

**Analyse subzellulärer Calcium-Signale und
Charakterisierung der Ryanodin-Rezeptor vermittelten Signale
in T-Lymphozyten und 3T3 Fibroblasten**

eingereicht von

Dipl. Ing. Biotechnologie Svenja Kunerth

geboren am 16. März 1975 in Bielefeld

an der Technischen Universität Berlin,
Fakultät III – Prozesswissenschaften,
Institut für Biotechnologie,
Fachgebiet Medizinische Biotechnologie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Ingenieurwissenschaften, Dr. Ing.

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ulf Stahl

Gutachter: Prof. Dr. Roland Lauster

Prof. Dr. Andreas H. Guse

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 26. März 2004

Berlin 2004

D 83

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Roland Lauster danke ich für die stets hilfsbereite Unterstützung dieser Arbeit sowie für die bereitwillige Übernahme des ersten Gutachtens seitens der Technischen Universität Berlin.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Andreas Guse für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung sämtlicher technischen und finanziellen Mittel, sowie die kompetenten und zahlreichen Anregungen. Bedanken möchte ich mich weiterhin für seine stete Diskussionsbereitschaft und die motivierende, engagierte Betreuung.

Desweiteren danke ich Prof. Dr. B. V. L. Potter von der University of Bath, England für die Bereitstellung des IP₃-Antagonisten und Prof. Dr. Li-He Zhang von der Peking University, China für die Überlassung des cADPR-Agonisten.

Herrn Prof. Dr. Antonio De Flora und Dr. Santina Bruzzone, Universität di Genova, Italien möchte ich für die außerordentlich gute, produktive und freundschaftliche Kooperation bei der Arbeit mit den 3T3 Fibroblasten danken.

Bei Herrn Prof. Dr. F. Koch-Nolte und seinem Arbeitskreis möchte ich mich für die freundliche Hilfe bei der Aufarbeitung der peripheren T-Zellen bedanken.

Bei meinen jetzigen und ehemaligen Kollegen Ariane Clausen, Ralf Fliegert, Andreas Gasser, Christine Goffinet, Matthias Langhorst, Nadine Schwarzmann und Karin Weber bedanke ich mich für die immerwährende Bereitschaft zur Diskussion über wissenschaftliche und experimentelle Probleme, die ausgesprochen hilfsbereite und nette Unterstützung und nicht zuletzt für das motivierende, ausgezeichnete Arbeitsklima.

Inhaltverzeichnis

Abkürzungen

| | |
|--|-----------|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Bedeutung der T-Lymphozyten im Immunsystem | 1 |
| 1.2 Signaltransduktion nach der Antigenerkennung | 2 |
| 1.3 Entstehung intrazellulärer Ca²⁺ Signale durch Second-Messenger | 3 |
| 1.3.1 D-myo-Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP ₃) | 4 |
| 1.3.2 Bildung von cADPR und NAADP durch ADP-Ribosylcyclasen | 6 |
| 1.3.3 cyclische ADP-Ribose (cADPR) | 7 |
| 1.3.4 Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotidphosphat (NAADP) | 9 |
| 1.3.5 Ca ²⁺ Einstrom-Mechanismen | 11 |
| 1.4 Räumliche und zeitliche Organisation der Ca²⁺ Signale | 13 |
| 1.4.1 Subzelluläre Ca ²⁺ Signale | 13 |
| 1.4.2 Amplifikation der subzellulären Ca ²⁺ Signale in Wellen | 18 |
| 1.4.3 Oszillationen und subzelluläre Signale in T-Zellen | 19 |
| 1.5 Mikroskopische Messmethoden | 20 |
| 1.5.1 Die Laser-basierte Fluoreszenzmikroskopie | 20 |
| 1.5.2 Die digitale konfokale Fluoreszenzmikroskopie | 21 |
| 1.5.3 Methodenvergleich | 22 |
| 2 Problemstellung | 25 |
| 3 Material und Methoden | 26 |
| 3.1 Materialien | 26 |
| 3.1.1 Medien, Puffer, Chemikalien | 26 |
| 3.1.2 Geräte | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2 Zellbiologische Aspekte | 28 |
| 3.2.1 Zellkultur | 28 |
| 3.2.2 Präparation peripherer T-Zellen | 29 |
| 3.2.3 Beladung mit Fura-2/AM | 30 |
| 3.2.4 Calciummessung an Einzelzellen | 30 |
| 3.2.5 Prinzip der ratiometrisch-fluorimetrischen Messung mit Fura-2 | 31 |
| 3.2.6 Mikroinjektion | 32 |
| 3.2.7 Immunhistochemische Färbungen von Zellorganellen und Ca ²⁺ -Signalproteinen | 32 |
| 3.3 Technische Aspekte | 34 |
| 3.3.1 Messprinzip des Imaging-Systems | 34 |
| 3.3.2 Messung von Ca ²⁺ Signalen mit Hilfe von Automaten | 35 |
| 3.3.3 Auswertung der Daten | 37 |
| 3.3.4 Konfokale Messung intrazellulärer Calciumkonzentrationen | 39 |
| 3.3.5 Messung der [Ca ²⁺] _i und Auswertung der Rohdaten per „no neighbor“ Algorithmus bei den 3T3 Fibroblasten | 42 |
| 3.3.6 Kalibrierung | 43 |
| 3.3.7 Konfokale Messung für die immunhistochemischen Färbungen | 43 |
| 4 Ergebnisse | 45 |
| 4.1 Entwicklung der Methodik für die Messung subzellulärer Ca²⁺ Signale mit konfokaler Mikroskopie | 45 |
| 4.1.1 Entstehung eines globalen Ca ²⁺ Signals am Beispiel von Einzelzellmessungen | 45 |
| 4.1.2 Vermeidung und Kompensation des Photobleachings | 46 |
| 4.1.3 Vergleich der Dekonvolution per „nearest neighbor“ Algorithmus mit der Dekonvolution per „no neighbor“ Algorithmus | 50 |
| 4.2 Analyse subzellulärer Ca²⁺ Signale in Jurkat (Klon JMP) und peripheren T- Lymphozyten während der Pacemaker-Phase | 52 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.2.1 | Analyse subzellulärer Ca^{2+} Signale in Jurkat T-Lymphozyten unter physiologischen Bedingungen | 52 |
| 4.2.2 | Analyse subzellulärer Ca^{2+} Signale in Jurkat T-Lymphozyten in Abwesenheit von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$ | 55 |
| 4.2.3 | Analyse subzellulärer Ca^{2+} Signale in peripheren T-Lymphozyten | 57 |
| 4.2.4 | Lokalisierung von Organellen und Ca^{2+} Signalproteinen in Jurkat und humanen peripheren T-Zellen und Korrelation mit Pacemaker-Signalen | 59 |
| 4.3 | Analyse subzellulärer Ca^{2+} Signale in Typ 3 RyR knock-down T-Zell-Klonen während der Pacemaker- und der Plateau-Phase | 61 |
| 4.3.1 | Analyse der subzellulären Ca^{2+} Signale während der Pacemaker-Phase nach TCR/CD3 Stimulation | 61 |
| 4.3.2 | Analyse der subzellulären Ca^{2+} Signale während der Pacemaker-Phase nach Stimulation des cADPR/ Ca^{2+} Signalwegs | 65 |
| 4.3.3 | Analyse der subzellulären Ca^{2+} Signale während der langanhaltenden Plateau-Phase nach TCR/CD3 Stimulation | 68 |
| 4.4 | Analyse von Ca^{2+} Signale in 3T3 Fibroblasten | 69 |
| 4.4.1 | Einfluss von cADPR und Ryanodin auf die Ca^{2+} Antwort in 3T3 Fibroblasten | 69 |
| 4.4.2 | Quantitative Analyse der subzellulären Ca^{2+} Signale in 3T3 Fibroblasten | 73 |
| 5 | Diskussion | 77 |
| 5.1 | Die digitale konfokale Fluoreszenzmikroskopie zur Messung subzellulärer Ca^{2+} Signale | 77 |
| 5.1.1 | Vergleich mit der Laserscanning-Mikroskopie | 77 |
| 5.1.2 | Rauschen und andere falsch positive Signale | 78 |
| 5.2 | Subzelluläre Pacemaker Ca^{2+} Signale in T-Lymphozyten: Puffs oder Sparks? | 79 |
| 5.2.1 | Puffs und Sparks in verschiedenen Zellsystemen | 79 |
| 5.2.2 | Zuordnung der subzellulären Ca^{2+} Signale in T-Lymphozyten | 80 |

| | |
|---|------------|
| 5.3 Einfluss des Typ 3 RyR auf die subzellulären Ca^{2+} Signale während der Pacemaker-Phase und des langanhaltenden Signals | 83 |
| 5.3.1 Rolle des Typ 3 RyR während der Pacemaker-Phase | 83 |
| 5.3.2 Rolle der Typ 3 RyR während der langanhaltenden Plateau-Phase | 86 |
| 5.4 Modell für die Rolle des RyR und des cADPR-vermittelten Ca^{2+} Signals in T-Zellen | 87 |
| 5.5 Einfluss von cADPR be im Ca^{2+} Signalling in 3T3 Fibroblasten | 90 |
| 5.5.1 Charakterisierung der subzellulären Ca^{2+} Signale | 90 |
| 5.5.2 Charakterisierung der globalen Ca^{2+} Welle | 92 |
| 5.6 Modell für das Ca^{2+} Signalling in 3T3 Fibroblasten | 93 |
| 6 Zusammenfassung | 96 |
| 7 Summary | 98 |
| 8 Literatur | 100 |
| 9 Veröffentlichungen/ Abstracts | 117 |
| 10 Lebenslauf | 118 |

Abkürzungen

| | |
|-------------------|---|
| 2-APB | 2-Aminoethoxydiphenylborat |
| 4-CEP | 4-Chloro-Methyl-Phenol |
| $[Ca^{2+}]_i$ | freie cytosolische und nucleäre Calciumionenkonzentration |
| $[Ca^{2+}]_{ex}$ | freie extrazelluläre Calciumionenkonzentration |
| A. bidest. | bidestilliertes Wasser |
| ACh | Acetylcholin |
| ADPR | Adenosin Diphosphoribose |
| APC | antigenpräsentierende Zelle |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| cADPR | cyclische Adenosin Diphosphoribose |
| CaM | Calmodulin |
| CCD-Kamera | (<i>charge coupled device</i>)-Kamera |
| CCK | Cholecystokinin |
| CICR | Ca^{2+} induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (<i>Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release</i>) |
| cIDPRE | <i>N</i> '-ethoxymethyl substituierte cyclische Inosin Diphosphoribose bzw. <i>N</i> '[(2-O-Phosphoryl-ethoxy)-methyl]-5'-O-phosphoryl-Inosin 5,5''-cyclisches Pyrophosphat |
| CIF | Faktor für Ca^{2+} Einstrom (<i>Ca^{2+} influx factor</i>) |
| CRAC-Kanal | durch Ca^{2+} -Freisetzung aktivierter Ca^{2+} -Kanal (<i>Ca^{2+}-release-activated Ca^{2+} channel</i>) |
| DAG | 1,2-Diacylglycerol |
| EGTA | Ethylenglycol-(N,N,N',N')-tetraacetat |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| Exp | Expositions-/Belichtungszeit |
| FCS | fötales Kälberserum |
| Fura-2/AM | Acetoxymethylester des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 |
| HEPES | 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure |
| IP ₃ | D- <i>myo</i> -Inositol-1,4,5-Trisphosphat |
| IP ₃ R | D- <i>myo</i> -Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor |
| IP ₃ S | D- <i>myo</i> -Inositol 1,4,6-Trisphosphorothioat |
| konj. | konjugiert |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>) |

| | |
|--------|---|
| NAADP | β -Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotidphosphat |
| NAADPR | β -Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotidphosphat-Rezeptor |
| NAD | β -Nicotinamid-Adenindinucleotid |
| NADP | β -Nicotinamid-Adenindinucleotid-2'-Phosphat |
| NCS | Serum von neugeborenen Kälbern |
| PHA | Phytohaemagglutinin |
| ROI(s) | bei der Auswertung analysierter Bereich der Zelle (<i><u>R</u>egion(s) <u>o</u>f <u>i</u>nterest</i>) |
| Ry | Ryanodin |
| RyR | Ryanodin-Rezeptor |
| SR | sarcoplasmatisches Retikulum |
| TCR | T-Zell Rezeptor |
| VOC | spannungs-abhängiger Kanal (<i><u>v</u>oltage-<u>o</u>perated <u>c</u>hannel</i>) |

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der T-Lymphozyten im Immunsystem

Die Erforschung der Immunität begann 1796 mit Edward Jenner, der erstmalig die Schutzimpfung gegen Pocken einführte. Jedoch erst im 19. Jahrhundert wurde durch die Arbeiten von Robert Koch bekannt, dass die Infektionskrankheiten durch Mikroorganismen hervorgerufen werden. Bei diesen „Mikroorganismen“ handelt es sich um Viren, Bakterien, Pilze und eukaryotische Parasiten. Ein Durchbruch gelang 1890 Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato mit der Entdeckung der Antikörper, die spezifisch an bestimmte Krankheitserreger binden [1].

Für die Immunität sind bestimmte Typen von weißen Blutzellen verantwortlich, die zusammenfassend als Lymphozyten bezeichnet werden.

Man unterscheidet zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Die angeborene Immunität wirkt während der frühen Phase einer Infektion und macht sich konservierte Eigenschaften pathogener Mikroorganismen zu nutze (z.B. allgemein vorkommende Bausteine von bakteriellen Oberflächen). Durch Makrophagen werden Bakterien angegriffen und beseitigt, eine dauerhafte Immunität entsteht nicht. Für das adaptive Immunsystem sind die Lymphozyten von großer Bedeutung. Auf der Oberfläche der B-Lymphozyten befinden sich Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, die als Rezeptoren wirken. Bei den T-Lymphozyten wird auf der Oberfläche der T-Zell-Rezeptorkomplex exprimiert. Trifft eine B-Zelle mit ihrem Antikörper auf der Oberfläche auf sein spezifisches Antigen, kommt es zur klonalen Expansion des B-Lymphozyten mit genau diesem Antikörper. Die T-Lymphozyten werden ebenfalls durch spezifische Antigene aktiviert. Ein Teil der bei der klonalen Expansion gebildeten aktiven spezifischen Lymphozyten differenziert zu Effektorzellen, die die Infektion bekämpfen können. Ein kleinerer Teil differenziert zu ruhenden Gedächtniszellen, die eine dauerhafte Immunität vermitteln. Die molekulare Vielfalt der Antigen-Rezeptoren auf den Lymphozyten ist durch somatische Rekombination und die zufällige Zusammenlagerung zweier verschiedener, variabler Proteinketten gegeben. Lymphozyten, die selbstreaktive Rezeptoren tragen, unterliegen einer klonalen Deletion, die alle Zellen beseitigt, die spezifisch auf ubiquitäre körpereigene Antigene reagieren [1].

