

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen
Abteilung Physiologie I
Leiter: Professor Dr. F. Lang

Regulation von Ca²⁺-Signalen in T-Lymphozyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

Vorgelegt von
Anja Regina Bialkowski
aus
Stuttgart

2005

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. A. Lepple-Wienhues

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Immunologische Grundlagen	1
1.1.1	Die zelluläre Immunantwort.....	1
1.1.2	Die T-Zellaktivierung	2
1.2	Die Rolle von Ionenkanälen und Rezeptoren bei der Immunantwort ..	5
1.2.1	Ionenkanäle	5
1.2.2	Speicheroperierter oder kapazitiver Ca^{2+} -Kanal.....	6
1.2.3	Charakteristik des kapazitiven Einstroms- I_{Crac}	7
1.2.4	Rafts (caps).....	11
1.2.5	Charakteristik der rafts (caps).....	13
1.2.6	Rolle der rafts im Membrantransport.....	15
1.2.7	Die Rolle der rafts bei der T-Zellaktivierung	17
1.3	Apoptose.....	20
1.3.1	Der programmierte Zelltod	20
1.3.2	Struktur, Funktion und klinische Bedeutung des CD95-Rezeptors 21	
1.3.3	Der CD95-induzierte Block des kapazitiven Calciumeinstroms	24
1.4	Fragestellung	25
2	Material und Methoden.....	27
2.1	Verwendete Substanzen	27
2.1.1	Antikörper	27
2.1.2	Lösungen	27
2.2	Fluoreszenzmikroskopische Messungen	29
2.2.1	Grundlagen der Ratio-Video-Imaging Technik.....	29
2.3	Fluoreszenz-Aktivierter-Zell-Sorter (FACS).....	34
2.3.1	Grundlagen der Durchflusszytometrie.....	34
2.4	Abgewandelte Patch-Clamp-Methode.....	38
2.4.1	Aufbau des Messplatzes.....	40
2.4.2	Durchführung der abgewandelten Patch-Clamp-Experimente	41

2.5	Zellkultur	43
2.5.1	Zellkultur-Medien	43
2.5.2	Präparation peripherer T-Lymphozyten	43
2.5.3	Stimulation der peripheren T-Lymphozyten (Blastifizierung)	44
2.6	Statistische Auswertung.....	44
3	Ergebnisse	46
3.1	Ca ²⁺ -Signale in T-Helferzellen.....	46
3.1.1	Anti-CD3	46
3.1.2	PHA	48
3.1.3	Thapsigargin induziert kapazitiven Ca ²⁺ -Einstrom in T-Lymphozyten via I _{CRAC}	49
3.2	Clustering: TCR-Clusters: Sphingolipidreiche Membranen – “rafts” ...	50
3.2.1	FM1-43	52
3.2.2	TCR-Cluster	53
3.2.3	FM1-43 blockiert den kapazitiven Calciumeinstrom.....	55
3.3	Kokultur mit CD95-Ligand exprimierende Tumorzellen blockiert das Ca ²⁺ -Signal in T-Zellen via CD95.....	56
3.3.1	Blockade des Ca ²⁺ -Signals via CD95.....	57
3.3.2	IL-2 Block durch CD95-Stimulation	59
4	Diskussion.....	61
4.1	Die Rolle von Anti-CD3, PHA und Thapsigargin bei der T-Zellaktivierung.....	61
4.1.1	CD3 und Anti-CD3	61
4.1.2	PHA und T-Zellaktivierung	63
4.1.3	Thapsigargin und T-Zellaktivierung.....	64
4.2	Rafts.....	65
4.2.1	Die Rolle der rafts bei der T-Zellaktivierung.....	66
4.2.2	Rolle der rafts im CD95-getriggerten Zelltod.....	68
4.2.3	Bedeutung der rafts für den I _{CRAC}	69
4.3	CD95-induzierte Blockade von CRAC.....	70
4.3.1	CD-95-induzierte Apoptose und die Immunevasion von Tumoren	70

4.3.2	Hemmung der T-Zellaktivierung (Anergie)	72
4.3.3	Molekulare Mechanismen der CD95-induzierten Anergie	73
5	Zusammenfassung.....	76
6	Abkürzungen	78
7	Literaturverzeichnis	81
8	Danksagung	80
9	Lebenslauf.....	80

1 Einleitung

1.1 Immunologische Grundlagen

1.1.1 Die zelluläre Immunantwort

Das Immunsystem ist ein bemerkenswert adaptiertes Verteidigungssystem des menschlichen Organismus gegen eindringende und damit potentiell pathogene Mikroorganismen. Jede Form einer Immunantwort beinhaltet das Erkennen einer körperfremden Substanz und den darauf folgenden Abwehrmaßnahmen des Immunsystems. Die Immunreaktion wird in eine angeborene (nichtspezifische) und eine erworbene (spezifische) Komponente unterteilt. In beiden Fällen spielen die Leukozyten eine entscheidende Rolle beim Zustandekommen der Immunreaktion.

Angeborene Abwehrmaßnahmen enthalten neben unspezifischen physikalischen und chemischen Mechanismen wie Haut und Mukosa, Lysozym und Komplement auch zelluläre Mechanismen, zu denen natürliche Killerzellen und Phagozyten zählen. In die Gruppe der Phagozyten gehören Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Phagozyten erkennen unspezifisch Mikroorganismen oder Fremdstoffen (Antigene), heften sich an diese an und eliminieren sie durch Phagozytose. Intrazellulär prozessieren sie diese und präsentieren Peptidanteile der von ihnen aufgenommenen Partikel gebunden an MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche, um sie für weitere Zellen des Immunsystems kenntlich zu machen. Aufgrund dieses Funktionsprinzips gehören sie zur Gruppe der Antigen präsentierenden Zellen (APC).

Die erworbene Immunreaktion wird durch Lymphozyten vermittelt und lässt sich nochmals in eine zelluläre (T-Zell-) und eine humorale (B-Zell-) Komponente unterteilen. Lymphozyten stammen alle von pluripotenten Knochenmarkstammzellen ab, die sich in unterschiedlichster Weise

weiterentwickeln: T-Lymphozyten erfahren ihre Reifung im Thymus, während B-Lymphozyten im Knochenmark reifen.

Innerhalb des T-Zell-Systems gibt es mehrere Subpopulationen: die zytotoxischen T-Zellen (T-Killerzellen oder CD8⁺-Zellen) und die T-Helfer-Zellen (CD4⁺-Zellen). Die Aktivierung der T-Lymphozyten erfolgt über einen Rezeptor auf der Oberfläche der T-Zellen, dem T-Zell-Rezeptor (TCR). Der T-Zell-Rezeptor erkennt das prozessierte Antigen zusammen mit MHC-II-Molekülen auf der Oberfläche von Antigen präsentierenden Zellen und aktiviert den T-Lymphozyt. Zytotoxische T-Zellen zerstören daraufhin die histoinkompatiblen, virusinfizierten oder andersartig veränderten Zellen, während T-Helferzellen durch Produktion und Sekretion von Zytokinen Makrophagen aktivieren und andere Lymphozyten zur Immunantwort stimulieren.

B-Lymphozyten präsentieren auf ihrer Zelloberfläche einen Rezeptor mit der Struktur eines Antikörpers (IgM, IgD), welcher hochspezifisch ein bestimmtes Antigen an seinem B-Epitop erkennen kann. Findet eine solche Interaktion statt, werden die B-Lymphozyten aktiviert und können das Antigen phagozytieren und ebenso wie APC prozessieren und mit MHC-Klasse-II-Molekülen zusammen auf ihrer Oberfläche den T-Helfer-Zellen präsentieren. T-Helfer-Zellen aktivieren daraufhin wiederum die B-Zellen zur Proliferation und Differenzierung in antikörperproduzierende Plasmazellen, welche genau die Antikörper, die auf der B-Zelle das Antigen erkannt haben, in löslicher Form produzieren.

Zusammen mit Bestandteilen des Komplementsystems und anderen zellulären und humoralen Faktoren tragen sie zur Auslösung einer adäquaten Immunreaktion bei. B-Lymphozyten inaktivieren (neutralisieren) und entfernen Fremdstoffe, Mikroorganismen und Viren, tragen zu der Abstoßung körperfremder Zellen bei und verhindern die Proliferation veränderter Zellen (Tumorzellen).

1.1.2 Die T-Zellaktivierung

T-Zellen und auch B-Zellen werden aktiviert, wenn sie an ihre spezifischen Antigene binden. Durch membranständige Rezeptoren auf der Zelloberfläche,

die je aus zwei transmembranären Glykoproteinketten, α und β bzw. γ und δ bestehen, können T-Zellen mit den endständigen variablen Domänen spezifische Bindungen mit passenden, an MHC-Moleküle gebundene Antigenepitope eingehen. B-Zellen hingegen können auch an freie Antigene binden, brauchen aber meistens die Hilfe von T-Zellen für ihre Aktivierung.

Verantwortlich für die Weiterleitung eines T-Zell-Rezeptorsignals ins Zellinnere ist ein mehrkettiger CD3-Komplex, der den transmembranären Ketten nicht-kovalent angelagert ist. Durch die Interaktion der variablen TCR-Ketten mit MHC-Molekülen und Antigen, sowie mit den Co-Rezeptoren CD4 bzw. CD8 findet Rezeptoraggregation und die Bildung des TCR/CD3-Komplexes statt. Dieser Komplex assoziiert mit verschiedenen Protein-Tyrosinkinasen (PTK's) und aktiviert diese auf der cytosolischen Seite des Rezeptors (Cambier, 1992). In Lymphozyten werden die PTK's Fyn und Lck exprimiert, von denen gezeigt werden konnte, dass sie essentiell an der Lymphozytenaktivierung beteiligt sind (Justement, 1991; Weiss und Littman, 1994). Über diese tyrosinphosphorylierenden Enzyme wird der Phosphatidylinositolmetabolismus in Gang gesetzt. Hierbei wird durch Phospholipase C- γ (PLC γ) aus Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat (PIP₂) die Transmittermoleküle Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃) als hydrophilen, cytosolischen und Diacylglycerol (DAG) als lipophilen, membranständigen Faktor (Mustelin et al., 1990) erzeugt. IP₃ bindet intrazellulär an IP₃-Rezeptoren in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und löst dadurch die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus diesen intrazellulären Speichern aus (Fanger et al., 1997; Berridge, 1998), während DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert (DeFranco, 1993; Weiss, 1994), die letztlich den Transkriptionsfaktor NF κ B induziert.

Durch die Freisetzung intrazellulären Ca²⁺ aus dem ER wird über einen bisher nicht hinreichend geklärten Mechanismus ein speicher-operierter Ca²⁺-Kanal, ein sogenannter Ca²⁺ release activated Ca²⁺ channel (CRAC) (Putney und McKay, 1999), der in der Zellmembran liegt, geöffnet. Dies führt zu einem langanhaltenden und oszillierenden Ca²⁺-Einstrom über die Plasmamembran (Zweifach, 1993; Putney und Bird, 1993; Parekh und Penner, 1997; Berridge et al., 1998). Durch die Erhöhung des cytosolischen Ca²⁺ kommt es zur

Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Enzyme. So wird Calmodulin (CaM) stimuliert und aktiviert seinerseits die Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin, den Angriffspunkt der immunsuppressiv wirksamen Substanzen Cyclosporin A (CsA) und FK506 (Liu et al., 1991; Crabtree, 1999). Calcineurin dephosphoryliert den cytosolischen Transkriptionsfaktor NF-ATc (nuclear factor activated T cells), so dass er für die Kernmembran permeabel wird (NF-ATn). Ein zweiter Transkriptionsfaktor (AP-1) wird nach Stimulation der PKC neu synthetisiert. Der in den Zellkern translozierte NF-ATn-Faktor, AP-1, c-MAF, GATA4 und andere Transkriptionsfaktoren interagieren miteinander, dh. sie assoziieren im Kern zu einem Transkriptionskomplex, können an den Promotor binden und leiten die Transkription des für IL-2 codierenden Gens ein (Flanagan, 1991). Die Transkription der Gene für IL-2 und anderer Faktoren der frühen Immunantwort (IL-3, IL-4, Granulozyten-Makophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), CD40L und FasL), die die T-Zell-Proliferation und -Differenzierung sowie die Aktivität weiterer Zellen der Immunantwort beeinflussen, wird durch CRAC-Blockierung beendet (Wegwaschen von Ca^{2+} aus dem Medium, Applikation von EDTA, Cyclosporin A oder FK506) (Timmerman et al., 1996; Crabtree und Clipstone, 1994; Crabtree, 1999).

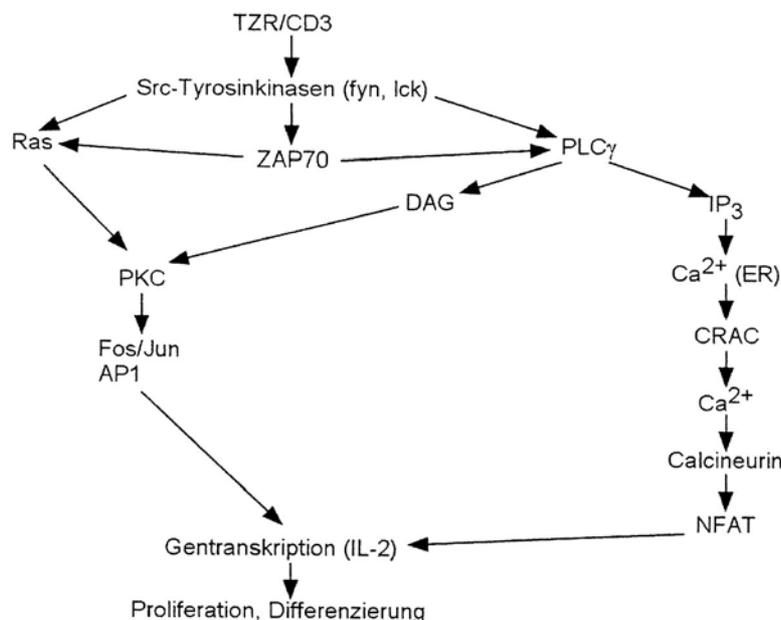


Abb. 1: Intrazelluläre Signaltransduktion der T-Zellaktivierung (Erläuterungen im Text)

Mitogene Lectine können lymphatische Zellen in Abwesenheit von Antigenen polyklonal stimulieren. Phytohämagglutinin (PHA) und Concanavalin A (Con A) stimulieren T-Zellen von Menschen und Mäusen. Lipopolysaccharine (LPS) wirken auf B-Zellen von Mäusen, Pokeweed-Mitogen (PWM) hingegen stimuliert menschliche T- sowie B-Zellen (Ruscetti, 1977). Monoklonale Antikörper gegen die Oberflächenmoleküle CD3-TCR oder ein Epitop von CD2 sind ebenso mitogen für alle T-Zellen. Ihre Anwendung in vitro hat gezeigt, dass die Aktivierung von T- und B-Zellen zur Produktion von Zytokinen und ihren Rezeptoren führt, die zusammen die Zellen in den Zyklus der Proliferation und schließlich zur Ausübung der Effektorfunktion bringen. Die mitogene Stimulation von Lymphozyten in vitro ahmt die Stimulation durch spezifische Antigene sehr gut nach (Roitt, 1995; Janeway, 1997).

Ca²⁺- Signale sind in bedeutendem Maße an der T-Zell-Aktivierung beteiligt, eine Stimulierung durch Anti-CD3 und PHA, sowie durch Thapsigargin wird in dieser Arbeit gezeigt.

1.2 Die Rolle von Ionenkanälen und Rezeptoren bei der Immunantwort

1.2.1 Ionenkanäle

Geladene Moleküle und anorganische Ionen passieren die Lipidschichten der Plasmamembran (PM) praktisch nicht. Nur mit Hilfe von hochspezialisierten Transmembranproteinen ist die Passage von Ionen möglich. Diese Transmembranproteine sind relativ selektiv bezüglich der durchfließenden Molekülspezies und können in fast allen biologischen Membranen vorkommen (Dudel, 1997).

Ionenkanäle sind an fundamentalen Zellfunktionsmechanismen beteiligt, wie z.B. Ca²⁺-Kanäle an Apoptose, Proliferation, Genexpression, Bildung und Ausschüttung von Signalstoffen, zellulärer Interaktion und Lokomotion beteiligt sind.

Man unterteilt Ionenkanäle zunächst nach den Ionen, die sie passieren lassen, also Na^+ -, K^+ -, Ca^{2+} -Ionen in die Gruppe der Kationenkanäle und Cl^- - und HCO_3^- -Ionen in die der Anionenkanäle. Innerhalb der jeweiligen Gruppe lassen sich Ionenkanäle weiter gemäß ihren physiologischen, genetischen, pharmakologischen und physikalischen Eigenschaften charakterisieren.

Ein Ionenkanal setzt sich in seiner Struktur als Protein aus mehreren Untereinheiten zusammen, wobei jede für sich die Zellmembran mit ihren lipophilen Anteilen mehrfach durchzieht. Je nach Kanaltyp lagern sich zum Beispiel vier solcher Untereinheiten bei K^+ -Kanälen zu einer Kanalpore zusammen. Durch diese wassergefüllten Poren können geladene Teilchen die Zellmembran per diffusionem passieren und sind so an der Signalübertragung zwischen Extra- und Intrazellulärraum beteiligt (Hille, 1992).

Der Ionenkanal selbst kann als ein erregbares Molekül angesehen werden, welches durch Ändern seiner Konformation die selektive Passagen von Ionen ermöglicht. Der Auslöser für den Konformationswechsel kann wie bei spannungsabhängigen Ionenkanälen eine Änderung des Membranpotentials sein oder, im Fall von ligandengesteuerten Kanälen, die Bindung eines Transmitters/Liganden an das Kanalprotein (Hille, 1992). Außerdem gibt es noch die speicheroperierten Kanäle, wobei hier insbesondere der speichergesteuerte Calciumkanal in Lymphozyten genauer betrachtet werden soll.

1.2.2 Speicheroperierter oder kapazitiver Ca^{2+} -Kanal

Speichergesteuerte oder kapazitive Calciumkanäle sind in vielen nicht erregbaren Zellen wie z. B. in Mastzellen, Fibroblasten, Hepatozyten, Melanomzellen und T-Lymphozyten auffindbar (Berridge, 1995; Zweifach und Lewis, 1993; Hoth und Penner, 1992). In menschlichen T-Zellen wurden speichergesteuerte Calciumkanäle zuerst von Lewis und Cahalan auf der Suche nach mitogen-aktivierten Ca^{2+} -Strömen identifiziert. Ihnen wird unter anderem eine Beteiligung an der Zellvolumenregulation (Tinel et al., 1994) und am proliferativen Signal in Lymphozyten (Lewis und Calahan, 1995; Zweifach und Lewis, 1993) zugeordnet. Diese Ca^{2+} -Kanäle erhalten ihr Signal zum

Öffnen, nachdem die intrazellulären Calciumspeicher (das Endoplasmatische Retikulum) das in ihnen gespeicherte Calcium ins Cytosol ausgeschüttet haben (Hoth, 1993). Wie dieses Signal zwischen Entleerung des Ca^{2+} -Speichers und Öffnung der speichergesteuerten Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran vermittelt wird, ist noch nicht eindeutig geklärt. Die Hypothesen hierzu reichen von einem löslichen Transmitter, welcher vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) freigesetzt wird (Randriamampita und Tsien, 1993), bis hin zu einer direkten Kopplung zwischen ER und dem Kanalprotein in Form einer physikalischen Interaktion (Irvine, 1990; Berridge, 1995). Auch eine Beteiligung von cGMP, G-Proteinen (Fasolato, Hoth und Penner, 1993) und Tyrosinkinasen (Jenner und Farndale, 1994) wurden vorgeschlagen.

Trotz all dem ist immer noch nicht vollständig geklärt, wie sich der Kontakt zwischen ER und Ca^{2+} -Kanälen in der Membran ergibt.

Kapazitative Ca^{2+} -Kanäle in nicht-erregbaren Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine Vielzahl von Zellfunktionen wie z.B. Exozytose, Gentranskription, Zellzyklus, Proliferation und auch Apoptose (Parekh und Penner, 1997) beeinflussen.

Sie können durch mehrere speicherentleerende Manipulationen, darunter intrazelluläre Applikation von IP_3 , EGTA, BAPTA sowie extrazellulär Thapsigargin, DBHQ, Cyclopiazonsäure u.a. aktiviert werden (Premack und Gardner, 1994).

1.2.3 Charakteristik des kapazitiven Einstroms- I_{Crac}

Die CRAC-Kanäle, wie die speichergesteuerten Ca^{2+} -Kanäle von Hoth und Penner in ihrer Arbeit über diese Kanäle in Mastzellen 1993 bezeichnet wurden, sind für das anhaltende mitogene Ca^{2+} -Signal bei der T-Zellaktivierung verantwortlich.

CRAC-Kanäle weisen eine Reihe von Eigenschaften auf, die von mitogenen Ca^{2+} -Kanälen zu erwarten sind, wie z.B. hohe Ca^{2+} -Permeabilität, Hemmung durch Depolarisation und durch erhöhtes Ca^{2+} sowie Hemmung durch die anorganischen Blocker Ni^+ und Cd^{2+} (Hoth, 1993).

Die Aktivierung des Stroms über Ca^{2+} -Kanäle ist GTP-abhängig und wurde vor der Arbeit von Hoth und Penner SOC (store-operated current) genannt.

Ein weiteres Kennzeichen der speicheroperierten Kanäle ist, dass neben dem physiologischen Stimulus des TCR auch durch artefizielle Stimulation des TCR mittels Phytohämagglutinin (PHA) (Zweifach und Lewis, 1993) und rezeptorunabhängige Stimuli, die zu einer Entleerung des ER führen, eine Aktivierung ausgelöst werden kann. Effektive Stimuli sind unter anderem Thapsigargin (TG), ein Sequesterpenlacton, das irreversibel an die endoplasmatische Ca^{2+} -Pumpe (SERCA-ATPase) bindet. Diese wird dadurch blockiert und die Aufnahme von Ca^{2+} in das ER verhindert (Premack et al., 1994; Thastrup et al., 1989). Andere Aktivatoren sind Ionomycin, ein lipophiles Ca^{2+} -Ionophor, intrazelluläre Ca^{2+} -Chelatoren, die zytosolisches Ca^{2+} chelieren und die Wiederaufnahme in die intrazellulären Speicher unterbinden und IP_3 , das an den endoplasmatischen IP_3 -Rezeptor bindet und durch Aktivieren des IP_3 -sensitiven Ca^{2+} -Kanals gespeichertes Ca^{2+} freisetzt (Parekh und Penner, 1997; Lewis, 1999).

In Patch-clamp-Studien konnten mehrere Typen von speicheroperierten Kanälen (SOC, store-operated channels) unterschieden werden (Lewis, 1999; Parekh und Penner, 1997). Der in T-Lymphozyten gefundene CRAC unterscheidet sich von den anderen SOC durch seine hohe Ca^{2+} -Selektivität. Es folgt eine Auflistung seiner charakteristischen Merkmale:

Hinsichtlich der Ionenselektivität ist der durch TCR-Stimulation erfolgende oder durch passive Speicherentleerung induzierte identisch mit dem auftretenden Ca^{2+} -Einstrom im Zuge der T-Zellaktivierung. Dasselbe gilt für die Leitfähigkeit, der Ca^{2+} -abhängigen Inaktivierung und der Blockade durch Schwermetalle (Premack et al., 1994; Zweifach und Lewis, 1993). Außerdem kann der durch Speicherentleerung induzierte Strom durch TCR-Stimuli (Lektine, Antikörper) nicht weiter erhöht werden (Premack et al., 1994; Sarkadi et al., 1991). Weiterhin blockieren SKF96365 (Imidazolderivat) oder nanomolare Mengen von Lanthan sowohl CRAC als auch die T-Zellaktivierung (Aussel et al., 1996; Chung et al., 1994).

Viele der Eigenschaften des CRAC-Kanals stimmen mit Charakteristiken von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (Ca_v) überein. In den Studien von Hoth and Penner zeigte sich eine Selektivität dieser Kanäle für Ca^{2+} gegenüber monovalenten Kationen wie Natrium, die bei $>1000:1$ liegt. Eine ähnliche Selektivität wurde auch für L-Typ Ca_v -Kanäle beschrieben (Hoth, 1995; Hoth und Penner, 1993). CRAC-Kanäle benötigen ähnlich wie Ca_v -Kanäle extrazelluläres Ca^{2+} , um diese Selektivität zu erreichen; erniedrigt man die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration auf mikromolare Werte, dann fließt ein monovalenter Strom (Hoth und Penner, 1993; Lepple-Wienhues et al., 1996). Die Porengröße des CRAC-Kanals und seine Sensitivität gegenüber innerer und äußerer Protonenkonzentration lassen darauf schließen, dass die Porenregion dieser beiden Calciumkanäle eine ähnliche Struktur aufweist (Kerschbaum und Cahalan, 1998). CRAC-Kanäle öffnen im Gegensatz zu Ca_v -Kanälen nicht spannungsabhängig und durch eine Hyperpolarisation wird der Ca^{2+} -Einstrom erhöht.

Die Einzelkanalleitfähigkeiten mit Calcium als Ladungsträger wurden durch Rauschanalysen von Ganzzellströmen auf 20fS geschätzt (Zweifach und Lewis, 1993).

Die Strom-Spannungscharakteristik weist eine Einwärtsrektifizierung für Ca^{2+} als Ladungsträger auf (Zweifach et al., 1993, Fanger et al., 1997).

Verschiedene Ca^{2+} -abhängige Mechanismen sind verantwortlich für die Inaktivierung. Derzeit sind mehrere Ca^{2+} -abhängige Inaktivierungsmechanismen bekannt. Eine Auffüllung der Ca^{2+} -Speicher des ER unterbricht den I_{CRAC} (Hofer et al., 1998; Zweifach und Lewis, 1995).

Daneben gibt es auch zwei „store-independent“ Inaktivierungsmechanismen. Die sogenannte schnelle Inaktivierung (im Bereich von Millisekunden) ist Ca^{2+} -abhängig. Sie resultiert aus einer lokalen intrazellulären Ca^{2+} -Akkumulation und der Bindung von Ca^{2+} an eine Bindungsstelle (fast inactivation site) in der Porenregion direkt am Kanal oder an einem assoziierten Protein (Zweifach und Lewis, 1995). Der zweite vom Füllungsgrad der Speicher unabhängige Inaktivierungsmechanismus weist einen langsamen im Bereich von Sekunden

liegenden Verlauf auf und wird vermutlich durch eine Proteinkinase C vermittelt (Parekh und Penner, 1995). Auch die Beteiligung von Mitochondrien an der Inaktivierung der CRAC-Kanäle wird derzeit diskutiert

Die Triebkraft für das Ca^{2+} -Signal wird außerdem durch Kaliumkanäle generiert, die über das Membranpotential den elektrochemischen Gradienten für den Ca^{2+} -Einstrom erzeugen (Lewis und Cahalan, 1990). Neben spannungsabhängigen Kaliumkanälen exprimieren Lymphozyten Ca^{2+} -regulierte Kaliumkanäle, die eine Kopplung des Membranpotentials an die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bewirken (Grissmer et al., 1992).

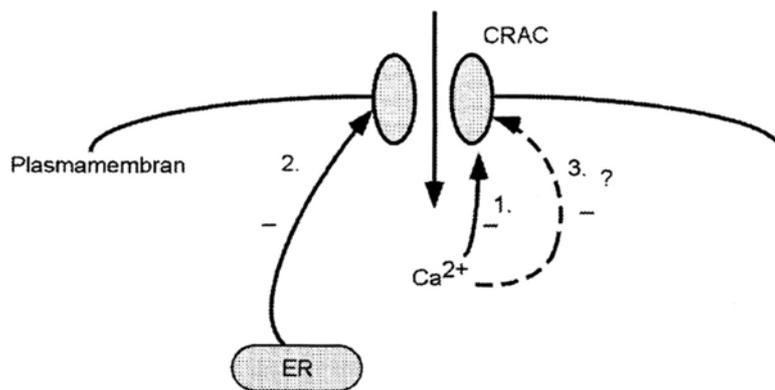


Abb: Ca^{2+} -abhängige Regulationsmechanismen des kapazitiven Ca^{2+} -Einstromes

Die schnelle Inaktivierung (1., Millisekundenbereich) wird durch eine Ca^{2+} -Bindungsstelle in der Porenregion vermittelt. Bei den langsamen Inaktivierungsmechanismen (Sekundenbereich) unterscheidet man einen vom Füllungsgrad des intrazellulären Speichers abhängigen (2) und einen „store-independent“ (3) Mechanismus, an dem vermutlich eine Proteinkinase beteiligt ist.

