV Medium mit einer Zelldichte von 3 mio/ml auszusähen.

Alle Zentrifugationen wurden in einer Eppendorf-Zentrifuge (5415 R) bei 4 °C durchgeführt. Die genaue Vorgehensweise während der Isolation wurde dem Herstellerprotokoll entnommen. Einzige Veränderung war das Ersetzen des Puffers1 (PBS; 0,1 % BSA; 2 mM EDTA) durch PBS mit 0,5 % BSA und ohne EDTA.

3.5 Stimulation von CD4⁺ und CD8⁺ naiven T-Zellen

Zur Vorbereitung der CD4⁺ bzw. CD8⁺ naiven T-Zellen wurde deren Anzahl pro ml mit der Neubauer Zählkammer ermittelt und dabei parallel deren Vitalität mit Trypan Blau überprüft. Die Stimulation von naiven T-Zellen wurde mit Hilfe von Dynabeads CD3/CD28 durchgeführt. Hierzu wurde eine bestimmte Anzahl Beads (Konzentration der Beads: 40 mio/ml) entnommen, sodass das Verhältnis von Beads zu stimulierenden T-Zellen 1:1 war. Die Beads wurden in 1 ml AIMV Medium aufgenommen und anschließend 5 min bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Beads erneut mit 1ml AIMV Medium aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde zum Waschen der Beads nochmals wiederholt. Danach wurden die Beads den zu stimulierenden Zellen hinzugefügt und mit einer 1ml Pipette vorsichtig gemischt. Abschließend wurden noch 2 ml frisches AIMV Medium zugegeben, um mit einem ausreichenden Nährstoffangebot der Proliferation und Differentiation der T-Zellen gerecht zu werden. Nun wurden die Zellen bei 37 °C und einer Kohlendioxidkonzentration

von 5 % für mindestens drei und maximal vier Tage inkubiert, bevor sie für weitere Experimente genutzt wurden. Alle Zentrifugationen erfolgten mit einer Eppendorf Zentrifuge.

3.6 Detektion von Wasserstoffperoxid

Das von THP-1 Makrophagen produzierte H_2O_2 wurde unter Verwendung des fluoreszierenden Farbstoffs CM-H₂DCFDA (5;6-Chlormethyl-2;7-Dichlordihydrofluorescein) detektiert. Makrophagen bzw. T-Zellen wurden 30 min in einer 1 mM Ca^{2+} -Lösung mit dem Farbstoff geladen. Dabei betrug die Konzentration von DCF 1 μ M. Aufgrund der hohen Lichtempfindlichkeit des Farbstoffs war hierbei auf möglichst geringe Exposition zu achten. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 mM Ca^{2+} -Puffer gewaschen und danach vorsichtig in die Messplatten pipettiert. Jedes gemessene Well (Vertiefung) der Messplatte enthielt insgesamt 200 μ l, jeweils 80 μ l in Puffer suspendierte Makrophagen bzw. T-Zellen und 40 μ l einer Lösung von Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) in 1 mM Ca^{2+} -Puffer. Die Konzentration von PMA wurde auf 1 μ M eingestellt. Für die Kontrolle der Hintergrundfluoreszenz wurde auf PMA verzichtet. Die Zellkonzentration wurde auf insgesamt 50000 Jurkat-T-Zellen und 200000 THP-1 Makrophagen je 200 μ l Lösung in einem Well der 96-Well-Platte (schwarz/transparenter Boden) eingestellt. Gemessen wurde in 96-Well-Platten unter Verwendung des GeniosPro universal microplate reader (Tecan). Bei jeder Messung wurden mindestens drei Wells für jede Bedingung genutzt. Die Wellenlänge des anregenden Lichts betrug 485 nm. Die Emission wurde mit einer Wellenlänge von 535 nm registriert. Vor der Messung wurde 30 s automatisch gerüttelt, um eine ausreichende Durchmischung zu erhalten. Die Experimente wurden im Dunkelraum bei Zimmertemperatur durchgeführt.

3.7 Messung der Glutathion-Levels

3.7.1 Vorbereitung von naiven und Effektor-T-zellen

Für beide Experimente wurden naive und Effektor-T-Zellen auf die gleiche Art präpariert. Zunächst wurden die Zellen in der Neubauer Kammer gezählt und mit Trypan-Blau deren Vitalität überprüft. Dann wurden jeweils 2 ml naive und 2 ml Effektor-T-Zellen in einem

Eppendorf-Gefäß 5 min bei 14000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellpellets in 600 µl PBS zu resuspendiert. Es folgte die Lyse der Zellen, die durch abwechselndes Bad in flüssigem Stickstoff und Wiedererwärmen im Zellinkubator bei 37°C erreicht wurde. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt und anschließend mikroskopisch überprüft, ob eine ausreichende Lyse stattgefunden hatte. Danach wurden die beiden Eppendorf-Gefäße 10 min bei 14000 U/min zentrifugiert, um Membranproteine zu extrahieren, die sich während der Zentrifugation auf dem Boden des Eppendorf-Gefäßes abgesetzt hatten. Aus jedem Eppendorf-Gefäß wurden im Anschluss an die Zentrifugation 400 µl des Überstands entnommen und auf zwei neue Gefäße verteilt, sodass für naive und Effektor-T-Zellen jeweils zwei Eppendorf-Gefäße mit 200 µl Zelllysats zur Verfügung standen. Die Gefäße wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Alle Zentrifugationen wurden mit einer Eppendorf-Zentrifuge durchgeführt.

3.7.2 Bestimmung des Gesamtglutathions mit Monochlorobimane (MCB)

MCB ist ein Farbstoff, der ausschließlich Verbindungen mit Glutathion eingeht. Das ungebundene MCB ist nahezu nicht fluoreszent, wohingegen es durch Bindung an Glutathion eine starke Fluoreszenz erhält. Dabei wird die Kopplung von MCB an Glutathionmoleküle durch das Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) katalysiert.

Alle Experimente wurden in 96-well Platten (schwarz; transparenter Boden) mit einem GeniosPro universal microplate reader (Tecan) durchgeführt. Für jede Messung wurden 9 Wells genutzt, jeweils drei Wells (Tripel) für CD4⁺ naive und Effektor-T-Zellen und für die Kontrolle der Hintergrundfluoreszenz. In jedes dieser Wells wurden 100 µl des Enzyms Glutathion-S-Transferase pipettiert, welches vorher in PBS gelöst wurde, sodass die enzymatische Aktivität 1 U/ml betrug. Außerdem wurden 30 µl PBS und 50 µl des vorbereiteten Zelllysats in die Wells gegeben. Das Kontrolltripel beinhaltete 50 µl PBS an Stelle des Zelllysats. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl MCB, dass damit in einer Konzentration von 100 µM vorlag.

Vor Beginn der Messung wurde im Well-Plate-Reader bei geringer Intensität 1 min automatisch gerüttelt, um eine ausreichende Durchmischung zu gewährleisten. Anschließend wurde die Platte für 200 min jeweils einmal pro Minute mit einer Exzitationswellenlänge von 380 nm bestrahlt und die Intensität der Emission (460 nm) gemessen. Die Experimente wurden im Dunkelraum durchgeführt und die Temperatur während der Messung betrug 37 °C.

3.7.3 Glutathionbestimmung mit o-Pthaldehyde

o-Pthaldehyde ist eine chemische Verbindung, die durch Bindung an Thiolgruppen fluoreszierende Eigenschaften erhält, wohingegen das ungebundene oPA einen sehr niedrigen Fluoreszenzhintergrund hat. Damit ist diese Substanz ideal geeignet, um die Menge reduzierter Glutathionspezies (GSH) zu detektieren. Allerdings werden auch Thiolgruppen andere Moleküle, wie zum Beispiel Proteine von oPA komplexiert, was zu Artefakten führen kann. Um das zu vermeiden wurden die Lysate der beiden T-Zell Typen zunächst mit 6 M Perchloridsäure behandelt. Dafür wurden je 60 µl der Säure zu den 200 µl der beiden Eppendorf-Gefäße gegeben und diese dann für 5 min auf Eis gelegt. Anschließend wurden die Eppendorf-Gefäße 5 min bei 14000 U/min zentrifugiert um das Absetzen der denaturierten Proteine zu erzielen. Vom Überstand wurden 220 µl entnommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Um pH-Werte im Bereich zwischen 7 und 9 zu erhalten wurden jetzt 110 µl Natriumhydroxid (3 M NaOH) hinzugefügt und der pH-Wert auf Lackmuspapier bestimmt. Die so präparierten Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Alle Experimente wurden in 96-well Platten (schwarz; transparenter Boden) mit einem GeniosPro universal Mikroplate Reader (Tecan) durchgeführt. Für jede Messung wurden 9 Wells genutzt, jeweils Tripel für CD4⁺ naive und Effektor-T-Zellen und für die Kontrolle der Hintergrundfluoreszenz. In jedes der neun Wells wurden 50 µl PBS, 50 µl Zelllysat bzw. weitere 50 µl PBS in das Kontrolltripel pipettiert. Um die Reaktion zu starten wurden dann 100 µl oPA, gelöst in PBS, hinzugefügt und damit eine Konzentration von 5 mg/ml erzielt. Nachfolgend wurde die Platte im Well-Plate-Reader automatisch 200 s gerüttelt, um ausreichend zu durchmischen. Die Messung folgte direkt im Anschluss. Dabei wurde mit einer Exzitationswellenlänge von 340 nm angeregt und die Intensität der Emission bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Experimente wurden im Dunkelraum durchgeführt und die Temperatur während der Messung betrug 37 °C.

3.8 Messung der Katalase Aktivität in CD4⁺ T-Zellen

CD4⁺ naive und Effektor-T-Zellen wurden mit der Neubauer Kammer gezählt und anschließend 5 min bei 200 g zentrifugiert. Nach Entfernung des alten Mediums wurde das Zellpellet in einem Puffer, bestehend aus PBS und 0,1 % TritonX resuspendiert und damit eine vollständige Lyse der T-Zellen erreicht. Die Zellkonzentration wurde dabei auf $1 \cdot 10^6$

Zellen/120 µl Lösung eingestellt. Nach 5 min Inkubationszeit auf Eis wurde das Lysat erneut 5 min bei 14000 U/min zentrifugiert, um schwere Membranproteine zu separieren. Anschließend wurden vom Überstand jeweils 120 µl, also eine Million Zellen in eine 3 ml Quarzküvette pipettiert. Die enzymatische Reaktion wurde gestartet, indem 2,88 ml einer vorher zubereiteten 10 mM H₂O₂ Lösung in destilliertem Wasser hinzugefügt wurden. Die erste Messung jeder einzelnen Küvette diente dabei als Referenz. Im Anschluss daran wurden die Proben für 10 min aller 30 s mit Licht der Wellenlänge 240 nm bestrahlt und die Absorption gemessen. Durch die abnehmende Absorption ergaben sich lineare Graphen mit bestimmten Steigungen. Aus den Anstiegen lassen sich die Enzymaktivitäten quantifizieren. Eine Standardkurve wurde mit Hilfe von aufgereinigtem Enzym (Sigma aldirch) entwickelt, wobei unter den selben Bedingungen mit unterschiedlichen, bekannten Aktivitäten von Katalase gearbeitet wurde. Alle Messungen wurden mit einem Spektrophotometer (Ultrospec 2100 pro) bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.9 Killingassays

3.9.1 CD33 Färbung der CHO-Zellen

Eine Voraussetzung für die Durchführung der Experimente zur zytolytischen Aktivität von CD8⁺ T-Zellen ist die stabile Transfektion der CHO-Zellen mit CD33. Zur Überprüfung dessen wurde ein Verfahren angewendet, dass auf der Fluoreszenz eines anti-CD33-Antikörpers beruht. Zuvor wurden die CHO-Zellen in 3 ml Medium verdünnt und in eine 6-well-Platte (Falcon) pipettiert. In jedes Well wurde vorher ein autoklaviertes Deckglas (Ø 25 mm, Stärke 1, Kindler) gegeben, auf dem die Zellen dann festwachsen konnten. Einen Tag später wurden die auf dem Deckglas adhärennten CHO-Zellen in eine Kammer gebracht, die mit Silikonfett fest verschlossen wurde. Des Weiteren verfügte diese Kammer über zwei Öffnungen, mit deren Hilfe das Spülen oder ein Lösungswechsel im Verlauf der Messung möglich war. Unter dem Mikroskop wurde zunächst eine Durchlichtaufnahme mit einem 20 fach vergrößernden Objektiv gemacht, bevor der selbe Bereich mit einem für den Farbstoff R-Phycoerythrin geeigneten Filtersatz aufgenommen wurde, um die Hintergrundfluoreszenz zu bestimmen. Anschließend wurden ca. 50 µl einer 1:10 verdünnten Lösung des R-PE markierten anti-CD33 Antikörpers in die Kammer gesaugt. Es folgte eine zwanzigminütige Inkubation, bevor abermals mit Medium gespült wurde, um den nicht-zellgebundenen

Antikörper zu entfernen. Im Anschluss wurde die Aufnahme wiederholt. Angeregt wurde dabei mit einem Doppelfiltersatz (Wellenlängen 470 bzw. 556 nm). Das Emissionslicht wurde mit 510 nm detektiert (Filtersatz: 56 HE GFP Ds/Red).

3.9.2 CHO/T-Zell Verbindung mittels Fusionsprotein

Das ursprünglich für die Untersuchung von T-Zellproliferation von der Arbeitsgruppe um Christoph Renner (USZ Zürich) entwickelte anti-CD3/anti-CD33 Fusionsprotein wird in der vorliegenden Dissertation als „Bindeglied“ zwischen zytotoxischen T-Lymphozyten und CHO-Zellen genutzt. Mithilfe dieses Proteins kann ein Zell-Zell-Kontakt hergestellt werden, der einer möglichst physiologischen Form der fokalen Stimulation nahe kommt. Dabei befindet sich der CD3-Anteil, welcher wichtiger Bestandteil des TCR ist, auf der CD8⁺ T-Zelle und das CD33-Molekül auf der so transfizierten CHO-Zelle. Die über den bispezifischen Antikörper vermittelte Zell-Zell-Interaktion führt zu einer Ausschüttung von sekretorischen Lysosomen des CTLs, welche den Tod der CHO-Zelle zur Folge hat. Dieses Prinzip soll hier bei der Analyse der Effektivität des Killing-Prozesses in Abhängigkeit der zugeführten H₂O₂-Konzentration behilflich sein.

3.9.3 Vorbereitung der CHO- bzw. T-Zellen

Die CD8⁺ T-Zellen wurden wie in 3.4 beschrieben mit dem Standard T-Zellexpander für ca. 72 Stunden stimuliert, anschließend die Beads magnetisch entfernt und die Zellen in frisches Medium aufgenommen, sodass eine Zellkonzentration von 10000 T-Zellen auf 50 µl AIMV-Medium vorlag.

Die CHO-Zellen wurden wie in 3.1 beschrieben mit 0,5 mM EDTA enthaltendem PBS aus der Kulturflasche gelöst, anschließend gezählt und in 96-well-Platten überführt, wobei jedes Well 10000 CHO-Zellen suspendiert in 100 µl des CHO-Zell-Mediums beinhaltet. Die Platten wurden dann für 12-16 Stunden bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert, um eine ausreichende Adhärenz der CHO-Zellen am Boden der 96-well-Platte zu sichern.