Die Lymphozyten entstehen wie alle Blutzellen aus den Stammzellen des Knochenmarks und differenzieren im Knochenmark zu B-Lymphozyten oder im Thymus zu T-Lymphozyten. B- und T-Lymphozyten haben bei der adaptiven Immunantwort verschiedene Aufgaben. Die B-Zellen differenzieren zu Plasmazellen und sammeln sich im Knochenmark und den lymphatischen Organen und sezernieren dort Antikörper, die im extrazellulären Raum wirken (humorale Immunität). Im Gegensatz dazu zeigen T-Lymphozyten eine Reihe verschiedener Effektorreaktionen, die für die zellvermittelte Immunantwort verantwortlich sind. Die T-Zellen erkennen mit ihren Rezeptoren

Peptidfragmente der Krankheitserreger, können die Blutbahn am Infektionsherd verlassen und die Erreger zerstören. Die Erkennung der infizierten Zellen erfolgt durch spezialisierte MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*) an der Oberfläche der Zellen. T-Lymphozyten werden unterschieden nach cytotoxischen T-Zellen (=Killerzellen) und Helfer-T-Zellen. Die Helfer-T-Zellen erkennen durch Bakterien infizierte Makrophagen und lösen durch Cytokine die bakterientötende Aktivität der Makrophagen aus. Weiterhin unterstützen sie die Aktivierung und Differenzierung von B-Lymphozyten. Als Oberflächenmolekül tragen sie CD4-Moleküle, die an ein MHC-II-Molekül auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) binden können. Die cytotoxischen T-Zellen wehren im wesentlichen virale Infektionen ab, indem sie infizierte Zielzellen töten. Sie tragen sogenannte CD8-Moleküle (daher auch der Name CD8-Zellen), die eine wichtige Rolle spielen bei der spezifischen Erkennung der Antigene, die vom MHC-I-Molekül präsentiert werden. Mit Hilfe des MHC-I-Moleküls präsentieren fast alle weiteren kernhaltigen Zellen das Antigen.

Die Bedeutung des Immunsystems wird bei seiner Schädigung durch das humane Immunschwächevirus (HIV) deutlich: dieses Virus zerstört die CD4-Zellen, die bei den meisten Immunantworten eine zentrale Rolle spielen. Auf Infektionen durch intrazelluläre Bakterien oder andere Krankheitserreger, die normalerweise der Kontrolle durch die Makrophagen und B-Lymphozyten unterliegen, die wiederum von den T-Zellen aktiviert werden, kann der Körper nicht mehr reagieren [1].

1.2 Signaltransduktion nach der Antigenerkennung

T-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche den T-Zell-Rezeptorkomplex (TCR-Komplex). Der TCR-Komplex besteht aus dem T-Zell-Rezeptor (TCR), der das Antigen erkennt, und einem Komplex namens CD3, der ins Innere der Zelle signalisiert, dass eine Antigenbindung stattgefunden hat. CD3 besteht aus drei Proteinketten γ , δ und ϵ , die wie der TCR größtenteils nach außen ragen, und einem ζ : ζ - oder ζ : η -Dimer, das hauptsächlich im Cytoplasma liegt. Durch Transmembrandomänen sind die einzelnen Proteinketten bzw. Proteine in der Plasmamembran verankert.

Der TCR ist ein Heterodimer und setzt sich aus den zwei Transmembranglycoproteinketten α und β zusammen. Der nach außen gerichtete Teil der beiden Ketten ist eine variable Region. Die Variabilität wird bei der Entwicklung der T-Zelle durch somatische Rekombination der Gene, die für die N-Termini codieren, gesichert. Dadurch erkennt die T-Zelle nur ein spezifisches Antigen, das ihr vom MHC präsentiert wird. Das Antigen ist dabei als Peptidfragment an einen MHC gebunden und an der Oberfläche einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) lokalisiert. Je nach Co-Ligation von Corezeptoren und Differenzierungszustand der T-Zelle kommt es durch die Ligandenbindung zur Proliferation, Apoptose oder Anergie [1, 2].

Bei der Antigenerkennung spielen weiterhin die Corezeptoren CD4 und CD8 eine wichtige Rolle, indem sie die Empfindlichkeit der T-Zellen, ein durch ein MHC präsentiertes Antigen zu erkennen um

das 100-fache erhöhen, d.h. für die Erkennung werden nur etwa 100 Antigen-MHC-Moleküle auf einer Zielzelle benötigt, während ohne die Corezeptoren 10.000 Antigen-MHC-Moleküle benötigt würden [1].

Der erste Schritt der Signalübertragung beruht auf der Tyrosinkinase Lck, die mit den Corezeptoren CD4 und CD8 assoziiert ist, und der Tyrosinkinase Fyn, die sich im Cytoplasma befindet. Dafür müssen die Tyrosinkinasen durch eine regulatorisch wirkende Tyrosinphosphatase (CD45) dephosphoryliert werden. Lck und Fyn wiederum phosphorylieren Bereiche der CD3 ζ - und CD3 ϵ -Kette, die dann eine zweite cytosolische Tyrosinkinase namens ZAP-70 (ζ -assoziiertes Protein-70) binden können. Als entscheidender Schritt wird nun ZAP-70 von Fyn und Lck phosphoryliert und dadurch aktiviert [1, 3].

ZAP-70 spielt bei der Aufrechterhaltung der Signalübertragung des T-Zell-Rezeptors eine wichtige Rolle [3] und löst drei verschiedene Signalwege aus: Einer läuft über die Aktivierung des GTP-bindenden Ras-Proteins und führt über mehrere Kinasen zur Stimulation des Transkriptionsaktivators AP-1, der bei vielen proliferativen Reaktionen von Bedeutung ist [4]. Ein zweiter Weg führt über die Tyrosinphosphorylierung der Phospholipase C- γ , die Phosphatidylinositol in Diacylglycerol (DAG) und D-*myo*-Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP₃) spaltet. DAG aktiviert die Proteinkinase C, die bei der Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B eine entscheidende Rolle spielt. Das zweite Spaltprodukt IP₃ ist für eine Ca²⁺ Freisetzung aus intrazellulären Speichern, wie z.B. dem endoplasmatischen Retikulum (ER), verantwortlich. Zusätzlich werden in der Plasmamembran der T-Zelle Ca²⁺ Kanäle geöffnet, sodass Ca²⁺ von außen in die Zelle strömt und die freie cytosolische und nukleäre Calciumkonzentration ([Ca²⁺]_i) weiter erhöht wird [2, 5]. Das komplexe Gefüge der Entstehung und der Verstärkung der frühen und späten intrazellulären Ca²⁺ Signale hängt neben IP₃ noch von weiteren Mechanismen ab, die zentraler Gegenstand der vorliegenden Dissertation sind und ausführlich im Ergebnis und Diskussionsteil erörtert werden. Die erhöhte [Ca²⁺]_i aktiviert eine cytoplasmatische Proteinphosphatase, das Calcineurin, das wiederum NF-AT-Proteine dephosphoryliert. In dieser Form kann NF-AT in den Zellkern transportiert werden und an AP-1 binden, wodurch der aktive Transkriptionsfaktor NF-AT entsteht. Die drei Transkriptionsfaktoren AP-1, NF-AT und NF- κ B und weitere hier nicht näher aufgeführte Faktoren binden allein oder auch in Kombination mit den Oktamerproteinen Oct-1 und Oct-2 an den Promotor des Interleukin-2 Gens (IL-2) und aktivieren so die Expression von IL-2 [4-6]. Die Expression von IL-2 führt zur klonalen Expansion der T-Zellen und deren Differenzierung und ist damit essentiell für eine effektive Immunantwort.

1.3 Entstehung intrazellulärer Ca²⁺ Signale durch Second-Messenger

Jeder Zelltyp exprimiert eine Vielzahl an Komponenten, die mit unterschiedlichen räumlichen und zeitlichen Möglichkeiten der Weiterleitung des Ca²⁺ Signals dienen. Diese Ca²⁺ Signale kontrollieren

unterschiedlichste zellulärer Prozesse wie Zellwachstum, Muskelkontraktionen, Hormonsekretion oder neuronale Prozesse [2, 7-9].

Das Ca^{2+} selbst kann aus intrazellulären Speichern oder dem extrazellulären Medium in das Cytosol der Zelle gelangen. Der Einstrom von Ca^{2+} aus dem extrazellulären Medium wird von verschiedenen Plasmamembran-ständigen Kanälen kontrolliert, die z.B. auf Membran-Depolarisation, mechanische Einflüsse, extrazelluläre Agonisten, intrazelluläre Botenstoffe oder die Ca^{2+} Freisetzung aus intrazellulären Speichern reagieren. Während der Ruhephase führt die Aktivität der sarcoplasmatischen/endoplasmatischen Ca^{2+} -ATPasen (SERCA) und der Plasmamembran Ca^{2+} -ATPasen (PMCA) dazu, dass die spontane Ca^{2+} Freisetzung aus intrazellulären Speichern und der Einstrom von Ca^{2+} keine signifikante Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bewirken. Die Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern, dem endoplasmatischen Retikulum (ER) oder bei Muskelzellen dem sarcoplasmatischen Retikulum (SR), wird durch Ca^{2+} selbst oder die Second-Messenger IP_3 , cyclische ADP-Ribose (cADPR) und Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NAADP) kontrolliert, stimuliert und moduliert [7, 9-12]. Diese Calcium-mobilisierenden Botenstoffe sind zwischen eukaryotischen Einzellern und verschiedenen Säugerzellen konserviert [13-15], wenn auch verschiedene Signalsysteme im Laufe der Evolution entwickelt wurden [12]. Ebenso differieren zwischen verschiedenen Zellen und Geweben die Amplitude, die Dauer und die räumliche Ausbreitung der Ca^{2+} Signale, insbesondere der elementaren Ca^{2+} Signale, die durch die den drei Molekülen entsprechenden Rezeptoren auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen [16, 17].

1.3.1 D-myo-Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP_3)

IP_3 wurde als erster Second-Messenger identifiziert [18] und verursacht die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER. IP_3 ist ein Schlüsselmolekül für zwei Signalwege: Der eine Weg läuft über GProtein gekoppelte Rezeptoren, die durch Agonisten wie z. B. die Hormone Acetylcholin (ACh) und Histamin, durch ATP oder auch durch Geruchstoffe und Licht stimuliert werden [19, 20]. Der andere Weg läuft über Tyrosinkinase gekoppelte Rezeptoren, die auf Wachstumsfaktoren oder Antigene reagieren. Ein Beispiel für einen Tyrosinkinase gekoppelten Rezeptor stellt der TCR dar. Mit Hilfe einer Phospholipase C (PLC, Subtypen β oder γ) wird Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP_2) zu IP_3 bzw. Diacylglycerol umgewandelt [19].

Nach dem Modell des kapazitiven Ca^{2+} Einstroms werden nach der Stimulation des IP_3 -Rezeptors (IP_3R) zunächst die intrazellulären Ca^{2+} Speicher geleert. Darauf folgt der schnelle Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} durch die Aktivierung eines Ca^{2+} Kanals (CRAC-Kanal) bis in der Zelle eine Ca^{2+} Konzentration erreicht ist, die den Ca^{2+} Einstrom inaktiviert [21, 22].

In Myozyten wurde eine „caged“ Vorläufersubstanz des IP_3 zur direkten Stimulation des IP_3R eingesetzt [23]. Der IP_3R wird weiterhin über diverse Kinasen durch Phosphorylierungen moduliert, so durch die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Kinase II, die cGMP-abhängige Proteinkinase, die Proteinkinase C und die cAMP-abhängige Proteinkinase, Proteinkinase A [24]. In B-Zellen wird nach der

Phosphorylierung durch die Tyrosinkinase Lyn eine erhöhte Aktivität des IP₃R festgestellt, sodass die B-Zell Rezeptor vermittelte Ca²⁺ Freisetzung beschleunigt wird. Diese Phosphorylierung wird durch das Scaffolding Protein BANK vereinfacht, das Lyn, den IP₃R und den B-Zell-Rezeptor miteinander verknüpft [25]. Weiterhin kann auch Ca²⁺ selbst den IP₃R stimulieren [26]. Die positive Feedback-Reaktion des freigesetzten Ca²⁺ auf die weitere Ca²⁺ Freisetzung aus den IP₃-sensitiven intrazellulären Speichern führt in Oocyten zu einer Ca²⁺ Welle [27] oder in humanen Thrombozyten zu Ca²⁺ Oszillationen [10]. Thimerosal verursacht in humanen Thrombozyten, HeLa-Zellen und Azinus-Zellen des Pankreas oszillierende Ca²⁺ Signale durch die Sensitivierung oder Stimulation des IP₃R [10, 28, 29].

Ein Augenmerk lag in den vergangenen Jahren auf der Steuerung der [Ca²⁺]_i durch IP₃ im Kern. Nach Lipp et al. kommen die Ca²⁺ Signale im Kern allein durch die Diffusion des Ca²⁺ aus dem Cytosol zustande [30]. Andere Autoren beschreiben den Ca²⁺ Anstieg im Kern als Ca²⁺ Ausstrom aus der Kernhülle [31, 32] oder als unabhängigen Prozess, der durch IP₃ am nucleoplasmatischen Retikulum des Kerns selbst gesteuert wird [33].

Die Konzentration von IP₃ verändert sich analog zu der [Ca²⁺]_i: Auf Stimulation des TCR/CD3-Komplexes reagiert die Zelle innerhalb weniger Sekunden oder Minuten mit der Erhöhung des IP₃-Spiegels von ca. 27 auf 286 pmol/10⁹ Zellen, der nach 10-20 min wieder auf niedrige Werte abfällt [34, 35]. In Fibroblasten wurde gezeigt, dass mit der Stimulation des purinergen P2Y-Rezeptors mit dem Ca²⁺ Anstieg auch die Menge an gebildetem Inositolphosphat ansteigt [36, 37]. Komplementär dazu geben die Fibroblasten von P2Y-knock-out Mäusen weder ein Ca²⁺ Signal nach der ATP-Stimulation, noch steigt die Konzentration der Inositolphosphate [37]. Nach der Überexpression des IP₃R steigt dagegen die Sensitivität gegenüber der P2Y-Stimulation [38].

Lokalisiert wurde der IP₃R in Jurkat T-Zellen in direkter Nachbarschaft des TCR, wobei es sich um ein „Cocapping“ handelt [39]. In T-Lymphoma-Zellen der Maus nach Stimulation durch Concanavalin A wurden die IP₃R in Clustern nahe der Zellmembran lokalisiert [40]. Bislang wurden 3 verschiedene Subtypen des IP₃R analysiert, die je nach Zelltyp in unterschiedlicher Menge exprimiert werden [41]. So können T-Zellen ohne die Expression des Typ 1 IP₃R nach TCR/CD3 Stimulation kein globales Ca²⁺ Signal entwickeln und nicht die weitere Ca²⁺ Signalkaskade bis hin zur IL-2 Produktion durchlaufen [42].