Fomina et al. haben in neueren Studien gezeigt, dass der Expressionslevel der CRAC-Kanäle von dem Aktivierungszustand der T-Zelle abhängt. In ruhenden T-Zellen finden sich erstaunlich wenig suffiziente CRAC-Kanäle, die ein Ca^{2+} -Signal vermitteln können, wohingegen die Expression der CRAC-Kanäle ungefähr auf das Zehnfache während einer T-Zellaktivierung ansteigt, was zu einem gesteigerten Ca^{2+} -Signal führt (Fomina et al, 2000). In dieser Arbeit wurden die T-Zellen jeweils zur Aktivierung während oder vor dem Experiment

gebracht, so dass eine möglichst hohe Anzahl an CRAC-Kanälen vorhanden war.

1.2.4 Rafts (caps)

Rafts spielen eine Schlüsselrolle bei der T-Zellaktivierung. Sie werden bei Anfärben als „Kappen“ auf der Zellmembran sichtbar und daher auch caps genannt (s.u.).

Rafts sind spezielle sphingolipidreiche Membrandomänen, die innerhalb der Zellmembran als sich bewegende Plattformen vorkommen, an die sich spezifische Proteine (GPI-anchored Proteine, Transmembranproteine und doppelt acylierte Tyrosinkinase der Src-Familie) binden können, z.B. während sich Membranen in der Zelle und bei Signaltransduktion bewegen.

Proteine können selektiv von diesen Mikrodomänen aufgenommen oder ausgeschlossen werden, was impliziert, dass die Aufgabe der Mikrodomänen im Transport von selektierten Membranen oder als Relaisstation für intrazelluläres Signalling besteht (Simons und Ikonen; 1997).

Zellmembranen bestehen aus einer komplexen Mischung von Cholesterol und verschiedenen Glycerolphospholipiden und Sphingolipiden. Glycerolphospholipide und Sphingolipide weisen deutliche biophysikalische Eigenschaften auf und verhalten sich auf unterschiedliche Weise, wenn sie eine Monolayer formen, wobei Glycerolphospholipide die Tendenz zeigen, eine mobile flüssige Phase anzunehmen, während Sphingolipide eine mehr dicht gepackte Organisation zeigen (Brown und London, 1998). Simons und Ikonen formulierten eine generelle „raft Hypothese“, die aussagt, dass in allen Zelltypen Anziehungskräfte zwischen Sphingolipiden und Cholesterol die Formierung lateraler Lipidcluster in einer ungesättigten Glycerolphospholipidumgebung vermitteln. Laut dieser Hypothese dienen rafts als Plattformen, in denen verschiedene Moleküle angereichert, andere ausgeschlossen werden.

In Epithelzellen sind Plasmamembranen in apikale und basolaterale Domänen polarisiert, wobei die apikale Region mehr Sphingolipide, die basolaterale mehr Phosphatidylcholine enthält (Rodriguez-Boulan und Nelson; 1989). Durch tight

junctions wird ein Vermischen von Sphingolipiden und Phosphatidylcholin verhindert.

Kleine Einschlüsse der Plasmamembran, sogenannte Kaveolen, sind in vielen Zelltypen vorhanden, enthalten Glykosphingolipidhaufen und benötigen Cholesterol, um zu funktionieren. Da diese Kaveolen wahrscheinlich bei Endozytose und Transzytose eine Rolle spielen, wurde eine Funktion für sphingolipidreiche rafts im Membrantransport angenommen.

Simons and Ikonen (Abb. 3) beschreiben ein Modell für die Organisation von sphingolipid-cholesterolreichen rafts, in dem die Sphingolipide seitlich miteinander assoziieren, wahrscheinlich durch schwache gegenseitige Wechselwirkungen zwischen den carbohydrierten Köpfen der Glykosphingolipide. Jeder Zwischenraum zwischen den assoziierten Sphingolipiden ist mit Cholesterolmolekülen aufgefüllt. Cholesterol kommt in beiden Zellmembranlipidschichten vor und fungiert als Füllungsmaterial, indem es die durch interdigitierte Fettsäureketten hervorgerufene Lücken ausfüllt.

Diese enggepackten sphingolipid-cholesterolreichen Haufen verhalten sich wie Zusammenschlüsse innerhalb der exoplasmatischen Plasmamembranseite, in denen die dazwischenliegenden flüssigen Regionen mit ungesättigten Phosphatidylcholinmolekülen ausgefüllt sind. Glykosphingolipide tragen meistens eine lange Fettsäure, die an die Sphingosinbasis amidgebunden ist und mit der cytoplasmatischen Zellmembranseite interagiert (Boggs und Koshy; 1994) . Die Natur der Phospholipide, die die cytoplasmatische Seite der Mikrodomänen besetzen, ist unbekannt, aber wahrscheinlich enthalten sie hauptsächlich gesättigte Fettsäureketten, um das dichte Zusammenpacken zu optimieren. Es wird angenommen, dass sich individuelle Lipide in rafts hinein- und herausbewegen können, was auch erklärt, warum sphingolipid-cholesterol clustering schwierig durch Spektroskopie aufgedeckt werden kann.

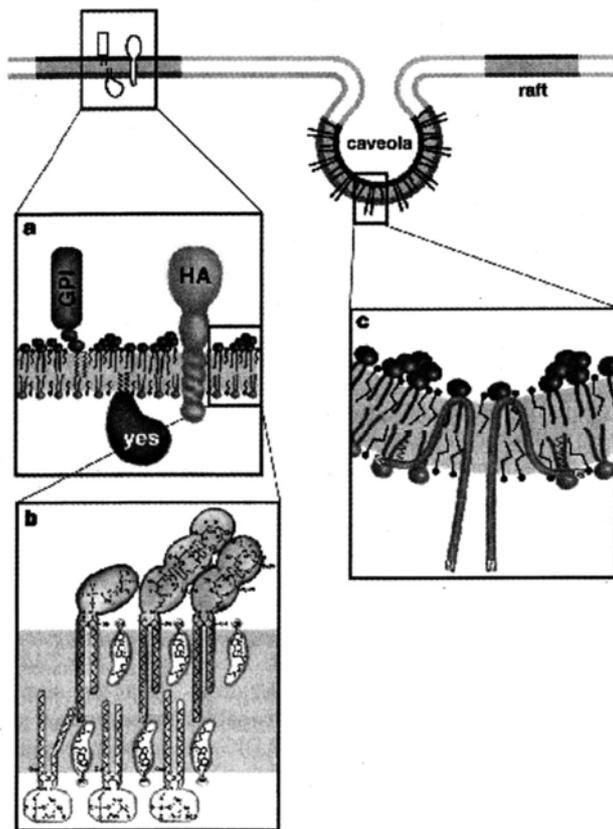


Abb. 3: Modell zur Organisation von Rafts und Caveolae in der Plasmamembran

- a) Rafts enthalten Proteine, die mit der exoplasmatischen Seite der Bilayer durch ihr GPI Anker Kontakt haben, Proteine, die an die zytoplasmatische Seite durch Acyl-Reste binden (die Src-Familien Kinase Yes wird gezeigt), oder Proteine, die durch ihre Transmembrandomänen assoziieren, wie das Influenzavirus Protein Neuraminidase und Haemagglutinin (HA).
- b) Die Lipidbilayer in Rafts ist asymmetrisch. Mit Sphingomyelin und Glycosphingolipiden auf der exoplasmatischen Seite und Glycerolipiden (z.B. Phosphatidylserin) in der zytoplasmatischen Seite. Cholesterol ist in beiden Seiten enthalten und füllt die Räume unter den Hauptgruppen der Sphingolipiden.
- c) Caveolae werden durch selbstassoziiierende Caveolinmoleküle geformt, die eine Einstülpung in der Membran schlagen. Interaktion mit Raft Lipiden könnte durch Bindung an Cholesterol vermittelt werden oder durch Acylation von C-terminalen Cysteinen.

1.2.5 Charakteristik der Rafts (caps)

Sphingolipid-cholesterolreiche Rafts sind in dem Lösungsmittel Triton X-100 bei 4°C unlöslich, in welchem sie glykolipidreiche Komplexe (DIGs – detergent-

insoluble, glycolipid-enriched complexes) bilden (Brown et al., 1992). Wegen ihres hohen Lipidgehaltes fließen diese DIGs während der Gradientenzentrifugation zur geringeren Dichte. Dies ermöglicht es, jedes assoziierte Protein zu identifizieren, und unterscheidet DIGs von anderen lösungsmittelunlöslichen Komplexen. Mildere Lösungsmittel wie z.B. Octylglucosid lösen Lipidrafts. Glycosphingolipide sind unlöslich durch sich selbst und Sphingomyelin ist widerstandsfähig gegen Lösungsmittelextraktion im Beisein von Cholesterol (Schroeder et al.; 1994).

Rafts können Proteine binden: GPI-verankerte Proteine, Transmembranproteine (Skibbens et al., 1989; Sargiacomo et al., 1993; Danielsen et al., 1995) und doppelt acylierte Tyrosinkinasen der Src-Familie (Casey 1995) sind mit rafts assoziiert und in DIGs eingebunden (Brown und Rose; 1992).

Obwohl Cholesterol im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert wird, taucht ein Raftzusammenschluss erstmals im Golgikomplex, in dem die Sphingolipide produziert werden, auf (van Meer; 1989).

Bei der Untersuchung der Zusammenarbeit GPI-verankerter Proteine mit rafts stellte sich heraus, dass mit dem Herauslösen von Cholesterol durch Saponin sich diese Proteine als löslich in Triton X-100 bei 4°C erweisen. Außerdem verleiht die Interaktion mit Lipidrafts eine Detergentienunlöslichkeit auf einem GPI-verankerten Protein und der Zusammenschluss der GPI-verankerten Proteinen mit DIGs in vivo wird durch Cholesterol und Sphingolipide beeinflusst (Hanada et al., 1995; Hannan et al., 1996). Für GPI-verankerte Proteine bestimmt der Lipidanker mit seinen zwei gesättigten Fettsäurenketten den raft-Zusammenschluss (Casey 1995). Doppelte Acylierung durch gesättigte Ketten, wie in Src-family Kinasen, kann vielleicht bevorzugte Abtrennung in rafts determinieren. Für Transmembranproteine können Membran-umfassende Domänen eine Affinität zu rafts verleihen.

Ein anderes Membranprotein, das in DIGs gefunden wurde, ist Caveolin: dieses lokalisiert sich zu Kaveolen und post-Golgi Transportvesikeln und bindet Cholesterol, was seine Association zu den DIGs erklären könnte.

Werden rafts durch Anfärben sichtbar gemacht, erscheinen diese Stellen auf der Zelloberfläche wie kleine Kappen, welche das Anhäufen von Rezeptormolekülen an wenigen Punkten oder einem Punkt der Zelloberfläche anzeigen. Dieser Vorgang wird auch Capping genannt (Graziadei et al, 1990).

Capping ist ein aktiver Prozeß, der durch niedrige Temperaturen, durch Reagenzien, die die Energieversorgung der Zelle lähmen, oder durch solche, die die Polymerisation der Mikrofilamente stören, verhindert werden kann (Bourguignon und Bourguignon, 1984; DeFranco, 1987), dieser Prozeß scheint Proteinkinase C abhängig zu sein (Pavan et al, 1992; Haverstick und Gray, 1992; Haverstick et al, 1992). Capping kann sowohl durch oligovalente Proteinantigene als auch durch Anti Ig Reagenzien hervorgerufen werden (Snow et al, 1983).

1.2.6 Rolle der rafts im Membrantransport

Der intrazelluläre Transport von sphingolipid-cholesterolreichen rafts wurde an der MDCK Zelllinie untersucht (Simons und Ikonen; 1997).

Die apikale Seite transportiert bevorzugterweise Sphingolipid-Cholesterol rafts, die GPI-verankerte Proteine und apikale Transmembranproteine tragen (Fig 2). Wie GPI-Anker (Lisanti et al., 1989) und spezifische Membran-spannende Regionen (Kundu et al., 1996), können N-Glykane auch als apikale „sorting signals“ angesehen werden. Manche Proteine sind abhängig von ihrer Bindung an N-Glykane in raft-assoziierten Lektinen, andere hingegen können in rafts direkt partitionieren.

Die basolaterale Ankunft ist abhängig von Signalen, die von den zytoplasmatischen Domänen der basolateral gerichteten Proteine herrühren.

Weiterhin sind sphingolipid-cholesterolreiche rafts in Transportproteine des Endozyoseweges involviert. Endozytose von der apikalen Oberfläche beinhaltet beides, den „Clathrin-coated Vesikel pathway“ und einen anderen, weniger gut beschriebenen Weg zu Endosomen über diese Membrandomäne (Danielsen und van Deurs; 1995). Es gibt in der apikalen Membran von Enterozyten oder

MDCK Zellen keine Caveolen, weshalb diese nicht für die Clathrin-unabhängige Route verantwortlich sein können.

Caveolen werden zusammen mit Clathrin-ummantelten Vertiefungen (coated pits) an der basolateralen Oberfläche von MDCK Zellen gefunden. Im Gegensatz zu den coated pits, die vollständig endozytiert werden, bleiben die Caveolen mit der Plasmamembran bei den meisten Zelltypen verbunden. Ihre Freisetzung wird durch unbekannte Signale ausgelöst. In Endothelien sind Caveolen in den Transzytoseweg eingebunden.

Simons und Ikonen postulieren, dass es zwei Routen, die den Golgikomplex mit der Zelloberfläche verbinden, für den Membrantransport gibt. Einer transportiert Membranproteine, die „aussortierende Signale“ in ihren cytoplasmatischen Domänen haben, der andere agiert mit sphingolipid-cholesterolreichen rafts und Proteinen, die mit ihnen assoziiert sind. Proteine können durch raft-Wege und Clathrin-ummantelte Vesikel endozytiert werden und manche Proteine kehren zum Golgikomplex zurück.

Ein Vorteil dieser Organisation der Zellmembranen ist der, dass die Proteine, die in den Signalweg eingebunden sind auf verschiedene Lipidmikrodomänen beschränkt sind. Clustering von GPI-verankerten Proteinen kann Signalwege je nach Zelltyp aktivieren. Dieses Clustering führt zu Signaltransduktion auf zwei Wegen:

Enzyme, die in den rafts aktiviert werden und in die Freisetzung involviert sind, könnten wasserlösliche Phospho-Oligosaccharide hervorbringen; diese müssten über die Doppelzellmembran geflippt werden, um als second messenger im Zytosol wirken zu können (Parpal et al., 1995)

Bei der zweiten Hypothese geht man davon aus, dass Clustering von GPI-verankerten Proteinen zu Interaktion mit signaltransduzierenden Proteinen führen kann, die daraufhin aktiviert werden. Eine potentielle Verbindung ist, dass zwei Src-family Kinasen, Lck und Fyn, die beide an der T-Zellaktivierung beteiligt sind, mit GPI-verankerten Proteinen nach Triton X-100 Extraktion bei 4°C immunpräzipitiert werden können.

Es ist jedoch nicht geklärt, wie GPI-verankerte Proteine auf der exoplasmatischen Seite des rafts mit doppelt acylierten Tyrosinkinase auf der zytoplasmatischen Seite kommunizieren können.

Lipide, die in die Signaltransduktion eingebunden sind, wurden auch in DIGs gefunden, z.B. Phosphoinositiden wie Phosphatidyl-Inositol-(4,5)-Bisphosphat (Hope et al., 1996) und Sphingomyelin.

Bei der Signalkaskade kann die Rolle der Kaveolen und DIGs nicht eindeutig festgelegt werden (Parton et al., 1995). Sie kann mit Kaveolen auftreten, z.B. in T-Lymphozyten (Fra et al., 1994). Aber Kaveolen können als Zentren agieren, von denen aus multiple Signalwege abgehen (Anderson, 1993). Geclusterte GPI-verankerte Proteine und Glycosphingolipide sind beide in Kaveolen angereichert, was vermuten lässt, dass Proteine und Lipide, die mit sphingolipid-cholesterolreichen rafts assoziiert sind, in Kaveolen „gefangen“ werden (Parton, 1995; Mayor et al., 1994).

Simons und Ikonen vermuten, dass Proteine, die mit rafts assoziieren, welche in der Plasmamembran präsent sind, in den Kaveolen fixiert werden, wenn sie oligomerisieren. Nachdem sie „gefangen“ wurden, könnte der Inhalt der Kaveolen internalisiert und von der Zelloberfläche entfernt werden auf signalabhängige Art und Weise.

Die allgemeine Funktion des raft-Zusammenschluss in der Signaltransduktion könnte sein, dass sich Rezeptoren für die Interaktion mit Liganden und Effektoren auf beiden Seiten der Membran konzentrieren, um die Bindung während der Signalkaskade zu beschleunigen und unpassendes Interferieren zwischen Signalwegen zu verhindern. Manche Proteine können an andere Proteine binden, um von rafts ausgeschlossen zu werden oder umgekehrt. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob CRAC-Kanäle auch in diesen rafts vorkommen.

1.2.7 Die Rolle der rafts bei der T-Zellaktivierung

Werden rafts durch Anfärben sichtbar gemacht, erscheinen diese Stellen auf der Zelloberfläche wie kleine Kappen, welche das Anhäufen von

Rezeptormolekülen an wenigen Punkten oder einem Punkt der Zelloberfläche anzeigen. Dieser Vorgang wird Capping genannt (Graziadei et al., 1990)

Capping scheint für den schnellen und effizienten Ablauf der Signalkaskade des stimulierten Rezeptors notwendig zu sein (Germain, 1997). Bei T-Lymphocyten konnte gezeigt werden, daß alleine durch Capping des T-Zellrezeptors diese Zelle aktiviert werden kann (Boniface et al., 1998). Bei der Stimulation der unterschiedlichsten Rezeptoren kann man das Capping finden, weil dieses ein sehr wichtiges Element der Zellaktivierung darstellt. Beispiele hierfür sind: der T-Zellrezeptor (Boniface et al., 1998), der B-Zellrezeptor (Graziadei et al., 1990), der Tumor Nekrose Faktor (Natoli et al., 1998) und andere mehr. Die meisten Rezeptoren konzentrieren sich in cholesterin- und sphingolipidreichen Anteilen der Zellmembran oder wandern nach Stimulation dorthin. Wahrscheinlich sind diese Anteile der Zelloberfläche der Ausgangspunkt von Capping und der nachfolgenden Signalkaskade des stimulierten Rezeptors (Simons und Ikonen, 1997). Früher wurde angenommen, daß nur Umbau des Zytoskeletts Capping möglich macht (Graziadei et al., 1990). Heute weiß man, daß auch Rezeptoren, die nicht mit dem Zytoskelett interagieren sich an einem Punkt der Zelloberfläche annähern. Wichtig für Capping sind also Lipide und Veränderungen der Zellmembran. Solche Lipide müssen, um an Capping beteiligt zu sein, bestimmte Eigenschaften haben:

Sie müssen schnell synthetisiert werden können, sich in den oben beschriebenen Membrananteilen befinden und an Proteine binden können, um eine effektive Signalkaskade zur T-Zellaktivierung zu gewährleisten.

Eine Vielzahl der Signalmoleküle sind in raft Domänen (caps) akkumuliert, inklusive der zwei Src Kinasen Lck und Fyn, die beide an der T-Zellaktivierung beteiligt sind, dem T-Zell-Verbindungsmolekül LAT, monomeren und heterotrimeren G-Proteinen, G-gekoppelten Proteinrezeptoren und Molekülen, die in die Ca^{2+} -Antwort involviert sind (Cinak et al., 1992; Zhang et al., 1998). Posttranslationale Addition von Lipiden (Myristylation, Palmitoylation und Farnesylation) ist ein kritisches Werkzeug für das Ansteuern vieler dieser Moleküle zur Membran sowie für ihre Funktion (Resh, 1994).

Glycerolphosphatidylinositol-verankerte Proteine zeigen, wenn sie durch Antikörper geclustert sind, ein Umformen intrazellulärer Signale, die zu Tyrosinphosphorylierung, Ca^{2+} -Einstrom oder Zellproliferation führen (Stefanova et al, 1991). Dieses Signal hängt ab von den raft-assoziierten Kinasen und kann durch Reduktion des Membrancholesterolanteils oder durch Veränderung der Membranlipidkomposition unterdrückt werden, was bedeutet, dass eine Einheit von raft Domänen benötigt wird (Stulnig et al, 1997).

In T-Zellen hat sich gezeigt, dass das Engagement des TCR seine Einstellung zu rafts induziert und dass raft-Einheiten für eine effiziente T-Zellaktivierung benötigt werden (Montixi et al, 1998; Xavier et al, 1998). In Hinsicht auf TCR-Triggerng enthalten supramolekulare Signalkomplexe hyperphosphorylierte Ketten, aktivierte ZAP-70 und viele andere, die in raft Domänen akkumuliert werden. Diese Ereignisse, sowie auch T-Zellaktivierung, können durch Unterbrechung der raft Struktur unterdrückt werden, was bedeutet, dass Membrankompartimentierung eine Grundvoraussetzung für TCR-Signaltransduktion ist. Seit kurzem ist bekannt, dass CD28-Engagement eine beeindruckende Umverteilung von rafts auf der TCR Kontaktseite fördert und sogar TCR-induzierte Signale verstärkt und aufrechterhält (Viola et al, 1999).

Wenn die Einstellung des TCR auf rafts sein Triggern induziert und vielleicht die Signalkaskade startet, dann repräsentiert die aktive Einstellung und das Clustering von raft Mikrodomänen an die Stelle des TCR-Triggers einen generellen Mechanismus, durch den Costimulation den Signalprozeß verstärken kann (Lanzavecchia et al, 1999). Während das Resultat naiver T-Zellaktivierung stark durch CD28-Costimulation beeinflusst wird, weisen Effektor-T-Zellen eine niedrigere Abhängigkeit von Costimulation und eine schnellere Antwort als naive Zellen auf (Croft, 1994; Iezzi et al, 1998). Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen haben eine effizientere Tür-Signalmaschinerie als naive T-Zellen. In murinen naiven zytotoxischen T-Zellen sind nur wenige CD8-Moleküle mit Lck assoziiert und die Kinase ist homogen in der Zelle verteilt, während in vivo priming naiver T-Zellen das Targeting von Lck zum CD8-Corezeptor in die Zellmembran induziert.

1.3 Apoptose

Der als Apoptose bezeichnete programmierte Zelltod soll im Folgenden näher erläutert und auf molekulare Mechanismen der Signaltransduktion eingegangen werden, da er als Grundlage für die untersuchten Veränderungen der Ionenströme im Zusammenhang mit der Fragestellung dieser Arbeit dient.

1.3.1 Der programmierte Zelltod

Der Begriff Apoptose steht für einen kontrollierten, selbstregulierten Zelltod. Apoptose ist eine spezifische Zellfunktion und führt im Gegensatz zu Nekrose nicht zu einer Immunreaktion.

Ein ständiger Abbau und entsprechende Erneuerung von Zellen sorgt für die Aufrechterhaltung der Homöostase bei multizellulären Organismen (Nagata und Golstein, 1995). Dadurch wird das zelluläre Gleichgewicht und damit die Integrität der Organe durch das Gleichgewicht von Zellproliferation und Zelltod gewährleistet.

Durch den programmierten Zelltod wird die Elimination von im Laufe der Entwicklung überflüssig gewordenen, mutierten oder beschädigten Zellen induziert (Vaux et al., 1994).

Neben ihrer wichtigen Rolle in der Entwicklung mehrzelliger Organismen ist Apoptose auch von entscheidender Bedeutung für die Bildung und Funktion des Immunsystems. Etwa 95% der T-Zellvorläufer und 75% der B-Zellvorläufer sterben beim Prozess der negativen Selektion durch Apoptose. Surh et al. zeigten auf, dass Lymphozyten, die autoreaktive oder nicht funktionelle Rezeptoren entwickeln ebenfalls durch programmierten Zelltod eliminiert werden (Surh und Sprent, 1994).

Besteht eine abnormale Apoptoseresistenz kann dies Missbildungen, Autoimmunkrankheiten oder die Entstehung eines Tumors verursachen. Eine gesteigerte Apoptoserate wird in einer Reihe von akuten Infarkten und chronischen Krankheitsbildern (neurodegenerative Erkrankungen, AIDS) beobachtet (Thompson, 1995).

Ein definiertes zeitliches Schema eingeteilt in drei Phasen ist bei der Apoptose zu erkennen (Martin und Green, 1995). In der Induktionsphase sind viele verschiedene Stimuli in der Lage den programmierten Zelltod auszulösen. Auf die Stimulation von spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche, z.B. von Mitgliedern der Tumor-Nekrosis-Faktor-Rezeptoren (TNFR)-Familie wie CD95-Rezeptor, Trail (Van Parijs und Abbas, 1998), zellulärer Stress, Entzug von Wachstumsfaktoren, reaktive Sauerstoffradikale, Bakterien und Viren, ionisierende Strahlung und Erhöhung des intrazellulären freien Ca^{2+} , folgt die Effektorphase, in der die endgültige Entscheidung fällt, ob die Zelle stirbt. In der Degradationsphase kommt es dann zum programmierten Zelltod mit den typischen biochemischen und morphologischen Erscheinungen, wie die Aktivierung von Proteasen und Endonucleasen, die Kondensierung des Zellkerns und die Fragmentierung der DNA, die Kondensation des Zytoplasmas und Zellschrumpfung, sowie die Ausbildung apoptotischer Partikel und das Zerfallen der apoptotischen Zellen in Membranvesikel (SchulzeOsthoff et al., 1998).

Apoptose kann durch Aktivierung induziert werden. Dies ist eine Sonderform, die eine wichtige Rolle zur Begrenzung der Immunantwort spielt. Sie dient der Erhaltung des immunologischen Gleichgewichts im Organismus, indem gewährleistet wird, dass sich die T-Zellen während der Immunantwort vermehren und nach Erfüllen ihrer Funktion wieder auf Normalwerte abfallen (Brunner et al., 1995). Für diesen Regulationsmechanismus ist unter anderem das Fas-Rezeptor-Liganden-System wichtig und wird im Folgenden weiter charakterisiert.

1.3.2 Struktur, Funktion und klinische Bedeutung des CD95-Rezeptors

Der CD95-Rezeptor wird in aktivierten Lymphozyten, Thymus, Herz, Lunge, Ovarien und in den immunprivilegierten Kompartimenten in Hoden, Leber und Auge exprimiert (Griffith, 1995; French, 1996; Griffith, 1996; Strand, 1996; Hunt, 1997). Er ist von entscheidender Bedeutung für die Begrenzung der Lymphozytenpopulation und die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz sowie der

Immuntoleranz in immunprivilegierten Organen wie der Vorderkammer des Auges (Singer, 1994).

Der CD95-Rezeptor (auch als Fas oder Apo-1 bezeichnet) ist ein 48kDa schweres Glykoprotein mit einer membran-durchspannenden Domäne (Nagata und Golstein, 1995). Seine extrazelluläre Region zeigt hohe Homologie zu anderen Mitgliedern der TNFR-Familie, wie dem TNF-Rezeptor 1 und 2 (p55 und p75), dem Nerve Growth Factor (NGF), dem CD40-, OX40-, CD27- und dem CD30-Rezeptor (Nagata und Golstein, 1995; Itoh und Nagata, 1993; Cosman, 1994). Diese Moleküle gehören zu der sogenannten NGF-Rezeptor-Familie. Für die Induktion der Apoptose essentiell ist eine sogenannte „death domain“. Darunter versteht man einen intrazellulären Bereich des CD95-Rezeptors (Itoh und Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993), der Homologie zum TNF-Rezeptor aufweist. Es sind eine Reihe von Adaptorproteinen bekannt, die C-terminal ebenfalls eine „death domain“ des CD95-Rezeptors besitzen und durch Wechselwirkungen mit der „death domain“ des CD95-Rezeptors an diesen binden können (Kischkel et al., 1995). Dazu gehören unter anderem TRADD (TNF-R1 associated death domain protein) (Hsu et al., 1995), FADD (Fas associating protein with death domain) oder MORT1 (Boldin et al, 1995; Chinnaiyan et al, 1995). Die N-terminale death effector domain (DED) von FADD, mit der Caspase-8, auch FLICE (Fas linked Interleukin Converting Enzyme) (Boldin et al, 1996) genannt, rekrutiert wird, erwies sich als ausreichend zur Apoptoseinduktion (Chinnaiyan et al., 1995). Caspase-8 gehört zu einer Gruppe von Proteasen, die zelluläre Substrate an bestimmten Aspartatresten spalten und normalerweise enzymatisch inaktiv als Proenzyme vorliegen (Yuan et al., 1993). Der Komplex aus CD95-Rezeptor, CD95-Ligand, FADD und Caspase-8 wird als DISC (death inducing signaling complex) bezeichnet. Der Zelltyp bestimmt das Ausmaß der DISC-Bildung. In Typ-I-Zellen ist innerhalb kurzer Zeit eine große Anzahl von DISC nachweisbar, was in einer starken und effizienten Caspasenaktivierung resultiert. Dagegen ist in Typ-II-Zellen die DISC-Bildung sehr gering, so dass ein zweiter Signaltransduktionsweg als Signalverstärker, eine sogenannte „amplification loop“, aktiviert wird (Scaffidi et al., 1998). Caspase-8 katalysiert dabei die

Spaltung von BID, einem im Zytosol lokalisierten proapoptotischen Protein der Bcl-2 Familie, welches in die mitochondriale Membran transloziert und dort über den mitochondrialen Verstärkungsweg mit Cytochrom C-Freisetzung und Depolarisation der mitochondrialen Membran weiter Caspasen aktiviert (Li et al., 1998; Luo et al., 1998).