3.9.4 Durchführung

Nach der Inkubation wurde das alte Medium entnommen und 50 µl der vorbereiteten T-Zell Suspension in die Wells gegeben. Zusätzlich wurden weitere 50 µl AIMV-Medium hinzu gegeben, welches den anti-CD3/CD33 Antikörper in einer Konzentration von 2 µg/µl enthielt. Die negativ Kontrolle für jedes dieser Tripel bestand in der Zugabe von 50µl AIMV-Medium ohne den Antikörper. Des Weiteren wurden 10 µl einer Lösung verschiedener Konzentrationen von H₂O₂ in PBS hinzugefügt. Die Kontrolle bestand hierbei in der Zugabe von reinem PBS. Es existierten schließlich fünf verschiedene Konzentrationen H₂O₂ und eine Kontrolle mit PBS. Für jede Konzentration wurden sechs Wells genutzt: ein Tripel mit und eines ohne den Antikörper. So wurde erreicht, dass jede der Konditionen ihre eigene Kontrolle erhält. Anschließend wurden die Platten erneut 24 Stunden inkubiert. Am Tag der Messung wurde der Inhalt der Wells entfernt und diese einmalig mit 200 µl vorgewärmten PBS gespült, bevor 200 µl frisches, ebenfalls gewärmtes AIMV-Medium in jede Vertiefung pipettiert wurde. Durch das Spülen wurden die T-Zellen bzw. abgestorbene CHO-Zellen entfernt. Danach wurde in jedes Well 20 µl Cell-Titer-Blue gegeben, um die Vitalität der verbleibenden CHO-Zellen bestimmen zu können. Nachfolgend wurde die Platte 3 Stunden in den Inkubator gebracht. Schließlich wurde mit dem Mikroplate- Reader gemessen. Die Platte wurde vor der Messung 10 s automatisch bei geringer Intensität gerüttelt. Der im Cell-Titer-Blue vorkommende Farbstoff Fluorescein wurde mit einer Exzitationswellenlänge von 535 nm angeregt und das emittierte Licht der Wellenlänge 590 nm gemessen.

3.9.5 Kontrollexperimente

Um die alleinige Toleranz der CHO- und der T-Zellen auf H₂O₂ zu testen, wurden zusätzlich Kontrollexperimente durchgeführt. Hierfür wurden die CHO-Zellen wie oben beschrieben vorbereitet, in gleicher Anzahl auf die 96-Well-Platten verteilt (10000 Zellen/Well) und 10 µl einer H₂O₂-Lösung in PBS verschiedener Konzentrationen hinzugefügt. Analog wurden die CD8⁺ T-Zellen allein in die Platten verteilt und ebenfalls verschiedenen Konzentrationen von H₂O₂ ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen wie in der Durchführung beschrieben 24 Stunden inkubiert, bevor die Vitalitätsprüfung mit Cell-Titer-Blue erfolgte. Bei den T-Zellen entfiel der Schritt des Spülens mit PBS, da sie nicht adhärent sind. Als Kontrolle wurden die Zellen parallel mit reinem PBS inkubiert und anschließend gemessen.

4 Ergebnisse

Die Auswertung der Daten wurden mit Microsoft Excel angefertigt.

Signifikanz: · bedeutet $p \leq 5\%$; ·· $p \leq 1\%$; ··· $p \leq 0,1\%$

Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

4.1 ROS Messung in T-Zell/Makrophagen Populationen mit DCF

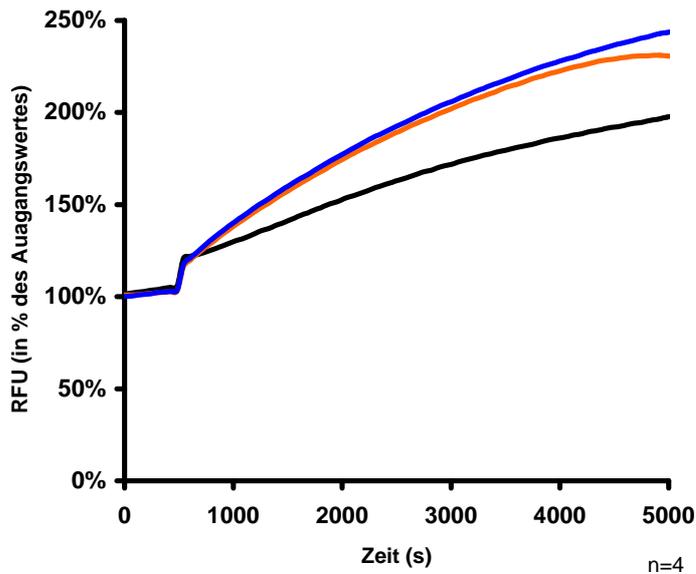
Um den ersten Teil der Arbeitshypothese zu verifizieren, wurden Experimente in einer gemischten Makrophagen/T-Zell Population durchgeführt. Hierfür wurden die Makrophagen bzw. T-Zellen der Jurkat-Zelllinie mit dem fluoreszierenden Farbstoff H_2 -DCFDA (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate) geladen. Dieser Farbstoff reagiert sensitiv auf die intrazelluläre Bildung, oder analog auf die Konzentrationserhöhung von H_2O_2 . Die Anzahl der Makrophagen und T-Zellen wurde dabei den Konditionen in nicht-infizierten Geweben angeglichen, um einen möglichst physiologischen Zustand zu simulieren.

4.1.1 Stimulation von Makrophagen mit PMA

Im ersten Schritt mussten die Makrophagen zur Produktion von ROS angeregt werden, um den „oxidative burst“ zu simulieren. Hierfür wurde Phorbol-12-myristat 13-acetat (PMA) verwendet, eine Substanz, die den Makrophagen aktiviert, maximal stimuliert und damit die Bildung von ROS induziert. Im Einzelnen bewirkt PMA die Assemblierung der NADPH-Oxidase mit der Plasmamembran und überführt das Enzym damit in seinen aktiven Zustand.

4.1.2 Konzentrationsbestimmung von ROS in T-Zellen und Makrophagen

Figur 1 zeigt die Messung der Entstehung von H_2O_2 in mit H_2 -DCFDA geladenen Makrophagen nach Aktivierung mit PMA ($1 \mu M$). Gemessen wurde mit einem Mikroplate Reader über den Zeitraum von 5000 s, wobei alle 60 s Werte registriert wurden. PMA wurde zum Zeitpunkt $T_1 = 500$ s zugegeben, woraufhin eine Steigerung der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) zu beobachten war. Der Anstieg war gegenüber der Negativkontrolle, bei welcher das Lösungsmittel DMSO anstatt PMA zugegeben wurde, deutlich größer. In Anwesenheit von Jurkat-T-Zellen war der Anstieg im Vergleich zu ihrer Abwesenheit ähnlich stark.



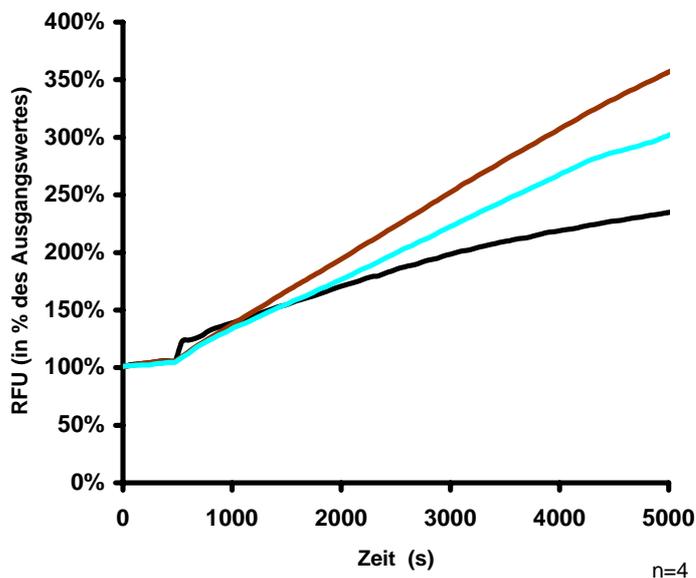
Figur 1

Messung der Entstehung von Wasserstoffperoxid in Makrophagen nach Aktivierung mit PMA mittels Fluoreszenz (DCF) in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Jurkat T-Zellen. Für die Kontrolle wurde DMSO anstelle von PMA hinzugefügt. schwarze Linie: Jurkat T-Zellen; Makrophagen; DMSO
orange Linie: Jurkat T-Zellen; Makrophagen; PMA
blaue Linie: Makrophagen; PMA

Das Experiment zeigt somit zwei entscheidende Dinge: erstens, dass die Stimulation der NADPH-Oxidase zu einer intrazellulären ROS-Produktion in Makrophagen führt und zweitens, dass die T-Zellen die ROS-Produktion und deren Messung nicht oder nur wenig beeinflussen.

Im zweiten Experiment (Figur 2) wurden Jurkat T-Zellen mit H₂-DCFDA geladen, um Aussagen über deren intrazelluläre H₂O₂-Konzentrationen treffen zu können. Hierfür wurden einerseits die T-Zellen allein mit PMA stimuliert, was zu einem Anstieg der RFU gegenüber der Kontrolle führte. Andererseits wurden wieder Makrophagen und T-Zellen gemeinsam mit PMA stimuliert, was eine signifikant größere Steigerung der RFU bewirkte. Als Kontrolle diente wie im ersten Experiment die Zusammensetzung aus Makrophagen, T-Zellen und DMSO. Hieraus ergibt sich, dass auch Jurkat-T-Zellen selbst in geringem Maße H₂O₂ generieren, zusätzlich aber neben ihrer Eigenproduktion von ROS auch von Makrophagen gebildetes H₂O₂ aufnehmen können. Die Daten aus Figur 1 und 2 wurden mit Hilfe einer Standardkurve und nach Subtraktion der Kontrollkurven (RFU der nicht stimulierten Makrophagen und Jurkat-T-Zellen) quantifiziert. Dabei ergab sich, dass die mit PMA stimulierten Makrophagen nach 5000 s in Abwesenheit von T-Zellen eine H₂O₂-Konzentration in Höhe von etwa 436 µM erreichen. In Gegenwart der Jurkat-T-Zellen reduziert sich die gemessene Konzentration auf ca. 352 µM. Jurkat-T-Zellen selbst produzieren nach Stimulation durch PMA ebenfalls ROS (108 µM), nehmen aber auch einen Teil des von Makrophagen gebildeten H₂O₂ auf. Aus der Gesamtkonzentration von 192 µM (Experiment 2) in der Messung mit PMA, Makrophagen und T-Zellen errechnet sich eine

Konzentrationserhöhung in Jurkat-T-Zellen, abzüglich der in den Jurkat-T-Zellen selbst gebildeten $108 \mu\text{M}$, in Höhe von $84 \mu\text{M}$. (aufgenommene Menge H_2O_2).



Figur 2

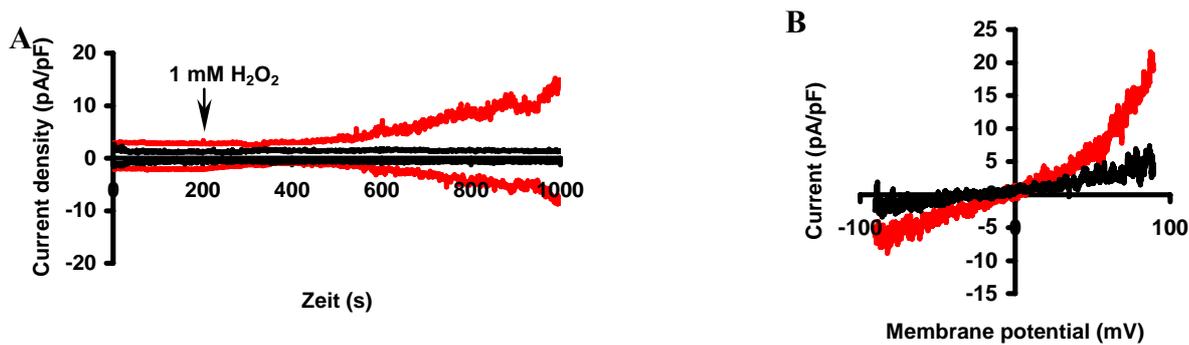
Fluoreszenzmessung der Wasserstoffperoxidkonzentration in mit DCF geladenen Jurkat T-Zellen in Gegenwart bzw. Abwesenheit von THP-1 Makrophagen. Die Kontrolle bestand hier aus T-Zellen und nicht aktivierten (kein PMA) Makrophagen. schwarze Linie: T-Zellen; Makrophagen; DMSO
türkise Linie: T-Zellen; PMA
braune Linie: T-Zellen; Makrophagen; PMA

4.2 Wirkungen von ROS auf den Calciumhaushalt von CD4^+ -T-Zellen

Aus den ersten beiden Experimenten geht klar hervor, dass T-Zellen das beim „oxidative burst“ entstandene H_2O_2 zum Teil aufnehmen und damit mindestens Konzentrationen im μM -Bereich ausgesetzt sind. Um die Wirkung des aufgenommenen H_2O_2 auf intrazelluläre Prozesse besser zu verstehen, stellte sich im nächsten Schritt die Frage nach der Beeinflussung des Calciumhaushaltes, ferner der Ca^{2+} -abhängigen T-Zell-Aktivierung durch H_2O_2 . Hierfür wurden von Bogeski et al. umfangreiche Experimente mittels Patch-clamp- und Imaging-Technik durchgeführt, die eine Beeinflussung des T-Zell-Calciumhaushaltes auf drei verschiedenen Wegen zeigten.

4.2.1 Aktivierung von Kationenströmen

Als erstes fanden wir eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration über nicht-selektive Ionenkanäle, welche experimentell mit der Patch-clamp Technik untersucht wurde. Es wurden Ströme gemessen, die in ihrer Entwicklung und Strom-Spannungs-Relation am wahrscheinlichsten auf den TRPM2-Kanal hindeuten. Überdies konnten die Ströme durch Flufenaminsäure (FFA) fast vollständig gehemmt werden, was diese These stützt, da FFA schon im Vorfeld als Antagonist von TRPM2 identifiziert wurde [Hill et al.,2004]. Auch bekannt ist die mögliche Aktivierung von Strömen über den TRPM2-Kanal durch H₂O₂ [Kraft et al.,2004], ebenso wie die Expression von TRPM2-Kanälen in T-Zellen [Schwarz et al.,2007]. Um sicher zu gehen, dass der Calciumeinstrom auf die oxidierenden Eigenschaften von H₂O₂ zurückzuführen ist, wurden Imaging-Experimente unter Zugabe des reduzierenden Agens Dithiothreitol (DTT) durchgeführt, welches den Calciuminflux drastisch verringerte. Daraus kann geschlossen werden, dass die H₂O₂-abhängige Oxidation zur Aktivierung eines Kationenstroms führt, welcher aller Voraussicht nach hauptsächlich TRPM2-vermittelt ist. (Figur 3) Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Kanäle der TRP-Familie am Ca²⁺-Einstrom beteiligt sind.



Figur 3

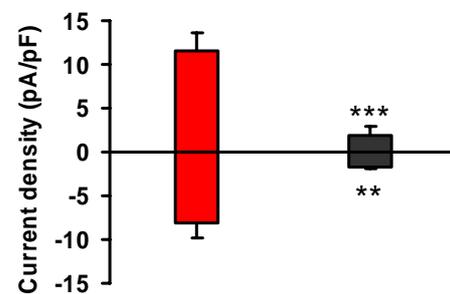
H₂O₂ aktiviert nonselektive Kationenströme in Jurkat T-Zellen

(A) Patch-clamp-Messungen der Entwicklung von einwärts und auswärts gerichteten Strömen nach Stimulation mit 1mM H₂O₂ (rote Kurve) bzw. nach Inhibition durch Inkubation mit 100μM FFA (schwarze Kurve).

(B) Strom-Spannungs-Relationen von mit 1mM H₂O₂ (rote Kurve) bzw. 100μM FFA (schwarze Kurve) behandelten Zellen.