Antagonistisch zum IP₃R wirken D-*myo*-Inositol 1,4,6-Trisphosphorothioat (IP₃S), Heparin und das membrangängige Xestospongin C [43-45]. Die Qualität des kommerziell erwerblichen Xestospongin C und die damit verbundene Hemmung des IP₃R schwankt jedoch stark (Ingeborg Berg, persönliche Mitteilung). Weiterhin wirken divalente Kationen wie Magnesium, Strontium und Barium inhibierend auf den IP₃R [26]. Die Funktion des membranpermeanten 2-Aminoethoxydiphenyl Borat (2-APB) auf

den IP₃R ist umstritten. Zunächst beschrieben Maruyama et al. die konzentrationsabhängige Wirkung von 2-APB auf die Hemmung des IP₃R-vermittelten Ca²⁺ Signals in Thrombozyten, Vesikeln von gestreiftem Muskelgewebe und glatten Muskelzellen [46]. In Mikrosomen aus Hirngewebe ist die Inhibition des IP₃ vermittelten Ca²⁺ Signals durch 2-APB abhängig von der stimulierenden IP₃ Konzentration [47]. In vielen Zelltypen hemmt 2-APB in geringen Konzentrationen auch den Store-Operated-Ca²⁺ Einstrom [48], kann jedoch in Konzentrationen >50 µM von außen einzelne Ca²⁺ Kanäle in der Plasmamembran aktivieren [49]. Als weitere Substanz zur Blockierung des IP₃-vermittelten Ca²⁺ Signals dient das membranpermeante U73122, das die PLC inhibiert [50].

1.3.2 Bildung von cADPR und NAADP durch ADP-Ribosylcyclasen

cADPR wurde als zweites Ca²⁺-mobilisierendes Molekül gefunden und ist ein cyclisches Derivat von β-Nicotinamid-Adenindinucleotid (NAD), das von ADP-Ribosylcyclasen synthetisiert wird [51, 52]. Erstaunlicherweise katalysiert dasselbe Enzym durch eine Basenaustauschreaktion von β-Nicotinamid-Adenindinucleotidphosphat (NADP) mit Nicotinsäure auch den letzten bisher bekannte Ca²⁺ Second-Messenger β-Nicotinsäure-Adenindinucleotidphosphat (NAADP). Eine nahezu reine ADP-Ribosylcyclase wurde erstmals als 30 kDa großes Protein aus dem Seehasen *Aplysia californica* isoliert [53]. ADP-Ribosylcyclasen können in gelöster oder in membrangebundener Form vorliegen. Die in wenigen Zellsystemen beschriebenen cytosolischen ADP-Ribosylcyclaseaktivitäten werden in Seeigeleiern und PC12-Zellen durch eine cGMP-abhängige Proteinkinase aktiviert [54], oder durch einen G-Protein-gekoppelten [55] oder einen Tyrosin-Kinase-gekoppelten Rezeptor aktiviert [56]. Im letzten Jahr wurden auch in humanen mononucleären Blutzellen [57] und in Azinus-Zellen des Pankreas der Ratte [58] cytosolische ADP-Ribosylcyclasen gefunden.

Membrangebundene ADP-Ribosylcyclasen haben meist eine hohe NAD-Glycohydrolase-Aktivität (NADase) und katalysieren in einer Seitenreaktion sowohl die Bildung als auch die Hydrolyse von cADPR [59, 60]. Das wohl am besten charakterisierte Mitglied der Familie der membranständigen ADP-Ribosylcyclasen ist das Ectoenzym CD38. Bei CD38 handelt es sich um ein Oberflächen-Antigen, das in aktivierten T- und B-Lymphozyten, Killerzellen und Erythrozyten exprimiert wird und als Leukozyten-Marker der Differenzierung und als Rezeptor bzw. Corezeptor dient [61, 62]. Lokalisiert wurde CD38 auch intrazellulär in der Mitochondrienmatrix [63], in der Membran des ER und in der Kernmembran, wobei eine deutliche Kolo-kalisation mit dem Ryanodin Rezeptor (RyR) zu beobachten ist [64].

In stimulierten Jurkat T-Lymphozyten wurde eine ADP-Ribosylcyclase-Aktivität in der cytosolischen Fraktion gemessen [65]. Außerhalb der Zelle gebildetes cADPR konnte nicht in die T-Zellen hineintransportiert werden [66], sodass man in T-Zellen von einer intrazellulären ADP-Ribosylcyclase

ausgehen muss. Die molekulare Identität der löslichen ADP-Ribosylcyclase in T-Lymphozyten konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden.

Untersuchungen in HeLa Zellen lassen hingegen vermuten, dass die ADP-Ribosylcyclase an der Zelloberfläche als Ectoenzym exprimiert wird [67]. In den HeLa-Zellen wurde CD38 als multifunktionelles Enzym beschrieben, das außer die Cyclisierung von NAD, die Hydrolyse von NAD und NADP und Basen-Austausch-Reaktionen zu katalysieren, in der Lage ist, sein eigenes Produkt cADPR aktiv zu transportieren [68]. In mit CD38 transfizierten 3T3 Fibroblasten wird NAD in einem äquilibrierenden Transportmechanismus durch Connexin 43 Halbkanäle in den extrazellulären Raum geleitet und von CD38 in cADPR umgewandelt [69, 70]. cADPR wird in einem konzentrierenden Mechanismus durch CD38 Dimere selbst [68], durch einen $\text{Na}^{2+}/\text{cADPR}$ Symport (konzentrierender Nucleosidtransporter) oder über äquilibrierende Nucleosidtransporter [71] wieder in die Zelle zurück transportiert. Der Einstrom von cADPR wird begleitet von einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den 3T3 Wildtyp-Zellen. Ähnliche Anstiege der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden nach der Transfektion von CD38 in die 3T3 Fibroblasten als Folge der cADPR Bildung beobachtet, was zu einer Verdoppelung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und einer Beschleunigung der Zellproliferation in den CD38^+ Zellen im Vergleich mit den CD38^- bzw. Wildtyp-Zellen führt [72, 73]. Während die CD38^+ Zellen cADPR aktiv über die CD38 Dimere ins Cytosol pumpen können, besteht für die CD38^- Zellen die Möglichkeit, durch die Nucleosidtransporter cADPR aufzunehmen und so ebenfalls über den cADPR/RyR-Signalweg zum Ca^{2+} Signalling beizutragen.

1.3.3 cyclische ADP-Ribose (cADPR)

Nach IP_3 wurde cADPR als zweite Ca^{2+} mobilisierende Komponente erstmals 1987 von der Arbeitsgruppe um Lee in Seeigeli-Homogenaten beschrieben [74]. Seitdem ist die Ca^{2+} freisetzende Wirkung von cADPR in vielen Zellsystemen entdeckt worden, die außer Invertebraten auch Pflanzenzellen, Säugerzellen und humane Zelllinien umfassen [13].

Zur Zeit ist noch nicht vollständig klar, wie cADPR die Ca^{2+} Freisetzung in der Zelle verursacht. In der Mehrheit der untersuchten Systeme gilt es als wahrscheinlich, dass cADPR die Ca^{2+} Freisetzung über den RyR stimuliert [13], wobei cADPR möglicherweise nicht direkt an den RyR bindet, sondern durch ein intermediäres Protein, das FK506-Binding Protein (FKBP 12.6) [75]. Der RyR kann außerdem durch Ca^{2+} sensitiviert werden, sodass auch das durch den IP_3R freigesetzte Ca^{2+} zur Ca^{2+} Freisetzung durch cADPR einen Beitrag leistet (CICR) [76]. Calmodulin (CaM) übt einen sensitivierenden Effekt auf die Ca^{2+} Freisetzung durch cADPR aus [77].

In Azinus-Zellen des Pankreas wird durch Hormone oder Neurotransmitter Ca^{2+} aus dem ER mobilisiert. Der Neurotransmitter ACh verursacht lokale Ca^{2+} Spikes die über den IP_3R vermittelt werden, während das Hormon Cholecystokin (CCK) globale und lokale Oszillationen hervorruft, die über einen Signalweg mit RyR und NAADP-Rezeptoren laufen. CCK potenziert die Wirkung des

ACh, sodass die lokalen Signale zu globalen Signalen werden können. Dieser Effekt wird spezifisch durch die RyR vermittelt [17].

Vor kurzem konnte in Azinus-Zellen des Pankreas die Ca^{2+} Freisetzung nach Stimulation mit Ryanodin im apikalen Pol der Zellen lokalisiert werden [78]. Ähnliche Untersuchungen wurden bei *Xenopus* Oocyten durchgeführt, indem die Zellen mechanisch durch Zentrifugation gestreckt wurden. Der cADPR-sensitive Pool fiel zusammen mit dem ER und dem IP_3 -sensitiven Pool, wogegen die NAADP-sensitiven Speicher bei den Mitochondrien angesiedelt waren [79].

In T-Zellen ist cADPR sowohl in die Initialphase des Ca^{2+} Signals und die Phase des lang anhaltenden Ca^{2+} Signals eingebunden [43]. Die Konzentration von cADPR in Jurkat T-Lymphozyten wurde nach Optimierung einer auf HPLC-basierten Messmethode mit $198 \pm 41 \text{ pmol} / 10^8 \text{ Zellen}$ bestimmt [80]. Die Stimulation mit dem anti-CD3 Antikörper OKT3 zeigte, dass die mittlere intrazelluläre cADPR-Konzentration langsam innerhalb von 30 min von ca. $0,5 \mu\text{M}$ bis zu einem Maximum von knapp $2 \mu\text{M}$ cADPR anstieg, und diese Konzentration über mehr als 60 min gehalten wurde [43].

Drei verschiedene Subtypen von RyR sind bisher bekannt: Typ 1 wird hauptsächlich in Skelettmuskel exprimiert, Typ 2 in Herzmuskel und Typ 3 im Gehirn und in peripheren Geweben. Im allgemeinen wird der RyR in nicht-erregbaren Zellen seltener exprimiert, aber so wie seine Existenz auch für HeLa-Zellen gezeigt wurde [81], fand man ihn auch in T-Zellen. Immunhistochemische Färbungen des RyR an diesen Zellen zeigten eine Verteilung auf den Rand der Zelle, die perinucleäre Region und große Kompartimente im Cytosol [82]. Wie auch schon beim IP_3R beobachtet wurde, werden nach der Stimulation mit Concanavalin A die Rezeptoren zu Clustern zusammengezogen [82]. Weiterhin konnte die Expression des RyR in Jurkat T-Lymphozyten mittels [^3H]-Ryanodin-Bindung und per Western Blot nachgewiesen werden [43]. Da es bisher keine Subtyp-spezifischen Antikörper für den humanen RyR gibt, konnten die einzelnen Subtypen nicht differenziert werden. Einzelkanalmessungen von RyR aus Herz- und Skelett-Muskelzellen in Lipid-Planar-Bilayers und die Freisetzung von $^{45}\text{Ca}^{2+}$ von Mikrosomen zeigten, dass Typ 2 und Typ 3 RyR von cADPR bei niedrigen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aktiviert werden [83]. Die Aktivierung des Typ 1 RyR durch cADPR dagegen war von der cytosolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($10 \mu\text{M}$) und der luminalen Ca^{2+} Konzentration abhängig [84]. In vaskulären Myozyten wurde gezeigt, dass der Typ 1 und Typ 2 RyR für die Entwicklung der subzellulären Ca^{2+} Signale, der globalen Ca^{2+} Antwort und damit über das freigesetzte Ca^{2+} für den CICR notwendig sind [85].

Außer durch cADPR und Ca^{2+} selbst wird Ca^{2+} über den RyR/ Ca^{2+} -Kanal durch nicht-physiologische Aktivatoren wie Coffein und diverse Agonisten freigesetzt [51]. Bei diesen Agonisten handelt es sich um chemisch modifizierte cADPR Analoga. Bisher in T-Zellen getestete Substanzen sind das 2'- NH_2 -cADPR, das an der sog. „nördlichen“ Ribose modifiziert wurde, Aristeromycin-cADPR und 2'-Phospho-cADPR, das an der sog. „südlichen“ Ribose eine Phosphatgruppe trägt [86, 87]. Die Ca^{2+}

Freisetzung durch Ryanodin selbst hängt von der Konzentration ab. Konzentrationen bis zu 10 μM führen zu einem Ca^{2+} Anstieg in den Zellen [88], Konzentrationen größer 50 μM führen zu einer Blockierung sämtlicher Ca^{2+} Signale [17].

Antagonistisch wirken hohe Magnesium-Konzentrationen, Ruthenium Rot (RuRed), Procain oder verschiedene synthetische Derivate von cADPR [51, 89]. In T-Lymphozyten wird die Ca^{2+} Freisetzung durch cADPR durch die Antagonisten 8-NH₂-cADPR, 8-OCH₃-cADPR, 8-CH₃-cADPR und 8-Br-cADPR spezifisch blockiert [87, 90]. Besondere Bedeutung kommt dem membranpermeanten Antagonisten 7-Deaza-8-Br-cADPR zu, denn anhand physiologischer Stimulationen mit einem anti-CD3 Antikörper wurde gezeigt, dass sowohl die initiale Phase des Ca^{2+} Signals als auch das langanhaltende Signal konzentrationsabhängig durch 7-Deaza-8-Br-cADPR in der Amplitude vermindert und in der Entstehung verzögert wurden [43]. Die Bedeutung des cADPR für das langanhaltende Ca^{2+} Signal wurde weiterhin deutlich, wenn nach der physiologischen Stimulation der Antagonist 8-OCH₃-cADPR in die Zellen injiziert wurde: jegliches weitere Ca^{2+} Signalling in Form von Ca^{2+} Oszillationen wurde unterbunden. Dagegen zeigte der IP₃ Antagonist IP₃S keine Wirkung auf das nachfolgende Oszillieren der Ca^{2+} Signale [43]. In Mikrosomen des glatten Muskels wird das Ca^{2+} Signal, das durch die RyR-Agonisten Coffein und 4-Chloro-Methyl-Phenol (4-CEP) vermittelt wurde, durch RuRed blockiert [88]. Die Stimulation über Lipopolysaccharide (LPS) führte in peripheren mononucleären Blutzellen zum Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, was sich komplett durch den cADPR Antagonisten 8-Br-cADPR blockieren ließ, sodass cADPR auch als Second-Messenger in den peripheren Blutzellen bei der angeborenen Immunität bei der LPS-stimulierten Proliferation eine Rolle spielt [57].

1.3.4 Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NAADP)

Aarhus et al. machten die Beobachtung, dass sowohl die ADP-Ribosylcyclase als auch CD38 nicht nur cADPR synthetisieren, sondern auch den Basenaustausch der Nicotinamid-Gruppe von NADP durch Nicotinsäure katalysieren [91]. Notwendig für diese Synthese ist ein saurer pH-Wert von pH 5 und eine hohe Konzentration von Nicotinsäure (im mM Bereich), die vermutlich in Zellen nicht zu finden ist [54, 91]. Als alternative Synthese-Mechanismen wurden noch die Phosphorylierung von Nicotinsäure-Adenindinucleotid (NAAD) oder die Desaminierung von Nicotinamid-Adenindinucleotid-Phosphat (NADP) vorgeschlagen [92]. Das Produkt der genannten Reaktionen ist das NAADP, das in verschiedenen Zellsystemen die Ca^{2+} Freisetzung vermitteln kann [77].