Die Aktivierung des CD95-Rezeptors induziert durch das Enzym Saure Sphingomyelinase (ASM) die Spaltung des Membranbestandteils Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin (Gulbins et al., 1995). Der genaue Mechanismus der ASM-Aktivierung ist noch weitgehend ungeklärt. Durch das gebildete Ceramid werden Proteine wie die Ceramid aktivierte Protein-Phosphatase (CAPP) (Dobrowsky et al., 1993), die Proteinkinase C (PKC) (Muller et al., 1995), die Raf-1 Kinase (Huwiler et al., 1996), Jun-N-terminale Kinase (JNK) (Verheij et al., 1996) und der Transkriptionsfaktor NF-kappaB (Ponton et al., 1996) aktiviert. Neben der Aktivierung des CD95-Rezeptors werden Tyrosinkinasen wie die bei der T-Zellaktivierung wichtige Src-Kinase Lck und somit die zelluläre Tyrosinphosphorylierung stimuliert (Eischen et al., 1994). Verschiedene Targetproteine, darunter auch Ionenkanäle, beispielsweise der Kaliumkanal Kv1.3 (Szabo et al., 1996), werden tyrosinphosphoryliert. Andererseits existieren auch eine Reihe von Proteinen, welche die Apoptose hemmen. Die Bcl-Proteinfamilie spielt hierbei eine herausragende Rolle, Bcl-2 oder homologe Proteine hemmen den Zelltod (Yang, 1997).

Neben der beschriebenen physiologischen Bedeutung nutzen auch verschiedene Viren wie z.B. das Adenovirus, das Epstein-Barr-Virus oder das Afrikanische Schweinefieber-Virus die Möglichkeit, Einfluss auf den CD95 gesteuerten Zelltod zu nehmen. Diese Viren produzieren Proteine, die wie das apoptoseprotektive Bcl-2 funktionieren und Zellen vor CD95 induziertem Zelltod schützen (Ray, 1992; Henderson, 1993; Neilan, 1993; Boyd, 1994). Andere Viren, wie z.B. das Pockenvirus, synthetisieren Proteine wie cmrA, die ICE-Proteasen hemmen und dadurch den Tod virusinfizierter Zellen blocken.

Weitere Studien zeigen, dass die CD95-Rezeptor vermittelte Apoptose von T-Lymphozyten bei HIV-infizierten Patienten deutlich erhöht ist (Kobayashi, 1990; Debatin, 1994). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der CD95-Rezeptor bei HIV-Infektion eine wichtige Rolle beim Verlust von T-Lymphozyten spielt.

Auch in Hepatozyten scheint der CD95-Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Zellhomöostase zu spielen. So führt eine Injektion von anti-CD95-Rezeptor-Antikörpern in Mäusen innerhalb von 24 Stunden über ein akutes Leberversagen zum Tod (Ogasawara, 1993).

Der CD95-Rezeptor scheint bei chronischer Hepatitis in Hepatozyten verstärkt exprimiert zu werden. Aktivierte Lymphozyten, die den CD95-Liganden exprimieren, induzieren über die Interaktion von CD95-Ligand und CD95-Rezeptor den Zelltod dieser Hepatozyten, was zu den pathologischen Veränderungen der Leber und den klinischen Symptomen der Hepatitis beiträgt (Galle, 1995).

1.3.3 Der CD95-induzierte Block des kapazitativen Calciumeinstroms

Neben der Apoptoseinduktion fungiert der CD95-Rezeptor auch als Inhibitor des Ca^{2+} -Einstromes via CRAC (Kovacs und Tsokos, 1995). Im Kapitel über die Grundlagen der T-Zellaktivierung ist bereits beschrieben, dass eine erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$, die durch Aktivierung speichergesteuerter Ca^{2+} -Kanäle und Ca^{2+} -Influx vermittelt wird, essentiell für die T-Zellaktivierung ist. Durch Inhibition der Ca^{2+} -abhängigen Signale mit Ionenkanalblockern oder Cyclosporin kann die T-Zellaktivierung, Proliferation und Zytokinfreisetzung unterbunden werden (Lewis und Cahalan, 1995). CD95-Stimulation blockiert den Ca^{2+} -Einstrom und inhibiert dadurch Ca^{2+} -abhängige Signalwege, NFAT-Translokation, Zytokinproduktion und Proliferation. Durch Ionomycin kann die IL-2-Synthese wiederhergestellt werden, indem die blockierten Ca^{2+} -Signale durch CRAC-unabhängige Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert werden (Lepple-Wienhues et al, 1999). Der Todesrezeptor CD95 stellt somit in Lymphozyten einen Rezeptor dar, der speichergesteuerte Ca^{2+} -Kanäle negativ reguliert und die Lymphozytenfunktion unabhängig von der Apoptose beeinflussen kann. Weiterhin kann durch diese Funktion die immunsuppressive Wirkung CD95-

Ligand-exprimierender Tumore erklärt werden, beispielsweise die in Gliompatienten gefundene T-Zellanergie. T-Zellen von Glioblastompatienten zeigten ein reduziertes Ca^{2+} -Signal nach TCR-Stimulation, verbunden mit einer Hemmung der Lymphozytenaktivierung, die durch Ionomycinapplikation überwunden werden kann (Schwartz et al, 1996). Die CD95-induzierte Blockade des kapazitiven Ca^{2+} -Einstromes kann zusätzlich zur Immunevasion von Tumoren weitere Ca^{2+} -abhängige Immunfunktionen beeinflussen.

1.4 Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in T-Lymphozyten die Regulation von Ca^{2+} -Signalen untersucht.

Wie bereits beschrieben werden T-Zellen über extrazelluläre Rezeptoren aktiviert. Neben der Aktivierung extrazellulär gibt es jedoch auch die oben erwähnten intrazellulären Aktivierungsmechanismen, z.B. mittels Thapsigargin.

Wir zeigen in dieser Arbeit das Verhalten der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach verschiedenen Stimulationsmechanismen.

Weiterhin ist bekannt, dass bei der Kaskade zur Erhöhung des intrazellulären Calciums als Proliferationsmechanismus besonders ein Ionenkanal, der CRAC-Kanal, wichtig ist. Wird ein T-Zellaktivierungsmechanismus ausgelöst – extra- oder intrazellulär -, so erfolgt über die oben beschriebenen Signalwege ein Ca^{2+} -Einstrom durch den CRAC-Kanal. Ebenfalls eine wichtige Rolle bei der T-Zellaktivierung spielen rafts. Rafts sind Mikrodomänen, in denen sich abhängig vom Aktivierungszustand der Zelle Rezeptoren, Ionenkanäle und andere für den Proliferationsmechanismus bedeutende Strukturen aufhalten, wahrscheinlich um dadurch eine schnellere und effektivere Signalkaskade durchführen zu können. Von Interesse für diese Arbeit ist insbesondere die Frage, ob der CRAC-Kanal ebenfalls in rafts vorhanden ist. Ob diese Hypothese zutrifft, soll hier beantwortet werden.

Darüber hinaus wird gezeigt, dass der CRAC-Kanal via CD95-Stimulation blockiert wird und dadurch eine T-Zellproliferation nicht mehr möglich ist. Auch dies kann anhand der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bzw. der IL-2-

Konzentration festgestellt werden. Dieser Blockierungsmechanismus endet in der Apoptose oder Anergie der Zelle.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Substanzen

Die verwendeten Substanzen wurden, sofern nicht anders angegeben ist, bei der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

Das Calciumionophor Ionomycin (freie Säure) wurde von Calbiochem (Bad Soden, Deutschland), der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM und der Lösungsvermittler Pluronic F-127 wurden bei Molecular Probes (Eugene, USA) gekauft.

Synthetische Ceramidanaloga (C2- und C6-Ceramid) wurden von Biomol (Hamburg, Deutschland) bezogen.

Die für die Zellkultur verwendeten Medien, sowie alle zum Supplementieren der Medien notwendigen Substanzen, wurden bei Life Technologies (Eggenstein, Deutschland) erworben.

2.1.1 Antikörper

Antikörper gegen den CD95 Rezeptor (CD95-aktivierend, Clone-11, CH11) wurden von Biozol (München, Deutschland), Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC) gekoppelte anti-Maus-IgG Antikörper von Dianova (Hamburg, Deutschland) bezogen.

Anti-CD3-mouse Antikörper sowie FM1-43 wurden bei Molecular Probes (USA) erworben.

Antikörper gegen humanes IL-2, sowie die dazugehörige Isotypenkontrolle, wurde bei Pharmingen (Hamburg, Deutschland) gekauft.

2.1.2 Lösungen

Für die Perfusion der Zellen während der Video-Imaging Experimente wurden folgende Lösungen verwendet (alle mit demineralisiertem Wasser hergestellt):

<u>Ringer:</u>	
NaCl	145mmol/l
HEPES	10mmol/l
Glucose	10mmol/l
KCl	5mmol/l
CaCl ₂	2mmol/l
MgCl ₂	1mmol/l

<u>Nominell Calcium-freier Ringer:</u>	
NaCl	145mmol/l
HEPES	10mmol/l
Glucose	10mmol/l
KCl	5mmol/l
MgCl ₂	3mmol/l

<u>Calcium-freier Ringer mit 2mmol/l EGTA:</u>	
NaCl	145mmol/l
HEPES	10mmol/l
Glucose	10mmol/l
KCl	5mmol/l
EGTA	2mmol/l
MgCl ₂	3mmol/l

Sollten den Perfusionslösungen Substanzen zugesetzt worden sein, so geschah dies direkt vor der Anwendung, gegebenenfalls aus einer Stammlösung. Die Osmolarität der verwendeten Lösungen betrug 320mOsmol/kg, sofern nichts anderes angegeben ist, und wurde mit einem Halbmikroosmometer (Firma Knauer, Berlin, Deutschland) bestimmt.

2.2 Fluoreszenzmikroskopische Messungen

2.2.1 Grundlagen der Ratio-Video-Imaging Technik

Die Verwendung fluoreszierender, zellmembrangängiger Substanzen erlaubt es, intrazelluläre Prozesse in biologisch intakten Zellen oder Zellverbänden sichtbar zu machen. Neben Veränderungen der zytosolischen Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) lassen sich der pH-Wert in einer Zelle oder Zellorganelle erfassen oder das Membranpotential messen.

Eine besondere Bedeutung in der vorliegenden Arbeit kommt dabei dem Farbstoff Fura-2-AM zu, der eine einfache und quantitative Bestimmung der freien zytoplasmatischen Calciumkonzentration erlaubt (Grynkiewicz, 1985). Zur Bestimmung des intrazellulären Calciums werden hierzu die zu untersuchenden Zellen zunächst mit dem Acetoxymethylester des Farbstoffs, Fura-2-AM (Molecular Probes, Eugene, USA) inkubiert. Der in dieser Form lipophile Farbstoff passiert die Zellmembran mittels Diffusion und reichert sich im Zytosol an, indem in den Zellen eine Hydrolyse des Esters durch unspezifische Esterasen zur freien, calciumbindenden Säure erfolgt. Durch die Esterspaltung gewinnt der Farbstoff an hydrophilen Eigenschaften und kann so die Lipidmembran der Zelle nicht mehr passieren, er ist quasi in der Zelle gefangen. Die Dissoziationskonstante (KD) des Fura-2/ Ca^{2+} -Komplexes im Bereich von 100nmol/l liegt idealerweise im Bereich des biologisch bedeutsamen Konzentrationsspektrums, und der maßgeschneiderte Spektralverlauf der Absorption prädestinieren diesen Farbstoff zur Messung von Ca^{2+} in lebenden Zellen. Die Anregung zur Fluoreszenz erfolgt bei Fura-2 mit zwei verschiedenen Wellenlängen, da die maximale Lichtabsorption von Ca^{2+} -freiem und Ca^{2+} -beladenem Fura-2 um 40nm differiert. So absorbiert Ca^{2+} -freies Fura-2 bei

380nm maximal und Ca^{2+} -beladener Farbstoff bei 340nm. In beiden Fällen wird Licht der Wellenlänge 510nm emittiert. Wird nun in kurzer zeitlicher Abfolge bei beiden Wellenlängen beleuchtet (je ein Bild bei 340nm und 380nm), so ist die jeweilige Emmissionsintensität eine Funktion der freien Ca^{2+} -Konzentration. Der Quotient der beiden Intensitäten (Ratio "R") erlaubt die Berechnung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (vgl. Abbildung 4). Dabei kreuzen sich Farbstoffkonzentration, Hintergrundfluoreszenz und andere Störfaktoren weitgehend heraus. Zur näherungsweise Berechnung der freien intrazellulären Calciumkonzentration findet die Formel nach Grynkiewicz Anwendung (Grynkiewicz, 1985). Hierbei wird eine KD von 135nmol/l für Fura-2 angenommen. Um die für jeden Zelltyp unterschiedlichen, maximal erreichbaren, niedrigsten und höchsten Calciumwerte bestimmen zu können, wurden die Zellen mit einem Ca^{2+} -Ionophor für Calcium permeabel gemacht, und je einmal in calciumfreier (Ringer-Lösung ohne Calcium mit 2mmol/l EGTA) und einmal in Ringer-Lösung mit 2mmol/l Calcium gemessen. Die so ermittelten Werte (R_{\max} und R_{\min}) werden zusammen mit der KD in folgende Formel eingesetzt:

$$R = (R_{\max} - R_{\min}) : (1 + KD) / [\text{Ca}^{2+}] + R_{\min}$$

Nach Umstellen der Gleichung kann die intrazelluläre Calciumkonzentration in den Experimenten errechnet werden:

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

R_{\max}	Ratio gemessen in Ringer mit 2mmol/l Calcium
R_{\min}	Ratio gemessen in Ringer ohne Calcium mit 2mmol/l EGTA
R	gemessene Ratio im Experiment

KD	Dissoziationskonstante für Fura-2 (135nmol/l)
$[Ca^{2+}]_i$	Calciumkonzentration im Zytosol der gemessenen Zellen

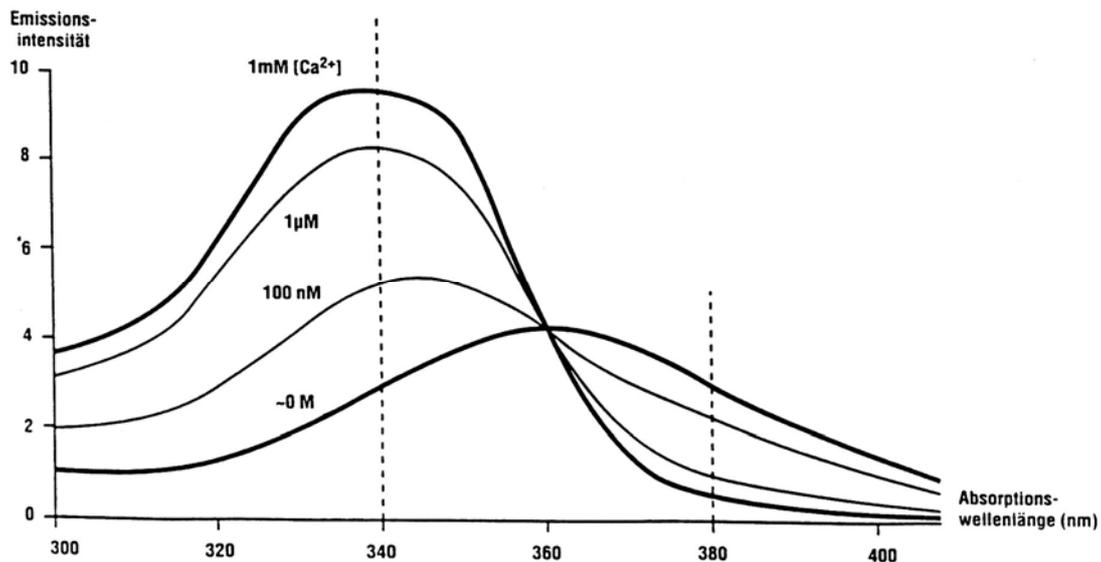


Abb. 4: Fluoreszenz von Fura-2 gemessen bei $\lambda=510\text{nm}$, (Erläuterungen siehe Text)

2.2.1.1 Aufbau der Messapparatur

Die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erfolgt auf dem Objektisch eines Invertmikroskops (Axiovert 135) der Firma Zeiss (Oberkochen, Deutschland).

Hier werden die mit Fura-2 beladenen Zellen auf einem Poly-L-Lysin beschichteten Glasdeckglas ($d=30\text{mm}$) in einer Plexigaskammer (Eigenherstellung) fixiert. Die Perfusion von Flüssigkeit durch die Kammer erfolgt mit einer peristaltischen Pumpe (Colora Messtechnik, Lorch/Württemberg, Deutschland), mit der bis zu fünf verschiedene Lösungen mit stufenloser Geschwindigkeit appliziert werden können. Eine einfache elektrische Pumpe sorgt für das Abpumpen des Perfusats und so für einen konstanten Flüssigkeitsspiegel in der Kammer. Um die Temperatur bei den Experimenten variieren zu können, wird die Perfusionslösung vor Erreichen der Messkammer in einem Durchlauferhitzer erwärmt, zusätzlich wird die Kammer über das verwendete Ölimmersionsobjektiv (Vergrößerung 40x) durch eine

Heizmanschette aufgeheizt (beides Eigenherstellung). Beide Wärmesysteme werden über ein Wasserbad (Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland) gespeist.

Um den Fluoreszenzfarbstoff in den Zellen zum Leuchten anzuregen, werden diese mit dem Licht einer Xenon-Lampe beleuchtet, wobei eine Filterradeinheit (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) nur die gewünschten Wellenlängen, bei Fura-2 je Aufnahme einmal 340nm und einmal 380nm, passieren läßt.

Das vom Farbstoff emittierte Licht wird von einer CCD-Videokamera (Proxitronic, Bensheim, Deutschland), der ein Restlichtverstärker vorgeschaltet ist, welcher nach dem Prinzip der Photokathodenröhren in Mikrotechnik arbeitet (microtunnel plate), aufgenommen, digitalisiert und zur Auswertung an einen PC weitergeleitet.

Die Aufzeichnung der Daten erfolgt mit dem Programm Axon Imaging Workbench, einer Software der Firma Axon (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Für die weitere Aufarbeitung und Auswertung der Daten wurde Microsoft Excel in der Version 7.0 (Microsoft, Seattle, USA) auf einem PC verwendet.

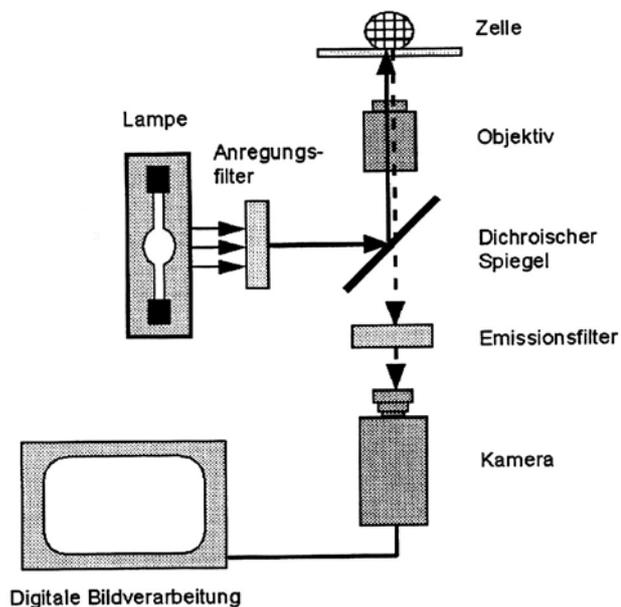


Abb. 5: Schematischer Aufbau eines Invertfluoreszenzmikroskops:

Das Licht einer Xenonlampe wird in das Mikroskop eingekoppelt und mit einem Anregungsfilter eine bestimmte Wellenlänge herausgefiltert (bei Fur-2 340nm und 380nm). Ein dichroischer Spiegel reflektiert das Anregungslicht durch das Objektiv zur Zelle. Das von der Zelle emittierte Fluoreszenzlicht (hier 510nm) kann den dichroischen Spiegel durchdringen und wird durch den Emissionsfilter gebündelt. Das Emissionslicht fällt in eine Kamera, die das Bild zur digitalen Verarbeitung weiterleitet (Erläuterungen im Text).

2.2.1.2 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mit der Video-Imaging Technik

Zur Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ wurden die verwendeten Plexiglaskammern auf der Unterseite mit einem Poly-L-Lysin beschichtetes Deckglas verschlossen und 250 μ l der zu untersuchenden Zellsuspension in die Kammer gegeben. Die Zellen wurden mit 1 μ mol/l Fura-2-AM (aus einer 1mmol/l Stammlösung in DSMO) versehen, im Brutschrank für 30min inkubiert, danach sofort auf den Objektivtisch des Messstandes gebracht und mit Ringer-Lösung perfundiert, um den Ladevorgang zu beenden und überschüssiges Fura-2-AM auszuwaschen. Die Messung der so vorbehandelten Zellen erfolgte bei 34°C unter ständiger

Perfusion mit Ringer-Lösung, der bei Bedarf verschiedene Substanzen zugesetzt wurden.

2.2.1.3 Fluoreszenzmikroskopische Detektion von apoptotischen Veränderungen in Lymphozyten

Die Detektion erster apoptotischer Veränderungen in Lymphozyten nach Stimulation des CD95-Rezeptors mittels Antikörper oder durch CD95-Ligand (CD95L) erfolgte mit dem DNA-bindenden Farbstoff Hoe-33342, der in unstimulierten Zellen eine homogene Verteilung der DNA sichtbar macht, wogegen die CD95 stimulierten Lymphozyten deutlich eine Kondensation der Nucleinsäuren erkennen lassen (Dive, 1992; Belloc, 1994).

Die Zellen wurden in eine phosphatfreie Lösung (Ringer) überführt, für 30min mit 1,2µl Hoe-33342 im Brutschrank inkubiert und anschließend auf dem Fluoreszenzmikroskop nach Anregen des Farbstoffs bei 340nm die Emission bei 510nm aufgenommen und die apoptotischen Zellen ausgezählt.

Die Apoptoserate wurde dabei im Vergleich zu nicht behandelten Zellen in % angegeben.

2.3 Fluoreszenz-Aktivierter-Zell-Sorter (FACS)

2.3.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Das Prinzip des Fluoreszenz-Aktivierten-Zell-Sorters oder Durchflusszytometers (FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, USA) erlaubt es in kurzer Zeit eine große Zahl einzelner Zellen aus einer Suspension zu untersuchen.

Dadurch können die Größe der Zellen und die Homogenität des Zytoplasmas ohne weitere Vorbehandlung der Proben ermittelt werden. Zur Analyse wird die Zellsuspension aus einem Probenröhrchen über eine Stahlkapillare mittels Überdruck durch eine Messkammer gedrückt und beim Eintreten in die Messkammer durch eine Trägerflüssigkeit stark beschleunigt, wodurch sich Zellaggregate auftrennen. Die Zellen passieren dann einzeln den Analysepunkt,

den Strahl eines Argon-Lasers der Wellenlänge 488nm. Dieser Vorgang wird auch als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet.

Das Maß für die Größe einer Zelle ergibt sich aus ihrer Durchlässigkeit (Vorwärtsstreuung (FSC)) für das Laserlicht, welches mittels seines Photodetektors aufgefangen wird. Die Homogenität (oder Granularität) einer Zelle wird über das im rechten Winkel gestreute Laserlicht (Seitwärtsstreuung (SSC)) ebenfalls mit einem Photodetektor bestimmt. Über drei weitere Messkanäle kann gleichzeitig zu den zuvor beschriebenen Parametern Licht verschiedener Wellenlängen aufgezeichnet werden. Darüber hinaus werden zu jedem Datenfile die Einstellungen des FACS-Gerätes, die Parameter zur Aufzeichnung in der verwendeten Software (Cellquest, Becton Dickinson, San Jose, USA) und der Zeitpunkt, an dem jede einzelne Zelle den Messstrahl passiert, aufgezeichnet.

Neben der Detektion der Zellgröße und Granularität besteht also auch die Möglichkeit, Fluoreszenzfarbstoffe einzusetzen. So können mit diesem Verfahren Strukturen auf der Zelloberfläche, oder nach Permeabilisieren der Zellen, auch im Zellinneren detektiert werden. Ferner lassen sich intrazellulär pH-Bestimmungen, $[Ca^{2+}]_i$ Messungen oder die Synthese von Zytokinen ermitteln.

Eine besondere Bedeutung kommt der Möglichkeit zu, DNA-Strangbrüche durch Anfärben mit Fluoreszenzfarbstoffen zu detektieren, da diese als ein frühes Anzeichen für das Auftreten von Apoptose in den untersuchten Zellen herangezogen werden können.

Während einer Messung wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie 10.000 Zellen untersucht. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Versuche am FACS bei 20°C durchgeführt.

2.3.1.1 Durchflusszytometrische Detektion apoptotischer Zellen

Die Detektion apoptotischer Zellen erfolgte mit Hilfe des an die DNA bindenden Farbstoffes SYTO-16 (Molecular Probes, Eugene, USA) (Frey 1995). Die zu untersuchenden Proben wurden mit 10nmol/l des in DMSO gelösten

Farbstoffes für 30 Minuten im Brutschrank (36,6°C und 5%CO₂) inkubiert und danach sofort im FACS gemessen, wobei die Seitwärtsstreuung (SSC) gegen die Fluoreszenz bei 530nm (Kanal 1) zur Auswertung herangezogen wurde (Abb. 6).

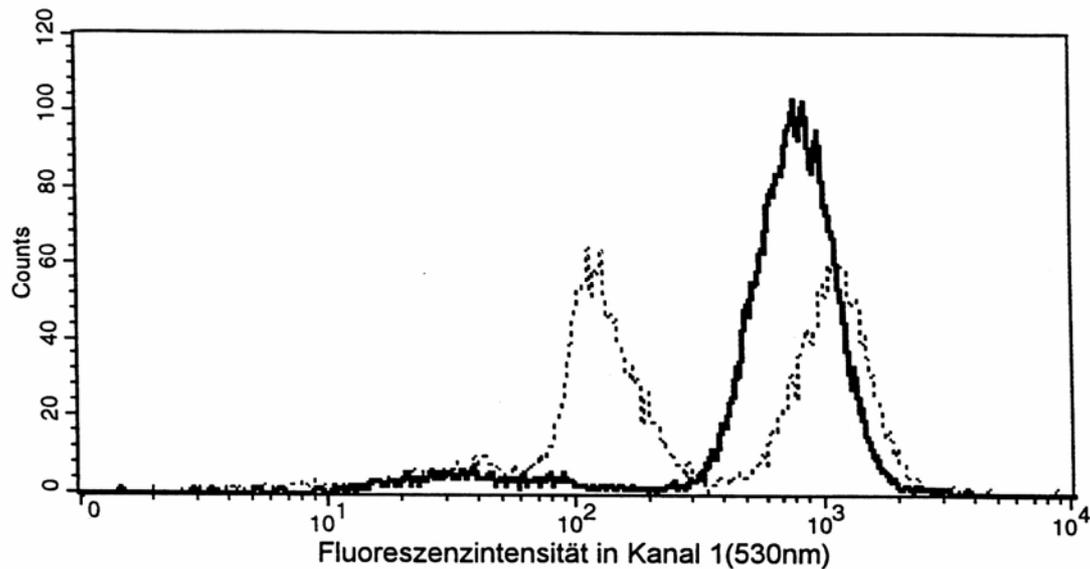


Abb. 6:

Die Abbildung zeigt einmal unstimulierte Jurkat T-Zellen (durchgezogene Linie) und Zellen, die für 6h mit 100ng/ml CH11 Antikörper behandelt wurden (unterbrochene Linie). Die Fluoreszenzintensität (x-Achse) ist gegen die Häufigkeit (y-Achse) aufgetragen. Die unbehandelten Zellen zeigen eine homogene Verteilung der Fluoreszenz, in den CH11 vorinkubierten Zellen können zwei Populationen beobachtet werden, von denen eine nahezu deckungsgleich mit den unbehandelten Zellen ist und wie dort die vitalen Zellen zeigt. Die zweite, linksverschobene Population repräsentiert die apoptotischen Zellen.