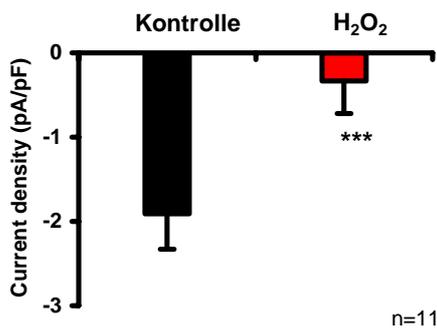
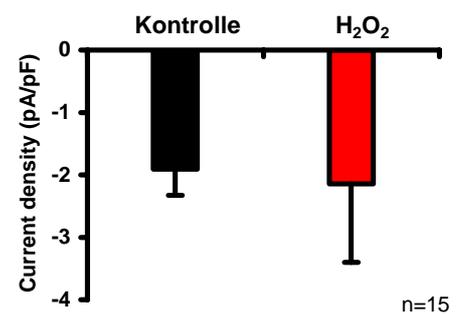
(C) Durchschnittliche Stromdichte von mit 1mM H₂O₂ (roter Balken) bzw. 100μM FFA (schwarzer Balken) behandelten Zellen.

C



4.2.2 Hemmung der CRAC-Kanäle

Des Weiteren fanden wir einen Effekt von H₂O₂ auf die CRAC-Kanäle. Hierfür wurden Patch-clamp-Versuche an Jurkat-T-Zellen durchgeführt. Ströme wurden in Gegenwart von H₂O₂ bzw. DTT und H₂O₂ gemessen. Es zeigte sich, dass mit 500 μM H₂O₂ inkubierte Zellen eine Reduktion des CRAC-Stroms von ca. 83 % gegenüber der Kontrollgruppe aufweisen. Mit Hilfe des reduzierenden DTTs gelang es diesen inhibitorischen Effekt partiell zu vermeiden, was prinzipiell vermuten lässt, dass die Inhibition des I_{CRAC} auf Oxidation durch H₂O₂ zurückzuführen ist. Interessanterweise kann H₂O₂ einmal aktivierte CRAC-Ströme nicht inhibieren, was zu der Annahme führt, dass H₂O₂ mit dem Aktivierungsmechanismus von CRAC interferiert, jedoch nicht mit den geöffneten Kanälen. (Figur 4)

A**B****Figur 4**

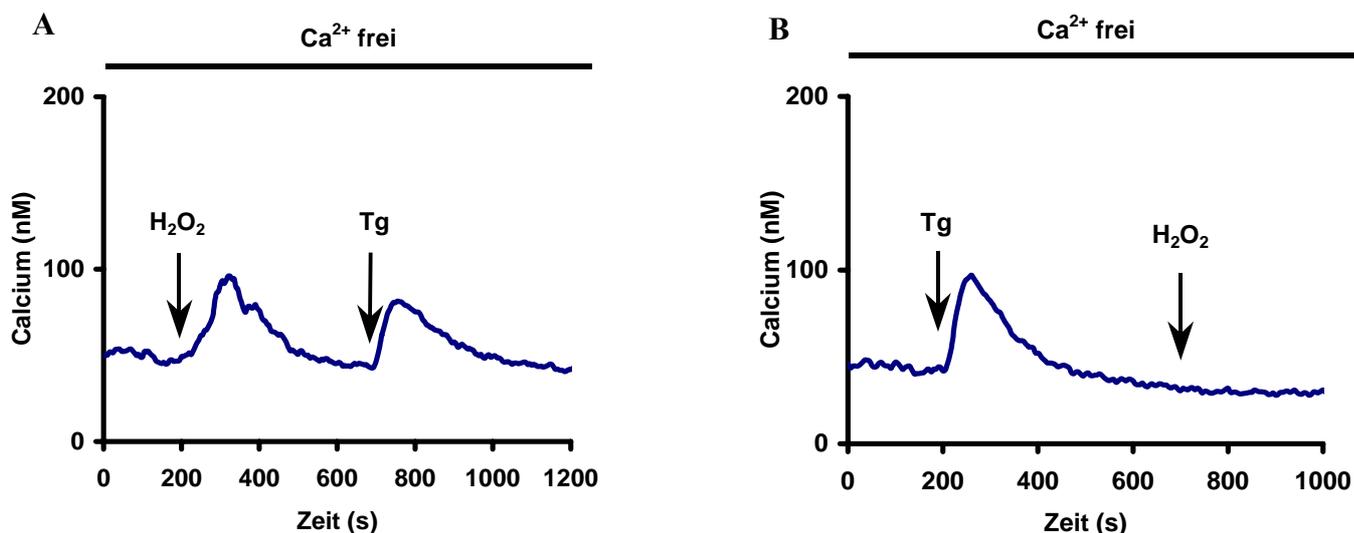
Der Effekt von H₂O₂ auf I_{CRAC} in Jurkat T-Zellen.

(A) Messungen der Stromdichte in Kontrollzellen (schwarzer Balken) bzw. in mit 500 μM H₂O₂ vorinkubierte T-Zellen (roter Balken).

(B) gleiche Bedingungen aber Zugabe von H₂O₂ nach vorheriger Entwicklung des I_{CRAC}

4.2.3 Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher

Als drittes untersuchten wir den Effekt von H₂O₂ auf die intrazellulären Calciumspeicher, das ER. Durch Behandlung mit H₂O₂ wurde eine Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher induziert. Die Folge ist eine Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration. Höchstwahrscheinlich funktioniert dieser Mechanismus über eine direkte Aktivierung des redox-sensitiven IP₃-Rezeptors [Mikoshiya, 2007]. Zunächst wurden Imaging-Experimente mit Jurkat-Zellen durchgeführt. Die mit Fura-2AM geladenen Zellen befanden sich dabei in einem Ca²⁺-freien Puffer. Nach Zugabe einer H₂O₂-Konzentration von 500 μM, wurde ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ([Ca²⁺]_i) gemessen. Die nachfolgende Behandlung der Zellen mit Thapsigargin (TG), welches als Antagonist an den Ca²⁺-Pumpen des ER (SERCA Pumpen) wirkt, führte zu einem weiteren Anstieg von [Ca²⁺]_i. Wurde zuerst TG und anschließend H₂O₂ zugegeben, konnte nur ein einmaliger Anstieg von [Ca²⁺]_i ausgelöst werden. DTT war durch seine reduzierenden Eigenschaften in der Lage den Effekt von H₂O₂ auf das ER komplett aufzuheben. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass H₂O₂ die intrazellulären Calciumspeicher mobilisiert, ohne das im ER vorkommende Calcium komplett zu entleeren. (Figur 5)

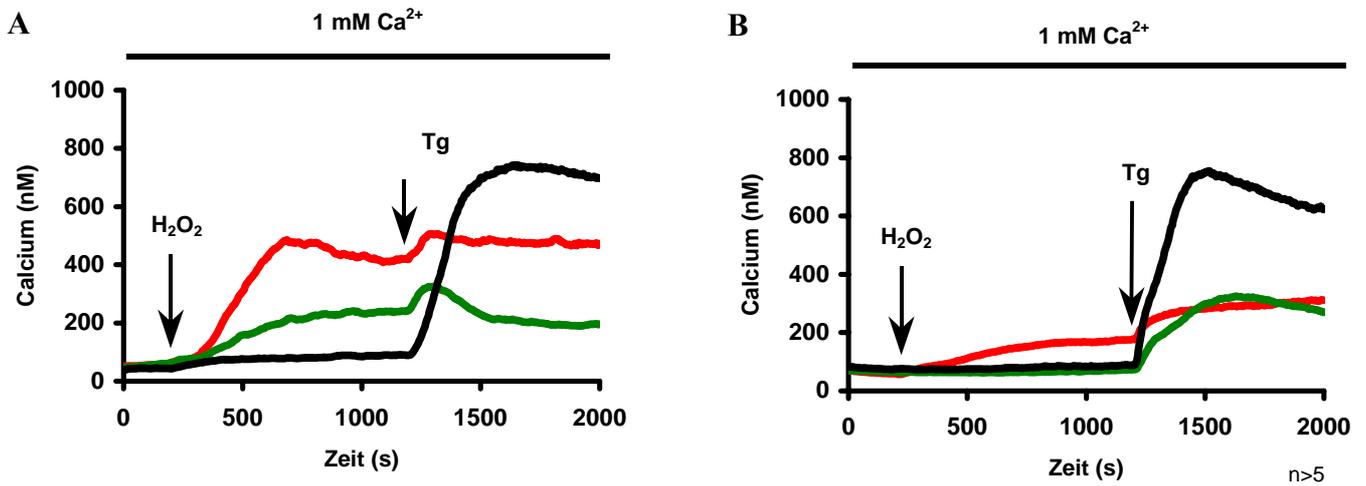


Figur 5

Der Effekt von H_2O_2 auf die intrazellulären Calciumspeicher (ER) in Jurkat T-Zellen. Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde unter Verwendung des Ca^{2+} -Imaging-Verfahrens im Ca^{2+} freien Bad bestimmt. $500\mu\text{M}$ H_2O_2 bzw. $1\mu\text{M}$ Tg wurden an den mit Pfeil gekennzeichneten Zeitpunkten hinzugefügt.

4.2.4 Unterschiede zwischen CD4^+ naiven- und Effektor-T-Zellen

Während Jurkat-T-Zellen ein gutes Modell für die Betrachtung genereller Probleme im Bereich der zellulären Signalkaskaden darstellen, erlauben sie nicht in jedem Fall sichere Voraussagen bezüglich primärer humaner T-Zellen. Deshalb wurden die Ca^{2+} -Imaging-Experimente unter Verwendung von primären CD4^+ -naiven und Effektor-T-Zellen wiederholt. Alle in Jurkats gefundenen Effekte treten qualitativ auch in den primären Zelltypen auf, wobei sich Unterschiede auf quantitativer Ebene ergeben (Figur 6). In einer 1 mM Ca^{2+} -Lösung zeigten naive T-Zellen bereits bei einer H_2O_2 -Konzentration von $10\mu\text{M}$ eine signifikante Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$, während die signifikante Steigerung in T-Effektorzellen erst bei H_2O_2 -Konzentrationen von 1 mM feststellbar war. Die hier auftretende $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung ist als kombinierter Effekt von Kationeneinstrom (TRP-Kanäle) und Entleerung der Speicher aufzufassen. Figur 7 zeigt ein Experiment, welches selektiv den Unterschied bezüglich der Ca^{2+} -Speicher untersucht. Eine Einstellung der H_2O_2 -Konzentration auf $500\mu\text{M}$ hat in den naiven Zellen eine direkte, drastische Steigerung zur Folge ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ von ca. 20 auf 70 nM), in den T-Effektorzellen ist diese kaum oder nicht sichtbar.



Figur 6

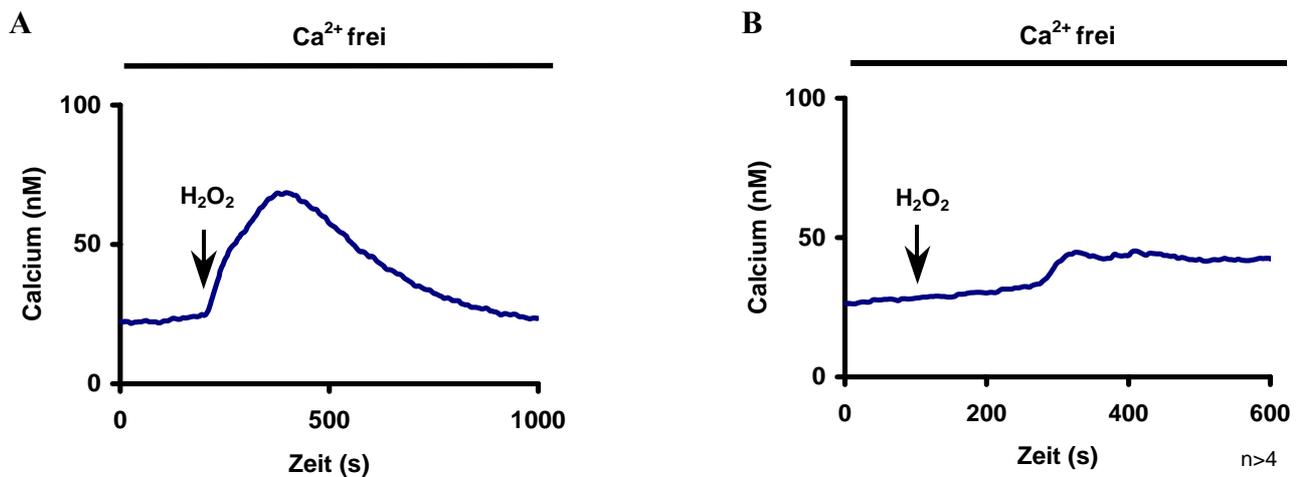
Auswirkung von H₂O₂ auf die Erhöhung von [Ca²⁺]_i in CD4⁺ naiven (A) und Effektor-(B) T-Zellen. 500 μM H₂O₂ bzw. 1 μM Tg wurden an den mit Pfeil gekennzeichneten Zeitpunkten hinzugefügt.

schwarze Kurve: Kontrolle

grüne Kurve: 100 μM H₂O₂

rote Kurve: 1 mM H₂O₂

Bestimmung von [Ca²⁺]_i mittels Fluoreszenz Ca²⁺-Imaging.



Figur 7

Effekt von H₂O₂ auf intrazelluläre Calcium Speicher (ER) in CD4⁺ naiven (A) und Effektor-(B) T-Zellen.

Die [Ca²⁺]_i wurde unter Verwendung des Ca²⁺-Imaging Verfahrens im Ca²⁺ freien Bad bestimmt.

500 μM H₂O₂ wurden an den mit Pfeil gekennzeichneten Zeitpunkten zugegeben.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die in Jurkat-T-Zellen beobachteten Effekte ebenso in primären T-Zellen auftreten. Die Auswirkungen auf naive bzw. Effektor-T-Zellen sind jedoch stark verschieden. So fällt der Einfluss auf die Ca²⁺-Homöostase der T-Effektorzellen insgesamt wesentlich geringer aus.

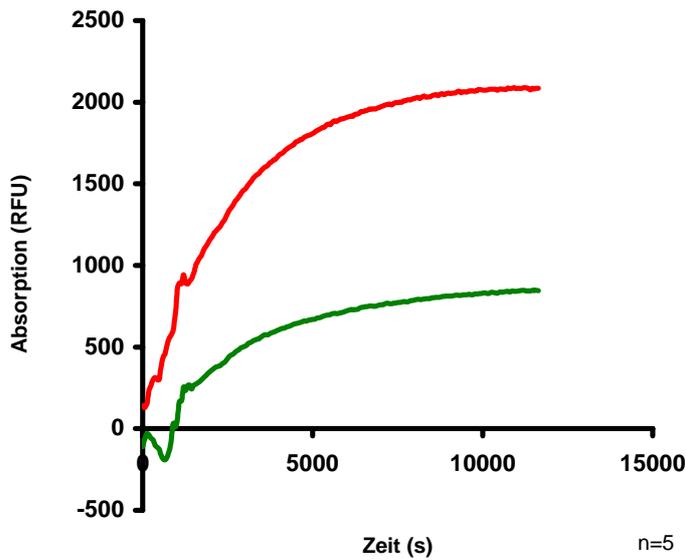
4.3 Vergleich des Redox-Eigenschaften von CD4⁺ naiven und Effektor-T-Zellen

Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, warum naive bzw. Effektor-T-Zellen verschieden auf gleiche Einflüsse, d.h. gleiche H₂O₂-Konzentrationen, reagieren. Grundlagen dieser Überlegung waren einerseits die oxidierenden Eigenschaften von H₂O₂, andererseits die Tatsache, dass die Effekte durch das reduzierende Agens DTT vermindert oder ausgelöscht werden konnten. Es wurde eine Hypothese entwickelt, wonach die Ursache dieser Divergenz, bezüglich der Wirkungen von H₂O₂, in der Ungleichheit des zellulären Redox-Potentials der beiden Zelltypen liegt. Um die reduzierenden Eigenschaften der beiden Zelltypen zu vergleichen, wurden zwei der wichtigsten zytosolischen Redox-Systeme analysiert: das Glutathion/ Glutathiondisulfid-System und das Enzym Katalase.