Beschrieben wurde die Ca^{2+} -freisetzende Wirkung von NAADP als erstes ebenfalls von der Arbeitsgruppe um Lee im Seeigelei [52]. Die Ca^{2+} Freisetzung durch NAADP erfolgte schon durch sehr niedrige Konzentrationen (10-100 nM NAADP) [51, 77, 93]. Der Mechanismus der Ca^{2+} Freisetzung durch NAADP unterscheidet sich von dem durch IP₃ und cADPR. IP₃- oder cADPR-Antagonisten konnten das NAADP-vermittelte Ca^{2+} -Signal nicht blockieren [77]. Die NAADP-aktivierte Ca^{2+} Freisetzung wurde durch Heparin, ein IP₃-Antagonist, oder durch Procain oder Ruthenium Rot (RuRed), Antagonisten des RyR, im Seeigelei nicht blockiert [92]. Außerdem findet

keine gegenseitige Desensibilisierung zwischen der NAADP- und der IP_3 - oder cADPR-aktivierten Ca^{2+} -Freisetzung statt [77]. In Seeigeleiern wurde außerdem eine Selbstinaktivierung durch das NAADP festgestellt. Konzentrationen unterhalb des Schwellenwertes von 10 nM NAADP konnten vollständig und irreversibel die weitere Ca^{2+} Freisetzung durch eine wiederholte Stimulation mit NAADP blockieren, vermutlich durch eine komplette Inaktivierung von Rezeptoren für NAADP [94]. Kinetisch betrachtet ist die NAADP-vermittelte Ca^{2+} Freisetzung schneller als die durch IP_3 oder cADPR aktivierte [77] und ist im Gegensatz zu IP_3 unabhängig von der cytoplasmatischen Ca^{2+} Konzentration. Die Ca^{2+} Freisetzung durch NAADP verhält sich im Seeigelei also nicht wie ein CICR-System [95]. Auf subzellulärer Ebene wurden in Seeigeleiern von Aarhus et al. lang anhaltende Ca^{2+} Oszillationen nach Photolyse von „caged“ NAADP beobachtet [94].

Auch in T-Zellen verursachte die Mikroinjektion von NAADP abhängig von den injizierten Konzentration Ca^{2+} Signale. Kleine NAADP-Konzentrationen (10 nM) führten zu wiederholten, langanhaltenden Ca^{2+} Signalen, während mit steigender NAADP-Konzentration die Amplitude des initialen Ca^{2+} Signals bis zur NAADP-Konzentration von 100 nM zunahm. Bei Injektion von 10-100 μ M NAADP fand eine Selbstinaktivierung statt; auch Coinjektionen von IP_3 oder cADPR zeigten unter diesen Bedingungen keine Ca^{2+} -mobilisierende Wirkung. Bei dieser NAADP-Konzentration wurde der durch den TCR/CD3-Komplex aktivierte Ca^{2+} Signalweg also komplett inhibiert, sodass NAADP eine essentielle Rolle im Ca^{2+} Signalweg der T-Lymphozyten spielen muss [96].

Aus diesen Untersuchungen ergab sich das Modell, dass nach Stimulation der T-Zellen NAADP zunächst eine geringe Menge Ca^{2+} (Trigger- Ca^{2+}) freisetzt. Alternativ könnte es auch sein, dass durch NAADP ständig kleine Ca^{2+} Signale verursacht werden, die bei zusätzlicher Stimulation des IP_3 R und RyR zum globalen Signal führen. So kann der Ca^{2+} Signalweg in T-Zellen an verschiedenen Punkten reguliert werden. Dabei stellt jedes System eine Art Checkpoint dar [12].

Weitere Untersuchungen mit NAADP wurden an Azinus-Zellen des Pankreas durchgeführt: hier zeigte sich, dass NAADP Ca^{2+} Signale verschiedener Dauer (1-2 s oder 0,2-1 min) verursacht [97]. Weiterhin sind die Zellen gegenüber NAADP viel empfindlicher als gegenüber cADPR oder IP_3 . Höhere NAADP-Konzentrationen dagegen inaktivieren, wie schon für T-Zellen erwähnt, selektiv die in den Azinus-Zellen durch Cholecystokinin hervorgerufenen Ca^{2+} Signale, was darauf hindeutet, dass NAADP als intrazellulärer Botenstoff in diesen Zellen wirkt [97].

Wachsendes Interesse gilt derzeit der Lokalisierung der NAADP-sensitiven Ca^{2+} Speicher und der Identifizierung eines NAADP-Rezeptors. Genazzani und Galione stellten im Seeigelei-System fest, dass sich die NAADP-sensitiven Calciumspeicher nicht wie die Speicher, die auf cADPR und IP_3 reagieren, im ER befinden [98]. Die gleiche Beobachtung machten Lee und Aarhus und führten durch mechanisches Strecken von Seeigeleiern durch Zentrifugation den ersten direkten und sichtbaren Beweis an, dass sich die NAADP-sensitiven Ca^{2+} -Speicher in der gleichen Fraktion wie die Mitochondrien befinden und nicht in der Fraktion des ER [79]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen

Albrieux et al., die in Aszidien-Oocyten einen IP_3 -sensitiven, einen cADPR-sensitiven und einen NAADP-sensitiven Ca^{2+} Signalweg voneinander unterscheiden konnten [11]. Gegen diese Theorie sprechen neuere Daten, die in Skelett-Muskelzellen und Zellkernen von Azinus-Zellen des Pankreas erhoben wurden [99-101]. An den Muskelzellen wurde der Typ 1 RyR, der aus dem SR isoliert wurde, in Lipid-Bilayern durch NAADP stimuliert [99], in den Pankreas-Zellkernen stimuliert NAADP vermutlich die in der Kernhülle befindlichen RyR [101]. Auch in T-Zellen deuten die bislang durchgeführten Coinjektionen von NAADP zusammen mit RuRed darauf hin, dass NAADP auf einen der RyR wirkt (Matthias Langhorst, persönliche Mitteilung). In verschiedenen Regionen des Rattenhirns wurden die NAADP-Bindungsstellen durch Autoradiographie markiert [102], identifiziert wurde ein Rezeptor für das NAADP dort jedoch noch nicht.

1.3.5 Ca^{2+} Einstrom-Mechanismen

Das von außen in die Zelle strömende Ca^{2+} ist für die Entwicklung des globalen und langanhaltenden Ca^{2+} Signals und die damit verbundenen weiteren Ca^{2+} -gesteuerten Prozesse in der Zelle von prinzipieller Bedeutung. Der Ca^{2+} Einstrom ist von dem elektrochemischen Gradient über der Plasmamembran abhängig. Die Zellen nutzen das extrazelluläre Ca^{2+} durch die Aktivierung verschiedenster Kanäle. Die Spannungs-abhängigen Kanäle (VOCs – voltage-operated channels) werden zumeist in elektrisch erregbaren Zellen gefunden und generieren schnelle Ca^{2+} Anstiege, um schnelle Prozesse, wie z.B. Muskelkontraktionen zu regulieren [103]. Des weiteren existieren Rezeptor-abhängige Kanäle (ROCs – receptor-operated channels), die auf Glutamat oder andere Liganden reagieren, oder Second-Messenger-abhängige Kanäle (SMOCs – second messenger operated channels), die durch interne Botenstoffe kontrolliert werden, z.B. durch cyclische Nucleotide [103, 104]. Viele andere Kanaltypen, wie auch die Speicher-abhängigen Kanäle (SOCs – store-operated channels) reagieren auf eine Vielzahl an Stimuli [7]. Viele der genannten Kanäle gehören zu der großen Familie der TRP (transient receptor potential)- Kanäle [105-107], die durch mindestens 23 verschiedene Gene codiert werden. Die TRP-Kanäle scheinen eine geringe Erregbarkeit aufzuweisen und sind deshalb dafür geeignet, über lange Zeiträume hin zu reagieren, ohne die Zelle mit Ca^{2+} zu überfluten. So werden von den TRP-Kanälen langsame zelluläre Prozesse gesteuert, wie z.B. die Kontraktion der glatten Muskeln und die Zellproliferation [7].

In T-Zellen trägt der Ca^{2+} Einstrom im Vergleich zu der Ca^{2+} Freisetzung aus den intrazellulären Speichern den Hauptanteil des globalen langanhaltenden Ca^{2+} Signals und wird vermutlich über die Ca^{2+} Freisetzung gesteuert [108]. Die Art und Weise dieser Steuerung ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt, es existieren daher 3 Modellvorstellungen, die den Ca^{2+} Einstrom in T-Zellen beschreiben:

Zum einen wird ein IP_3 - oder Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat- (IP_4 -) sensitiver Ca^{2+} -Kanal in der Plasmamembran diskutiert, der direkt an den TCR gekoppelt ist [109], wobei mittlerweile die Rolle von IP_4 bei der Regulation des Ca^{2+} Einstroms in T-Zellen widerlegt wurde [110]. Neuere Ergebnisse

zeigen zwar keinen direkten Einfluss des IP_4 und der IP_4 -bildenden Kinase (IP_3 -3-Kinase Isoform b) auf das Ca^{2+} Signalling, jedoch wurde gezeigt, dass IP_3 -3-Kinase Isoform b-defiziente Mäuse schwere Defekte bei der T-Zell-Selektion und -Differenzierung im Thymus haben [111].

Das am weitesten verbreitete Modell ist das des „kapazitiven Ca^{2+} Einstroms“ [21]. Putney zeigte als erster, dass der Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} über die Entleerung der intrazellulären Speicher reguliert wird und nicht direkt über IP_3 , da die IP_3 -Konzentration nach wenigen Minuten wieder basale Werte erreicht hat, während die Ca^{2+} Konzentration auf konstant erhöhtem Niveau blieb [112]. Das Modell beruht auf dem kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom, wo durch Ca^{2+} -Freisetzung aktivierte Ca^{2+} - (= CRAC-) Kanäle durch den Füllstand von intrazellulären Speichern wie z.B. ER kontrolliert werden [113-115]. Diese zu den SOCs gezählten Kanäle zeichnen sich dadurch aus, dass sie unabhängig von der TCR-Stimulation aktiviert werden können: Thapsigargin führt durch die Inhibition der SERCA zur Entleerung des ER- Ca^{2+} -Speichers, das lipophile Ionophor Ionomycin macht die Membranen für Ca^{2+} durchlässig oder Ca^{2+} Chelatoren blockieren die Ca^{2+} Aufnahme in die Speicher [108, 116]. Wie genau das Signal über die Entleerung der intrazellulären Speicher zu einem Ca^{2+} Einstrom aus dem extrazellulären Raum über die CRAC-Kanäle führt, ist noch unbekannt. Für T-Lymphozyten existieren mehrere Möglichkeiten zur Aktivierung der CRAC-Kanäle [117]: Diskutiert wird ein „Calcium influx factor“ (CIF), der nach der Speicher-Entleerung von intrazellulären Organellen in das Cytosol abgegeben wird [118]. Des weiteren wurde die Beteiligung von G-Proteinen (ggf. auch Kopplung zwischen Plasmamembran-nahen Vesikeln und den Kanälen in der Plasmamembran [119]) oder eine direkte Protein-Protein-Interaktion als Mechanismus zur Weiterleitung des Signals von den entleerten Ca^{2+} Speichern zu den CRAC-Kanälen postuliert [120]. Eine schnelle Inaktivierung des Ca^{2+} Stroms über die CRAC-Kanäle (I_{CRAC}) findet durch extrem hohe Ca^{2+} Konzentrationen statt, wie z.B. bei der photolytischen Freisetzung von „caged“ Ca^{2+} [121]. Außerdem führt eine Auffüllung der intrazellulären Ca^{2+} Speicher in T-Zellen zur Inaktivierung des I_{CRAC} [122]. Auch wenn die Auffüllung der Speicher durch Thapsigargin gehemmt ist, kommt der I_{CRAC} zum Erliegen. Aufrecht erhalten wird der Ca^{2+} Einstrom durch die Aktion der Mitochondrien, die in der Nähe der CRAC-Kanäle lokalisiert sind und das Ca^{2+} aufnehmen, sodass eine Ca^{2+} abhängige Inaktivierung der Kanäle vermieden wird [123].

Besonderes Interesse gilt dem Ca^{2+} Einstrom aus dem extrazellulären Raum, weil erst während der lang anhaltenden, hohen Ca^{2+} Oszillationen die Genexpression, insbesondere des Transkriptionsfaktors NF-AT, und die Zelldifferenzierung in Gang gesetzt wird [124, 125]. Die Bedeutung des Ca^{2+} -Signalwegs bei der Aktivierung von T-Lymphozyten wird dadurch deutlich, dass Immunsuppressiva, wie z.B. Cyclosporin A oder FK506, durch die Inhibition der Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung von NF-AT wirken [126]. Derzeitige Untersuchungen beschäftigen sich mit der Analyse zahlreicher Substanzen, die auf den SOC in T-Zellen wirken können, wie z.B. das kürzlich erst beschriebene Pyrozol Derivat YM-58483 oder ein dem FK506 ähnliches Cytotoxin aus *Helicobacter pylori* [127,

128]. Deutlich wird die Relevanz des Ca^{2+} Einstroms bei einem Defekt dieses Signalwegs: Partiseti et al. beschrieben einen Patienten mit einer Immundefizienz, ausgelöst durch mangelnde Proliferation der T-Lymphozyten, Diese ließ sich auf einen Defekt im Ca^{2+} Einstrom zurück führen [129]. Zum Krankheitsbild der Schwere kombinierten Immundefizienz (SCID) kommt es, wenn durch die Speicher-Entleerung kein Ca^{2+} Einstrom aktiviert wird, was schließlich zu einer komplexen Änderung der Genexpression während der T-Zell Aktivierung führt [130].

Ein letztes Modell des Ca^{2+} Einstroms in T-Zellen über die Plasmamembran favorisiert einen in der Plasmamembran lokalisierten Ca^{2+} Kanal, der über den TCR-CD3-Komplex aktiviert wird. Dieser Prozess wird als TROCE (T-cell receptor-operated Ca^{2+} entry) bezeichnet [117]. Der Mechanismus, wie der putative TROCE aktiviert wird und wie der Ca^{2+} Einstrom in diesem Mechanismus aufrecht erhalten wird, ist noch unklar. Möglicherweise aktiviert die erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über eine positive Feedback Reaktion den TROCE-assoziierten, spannungsabhängigen Ca^{2+} Kanal. Da cADPR den Ca^{2+} Einstrom in T-Lymphozyten hervorruft [131], könnte das durch cADPR freigesetzte Ca^{2+} ähnlich wirken wie das Ca^{2+} bei der Speicherentleerung durch IP_3 [117]. Neuste Ergebnisse belegen den Einfluss eines spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} Kanals auf den Ca^{2+} Einstrom in T-Lymphozyten [132].

1.4 Räumliche und zeitliche Organisation der Ca^{2+} Signale

1.4.1 Subzelluläre Ca^{2+} Signale

Bevor sich nach der Stimulation die beschriebenen globalen Signale in Zellen ausbreiten, findet eine Amplifikation kleiner subzellulärer Signale statt, die auf der Öffnung einzelner oder in Clustern zusammenliegender Rezeptoren beruhen. Je nach intrazellulärem Ca^{2+} Kanal und Zelltyp dauern die subzellulären Signale zwischen wenigen Millisekunden und mehreren Sekunden an und haben einen Durchmesser von einigen hundert Nanometern bei der Öffnung eines einzelnen Kanals bis zu mehreren Mikrometern bei der Öffnung eines Clusters von Kanälen. Unterschieden werden die Blips und Puffs, die auf der Öffnung eines (Blip) oder mehrerer IP_3R (Puff) beruhen, von den Quarks und Sparks, die durch die Öffnung eines (Quark) oder mehrerer RyR (Spark) hervorgerufen werden. Einen Überblick der Charakterisierung der subzellulären Ca^{2+} Signale gibt Tab. 1.1.