2.3.1.2 Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration mit dem FACS

Die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ erfolgte im Durchflusszytometer mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen als bei der Video-Imaging-Technik, da man hier nur eine Anregungswellenlänge zur Verfügung hat, und das ratiometrische Verfahren, wie es bei Fura-2 verwendet wird, nicht ohne weiteres anwendbar ist.

Um dennoch möglichst viel störende Faktoren (Farbstoffkonzentration, Hintergrundfluoreszenz) zu minimieren, wurden zwei membrangängige Ca^{2+} -

Indikatoren als Farbstoffe verwendet, die in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration gegenläufig ihre Intensität nach Anregung bei 488nm durch einen Argon-Laser verändern. Dies sind Fluo-3/AM und Fura-red-AM, wobei das Kürzel AM dabei für Acetoxymethyl-Ester steht. In Verbindung mit dieser Estergruppe ist der Ca^{2+} -sensitive Farbstoff auf Grund seiner lipophilen Eigenschaften in der Lage, die Membranbarriere zu überwinden. In der Zelle wird die Estergruppe durch intrazelluläre Esterasen abgetrennt. Dies verhindert, dass die Farbstoffe, einmal in die Zelle gelangt, in den Extrazellulärraum zurück diffundieren.

Fura-red zeigt mit sinkender $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eine Zunahme in der Intensität des emittierten Lichtes gemessen mit Kanal 3 des Durchflusszytometers ($\lambda=650\text{nm}$), Fluo-3 reagiert bei Anstieg des intrazellulären Calciums mit einer Intensitätszunahme und wurde bei $\lambda=530\text{nm}$ in Kanal 1 aufgezeichnet. Der Quotient der beiden Intensitäten (Fluo-3/Fura-red) ermöglicht so eine Zwei-Farbstoff Ratiomessung (Novak, 1994; Coligan, 1995).

Die Lymphozyten wurden 1h mit $9\mu\text{mol/l}$ Fura-red-AM und 10 min mit $1\mu\text{mol/l}$ Fluo-3-AM unter Verwendung von Pluronic F-127 (MolecularProbes, 15%ige Lösung in DMSO 1:1000 verdünnt im Medium) als Lösungsvermittler im Brutschrank bei 37°C beladen. Die Zellen wurden innerhalb von zwei Stunden analysiert. Die Anregungslichtwellenlänge im FACS betrug 488nm (Argon-Laser). Das Intensitätsmaximum des vom Farbstoff Fluo-3 emittierten Lichtes bei $530\pm 30\text{nm}$ und das Intensitätsmaximum von Fura-red bei $630\pm 26\text{nm}$ wurden für die Messungen herausgefiltert. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten wurde nach der Messung und Datenwandlung mit einem selbsterstellten Algorithmus im Programm Igor Pro (Wavemetrics, OR, USA) berechnet und graphisch dargestellt.

Nach der Beladung der Lymphozyten mit Fluoreszenzfarbstoffen wurden die Zellen 5 min vor der Messung aus der Badlösung in die Kalibrationslösung umgesetzt, um Unterschiede bei der Beladung der Lymphozyten auszuschließen. Um $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu manipulieren, wurde das Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin ($10\mu\text{mol/l}$) der Zellsuspension zugegeben. Ca^{2+} -Sättigung der

Farbstoffe wurde mit 2mmol/l Ca^{2+} in der Eichlösung, Ca^{2+} -freie Bedingungen mit 0 Ca^{2+} /2mmol/l EGTA hergestellt. Fluoreszenzmaximum und -minimum wurden bei jeder Messung neu bestimmt.

2.3.1.3 Messung der intrazellulären IL-2-Konzentration

Die IL-2 Synthese nach Stimulation des TCR wurde mittels FACS-Analyse bestimmt, dabei wurde zunächst die Zytokinfreisetzung in den zu untersuchenden Zellen mit 1 μ mol/l Monensin blockiert. Die TCR-Stimulation erfolgte mit 50 μ g/ml PHA und 100nmol/l PMA (Phorbol-Myristat-Acetat) für 5 Stunden mit und ohne 20h Vorinkubation mit 100g/ml anti-CD95-Antikörper. Die Lymphozyten wurden in Ringer mit 1 % bovinem Serumalbumin gewaschen und mit Zytofix-Formaldehydlösung 30 min. auf Eis fixiert. Nach anschließendem Waschen wurden die Zellen für weitere 30 min. auf Eis mit Zytoperm-Saponinlösung (Cytifix/Cytoperm Pharmingen, Hamburg, Deutschland) permeabilisiert und mit dem fluoreszenzmarkiertem Anti-IL-2-Antikörper bzw. einer Isotopenkontrolle (1,5 μ g/ml, Pharmingen, Hamburg, Deutschland) gefärbt. Anschließend wird das Detergens gewaschen und die Fluoreszenz im Durchflußzytometer bei einer Laseranregung von 488nm bestimmt.

Bei der Aufhebung der CD95-induzierten Anergie mit Ionomycin wurde nach der Beladung der Lymphozyten mit Fluoreszenzfarbstoffen die Zellen 5 Minuten vor der Messung aus der Badlösung in die Kalibrationslösung umgesetzt. Um $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu manipulieren, wurde das Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin (10 μ mol/l) der Zellsuspension zugegeben.

Die Messung am FACS-Gerät erlaubt es, die apoptotischen Zellen von den lebenden zu unterscheiden, so dass gezielt nur vitale Zellen in die Messung einbezogen werden können.

2.4 Abgewandelte Patch-Clamp-Methode

Mit Hilfe der normalen Patch-clamp-Technik (Membranfleck-Klemme) lassen sich elektrische Eigenschaften von einzelnen Zellen oder von bestimmten

Zellarealen bestimmen. Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelten ausgehend von der Spannungsklemme (voltage clamp), bei welcher der Zellmembran ein bestimmtes Potential aufgezwungen wird und die daraus resultierenden Ströme gemessen werden, diese Technik (Sakmann und Neher, 1984), für die sie 1991 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie erhielten.

Das Grundprinzip der Messung besteht darin, durch dichtes Aufsetzen der Spitze einer sehr dünn ausgezogenen Glaspipette, ein definiertes Membranareal von der übrigen Membran und der Umgebung elektrisch zu isolieren. Der dabei auftretende Widerstand zwischen Glaspipette und Zellmembran, welcher die Auflösung der durch Ionenkanäle fließenden Ströme limitiert, wurde durch einen Zufall optimiert. Die beiden Wissenschaftler Erwin Neher und Bert Sakmann stellten fest, dass im Moment des Aufsetzens auf die Zelle ein geringer Unterdruck in der Pipette den Abdichtungswiderstand um mehrere Zehnerpotenzen in den Gigaohm-Bereich (10^9 Ohm; Gigaseal) verschiebt. Nach Aufsetzen der Pipette lassen sich durch gezielte Manipulationen die Messkonfigurationen variieren.

Die Ausgangssituation nach Etablieren eines Gigaseals bezeichnet man als on-cell oder cell-attached Konfiguration. In dieser Konfiguration werden die Ionenkanäle, welche sich in dem Zellmembranareal unterhalb der Pipettenöffnung befinden, erfasst. Der cell-attached Modus stellt die Ausgangssituation der whole-cell Konfiguration dar. Durch diese Ganzzellkonfiguration werden die Ionenkanäle der gesamten Zellmembran für die Messung zugänglich gemacht.

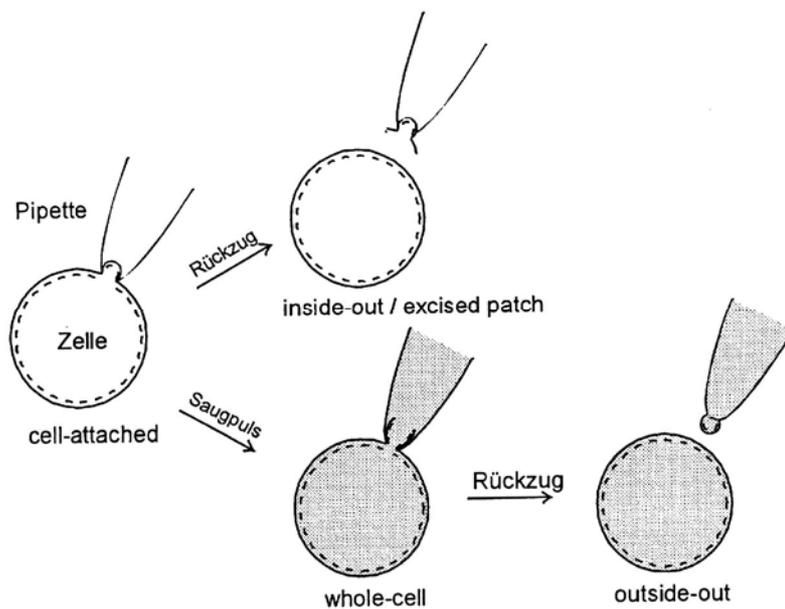


Abb. 7: Messkonfigurationen in der Patch-clamp-Technik (Erläuterungen im Text).

Bei der abgewandelten Patch-clamp-Methode wurden keine elektrischen Ströme der Zelle gemessen, sondern in Verbindung mit der Imaging-Technik versucht herauszufinden, ob der I_{CRAC} -Kanal in den oben beschriebenen rafts vorhanden ist. Dazu wurde wie bei der originalen Patch-clamp-Technik eine Glaspipette mit einer bestimmten Lösung an die vorher markierten und dadurch sichtbar gemachten rafts gepatcht. Diesem Zellmembranareal wurde nun eine bestimmte Lösung (die in der Glaspipette) angeboten und über die Imaging-Technik auf dem PC sichtbar gemacht, wie die Zelle darauf reagiert.

2.4.1 Aufbau des Messplatzes

Die Zellen, T-Zellen und Jurkat-Zellen, wurden in einer Zellkammer, die durch ein mit Poly-L-Lysin beschichtetes Deckglas (=35mm) verschlossen war, auf dem Objektisch eines Zeiss Axiovert 135 Invertmikroskops (Zeiss, Oberkochen) untersucht.

An der einen Seite des Mikroskopisches wurde die Messpipette über einen Pipettenhalter befestigt, der über einen Drei-Wege-Mikromanipulator am Objektisch fixiert war. Zur Regulation des Druckes in der Messpipette war diese mit einem offenen Schlauch zur Applikation der Saugpulse verbunden. Die Lösung in der Glaspipette wurde über einen Schlauch direkt aus einem Reagenzglas angeboten.

Das Perfusionssystem, durch stufenlos regulierbaren Luftdruck getrieben, bestand aus fünf parallel angeordneten Perfusionsröhrchen mit einem Innendurchmesser von 100µm. Das raumtemperierte (20°C) Perfusat konnte durch Parallelverschiebung der Röhrchen in die Umgebung der zu untersuchenden Zelle gebracht werden und so ein Mediumwechsel innerhalb von 100ms erreicht werden.

Eine einfache elektrische Pumpe sorgt für das Abpumpen des Perfusats und so für einen konstanten Flüssigkeitsspiegels in der Kammer. Um die Temperatur bei den Experimenten variieren zu können, wird die Perfusionslösung vor Erreichen der Messkammer in einem Durchlauferhitzer erwärmt, zusätzlich wird die Kammer über das verwendete Ölimmersionsobjektiv (Vergrößerung 40x) durch eine Heizmanschette aufgeheizt (beides Eigenherstellung). Beide Wärmesysteme werden über ein Wasserbad (Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland) gespeist.

Wie unter Aufbau der Messapparatur der Video-Imaging-Methode schon eingehend beschrieben, wurde nun die Reaktion der einzelnen, an dem raft angepatchten Zelle im Hinblick auf die durch die Glaspipette angebotene Lösung aufgezeichnet.

2.4.2 Durchführung der abgewandelten Patch-Clamp-Experimente

Die Zellen wurden etwa 20 Minuten vor Beginn der Messung in die Messkammer gegeben, ein Anheften der Zellen an das Poly-L-Lysin beschichtete Deckglas ermöglicht und danach perfundiert, um nicht anhaftende Zellen zu eliminieren. Die Zellen wurden spätestens nach 1h ausgetauscht.

Die Messpipetten wurden aus Glaskapillaren (GC150TF-15, Clark Electromedical Instruments, Pangbourne Reading, GB) aus Borosilikatglas unter Erhitzung mit einem Horizontalpuller (DMZ Universal, Zeitz-Instrumente, Augsburg) gezogen und auf einen Widerstand von 3-5mOhm für Experimente im whole-cell Modus feuerpoliert.

Die Glaskapillare wurde mit eigens hergestellten Pipettenfüllschläuchchen mit Ca^{2+} -Ringer von der Rückseite her gefüllt, im Pipettenhalten fixiert, mit dem Reagenzglas, gefüllt mit Ca^{2+} -Ringer, verbunden und in die Messkammer gebracht.

Die Annäherung an eine Zelle fand unter optischer Kontrolle statt.

Die T-Zellen, die zu dieser Messung verwendet wurden, wurden ein paar Tage vorher mit PHA stimuliert. Am Tag der Messung wurden sie nach Anheften an das Poly-L-Lysin beschichtete Deckglas und Waschen mit Ca^{2+} -Ringer im Brutschrank fünf Minuten mit Anti-CD3-mouse-Antikörper (300ng/ml) stimuliert. Danach wurden die Zellen dreimal mit Ca^{2+} -Ringer gewaschen und mit einem Anti-mouse-Cy2-Antikörper (1:100 verdünnt in Ca^{2+} -Ringer und 5% FCS) 45 Minuten lang bei Raumtemperatur angefärbt. Wiederum erfolgte ein dreimaliges Waschen mit Ca^{2+} -Ringer.

Unter Zuhilfenahme des Mikroskopes wurde festgestellt, ob ein Capping stattgefunden hat. Die auf diese Art sichtbar gemachten caps wurden gebleicht. Danach wurden die Zellen mit 10uM FM1-43 in Ca^{2+} Ringer versetzt.

FM1-43 ist ein Styrylpyridiniumfarbstoff, der zur Untersuchung synaptosomalen Recyclings bei mehreren Spezien (Frosch, Ratte, Maus) verwendet wurde. Außerdem wurde bewiesen, dass FM1-43 in Drosophilalarven benutzt werden kann, wo es auf diese Art und Weise die Analyse von Mutationen bei synaptischem Vesikelrecycling ermöglicht. FM1-43 wurde weiterhin in einer Studie verwendet, die aufzeigte, dass synaptosomale Endozytose unabhängig von extrazellulärem Ca^{2+} und Membranpotential in dissoziierten Hippocampusneuronen ist.

Nun wurde mikroskopisch gezeigt, dass die vorher durch Cy2 gefärbten caps mit FM1-43 an derselben Stelle angefärbt wurden. Die Illumination settings des

Video-Imagings mussten je nach Farbstoff jeweils verändert werden. Für Cy2 und FM1-43 musste der Filter 3 (490nm), für Fura-2-AM der Filter 1 (340nm) geöffnet werden, damit mit der richtigen Wellenlänge angeregt wurde.

2.5 Zellkultur

2.5.1 Zellkultur-Medien

Die verwendeten Zelllinien Jurkat, alle bezogen von ATCC (Rockville, MD, USA), wurden ebenso wie die Primärkultur peripherer, humaner T-Lymphozyten und daraus gewonnene T-Blasten in RPMI-1640 gehalten, das mit 10% FCS, 10mmol/l HEPES, 2mmol/l L-Glutamin, 1mmol/l Natrium-Pyruvat, 100umol/l nichtessentielle Aminosäuren, 100U/ml Penicillin, 100ug/ml Streptomycin und 50umol/l beta-Mercaptoethanol (alle Substanzen Life Technologies, Eggenstein, Deutschland) ergänzt wurde (RPMI-K10). Die Passage der Zelllinien erfolgte zwei- bis dreimal die Woche.

Alle Zellen wurden in einem Brutschrank der Firma Heraeus bei 36,6°C und 5% CO₂ unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre gehalten.

2.5.2 Präparation peripherer T-Lymphozyten

Die humanen, peripheren T-Lymphozyten wurden aus eigenem venös abgenommenem und zur Gerinnungshemmung mit Heparin versetztem Blut gewonnen und nach folgendem Protokoll unter sterilen Bedingungen präpariert.

Das abgenommene Volumen betrug in der Regel 10ml. Das Blut wurde nach der Abnahme im Verhältnis 1:1 mit RPMI (10mM HEPES) verdünnt, diese Suspension in einem Zentrifugenröhrchen (Falcon tube, 50ml) vorsichtig über die gleiche Menge Ficoll paque (Ficoll/ATS Dichte 1,077, Biochrom, Berlin) geschichtet und bei 400g für 20 Minuten zentrifugiert (20°C, ausgeschaltete Bremse, Sorvall RT 6000 B, Du Pont). Bei dieser Dichtezentrifugation bildet sich im Bereich des oberen Drittels eine weiße Bande, welche die mononukleären Blutzellen enthält. Diese Bande wurde abgenommen und mit RPMI (10% FCS) dreimal gewaschen.

Zuvor mit RPMI äquilibrierte Säulen (im Brutschrank, 45 Minuten), gefüllt mit Nylon-Wolle (Biotest Diagnostics, Dreieich) konnten daraufhin mit der gewaschenen Zellsuspension befüllt und für weitere 45 Minuten in den Brutschrank gegeben werden. Dieser Schritt ist notwendig, um die T-Zellen, welche als einzige mononukleäre Zellen nicht an die Nylonwolle adhären, von den übrigen präparierten Zellen zu trennen. Die Säulen wurden nach 45-minütiger Adhärenzzeit mit vorgewärmtem RPMI (10%FCS) eluiert und die T-Zellen noch zweimal mit RPMI (10% FCS) gewaschen. Die FACS-Analyse mittels FITC-markiertem CD3-Antikörper von nach diesem Protokoll präparierten Zellen ergab einen Anteil CD3+-Zellen (gleichbedeutend mit T-Lymphozyten) von >90%. Die Zellen wurden für ein bis drei Tage in Zellkulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ gehalten und für Experimente verwendet.

2.5.3 Stimulation der peripheren T-Lymphozyten (Blastifizierung)

Nach Präparation der peripheren T-Lymphozyten wurde deren T-Zell-Rezeptor (TCR) mit 1µg/ml Phythämagglutinin (PHA) bis zu Beginn der Experimente in RPMI-K10 stimuliert.

Die so blastifizierten Zellen wurden einmal mit RPMI-K10 gewaschen, in Kompletmedium mit zusätzlich 25U/ml humanem IL-2 aufgenommen und für bis zu 6 Tagen im Brutschrank kultiviert. Um verbrauchtes Nährmedium und IL-2 zu ersetzen, wurden die Zellen alle 2Tage mit neuem RPMI-K10 und 25 U/ml IL-2 versehen (Peter, 1997).

2.6 Statistische Auswertung

Bei der Datenauswertung wurde für alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsergebnisse das arithmetische Mittel und der Standard Error of the Mean (SEM) verwendet. Zur Untersuchung auf signifikante Unterschiede der Ergebnisse wurde der Student's t-Test verwendet. Ein signifikanter Unterschied wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.05$ angenommen.

Auf die Angabe der Versuchsergebnisse in Form von Tabellen wird bewusst verzichtet. Anstelle dieser werden übersichtlichere Balkendiagramme gewählt.

3 Ergebnisse

3.1 Ca²⁺-Signale in T-Helferzellen

3.1.1 Anti-CD3

Anti-CD3 Antikörper helfen bei der Identifizierung der T-Zellen. CD3, ein Mitglied der Immunglobulin Superfamilie ist ein Cluster zur Differenzierung der (CD) Zell-Oberflächenantigene, die mit dem T-Zell-Rezeptor der T-Zellen und Thymozyten assoziiert sind. TCR's sind spezifisch für Komplexe, die kurze Peptide umfassen, die an den MHC-Komplex gebunden und von diesem repräsentiert werden.

Der humane TCR/CD3-Komplex besteht aus mindestens fünf CD3 Proteinen (alpha, beta, gamma, delta, epsilon), die entweder im Verband als alpha/beta oder gamma/delta Proteine vorkommen. Der T-Zell-Rezeptor erkennt und bindet Antigene, die ihm durch den MHC präsentiert werden. Danach vermittelt die Proteinkette des CD3-Moleküls das Aktivierungssignal durch seine cytoplasmatischen Ausläufer, mit denen es mit signalübertragenden Proteinen interagieren kann. Das CD3-Molekül ist nicht auf B-Zellen vorhanden und kann deshalb als Marker für T-Zellen benutzt werden.

Die T-Zellaktivierung, die eine entscheidende Rolle in der Regulation der Immunantwort spielt, umfasst multiple intrazelluläre Signale, die über den TCR/CD3-Komplex der Zelloberfläche ausgelöst werden. Cross-linking des TCR/CD3-Komplexes mit immobilisierten Anti-CD3 Antikörpern induziert eine T-Zellaktivierung, die eine Zytokinproduktion (zB IL-2) zur Folge hat. IL-2 bindet an seinen hoch-affinen intrazellulären Rezeptor, um die Zellproliferation in Gang zu setzen. Weiterhin hat sich gezeigt, dass kostimulierende Oberflächenmoleküle wie CD28 zusätzliche Signale in der T-Zellaktivierung vermitteln, wodurch die IL-2 Produktion, wenn der kostimulierende anti-CD28 Antikörper mit anti-CD3 kombiniert wird, erhöht wird.

CD3 ist auf mehr als 95% der zirkulierenden humanen peripheren T-Zellen vorhanden.

3.1.1.1 Anti-CD3 induziert Ca^{2+} -Einstrom in T-Lymphozyten via TCR

Um das funktionelle Zusammenspiel zwischen dem TCR und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu charakterisieren, wurde Anti-CD3-Antikörper eingesetzt und dessen aktivierenden Einfluss auf den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms mit der Video-Imaging-Technik untersucht.

Es wurden Jurkat-T-Lymphozyten verwendet, die nach anfänglicher Ca^{2+} -Ringer-Spülung mit 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Anti-CD3-Antikörper in Ca^{2+} -Ringer versetzt wurden. Dies bewirkte einen Ca^{2+} -Einstrom durch CRAC-Kanäle (Abb. 8), was im weiteren Anschluss zu einer T-Zellaktivierung führt (nicht gezeigt).

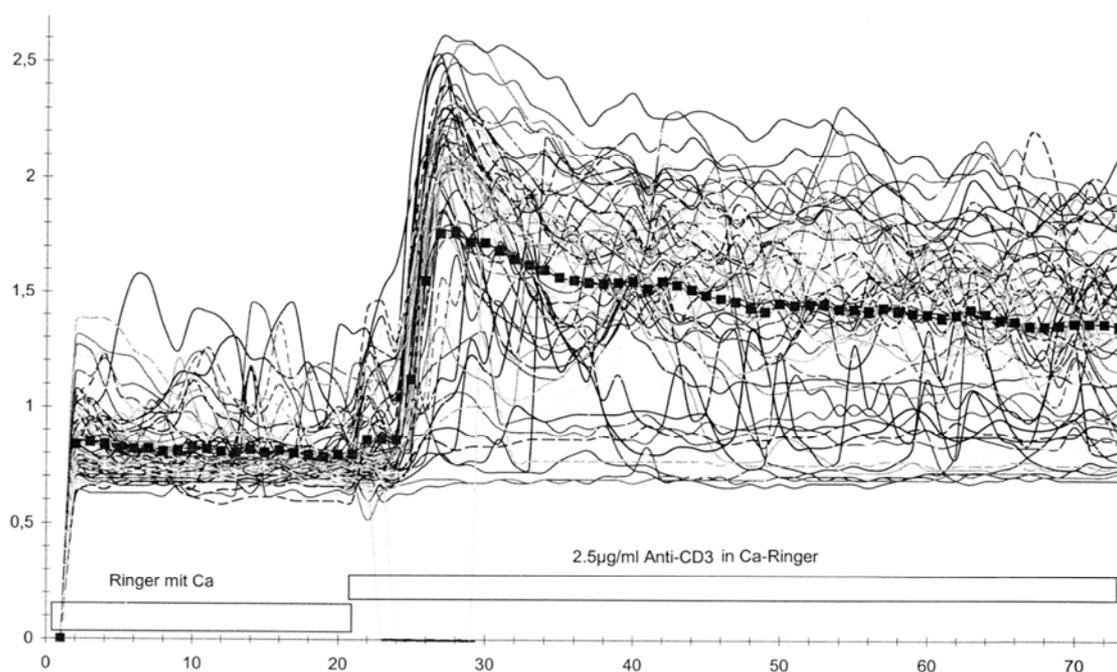


Abb. 8: Anti-CD3 löst Ca^{2+} -Einstrom in T-Lymphozyten aus

Dargestellt ist der Zeitverlauf der durchschnittlichen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Aktivierung des TCR mit Anti-CD3. Durch Zugabe von Anti-CD3 in Ca^{2+} -Ringerlösung kommt es zum Einstrom von Ca^{2+} über den CRAC-Kanal, der längerfristig anhält.

Die x-Achse gibt die Zeitachse in s an, die y-Achse zeigt die Ratio R 340/380 (siehe Methodenteil) an.

Hier wird nur der relative Anstieg gezeigt, der etwa einem Anstieg von 100nM auf 1 μ M entspricht. Auf eine individuelle Eichung wurde deshalb verzichtet. Der deutlich hervorgehobene schwarze Balken entspricht dem Mittelwert

3.1.2 PHA

PHA wird aus der roten Feuerbohne (*Phaseolus vulgaris*) extrahiert. Es besteht aus 5 Isolektinen, die als Tetramere vorliegen und von nicht-kovalenten Kräften zusammengehalten werden. Es bindet unspezifisch an verschiedene Moleküle der Zelloberfläche von T-Lymphozyten und löst damit innerhalb der Zelle ein aktivierendes Signal aus. PHA ist besonders gut zur effizienten, polyklonalen Aktivierung von T-Lymphozyten geeignet.

3.1.2.1 PHA induziert Ca²⁺-Einstrom in T-Lymphozyten via TCR

Das gleiche Verhalten wie bei Anti-CD3 konnte mit PHA ebenfalls gezeigt werden. PHA bindet an den TCR und löst damit eine T-Zellaktivierung aus.

Um den aktivierenden Effekt von PHA auf den kapazitiven Ca²⁺-Einstrom nachzuweisen, wurde die [Ca²⁺]_i in Abhängigkeit der PHA-Applikation mit der Video-Imaging-Technik untersucht.

Dazu wurden Jurkat-T-Lymphozyten verwendet, die nach anfänglicher Ca²⁺-Ringer-Spülung mit 50 μ g/ml PHA in Ca²⁺-Ringerlösung versetzt wurden. In Abb. 9 wird der Ca²⁺-Einstrom erkennbar, welcher auch nach Wegnahme der PHA-Lösung und alleiniger Spülung mit Ca²⁺-Ringer anhält, was für eine längerfristige Aktivierung des TCR spricht.