4.3.1 Glutathion

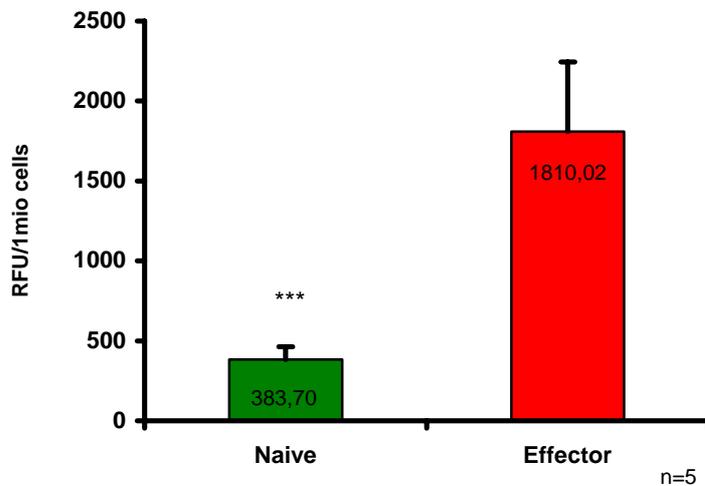
Um Informationen über die Verschiedenheit der Glutathion-Levels in den beiden Zelltypen zu gewinnen, standen die beiden fluoreszierenden Substanzen Monochlorobimane (MCB) und o-Phthaldialdehyd (oPA) zur Verfügung. MCB ist eine chemische Verbindung, die enzymatisch auf Glutathion Moleküle übertragen wird und dadurch stark fluoreszierende Eigenschaften erhält. Mit Hilfe von MCB ist es möglich, Aussagen über die Gesamtkonzentration von Glutathion in Zellen zu erlangen. oPA ist ebenfalls ein Stoff mit fluoreszierenden Eigenschaften, wird hingegen aber nicht-enzymatisch an Glutathion Moleküle gebunden. Der entscheidende Unterschied ist, dass oPA ausschließlich an die reduzierte Form von Glutathion (GSH) bindet, womit sich in diesem Fall nur die vorhandene Menge reduziertem Glutathion bestimmen lässt.

Figur 8 zeigt den kinetischen Verlauf der Messung des Gesamtglutathions mittels MCB, welches zu Beginn des Versuchs in die Wells pipettiert wurde. An der Steigerung der RFU und der Hyperbelform der beiden Kurven ist der enzymatische Charakter der Reaktion erkennbar. Nach ca. 10000 s erreicht der asymptotische Verlauf sein Maximum. Der eigentliche Vergleich der Glutathion-Level erfolgt nach Berücksichtigung der Zellzahl, wobei die RFU durch die Konzentration der gemessenen Zellen (Mio Zellen/ml) geteilt wurden, sodass die Einheit RFU/10⁶ Zellen entsteht. Die Darstellung dessen findet sich in Figur 9. Hierbei zeigt sich, dass die Gesamtmenge an Glutathion in T-Effektorzellen durchschnittlich 4,7 mal höher ist, als in naiven T-Zellen. T-Zellen des naiven Typs verfügen also nur über 21 % der GSH/GSSG-Menge von Effektor-T-Zellen.



Figur 8

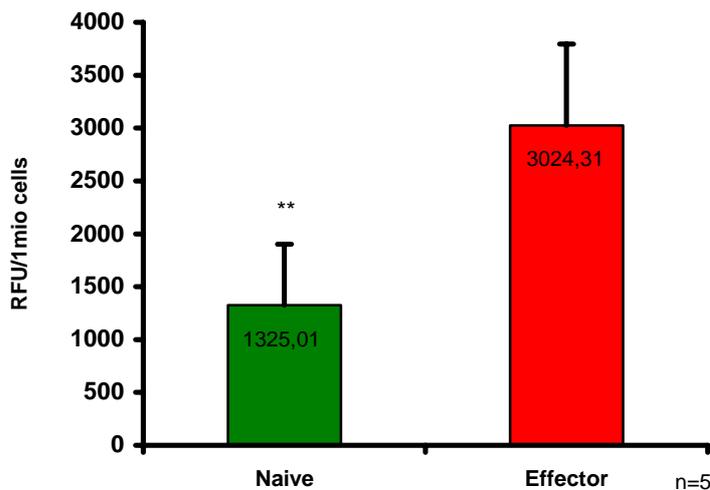
Darstellung der kinetischen Messung von Glutathion mittels MCB in naiven (grüne Kurve) und Effektor-T-Zellen (rote Kurve).



Figur 9

Vergleich der Gesamtmenge an Glutathion in $CD4^+$ naiven und Effektor-T-Zellen anhand von Absorption mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffs Monochlorobimane (MCB).

Figur 10 zeigt die Messung der relativen Menge an reduziertem Glutathion (GSH) anhand der Absorption unter Benutzung des Farbstoffs oPA. Da für die Experimente mit oPA und MCB jeweils die gleichen Zelllysate verwendet wurden, konnte hier ebenfalls unter Zuhilfenahme der Einheit RFU/ 10^6 Zellen sinnvoll verglichen werden. Dabei zeigte sich erwartungsgemäß ein rund 2,3 mal größerer Quotient in den T-Effektorzellen, woraus sich schließen lässt, dass naive T-Zellen nur über 44 % der Menge GSH verfügen, welche in den T-Effektorzellen vorhanden ist.



Figur 10

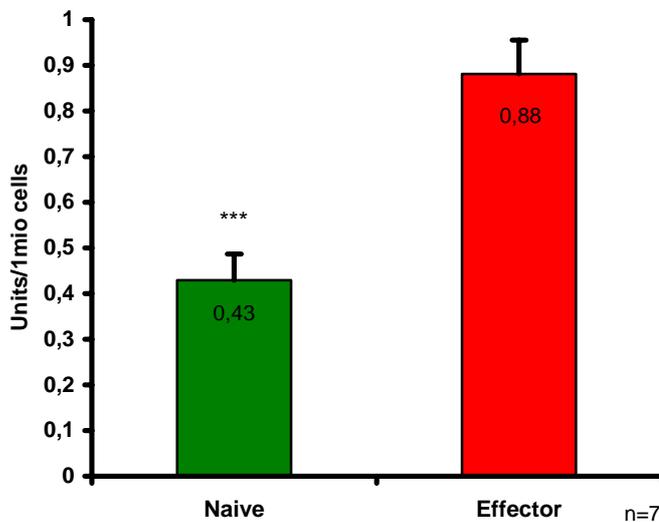
Vergleich der Menge an reduziertem Glutathion in $CD4^+$ naiven- und Effektor-T-Zellen anhand von Absorption mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffs o-Phthalaldehyd (oPA)

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass sowohl die Gesamtmenge, als auch die Menge an reduziertem Glutathion in T-Effektorzellen gegenüber naiven T-Zellen deutlich erhöht ist.

4.3.2 Katalase

Um die Katalaseaktivität in $CD4^+$ naiven und Effektor-T-Zellen vergleichen zu können, wurde ein spektrophotometrisches Verfahren verwendet. Grundlage dessen ist die starke Absorption von Wasserstoffperoxid bei einer Wellenlänge von 240 nm. Da das Enzym Katalase den direkten Umsatz von Wasserstoffperoxid zu Wasser und molekularem Sauerstoff katalysiert, konnte die Aktivität des Enzyms über die Abnahme der Absorption bestimmt werden. Hierbei ergeben sich durch die Absorptionsminderung über die Zeit lineare Verläufe mit konstanter Steigung. Die Linearität der Funktion war ein wichtiger Hinweis darauf, dass das Enzym Katalase mit kontinuierlicher Geschwindigkeit arbeiten kann und dessen Substrate nicht verbraucht werden. Es wurde eine Eichkurve bestimmt, indem bekannte enzymatische Aktivitäten den gemessenen Anstiegen zugewiesen wurden. Anschließend wurden die Durchschnittswerte der experimentell ermittelten Steigungen in die Standardkurve übertragen und die enzymatische Aktivität abgelesen. Nach Berechnung des Verdünnungsfaktors und Einbeziehung der Zellkonzentration in den Lysaten war es möglich die Katalaseaktivität für naive und Effektor-T-Zellen in Zahlenwerten anzugeben, dargestellt in Figur 11. Es ist zu sehen, dass T-Effektorzellen mehr als die doppelte Katalaseaktivität

(0,88 U/1 Mio Zellen) im Vergleich zu ihren unstimulierten Vorstufen (0,43 U/1 Mio Zellen) aufweisen.



Figur 11
Spektrophotometrischer Vergleich der Katalaseaktivität von CD4⁺ naiven- und Effektor-T-Zellen.

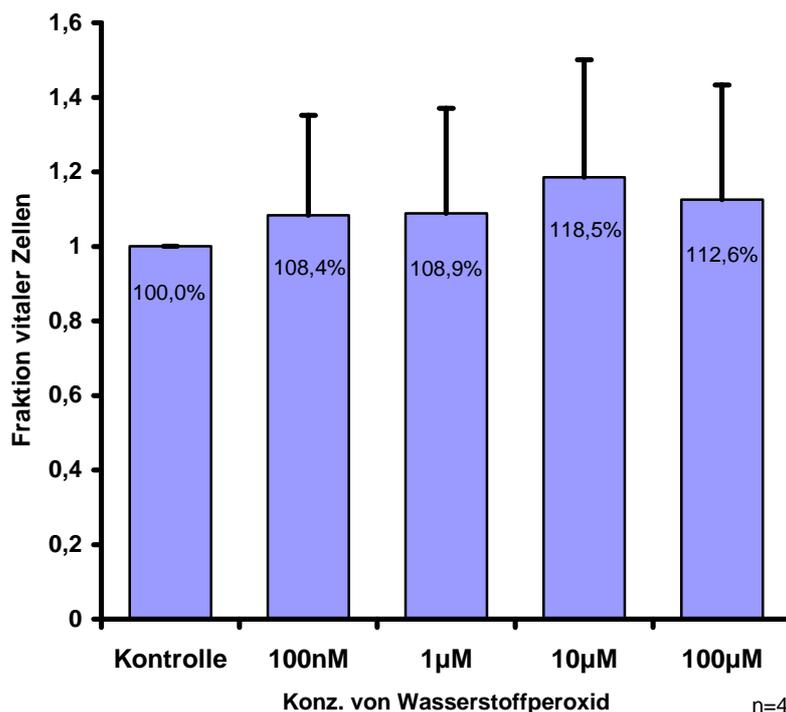
Dieses Experiment ist ein direkter Beweis dafür, dass CD4⁺ T-Zellen mit Effektorstatus oxidierende Substanzen, wie in diesem Fall H₂O₂, wesentlich effektiver umsetzen können als die unstimulierten, naiven T-Zellen.

4.4 Wirkungen von ROS auf die zytotoxische Aktivität von CD8⁺-T-Zellen

Die nachfolgenden Experimente dienen der Untersuchung des Einflusses von ROS auf die zytolytische Aktivität von CD8⁺-T-Effektorzellen. Das Prinzip basiert, wie in 3.8.2 genauer erläutert wurde, auf einer Zell-Zell-Verbindung, die durch ein Fusionsprotein realisiert wird, welches über eine antigene Determinante für CD33 und CD3 verfügt und damit einen Link zwischen den T-Zellen und den CHO-Zellen herstellen kann. Der CTL wird so in die Lage versetzt, sein zytolytisches Potential auf die CHO-Zelle zu entfalten. Das Ziel dieser Versuche besteht darin zu prüfen, ob die Effektivität des Killing-Prozesses hinsichtlich der zugeführten Menge an H₂O₂ veränderlich ist.

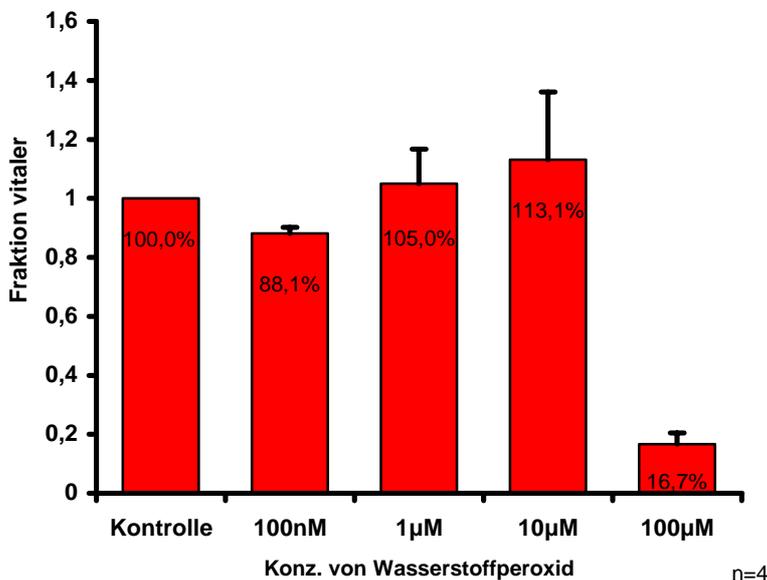
4.4.1 Kontrollexperimente mit CD8⁺ T-Zellen und CHO-Zellen

Zunächst wurde eine Versuchsreihe gestartet, die den Anteil überlebender Zellen nach 24h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von H₂O₂ darstellt. In Figur 12 ist die Fraktion vitaler CHO-Zellen gemessen an der Kontrollgruppe aufgetragen. Es zeigt sich, dass CHO-Zellen auf H₂O₂-Konzentrationen zwischen 100 nM und 100 µM mit einem leicht erhöhten Anteil überlebender Zellen reagieren. Dies geht aus den Werten im Balkendiagramm hervor, die durchschnittlich über 100 % liegen, was bedeutet, dass mehr Zellen bei Anwesenheit von H₂O₂ vital waren als in der Kontrollgruppe ohne H₂O₂. Die CD8⁺ T-Zellen (Figur 13) reagieren bei H₂O₂-Konzentrationen von 10 µM und 1 µM ebenfalls mit einer leichten Erhöhung der vitalen Fraktion gegenüber der Kontrolle (113% und 105%), während der Anteil überlebender T-Zellen bei einer H₂O₂-Konzentration von 100 nM auf 88 % der Kontrollgruppe sinkt. Im Gegensatz zu CHO-Zellen, deren Vitalität bei einer Konzentration von 100 µM H₂O₂ eher gefördert wird (113 % gegenüber der Kontrolle), tolerieren die T-Lymphozyten Konzentrationen in dieser Höhe zunehmend schlechter. Nur noch 17% überlebten hier die Zeit der Inkubation. Für H₂O₂-Konzentrationen im mM Bereich sinkt der Anteil überlebender Zellen beider Arten auf nahezu null.



Figur 12

Anteil vitaler CHO nach 24h Inkubation in Abhängigkeit der zugeführten H₂O₂-Konzentration. Hierbei entspricht der Wert 1 der Menge an CHO-Zellen, die in der Kontrolle (ohne H₂O₂) nach 24h noch vital sind.