Die von Bootman et al. beschriebenen fundamentalen Blips wurden in HeLa-Zellen nach Stimulation mit Histamin beobachtet. Sie weisen einen Durchmesser von $1,3 \mu\text{m}$, eine Anstiegszeit von 12 ms und eine Amplitude von 30 nM auf. Die nächstgrößeren Signale, die Puffs, weisen einen Durchmesser von $4\text{-}7 \mu\text{m}$, eine Anstiegszeit von 360 ms und eine Amplitude >50 nM auf und führen nach Überschreiten einer kritischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zum globalen Ca^{2+} Signal [133]. Die Phase in der nach und nach immer mehr subzelluläre Signale entstehen und immer mehr Rezeptoren rekrutiert werden bezeichnet man als Pacemaker-Phase [134]. Ähnliche Pacemaker Signale wurden in *Xenopus* Oocyten [135], PC12 Zellen

[136, 137] und Endothel-Zellen [138] beobachtet. Wie an unterschiedlichen Zelltypen mit verschiedener Expression der einzelnen IP₃R Subtypen gezeigt wurde, beruhen die Puffs zelltypspezifisch auf einem Subtyp oder der Kombination der einzelnen IP₃R Subtypen [139]. In sekretorischen Zellen, wie z.B. Azinus-Zellen des Pankreas, werden die ersten subzellulären Pacemaker-Signale im apikalen Pol gemessen. Diese Signale unterscheiden sich von den bisher erwähnten Puffs durch eine langsamere Anstiegszeit (>1 s) und einen großen Durchmesser (~10 µm) [140]. In Azinus-Zellen des Pankreas bleiben bei einer geringen Stimuluskonzentration die subzellulären Ca²⁺ Signale auf den apikalen Pol beschränkt, während nach stärkerer Stimulation die Signale Richtung des basalen Pols zurückgeleitet werden. Diese räumliche Beschränkung scheint durch Mitochondrien hervorgerufen zu werden, die geringe Ca²⁺ Konzentrationen puffern können und die Aktivierung von RyR im basalen Pol verhindern [141, 142]. Auch in anderen Zellen konnte gezeigt werden, dass die Mitochondrien den Ca²⁺ Einstrom und die Ca²⁺ Freisetzung aus intrazellulären Speichern modulieren können [143, 144], was möglicherweise an der räumlichen Nähe der Mitochondrien zu den jeweiligen Kanälen liegen kann [145].

| Signal | Gewebe | Stimulus | Dauer (t _{1/2}) | Amplitude | Durchmesser | Ref. |
|---|--------------------------------|---|----------------------------|--------------------|-------------|-------|
| IP₃R vermittelte Signale: | | | | | | |
| Spike | Azinus-Zellen des Pankreas | 25-50 nM ACh 5-20 pM CCK ± Heparin | 2,9 ± 0,2 s 2,5 ± 0,3 s | ~ 50 nM ~ 90 nM | - | [44] |
| Spike | Azinus-Zellen des Pankreas | 15 µM IP ₃ | 1,2 s | - | 4 µm | [146] |
| Spike | Azinus-Zellen des Pankreas | ACh | 3-12 s | bis 1 µM | - | [147] |
| Puff | Azinus-Zellen des Pankreas | IP ₃ ± [Ca ²⁺] _{ex} | >1 s | - | >10 µm | [140] |
| Puff | <i>Xenopus</i> Oocyten | 5-200 nM 3-F-IP ₃ | ca. 500 ms | 140 nM | 4-6 µm | [135] |
| „Hot Spot“ | vaskuläre Muskelzellen | 0,1 units/ml Thrombin | - | 200-500 nM | - | [148] |
| Puff | PC12 neurosekretorische Zellen | 500 nM Bradykinin ± PLC Inhibitor (U73211) | 590±70 ms | ΔR ~ 0,5 | 5,4 µm | [136] |
| Puff | PC12 neurosekretorische Zellen | spontan oder Coffein | ~1 s | - | 5-6 µm | [137] |
| Puff Blip | vaskuläre Endothelzellen | 250 nM ATP | <100 ms | 23 nM 10 nM | 1,3 µm | [138] |

| | | | | | | |
|---------------------------------|---|---|---------------------------------|--|--|---------------|
| Puff | 16 HBE14o- HeLa Zellen HUVEC NIH-3T3 RBL-2H2 SH-SY5Y | 5 μ M ATP 1 μ M Histamin 1 μ M ATP 1 μ M Carbachol | - | 178 \pm 108 nM 127 \pm 143 nM 49 \pm 26 nM 73 \pm 49 nM 42 \pm 28 nM 123 \pm 105 nM | 3,2 \pm 0,8 μ m 3,7 \pm 0,6 μ m 3,1 \pm 0,5 μ m 4,1 \pm 0,8 μ m 2,5 \pm 0,5 μ m 3,0 \pm 0,6 μ m | [139] |
| Blip Puff | HeLa Zellen | 0,5-10 μ M bzw. 100 μ M Histamine | 20-30 ms 360 ms | <40 nM >50 nM | <2 μ m 7 μ m | [133, 149] |
| „lokales Signal“ | Astrozyten | Norepinephrine Glutamat | - | ca. 17 nM | 7-15 μ m | [150] |
| Puff | Vorläuferzellen von Oligodendrocyten | „caged“ IP ₃ | 100 ms | - | 2-3 μ m | [151] |
| RyR vermittelte Signale: | | | | | | |
| STOC | glatte Muskelzellen | | 500 ms | - | - | [152] |
| Spark STOC | glatte Muskelzellen | Depolarisation bei -40 mV \pm Ryanodin | 20 ms 17 ms | 300 nM 20 nM | 2,38 μ m - | [153] |
| Spark | glatte Muskelzellen | | 16 ms Dauer des Abfall | 11,6 \pm 0,29 % | 2,4 \pm 0,04 μ m FWHM | [154] |
| Spark | arterielle vaskuläre glatte Muskelzellen | spontan | ~20 ms Anstieg | 2,23 \pm 0,2 F/F ₀ | 2,25 \pm 0,2 | [155] |
| Spark | glatte Muskelzellen | Depolarisation: -20 \rightarrow -50 mV | ~35 ms | 2,12 \pm 0,03 F/F ₀ | - | [156] |
| einzelne RyR | Skelett- Muskelfaser | Depolarisation: -90 \rightarrow -55/58 mV | - | 30 nM | 300 nm | [157] |
| Spark | Skelett- Muskelfaser | Depolarisation: -90 \rightarrow -70/-60 mV | 32 / 34 ms FDHM | 71 / 140 nM | 2,27 / 2,34 μ m FWHM | [158] |
| Spark | Skelettmuskel nur RyR Typ 3 | spontan 0,1 mM Coffein | 43-45 ms FDHM >100 ms | 1,25-1,55 F/F ₀ - | 2,6-2,7 μ m FWHM - | [159] |
| Spark | Skelettmuskel | spontan | 12-36 ms FDHM | 2,51-3,57 F/F ₀ | 2,05-3,4 μ m FWHM | [160] |
| Spark | Skelettmuskel | DP4 | 16 ms FDHM | 0,6 | 1,8 μ m FWHM | [161] |
| Spark | Herz- Muskelzellen | Depolarisation: -40 \rightarrow -5 – 80 mV | 2-32 ms | F/F ₀ ~ 2 | 2 μ m | [162] |

| | | | | | | |
|-------|--|---|---------------------|---------------------------------|------------------------|-------|
| Spark | Herz-Muskelzellen | Depolarisation: -50 → 5 mV | 60 ms | 250 nM | 1,65 µm | [163] |
| Quark | | Flash-Photolyse von „caged“ Ca ²⁺ | <60 ms | < 250 nM | < 1,65 µm | |
| LTC | Herz-Muskelzellen | Depolarisation: -40 → -30-100 mV | - | 200 nM | 5 µm | [164] |
| Quark | Herz-Muskelzellen | Flash-Photolyse von „caged“ Ca ²⁺ | < 50 ms | 37 ± 6 nM | 0,85 ± 0,2 µm FWHM | [165] |
| Spark | intakte ventrikuläre Myozyten | spontan | 28 ± 1,1 ms FDHM | 1,69 ± 0,02 F/F ₀ | 1,75 ± 0,07 µm FWHM | [166] |
| | | 5 µM Calmodulin | 27 ± 0,6 ms | 1,9 ± 0,03 | 1,93 ± 0,04 µm | |
| | | 5 µM cADPR | 29 ± 1,3 ms | 1,52 ± 0,01 | 1,94 ± 0,09 µm | |
| Spark | permeabilisierte ventrikuläre Myozyten | 5 µM cADPR | 21 ± 1,1 ms FDHM | >2 F/F ₀ | 1,9 ± 0,1 µm FWHM | [167] |
| SMOC | Neuronen (sympathisches Nervensystem) | 10 mM Coffein | <100 ms | - | - | [168] |
| Spark | Vorläuferzellen von Oligodendrocyten | | 30 ms | | 2 µm | [169] |
| Spark | Vorläuferzellen von Oligodendrocyten | spontan | 67 ± 16 ms FDHM | 1,10 ± 0,02 F/F ₀ | 2,4 ± 0,4 µm FWHM | [170] |
| | | 1-2,5mM DPMX | 66 ± 7 ms | 1,31 ± 0,0009 | 2,4 ± 0,2 µm | |
| | | 3 µM MeCh | 69 ± 6 ms | 1,43 ± 0,02 | 1,8 ± 0,1 µm | |
| Spike | Osteoklasten | Serum | 6-40 ms | - | 8-20 µm | [171] |

Tab. 1.1 Charakterisierung subzellulärer Ca²⁺ Signale in verschiedenen Zelltypen. Aufgeteilt werden die subzellulären Signale in die durch den IP₃R und den RyR vermittelten Signale. Verwendete Abkürzungen: STOC – „spontaneous transient outward current“, LTC – „local transient Ca²⁺“, SMOC – „spontaneous miniature outward current“, F/F₀ – gemessene Fluoreszenz/ basale Fluoreszenz, FWHM – „full width at half maximum amplitude“, FDHM – „full duration at half maximum amplitude“, ACh – Acetylcholin, CCK – Cholecystokinin, DP4 – synthetisches Peptid, das an den RyR Typ 1 in der Region Leu²⁴⁴²-Pro²⁴⁷⁷ bindet, 3-F-IP₃ – 3-Deoxy-3-Fluoro-IP₃, DPMX – Caffein-Analogen, MeCh – PLC/IP₃-verknüpfter muscarinerges Agonist

Die subzellulären Ca²⁺ Signale in elektrisch erregbaren Zellen entstammen vornehmlich der Stimulation des RyR, wodurch Ca²⁺ aus dem Sarcoplasmatischen Retikulum (SR) freigesetzt wird. Da die Aktionen wie Depolarisation und mechanische Aktivität ein schnelles Signalling erfordern, sind die Sparks in ihrer Entstehung schneller, räumlich beschränkter und haben meist eine höhere Amplitude als die Puffs. Die von Lipp und Niggli gemessenen Ca²⁺ Sparks nach Depolarisation wiesen einen Durchmesser von 1,65 µm, eine Anstiegszeit von ~ 60 ms und eine Amplitude von 250 nM auf [163]. Noch kleinere subzelluläre Signale, die zu einer prinzipiellen Erhöhung der [Ca²⁺]_i in

der Zelle führten, wurden durch die Freisetzung von „caged Ca^{2+} “ gemessen. Der Durchmesser und die Amplitude dieser Signale waren deutlich kleiner als die der Sparks [165]. Dementsprechend bezeichneten Lipp und Niggli diese subzellulären Signale als Ca^{2+} Quarks, die auf der Öffnung eines oder nur weniger RyR beruhen [163]. Eben solche kleinen Quark-Signale mit einem Durchmesser von 300 nm und einer Amplitude von 30 nM konnten in Skelettmuskelzellen gemessen werden [157]. In glatten Muskelzellen kann Ca^{2+} in Abhängigkeit der räumlichen Ausbreitung die Muskelkontraktion aktivieren oder inhibieren. Das globale Ca^{2+} Signal vermittelt die Kontraktion durch die Aktivierung Ca^{2+} /CaM-abhängiger Enzyme, die Ca^{2+} Sparks führen zur Relaxation durch die Aktivierung Ca^{2+} abhängiger Plasmamembran-ständiger Kaliumkanäle [153]. In arteriellen Schrittmacher-Zellen werden die spontanen Ca^{2+} Sparks durch eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hervorgerufen, die durch den Ca^{2+} Einstrom über spannungsaktivierte Ca^{2+} Kanäle (VOCs) aus dem extrazellulären Raum in die Zelle entstand. Die progressive Ca^{2+} Erhöhung in der Zelle durch die Sparks führt zu verstärktem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austausch, was schließlich zur Depolarisation führt [172]. Ein ähnliches Trigger- Ca^{2+} , das vermutlich der mit den RyR kolokalisierte IP_3R zur Verfügung stellt, wird in Hormon-stimulierten arteriellen Myozyten zur Entwicklung der Sparks benötigt [173].

In myometrialen Zellen ist für die Aktivierung des Typ 3 RyR eine extrazelluläre Ca^{2+} Konzentration von 10 mM notwendig, was darauf hindeutet, dass eine Ca^{2+} Überladung des SR notwendig ist, um subzelluläre Signale auszulösen [174]. Conklin et al. haben die Sparks von Muskelzellen aus RyR Typ 1 knock-out und RyR Typ 3 knock-out Mäusen verglichen. Dabei war zwischen beiden knock-out Zelllinien während der Basalphase kein Unterschied bei der Spark-Amplitude, dem Durchmesser und der Dauer zu finden. Nach Stimulation mit Coffein reagierten jedoch nur die RyR Typ 1 knock-out Zellen mit einer erhöhten Amplitude, was auf die unterschiedlichen Aufgaben der einzelnen Subtypen zurückzuführen ist [159, 175]. Der Typ 3 RyR wird nicht durch Spannungsänderung aktiviert und vermittelt nicht die elektromechanische Kopplung, sondern wirkt vermutlich als essentielle Hilfe des Typ 1 RyR durch Bereitstellung eines Trigger- Ca^{2+} [159]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Rossi et al. in Typ 1 und Typ 3 RyR transfizierten HEK293-Zellen, die zu den elektrisch nicht erregbaren Zellen gehören und erwiesenermaßen keinen endogenen RyR exprimieren. Spontane Sparks sind nur in den ER-Regionen der Typ 3 RyR-transfizierten zu finden, nicht in den Typ 1 RyR transfizierten Zellen. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass der Typ 3 RyR spezifische „Release Units“ bildet und so die subzellulären Ca^{2+} Signale entstehen können [176].