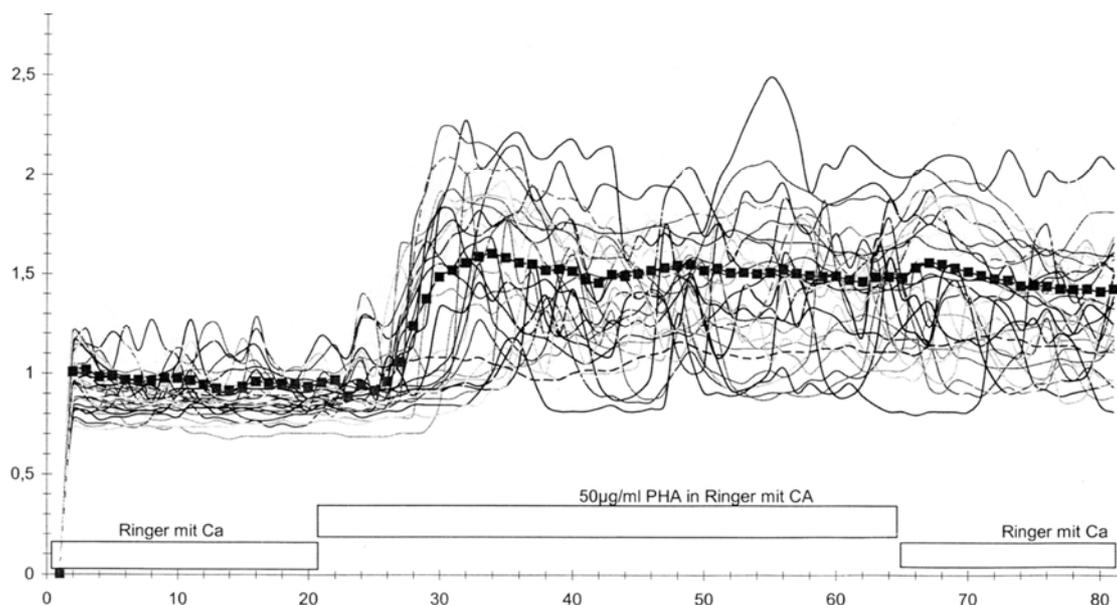


Abb. 9: PHA löst Ca^{2+} -Einstrom in T-Lymphozyten aus

Dargestellt ist der Zeitverlauf der durchschnittlichen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Aktivierung des TCR in Jurkat-T-Lymphozyten. Nach Zugabe von PHA-Lösung kommt es zu einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Die x-Achse gibt die Zeitachse in s an, die y-Achse zeigt die Ratio R 340/380 (siehe Methodenteil) an. Hier wird nur der relative Anstieg gezeigt, der etwa einem Anstieg von 100nM auf 1µM entspricht. Auf eine individuelle Eichung wurde deshalb verzichtet. Der deutlich hervorgehobene schwarze Balken entspricht dem Mittelwert

3.1.3 Thapsigargin induziert kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom in T-Lymphozyten via I_{CRAC}

Thapsigargin ist ein Sequesterpenlacton, das irreversibel an die endoplasmatische Ca^{2+} -Pumpe (SERCA-ATPase) bindet, diese blockiert und dadurch die Aufnahme von Ca^{2+} in das ER verhindert (Premack et al., 1994; Thastrup et al., 1989). Dies bedeutet, dass die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher (Endoplasmatisches Retikulum, ER) durch TG aktiviert werden und Ca^{2+} in das Zytoplasma entleeren, woraufhin wiederum der I_{CRAC} maximal stimuliert wird und bei extrazellulärem Ca^{2+} -Angebot ein Ca^{2+} -Einstrom stattfindet (Thastrup et al., 1990).

Es wurden Jurkat-T-Lymphozyten verwendet und der Einfluss des Thapsigargin auf den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom mit der Video-Imaging-Technik untersucht (Abb. 10).

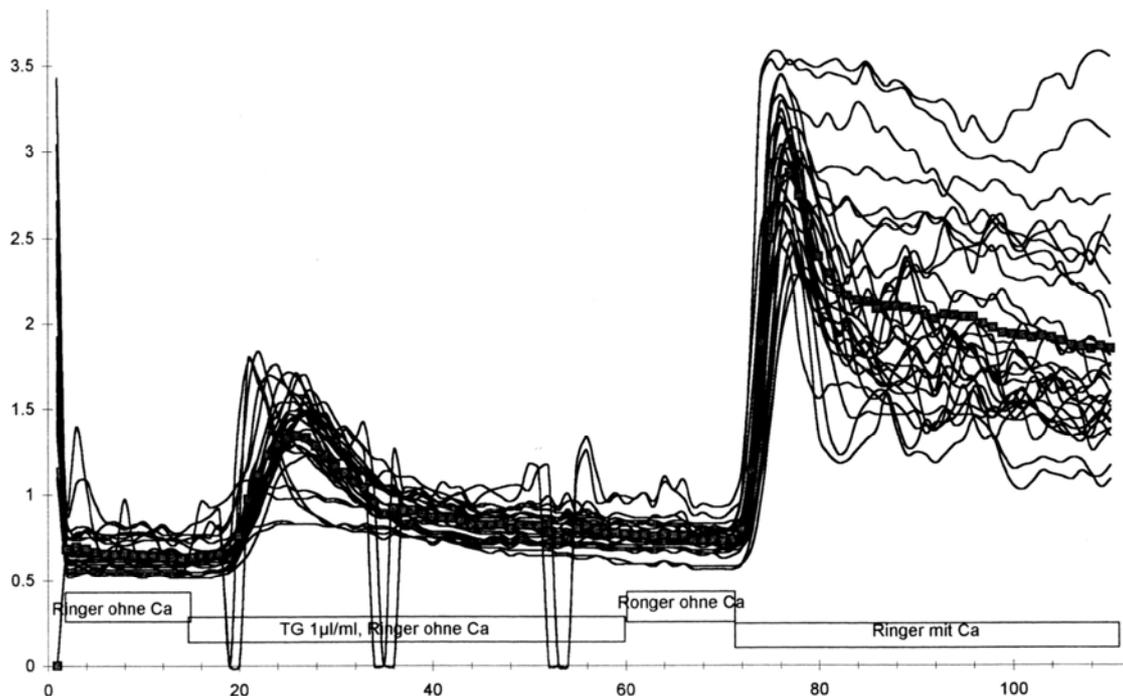


Abb. 10: Hier erkennt man einen ersten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Zugabe von TG (1 μM) in Ca^{2+} -freier Lösung, welcher der Ca^{2+} -Entleerung aus dem ER entspricht. Weitere Ca^{2+} -freie Lösung lässt die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fast wieder auf ihr Ausgangsniveau absinken. Der zweite, weitaus höhere Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, entsteht bei Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Zugabe von Ca^{2+} -Ringer und entspricht einer Öffnung des I_{CRAC} .

Die x-Achse gibt die Zeitachse in s an, die y-Achse zeigt die Ratio R 340/380 (siehe Methodenteil) an. Hier wird nur der relative Anstieg gezeigt, der etwa einem Anstieg von 100nM auf 1 μM entspricht. Auf eine individuelle Eichung wurde deshalb verzichtet. Der deutlich hervorgehobene schwarze Balken entspricht dem Mittelwert

3.2 Clustering: TCR-Clusters: Sphingolipidreiche Membranen – “rafts”

Wie in der Einleitung schon erwähnt könnte eine allgemeine Funktion des raft-Zusammenschluss in der Signaltransduktion sein, dass sich Rezeptoren für die Interaktion mit Liganden und Effektoren auf beiden Seiten der Membran

konzentrieren, um die Bindung während der Signalkaskade zu beschleunigen und unpassendes Interferieren zwischen Signalwegen zu verhindern. Manche Proteine können an andere Proteine binden, um von rafts ausgeschlossen zu werden oder umgekehrt. Raft Mikrodomänen sind dafür bekannt, mit Glykosphingolipiden, sowie dem Gangliosid GM1, welches durch Cholera toxin erkannt wird, angereichert zu sein. Eine Studie zur Lokalisation der rafts durch Konfokalmikroskopie konnte beweisen, dass, während in naiven T-Zellen die FITC-Cholera toxin-B Färbung diffus in der Zelle verteilt ist, d.h. eine klare intrazelluläre Verteilung von GM1 aufzeigt, in aktivierten T-Zellen die Färbung auf die Membran begrenzt ist. Das bedeutet, dass das synthetisierte GM1 nicht in der Zelle gespeichert bleibt, sondern direkt in die Plasmamembran gelangt (Tuosto et al., 2001). Außerdem sind in ruhenden T-Zellen rafts hauptsächlich intrazellulär vorhanden und nur zu einem geringen Anteil an der Zelloberfläche repräsentiert. In Effektor-T-Zellen tragen sie dahingegen einen viel höheren Anteil und befinden sich nur auf der Zelloberfläche. Auch die Tatsache, dass Lck in naiven zytotoxischen T-Zellen eine zytosolische Verteilung aufweist und eine schwache Affinität zum Corezeptor hat, wohingegen die Kinase in CD8-Effektor und-Gedächtnis-Zellen zur Membran geschleust wird und mit dem Corezeptor assoziiert (Tuosto et al, 2001), zeigt, dass raft Mikrodomänen in humanen naiven T-Zellen nicht in der Plasmamembran organisiert sind, sondern im Zytoplasma und bei T-Zellstimulation diese Domänen zur Membran gelangen und sich dort zusammenraffen, um Signalkompartimente hervorzubringen.

Weiterhin induziert T-Zellpriming die Neusynthese von raft Komponenten, wodurch Effektorzellen ansprechbarer sind als naive T-Zellen. Effektor-T-Zellen reagieren auf geringere Dosen Antigen als naive T-Zellen und benötigen wie diese auch keine CD28-vermittelte Rekrutierung von rafts.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Verfügbarkeit von Signalkomponenten in verschiedenen Zellen oder unter unterschiedlichen Bedingungen möglicherweise abweicht, weil die lokale Konzentration der verschiedenen Komponenten reguliert werden kann. Auf diese Art und Weise, durch Hoch- oder Runterregulieren der lokalen Konzentration der

Signalmoleküle, kann die T-Zelle ihre Antwortfähigkeit auf Antigene während ihrer verschiedenen Lebensphasen modulieren.

In den theoretischen Ausführungen wurde beschrieben, welche Aufgabe der CRAC-Kanal bei der T-Zellaktivierung hat.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob CRAC-Kanäle auch in den rafts vorkommen.

Dafür wurden zuerst periphere T-Zellen aus peripheren humanem Blut extrahiert, mittels PHA (10ug/ml) aktiviert und für 2-3 Tage bei 37°C kultiviert. Dann sollte durch das Anfärben mit FM-143 gezeigt werden, dass rafts vorhanden sind und Endozytose stattfindet.

3.2.1 FM1-43

Der Farbstoff FM1-43 wurde in Kombination mit Fura-2 verwendet, um gleichzeitig das intrazelluläre Ca^{2+} und den Membranturnover zu messen. Wie bei den meisten Styrylfarbstoffen sind die Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspectra von FM1-43 signifikant in der Membranumgebung verschoben. FM1-43 wird wirksam mit standardfluoreszinoptischen Filtern angeregt, aber nur geringfügig mit standardtetramethylrhodaminoptischen Filtern.

FM1-43 kann dazu benutzt werden, Exo- und Endozytose aufzuzeigen (Zweifach, 2000). Zweifach erkannte, dass es in durch Ionomycin stimulierten Jurkat Leukämie T-Zellen einen großen Anstieg der FM1-43 Fluoreszenz gab. Diese Antwort ist zu enorm, als dass sie durch Exozytose allein ausgelöst werden kann. Tatsächlich gelang es mit drei verschiedenen Experimenten aufzuzeigen, dass FM1-43 auf Phospholipidanreicherung wie z.B. bei Endozytose (scrambling) reagiert.

Wichtig für die vorliegenden Experimente ist, dass Lipiddomänen wie Kaveolen oder rafts einen hohen Cholesterol- und Sphingolipidanteil haben und bei Endozytose und Zellsignalen mitwirken. Dies bedeutet, dass FM1-43 als Endozytosemarker rafts anfärbt, da diese an Endozytose teilnehmen.

3.2.2 TCR-Cluster

Nach Vorstimulation mit PHA wie oben beschrieben wurden die T-Zellen 20 Minuten auf dem Lysin-Plättchen im Brutschrank adhärirt, der Überstand danach abgezogen und 5 Minuten mit Ca^{2+} -Ringer gewaschen, so dass nur noch adhäririerte Zellen für das Experiment zur Verfügung standen.

Als nächstes folgte eine Stimulation der T-Zellen mittels Anti-CD3-mouse-Antikörper (300ng/ml für 5 Minuten im Brutschrank).

Erneut erfolgte dreimaliges Waschen à 5 Minuten mit Ca^{2+} -Ringer und anschließend Anfärbung des TCR mittels Anti-mouse-Cy2 Farbstoff für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Der Farbstoff Cy2 hängt an dem Anti-mouse-Antikörper und gibt damit die Lage des Anti-CD3-mouse-Antikörper, der am TCR hängt, an (s. Abb. 11). Nach der Anfärbung erfolgte erneut dreimaliges Waschen mit Ca^{2+} -Ringer.

Danach wurde mit der CCD-Videokamera eine Bildaufnahme der angefärbten Zellen angefertigt (s. Abb. 11).

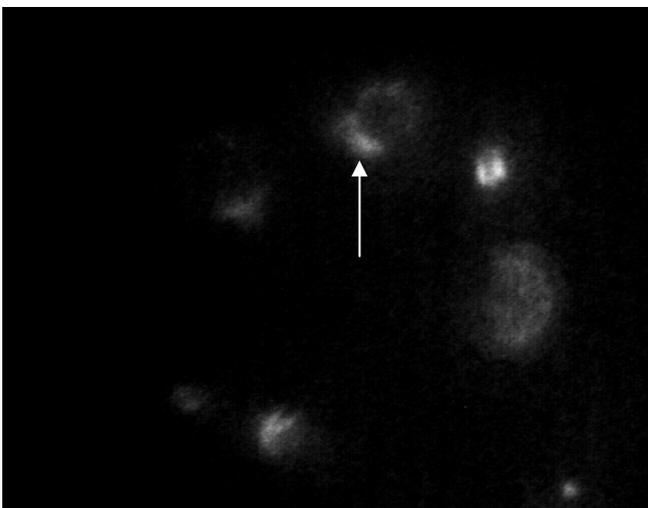


Abb. 11 Erläuterungen im Text. Der Pfeil zeigt die punktförmig angefärbte Stelle nach Anti-Cd3 Cy2-Färbung nach PHA-Stimulation und somit den TCR an.

Damit eine FM1-43 Färbung nicht von der Cy2-Färbung beeinflusst wird, wurden nach der Bildaufnahme die Zellen mit Durchlicht ca. 2-4 Minuten gebleicht, damit sich das Farbstoffmolekül chemisch zersetzt und auseinanderbricht und somit nicht mehr die TCR-Stelle anzeigt (s. Abb. 12)

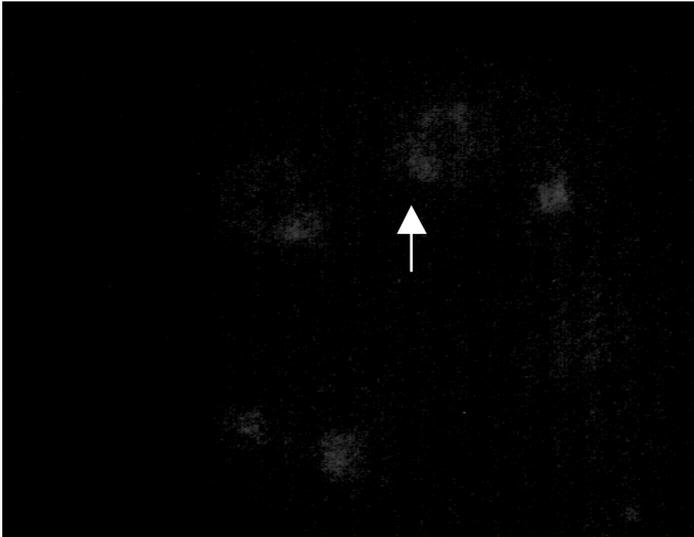


Abb. 12: Erläuterungen im Text. Der Pfeil zeigt die vormals angefärbte Stelle nach Bleichen mit Durchlicht an.

Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit FM1-43 (10uM) angefärbt. Da FM-143 die rafts anfärbt, zeigte sich hierbei, dass exakt die gleichen Stellen wie bei der Anti-CD3 Cy2-Färbung angefärbt wurden, was beweist, dass der TCR in den rafts liegt (s. Abb.13). Die Färbung tritt deutlicher hervor, was die oben erwähnte Theorie untermauert, dass rafts sich nach Stimulation an der Zelloberfläche vermehrt aufhalten.

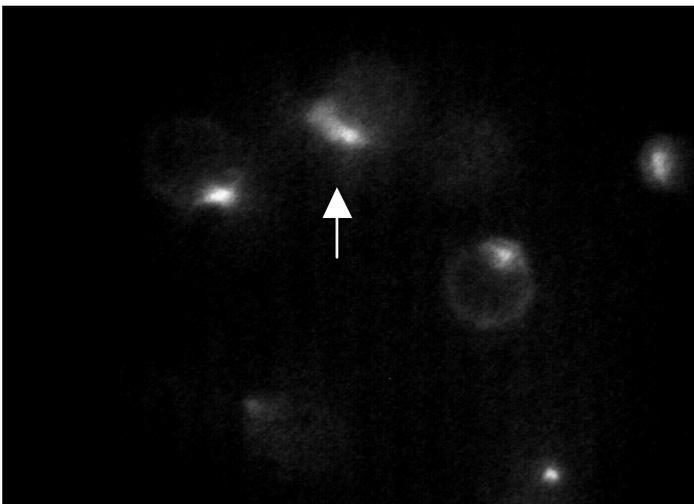


Abb. 13: Erläuterungen im Text. Der Pfeil zeigt die jetzt mit FM1-43 angefärbte punktförmige Stelle an. Da FM1-43 rafts anfärbt, zeigt sich hier, weil exakt die gleiche Stelle wie in Abb. 11 angefärbt wurde, dass der TCR in rafts liegt.

Um nun festzustellen, ob der I_{CRAC} ebenso in den rafts vorhanden ist, wurde mit der abgewandelten patch-clamp-Methode direkt an eine mit FM1-43 angefärbten Stelle angepatcht und eine Ca^{2+} -Ringerlösung der Zelle angeboten.

Um einen Ca^{2+} -Einstrom sichtbar zu machen, mussten die T-Zellen vorher mit fura-2-AM beladen werden (30 Minuten). Mittels der Video-Imaging-Methode konnte der Ca^{2+} -Einstrom aufgezeichnet werden.

Bei der Auswertung stellte sich heraus, dass kein signifikanter Ca^{2+} -Anstieg zu beobachten war (nicht gezeigt). Da dieselben Zellen ohne FM1-43-Farbstoffbeladung jedoch einen Ca^{2+} -Anstieg zeigten, konnte dieser Effekt nur durch Blockierung des I_{CRAC} durch FM1-43 ausgelöst worden sein, was im folgenden Experiment untersucht wurde.

3.2.3 FM1-43 blockiert den kapazitiven Calciumeinstrom

Um den blockierenden Effekt von FM1-43 auf den kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom nachzuweisen, wurde die $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit der FM1-43-Applikation mittels Video-Imaging-Methode untersucht.

Dazu wurden mit PHA vorstimulierte T-Zellen mit fura-2-AM beladen (1 μ M, für 2h im Brutschrank), danach zuerst mit Ca^{2+} -Ringer und, um einen deutlicheren Effekt zu erzielen, im weiteren Verlauf mit Ca^{2+} -freiem Ringer perfundiert. Als nächstes wurden die speichergesteuerten Ca^{2+} -Kanäle durch Entleeren der endoplasmatischen Speicher mit Thapsigargin maximal aktiviert (Thastrup et al., 1990) und ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ gemessen (s. Abb. 14), der in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ringer bestehen blieb und erst bei Perfusion mit Ca^{2+} -freiem Ringer abfiel. Erneute Perfusion mit Ca^{2+} -Ringer beweist durch den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ einen zu diesem Zeitpunkt funktionierenden speichergesteuerten Calciumkanal. Nach Abschalten der Perfusion wurde FM1-43 (10 μ M) zugegeben. Nach Einschalten der Ca^{2+} -freien Ringerlösung zeigte sich ein deutlicher Abfall der $[Ca^{2+}]_i$. Dies ist durch die Wegnahme des für den speichergesteuerten Kanal wichtigen Ions Calcium zu erklären. Nach Umschalten der Perfusion auf Ca^{2+} -Ringer zeigte sich jedoch kein, wie eigentlich physiologischerweise zu erwarten wäre, Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ bei einem

noch funktionierenden I_{CRAC} . Dies ist durch die Applikation von FM1-43 zu erklären, die den speichergesteuerten Calciumkanal blockiert (s. Abb. 14).

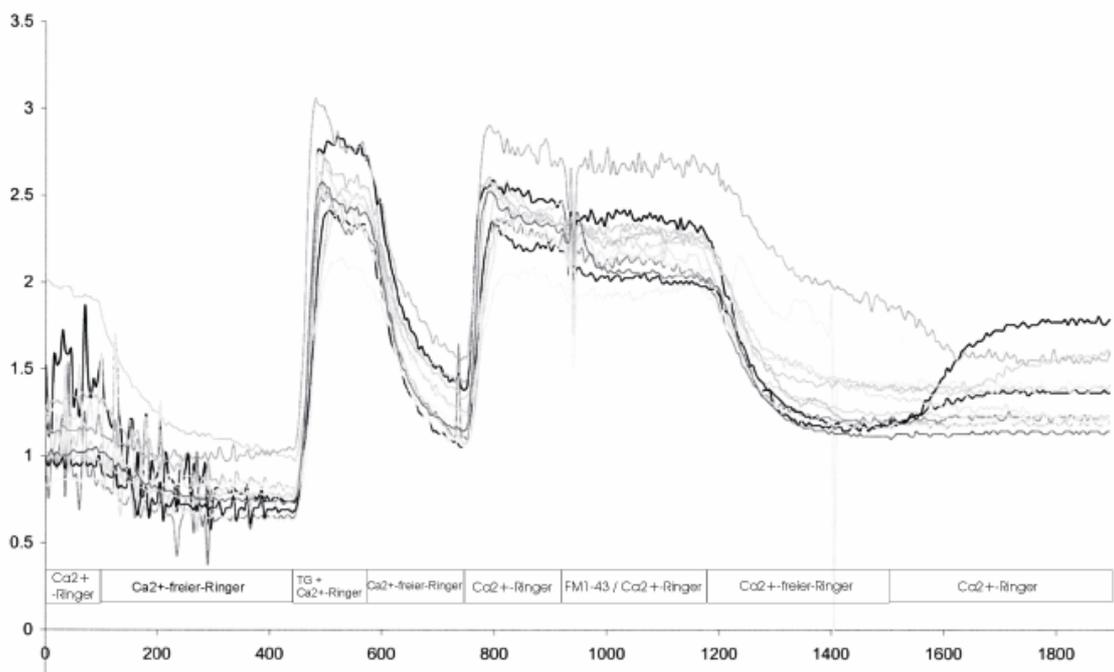


Abb. 14: Dargestellt ist der Zeitverlauf der durchschnittlichen $[Ca^{2+}]_i$ nach Aktivierung des CRAC-Kanals in humanen T-Zellen (auf der x-Achse). Durch Zugabe von Thapsigargin (1 μ M) in Ca^{2+} -freier Lösung kommt es zur Entleerung der intrazellulären Speicher (ER) und dadurch zur Aktivierung des Ca^{2+} -Kanals. Es zeigt sich im weiteren Verlauf die Reaktion der $[Ca^{2+}]_i$ bei Perfusion mit Ca^{2+} -freiem Ringer oder nachfolgend Ca^{2+} -Ringer. Nach Zugabe von FM1-43 reagiert die $[Ca^{2+}]_i$ nicht sofort. Die Perfusion mit Ca^{2+} -freiem Ringer zeigt einen physiologischen Abfall der $[Ca^{2+}]_i$. Erneute Zugabe von Ca^{2+} -Ringer zeigt keine Reaktion der $[Ca^{2+}]_i$, was auf eine Inhibition des I_{CRAC} durch FM1-43 schließen lässt.

3.3 Kokultur mit CD95-Ligand exprimierende Tumorzellen blockiert das Ca^{2+} -Signal in T-Zellen via CD95

Bei Patienten mit verschiedenen malignen Tumoren lässt sich eine allgemeine Suppression der Lymphozytenfunktion nachweisen. In neueren Studien wurde für diesen Effekt ein Funktionsverlust (Anergie) der Immunzellen beschrieben (Morford 1997; Staveley-O'Carroll 1998). Die folgenden Experimente deuten

auf eine wesentliche Beteiligung des CD95-Rezeptors bei der Entstehung dieser Anergie hin.

Es wurden CD95L⁺ maligne Glioblastomzellen mit murinen Thymozyten oder humanen Jurkat T-Zellen kokultiviert. Mit der oben beschriebenen Video-Imaging-Technik konnte anschließend der durch Thapigargin induzierte speichergesteuerte Ca²⁺-Einstrom untersucht werden.

Der speichergesteuerte Ca²⁺-Einstrom in Jurkat T-Zellen wurde durch 1.5stündige Kokultur mit CD95⁺-Tumorzellen (Abb. 15A) blockiert, dasselbe galt auch für humane periphere T-Blasten (nicht abgebildet). Die für die Proliferation notwendige langanhaltende intrazelluläre Calciumerhöhung auf ~ 500nmol/l (Negulescu, 1994; Fanger, 1997) wurde nach Kokultur mit den Tumorzellen nicht mehr erreicht.

Auch Kokultur mit CD95l-negativen humanen Vorhautfibroblasten (Abb. 15C) hemmte Ca²⁺-Signale nicht.

Im Hinblick auf den zuvor beschriebenen Effekt sollte in den folgenden Experimenten die Rolle des CD95-Rezeptors, sowie die bekannten Elemente der Signalkaskade untersucht werden.

3.3.1 Blockade des Ca²⁺-Signals via CD95

Um Aufzuzeigen, dass CD95 für diesen Effekt bedeutsam ist, wurde der CD95L auf den Tumorzellen mit einem CD95-Fc-Fusionsprotein neutralisiert. Der Ca²⁺-Einstrom nach Kokultur mit CD95L-inaktivierten Tumorzellen war im Vergleich zur Kontrolle unverändert (Abb. 15B/C).

Sowohl die Effizienz von löslichem CD95-Fc-Fusionsprotein als auch der genetische CD95-Defekt zeigen, dass Tumoren in T-Lymphozyten eine

Inhibition von Ca^{2+} -Signalen via CD95-Rezeptor-Stimulation induzieren.

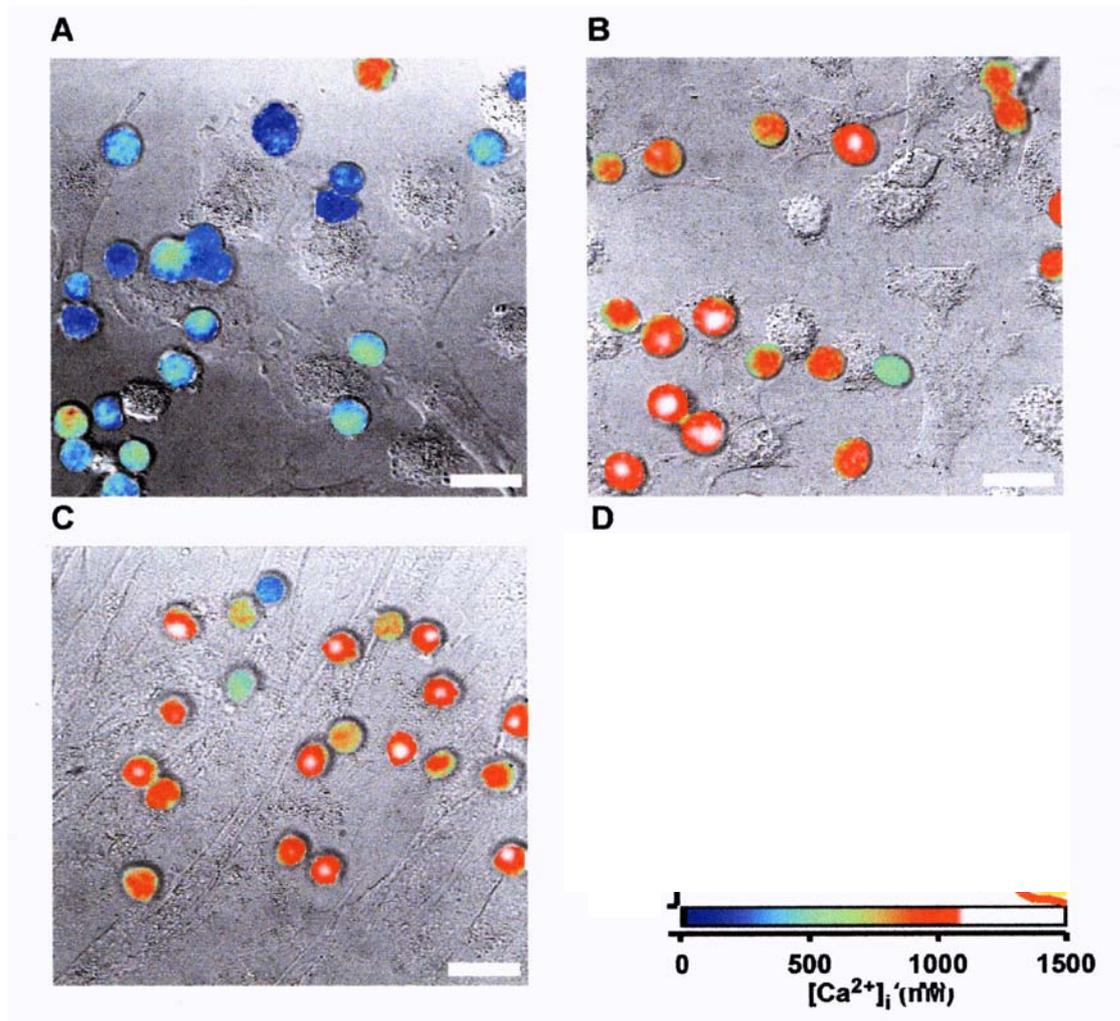


Abb. 15: Kokultur von Lymphozyten mit CD95L-exprimierenden Tumorzellen blockiert den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom in CD95^+ , aber nicht in CD95 -defekten T-Zellen.