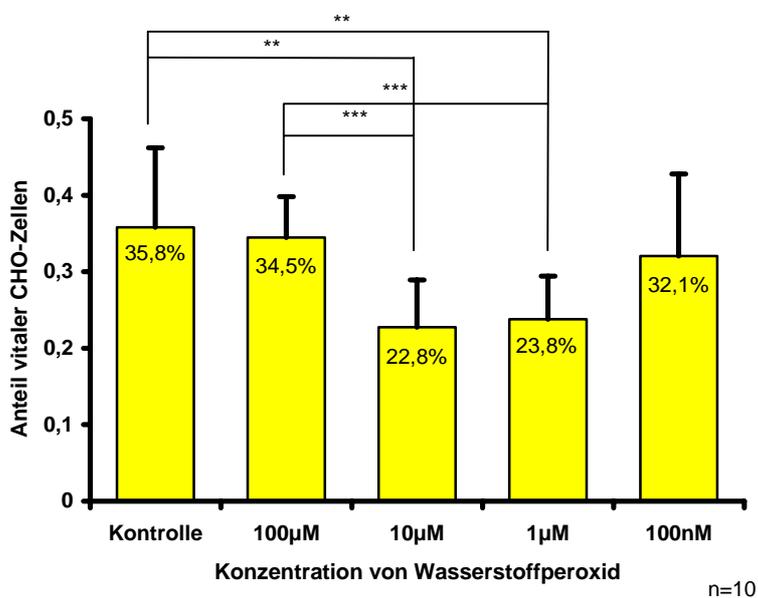


Figur 13
 Anteil vitaler CD8⁺ Effektor-T-Zellen nach 24h Inkubation in Abhängigkeit der zugeführten H₂O₂ Konzentration. Hierbei entspricht der Wert 1 der Menge an T-Zellen, die in der Kontrolle (ohne H₂O₂) nach 24h noch vital sind.

4.4.2 „Killing-Effektivität“ in Abhängigkeit der H₂O₂-Konzentration

Figur 14 zeigt das Balkendiagramm, in welchem die Fraktion vitaler CHO-Zellen nach 24 h Inkubation in Abhängigkeit der zugeführten H₂O₂-Konzentrationen dargestellt ist. Für die Kontrolle (PBS anstatt H₂O₂) ergibt sich ein Prozentsatz von durchschnittlich 35,8 % überlebender Zellen. Dieser Betrag entsteht rechnerisch aus einer Division der RFU der Messreihe, welche das Fusionsprotein beinhaltet, geteilt durch ihre Negativkontrolle, also jene Messungen ohne den CD3/CD33-Antikörper (s. auch 3.8.4). Für die Messungen ohne H₂O₂ heißt das, dass die durch das Fusionsprotein entstandene T-Zell/CHO-Zell-Interaktion die Killing-Effektivität der T-Zellen steigert, sodass 64,2 % mehr CHO-Zellen gegenüber der Negativkontrolle getötet wurden. Ebenso sind die Zahlen für die unterschiedlichen H₂O₂-Konzentrationen zu verstehen. Für jede Konzentration existiert eine Messung mit Fusionsprotein, welche einer ohne Zusatz des Antikörpers gegenübersteht. So ist es möglich für jede einzelne Kondition die zytolytische Effektivität der CD8⁺ T-Zellen vergleichend zu beurteilen. Für die H₂O₂-Konzentrationen von 100 nM bzw. 100 µM nimmt der Anteil der vitalen Zellen scheinbar kaum ab (32,1 % bzw. 34,5 %). Allerdings ergeben sich signifikante Änderungen bei den Konzentrationen von 1 µM und 10 µM. Hier weicht die Überlebensquote der CHO-Zellen um mehr als 10 % auf 23,8 % und 22,8 % nach unten ab.

Aus dieser Reihe von Versuchen lässt sich schließen, dass H_2O_2 in bestimmten Konzentrationsbereichen eine Wirkung auf die zytotoxische Aktivität des Systems (Interaktion von $CD8^+$ T-Effektorzellen mit CHO-Zellen) hat, welche die Überlebensquoten der CHO-Zellen signifikant sinken lässt.



Figur 14

Anteil der vitalen CHO-Zellen nach 24h Inkubation mit CD3/CD33 Antikörper (und $CD8^+$ Effektor-T-Zellen) an der Population vitaler CHO-Zellen ohne Fusionsprotein-vermitteltes Killing in Abhängigkeit von zugefügtem H_2O_2 . Für die Kontrolle wurde anstelle von H_2O_2 PBS verwendet.

5 Diskussion

5.1 ROS Produktion in Makrophagen und T-Zellen

In den ersten beiden Experimenten wurde gezeigt, dass durch Stimulation mit PMA eine messbare Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies sowohl in Makrophagen als auch in Jurkat T-Zellen induziert werden konnte. Dass stimulierte Makrophagen reaktive Sauerstoffspezies produzieren, ist schon seit langem unter dem Ausdruck „oxidative“ oder „respiratory burst“ bekannt und ausführlich studiert [Babior et al.,1973]. Anfänglich aber wurde dies hauptsächlich im Kontext der bakteriziden Wirkung von ROS betrachtet. Einen Beweis der Wichtigkeit dieser ROS-spezifischen Funktion liefert die genetische Erkrankung der chronischen Granulomatose. Patienten mit diesem Krankheitsbild leiden unter einem genetischen Defekt, welcher die Funktionalität der NADPH-Oxidase betrifft und in der Folge zu einer verminderten Produktion von ROS führt [Segal,1996]. Die dadurch entstehende Symptomatik entwickelt sich aus der unzureichenden Bekämpfung von für gesunde Menschen ansonsten harmlose Keime. Jedoch gilt neben der Abtötung von Keimen eine Beteiligung von ROS an intrazellulären Signalkaskaden innerhalb der Makrophagen als gesichert [Forman and Torres,2002]. Danach sind ROS in der Lage den Aktivierungsgrad und die Produktion von Zytokinen zu modulieren, um eine ausreichende inflammatorische Antwort der Makrophagen zu gewährleisten. Zum Beispiel konnte in Kupffer-Zellen (den ortständigen Makrophagen der Leber) demonstriert werden, dass ROS die Bildung von TNF- α (Tumor necrosis factor) über einen NF- κ B-abhängigen Signalweg positiv begünstigt [Rose et al.,2000]. Ebenso wurde eine Beteiligung von ROS an der ERK-Kaskade (Extracellular-signal regulated kinase) diskutiert. Prinzipiell wird dieser Signalweg durch Hormone und Wachstumsfaktoren aktiviert und mündet in vermehrter Synthese von Proteinen, die mit Zelldifferenzierung und Proliferation in Verbindung gebracht werden [Abe et al.,1998; Guyton et al.,1996].

Über die von T-Zellen selbst produzierten ROS ist im Vorfeld ebenfalls intensiv geforscht worden. So erarbeiteten Tatla et al. 1999 Ergebnisse, die darauf hinweisen, dass PMA genau wie bei Makrophagen auch bei T-Zellen eine vermehrte intrazelluläre Herstellung von ROS bedingt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die ROS Produktion in T-Zellen abhängig von bestimmten Co-Stimulatoren ist. Interessanterweise wurden hier als maßgeblich fördernd für die ROS Erzeugung CD3, Teil des T-Zell Rezeptors, und CD2 identifiziert. CD2 ist ein für die Adhäsion der T-Zelle wichtiger Co-Rezeptor. Das passende Gegenstück für CD2, also der Agonist, ist CD58. Dieser ist ein Rezeptor auf Monozyten und Makrophagen. Diese

Erkenntnis legt nahe, dass Makrophagen durch eine Interaktion (von CD2 und CD58) in T-Zellen eine erhöhte ROS Produktion bedingen, welche wiederum in Aktivierung von NF- κ B, gesteigerter Synthese von inflammatorischen Proteinen wie IL2, Aktivierung der Ras-Kaskade oder Proliferation resultiert [Lander et al.,1995; Rabesandratana et al.,1992].

Unter Berücksichtigung dieser Informationen ist nicht ganz klar, ob in den Experimenten der vorliegenden Arbeit die T-Zellen tatsächlich einen Teil der von Makrophagen gebildeten ROS aufnehmen, oder ob sie in Gegenwart von Makrophagen durch die eben erwähnte Co-Stimulation selbst mehr ROS generieren. Allerdings ist ersteres wahrscheinlich, da H_2O_2 als ungeladenes Molekül leicht Membranen permeieren kann.

Selbst wenn beide Effekte in Kombination eine Rolle spielen sollten, ist gesichert, dass die Erhöhung der ROS-Konzentration in T-Zellen durch Makrophagen vorhanden ist.

5.1.1 Probleme der Messung von ROS

Die Untersuchungen über Bildung und Wirkung von ROS in biologischen Systemen werden durch Hindernisse bei der Messung in lebenden Zellen und Geweben erschwert. Es existieren verschiedene Methoden, denen aber alle Mängel in Sensitivität, Spezifität und Validierung nachzuweisen sind [Munzel et al.,2002]. Von den verschiedenen etablierten Substanzen für die Detektion von ROS ist die am häufigsten genutzte Fluoreszenzprobe das 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate (H_2 -DCF-DA). H_2 -DCF-DA wird von der Zelle aufgenommen und sofort durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert, wodurch es nicht mehr zellpermeabel ist. Durch die folgende ROS-vermittelte Oxidation entsteht Fluorochrom-Dichlorofluorescein (DCF). Damit erhält DCF reaktiv seine fluoreszierenden Eigenschaften, gleichzeitig wird es aber wieder membranpermeabel, strömt aus der Zelle und kumuliert im extrazellulären Raum. Die Membrangängigkeit ist insbesondere bei Einzelmessungen problematisch. Ein weiteres Problem ist, dass die Reaktionen von H_2 -DCF nicht spezifisch sind und Fluoreszenzantworten auf Reaktion mit unterschiedlichsten Substanzen liefern. Neben einer Autooxidation des H_2 -DCF, stellen die Bildung von $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 aus der Reaktion von H_2 -DCF mit Peroxiden und die Reaktion von H_2 -DCF mit intrazellulären Peroxidasen Probleme in der Messung von ROS dar [LeBel et al., 1992]. Trotz dieser methodischen Einschränkungen ist DCF ein geeigneter Indikator für unsere Untersuchungen, da die beschriebenen systematischen Fehler dennoch Vergleiche zulassen und relativ zuverlässige Aussagen auf qualitativer Ebene erlauben. Vorsicht jedoch ist bei Bewertung der unter 4.1.2 dargelegten Quantifizierung geboten. Zum einen aus den eben erläuterten

Gründen, zum anderen, weil bedacht werden muss, dass der Extrazellulärraum im Modelversuch um ein Vielfaches größer ist als unter physiologischen Bedingungen. In den hier durchgeführten Experimenten betrug der Extrazellulärraum in etwa 99 %, wohingegen Schätzungen aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen von lymphatischen Geweben auf eine sehr viel höhere Zelldichte schließen lassen. Schrumpfte der Extrazellulärraum auf weniger als 15 %, würden sich demzufolge auch für umliegende Zellen mehr als 5-fach höhere ROS-Konzentrationen als die hier gemessenen ergeben.

5.2 ROS und Calcium

Die Wirkungen von reaktiven Sauerstoffspezies auf den Calciumhaushalt der Zelle sollen im Nachstehenden nochmals zusammengefasst und genauer betrachtet werden. Aus den unter 4.2.1 bis 4.2.3 geschilderten Experimenten geht deutlich hervor, dass Oxidantien wie H_2O_2 eine Beeinflussung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Jurkat T-Zellen auf mindestens drei unterschiedlichen Wegen auslösen. Einerseits wird $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch die Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher und durch die Aktivierung von Ionenkanälen erhöht (s. Figur 3 u. 5), andererseits wird der I_{CRAC} in seiner Entstehung gehemmt, was eine drastische Zunahme von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verhindert und damit einer T-Zellaktivierung eher entgegenwirkt (s. 2.1.5). Allerdings kann der CRAC-Strom nur dann inhibiert werden, wenn er noch nicht aktiviert ist. Die Inhibition des Kanals oder seines Öffnungsmechanismus muss vor Einsetzen des I_{CRAC} stattgefunden haben. Sind die Kanäle erst einmal geöffnet, werden sie den oxidierenden Eigenschaften von H_2O_2 gegenüber unempfindlich und der „store-operated“ Ca^{2+} -Einstrom findet in vollem Umfang statt (Figur 4).

Insgesamt ergibt sich damit ein vielschichtiges Muster von Möglichkeiten, die Calciumsignale in der T-Zelle mit Hilfe von ROS zu modulieren. Ein Erklärungsversuch für diese komplexen Regulationsvorgänge stellt die Idee von oszillierenden Calciumsignalen in der Zelle dar [Woods et al.,1986; Lewis,2003; Cobbold and Cuthbertson,1990]. Hiernach ist die intrazelluläre Calciumkonzentration niemals konstant, sondern im ständigen Wandel. Die Vielzahl von Calciumkanälen, Pumpen und Calcium-abhängigen Proteinen sind die Ursachen dieser Veränderlichkeit. Voraussetzung ist auch der hohe Konzentrationsgradient zwischen Intra- und Extrazellulärraum (ca. 1:10000), der für die Schnelligkeit der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderungen zum Beispiel bei Öffnung von Kationenkanälen eine wichtige Rolle spielt. Die Bedeutung dieser Oszillationen liegt vermutlich in der Feinabstimmung von Signalkaskaden. Demzufolge kann eine auf hohem Niveau oszillierende Calciumkonzentration andere

Signalwege aktivieren bzw. hemmen als niedrigere. Darüber hinaus sind wahrscheinlich auch die Frequenz, genauso wie die Größe der Amplituden entscheidende Faktoren [Dolmetsch et al.,1998]. Hinzu kommt, dass die $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen keinesfalls überall in der Zelle gleich sind. Neben den vom Zytosol abgetrennten Kompartimenten entstehen zum Beispiel in der Umgebung von Kanälen lokale Mikrodomänen in denen die Konzentration bestimmter Ionen vergleichsweise groß ist [Wang et al.,2004]. In diesem Zusammenhang sind auch die Mitochondrien als Calcium-Puffer von Belang.[Quintana et al.,2007] Bedenkt man nun noch die Summe an Rezeptoren die Ca^{2+} -Signale nutzen, um die Aktivierung und Expression von Genen, die Sekretion von z.B. Zytokinen oder das Zellwachstum steuern, steht man vor einem sehr großen Feld an Varianten und Modifikationen von Stoffwechselwegen [Dolmetsch et al.,1998].

Anhand von den zwei bereits erwähnten Transkriptionsfaktoren NFAT und NF- κ B soll erläutert werden, wie Ca^{2+} -Oszillationen Kaskaden beeinflussen können. NFAT, ein für die Produktion von IL-2 unerlässlicher Faktor (s. 2.1.5), wird Calcineurin-abhängig dephosphoryliert und in den Kern transportiert, wo es die Transkription beeinflusst. Der Dephosphorylierung steht ein aggressives Kinasesystem gegenüber, das eine Phosphatgruppe auf NFAT überträgt, sobald ein bestimmter Schwellenwert von $[Ca^{2+}]_i$ unterschritten wird. Die Rephosphorylierung ist ein Signal, welches den sofortigen Export aus dem Kern nach sich zieht und die Wirkung von NFAT damit aufhebt. Es zeigte sich, dass Oszillationen mit einer Amplitude von $1\mu M$ und Frequenzen < 6 min nötig waren, um die NFAT vermittelte Transkription aufrechtzuerhalten. NF- κ B liegt im Zytoplasma als Heterodimer vor und ist mit einer inhibitorischen Untereinheit (κB) assoziiert. Erreicht $[Ca^{2+}]_i$ einen Schwellenwert, wird κB phosphoryliert und ubiquitiniert. Hierdurch entlässt es N-F κ B in den Nukleus, wo dieses die Transkription von Chemokinen wie z.B. IL-8 anregt. Um die Kaskade zu stoppen, muss in diesem Fall κB neu synthetisiert werden. Deshalb ist hier eine Frequenz < 30 min ausreichend, die Aktivität von NF- κ B zu erhalten [Lewis, 2003]. Auf ein physiologisches Geschehen übertragen könnte das heißen: In einer nach „erfolgreichem“ Antigenkontakt voll aktivierten T-Zelle werden mit Sicherheit beide Kaskaden aktiviert, weil durch I_{CRAC} viel Ca^{2+} in die Zelle transportiert wird. Ist der Antigenkontakt aber unzureichend, unpassend oder die T-Zelle in Reichweite eines von Makrophagen induzierten „oxidative burst“, wird wahrscheinlich nur eine, nämlich die NF- κ B vermittelte Kaskade aktiviert, da in diesem Fall der Ca^{2+} -Einstrom geringer ausfällt.