Ob die subzellulären Signale jeweils nur von einem Rezeptortyp abhängen, kann meist nicht genau definiert werden. Während in Muskelzellen im allgemeinen von der Stimulation des RyR ausgegangen wird, konnte die Bedeutung des IP_3R für das langsame Ca^{2+} Signal nachgewiesen werden [177, 178]. Ebenso wurde die Expression des RyR in elektrisch nicht-erregbaren Zellen nachgewiesen, und gezeigt, dass dieser bei der Feinregulation des Ca^{2+} Signals eine entscheidende Rolle spielt [81, 179].

1.4.2 Amplifikation der subzellulären Ca^{2+} Signale in Wellen

Die Amplifikation der subzellulären, elementaren Ca^{2+} Signale führt nach Überschreiten einer kritischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zur globalen Ca^{2+} Welle [8, 180].

Bei wiederholter Stimulation breiten sich diese Wellen immer von den gleichen Orten her aus [133, 149]. Die Geschwindigkeit einer solchen Ca^{2+} Welle beträgt $22 \pm 5,4 \mu\text{m/s}$, wobei die Ausbreitung von einer Seite der Zelle zur anderen stattfindet [181]. Spiralförmige, komplex organisierte Ca^{2+} Wellen wurden in Herzmuskelzellen und in *Xenopus* Oocyten beobachtet [182, 183], wobei sich die Wellen in *Xenopus* Oocyten teilweise planar und teilweise sogar zirkulär ausbreiten.

In Azinus-Zellen des Pankreas breiten sich diese Ca^{2+} Wellen von der IP_3 -reichen T(= trigger)-Zone nach Stimulation mit IP_3 oder Ca^{2+} aus und werden in der granulären Zone über CICR bis in die basale Zone weitergegeben, die nur eine geringe IP_3 -Sensitivität aufweist [184]. Die gleiche Art der Ca^{2+} Wellenausbreitung vom apikalen Pol, wo die IP_3 R lokalisiert sind zum basalen Teil der Zelle stellen auch Thorn et al. bei Azinus-Zellen des Pankreas fest [44]. Diese Organisationsform der Wellen könnte für die Regulation der apikalen Exocytose in Azinus-Zellen wichtig sein [147, 185]. Die Ausbreitung des Ca^{2+} Signals von einer der T-Zone verschiedenen Region wird nach Stimulation der Azinus-Zellen des Pankreas mit cADPR und geringen Ca^{2+} Konzentrationen beschrieben [186]. Die cADPR-vermittelte Ca^{2+} Freisetzung kann durch CCK angeregt und durch Ryanodin inhibiert werden. NAADP verursacht in Azinus-Zellen Ca^{2+} Signale, wobei die Zellen gegenüber NAADP auch in geringen Konzentrationen viel sensitiver sind, als gegenüber cADPR oder IP_3 . Hohe Konzentrationen von NAADP inhibieren selektiv die durch CCK induzierten Ca^{2+} Signale, sodass NAADP offensichtlich als intrazellulärer Botenstoff für die Ca^{2+} Signale agiert [97]. Die Stimulation von Ca^{2+} Signalen in Azinus-Zellen mit ACh dagegen wird nicht durch hohe Konzentrationen von NAADP gehemmt [17]. Daraus wird geschlossen, dass im apikalen Pol die Aktivierung des Ca^{2+} Ausstroms statt findet und IP_3 -, cADPR- und NAADP-Rezeptoren als Cluster zusammenwirken, d.h. die IP_3 - und cADPR-vermittelte Ca^{2+} Freisetzung wirkt als Ca^{2+} Oszillator und Verstärker und die NAADP-vermittelte Ca^{2+} Freisetzung als Trigger [187].

Bei Aszidien-Oocyten breitet sich das Ca^{2+} Signal bei der Befruchtung von der Eintrittsstelle des Spermiums her durch die Eicortex in Wellenform aus [11]. Auch hier konnte gezeigt werden, dass es drei unabhängige Ca^{2+} Signalwege gibt, die jeweils für bestimmte Veränderungen während der Befruchtung verantwortlich sind [11].

Auch in Seeigeln Homogenaten unterscheiden sich die Sensitivitäten der Ca^{2+} Speicher für IP_3 , cADPR und NAADP [98]. So wird die NAADP-vermittelte Ca^{2+} Freisetzung im Gegensatz zur IP_3 - und cADPR-vermittelten Ca^{2+} Freisetzung, die durch cytosolisches Ca^{2+} moduliert wird, nicht durch den Chelator EGTA beeinflusst, d.h. NAADP aktiviert einen Ca^{2+} Freisetzungsmechanismus, der unabhängig von cytosolischem Ca^{2+} ist [95]. Churchill und Galione zeigten, dass der NAADP-induzierte Ca^{2+} Anstieg lokal durch CICR erfolgt, aber für die durch NAADP-vermittelten Ca^{2+} -Wellen unbedingt ein NAADP-Gradient innerhalb des Seeigels notwendig ist [188]. Dabei ist für die

Initiierung der Oszillationen die Ca^{2+} Freisetzung aus NAADP-sensitiven Speichern notwendig und für die anhaltenden Oszillationen die Ca^{2+} Aufnahme und Freisetzung aus CICR-Speichern [189]. Wird über die Freisetzung von „caged“ NAADP im Seeigelei ein lokales Ca^{2+} Signal hervorgerufen, breitet sich das Ca^{2+} Signal nur über die Hälfte des Seeigeleis aus. Bei einer wiederholten NAADP-Freisetzung in der gesamten Zelle befindet sich das Ca^{2+} Signal nur in der noch nicht stimulierten Region der Zelle. Es fand also eine Desensitivierung der bereits vorher angeregten Region der Zelle statt, auch bezeichnet als molekulares Gedächtnis. Werden die gleichen Versuche mit cADPR oder IP_3 durchgeführt, breitet sich die Ca^{2+} Welle auch bei der 2. Stimulation über die gesamte Zelle aus [190]. NAADP ist damit der ideale Botenstoff, um zelluläre Prozesse zu kontrollieren, die räumlich und zeitlich begrenzte Ca^{2+} Erhöhungen erfordern [190].

1.4.3 Oszillationen und subzelluläre Signale in T-Zellen

Im Gegensatz zu anderen Zellen und Geweben wie z.B. Oocyten, Azinus-Zellen des Pankreas, verschiedenen Arten von Muskelzellen oder HeLa Zellen, an denen subzelluläre Ca^{2+} Signale gemessen und charakterisiert wurden (s. Tab. 1.1), gibt es für T-Lymphozyten bislang nur Daten über die Oszillation der Ca^{2+} Signale [131, 191-196]. Der Sinn der oszillierenden Signale ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Für bestimmte Prozesse oder weiterführende Signalwege in der Zelle sind die lokalen Ca^{2+} Erhöhungen notwendig: So wurde beschrieben, dass die Ca^{2+} Oszillationen die Effizienz und die spezifische Expression von Transkriptionsfaktoren (NF-AT, Oct/Oap, NF κ B) in der T-Zelle regulieren [117, 124, 197] und die Aktivität der Calmodulin-abhängige Proteinkinase II steuern [198].

T-Zellen können durch Mikroinjektion von IP_3 oder cADPR zu oszillierenden Ca^{2+} -Signalen angeregt werden, wobei die Injektion von IP_3 im Vergleich zu cADPR zu regelmäßigeren Oszillationen führte [131], dies allerdings nur in Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} [131, 192]. Die Ca^{2+} Anstiege nach IP_3 -Injektion verliefen schnell und nach einem globalen Signal sank die Ca^{2+} Konzentration in der Zelle wieder auf Basalkonzentrationen, bei den Oszillationen wurden annähernd globale Signalamplituden erreicht [131]. Die Injektion einer mittleren Konzentration cADPR (10 μM Pipettenkonzentration) führte im Mittel zu einem langsamen Ca^{2+} Anstieg, auf Einzelzellebene reagierten manche Zellen mit einem globalen, andere mit einem leichten Anstieg, der im allgemeinen etwas verzögert eintrat [131]. Die NAADP-Injektion dagegen löste einen sofortigen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aus, die dann relativ gleichmäßig, von kleinen Ca^{2+} Peaks abgesehen, wieder abfiel [96]. Die durch cADPR vermittelten subzellulären Signale starteten nahe der Plasmamembran, bildeten dann eine Art Ring erhöhter Ca^{2+} Konzentration um die Zelle und setzten sich in den inneren Teil der Zelle fort, wo auch der Kern des T-Lymphozyten lokalisiert ist [131].

Die subzellulären Ca^{2+} Signale, die während der sog. Pacemaker-Phase in mehreren Geweben und Zellen beobachtet wurden (s.o.) und zur globalen Ca^{2+} Welle und dem globalen Ca^{2+} Signal führten, wurden in T-Lymphozyten bislang noch nicht näher analysiert und charakterisiert. Ebenfalls steht

noch die Untersuchung der Funktion der einzelnen Rezeptoren bzw. Second-Messenger bei der Entwicklung der subzellulären Signale aus.

1.5 Mikroskopische Messmethoden

Zur räumlichen Aufnahme und Darstellung von Fluoreszenzsignalen werden verschiedene Arten der Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Eine Übersicht gibt Abb. 1.1.

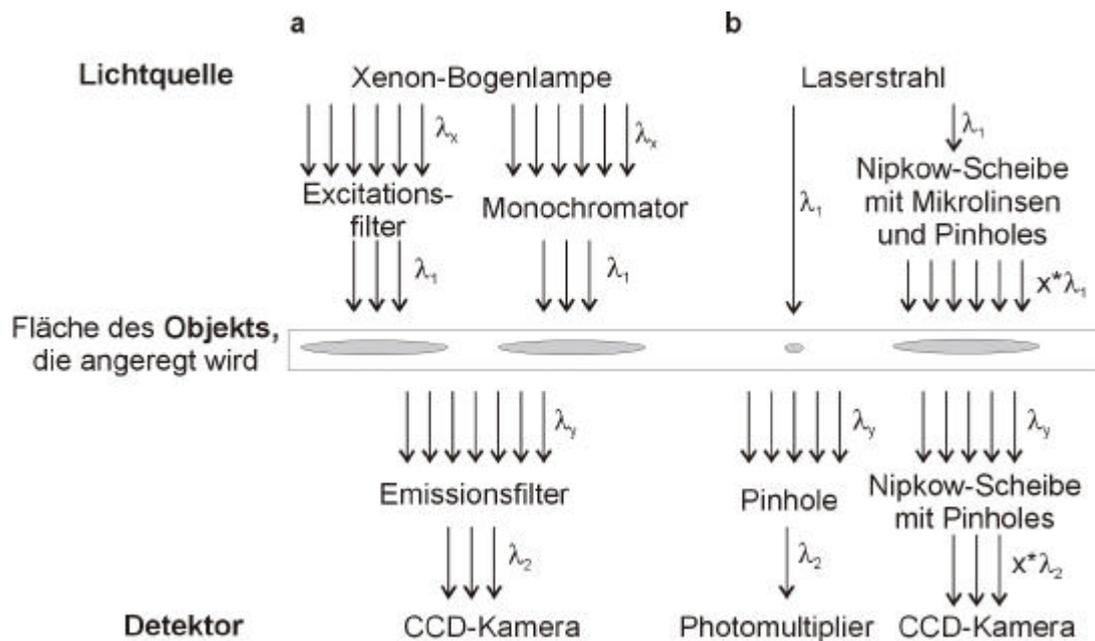


Abb. 1.1 Übersicht über die Methoden der Fluoreszenzmikroskopie. Als Lichtquellen stehen u.a. die Xenon-Bogenlampe und ein Laser zur Verfügung. **a** Die Xenon-Bogenlampe emittiert polychromatisches Licht (λ_x). Das Licht wird durch einen Emissionsfilter oder einen Monochromator geleitet und Licht einer definierten Wellenlänge (λ_1) trifft auf das Objekt. Das vom Objekt emittierte Licht (λ_y) wird über einen Emissionsfilter geleitet und Licht der Emissionswellenlänge (λ_2) wird von einer CCD („charge coupled device“-)Kamera detektiert. **b** Der Laser gibt nur Licht einer bestimmten Wellenlänge (λ_1) ab, welches direkt als gebündelter Strahl punktförmig auf das Objekt fällt oder über eine Nipkow-Scheibe mit Mikrolinsen und eine zweite Nipkow-Scheibe mit Pinholes in viele Strahlen der definierten Wellenlänge ($x \cdot \lambda_1$) aufgeteilt wird und dann eine größere Fläche des Objektes gleichzeitig anregen kann. Das vom Objekt emittierte Licht (λ_y) wird über ein konfokales Pinhole geleitet, sodass nur das Licht mit der Emissionswellenlänge (λ_2) auf den Detektor trifft. Bei der punktförmigen Anregung geschieht die Detektion über einen Photomultiplier. Bei Verwendung des Nipkow-Scheibe Systems wird das gesamte Emissionslicht (λ_y) der größeren Fläche über viele Pinholes, die auf der zweiten Nipkow-Scheibe angeordnet sind, geleitet, und das definierte Emissionslicht (λ_2) von einer CCD-Kamera detektiert.

1.5.1 Die Laser-basierte Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Laser-basierten Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 1.1 b) dient monochromatisches Licht, das von einem Laser abgegeben wird, als Anregungslicht. Dieses Excitationslicht wird bei der Laser-Scanning

Mikroskopie in einem Punkt des Objektes fokussiert (Abb. 1.1 b, links). Das vom Objekt zurückgegebene Fluoreszenzlicht wird durch eine reale Lochblende (= Pinhole) zum Detektor geleitet, sodass nur das Fluoreszenzlicht der fokussierten Ebene detektiert wird [199]. Als Detektor dient ein Photomultiplier, der mit Hilfe einer Photozelle die schwachen Lichtimpulse erkennt und diese Impulse in einen elektrischen Ladungsimpuls umwandelt und verstärkt. Die elektrischen Impulse werden vom Computer in einem Spektrum der Impulshöhen dargestellt [199]. Bei der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie können entweder die gesamte Einzelzelle oder aber kleinere Teilbereiche aufgenommen werden. Beim sogenannten Line-Scan-Verfahren regt der Laserstrahl nur eine wenige μm dünne Linie an [135]. Die Laser-Scanning Mikroskopie weist bei der Aufnahme einer einzelnen Linie durch eine Zelle eine weitaus höhere zeitliche Auflösung auf als die digitale konfokale Fluoreszenzmikroskopie.

Maximale Geschwindigkeiten werden durch die Verwendung eines Laser-basierten Fluoreszenzmikroskops mit einem Nipkow-Scheiben System (Abb. 1.1 b, rechts) erlangt, weil bei einem genügend hellen Fluorophor ein gesamtes Bild innerhalb von 10 ms aufgenommen werden kann [200]. Durch die Mikrolinsen in der rotierenden Nipkow-Scheibe wird der Laser-Strahl aufgespalten, wird durch die korrespondierenden Pinholes auf einer zweiten Nipkow-Scheibe fokussiert und fällt dann durch die Linse des Objektivs auf das Objekt. Das emittierte Fluoreszenzlicht nimmt den gleichen Weg zurück über die Linse des Objektivs, durch die Pinholes und dann über einen Strahlenteiler auf die CCD-Kamera [201]. Zwar ist das Nipkow-Scheiben System extrem schnell auch für die Aufnahme größerer Bereiche, aber nicht effizient genug, um schwache Fluoreszenzen zu erfassen.