Fura-2 beladene Jurkat T-Zellen wurden mit CD95L^+ Glioblastomzellen (LN 18) für 1.5h kokultiviert und der Ca^{2+} -Einstrom mit TG aktiviert ($1\mu\text{M}$, 10 min). Digitale Falschfarbenbilder der Lymphozytenfluoreszenz codieren die intrazelluläre freie Ca^{2+} -Konzentration entsprechend der Farbskala in D. Die Fluoreszenzbilder wurden digital über Transmissionsbilder mit differentiellem Interferenzkontrast gelegt. Der weiße Balken zeigt $20\mu\text{m}$.

- A) Kokultur mit CD95L^+ Glioblastomzellen blockiert den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom in T-Lymphozyten. Mit einer zweiten CD95L^+ Glioblastomlinie (LN229) wurde dasselbe Ergebnis erzielt.
- B) Neutralisation von CD95L mit einem CD95-Fc-Fusionsprotein ($3\mu\text{g/ml}$) verhindert die Blockade des Ca^{2+} -Einstroms in T-Zellen nach Kokultur mit LN18 Tumoren.

- C) Kokultur mit humanen Vorhautfibroblasten, die keinen CD95L exprimieren, verändert den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom nicht.
- D) Der Farbbalken zeigt die Skalierung von A-C.

3.3.2 IL-2 Block durch CD95-Stimulation

Ein wesentliches Merkmal der Aktivierung von T-Helferzellen (Crabtree, 1989) ist eine erhöhte IL-2-Synthese, welche im wesentlichen durch die Öffnung von CRAC-Kanälen mit Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reguliert wird. Apoptotischer Zellverlust oder Anergie kann eine Suppression der TCR-induzierten IL-2 Synthese bewirken. Um zwischen CD95-induziertem Zelltod und der Wirkung von CD95-Stimulation auf die Lymphozytenfunktion zu unterscheiden, wurde die IL-2 Synthese in einzelnen T-Zellen bestimmt. Die Zellen wurden über Nacht mit einem stimulierenden CD95-Antikörper inkubiert und nachfolgend der TCR mit Phythaemagglutinin (PHA) und Phorbol ester (PMA) aktiviert. Die optische Bestimmung des intrazellulären IL-2-Gehalts in einzelnen permeabilisierten T-Zellen erlaubte eine Diskriminierung von IL-2 in apoptotischen und apoptoseresistenten Zellen. Die intrazelluläre IL-2 Konzentration nahm nach TCR-Stimulation in lebenden Zellen zu (Abb. 16).

Nach CD95-Stimulation für 18h (100ng/ml CH11) überlebten 50% der T-Zellen. Ein Merkmal von T-Zellanergie zeigte sich in dieser apoptoseresistenten Population durch die Blockade der TCR-aktivierten IL-2 Synthese. Weil eine Anergie vom Ras-geblockten Typ wegen des bekannten Ras-stimulierenden Effekts von CD95 unwahrscheinlich erschien, wurde untersucht, ob CD95-Stimulation Ca^{2+} -abhängige TCR-Signale hemmt. Mit Ionomycin wurde versucht, die CD95-induzierte Anergie aufzuheben, da dieses Ca^{2+} -Ionophor Anergie vom Ca^{2+} -geblockten Typ überwinden kann (Schwartz, 1996). Wie in Abb. 16 gezeigt, stellte 10 μM Ionomycin die TCR-induzierte IL-2 Synthese nach CD95-Stimulation komplett wieder her. Diese hohe Dosis von Ionomycin permeabilisiert die Zellen für Ca^{2+} unabhängig von intrinsischen Ca^{2+} -Kanälen. Die Wiederherstellung der IL-2 Synthese durch Ionomycin weist auf eine Inhibition von TCR-aktivierten Ca^{2+} -Signalen durch CD95 hin. Dieses Ergebnis weist auf eine Inhibition der IL-2-Transkription durch CD95 hin.

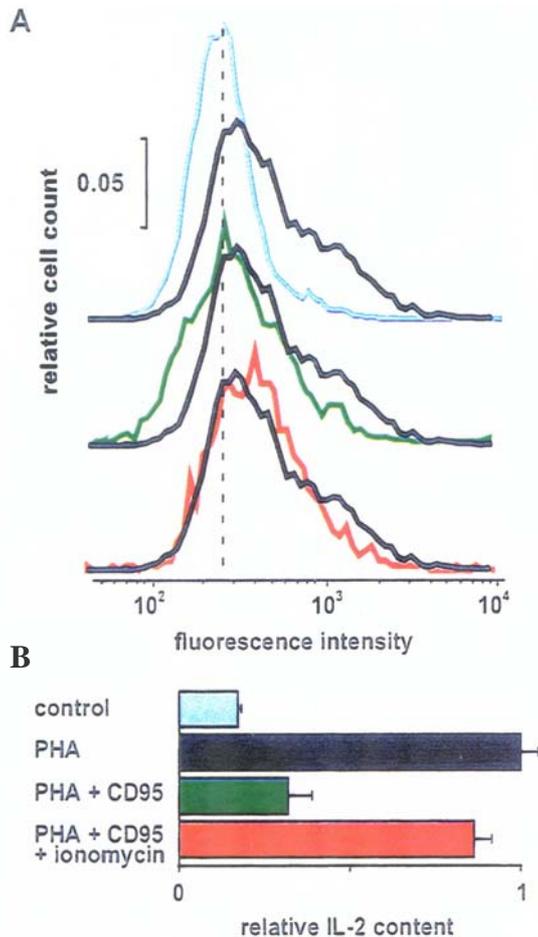


Abb. 16: Diese Abbildung zeigt die fluoreszenzoptische Messung der intrazellulären IL-2 Konzentration in lebenden, apoptoseresistenten Zellen mit der Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden hierzu für 18h mit 100ng/ml CH11 Antikörper vorinkubiert, gefolgt von 5h Stimulation des TCR mit PHA (50µg/ml)/PMA (150nmol/l), anschließend permeabilisiert und mit FITC-markiertem Antikörper gegen humanes IL-2 versehen. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist so ein Maß für den IL-2 Gehalt der Zellen. Die obere Grafik zeigt die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Intensität, ohne PHA/PMA (blaue Kurve) und nach TCR-Stimulation mit PHA/PMA (schwarze Linie). In den CD95 vorbehandelten Zellen ist die Fluoreszenzzunahme nach PHA/PMA Stimulation deutlich geringer als in Kontrollzellen. Eine Erhöhung des $[Ca^{2+}]_i$ unabhängig von vorhandenen Ionenkanälen mit 10µmol/l Ionomycin steigert die gemessene Fluoreszenz auf Kontrollwerte und zeigt die Bedeutung von $[Ca^{2+}]_i$ für die Synthese von IL-2. Das Balkendiagramm im unteren Bildteil zeigt die relative, mittlere IL-2 Konzentration, errechnet aus den Fluoreszenzintensitäten an der als unterbrochene Linie im oberen Bild gekennzeichneten Stelle. Die Fluoreszenzintensitäten wurden normiert und um die Intensität der Isotopenkontrolle korrigiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes wieder.

4 Diskussion

4.1 Die Rolle von Anti-CD3, PHA und Thapsigargin bei der T-Zellaktivierung

Bereits kurze Zeit nach der Stimulation des T-Zell-Rezeptors durch Antigenkontakt oder Crosslinking mittels Anti-CD3 oder PHA kommt es zur Erhöhung der intrazellulären freien Calciumkonzentration. Diese ist ein Schlüsselsignal für die T-Zellaktivierung (Lewis und Cahalan, 1995). Nach Stimulation des TCR-Komplexes werden eine Reihe von Tyrosinkinase aktiviert, was zu einer Aktivierung von Phospholipase C führt. PLC spaltet in der Plasmamembran lokalisiertes PIP_2 und bildet somit Diacylglycerol, welches den Ras-pathway aktiviert und Inositoltriphosphat, das über den IP_3 -Rezeptor Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (ER) freisetzt (Berridge, 1993). Durch die Speicherentleerung, die auch durch rezeptorunabhängige Stimuli wie TG hervorgerufen werden kann, werden CRAC-Kanäle geöffnet. Der genaue molekulare Mechanismus der Kanalaktivierung ist noch unbekannt (Putney, 1990). Der anhaltende Ca^{2+} -Strom ist notwendig für die Aktivierung von Calmodulin/Calcineurin, die Translokation von NFAT in den Nukleus (Rao et al., 1997) und letztlich für die IL-2 Genexpression und Proliferation der T-Lymphozyten (Negulescu et al., 1994). Hier werden die einzelnen Aktivierungsmechanismen zur Ca^{2+} -Freisetzung genauer betrachtet. Da durch Antikörper oder andere Substanzen aktivierte T-Zellen ein wichtiges Modell für die weiteren raft-Versuche dieser Arbeit darstellen, muß als Vorbedingung gezeigt werden, dass diese eine Ca^{2+} -Freisetzung hervorrufen.

4.1.1 CD3 und Anti-CD3

Die T-Zellaktivierung spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Immunantworten und beinhaltet multiple intrazelluläre Signalereignisse, die von dem Zelloberflächen-TCR/CD3-Komplex herrühren.

CD3 ist ein Komplex von Proteinen, der fest mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) auf der Oberfläche der T-Zellen assoziiert ist. Er übernimmt die Funktion, der Zelle zu signalisieren, dass der TCR ein Antigen gebunden hat, denn keine der Ketten des T-Zell-Rezeptorheterodimers besitzt eine große cytoplasmatische Domäne, die diese Funktion ausüben könnte.

Der Komplex besteht aus drei verschiedenen Proteinen mit einiger Homologie zu den Immunglobulinen und zwei weiteren Proteinen ohne eine solche Homologie, die aber eng miteinander verwandt sind.

Die CD3-Proteine haben im Gegensatz zum Heterodimer des TCR cytoplasmatische Ausläufer, mit denen sie mit signalübertragenden Proteinen interagieren können.

Die Proteine mit Sequenzhomologien zu den Immunglobulinen werden als CD γ , CD δ und CD ϵ bezeichnet. Die Struktur der CD3-Proteine besteht wie Ig α und Ig β aus extrazellulären Domänen mit schwacher Aminosäurehomologie zu Immunglobulindomänen, einer Transmembranregion und bescheidene cytoplasmatischen Domänen. Für die Transmembrandomänen ist ein negativ geladener Rest an einer Stelle charakteristisch, von der aus er eine Salzbindung mit den positiv geladenen Aminosäuren in der Transmembranregion des TCR bilden kann. Die cytoplasmatischen Domänen enthalten Sequenzen, die es ihnen ermöglichen, sich mit cytosolischen Tyrosinkinasen zu assoziieren.

Die beiden anderen Proteine ζ und η , sind auch Teil dieses Komplexes, und zwar entweder als ζ : ζ - oder als ζ : η -Dimere, die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Ca 80% der TCR an der Zelloberfläche assoziieren sich mit einem ζ : ζ -Dimer, der Rest enthält ein ζ : η -Dimer. Im Gegensatz zu den anderen CD3-Ketten ragen weder die ζ - noch die η -Polypeptide weit aus der Zelle heraus. Der Hauptanteil ihrer Polypeptidketten liegt im Cytoplasma.

Außerdem sind CD3-Proteine für die Expression des TCR auf der Zelloberfläche erforderlich. Mutierte Zellen, denen entweder die TCR-Ketten oder eine der drei γ -, δ - oder η -Ketten des CD3-Komplexes fehlen, können keine Bestandteile des Komplexes auf der Zelloberfläche exprimieren. Die

Interaktion zwischen den entgegengesetzt geladenen Resten im TCR und in den Transmembrandomänen von CD3 scheint für den Zusammenbau des Komplexes und seinen Transport zur Zelloberfläche notwendig zu sein.

Um eine Aktivierung des CD3-Komplexes auszulösen benötigten wir deshalb einen monoklonalen Antikörper, Anti-CD3.

Stingl et al. zeigten in ihren Experimenten, dass die Bindung des monoklonalen Antikörpers an CD3 (Anti-CD3) fähig ist, den Prozess des prämitotischen Umbaus in T-Zellen anzuregen, der in der Proliferation gipfeln kann, wenn exogenes IL-2 vorhanden ist.

Anti-CD3 lagert sich an den CD3-Komplex an und löst dadurch die Signalkaskade zur T-Zellaktivierung aus, was in unserem Experiment durch eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]$ angezeigt wird.

Das CD3-Molekül kann bei B-Zellen nicht gefunden werden und wird deshalb als Marker für T-Zellen benutzt.

Die Modulation der Zytokinproduktion und Zellproliferation durch therapeutische Agenzien sind von großem Interesse für die pharmazeutische Forschung. Nicht nur Anti-CD3, auch die anderen Ca^{2+} -Freisetzung stimulierenden Substanzen könnten somit eine bedeutende Rolle für zukünftige Pharmaka, die zur Immunabwehr eingesetzt werden, spielen.

Wie in diesen Experimenten nun veranschaulicht, zeigt sich, dass Anti-CD3 eine effektive Ca^{2+} -Freisetzung und somit T-Zellaktivierung auslöst (Ergebnisse Kapitel 3.1.1.1, Abbildung 8).

4.1.2 PHA und T-Zellaktivierung

PHA wird aus der roten Feuerbohne (*Phaseolus vulgaris*) extrahiert. Es besteht aus 5 Isolektinen, die als Tetramere vorliegen und von nicht-kovalenten Kräften zusammengehalten werden. Es bindet unspezifisch an verschiedene Moleküle der Zelloberfläche von T-Lymphozyten und löst damit innerhalb der Zelle ein aktivierendes Signal aus.

PHA ist ein starkes mitogenes Agens und agglutiniert Leukozyten, daraus resultiert ihre gesteigerte Proliferation. Dies funktioniert wahrscheinlich nur in Anwesenheit von Metallionen Calcium und Mangan. PHA ist somit besonders gut zur effizienten, polyklonalen Aktivierung von T-Lymphozyten geeignet.

Auch in diesen Experimenten wird deutlich gemacht, dass nach Zugabe von PHA ein adäquater Calciumeinstrom erfolgt, der für die T-Zellaktivierung wie schon beschrieben unerlässlich ist (Ergebnisse Kapitel 3.1.2.1, Abbildung 9).

4.1.3 Thapsigargin und T-Zellaktivierung

Thapsigargin ist ein Sequesterpenlacton, das irreversibel an die endoplasmatische Ca^{2+} -Pumpe (SERCA-ATPase) bindet, diese blockiert und dadurch die Aufnahme von Ca^{2+} in das ER verhindert (Premack et al., 1994; Thastrup et al., 1989). Dies bedeutet, dass die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher (Endoplasmatisches Retikulum, ER) durch TG aktiviert werden und Ca^{2+} in das Zytoplasma entleeren, woraufhin wiederum der I_{CRAC} maximal stimuliert wird und bei extrazellulärem Ca^{2+} -Angebot ein Ca^{2+} -Einstrom stattfindet (Thastrup et al., 1990).

Die Hemmung dieser ER-Isoform der Ca^{2+} -ATP-ase ist sehr selektiv, denn Thapsigargin hat keinen Einfluß auf Hepatozyten- oder Erythrozyten-Plasmamembran oder auf sarkoplasmatisches Retikulum kardialer oder skeletaler Muskelzellen.

Breitmayer et al. veranschaulichten, dass Thapsigargin denselben Effekt auslöst wie CD3 monoklonale Antikörper (Breitmayer et al., 1993). Der genaue Ablauf von der ER-Entleerung zum Öffnen des I_{CRAC} ist noch nicht bekannt, jedoch vermuten Breitmayer et al., dass eventuell das Cytochrom P450 einen entscheidenden Einfluß bei der Informationsvermittlung zwischen entleertem ER und der Plasmamembran hat.

Der Effekt von Thapsigargin kann komplett durch erhöhte extrazelluläre K^{+} -Konzentrationen, dh. Zelldepolarisation, verhindert werden (Gouy et al., 1990).

In dieser Arbeit wird der Thapsigargin-Effekt zur T-Zellaktivierung aufgezeigt, bei Nichtvorhandensein von extrazellulärem Calcium findet kein Calciumanstieg

nach Zugabe von Thapsigargin intrazellulär statt. Erst nach Calciumangebot extrazellulär kann ein intrazellulärer Calciumanstieg registriert werden. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass für einen funktionierenden I_{CRAC} extrazelluläres Calcium vorhanden sein muss, damit nach Anpatchen überhaupt eine Reaktion verzeichnet werden kann.

4.2 Rafts

Lange Zeit wurde Lipiden nur eine passive Rolle als einfache Bausteine für Membranen zur Abgrenzung intrazellulärer Kompartimente und zur Trennung des intrazellulären Milieus von der extrazellulären Umgebung zugeschrieben. In dem fluid mosaic Modell stellte man sich zelluläre Membranen als ungeordnete uniforme Bilayers vor, in denen sich Lipide frei und willkürlich durch laterale Diffusion bewegen. In den letzten zehn Jahren entstand ein neues Modell, das die Lipidvielfalt erklärt. Dieses Modell schlägt die Existenz von Lipidmikrodomänen oder „rafts“ in biologischen Membranen vor, die reich an Sphingolipiden und Cholesterol sind. Gemeinsam formen Sphingolipide und Cholesterol Mikrodomänen, die in den kürzeren ungesättigten Phospholipiden der meisten Membranen umherfließen (Harder und Simons, 1997). Die eigenartige Organisation der rafts begrenzt den Zutritt der Proteine auf die Art, dass nur Proteine, die durch einen Lipidanker an die Membran befestigt sind, wie z.B. GPI-verankerte Proteine oder acylierte cytosolische Proteine und bestimmte Transmembranproteine, in rafts liegen können. Die Mehrheit integraler Membranproteine wird ausgeschlossen.

Rafts sind reichlich vorhanden in der Plasmamembran, weiterhin werden sie auch intrazellulär in Exocytose- und Endocytosekompartimenten gefunden (Dupree et al, 1993; Gagescu et al., 2000; Puertollano et al., 2001). Der Endozytoseweg beinhaltet rafts, die die Internalisierung von GPI-verankerten Proteinen und IL-2-Rezeptoren durch einen Clathrin-unabhängigen Mechanismus vermitteln (Bamezai et al., 1992; Deckert et al., 1996; Lamaze et al., 2001). Rafts sind mobil und dynamisch und bewegen sich lateral im Niveau

der Plasmamembran und verkehren kontinuierlich zwischen der Plasmamembran und internen Kompartimenten (Nichols et al, 2001).

4.2.1 Die Rolle der rafts bei der T-Zellaktivierung

Neben ihrer Aufgabe im Exo- und Endozytoseweg, spielen die rafts eine wichtige Rolle bei der T-Zellaktivierung. Es ist bekannt, dass TCR Engagement die Zusammensetzung eines grossen makromolekularen Komplex triggert, der eine Vielzahl an Signalmolekülen und Verbindungsstücken enthält, aber erst kürzlich haben Foscher postuliert, dass rafts Plattformen für diesen Signalkomplex sind (Montixi et al., 1998; Xavier et al., 1998; Zhang et al., 1998). In ruhenden T-Zellen sind rafts stark angereichert mit den Src Kinasen Lck und Fyn (Montixi et al., 1998; Xavier et al., 1998) und dem LAT Transmembranverbindungsstück (Zhang et al., 1998).

Extensives Crosslinking des TCR mit Antikörpern fördert die schnelle Aktivierung von Src Kinasen und darauffolgende Akkumulation einer Serie von neu tyrosin-phosphorylierten Substraten in rafts (Kane et al., 2000; Langlet et al., 2000; Leo and Schraven, 2001), inklusive praktisch aller hyperphosphorylierten p23 CD3 Molekülen (Montixi et al., 1998; Xavier et al., 1998; Kosugi et al., 1999), den aktivierten Formen der ZAP70 Tyrosinkinase und Phospholipase C γ 1 (PLC γ 1), Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-K), dem Vav Rac/CDC42 Austauschfaktor (Montixi et al., 198; Xavier et al., 1998) und LAT (Brdicka et al., 1998; Zhang et al., 1998).

Die Präsenz des TCR-CD3-Komplexes in den rafts vor und nach dem Engagement wird kontrovers diskutiert (Montixi et al., 1998; Janes et al., 1999; Kosugi et al., 1999). Als eine Konsequenz aus beidem – raft Umverteilung und zytoskeletale Reorganisation, wird ein supramolekularer Aktivierungskomplex, der die gesamte Signalmaschinerie enthält, an der Grenzfläche des T-Lymphozyten und der Antigen-präsentierenden Zelle (APC) gebildet (Monks et al., 1998; Grakoui et al., 1999; Dustin und Chan, 2000). Aufgrund des Zusammenraffens der Signalmaschinerie wird das Zytoskelett reorganisiert und die Ras/MAPK und PLC γ 1 Kaskaden in den rafts aktiviert, was Signale produziert, die die T-Zellproliferation stimulieren (Lin und Weiss, 2000).

Neben dem TCR scheinen auch andere multikettige Immunerkennungsrezeptoren wie der B-Zellantigenrezeptor und der hochaffine IgE-Rezeptor in Mastzellen rafts zum Signalling zu benutzen (Langlet et al., 2000; Cherukuri et al., 2001).

Durch Anfärben mittels PHA vorstimulierter T-Zellen mit Anti-CD3-Antikörper konnte in diesen Experimenten der TCR sichtbar gemacht werden. Erstaunlicherweise gibt es auf einer T-Zelle jeweils nur einen angefärbten Cluster. Da FM1-43 ein Endozytosemarker ist und rafts an der Endozytose beteiligt sind, ist dies ein guter Indikator für rafts. Um herauszufinden, ob der TCR in den rafts liegt, wurde die erste Färbung gebleicht, damit der neue Farbstoff nicht mit dem vorherigen interferiert. Nach der FM1-43-Färbung, die ebenso einen angefärbten Cluster aufzeigte, konnte durch Vergleich der Bilder festgestellt werden, dass genau an derselben Stelle das Cluster aufgetreten ist wie zuvor bei der TCR-Färbung. Dies beweist, dass der TCR in den rafts liegt (Ergebnisse Kapitel 3.2.2, Abbildung 11/12).

Im Gegensatz zum Triggern durch extensives TCR Crosslinking mit einem Überschuss an anti-CD3 Antikörpern, beinhaltet Triggern durch APCs eine auffallend begrenzte Menge an prozessierten Antigenpeptiden, die kein massives TCR Engagement direkt produzieren können. Unter diesen Umständen sind kostimulatorische Signale, die durch andere Rezeptor-Ligand Interaktionen vermittelt werden, nötig zur T-Zellaktivierung. Dabei funktioniert CD28 als der Haupt-T-Zell-Kostimulatorrezeptor, aber auch andere T-Zelloberflächenmoleküle können die T-Zell-Kostimulation induzieren. Angesichts der Tatsache, dass das Crosslinking des TCR durch suboptimale Mengen an Anti-CD3 Antikörpern nicht in einem Clustern von rafts resultiert, sondern eine Kostimulation mit CD28 die Lipidrafts zur Kontaktseite hin umverteilt (Viola et al., 1999), war die Vorstimulation der T-Zellen mit PHA wichtig, um den Effekt überhaupt erst zu erkennen. Die Reorganisation des Aktinzytoskeletts zur Kontaktseite wird für das anhaltende Signalling benötigt, das zur T-Zellaktivierung führt (Valitutti et al., 1995). Die Kostimulation durch zusätzliche Moleküle scheint eine dynamische Reorganisation der rafts zu

beinhalten, um die TCR-Moleküle zu umgeben, ein Prozeß, der eine gleichzeitige Aktivierung des TCR erfordert (Yashiro-Ohtani et al., 2000).

Es wird immer deutlicher, dass die raft-Anhäufung das Signalling begleitet, das der TCR-Aktivierung folgt (Janes et al., 1999), und dass der Aktivierungsprozeß eine Maschinerie benötigt, die fähig ist, Zugang zu rafts zu finden (Kabouridis et al., 1997; Lin et al., 1999). Die raft-Einheit ist nötig für die effiziente Bindung des TCR an MHC-I-Klasse-Moleküle (Drake und Braciale, 2001).

4.2.2 Rolle der rafts im CD95-getriggerten Zelltod

Nicht nur bei der T-Zellaktivierung scheinen rafts eine bedeutende Rolle zu spielen, sondern auch bei dem durch CD95-vermittelten Zelltod. Fas, ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Rezeptor Familie, kann durch Bindung agonistischer Antikörper Signalkaskaden triggern, die zu Zelltod in Lymphozyten und anderen Zelltypen führen. Solche Signalkaskaden werden durch die Formierung von DISCs, die Fas, Fas-assoziierte Todesdomänen (FADD) und Caspase-8 enthalten, ausgelöst. Hueber et al berichten, dass eine beträchtlicher Teil des Fas in ihrem Aufbau in Mausthymozyten sowie in L12.10-Fas T-Zellen in sphingolipid- und cholesterolreiche Membranrafts aufgeteilt wird und die Fasbindung eine schnelle und spezifische Rekrutierung von FADD und Caspase-8 zu den rafts fördert (Hueber et al, 2002). Eine Zerstörung der rafts durch Cholesterolverringering hebt das Fas-getriggerte Rekrutieren von FADD und Caspase-8 zur Membran, DISC Formierung und Zelltod auf. Durch Methyl-beta-Cyclodextrin, ein Lipidrafts-„Zerstörer“, kann die durch Fas induzierte Apoptose in CD4+-T-Zellen inhibiert werden (Scheel-Toellner et al., 2002). Aus Kontroll- und Fas-Ligand behandelten Zellen wurden die Lipidrafts isoliert und es zeigte sich, dass ein kleiner Teil an Fas in der raft Fraktion in den unbehandelten Zellen vorhanden war, jedoch in den Fas-behandelten Zellen diese Menge enorm erhöht war. Auch die anderen Komponenten des DISC, FADD und Procaspase waren in einem bedeutend höheren Ausmaß in der raft-Fraktion Fas-Ligand behandelter Zellen vorhanden. Daraus schließt man, dass die Bildung der DISCs in Lipidrafts stattfindet und

dass diese Membranmikrodomänen für eine effiziente Fas-Signalkaskade und Apoptose benötigt wird.

4.2.3 Bedeutung der rafts für den I_{CRAC}

Der kapazitative Ca^{2+} -Kanal, I_{CRAC} , nimmt jeweils eine Schlüsselfunktion bei der T-Zellaktivierung sowie bei T-Zellanergie ein. Der genaue molekulare Mechanismus der Kanalaktivierung ist dabei noch unbekannt (Putney, 1990).

Da wie oben beschrieben eine effiziente T-Zellaktivierung, Fas-Signalkaskade und Apoptose nur in Anwesenheit von rafts möglich ist, könnte man sich vorstellen, dass, da sich die meisten Signalmoleküle in rafts anreichern, sich deshalb auch eventuell der I_{CRAC} dort befindet. So wäre eine rapide Signalkaskade möglich.

Mit der abgewandelten patch-clamp-Methode kann die $[Ca^{2+}]_i$ nach Anpatchen an einem durch FM1-43 markierten raft gemessen werden, wobei extrazelluläres Calcium selektiv nur an der Aussenseite des rafts, nicht aber an der übrigen Membran angeboten wird. Nach unserer Hypothese sollte eine $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung auftreten. Da diese jedoch nicht stattfand, mussten wir eruieren, ob dies an einem Nicht-Vorhandensein des CRAC-Kanals in den rafts oder einer Blockade des I_{CRAC} lag.

Die weiteren Experimente veranschaulichten, dass der Farbstoff FM1-43 leider den I_{CRAC} inhibiert. Der genaue molekulare Mechanismus dieser Blockade ist unbekannt. Vermutlich verändert FM1-43 jedoch die Konformation des CRAC-Kanals so, dass ein Ca^{2+} -Einstrom nicht mehr möglich ist. Da FM1-43 in den verwendeten Konzentrationen fluoreszenzoptisch nur in rafts nachweisbar war, könnte dies einen indirekten Hinweis auf die Lokalisation des CRAC Kanals in den rafts geben.