Diese Untersuchungen stützen den Gedanken, dass ein Calcium-Signalcode existiert und die Zelle über eine Maschinerie verfügt, die in Frequenz und Amplitude der Oszillationen liegenden Informationen zu decodieren. Es ist sinnvoll anzunehmen, dass ROS auf diese oder

ähnliche Art und Weise in die Signaltransduktion der T-Zelle eingreift, die Synthese von Proteinen beeinflusst und ihren Aktivierungsgrad moduliert. Vom jetzigen Informationsstand aus scheint es allerdings unmöglich, den Gesamtapparat in seiner Komplexität zu erfassen.

5.3 Die Dualität von CD4⁺ naiven und Effektor-T-Zellen

Von besonderem Interesse für das physiologische Verständnis sind die Unterschiede in der Reaktion auf ROS von naiven im Vergleich mit Effektor-T-Zellen. Aus den Figuren 6 und 7 ist abzulesen, dass T-Effektorzellen eine wesentlich geringere Empfindlichkeit bezüglich der zugeführten Menge an H₂O₂ aufweisen. Dieser Rückschluss lässt sich aus dem Effekt von ROS auf den Calciumhaushalt der Zelle ziehen. So bedarf es in jedem Fall einer größeren H₂O₂-Konzentration, um signifikante Änderungen von [Ca²⁺]_i in Zellen mit Effektorstatus hervorzurufen. In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass diese Unterschiede mit einer Änderung des intrazellulären Redox-Potentials begründbar sind. Die Ursachen liegen einerseits im vermehrten Vorhandensein von reduzierenden Substanzen und andererseits in einer gesteigerten enzymatisch-reduzierenden Aktivität. Nachstehend soll der Begriff des Reduktionspotentials im Bezug auf das GSH/GSSG-System genauer diskutiert werden, wobei in erster Linie eine Quantifizierung der mit MCB gemessenen Daten von Interesse ist.

5.3.1 Glutathion und Reduktionspotentiale

Die unter 4.3.1 geschilderten Experimente dienen dem Vergleich der Glutathionmenge in naiven und Effektor-T-Zellen. Aus Figur 9 wird ersichtlich, dass der Betrag von RFU, genormt auf 1 Mio Zellen/ml, in T-Lymphozyten mit Effektorstatus fast 5 mal höher liegt als in den unreifen CD4⁺ T-Zellen. Möchte man diesen Vergleich in absoluten Konzentrationen des zellulären Gesamtglutathions ausdrücken, müssen Verdünnungsprobleme berücksichtigt werden. Durch die Herstellung des Zellysats entsteht ein Verdünnungsfaktor, welcher abhängig von den Zellvolumina und der Gesamtmenge der Lösung ist. Messungen mit einem konfokalen Mikroskop erlauben eine zuverlässige Abschätzung des Zelldurchmessers, welcher zur Berechnung der Volumina genutzt wurde. Dabei wurden die Zellen in Annäherung als kugelförmig betrachtet.

Für das Volumen einer Kugel gilt:

$$V = 4/3\pi \cdot r^3$$

Mit Radien von 3,66 bzw. 5,50µm für naive bzw. Effektor-T-Zellen ergeben sich Volumina von 204,84µm³ und 697,03µm³.

Eine Million Zellen nehmen demzufolge einen Raum von $2,05 \cdot 10^{-10} \text{m}^3$ bzw. $6,97 \cdot 10^{-10} \text{m}^3$ ein. Bei einer Gesamtmenge des Lysats von 1ml ($1 \cdot 10^{-6} \text{m}^3$) und einer Zellanzahl von 1 Mio erhält man Verdünnungsfaktoren von:

naive T-Zellen $10^{-6}/2,05 \cdot 10^{-10} \cdot 4 = \underline{19512};$

analog für Effektor-T-Zellen $10^{-6}/6,97 \cdot 10^{-10} \cdot 4 = \underline{5739}.$

Mit 4 muss zusätzlich multipliziert werden, weil der Anteil des Zelllysats nur 50 der insgesamt 200 µl ausmachte. Setzt man nun für x die Werte RFU/1 Mio Zellen, multipliziert mit den berechneten Verdünnungsfaktoren, in die GSH-Standardkurve ein, welche durch die Geradengleichung $y = 0,001x - 1,534$ beschrieben wird, so ergibt sich:

naive T-Zellen $\text{GSH (in } \mu\text{M)} = 0,001 \cdot (383,70 \cdot 19512) - 1,534$ $\text{GSH}_{\text{ges}} = \underline{7,48\text{mM}}$

Effektor-T-Zellen $\text{GSH (in } \mu\text{M)} = 0,001 \cdot (1810,02 \cdot 5739) - 1,534$ $\text{GSH}_{\text{ges}} = \underline{10,39\text{mM}}$

Bemerkenswert ist, dass der fünffachen Steigerung der Glutathion-Gesamtmenge die Konzentrationserhöhung von „nur“ etwa 3 mM zu Grunde liegt, was einer Zunahme der GSH-Konzentration von rund 40 % entspricht. Es darf nicht vergessen werden, dass die Gesamtmenge dennoch eine große Rolle spielt, da sie die Pufferkapazität des Redox-Systems festlegt.

Um dem Begriff Redox-Potential physikalischen Ausdruck zu verleihen, wird die Nernst'sche Gleichung herangezogen:

$$\Delta E = \Delta E_0 - RT/nF \cdot \ln Q$$

wobei R die universelle Gaskonstante ($8,314 \text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), T die Standardtemperatur (298,15 K), F die Faraday'sche Konstante ($9,6485 \cdot 10^4 \text{C} \cdot \text{mol}^{-1}$) und n die Anzahl der übertragenen Elektronen (2 für GSH/GSSG) ist. Q spiegelt das Konzentrationsverhältnis von Oxidantien zu Reduktantien wider:

$$Q = [\text{Red}]/[\text{Ox}]$$

Für die Reaktion: $\text{GSSG} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{GSH}$ ergibt sich also

$$Q = [\text{GSH}]^2/[\text{GSSG}]$$

Die GSH-Konzentration geht quadratisch in den Term ein, da zwei Moleküle GSH zu einem Molekül GSSG reagieren. ΔE_0 ist als Standardpotential bei einem pH von 7,0 gegen eine Platin-Wasserstoffelektrode gemessen und beträgt für GSH/GSSG -240 mV [Rost and Rapoport, 1964]. Mit einem Umrechnungsfaktor von 2,303 wird aus dem natürlichen der dekadische Logarithmus (\log_{10}) und mit $RT/F = \text{konstant}$ lässt sich der Term wie folgt schreiben:

$$\Delta E = -240 - 59,1/2 \cdot \log([\text{GSH}]^2/[\text{GSSG}]) \text{ mV}$$

Laut dieser Gleichung ist das Glutathion-spezifische Reduktionspotential von zwei Faktoren abhängig: erstens die Konzentration vom Gesamtglutathion und zweitens das Verhältnis von GSH zu GSSG. Zum Vergleich der Potentiale wird als nächstes eine Funktion entwickelt, die das Reduktionspotential in Abhängigkeit vom Anteil reduzierten Glutathions beschreibt.

Die Konzentration von reduziertem Glutathion lässt sich schreiben als:

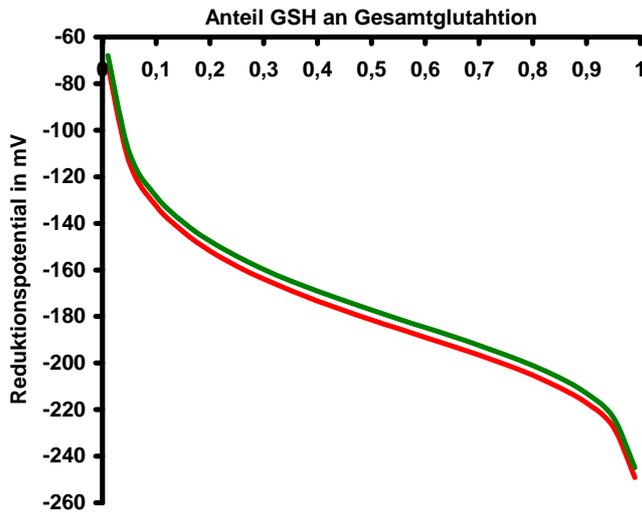
$$[\text{GSH}] = x \cdot [\text{Glu}_{\text{ges}}]$$

Die Konzentration von oxidiertem Glutathion lässt sich schreiben als:

$$[\text{GSSG}] = (1-x)/2 \cdot [\text{Glu}_{\text{ges}}]$$

wobei x der Prozentsatz an reduziertem GSH ist und zwei Moleküle GSH ein Molekül GSSG bilden. Unter Einsetzen für $[\text{GSH}]$ und $[\text{GSSG}]$ entsteht die Funktion:

$$y = -240 - 59,1/2 \cdot \log((x \cdot [\text{Glu}_{\text{ges}}])^2 / ((1-x)/2 \cdot [\text{Glu}_{\text{ges}}]))$$



Figur 15

Reduktionspotential des GSH/GSSG-Systems in Abhängigkeit des Anteils reduzierter Glutathionspezies bei pH 7,0 und T = 298,15 K. Für naive T-Zellen (grüne Kurve) beträgt die Konzentration von GSH_{ges} 7,49 mM; für Effektor-T-Zellen 10,38 mM

Nimmt man also zum Beispiel an, die Konzentration von Glutathion sei wie in T-Effektorzellen 10,39 mM und das Verhältnis von GSH zu GSSG betrage 99:1, dann ergibt sich ein Reduktionspotential von $-249,13$ mV. In den unreifen $CD4^+$ T-Zellen errechnet sich in diesem Fall ein Reduktionspotential von $-244,93$ mV (Figur 15) Diese Zahlen sind Ausdruck der elektromotorischen Kraft, mit der Elektronen bei Redoxreaktionen übertragen werden können. Je negativer das Potential ausfällt, desto leichter werden e^- vom betreffenden Molekül abgegeben und desto reduzierender ist das Milieu, in welchem sich die Substanz befindet. Der Abstand der beiden Kurven in Figur 15 (4,2 mV) bleibt über den gesamten Verlauf erhalten. Diese Differenz mag prozentual gesehen klein erscheinen, aber die Kapazität des Redox-Puffers wird von der Gesamtmenge an vorhandenem Glutathion bestimmt. Das heißt, wenn naive und Effektor-T-Zellen der gleichen Menge an oxidierenden Substanzen ausgesetzt sind, ändert sich das Verhältnis von GSH zu GSSG in Zellen des naiven Typs schneller zu Gunsten des GSSG-Anteils. Dieser Sachverhalt lässt sich durch die Berechnung der Stoffmenge von Glutathion veranschaulichen. Es gilt:

$$n_{GSH} = c \cdot V$$

wobei c der gemessenen Konzentration entspricht und V das Zellvolumen ist. Die Änderung der GSH-Menge kann beschrieben werden durch:

$$n_{GSH} - x / n_{GSH}$$

x ist die Stoffmenge des verbrauchten GSHs

Hieraus folgt:

$$(c \cdot V - x) / c \cdot V = 1 - x / c \cdot V$$

Die Steigung der Funktion ist abhängig vom Faktor $c \cdot V$, welcher gleichzeitig die Stoffmenge des gemessenen Glutathions angibt.

$$c_N \cdot V_N = 1,54 \text{ nmol} \quad c_E \cdot V_E = 7,24 \text{ nmol}$$

Daraus geht klar hervor, dass die Änderung der Relation (GSH zu GSSG) von der Stoffmenge des Gesamtglutathions abhängig ist. Der unterscheidende Faktor beträgt 4,7. (s. Figur 9) Das bedeutet, wenn in beiden Zelltypen die gleiche Menge GSH zu GSSG umgewandelt wird, fällt die Änderung der Relation $[GSH]/[GSSG]$ in naiven T-Zellen 4,7 mal höher aus als in Effektor-T-Zellen. Sinkt der prozentuale Anteil GSH, verschiebt sich das Reduktionspotential in Richtung positivere Werte. Die Folge ist ein Wandel der Umgebung hin zu oxidierenderen Eigenschaften. Im Bereich zwischen 99 und 90 % GSH ist die Änderung des Reduktionspotentials am größten (s. Figur 15), was mit Sicherheit das physiologische Kontinuum für zytoplasmatische GSH/GSSG-Verhältnisse umfasst.

Zur Berechnung der Konzentrationen und Mengen an Glutathion muss erwähnt werden, dass durch die Lyse der Zellen keine Kompartimente erhalten geblieben sind, was eine Mischung der Glutathionkonzentrationen sowohl aus Kern, ER, Mitochondrien und Zytoplasma nach sich zieht. Des Weiteren wird die Berechnung durch die Annahme, die Zelle sei kugelförmig, ebenfalls verfälscht. Trotz dieser systematischen Fehlerquellen halten sich die Zahlen in guter Näherung an den Arbeiten anderer Forschungsgruppen [Smith et al.,1996; Fernandes and Cotter,1994; Chatterjee et al.,1999; Kosower,1978].

Für die Experimente mit dem Farbstoff oPA ist auf die Quantifizierung verzichtet worden. Die Gründe dafür sind: erstens Schwierigkeiten bei der Kalibrierung einer Standardkurve, da das Fluoreszenzsignal extrem abhängig von der Proteinkonzentration der Probe ist. Es erwies sich aber während dieser Versuche als kaum möglich, die Zelllysate auf immer gleiche Proteinkonzentrationen einzustellen, da die Behandlung mit Perchlorsäure zu großen Abweichungen führte. Zweitens sind die Messungen aufgrund des Verfahrens artefaktbehaftet, was schon die hohe Standardabweichung erkennen lässt. Als wichtigster Grund jedoch ist drittens anzuführen, dass selbige Betrachtung für oPA undurchführbar ist, weil hier nur das reduzierte Glutathion gemessen wurde und somit keine Aussagen über die Verhältnisse von GSH/GSSG getroffen werden können.

Eine kritische Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse zeigt einen Widerspruch im Vergleich der relativen Mengen von Gesamtglutathion und GSH auf. Konsequenterweise müsste die GSH-Menge, welche mit oPA gemessen wurde (vgl. Figur 9 vs. 10) ebenso wie die Gesamtmenge an Glutathion in T-Effektorzellen um etwa das Fünffache ansteigen. Tut sie

das nicht, bedeutete das, die Relation GSH/GSSG würde in Richtung Oxidation verkehrt. Obzwar diese Unstimmigkeit nicht ganz auszuräumen ist, wird die Tendenz der wachsenden GSH-Menge eher als Unterstützung der These gewertet.