Durch die Zwei- oder Multi-Photonen Mikroskopie lassen sich vor allem tief in lebenden, licht-absorbierenden Geweben Fluoreszenzsignale nachweisen [200, 202, 203]. Nachteil dieser Methoden ist ggf. die starke Schädigung des Gewebes durch die hohen Lichtintensitäten.

1.5.2 Die digitale konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Die Xenon-Bogenlampe erzeugt polychromatisches Licht, das über einen Excitationsfilter oder einen Monochromator geleitet wird, sodass nur Licht einer definierten Wellenlänge auf das Objekt fällt (Abb. 1.1 a). Das vom Objekt emittierte Licht wird über einen Emissionsfilter geleitet und von einer CCD-Kamera aufgenommen.

Bei der digitalen konfokalen Fluoreszenzmikroskopie wird das Streulicht aus anderen Zellebenen, deren Daten ebenfalls aufgenommen wurden, über einen mathematischen Algorithmus herausgerechnet, wodurch die maximale räumliche Auflösung von fluoreszierenden Proben mit der digitalen konfokalen Fluoreszenzmikroskopie erreicht werden kann [204]. Als mathematische Algorithmen stehen der no neighbor, der nearest neighbor, der multiple neighbor Algorithmus und eine iterative Methode zur Verfügung. Bei dem no neighbor Algorithmus wird mathematisch definiertes Streulicht zur Berechnung des dekonvolvierten Bildes herangezogen. Zur Berechnung des konfokalen Bildes mit dem nearest neighbor Algorithmus werden jeweils das real gemessene

Streulicht aus der Ebenen oberhalb und unterhalb der Probe herangezogen. Entsprechend gehen bei dem multiple neighbor Algorithmus das Streulicht einer definierten Anzahl von Ebenen in die Berechnung des konfokalen Bildes ein. Bei den beschriebenen Algorithmen findet durch die Wahl einer virtuellen Lochblende (dem Pinhole bei Laser-Anregung vergleichbar) vor allem eine Schärfung der vorhandenen sichtbaren Fluoreszenzsignale statt. Bei der iterativen Methode wird zum einen das Streulicht der gemessenen Ebenen über- und unterhalb der Fokusebene entfernt, aber zusätzlich Licht aus der Fokusebene in diese zurückgegeben, wodurch ein noch schärferes konfokales Bild entsteht. Der Unterschied dieser Methoden liegt vor allem in der Geschwindigkeit der Datenaufnahme und der Auswertung der Daten. Bei dem no neighbor Algorithmus wird die maximale Geschwindigkeit des Messstandes ausgenutzt und es werden ohne Zeitverzögerung Daten auf der Fokusebene akquiriert. Bei Verwendung des nearest neighbor Algorithmus verlängert sich die Zeit für die Datenaufnahme eines konfokalen Bildes um den Faktor der Ebenen, die aufgenommen werden, denn für die Berechnung eines konfokalen Bildes sind bei Verwendung des nearest neighbor Algorithmus 3 Rohdatenbilder notwendig: oberhalb der Fokusebene, die Fokusebene selbst und unterhalb der Fokusebene. Weiterhin werden für die Datenaufnahme über und unter der Fokusebene einige Millisekunden benötigt, um die beiden Ebenen über und unter der Fokusebene anzusteuern. Die zeitliche Auflösung ist bei Ca^{2+} Messungen von Bedeutung, bei der Aufnahme von immunhistochemischen Studien an fixierten Proben spielt sie jedoch keine Rolle [205, 206]. So lohnt es sich bei Proteinlokalisationsstudien in fixierten Zellen auf mehreren (>5) Ebenen Daten zu akquirieren und mit in die Berechnung des konfokalen Bildes einzubeziehen. Dieser Algorithmus wird dann als multiple neighbor Algorithmus bezeichnet. Die Berechnung der konfokalen Daten mit einem der neighbor Algorithmen ist für ein Bild in kurzer Zeit abgeschlossen, je nach Anzahl der einbezogenen Nachbarn dauert die Berechnung wenige Sekunden bis zu 3 Minuten. Bei Verwendung der iterativen Methode, wo Streulicht rechnerisch wieder der Fokusebene zugeführt wird, dauert die Berechnung eines konfokalen Bildes bis zu mehreren Stunden.

1.5.3 Methodenvergleich

Für die Analyse der subzellulären Ca^{2+} Signale wurde von anderen Autoren meist ein Laser-Scanning Mikroskop eingesetzt. Ein für die Ca^{2+} Messungen entscheidender Unterschied zwischen der digitalen konfokalen und der Laser-Scanning Fluoreszenzmikroskopie ist die zeitliche Auflösung der subzellulären Signale.

Bei der Messung von intrazellulären Ca^{2+} -Signalen mit einem Laser-Scanning Mikroskop wurde bei der Aufnahme einer gesamten GH_4C_1 -Hypophysen-Zelle eine zeitliche Auflösung von 4-7 s pro Bild erreicht [207]. Bei einem Line-Scan, also der Aufnahme einer einzelnen Linie durch die Zelle, wurden dagegen nur 17 ms je Aufnahme bzw. Linie benötigt [207]. Yao et al. verwendeten ein neues System für die konfokale Laser-Scanning Mikroskopie, mit dem sie eine höhere zeitliche Auflösung als mit den herkömmlichen Systemen erreichten [135]. Mit dem System wurden für die Aufnahme eines Line-

Scans durch die *Xenopus* Oocyte 64 μ s benötigt. So konnte in zahlreichen Zellsystemen die Entwicklung von subzellulären Ca^{2+} Signalen beobachtet werden.

Bei den Ca^{2+} Messungen wird die Wellenlänge des Lasers nach dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff gewählt. Zur Verfügung stehen eine Reihe von Farbstoffen, wie z.B. Fluo-3 oder Ca^{2+} -Green, Ca^{2+} -Orange und Fura-Red. Nachteil dieser Farbstoffe ist, dass sie nur bei einer Wellenlänge Licht emittieren, und so die Farbstoffverteilung, das Ausbleichen des Farbstoffs und die unterschiedliche Farbstoffaufnahme in einzelne Organellen zu Fehlern bei der Bestimmung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führen kann [208]. Abhilfe kann durch Verwendung des Farbstoffe Indo-1 geschaffen werden, der jedoch über einen kostspieligen Argon-Laser angeregt werden muss [199].

Die Amplituden der Ca^{2+} Signale werden meist als Fluoreszenzratio (F/F_0) ausgewiesen [167, 170]. Der Abgleich findet gegen die Hintergrundfluoreszenz F_0 statt, die zu Beginn der Messung aufgenommen wurde. Eine Kalibrierung der Fluoreszenzen ist durchaus möglich, bezieht sich jedoch auf ein Ratio, das mit einem Wert vom Aufnahmebeginn gebildet wurde [139].

Protein-Lokalisationsstudien können mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop ebenfalls betrieben werden, soweit der Laser die für den Fluoreszenzfarbstoff notwendige Anregungswellenlänge besitzt. Hier zeigt sich die beschränkte Anwendungsmöglichkeit eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops, denn ein Laser kann nur in ganz definierten Wellenlängen anregen, für jede weitere Färbung wird ein neuer Laser notwendig [209].

Mit der digitalen Fluoreszenzmikroskopie wurden mit der Geschwindigkeit von 812 Ratios/s Ca^{2+} -Wellen in PC12 Neuronen gemessen [210]. O'Rourke et al. konnten mit dem von ihnen verwendeten messtechnischen Aufbau 100 Bilder/s aufnehmen [211]. Dieses reichte aus, um kurzlebige Ca^{2+} Signale und Kontraktionen in Fura-2 beladenen Herz-Muskelzellen zu analysieren. Teilweise wurden aber auch nur 2 Ratios/s gemessen, womit trotz der relativ langsamen Geschwindigkeit die wellenförmige Entwicklung einer Ca^{2+} -Welle in Chondrozyten sowohl räumlich als auch zeitlich aufgelöst wurde [212]. Bei humanen Thrombozyten wurden die Oszillationen der Calciumkonzentration bei einer Aufnahmezeit von etwas mehr als 1 Ratio/s beobachtet [213].

Da in Verbindung mit einem Fluoreszenzmikroskop in der Regel mit einem Monochromator gearbeitet wird, kann jede beliebige Wellenlänge als Anregungswellenlänge verwendet werden. Für Ca^{2+} Messungen bieten sich die ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 oder Indo-1 an. Fura-2 wird bei 340 und 380 nm angeregt und emittiert bei 510 nm, Indo-1 wird bei 351 nm angeregt und hat zwei Emissionsmaxima bei 405 nm in der Ca^{2+} -gebundenen Form und 485 nm in der Ca^{2+} -freien Form. Die Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wird als Ratio zwischen den beiden Fluoreszenzintensitäten gemessen. Durch die Messung mit ratiometrischen Farbstoffen kann eine ungleichmäßige Farbstoffverteilung innerhalb der Zelle, das Ausbleichen des Farbstoffes und die unterschiedliche Verteilung des Farbstoffes in den einzelnen Zellen ausgeglichen werden [199, 200].

Für Immunfärbungen eignet sich ein Fluoreszenzmikroskop hervorragend. Der entscheidende Vorteil eines Fluoreszenzmikroskops mit angeschlossenem Monochromator ist die variable Wahl der Anregungswellenlänge. Die Anzahl der Excitationswellenlängen und damit auch die Anzahl der Colokalisationen ist allein durch die vorhandenen Filtersets begrenzt. Diese müssen so konstruiert sein, dass nur die Emissionswellenlänge der gewünschten Lokalisation durchgelassen wird, jedoch die Doppel- oder Dreifachfärbung nicht gleichzeitig Licht emittiert [209]. Überlappende Fluoreszenzen können im Nachhinein durch entsprechende mathematische Algorithmen so modifiziert werden, dass sich die Excitationsfluoreszenzen klar voneinander abtrennen lassen („spectral un-mixing“, [214]).

Ein Vorteil der nachträglichen Bildbearbeitung bei der Fluoreszenzmikroskopie ist die variable Wahl des konfokalen Pinholes. Für die Ca^{2+} Messungen kann die Konfokalität optimiert werden und bei den Lokalisationsstudien können auch schwache Färbungen noch sichtbar gemacht werden, während ein Laser-Scanning Mikroskop mit einem fest eingestellten Pinhole arbeitet. Weiterhin kann zwischen einem schnellen Auswerten mittels des multiple neighbor Algorithmus und der zeitintensiveren iterativen Methode gearbeitet werden, um das optimale Ergebnis zu erhalten.

2 Problemstellung

Subzelluläre Ca^{2+} Signale geben wichtige Informationen über die funktionelle Struktur der intrazellulären Ca^{2+} Speicher. Aktivitäten wie z.B. Puffs oder Sparks repräsentieren elementare Ereignisse der Ca^{2+} Freisetzung aus intrazellulären Speichern durch die Stimulation des IP_3R und RyR . Die subzellulären Ca^{2+} Pacemaker-Signale werden bei Überschreiten einer Schwellenkonzentration zum globalen Ca^{2+} Signal koordiniert, welches eine Vielzahl weiterer Prozesse in Zellen reguliert, wie z.B. in T-Zellen die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren. Untersuchungen dieser grundlegenden ersten Ca^{2+} Ereignisse sind daher für das Verständnis von Ca^{2+} Signalen und Ca^{2+} Wellenentwicklung unerlässlich.

Bisher wurden Untersuchungen der subzellulären Ca^{2+} -Signale mit Bestimmung ihrer Amplitude, Dauer, Durchmesser und Frequenz sowie der Geschwindigkeit der wellenförmigen Ausbreitung des Ca^{2+} Signals zum globalen Signal mit Zuordnung des Signalursprungs zu IP_3R oder RyR an einigen Zellen und Geweben durchgeführt.

Dagegen wurden in T-Lymphozyten bisher nur Ca^{2+} Oszillationen und lokale Ca^{2+} Signale beobachtet, eine genaue Charakterisierung der subzellulären Signale und Zuordnung zu den Ca^{2+} Signalling Rezeptoren IP_3R und RyR stand noch aus. Des Weiteren war noch nicht geklärt, ob und welchen Beitrag der Second-Messenger cADPR zu den Pacemaker-Signalen in T-Lymphozyten oder in 3T3 Fibroblasten leistet.

Ziel dieser Arbeit war zunächst eine methodische Entwicklung zur Charakterisierung der subzellulären Ca^{2+} Signale. Mit dieser Methode sollten in Jurkat T-Lymphozyten die subzellulären Ca^{2+} Signale während der Pacemaker-Phase bezüglich ihrer Amplitude, ihres Durchmessers und ihrer Frequenz analysiert werden und mit der lokalen Expression der Rezeptoren korreliert werden. Von Interesse war außerdem die Analyse der subzellulären Ca^{2+} Signale während der langanhaltenden Phase.

Weiterhin sollte die Relevanz des cADPR/RyR-Signalwegs für der Entwicklung der subzellulären Ca^{2+} Signale aufgeklärt werden. Hierfür standen ein Typ 3 RyR knock-down T-Zell-Klon und ein entsprechender Kontrollklon zur Verfügung, die nach physiologischer Stimulation des TCR/CD3-Komplexes, nach direkter Stimulation über cADPR und nach Stimulation durch ein neu entwickeltes cADPR-Analogon verglichen werden sollten.