Zum definitiven Nachweis dieser Hypothese wären jedoch weitere Experimente nötig, die derzeit von mehreren Problemen behaftet sind, denn insbesondere das CRAC Protein ist noch nicht identifiziert und es sind keine Antikörper verfügbar.

4.3 CD95-induzierte Blockade von CRAC

In dieser Arbeit wird ein neuer Mechanismus beschrieben, den Tumoren ausnützen könnten, um die T-Zellantwort gleichsam auszuschalten. Wir zeigten, dass diese Anergie durch CD95 vermittelt wird, rasch einsetzt, über mehrere Stunden anhält und unabhängig von der CD95-induzierten Apoptose auftritt. Das wesentliche Merkmal dieser T-Zellanergie ist die Blockade des Ca^{2+} -Einstroms, da die IL-2-Produktion durch Ionomycin wiederhergestellt werden kann, das $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unabhängig von CRAC-Kanälen erhöht (Ergebnisse Kapitel 3.3.1, Abbildung 15).

Zum einen haben wir dadurch eine neue Funktion des CD95-Rezeptors gezeigt. Zum zweiten stellt CD95 den ersten Rezeptor in Lymphozyten dar, der nachweisbar speichergesteuerte Ca^{2+} -Kanäle negativ reguliert, die in vielen Geweben Ca^{2+} -Signale vermitteln (Bootman und Berridge, 1995). Zum dritten könnte die hier beschriebene Wechselwirkung zwischen CD95- und TCR-Signalen wichtig für das Verständnis tumorinduzierter Immunsuppression sein. Gezielte Manipulation dieser CD95-vermittelten Hemmung der T-Zellaktivierung könnte für tumortherapeutische Strategien wie der Impfung gegen Tumorantigene sowie für eine spezifische Immunsuppression bei der Organtransplantation genutzt werden.

4.3.1 CD-95-induzierte Apoptose und die Immunevasion von Tumoren

Der CD95-Rezeptor spielt als Vermittler des gesteuerten Zelltodes eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz (Van Parijs, 1998), bei der Limitierung der peripheren Lymphozytenpopulation (Watanabe-Fukunaga, 1992; Watanabe-Fukunaga, 1992; Dhein, 1995; Sytwu, 1996; Van Parijs, 1996) und an der Vermittlung der T-Zellzytotoxizität (Ju, 1994). Bei Tier und Mensch führe genetische Defekte von CD95L oder CD95 demgemäß zu schweren Autoimmunerkrankungen (Watanabe-Fukunaga, 1992; Watanabe-Fukunaga, 1992; Drappa, 1996; Sneller, 1997). Die Abstoßung transplantierte Melanomzellen ist in CD95-defekten *lpr*- verglichen mit CD95-Ligand-defekten *gld*-Mäusen verstärkt (Hahne et al., 1996) und transplantiertes Hodengewebe

von *gld*-Mäusen wird stärker und schneller abgestoßen als das von Wildtypmäusen (Bellgrau et al., 1995). Diese Beobachtungen weisen auf eine Rolle von CD95 für die Immuntoleranz gegenüber transplantiertem malignem und normalem Gewebe hin. Starke Expression von CD95L ist verantwortlich für das Immunprivileg in Organen wie Testis, Innenohr, Gehirn und der Augenvorderkammer. Das letztere spielt eine entscheidende Rolle für die Corneatransplantation, die deshalb keiner HLA-Typisierung bedarf (French et al., 1996; Hunt et al., 1997; Griffith et al., 1996; Griffith et al., 1995). Diesen Mechanismus nutzen maligne Tumoren einschließlich Lymphom, Melanom, Colonkarzinom, Hepatom und Gliom aus, indem sie CD95L stark exprimieren (Strand et al., 1996; Hahne et al., 1996; Weller et al., 1997; Zeytun et al., 1997). Interessant und wichtig für die klinische Tumorthherapie ist dabei die Beobachtung, dass Bestrahlung sowie Zytostatika eine verstärkte CD95L-Expression auf Karzinomzellen induzieren (Strand et al., 1996). Diese Berichte zeigen die Bedeutung von CD95 als Immunsuppressor und nehmen als zellulären Mechanismus die apoptotische Deletion von lymphatischen Zellen an.

Allerdings zeigen weitere Beobachtungen, dass zusätzliche zelluläre Effekte der CD95-Stimulation vorkommen, die über die reine Apoptoseinduktion hinausgehen. Erstens überlebt typischerweise etwa die Hälfte der Lymphozytenpopulation eine Tumor/Lymphozyten-Kokultur (Strand et al., 1996; Hahne et al., 1996; Weller et al., 1997). Eine solche Resistenz gegen Apoptose kann durch Genprodukte wie Bcl-x_L oder reduzierte Aktivierung bestimmter Caspasen bedingt sein, wie für CD95-resistente humane Lymphoblasten gezeigt wurde (Broome et al., 1998; Peter et al., 1997; Klas et al., 1993). Zweitens wurde in *lpr*-Mäusen beobachtet, dass der Block CD95-induzierter Apoptose in transgenen Tieren durch Expression von dominant negativem FADD oder des Caspaseinhibitors CmA nicht zu einer lymphoproliferativen Klinik führt (Newton et al., 1998; Zhang et al., 1998). Drittens erkennt man in CD95-defekten *lpr* T-Lymphozyten eine Resistenz gegen TCR-vermittelte Anergie durch anti-CD3-Antikörper (Bossu et al., 1993). Schließlich wurde in Tumorpatienten eine Vielzahl von Defekten der Lymphozytenfunktion

beschrieben (Staveley-O'Carroll et al., 1998; Brooks et al., 1972; Roszman et al., 1985; Elliott et al., 1984; Morford et al., 1997). Gemeinsam mit der CD95-induzierten Anergie, die wir hier beschreiben, suggerieren diese Beobachtungen, dass CD95 die Lymphozytenfunktion unabhängig von der Apoptose beeinflussen kann.

4.3.2 Hemmung der T-Zellaktivierung (Anergie)

Im Vergleich zur Apoptose ist sehr wenig bekannt über zelluläre Mechanismen, die zur Anergie führen. Durch inkomplette TCR-Signale *in vitro* und *in vivo* kann anhaltende Anergie ausgelöst werden, die wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Selbsttoleranz spielt (Schwartz, 1996). Generell kann man zwei Arten von Anergie unterscheiden: Antigenpräsentation ohne adäquate CD28-Kostimulation induziert anhaltende Blockade des Ras-Signalwegs. Dazu gehören erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ Aktivität von $p59^{fyn}$ und dem G Protein Rap1, aber auch eine Inhibition von AP-1 (Boussiotis et al., 1997). Da CD95 in T-Zellen Ras aktiviert, spielt bei der CD95-vermittelten Immunsuppression diese Art von Anergie vermutlich keine Rolle (Gulbins et al., 1995).

Eine andere Anergieform kann *in vitro* und *in vivo* durch Applikation hoher Antigendosen in der Abwesenheit antigenpräsentierender Zellen ausgelöst werden. Diese Anergie ist charakterisiert durch blockierte Ca^{2+} -abhängige Signale (O'Hehir et al., 1991; Wotton et al., 1995). Diese Anergieform kann mit Ca^{2+} -Ionophoren wie Ionomycin überwunden und die IL-2 Synthese genauso wie die T-Zellproliferation restauriert werden. Anergie mit blockierten Ca^{2+} -Signalen ist interessanterweise in T-Lymphozyten von Glioblastompatienten beobachtet worden, bei denen frühe TCR-Signale gestört sind (Morford et al., 1997). Diese T-Zellen zeigen eine gehemmte Ca^{2+} -Antwort nach TCR-Stimulation und nach Gabe von 1 μ M Ionomycin. Bei dieser geringen Konzentration wirkt das lipophile Ionomycin noch nicht membranpermeabilisierend, sondern entleert intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher und aktiviert CRAC-Kanäle in T-Zellen (Hoth und Penner, 1992; Albert und Tashjian, 1986). Diese Arbeiten bieten starke Hinweise auf eine Hemmung des

speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms in anergen T-Zellen von Tumorpatienten, obwohl die zugrundeliegenden Mechanismen unbekannt sind. Unsere Beobachtung einer CD95-induzierten Blockade des Ca^{2+} -Einstroms bietet eine Erklärung für die T-Zellanergie, die in Gliompatienten beobachtet wird. Andere CD95L^+ Tumoren können vermutlich eine ähnliche Anergie auslösen.

4.3.3 Molekulare Mechanismen der CD95-induzierten Anergie

Voraussetzung für eine Reihe verschiedener Lymphozytenfunktionen wie Proliferation, Zytokinproduktion und Differenzierung ist der speichergesteuerte Ca^{2+} -Einstrom durch CRAC-Kanäle (Crabtree, 1989; Partiseti et al., 1994; Qian und Weiss, 1997). In vielen weiteren Zelltypen kontrollieren CRAC-Kanäle so verschiedene Funktionen wie Zellwachstum, Migration, Kontraktion und Sekretion (Bootman et al., 1995). Allerdings ist es immer noch nicht gelungen, die putativen Kanalproteingene zu klonieren, und die Regulation dieses Kanals ist nur teilweise bekannt. Nach Stimulation des TCR-Komplexes in funktionsfähigen Lymphozyten wird Inositoltriphosphat gebildet, das wiederum Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern entleert. Der reduzierte Füllungsgrad dieser Speicher öffnet dann CRAC-Kanäle über einen unbekanntem molekularen Mechanismus (Zweifach und Lewis, 1993) und erlaubt dadurch einen anhaltenden Ca^{2+} -Einstrom. Ein andauernder Ca^{2+} -Anstieg auf über 500nM ist in aktivierten T-Zellen Voraussetzung für die Induktion der IL-2 Synthese via Calmodulin/Calcineurin und NFAT (Negulescu, 1994). Die T-Zellaktivierung, Proliferation und Zytokinfreisetzung wird durch Inhibition der Ca^{2+} -abhängigen Signalwege mit Cyclosporin oder Ionenkanalblockern unterbunden (Lewis, 1995). Ein Beispiel für Ca^{2+} -Modulation als zellulärer Schalter wurde neulich in toleranten B-Zellen beschrieben, wo nach Toleranzinduktion reduzierte Ca^{2+} -Signale mit verändertem Zeitverlauf bestimmte Muster von Transkriptionsfaktoren aktivieren und so spezifisch die Gentranskription steuern (Dolmetsch et al, 1997; Healy et al., 1997).

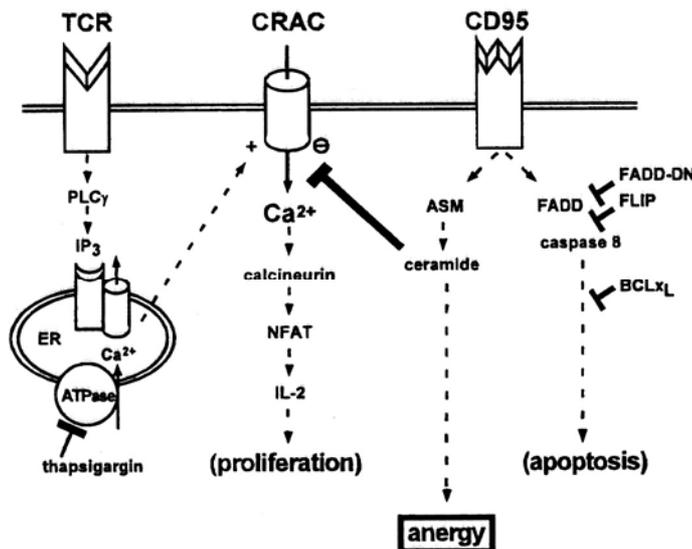


Abb. 18: Modell für T-Zellenergie induziert durch CD95. Die Querverbindungen zwischen CD95- und TCR-Signalen sind dargestellt (IP₃= Inositoltriphosphat, PLCγ= Phospholipase C γ, ER= Endoplasmatisches Retikulum). Erläuterungen im Text.

Hier haben wir uns auf Signale konzentriert, die eine Blockade des speicheroperierten Ca²⁺-Einstroms nach CD95-Stimulation in T-Zellen vermitteln. Für diesen Effekt war unerheblich, ob der Ca²⁺-Einstrom durch TCR-Stimulation, durch direkte Speicherentleerung oder durch intrazelluläres EGTA aktiviert wurde. TG entleert endoplasmatische Speicher spezifisch und direkt durch irreversible Inhibition der endoplasmatischen Ca²⁺-ATPase, und aktiviert somit denselben CRAC-Kanal wie TCR-Stimulation durch Antigen (Partiseti et al., 1994; Aussel et al., 1996). CD95-Stimulation veränderte nicht den Füllungsgrad intrazellulärer Speicher gemessen als Menge an Ca²⁺, die nach TG-Applikation freigesetzt wird (nicht gezeigt). Dies bedeutet zusammenfassend, dass CD95-Stimulation den Füllungsstand des endoplasmatischen Ca²⁺-Speichers nicht verändert, den TG-induzierten Ca²⁺-Einstrom hemmt und EGTA-aktivierte Ca²⁺-Ströme blockiert. Diese Beobachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass CD95 zwischen endoplasmatischen Ca²⁺-Speichern und speichergesteuerten Ca²⁺-Kanälen eingreift.

CD95-induzierte Anergie kann zusätzlich zu der hier diskutierten Immunevasion von Tumoren eine Reihe von Immunfunktionen beeinflussen. Da CD95L und CD95 wichtig für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz sind, könnte die CD95-induzierbare Anergie einen wichtigen Mechanismus für die Vermeidung einer Immunantwort gegen Selbstantigen darstellen. Ausserdem kann vermutet werden, dass CD95 mit zytotoxischen T-Zellen interferiert, weil deren Effektorfunktion zum Teil Ca^{2+} -abhängig ist. Zusätzlich zu der Immunevasion von Tumoren durch T-Zellanergie könnte also eine Reihe von Immunfunktionen durch CD95-induzierte Hemmung von Ca^{2+} -Signalen beeinflusst werden.

5 Zusammenfassung

Ca^{2+} -Signale in T-Lymphozyten regulieren eine Reihe von fundamentalen Zellfunktionen. Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration und damit auch Aktivitätsänderungen von Ionenkanälen spielen eine bedeutende Rolle und sind kennzeichnend für zelluläre Prozesse wie Proliferation und Apoptose.

In der vorliegenden Arbeit werden mehrere Mechanismen zur intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung und damit zur T-Zellaktivierung beschrieben.

Der Zelloberflächen-TCR/CD3-Komplex kann wie hier dargestellt durch Anti-CD3, einem monoklonalen Antikörper, aktiviert werden. Auch PHA löst unspezifisch gebunden an den TCR eine Reaktion aus, die zur T-Zellaktivierung führt. Als drittes auslösendes Agens wurde Thapsigargin verwendet, ein Sequesterpenlacton, das irreversibel an die endoplasmatische Ca^{2+} -Pumpe (SERCA-ATPase) bindet, diese blockiert und dadurch die Aufnahme von Ca^{2+} in das ER verhindert. Mittels fluoreszenzmikroskopischen Methoden wurde die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in humanen peripheren Lymphozyten und der T-Zellymphomlinie Jurkat bestimmt.

Die hier durchgeführten Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ergaben, dass Stimulation mit Anti-CD3, PHA und Thapsigargin jeweils eine anhaltende erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration zur Folge hat. Daraus resultiert die T-Zellproliferation. Somit konnte gezeigt werden, dass verschiedene Agenzien in der Lage sind, T-Zellen zu stimulieren.

Dies wiederum war als Voraussetzung für die folgenden Experimente wichtig:

In vorhergehenden Studien hat sich herausgestellt, dass in aktivierten T-Zellen rafts in der Plasmamembran vorhanden sind, was vermutlich zur schnelleren und effektiveren Signaltransduktion beiträgt. In naiven T-Zellen konnten rafts nur intrazellulär gefunden werden. In dieser Arbeit konnte mittels verschiedenen Anfärbemethoden in live-Kameraaufnahmen gezeigt werden, dass der TCR in

dem raft vorhanden ist. Auf jeder T-Zellmembran befand sich erstaunlicherweise nur ein deutlich anfärbter cluster.

Die Frage nach dem Vorhandensein des CRAC-Kanals in rafts konnte indirekt beantwortet werden. Es konnte dargestellt werden, dass FM1-43, der Farbstoff, der rafts anfärbt, den I_{CRAC} blockiert. Die aktivierten T-Zellen reagierten nach Zugabe von FM1-43 und Anbieten von extrazellulären Calciums direkt am raft mit keiner Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Dies beweist, dass FM1-43 den CRAC-Kanal blockiert und dieser in den rafts vorhanden sein muß. Aufgrund fehlender Identifizierung des CRAC-Proteins und mangelnder Antikörper kann ein direkter Beweis noch nicht durchgeführt werden.

Der dritte Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Reaktion der $[Ca^{2+}]_i$ nach CD95-Rezeptor Stimulation. Neben der für die Begrenzung der Immunreaktion wichtigen Induktion von Apoptose wird durch Stimulation des CD95-Rezeptors ein anhaltender Block des kapazitativen Calciumeinstromes ausgelöst. Eine Reduktion der IL-2-Synthese in aktivierten T-Zellen ist die Folge.

Das Absinken der IL-2 Konzentration führt in letzter Konsequenz zum Stop der T-Zellproliferation und damit zum Abbruch der Immunantwort. Diesen Vorgang, Abschalten kultivierter T-Lymphozyten ohne sie apoptotisch zu deletieren, bezeichnet man als Anergie.

6 Abkürzungen

Anti-CD 3	Antikörper gegen CD3-Komplex von T-Zellen
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ASM	Saure Sphingomyelinase
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	B1,2,-bis(2-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacetat
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD95	Fas/Apo-1-Rezeptor der TNF-Rezeptorsuperfamilie
CD95L	CD95-Ligand
CRAC channel	kapazitiver Calcium-Kanal (Ca ²⁺ release activated Ca ²⁺ channel)
CsA	Cyclosporin A
DAG	Diacylglycerol
DBHQ	Di-tert-butylhydroquinon
DIG	detergent insoluble glycolipid
DISC	death inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence-activated death domain

FADD	Fas-associated death domain
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLICE	FADD-like ICE
gld	generalized lymphoproliferative disease
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure])
I _{CRAC}	Ca ²⁺ -Einstrom durch CRAC
IL	Interleukin
IP ₃	Inositoltrisphosphat
lpr	lymphoproliferation
K _D	Dissoziationskonstante
MHC	major histocompatibility complex
NFAT	Nuclear factor activated T cells
NGF	Nerve Groth Factor
PHA	Phytohämagglutinin
PIP ₂	Phosphatidylinositoldiphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase γ
PMA	Phorbolmyristat-acetat
PTK	Protein-Tyrosinkinase
SOC	store operated current
TCR	T-Zell-Rezeptor
TG	Thapsigargin

TNF Tumornekrosefaktor

TRAIL TNF-related apoptosis inducing ligand

7 Literaturverzeichnis

Albert, P.R. and A.H. Tashjian Jr. (1986) Ionomycin acts as an ionophore to release TRH-regulated Ca^{2+} stores from GH4C1 cells. *Am J Physiol.* 251:C887.

Anderson, R.G.W. (1993): Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90:10909-10913.

Anderson, R.G. and Jacobson, K (2002). A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296(5574):1821-5.

Aussel, C., R. Marhaba, C. Pelassy and J.P. Breitmayer (1996). Submicromolar La^{3+} concentrations block the calcium release activated channel, and impair CD69 and CD25 expression in CD3- or thapsigargin-activated Jurkat cells. *Biochem J* 313:909-913.

Bamezai, A., Goldmacher, V.S. and K.L. Rock (1992). Internalization of glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchored lymphocyte proteins. II. GPI-anchored and transmembrane molecules internalize through distinct pathways. *Eur. J. Immunol.* 22:15-21.

Bellgrau, D., Gold, D., Selawry, H., Moore, J., Franzusoff, A. and R.C. Duke (1995). A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377:630.

Belloc, F., P. Dumain, M.R. Boisseau, C. Jalloustre, J. Reiffers, P. Bernard and F. Lacombe (1994). A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry* 17(1):59-65.

Berridge, M.J. (1993). Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* 361:315-325.

Berridge, M. (1995). Capacitative Calcium Entry. *Biochem. J.* 312:1-11.

Berridge, M.J. (1998). Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Exp. Biol.* 200(Pt2):315-319.

Boggs, J.M. and K.M. Koshy (1994). Do the long fatty acid chains of sphingolipids interdigitate across the center of bilayer of shorter chain symmetric phospholipids? *Biochim. Biophys. Acta* 1189:233-241.

Boldin, M.P., T.M. Goncharov, Y.V. Goltsev and D. Wallach (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85:803-815.

Boldin, M.P., E.E. Varfolomeev, Z. Pancer, I.L. Mett, J.H. Camonis and D. Wallach (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem* 270:7795-7798.

Boniface, J.J., Rabinowitz, J.D., Wülfing, C., Hampl, J., Reich, Z., Altan, J.D., Kantor, R.M., Beeson, C., Mc Connel, H. and Davis, M.M. (1998). Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands. *Immunity* 9:459-466.

Bootman, M.D. and M.J. Berridge (1995). The elemental principles of calcium signalling. *Cell* 83:675.

Bourguignon, L.Y.W. and Bourguignon, G.J. (1984). Capping and the cytoskeleton. *Int. Rev. Cytol.* 87:195-224.

Bossu, P., Singer G.G., Andres, P., Ettinger, R., Marshak-Rothstein A. and A.K. Abbas (1993). Mature CD4+ T lymphocytes from MRL/lpr mice are resistant to receptor-mediated tolerance and apoptosis. *J Immunol.* 151:7233.

Boussiotis, V.A., Freeman, G.J., Berezovskaya, A., Barber, D.L. and L.M. Nadler (1997). Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science* 271:124.

Boyd, J.M., S. Malstrom, T. Subramanian, L.K. Venkatesh, U. Schaeper, B. Elangovan, C. D'Sa-Eipper and G. Chinnadurai (1994). Adenovirus E1B 19kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell* 79: 341.

Brdicka, T., Cerny, J. and V. Horejsi (1998). T cell receptor signalling results in rapid tyrosine phosphorylation of the linker protein LAT present in detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248:356-60.

Breitmayer, JP., Berthe, P., Cousin, JL., Bernard, A. and C Aussel (1993). CD3 monoclonal antibodies evoke the same cytochrome P450-regulated Capacitative entry of calcium as thapsigargin in Jurkat T cells. *Cell Immunol.*152:143-52.

Brooks, W.H., Netsky M.G., Normansell, D.E. and D.A. Horwitz (1972). Depressed cell-mediated immunity in patients with primary intracranial tumors. *Characterization of a humoral immunosuppressive factor J Exp Med.* 136:1631.

Broome, H.E., Dargan, C.M., Brunner, T. and D.M. Sansom (1998). Sensitivity of S49.1 cells to anti-CD95 (Fas/APO-1)-induced apoptosis: effects of CD95, bcl- or bcl-x transduction. *Cell Death Diff.* 5:200.

Brown, D.A. and E. London (1998). Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr. Biol.* 164:103-114.

Brown, D. and J. Rose (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68:533-544.

Brunner, T., R.J. Mogil, D. LaFace, N.J. Yoo, A. Mahboubi, F. Echeverri, S.J. Martin, W.R. Force, D.H. Lynch, C.F. Ware and et al. (1995). Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 373:441-444.

Cambier, J.C. (1992). Signal transduction by T- and B-cell antigen receptors: converging structures and concepts. *Curr. Opin. Immunol.* 4:257.

Casey, P.J. (1995). Protein lipidation in cell signalling. *Science* 268:221-225.

Cherukuri, A., Dykstra, M. and S.K. Pierce (2001). Floating the raft hypothesis: lipid rafts play a role in immune cell activation. *Immunity* 14:657-60.

Chinnaiyan, A.M., K. O'Rourke, M. Tewari and V.M. Dixit (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81:505-512.

Chung, S.C., T.V. McDonald, and P. Gardener (1994). Inhibition by SK&F 96365 of Ca²⁺ current, IL-2 production and activation in T lymphocytes. *Br J Pharmacol.* 113:861-868.

Cinak, T. and V. Horejsi (1992). The nature of large noncovalent complexes containing glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane glycoproteins and protein tyrosine kinases. *J Immunol.* 149:2262-2270.

Coligan, J., A. Kruisbeek, D. Margulies, E. Shevach and W. Strober (1995). Current Protocols in Immunology. *John Wiley & Sons, Inc., USA*:5.5.1-5.5.21.

Cosman, D. (1994). A family of ligands for the TNF receptor superfamily. *Stem Cells* 12:440.

Crabtree, G.R. (1989). Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* 243:355-361.

Crabtree, G.R. (1999). Generic signals and specific outcomes: signalling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell* 96(5):611-614.

Crabtree, G.R. and N.A. Clipstone (1994). Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu. Rev. Biochem.* 63:1045-1083.

Croft, M. (1994). Activation of naïve, memory and effector T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 6:431-437.

Danielsen, E.M. and B. van Deurs (1995). Involvement of detergent-insoluble complexes in the intracellular transport of intestinal brush border enzymes. *J Cell Biol.* 131:939-950.

Debatin, K.M., A. Fahrig-Faissner, S. Enekel-Stoodt, W. Kreuz, A. Benner and P.H. Krammer (1994): High expression of APO-1(CD95) on T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1-infected children. *Blood* 83:3101.

Deckert, M., Ticchioni, M. and A. Bernard (1996). Endocytosis of GPI-anchored proteins in human T lymphocytes: role of glycolipid-based domains, actin cytoskeleton, and protein kinases. *J. Cell Biol.* 133:791-99.

DeFranco, A.L. (1987). Molecular aspects of B-lymphocyte activation. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 3:143-178.

DeFranco, A.L. (1993). Signaling pathways activated by protein tyrosine phosphorylation in lymphocytes. *Curr. Opin. In Immunol.* 6:364

Dhein, J., Walczak, H., Bäumler, C., Debatin, K.M. and P.H. Krammer (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1(Fas/CD95). *Nature* 373:438.

Dive, C., C.D. Gregory, D.J. Phipps, D.L. Evans, A.E. Milner and A.H. Wyllie (1992). Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim. Biophys. Acta* 1133(3):275-285.

Dobrowsky, R.T., C. Kamibayashi, M.C. Mumby and Y.A. Hannun (1993). Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* 268:15523-15530.

Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., Goodnow, C.C. and J.I. Healy (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 386:855.

Drake III, D.R. and T.J. Braciale (2001). Lipid raft integrity affects the efficiency of MHC class I tetramer binding and cell surface TCR arrangement on CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 166:7009-13.

Drappa, J., Vaishnav, A.K., Sullivan, K.E., Chu, J.L. and K.B. Elkon (1996). Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative syndrome associated with autoimmunity. *N. Engl. J. Med.* 335:1643.

Dudel, J. (1997). Grundlagen der Zellphysiologie. In Physiologie des Menschen, R.F. Schmidt und G. Thews, eds.: Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 3-19.

Dupree, P., Parton, R.G., Raposo, G., Kurzchalia, T.V. and K. Simons (1993). Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J* 12:1597-1605.

Dustin, M.L. and A.C. Chan (2000). Signaling takes shape in the immune system. *Cel* 103:283-294.

Eischen, C.M., C.J. Dick and P.J. Leibson (1994). Tyrosine kinase activation provides an early and requisite signal for Fas-induced apoptosis. *J. Immunol.* 153:1947-1954.

Elliott, L.H. W.H. Brooks and T.L. Roszman (1984). Cytokinetic basis for the impaired activation of lymphocytes from patients with primary intracranial tumors. *J Immunol.* 132:1208.

Fanger, S., A. Zweifach, R. Dolmetsch, M. Hoth and R. Lewis (1997). Function Follows Form: The Role of Store-Operated Calcium Channels in T-Cell Activation. *Cell. Physiol. Biochem.* 7:203-218.

Fasolato, C., M. Hoth and R. Penner (1993). Multiple mechanisms of manganese-induced quenching of fura-2 fluorescence in rat mast cells. *Pflügers Arch.* 423:225-231.

Flanagan, W.M., B. Corthesy, R.J. Bram, G.R. Crabtree (1991). Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 352:803-807.

Fomina, A.F., Fanger, C.M., Kozak, J.A. and Cahalan, M.D. (2000). Single channel properties and regulated expression of Ca²⁺ release activated Ca²⁺ (CRAC) channels in human T cells. *J Cell Biol.* 150:1435-1444.

Fra, A.M., Williamson, E., Simons, K. and R.G. Parton (1994). Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *J Biol. Chem.* 269:30745-30748.