5.3.2 Wirkungen von ROS im Immunsystem

T-Helferzellen werden im Immunsystem hauptsächlich dafür benötigt, die B-Lymphozyten und Makrophagen dabei zu unterstützen, ihre Aufgaben effizient wahrzunehmen. Für die Realisierung dessen ist es von entscheidender Wichtigkeit, die Antigen-spezifisch „passenden“ T-Zellen zu aktivieren und zu vermehren. Im idealen Fall sollte daher weder Zeit noch Energie darauf verwendet werden, die „falschen“ T-Zellen zu aktivieren. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ist vielleicht der bedeutsamste Parameter bei der Initiation der T-Zell-Aktivierung. Dabei sind Immunprozesse als Schwellenphänomene interpretierbar. In ein simples Modell übersetzt könnte man sagen: niedrige $[\text{Ca}^{2+}]_i$, keine T-Zell Aktivierung; höhere $[\text{Ca}^{2+}]_i$, partielle oder vollständige Aktivierung des T-Lymphozyten; zu hohe $[\text{Ca}^{2+}]_i$, Apoptose. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen wie ROS $[\text{Ca}^{2+}]_i$ modulieren kann, sodass eine sinnvolle Regulation hinsichtlich immunologischer Prozesse stattfindet. Nachstehend sind Szenarien geschildert, die veranschaulichen, wie ROS im Rahmen einer Immunreaktion wirken kann. Ein in diesem Zusammenhang bedeutungsvoller Begriff ist die Selektion. Proliferationsexperimente konnten zeigen, dass die Wachstumsrate von T-Zellen, in Abhängigkeit von ihrem Aktivierungsgrad, durch ROS entweder gesteigert oder erniedrigt wird [Bogeski et al.,2009]. Je unreifer die T-Zellen waren, desto empfindlicher wurde die Proliferation durch H_2O_2 gestört. Im Kontrast dazu wurde die Proliferationsrate bei gewisser Voraktivierung und bestimmten ROS-Konzentrationen begünstigt. Diese Ergebnisse können als Selektionsprinzip aufgefasst werden, welches sich das Immunsystem zu Nutze macht.

Makrophagen induzieren eine Immunantwort durch die Präsentation von Antigenen an T-Zellen in zentral- und peripher- lymphatischen Organen. Wahrscheinlich werden bei der Präsentation der Antigene im Lymphknoten ROS in weniger großen Mengen von Makrophagen gebildet als während des „oxidative burst“, der das Ziel hat, Pathogene zu vernichten [Solomon et al.,2005]. Daraus folgt, dass T-Helferzellen unterschiedlicher Aktivierungsgrade mit verschiedenen Konzentrationen von ROS in Kontakt geraten. Innerhalb entzündlicher Prozesse können H_2O_2 -Konzentrationen $> 100 \mu\text{M}$ erreicht werden. naive T-Zellen, die in entzündetem Gewebe nicht gebraucht werden, sind außerstande diesem hohen oxidierenden Potential zu widerstehen und reagieren apoptotisch. Im Gegensatz dazu

sind Effektor-T-Zellen durch ihr höheres Reduktionspotential und die größere Katalaseaktivität gegen die Oxidantien geschützt. Ferner helfen H_2O_2 -Konzentrationen zwischen 1 und 100 μM aktivierten Effektorzellen zu expandieren. Der Selektionsmechanismus steigert also die Effizienz der T-Zell-basierten Immunantwort in inflammatorischen Geweben. Kleinere Mengen H_2O_2 treten wahrscheinlich in lymphatischen Geweben auf. Die oxidierenden Potentiale von 1-10 μM H_2O_2 beeinflussen weder die Proliferation von naiven T-Zellen noch deren Überleben, unterstützen aber das Wachstum vorstimulierter (auf das Antigen passende) Zellen. Sehr hohe Konzentrationen (von 0,5-1 mM), welche eventuell auch physiologische Tragweite besitzen [Dröge,2002], induzieren in beiden Zelltypen die Apoptose und sind eventuell an der Termination einer Immunreaktion beteiligt [Hildeman et al.,2007].

5.4 ROS und T-Zell vermitteltes Killing

Die Idee zu den unter 4.4 beschriebenen Experimenten entwickelte sich aus der Hypothese, dass CD8^+ T-Zellen in ihrer Funktion ebenso wie CD4^+ T-Zellen durch ROS beeinflussbar sein müssten. Da die Hauptaufgabe zytotoxischer T-Lymphozyten in der Zytolyse anderer Zellen liegt, wäre es sinnvoll, wenn die Fähigkeit, dies zu tun, durch reaktive Sauerstoffspezies unterstützt und gefördert würde. Leider gibt es in diesem Bereich keine Referenzen aus der Literatur, die die Eigeninterpretation untermauern könnten.

Aus Figur 14 wird ersichtlich, dass der Anteil überlebender CHO-Zellen bei H_2O_2 Konzentrationen von 1 und 10 μM , der Kontrolle gegenüber (auf einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$) um mehr als 10 % geringer ist. Desgleichen sind diese Ergebnisse gegenüber einer Konzentration von 100 μM signifikant ($p \leq 0,001$). Damit scheint eine starke Aussagekraft gegeben und ein nachweisbarer Effekt für diese beiden Konzentrationen tatsächlich vorhanden. Allerdings konnte dieser Effekt mit anderen Bedingungen (Veränderung der Inkubationszeiten, Veränderung der Zellzahlen) nicht reproduziert werden. Deshalb ist eine kritische Betrachtung des beobachteten Effekts nötig. Bei einer H_2O_2 Konzentration von 100 μM liegt die Überlebensrate der CHO-Zellen in Höhe von 34,5 %, also ca. 1 % unter der der Kontrolle. Veranschaulicht man sich jedoch das Kontrollexperiment mit T-Zellen (s. Figur 13), so wird offenbar, dass nur rund 17 % der CD8^+ -T-Zellen die 24 stündige Inkubation mit 100 μM H_2O_2 überlebt haben. Folglich kann auch nur ein Teil dieser T-Zellen in den Killing-Prozess integriert gewesen sein. Die CHO-Zellen präsentieren sich im Kontrast dazu unempfindlich gegenüber allen dargebotenen Konzentrationen. Überdies ist

durchschnittlich sogar ein leichtes Plus des vitalen Anteils zu bemerken (s. Figur 12). In Anbetracht dessen korrigieren sich die Überlebensraten der CHO-Zellen im Killing-Experiment (s. 4.4.2) wohl etwas nach unten. Berücksichtigt man nun noch die „T-Zell-Faktoren“ der einzelnen Konzentrationen würden sich für 100 μM und auch 100 nM erhöhte Killing-Raten ergeben, wohingegen das Killing bei 10 μM und 1 μM geringer ausfiele.

Die Problematik der Interpretation dieser Versuche liegt in der Überlagerung mehrerer Effekte. Mit der verwendeten Methodik ist es nicht möglich, die Wirkung auf die reine Interaktion der Zellen herauszulösen. In physiologischer Hinsicht passen die Ergebnisse dennoch gut ins Modell. So könnte der logische Schluss lauten, dass zytotoxische T-Lymphozyten, sind sie über längeren Zeitraum ROS ausgesetzt, ihre zytolytische Effektivität steigern. Im Unklaren bleibt indes, ob die Ursache dafür, ähnlich wie bei CD4^+ T-Zellen, in der Modulation von Calciumsignalen zu suchen ist oder ob dem ein anderer Mechanismus zu Grunde liegt.

5.5 Ausblick

Die elementare Bedeutung von Redox-abhängigen Signalkaskaden für die Zelle ist ausführlich beschrieben worden. Deswegen wäre es aufschlussreich, die Redox-Eigenschaften von T-Zellen genauer zu charakterisieren und im Verlauf ihrer Stimulation zu beurteilen. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden könnte ein Gesamtkonzept geschaffen werden, das die Veränderlichkeit der Redox-Eigenschaften auf DNA-Ebene belegt und damit Rückschlüsse auf die Immunphysiologie zulässt. In diesem Zusammenhang wäre es sehr interessant, sich intensiver auf die Interaktion von Makrophagen und T-Zellen zu konzentrieren, da an dieser Stelle offenbar wird, dass ROS sowohl der Kommunikation zwischen Zellen, als auch der intrazellulären Kommunikation dient. Überdies ist die Frage, ob von Makrophagen gebildete ROS von T-Zellen aufgenommen werden können nicht abschließend geklärt. Man könnte aber zum Beispiel Zellen von denen bekannt ist, dass sie selbst kein ROS produzieren mit DCF laden und die betreffenden Experimente wiederholen.

Bei der Aufklärung der Wirkung von ROS auf CD8^+ -T-Zellen ist in erster Linie wichtig, dass der Effekt, welchen ROS auf die Einzelzelle hat, zunächst charakterisiert wird. Der nächste Schritt liegt dann in der Verbindung von Killing-Experimenten mit einem Imaging-Verfahren, weil so parallel Calciumsignale in den T-Zellen gemessen werden können.

Obwohl eindrücklich gezeigt werden konnte, dass reaktive Sauerstoffspezies an der Vermittlung und Weiterleitung von Signalen in der Zelle beteiligt sind, ist nicht geklärt, ob

ROS eher ein „zufällig“ entstehendes Nebenprodukt ist oder ob die Hauptaufgabe von ROS tatsächlich in der Mediation zellulärer Kaskaden liegt. Um diese Frage zu lösen, muss zukünftig weiter intensiv an der Aufklärung Redox-abhängiger Prozesse geforscht werden.

Literaturverzeichnis

Abe MK, Kartha S, Karpova AY, Li J, Liu PT, Kuo WL, Hershenson MB.Hydrogen peroxide activates extracellular signal-regulated kinase via protein kinase C, Raf-1, and MEK1. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998 Apr;18(4):562-9.

Abramov AY, Duchen MR.The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005 Dec 29;360(1464):2309-14. Review.

Allen RG, Newton RK, Sohal RS, Shipley GL, Nations C.Alterations in superoxide dismutase, glutathione, and peroxides in the plasmodial slime mold *Physarum polycephalum* during differentiation. *J Cell Physiol.* 1985 Dec;125(3):413-9.

Allen RG, Venkatraj VS.Oxidants and antioxidants in development and differentiation. *J Nutr.* 1992 Mar;122(3 Suppl):631-5. Review.

Arrigo AP.Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med.* 1999 Nov;27(9-10):936-44. Review.

Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT.Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest.* 1973 Mar;52(3):741-4.

Baeuerle PA, Baltimore D.NF-kappa B: ten years after. *Cell.* 1996 Oct 4;87(1):13-20

Baeuerle PA, Henkel T.Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:141-79. Review.

Batista FD, Iber D, Neuberger MS.B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature.* 2001 May 24;411(6836):489-94.

Bedard K, Krause KH.The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):245-313. Review.

Beiqing L, Chen M, Whisler RL.Sublethal levels of oxidative stress stimulate transcriptional activation of c-jun and suppress IL-2 promoter activation in Jurkat T cells. *J Immunol.* 1996 Jul 1;157(1):160-9.

Bellomo G, Vairetti M, Stivala L, Mirabelli F, Richelmi P, Orrenius S.Demonstration of nuclear compartmentalization of glutathione in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 May 15;89(10):4412-6.

Bootman MD, Taylor CW, Berridge MJ.The thiol reagent, thimerosal, evokes Ca²⁺ spikes in HeLa cells by sensitizing the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem.* 1992 Dec 15;267(35):25113-9.

Bray TM, Taylor CG.Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress. *Can J Physiol Pharmacol.* 1993 Sep;71(9):746-51. Review.

Brown MR, Miller FJ Jr, Li WG, Ellingson AN, Mozena JD, Chatterjee P, Engelhardt JF, Zwacka RM, Oberley LW, Fang X, Spector AA, Weintraub NL.Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1999 Sep 17;85(6):524-33.

- Buettner GR, Schafer FQ.**Free radicals, oxidants, and antioxidants.Teratology. 2000 Oct;62(4):234. Review.
- Cahalan MD, Zhang SL, Yeromin AV, Ohlsen K, Roos J, Stauderman KA.**Molecular basis of the CRAC channel.Cell Calcium. 2007 Aug;42(2):133-44. Epub 2007 May 7. Review.
- Chatterjee S, Noack H, Possel H, Keilhoff G, Wolf G.**Glutathione levels in primary glial cultures: monochlorobimane provides evidence of cell type-specific distribution.Glia. 1999 Aug;27(2):152-61.
- Crabtree GR, Olson EN.**NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. Cell. 2002 Apr;109 Suppl:S67-79
- Cobbold PH, Cuthbertson KS.**Calcium oscillations: phenomena, mechanisms and significance.Semin Cell Biol. 1990 Aug;1(4):311-21. Review.
- Cross AR, Segal AW.**The NADPH oxidase of professional phagocytes—prototype of the NOX electron transport chain systems. Biochim Biophys Acta 1657: 1–22, 2004.
- Csutora P, Su Z, Kim HY, Bugrim A, Cunningham KW, Nuccitelli R, Keizer JE, Hanley MR, Blalock JE, Marchase RB.**Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores.Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jan 5;96(1):121-6.
- Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS.**Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression.Nature. 1998 Apr 30;392(6679):933-6.
- Dröge W.**Oxidative stress and ageing: is ageing a cysteine deficiency syndrome?Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2005 Dec 29;360(1464):2355-72. Review.
- Dröge W.**Free radicals in the physiological control of cell function.Physiol Rev. 2002 Jan;82(1):47-95. Review.
- Dustin ML.** The immunological synapse.Arthritis Res. 2002;4 Suppl 3:S119-25. Epub 2002 May 9. Review.
- Dybbukt JM, Ankarcrona M, Burkitt M, Sjöholm A, Ström K, Orrenius S, Nicotera P.**Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines.J Biol Chem. 1994 Dec 2;269(48):30553-60.
- Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A.**A mutation in Orail causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function.Nature. 2006 May 11;441(7090):179-85. Epub 2006 Apr 2.
- Fernandes RS, Cotter TG.**Apoptosis or necrosis: intracellular levels of glutathione influence mode of cell death.Biochem Pharmacol. 1994 Aug 17;48(4):675-81.
- Forman HJ, Torres M.**Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling.Am J Respir Crit Care Med. 2002 Dec 15;166(12 Pt 2):S4-8. Review.
- Galter D, Mihm S, Dröge W.**Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factor kappa B and the activator protein-1.Eur J Biochem. 1994 Apr 15;221(2):639-48.
- Gelderman KA, Hultqvist M, Olsson LM, Bauer K, Pizzolla A, Olofsson P, Holmdahl R.**Rheumatoid arthritis: the role of reactive oxygen species in disease development and therapeutic strategies.Antioxid Redox Signal. 2007 Oct;9(10):1541-67. Review.

Gilbert HF. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1990;63:69-172. Review.

Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science.* 1999 Jul 9;285(5425):221-7.

Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem.* 1996 Feb 23;271(8):4138-42.

Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, Yamada H, Shimizu S, Mori E, Kudoh J, Shimizu N, Kurose H, Okada Y, Imoto K, Mori Y. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell.* 2002 Jan;9(1):163-73.

Hildeman D, Jorgensen T, Kappler J, Marrack P. Apoptosis and the homeostatic control of immune responses. *Curr Opin Immunol.* 2007 Oct;19(5):516-21. Epub 2007 Jul 20. Review

Hill K, Benham CD, McNulty S, Randall AD. Flufenamic acid is a pH-dependent antagonist of TRPM2 channels. *Neuropharmacology.* 2004 Sep;47(3):450-60.

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

Hoth M, Penner R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature.* 1992 Jan 23;355(6358):298-9.

Hultqvist M, Olofsson P, Holmberg J, Bäckström BT, Tordsson J, Holmdahl R. Enhanced autoimmunity, arthritis, and encephalomyelitis in mice with a reduced oxidative burst due to a mutation in the *Ncf1* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Aug 24;101(34):12646-51. Epub 2004 Aug 13.

Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science.* 1992 Sep 11;257(5076):1496-502

Hu Q, Zheng G, Zweier JL, Deshpande S, Irani K, Ziegelstein RC. NADPH oxidase activation increases the sensitivity of intracellular Ca²⁺ stores to inositol 1,4,5-trisphosphate in human endothelial cells. *J Biol Chem* 2000;275:15749-15757

Kaplan P, Babusikova E, Lehotsky J, Dobrota D. Free radical-induced protein modification and inhibition of Ca²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Mol Cell Biochem.* 2003 Jun;248(1-2):41-7.

Karlsson A, Dahlgren C. Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes. *Antioxid Redox Signal* 4: 49–60, 2002.

Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell.* 2005 Apr 1;18(1):61-9.