French, L.E., M. Hahne, I. Vivard, G. Radlgruber, R. Zanone, K. Becker, C. Muller and J. Tscopp (1996). Fas and Fas ligand in embryos and adult mice: ligand expression in several immune-privileged tissues and coexpression in adult tissues characterized by apoptotic cell turnover. *Cell Biol.* 133:335-343.

Frey, T. (1995). Nucleic acid dyes for detection of apoptosis in live cells. *Cytometry* 21(3):265-274.

Gagescu, R., Demaureux, N., Parton, R.G., Hunziker, W., Huber, L.A. and J. Gruenberg (2000). The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components. *Mol. Biol. Cell* 11:2775-2791.

Galle, P.R., W.J. Hofmann, H. Walczak, H. Schaller, G.Otto, W. Stremmel, P.H. Krammer and L. Runkel (1995). Involvement of the Cd95 (Apo-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *Exp. Med.* 182:1223.

Germain, R.N. (1997). T-cell signalling: The importance of receptor cluster. *Current Biology* 7: R640-644

Gouy, H., Cefai, D., Christensen, SB., Debre, P. and G. Bismuth (1990). Ca²⁺ influx in human T lymphocytes is induced independently of inositol phosphate production by mobilization of intracellular Ca²⁺ stores. A study with the Ca²⁺ endoplasmatic reticulum-ATPase inhibitor thapsigargin. *Eur J Immunol.* 20 :2269-75.

Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M. and M.L. Dustin (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285:221-227.

Graziadei, L., Riabowol, K. and Bar-Sagi, D. (1990). Co-capping of ras proteins with surface immunoglobulins in B lymphocytes. *Nature* 34: 396-400.

Griffith, T.S., T. Brunner, S.M. Fletcher, D.R. Green and T.A. Ferguson (1995). Fas ligand-induces apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270:1189-1192.

Griffith, T.S., X.Yu, .M Herndon, D.R. Green and T.A. Ferguson (1996). CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity* 5:7-16.

Grissmer, S. R.S. Lewis and M.D. Cahalan (1992). Ca⁺-activated K⁺ channels in human leukemic T cells. *J Gen Physiol* 99:63-84.

Grynkiewicz, G., M. Poenie and R.Y. Tsien (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol. Chem.* 260:3440-3450.

Gulbins, E., R. Bissonnette, A. Mahboubi, S. Martin, W. Nishioka, T. Brunner, G. Baier, G. Baier-Bitterlich, C. Byrd, F. Lang et al. (1995). Fas-induced apoptosis is mediated via a ceramide-initiated RAS signalling pathway. *Immunity* 2:341-351.

Gulbins, E., Schlottmann, K., Brenner, B., Linderkamp, O., Lang, F. and K.M. Coggeshall (1995). Molecular analysis of Ras activation by tyrosine phosphorylated Vav. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 217:876.

Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L.E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J. and J. Tschopp (1996). Melanoma cell expression of Fas(APO-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274:1363.

Hanada, K., Nishijima, M., Akamatsu, Y. And Pagano, R.E. (1995). Both sphingolipids and cholesterol participate in the detergent-insolubility of alkaline phosphatase, a glycosyl-phosphatidylinositol anchored protein in mammalian cells. *J Biol. Chem.* 270:6254-6260.

Hannan, L.A. and Edidin, M. (1996). Glycosylphosphatidylinositol-anchored protein after LDL-deprivation of MDCK cells. *J Cell Biol.* 133:1265-1276.

Harder, T. and K. Simons (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:534-542.

Haverstick D., Sakai H. and Gray L. S. (1992). Lymphocyte adhesion can be regulated by cytoskeleton-associated, PMA-induced capping of surface receptors. *Am. J. Physiol.* 262: C916-C926.

Haverstick, D.M. and Gray L.S. (1992). Lymphocyte adhesion mediated by lymphocyte function-associated antigen-1. II. Interaction between phorbol ester- and cAMP-sensitive pathways. *J. Immunol.* 149:397-402.

Healy, J.I., Dolmetsch, R.E., Timmerman, L.A., Cyster, J.G., Thomas, M.L., Crabtree, G.R., Lewis, R.S. and C.C. Goodnow (1997). Different nuclear signals

are activated by the B cell receptor during positive versus negative signalling. *Immunity* 6:419.

Henderson, S., D. Huen, M. Rowe, C. Dawson, G. Johnson and A. Rickinson (1993). Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8479.

Hille, B. (1992). Ionic channels of excitable membranes. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates Inc.: 127-135.

Hofer, A.M., C. Fasolato and T. Pozzan (1998). Capacitative Ca^{2+} Entry Is Closely Linked to the Filling State of Internal Ca^{2+} Stores: A Study Using Simultaneous Measurements of I CRAC and Intraluminal $[Ca^{2+}]$. *J cell bio* 140:325-334.

Hope, H.R. and L. J. Pike (1996). Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. *Mol. Biol. Cell* 7:843-851.

Hoth, M. (1995). Calcium and barium permeation through calcium release-activated calcium (CRAC) channels. *Pflugers Arch* 430:315-322.

Hoth, M. and R. Penner (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355:353-356.

Hoth, M. and R. Penner (1993). Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol* 465:359-386.

Hsu, H., J. Xiong and D.V. Goeddel (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81:495-504.

Hueber, A.O., Bernard, A.M., Herines, Z., Couzinet, A. and H.T. He (2002). An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes. *EMBO* 2:190-196.

Hunt, J.S., D. Vassmer, T.A. Ferguson and L. Miller (1997). Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. *Immunol.* 158:4122-4128.

Huwiler, A., J. Brunner, R. Hummel, M. Vervoordeldonk, S. Stabel, H. van den Bosch and J., P. (1996). Ceramide-binding and activation defines protein kinase c-Raf as a ceramide-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci* 93:6959-6963.

Iezzi, G., Karjalainen, K. and A. Lanzavecchia (1998). The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8:89-95.

Immunobiology: The Immune System in Health and Disease (2001). Charles A., Jr. Janeway et al., Garland Publishing, ISBN 081533642X, 5. Auflage.

Irvine, RF (1990). Quantal Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry by Inositol phosphates- a possible mechanism. *FEBS Lett.* 263:5-9.

Itoh, N. and S. Nagata (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.* 268:10932-10937.

Janes, P.W., Ley, S.C. and A.I. Magee (1999). Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J. Cell Biol.* 147:447-461.

Janeway, C. and P. Travers (1997). Immunology-The Immune System in Health and Disease. Garland Publishing Inc., New York, USA.

Jenner, S., R.W. Farndale and S.O. Sage (1994). The effect of calcium-store depletion and refilling with various bivalent cations on tyrosine phosphorylation and Mn²⁺ entry in fura-2 loaded human platelets. *Biochem J* 303:337-9.

Ju, S.T., Cui, H., Panka, D.J., Ettinger, R. and A. Marshak-Rothstein (1994). Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4⁺ Th1 and CD8⁺ cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4185-4189.

Justement, L.B., K.S. Campbell, N.C. Chin and J.C. Cambier (1991). Regulation of B cell antigen receptor signal transduction and phosphorylation by CD45. *Science* 252:1839.

.

Kabouridis, P.D., Magee, A.L. and S.C. Ley (1997). S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for signaling function in T lymphocytes. *EMBO J* 16:4983-4998.

Kane, L.P., Lin, J. and A. Weiss (2000). Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.* 12:242-49.

Kerschbaum, H.H. and M.D. Cahalan (1998). Monovalent permeability, rectification, and ionic block of store-operated calcium channels in Jurkat T lymphocytes. *J Gen Physiol* 111:521-537.

Kischkel, F.C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P.H. Krammer and M. E. Peter (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *J. EMBO* 14:5579-5588.

Klas, C., Debatin, K.M., Jonker, R.R. and P.H. Krammer (1993). Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int. Immunol.* 5:625.

Kobayashi, N., Y. Hamamoto, N. Yamamoto, A. Ishii, M. Yonehara and S. Yonehara (1990). Anti-Fas monoclonal antibody is cytotoxic to human immunodeficiency virus-infected cells without augmenting viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9620

Kovacs, B. and G.C. Tsokos (1995). Cross-linking of the Fas/APO-1 antigen suppresses the CD3-mediated signal transduction events in human T lymphocytes. *J Immunol.* 155:5543-5549.

Kosugi, A., Saitoh, S., oda, S., Yasuda, K., Hayashi, F., Ogata, M. and T. Hamoka (1999). Translocation of tyrosine-phosphorylated TCR chain to glycolipid-enriched membrane domains upon T cell activation. *Int. Immunol.* 11:1395-1401.

Kundu, A., Avalos, R.T., Sanderson, C.M. and D.P. Nayak (1996). Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J Virol.* 70: 6508-6515.

Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T. Lo, C.G., Benmerah, A. and A. Dautry-Varsat (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol. Cell* 7:661-71.

Langlet, C., Bernard, A.M., Drevot, P. and H.T. He (2000). Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 12:250-55.

Lanzavecchia, A., Iezzi, G. and A. Viola (1999). From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell* 96:1-4.

Lepple-Wienhues, A., Belka, C., Laun, T., Walter, B., Wieland, U., Welz, M., Heil, L., Kun, J., Bosch, G., Weller, M., Bamberg, M., Gulbins, E. and F. Lang (1999). Stimulation of CD95 (Fas) blocks T lymphocyte calcium channel through sphingomyelinase and sphingolipids. *PNAS* 96:13795-800.

Lepple-Wienhus, A. and M.D. Cahalan (1996). Conductance and permeation of monovalent cations through depletion-activated Ca^{2+} channels (ICRAC) in Jurkat T cells. *Biophys J* 71:787-794.

Leo, A. and B. Schraven (2001). Adapters in lymphocyte signalling. *Curr. Opin. Immunol.* 13:307-16.

Lewis, R.S. (1999). Store-operated calcium channels. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 33:279-307.

Lewis, R.S. and M.D. Cahalan (1990). Ion channels and signal transduction in lymphocytes. *Annu Rev Physiol* 52:415-430.

Lewis, R.S. and M.D. Cahalan (1995). Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 13 :623-653.

Li, H. H. Zhu, C.J. Xu and J. Yuan (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.

Lin, J., Weiss, A. and T.S. Finco (1999). Localization of LAT in glycolipid-enriched microdomains is required for T cell activation. *J. Biol. Chem.* 274:28861-64.

Lin, J. and A. Weiss (2000). T cell receptor signalling. *J. Cell Sci.* 114:243-44.

Lisanti, M.P., Sargiacomo, M., Graeve, L., Saltiel, A. and E. Rodriguez-Boulan (1989). Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85:9557-9561.

Liu, J., J.D. Farmer Jr., W.S. Lane, J. Friedman, I. Weissman and S.L. Schreiber (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66:807-815.

Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter and X. Wang (1998). Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome C release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:484-490.

Martin, S.J. and D.R. Green (1995). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82:349-352.

Mayor, S., Rothberg, K.G. and F.R. Maxfield (1994). Sequestration of GPI-anchored proteins in caeolae triggered by cross-linking. *Science* 264:1948-1951.

Monks, C.R.F., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N. and A. Kupfer (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395:82-86.

Montixi, C., Langlet, C., Bernard, A.-M., Thimonier, J., Dubois, C., Wurbel, M.A., Chauvin, J.P., Pierres, M. and H.T. He (1998). Engagement of T cell receptors triggers its recruitment to low density detergent-insoluble membran domains. *EMBO J.* 17:5334-48.

Morford, L.A., L.H. Elliott, S.L. Carlson, W.H. Brooks and T.L. Roszman (1997). T cell receptor-mediated signalling is defective in T cells obtained from patients with primary intracranial tumors. *Immunol.* 159:4415:4425.

Muller, G.,M. Ayoub, P. Storz, J. Rennecke, D. Fabbro and K. Pfizenmaier (1995). PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *J EMBO* 14:1961-1969.

Mustelin, T., K.M. Coggeshall, N. Isakov and A. Altman (1990). T-cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C requires tyrosine phosphorylation. *Science* 247:1584.

Nagata, S. and P. Golstein (1995). The Fas death factor. *Science* 267:1449-1456.

Negluescu, P.A., N. Shastri and M.D. Cahalan (1994). Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2873-2877.

Natoli, G., Constanzo, A., Guido, F., Moretti, F. and Levrero, M. (1998). Apoptotic, non apoptotic and antiapoptotic of tumor necrosis factor signalling. *Biochem. Pharmacol.* 56:915-920.

Neilan, J.G., Z. Lu, C.L. Afonso, G.F. Kutish, M.D. Sussman and D.L. Rock (1993). An African swine fever virus gene with similarity to the proto-oncogene bcl-2 and the Epstein-Barr virus gene BHRF1. *Virology* 67:4391.

Negulescu, P.A., Shastri, N. and M.D., C. (1994). Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:2873-77.

Newton, K., Harris, A.W., Bath, M.L., Smith, K.G.C. and A. Strasser (1998). A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *Embo J.* 17:706.

Nichols, B.J., Kenworthy, A.K., Polishchuk, R.S., Lodge, R. Roberts, T.H., Hirschberg, K., Phair, R.D. and J. Lippincott-Schwartz (2001). Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J. Cell Biol.* 153:529-541.

Novak, E.J. and P.S. Rabinovitch (1994). Improved sensitivity in flow cytometric intracellular ionised calcium measurement using fluo-3/fura red fluorescence ratios. *Cytometry* 17:135-141.

Ogasawara, J., R. Watanabe-Fukunaga, M. Adachi, A. Matsuzawa, T. Kasugai, Y. Kitamura, N. Itoh, T. Suda and S. Nagata (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364:806.

O'Hehir, R.E., Yssel, H., Verma, S., de-Vries, J.E., Spits, H. and J.R. Lamb (1991). Clonal analysis of differential lymphokine production in peptide and superantigen induced T cell anergy. *Int. Immunol.* 3: 819.

Parekh, A.B. and R. Penner (1995). Depletion-activated calcium current is inhibited by protein kinase in RBL-2H3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7907-7911.

Parekh, A.B. and R. Penner (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 77:901-930.

Parpal, S., J. Gustavsson and P. Stralfors (1995). Isolation of phosphooligosaccharide/phosphoinositol glycan from caveolae and cytosol of insulin-stimulated cells. *J Cell Biol.* 131:125-135.

Partiseti, M., Le Diest, F., Hivroz, C., Fischer, A., Korn, H. and D. Choquet (1994). The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in primary immunodeficiency. *J Biol. Chem.* 51:32327.

Parton, R.G. and K. Simons (1995). Digging into caveolae. *Science* 269:1398-1399.

Pavan A., Lucania G., Sansolini T., Frati L. and Torrisis M.R. (1992). Patching and capping of LFA-1 molecules on human lymphocytes. *Histochemistry* 98: 253-258.

Peter, M.K.F.C., C.G. Scheuerpflug, J.P. Medema, K.M. Debatin and P.H. Krammer (1997). Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signalling complex. *Eur. J. Immunol.* 27:1207-1212.

Ponton, A., M.V. Clement and I. Stamenkovic (1996). The CD95 (APO-1/Fas) receptor activates NF-kappaB independently of its cytotoxic function. *J. Biol. Chem.* 271:8991-8995.

Premack, B.A., T.V. McDonald and P. Gardner (1994). Activation of Ca²⁺ current in Jurkat T cells following the depletion of Ca²⁺ stores by microsomal Ca²⁺-ATPase inhibitors. *J Immunol.* 152: 5226-5240.

Puertollano, R., Matinez-Menarguez, J.A., Batista, A., Ballesta, J. and M.A. Alonso (2001). An intact dilysine-like motif in the carboxyl terminus of MAL is required for normal apical transport of the influenza virus hemagglutinin cargo protein in epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Biol. Cell* 12:1869-1883.

Putney, J.W. (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11:611-624.

Putney, J.W. and G.S. Bird (1993). The signal for capacitative calcium entry. *Cell* 75(2):199-201.

Putney, J.W. and R.R. McKay (1999). Capacitative calcium entry channels. *Bioessays*. 21(1):38-46.

Qian, D. and A. Weiss (1997). T cell antigen receptor signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:205.

Randriamampita, C. and R.Y. Tsien (1993). Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx *Nature* 364:809-814.

Rao, A., Luo, C. and Hogan, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 15 :707-747.

Ray, C.A., R.A. Black, S.R. Kronheim, T.A. Greenstreet, P.R. Sleath, G.S. Salvesen and D.J. Pickup (1992). Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 69:597.

Resh, .D. (1994). Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* 76:411-413.

Rodrigues-Boulan, E. and W.J. Nelson (1989). Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* 245:718-725.

Roitt, I., J. Borstoff and D. Male (1995). Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland.

Roszman, T.L., Brooks, W.H., Steele, C. and L.H. Elliott (1985). Pokeweed mitogen-induces immunoglobulin secretion by peripheral blood lymphocytes from patients with primary intracranial tumors. *Characterization of T helper and B cell function J Immunol.* 134:1545.

Ruscetti, F.W., D.A. Morgan and R.C. Gallo (1977). Functional and morphologic characterization of human T cells continuously grown in vitro. *J Immunol.* 119(1):131-138.

Sakman, B. and E. Neher (1984). Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol* 46:455-472.

Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z. and M.P. Lisanti (1993). Signal transducing molecules and GPI-linked proteins from a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol.* 122:789-807.

Sarkadi, B., A. Tordai, L. Homolya, O. Scharff and G. Gardos (1991). Calcium influx and intracellular calcium release in anti-CD3 antibody-stimulated and thapsigargin-treated human T lymphoblasts. *J Membr Biol.* 123:9-21.

Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K.J. Tomaselli, K.M. Debatin, P.H. Krammer and M.E. Peter (1998). Two CD95 (APO1/Fas) signalling pathways. *The EMBO Journal* 17:1675-1687.

Scheel-Toellner, D., Wang, K., Singh, R., Majeed, S., Raza, K., Curnow, S.J., Salmon, M. and J.M. Lord (2002). The death-inducing signalling complex is recruited to lipid rafts in Fas-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 297:876-879.

Schroeder, R., E. London and D. Brown (1994). Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91:12130-12134.

Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg and M.E. Peter (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem.* 254:439-459.

Schwartz, R.H. (1996). Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism. *Exp. Med.* 184:1-8.

Shaw, J.P., P.J. Utz, D.B. Durand, J.J. Toole, E.A. Emmel and G.R. Crabtree (1988). Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 241:202-205.

Simons, K. and E. Ikonen (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.

Singer, G.G. and A.K. Abbas (1994). The Fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1:365.

Skibbens, J.E., Roth, M.G. and K.S. Matlin (1989). Differential extractibility of influenza virus hemagglutinin during intracellular transport in polarized epithelial cells and nonpolar fibroblasts. *J Cell Biol.* 108:821-832.

Sneller, M.C., Wang, J., Dale, J.K., Strober, W., Middleton, L.A., Choi, Y., Fleisher, T.A., Lim, M.S., Jaffe, E.S., Puck, J.M., Lenardo, M.J. and S.E. Strauss (1997). Clinical, immunologic and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Blood* 89:1341.

Snow, E.C., Noelle, R.J., Uhr, J.W. and Vitetta, E.S. (1983). Activation of antigen-enriched B cells. II. Role of linked recognition in B cell proliferation to thymus-dependent antigens. *J. Immunol.* 130:614-618.

Staveley-O'Carroll, K., E. Sotomayor, J. Montgomery, I. Borrello, L. Hwang, S. Fein, D. Prdöll and H. Levitsky (1998). Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:1178-1183.

Stefanova, I., Horejsi, V., Ansotegui, I.J., Knapp, W. and H. Stockinger (1991). GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. *Science* 254:1016-1019.

Stingl LA, Sinska A, Landesmann U and Smolen JS (1987). Induction of interleukin 2 receptiveness and proliferation in resting peripheral T cells by monoclonal anti-CD3 (T3) antibodies does not require the presence of macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 68(1):146-55.

Strand, S., Hofmann, W.J., Hug, H., Müller, M., Otto, G., Strand, D., Mariani, S.M., Stremmel, W., Krammer, P.H. and P.R. Galle (1996). Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells—a mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* 2:1361.

Stulnig, T.M., Berger, M., Sigmund, T., Stockinger, H., Horejsi, V. and W. Waldhausl (1997). Signal transduction via glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins in T cells is inhibited by lowering cellular cholesterol. *J Biol. Chem.* 272:19242-19247.

Surh, C.D. and J. Sprent (1994). T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372:100-103.

Sytwu, H.K., Liblau, R.S. and H.O. McDevitt (1996). The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 5:17.

Szabo, I., E. Gulbins, H. Apfel, X. Zhang, P. Barth, A.E. Busch, K. Schlottmann, O. Pongs and F. Lang (1996). Tyrosine phosphorylation-dependent suppression of a voltage-gated K⁺ channel in T lymphocytes upon Fas stimulation. *J. Biol. Chem.* 271:20465-20469.

Tartaglia, L.A., M. Rothe, Y.F. Hu and D.V. Goeddel (1993). Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signalled by the p55 TNF receptor. *Cell* 73:213-216.

Thastrup, O., A.P. Dawson, O. Scharff, B. Foder, P.J. Cullen, B.K. Drobak, P.J. Bjerrum, S.B. Christensen and M.R. Hanley (1989). Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions* 27:17-23.

Thastrup, O., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Hanley, M.R and Dawson, A.P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2466-70.

Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462.

Timmerman, L.A., N.A. Clipstone, S.N. Ho, J.P. Northrop and G.R. Crabtree (1996). Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression. *Nature* 383(6603):837-840.

Tinel, H., F. Wehner and H. Sauer (1994). Intracellular Ca²⁺ release and Ca²⁺ influx during regulatory volume decrease in IMCD cells. *Am J Physiol.* 267(1 Pt 2):F130-138.

Tuosto, L., Parolini, I., Schröder, S., Sargiacomo, M., Lanzavecchia, A. and A. Viola (2001). Organization of plasma membrane functional rafts upon T cell activation. *Eur J Immunol.* 31:345-349.

Valitutti, S., Dessing, M., Aktories, K., Gallati, H. and A. Lanzavecchia (1995). Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J. Exp. Med.* 181:577-84.

Van Meer, G. (1989). Lipid traffic in animal cells. *Annu Rev. Cell Biol.* 5:247-275.

Van Parijs, L., Ibraghimov, A. and A.K. Abbas (1996). The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity* 4:321.

Van Parijs, L. and A.K. Abbas (1998). Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280, 243-247.

Vaux, D.L., G. Haecker and A. Strasser (1994). An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76:777-779.

Verheij, M., R. Bose, X.H. Lin, . Yao, W.D. Jarvis, S. Grant, M.J. Birrer, E. Szabo, L.I. Zon, J.M. Kyriakis, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks and R.N. Kolesnick (1996). Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380:75-79.

Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y. and A. Lanzavecchia (1999). T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* 283:680-82.

Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Itoh, N, Yonehara, S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and S. Nagata (1992). The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J. Immunol.* 148:1274.

Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, Jenkins, N.A. and S. Nagata (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356:314.

Weiss, A. and D.R. Littman (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76:263.

Weiss, A. and D.R. Littman (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76:263

Weller, M., Weinstock, C., Will, C., Wagenknecht, B., Dichgans, J., Lang, F. and E. Gulbins (1997). CD95-dependent T-cell killing by glioma cells expressing CD95 ligand: More on tumor immune escape, the CD95 counterattack, and the immune privilege of the brain. *Cell Physiol. Biochem.* 7:282.

Wotton, D., Higgins, J.A., O'Hehir, R.E., Lamb, J.R. and R.A. Lake (1995). Differential induction of the NF-AT complex during restimulation and the induction of T-cell anergy. *Hum. Immunol.* 42:95.

.

Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C. and B. Seed (1998). Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 8:723-32.

Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C.N. Kim, A.M. Ibrado, J. Cai, T.I. Peng, D.P. Jones and X. Wang (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275:1129-1132.

Yashiro-Ohtani, Y., Zhou, X.Y., Toyo-oka, K., Tai, X.G., Park, C.S., Hamaoka, T., Abe, R., Miyake, K. and H. Fujiwara (2000). Non-CD28 costimulatory molecules present in T cell rafts induce T cell costimulation by enhancing the association of TCR with rafts. *J. Immunol.* 164:1251-59.

Yuan, J., S. Shaham, S. Ledoux, H.M. Ellis and H.R. Horvitz (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75:641-625.

Zeytun, A., Hassuneh, M., Nagarkatti, M and P.S. Nagarkatti (1997). Fas-Fas ligand-based interactions between tumor cells and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes: a lethal two-way street. *Blood* 90:1952.

Zhang, J.K., Cado, D., Chen, A., Kabra, N.H. and A. Winoto (1998). Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 392:296.

Zhang, W., Tribble, R.P. and L.E. Samelson (1998). LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 9:239-46.

Zweifach, A (2000). FM1-43 reports plasma membrane phospholipid scrambling in T-lymphocytes. *Biochem J* 349(Pt 1): 255-60.

Zweifach, A. and R.S. Lewis (1993). Mitogen-regulated Ca^{2+} current of T-lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6295-6299.

Zweifach, A. and R.S. Lewis (1995). Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (I-crac) due to local calcium feedback. *J. Gen. Physiol.* 105:209-226.

8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn PD Dr. Albrecht Lepple-Wienhues am Physiologischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit wahrnehmen, all denjenigen zu danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Im Besonderen:

Herrn PD Dr. Albrecht Lepple-Wienhues für seine unermüdliche Bereitschaft, mich immer wieder neu zu motivieren, für den wissenschaftlichen Gedankenaustausch und die tolle kompetente wissenschaftliche Betreuung sowie für zahlreiche Ratschläge bei der Durchführung und Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Florian Lang danke ich für die freundliche Aufnahme im Team des Physiologischen Institutes I.

Meinen Laborkollegen Georg Dangel, Luzia Heil, Tilmann Laun, und Martina Welz danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, ihre wissenschaftliche und moralische Unterstützung, die gemeinsam durchlebten Hochs und Tiefs bei den üblichen Laborenten und ihren Humor auch außerhalb des Labors.

Bei allen Mitarbeitern/innen des Physiologischen Institutes bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung und die angenehme Zusammenarbeit, insbesondere Herrn Dr. Horst Apfel für seine Unterstützung, die zur Fertigstellung dieser Arbeit von besonderem Wert war.

Frau Dr. Eva-Lotta Bäßler und Frau Dr. Melanie Müller danke ich für die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit und ihre langjährige tolle Freundschaft.

Besonders danke ich meiner Mutter für den Rückhalt und die tolle Förderung während meines Werdeganges, sowie meinem Bruder für die technische und geschwisterliche Hilfe und Unterstützung.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Anja Regina Bialkowski
Geburtsdatum: 26. September 1976
Geburtsort: Stuttgart

Schulbildung:

1983-1987 Grundschole Sommerhofen, Sindelfingen
1987-1989 Lise-Meitner-Gymnasium, Böblingen
1989-1996 Albert-Einstein-Gymnasium, Böblingen
(bis 1992 Musikzug, dann Sprachzug)
1996 Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung:

1994/95 zwei-monatiges Pflegepraktikum am
Kreiskrankenhaus Sindelfingen
Ab 1996 Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-
Universität, Tübingen
09/1998 Physikum
09/1998 Famulatur am Olgahospital, Stuttgart (Pädiatrie)

1998-2000	Promotionsstudien am Physiologischen Institut der Universität Tübingen (PD Dr. Albrecht Lepple-Wienhus)
02-04/1999	Famulatur am Northern General Hospital, Sheffield, England (Nephrologie)
09/1999	Famulatur in der Allgemeinmedizin-Praxis von Fr. Dr. Wienhus, Tübingen
03/2000	1. Staatsexamen
08/2000	Famulatur an der Universitätskinderklinik, Tübingen
02-03/2001	Famulatur am St. Vincents Hospital, New York (emergency child care)
03-04/2000	Famulatur in der Medizinischen Klinik, Tübingen
09/2001	Famulatur in der Fachklinik für Physikalische und Rehabilitative Medizin, Lenggries
04/2002	2. Staatsexamen
ab 04/2002	Praktisches Jahr: Erstes Tertial Kantonsspital Basel, Schweiz (Chirurgie); Zweites Tertial Inselspital Bern, Schweiz und Universitätskinderklinik, Tübingen (Pädiatrie), Drittes Tertial Medizinische Klinik, Tübingen
22. Mai 2003	3. Staatsexamen
seit 10/2003	Ärztin im Praktikum an der Universitätskinderklinik, Tübingen (Abteilung II, Prof. Dr. M. Hofbeck)
seit 10/2004	Assistenzärztin an der Universitätskinderklinik, Tübingen (Abteilung II, Prof. Dr. M. Hofbeck)