Kosower NS, Kosower EM. The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol.* 1978;54:109-60. Review

Kraft R, Grimm C, Grosse K, Hoffmann A, Sauerbruch S, Kettenmann H, Schultz G, Harteneck C.Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia.*Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 Jan;286(1):C129-37. Epub 2003 Sep 24.

Kregel KC, Zhang HJ.An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007 Jan;292(1):R18-36. Epub 2006 Aug 17.

Lajas AI, Sierra V, Camello PJ, Salido GM, Pariente JA.Vanadate inhibits the calcium extrusion in rat pancreatic acinar cells.*Cell Signal.* 2001 Jun;13(6):451-6.

Lander HM, Ogiste JS, Teng KK, Novogrodsky A.p21ras as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress.*J Biol Chem.* 1995 Sep 8;270(36):21195-8.

LeBel C. P., Ischiropoulos H., Bondy S. C. Evaluation of the probe 2',7'- dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 1992; 5: 227-231

van Leeuwen JE, Samelson LE.T cell antigen-receptor signal transduction.*Curr Opin Immunol.* 1999 Jun;11(3):242-8. Review.

Lewis RS.Calcium oscillations in T-cells: mechanisms and consequences for gene expression.*Biochem Soc Trans.* 2003 Oct;31(Pt 5):925-9. Review.

Li N, Oberley TD.Modulation of antioxidant enzymes, reactive oxygen species, and glutathione levels in manganese superoxide dismutase-overexpressing NIH/3T3 fibroblasts during the cell cycle.*J Cell Physiol.* 1998 Oct;177(1):148-60.

Li Q, Verma IM.NF-kappaB regulation in the immune system.*Nat Rev Immunol.* 2002 Oct;2(10):725-34. Review. Erratum in: *Nat Rev Immunol* 2002 Dec;2(12):975.

Los M, Dröge W, Stricker K, Baeuerle PA, Schulze-Osthoff K.Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions.*Eur J Immunol.* 1995 Jan;25(1):159-65.

Lu SC.Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies.*FASEB J.* 1999 Jul;13(10):1169-83. Review.

Makino Y, Yoshikawa N, Okamoto K, Hirota K, Yodoi J, Makino I, Tanaka H.Direct association with thioredoxin allows redox regulation of glucocorticoid receptor function.*J Biol Chem.* 1999 Jan 29;274(5):3182-8.

Matsuda S, Moriguchi T, Koyasu S, Nishida E.T lymphocyte activation signals for interleukin-2 production involve activation of MKK6-p38 and MKK7-SAPK/JNK signaling pathways sensitive to cyclosporin A.*J Biol Chem.* 1998 May 15;273(20):12378-82.

Mikoshiba K.IP3 receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts.*J Neurochem.* 2007 Sep;102(5):1426-46. Review.

Mikoshiba K.The IP3 receptor/Ca²⁺ channel and its cellular function.*Biochem Soc Symp.* 2007;(74):9-22. Review.

Munzel T., Afanas'ev I. B., Kleschyov A. L., Harrison D. G. Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 1761-1768

- Nauseef WM.** Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochem Cell Biol* 122: 277–291, 2004
- Parekh AB.** On the activation mechanism of store-operated calcium channels. *Pflugers Arch.* 2006 Dec;453(3):303-11. Epub 2006 Jun 21. Review.
- Patiño PJ, Perez JE, Lopez JA, Condino-Neto A, Grumach AS, Botero JH, Curnutte JT, García de Olarte D.** Molecular analysis of chronic granulomatous disease caused by defects in gp91-phox. *Hum Mutat.* 1999;13(1):29-37.
- Peinelt C, Vig M, Koomoa DL, Beck A, Nadler MJ, Koblan-Huberson M, Lis A, Fleig A, Penner R, Kinet JP.** Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol.* 2006 Jul;8(7):771-3. Epub 2006 May 30.
- Penna A, Demuro A, Yeromin AV, Zhang SL, Safrina O, Parker I, Cahalan MD.** The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature.* 2008 Nov 6;456(7218):116-20. Epub 2008 Sep 28.
- Qian D, Weiss A.** T cell antigen receptor signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Apr;9(2):205-12. Review.
- Quintana A, Schwindling C, Wenning AS, Becherer U, Rettig J, Schwarz EC, Hoth M.** T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Sep 4;104(36):14418-23. Epub 2007 Aug 28.
- Rabesandratana H, Fournier AM, Chateau MT, Serre A, Dornand J.** Increased oxidative metabolism in PMA-activated lymphocytes: a flow cytometric study. *Int J Immunopharmacol.* 1992 Jul;14(5):895-902.
- Randriamampita C, Tsien RY.** Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx. *Nature.* 1993 Aug 26;364(6440):809-14.
- Rao A.** Signaling to gene expression: calcium, calcineurin and NFAT. *Nat Immunol.* 2009 Jan;10(1):3-5
- Robinson JM, Ohira T, Badwey JA.** Regulation of the NADPH-oxidase complex of phagocytic leukocytes. Recent insights from structural biology, molecular genetics, microscopy. *Histochem Cell Biol* 122: 293–304, 2004
- Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Liudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Veliçelebi G, Stauderman KA.** STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol.* 2005 May 9;169(3):435-45. Epub 2005 May 2.
- Rose ML, Rusyn I, Bojes HK, Belyea J, Cattley RC, Thurman RG.** Role of Kupffer cells and oxidants in signaling peroxisome proliferator-induced hepatocyte proliferation. *Mutat Res.* 2000 Mar 17;448(2):179-92. Review.
- Rost J, Rapoport S.** Reduction potential of Glutathione. *Nature.* 1964 Jan 11;201:185.
- Schafer FQ, Buettner GR.** Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 2001 Jun 1;30(11):1191-212. Review.

Schafer F, B.A. Wagner, H.P. Wang, L.W. Oberley and G.R. Buettner, Does peroxide toxicity correlate with antioxidant enzyme activity or oxidizability of cells?. *Free Radic. Biol. Med.* **27** (1999), p. S115.

Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 1991 Aug;10(8):2247-58.

Schwarz EC, Wolfs MJ, Tonner S, Wenning AS, Quintana A, Griesemer D, Hoth M. TRP channels in lymphocytes. *Handb Exp Pharmacol.* 2007;(179):445-56. Review.

Segal AW. The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *Mol Med Today.* 1996 Mar;2(3):129-35. Review.

Simons SS Jr, Pratt WB. Glucocorticoid receptor thiols and steroid-binding activity. *Methods Enzymol.* 1995;251:406-22

Smith CV, Jones DP, Guenther TM, Lash LH, Lauterburg BH. Compartmentation of glutathione: implications for the study of toxicity and disease. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996 Sep;140(1):1-12.

Smyth JT, Dehaven WI, Jones BF, Mercer JC, Trebak M, Vazquez G, Putney JW Jr. Emerging perspectives in store-operated Ca²⁺ entry: roles of Orai, Stim and TRP. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Nov;1763(11):1147-60. Epub 2006 Sep 5

Sohal RS, Allen RG. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. *Exp Gerontol.* 1991;26(5):511-7.

Solomon S, Rajasekaran N, Jeisy-Walder E, Snapper SB, Illges H. A crucial role for macrophages in the pathology of K/B x N serum-induced arthritis. *Eur J Immunol.* 2005 Oct;35(10):3064-73.

Stinchcombe JC, Barral DC, Mules EH, Booth S, Hume AN, Machesky LM, Seabra MC, Griffiths GM. Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J Cell Biol.* 2001 Feb 19;152(4):825-34.

Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity.* 2001 Nov;15(5):751-61.

Stinchcombe JC, Griffiths GM. The role of the secretory immunological synapse in killing by CD8+ CTL. *Semin Immunol.* 2003 Dec;15(6):301-5. Review.

Su B, Jacinto E, Hibi M, Kallunki T, Karin M, Ben-Neriah Y. JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell.* 1994 Jun 3;77(5):727-36.

Tatla S, Woodhead V, Foreman JC, Chain BM. The role of reactive oxygen species in triggering proliferation and IL-2 secretion in T cells. *Free Radic Biol Med.* 1999 Jan;26(1-2):14-24.

Timmerman LA, Clipstone NA, Ho SN, Northrop JP, Crabtree GR. Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression. *Nature.* 1996 Oct 31;383(6603):837-40.

Vig M, Beck A, Billingsley JM, Lis A, Parvez S, Peinelt C, Koomoa DL, Soboloff J, Gill DL, Fleig A, Kinet JP, Penner R. CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr Biol.* 2006 Oct 24;16(20):2073-9. Epub 2006 Sep 14.

Vyas YM, Maniar H, Dupont B. Visualization of signaling pathways and cortical cytoskeleton in cytolytic and noncytolytic natural killer cell immune synapses. *Immunol Rev.* 2002 Nov;189:161-78. Review.

Waring P. Redox active calcium ion channels and cell death. *Arch Biochem Biophys.* 2005 Feb 1;434(1):33-42. Review.

Wagner BA, Buettner GR, Oberley LW, Darby CJ, Burns CP. Myeloperoxidase is involved in H₂O₂-induced apoptosis of HL-60 human leukemia cells. *J Biol Chem.* 2000 Jul 21;275(29):22461-9. Erratum in: *J Biol Chem* 2001 Jun 29;276(26):24432.

Wang SQ, Wei C, Zhao G, Brochet DX, Shen J, Song LS, Wang W, Yang D, Cheng H. Imaging microdomain Ca²⁺ in muscle cells. *Circ Res.* 2004 Apr 30;94(8):1011-22. Review.

Wei SH, Safrina O, Yu Y, Garrod KR, Cahalan MD, Parker I. Ca²⁺ signals in CD4⁺ T cells during early contacts with antigen-bearing dendritic cells in lymph node. *J Immunol.* 2007 Aug 1;179(3):1586-94.

Williams RT, Manji SS, Parker NJ, Hancock MS, Van Stekelenburg L, Eid JP, Senior PV, Kazenwadel JS, Shandala T, Saint R, Smith PJ, Dziadek MA Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochem J.* 2001 Aug 1;357(Pt 3):673-85.

Woods NM, Cuthbertson KS, Cobbold PH. Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature.* 1986 Feb 13-19;319(6054):600-2.

Yang M, Nazhat NB, Jiang X, Kelsey SM, Blake DR, Newland AC, Morris CJ. Adriamycin stimulates proliferation of human lymphoblastic leukaemic cells via a mechanism of hydrogen peroxide (H₂O₂) production. *Br J Haematol.* 1996 Nov;95(2):339-44.

Zaidi A, Michaelis ML. Effects of reactive oxygen species on brain synaptic plasma membrane Ca(2+)-ATPase. *Free Radic Biol Med.* 1999 Oct;27(7-8):810-21.

Zhang SL, Yeromin AV, Zhang XH, Yu Y, Safrina O, Penna A, Roos J, Stauderman KA, Cahalan MD. 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.* 2006 Jun 13;103(24):9357-62. Epub 2006 Jun 2.

Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med.* 2000 Oct 2;192(7):1001-14.

Verzeichnis der Abkürzungen

Ak	Antikörper
AP-1	Aktivator Protein 1
APC	Antigen präsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
Ca	Calcium
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
CHO	Chinese Hamster Ovary
CRAC	Ca ²⁺ release-activated Ca ²⁺ channel
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte
DAG	Diazylglyzerin
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
e	Elektron
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FADH	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FFA	Flufenaminoacid
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
hIL	Humanes Interleukin
ICOS	Inducibel 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
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
MTOC	Microtubulus Organisation Center
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NF-AT	Nuclear Faktor of Activatet T-cell
NF-κB	Nuclear Faktor κB
NK-Zellen	Natural Killer cells
PBLs	Periphere Blutlymphozyten
PD	programmed cell death
PHA	Phytohämagglutinin
PKC	Phosphokinase C
PIP ₂	Inositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasmamembran Ca ²⁺ -ATPase
RFU	Relative Fluorescent Unit
ROS	Reactive Oxygen Species

R-PE	R-Phycoerythrin
RT	Raumtemperatur
SCID	Severe combined immunodeficiency
SERCA	Sarco-endoplasmatic-reticulum Ca^{2+} -ATPase
SMAC	supra-molecular activation complex
SL	secretoric Lysosom
SOC	Store-operated channel
SOD	Superoxiddismutase
STIM	Stromal interaction molecule
TCR	T-Zell Rezeptor
TG	Thapsigargin
TK	Tyrosinkinase
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRP	Transient receptor potential
U	Unit
YFP	Yellow Fluorescent Protein

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Köhler

Vorname: Richard Martin

Geburtsdatum/-ort: 16.08.1984 in Dresden

Heimanschrift: Zweibrücker Straße 9
66424 Homburg (Saar)

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Schulbildung

1991-1995 47. Grundschule, Dresden-Strehlen

1996-2003 Gymnasium Kreuzschule, Dresden
naturwissenschaftliches Profil

2003 Abschluss: Abitur, Note: 1.3

Kenntnisse

Sprachen: Englisch in Wort und Schrift,
Grundkenntnisse Französisch

EDV: Microsoft Office, Windows XP,
Powerpoint Präsentationen

Studium

Seit 10/2004 Medizinstudium an der Universität des Saarlandes

08/2006 Physikum, Note: 2.0

ab 10/2006 Arbeit als wissenschaftliche Hilfskraft in den Fachbereichen
Anatomie; Physiologie; Physik

ab 4/2007 Doktorarbeit bei Prof. Dr. Markus Hoth im Bereich der
medizinischen Biophysik/ Experimentelle Grundlagenforschung

Danksagung

Allem voran geht der Dank an alle Mitarbeiter des Labors von Prof. Dr. Markus Hoth für die allzeit hilfsbereite und freundliche Unterstützung bei kleinen und großen Problemen im Laboralltag. Insgesamt war eine produktive und lustige Atmosphäre tragendes Element der wissenschaftlichen Arbeit.

Besonderer Dank geht an:

Meinen Doktorvater, Prof. Dr. Markus Hoth, der immer mit Rat und Tat zur Seite stand und die Entstehung beziehungsweise Verwirklichung von Ideen weitestgehend gefördert und ermöglicht hat, außerdem ein Meister im Gut-zu-reden ist, ohne welchen ich so manches Mal der Verzweiflung anheim gefallen wäre.

Den Zweitkorrektor, für die Durchsicht und Korrektur meiner Arbeit und die damit verbundene Zeit.

Meinen Betreuer, Dr. Ivan Bogeski, der seinen Lehr- und Betreuungsauftrag sogar über wissenschaftliche Bereiche hinaus bestens erfüllt hat, besonders während unseres Aufenthalts in Mazedonien. Nicht nur einmal hat er mir erzählt, wie die Sache wirklich läuft.

Bettina Strauss und Anja Ludes, die mir mit engelsgleicher Geduld und vielfachen Erklärungen das Finden von Arbeitsgegenständen erleichtert haben und großmütig fälschliches Benutzen derselben immer wieder verzeihen konnten.

Regine Kaleja, die mit großem Überblick kompliziert auszufüllende Verträge zum erfolgreichen Abschluss gebracht hat und in wichtigen formellen Fragen immer Bescheid wusste.

Dr. Bin Qu, für ihre Unterstützung und Erklärungen bezüglich der Killing-Aktivität.

Christian Junker, ein Virtuose am Cell-Observer, dem ich eindrucksvolle Lichtblicke aus dem Land der zellulären Vielfarbigkeit zu verdanken habe.

Carsten Kummerow, der auf wissenschaftlichen Exkursionen zum Lagerfeuer stimmungsgewaltig und mit Hingabe auf der Klampfe für die musikalische Untermalung gesorgt hat.

Dr. Eva Schwarz, die wann immer gefragt wesentliche Ratschläge parat hatte, um meine Gedanken wenn nötig auf rationale Wege zurückzuleiten.

Meine Familie, ohne deren Verständnis, emotionale Unterstützung und liebevolles Umsorgen das alles überhaupt nicht möglich gewesen wäre.