Parallel zu den T-Lymphozyten sollte der Einfluss von cADPR auf die Amplifikation der subzellulären Ca^{2+} Signale in 3T3 Fibroblasten charakterisiert werden. Die subzellulären Signale sollten bezüglich ihrer Ausbreitung und bezüglich Amplitude, Durchmesser und Frequenz analysiert mit den Ergebnissen der T-Lymphozyten verglichen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Medien, Puffer, Chemikalien

Zellkulturmedien:

- Kompletmedium für die Jurkat T-Lymphozyten
 - RPMI 1640-Medium mit Glutamax I Invitrogen, Karlsruhe
 - HEPES, 25 mM, pH 7,4, sterilfiltriert Biomol, Hamburg
 - neugeborenes Kälberserum, 7,5%, 30 min bei 56°C inaktiviert Biochrom, Berlin
 - Penicillin/Streptomycin, (100 U/ml; 50 µg/ml) Invitrogen, Karlsruhe
- Kompletmedium für die Tet-On Klone
 - RPMI 1640-Medium mit Glutamax I Invitrogen, Karlsruhe
 - HEPES, 25 mM, pH 7,4, sterilfiltriert Biomol, Hamburg
 - Penicillin/Streptomycin, (100 U/ml; 50 µg/ml) Invitrogen, Karlsruhe
 - fötales Kälberserum, 10%, 30 min bei 56°C inaktiviert Biochrom, Berlin
 - Na-Pyruvat, 1 mM Invitrogen, Karlsruhe
 - Hygromycin, 50 µg/ml Invitrogen, Karlsruhe
 - Geneticin G-418, 100 µg/ml Invitrogen, Karlsruhe
- Medium für die 3T3 Fibroblasten
 - Dulbecco´s MEM mit Glutamax I Invitrogen, Karlsruhe
 - fötales Kälberserum, 10%, 30 min bei 56°C inaktiviert Biochrom, Berlin
 - Penicillin/Streptomycin, (100 U/ml; 50 µg/ml) Invitrogen, Karlsruhe

Puffer:

- Calciummesspuffer, pH 7,4 (eingestellt mit NaOH)
 - 140 mM NaCl Merck, Darmstadt
 - 5 mM KCl Merck, Darmstadt
 - 1 mM MgSO₄*7H₂O Merck, Darmstadt
 - 1 mM CaCl₂*2H₂O Merck, Darmstadt
 - 20 mM HEPES Biomol, Hamburg
 - 1 mM NaH₂PO₄ Merck, Darmstadt
 - 5,5 mM Glucose Merck, Darmstadt

- intrazellulärer Puffer, pH 7,2 (eingestellt mit NaOH)
 - 20 mM HEPES Biomol, Hamburg
 - 110 mM KCl Merck, Darmstadt
 - 10 mM NaCl Merck, Darmstadt
 - 2 mM MgCl₂*6H₂O Merck, Darmstadt
 - 5 mM KH₂PO₄ Merck, Darmstadt
- 1x PBS, pH 7,3 (eingestellt mit HCl)
 - 137 mM NaCl Merck, Darmstadt
 - 2,7 mM KCl Merck, Darmstadt
 - 4,3 mM Na₂HPO₄* 7H₂O Merck, Darmstadt
 - 1,4 mM KH₂PO₄ Merck, Darmstadt

sonstige Chemikalien:

- Trypsin-EDTA (10x) (0,5 % Trypsin, 5,3 mM EGTA) Invitrogen, Karlsruhe
- Fura-2/AM, 1 mg/ml in DMSO Calbiochem, Bad Soden
- Ionomycin, 150 µM in DMSO Calbiochem, Bad Soden
- Tris/EGTA-Eichlösung, pH 7,4 (eingestellt mit 30%-iger HCl):
 - 3 M Tris base Sigma, Deisenhofen
 - 400 mM EGTA in A. bidest. Sigma, Deisenhofen
- Rinderserumalbumin (BSA) 5 mg/ml in A. bidest. Sigma, Deisenhofen
- Poly-L-Lysin, Mol. Wt. 30.000-70.000 Sigma, Deisenhofen
0,1 mg/ml in A. bidest.
- Baysilone, mittelviskos Bayer, Leverkusen
- α-CD3 Antikörper OKT3, 1 mg/ml (Maus) per Affinitäts-Chromatographie an G-Sepharose aufgereinigt
- cADPR Sigma, Deisenhofen
- ATP Sigma, Deisenhofen
- Bisbenzimid H33258 Fluorochrom Calbiochem, Bad Soden
- MitoTracker Orange Molecular Probes, Leiden, Niederlande
- BODIPY FL Thapsigargin Molecular Probes, Leiden, Niederlande
- BODIPY FL-X Ryanodin Molecular Probes, Leiden, Niederlande
- α-IP₃R Antiserum (Kaninchen) Calbiochem, Bad Soden
- α-IP₃R Antikörper subtypspezifisch (Ziege), mit jeweils entsprechendem Blocking-Peptid Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

- | | |
|---|---------------------------------------|
| • FITC konj. Ziege α -Maus Zweitantikörper | Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| • Rhodamin Rot konj. Ziege α -Kaninchen Zweitantikörper | Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| • Alexa-568 konj. Kaninchen α -Ziege Zweitantikörper | Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| • Thapsigargin | Calbiochem, Bad Soden |
| • Ryanodin | Calbiochem, Bad Soden |
| • Para-Formaldehyd | Sigma, Deisenhofen |
| • Methanol | Merk, Darmstadt |

3.1.2 Geräte

| | |
|--|---------------------------------|
| Varifuge 3.0R | Heraeus, Hanau |
| Mikrozentrifuge Biofuge fresco | Heraeus, Hanau |
| CO ₂ -Inkubator | Heraeus, Hanau |
| Sterile Werkbank | BDK, Sonnenbühl-Genkingen |
| Hämozytometer mit Teilung nach Neubauer | Helma, Müllheim (Baden) |
| Inversmikroskop | Leitz, Wetzlar |
| Casy-Zellzähler | Schärfe Systems, Reutlingen |
| Imaging Messstation mit Openlab Software Version 3.0.9 bestehend aus: | Improvision Systems, Heidelberg |
| – Monochromator II oder IV mit Lichtquelle | Till Phototonics, Gräfeling |
| – CCD-Kamera mit Camera Controller Orca C4742-95- 12NRB oder –12ER | Hamamatsu, Enfield |
| – Fluoreszenzmikroskop DM IRBE oder IRB2 mit Piezo- Stepper | Leica |
| – Computer (G3 oder G4) | Apple |
| – Jaz Drive (2GB) | Iomega |
| – CD-Brenner (6x4x16) | Lacie oder Apple |
| Mikromanipulator 5171 mit Femtotips II | Eppendorf, Hamburg |
| Transjektor 5246 | Eppendorf, Hamburg |

3.2 Zellbiologische Aspekte

3.2.1 Zellkultur

Jurkat T-Lymphozyten (Subklon JMP) wurden in Kompletmedium kultiviert und bei 37°C und 5% CO₂ in Luft im Brutschrank gehalten. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen mit frischem Kompletmedium

verdünnt, um bei einer Wachstumsrate von 1,8/d eine Zelldichte zwischen $0,3 \cdot 10^6$ und $1,2 \cdot 10^6$ Zellen/ml aufrecht zu erhalten. Die Zelldichte wurde am Casy-Zellzähler überprüft, die Morphologie der Zellen unter dem Inversmikroskop beobachtet. Die Kultivierung der Tet-On Klone erfolgte auf gleiche Weise mit dem entsprechenden Tet-On Komplettmedium.

Die 3T3 Fibroblasten wurden in DMEM Komplettmedium ebenfalls bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden alle 34 Tage im konfluenten Zustand verdünnt. Dafür wurden die adhärennten Zellen zunächst mit 10 ml 1x PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin (auf 1x mit PBS verdünnte Stammlösung) für 2-3 min inkubiert und durch leichtes Klopfen an der Zellkulturflasche vom Boden abgelöst. Der Trypsinverdau wurde mit DMEM Komplettmedium gestoppt, die Zellen 1:10 verdünnt und in eine neue Zellkulturflasche überführt.

3.2.2 Präparation peripherer T-Zellen

Die Isolation peripherer T-Lymphozyten wurde in Kooperation mit dem Labor von Prof. Fritz Koch-Nolte (Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) durchgeführt.

50 ml frisch abgenommenes Blut wurde für 10 min bei 5°C und 1600 rpm über eine Dichtegradienten-Zentrifugation unter Verwendung von Accuspin™-Röhrchen mit Histopaque®-1077 in die Bestandteile Erythrozyten, mononucleäre Zellen und Plasma aufgetrennt. Der Überstand, bestehend aus Plasma und mononucleären Zellen, wurde abgenommen, mit 5 ml PBS gewaschen und wieder 10 min bei 5°C und 1600 rpm abzentrifugiert. Das Plasma wurde abgenommen und kühl gestellt, um das RPMI-Medium für spätere Messungen zu komplettieren. Das Pellet wurde in 10 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl per Hämozytometer gezählt. Nach einem weiteren Waschschrift mit 5 ml PBS wurde das Zellpellet in 400 µl PBS gelöst und mit 80 µl des Hapten Antikörper Cocktails (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) versetzt. Das Gemisch wurde für 10 min bei 10°C inkubiert. Bei diesem Schritt wurden B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, dendritischen Zellen, erythroiden Vorläuferzellen, Blutplättchen und basophilen Granulozyten durch Hapten-konjugierte CD11b, CD16, CD19, CD36 und CD56 Antikörper markiert. Nach der Inkubation wurden die Zellsuspension 3 mal mit je 5 ml PBS gewaschen und nach der letzten Zentrifugation das Pellet in 400 µl PBS aufgenommen. Es folgte eine Inkubation mit 80 µl α-Hapten Microbeads für 15 min bei 10°C. Diese magnetischen α-Hapten Microbeads koppeln an die Hapten-konjugierten Antikörper. Die Zellen wurden wieder wie oben beschrieben mit 3 mal mit je 5 ml PBS gewaschen und das Pellet anschließend in 500 µl PBS mit 1% BSA aufgenommen. Diese Suspension wurde auf die mit 3 ml PBS mit 1% BSA kalibrierte Magnetsäule (MACS Typ BS, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) gegeben, wo die markierten mononucleären Zellen hängen bleiben. Abschließend wurde die Magnetsäule mit 6 ml PBS mit 1% BSA gewaschen und das gesamte T-Zell-Eluat aufgefangen. Bis zur weiteren Messung wurden die Zellen auf Eis verwahrt.

Die T-Zell-Präparationen enthielten > 95% CD3⁺ Zellen, wie über Färbung mit Phycoerythrin-konjugiertem α -CD3-Antikörper und Durchflusszytometrie an einem FACS-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg) von der Arbeitsgruppe von Prof. Koch-Nolte gezeigt wurde [215].

3.2.3 Beladung mit Fura-2/AM

Die Beladung der T-Zellen erfolgt nach Guse et al. [34]: $1 \cdot 10^7$ T-Lymphozyten wurden bei Raumtemperatur und 1600 rpm (550g) 4 min abzentrifugiert und anschließend in 1 ml auf 37°C vorgewärmtem RPMI Komplettmedium resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei 37°C wurden 4 μ l des membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2/AM (Endkonzentration von 4 μ g/ml) zugesetzt, durch Schwenken mit der Zellsuspension vermischt und 15 min bei 37°C inkubiert. Da der Farbstoff ausbleichen kann, erfolgte dieser und alle weiteren Arbeitsschritte unter Lichtausschluss. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen 1:5 mit Komplettmedium verdünnt und wiederum 15 min inkubiert. Bei Fura-2/AM handelt es sich um einen membranpermeablen Acetoxymethylester. Während der Inkubationszeit diffundiert der Fluoreszenzfarbstoff durch die Membran in alle Zellkompartimente. Die ausschließlich im Cytosol vorkommenden unspezifischen Esterasen spalten die Acetoxymethylestergruppen ab, und die Fura-2 freie Säure kann aufgrund der negativen Ladung die Zellen durch die Membran nicht mehr verlassen. Fura-2 freie Säure komplexiert mit den Carboxylgruppen das Ca^{2+} und die darauf folgende Fluoreszenzänderung dient der Bestimmung des im Cytosol befindlichen Calciums [216]. Um das überschüssige Fura-2/AM zu entfernen, wurden die Zellen mit 4 ml Ca^{2+} Messpuffer gewaschen und anschließend in 4 ml Ca^{2+} Messpuffer aufgenommen. Bis zur Messung wurden die Zellen bei Raumtemperatur lichtgeschützt aufbewahrt.

Für die Beladung der peripheren T-Lymphozyten mit dem Ca^{2+} -Indikator Fura-2/AM wurden die Zellen abzentrifugiert, in RPMI-Medium mit 10% Plasma aufgenommen und nach dem gleichem Protokoll wie die Jurkat T-Lymphozyten mit Fura-2/AM beladen. Statt Komplettmedium wurde jedoch RPMI mit 10% Plasma verwendet.

Die Beladung der 3T3 Fibroblasten erfolgte in sogenannten „Chamberslides“ (Nalge Nunc International, Naperville, USA) mit 4 Kammern. Die Zellen wurden am Vortag so ausgesät, dass am Messtag einzelne Zellen auf der Oberfläche zu unterscheiden waren. Das Gesamtvolumen pro Kammer betrug 500 μ l. Pro Kammer wurden 2 μ l Fura-2/AM (Endkonzentration 4 μ g/ml) zugesetzt und für 30 min bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach 2-maligem Waschen mit je 500 μ l Ca^{2+} Messpuffer wurden auf die Zellen 200 μ l Ca^{2+} Messpuffer gegeben und die Messung gestartet.

3.2.4 Calciummessung an Einzelzellen

Die Messung der Calciumkonzentration der T-Lymphozyten erfolgte auf Deckgläschen (21 x 56 mm, Stärke 0,13-0,17 mm; Marienfeld, Hamburg). Um eine Voraktivierung der zu messenden Zellen durch die SiO^- -Gruppen der Glasdeckgläschen zu vermeiden, wurden die Deckgläschen mit 5 μ l BSA (5

mg/ml) beschichtet. Um die Anheftung der Zellen zu verbessern, wurde dann mit 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin beschichtet. Nach Trocknen der Beschichtung wurden als Messkammer O-Ringe mit einem Durchmesser von 10 mm mit Siliconfett (Baysilone) auf den Deckgläschen befestigt und die Messkammer mit dem Fett abgedichtet [131].

In die kleine Kammer wurden 60 μ l Calciummesspuffer und 40 μ l Zellsuspension gegeben, sodass unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 100-facher Vergrößerung im Auflicht Einzelzellen beobachtet werden konnten.

Die Stimulation der T-Zellen erfolgte durch den gegen CD3 gerichteten Antikörper OKT3, durch die Mikroinjektion von IP_3 oder cADPR oder durch die extrazelluläre Zugabe von cyclischem Inosindiphospho-Ribose-Ether (cIDPRE). Je nach Messanforderung wurden die Deckgläschen nach der BSA- und Poly-L-Lysin-Beschichtung mit 1 μ l der 1 mg/ml OKT3-Stammlösung beschichtet, oder OKT3 wurde in der Endkonzentration von 1 – 10 μ g/ml nach definierter Zeit zu der Zellsuspension pipettiert. Bei OKT3 handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der den CD3-Komplex der T-Lymphozyten stimuliert und damit eine der Stimulation durch prozessiertes Antigen ähnliche Aktivierung hervorruft. Ein Aspekt der Aktivierung ist die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, die sich aus Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern und aus Ca^{2+} -Influx aus dem die Zellen umgebenden Extrazellulärraum in das Cytosol zusammensetzt.

Die 3T3 Fibroblasten wurden durch die Zugabe von 100 μ M ATP Endkonzentration stimuliert. In mikromolaren Konzentrationen stimuliert ATP in Fibroblasten den P2Y Rezeptor, was zur IP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Freisetzung führt [37, 217, 218].

3.2.5 Prinzip der ratiometrisch-fluorimetrischen Messung mit Fura-2

Fluoreszierende Substanzen können bei Bestrahlung mit einer bestimmten Wellenlänge Energie aufnehmen und diese innerhalb von 10^{-9} s als Licht einer anderen, längeren Wellenlänge wieder abgeben. Das Emissionsmaximum von Fura-2 liegt bei 510 nm. Die Fluoreszenzintensität von Fura-2 nimmt nach Anregung mit 340 nm nach der Bindung von Calciumionen zu, während die Intensität nach Anregung mit 380 nm abnimmt (Abb. 3.1). Aus diesen beiden Intensitäten, die nicht im gleichen Verhältnis ansteigen bzw. abfallen, wird das Ratio 340/380 gebildet. Nach entsprechender Kalibrierung (s. Kap. 3.3.7) kann für jeden Ratiowert die zugehörige $[Ca^{2+}]_i$ berechnet werden. Alternativ kann zur Bildung des Ratios auch die Wellenlänge des isosbestischen Punkts bei 360 nm verwendet werden.

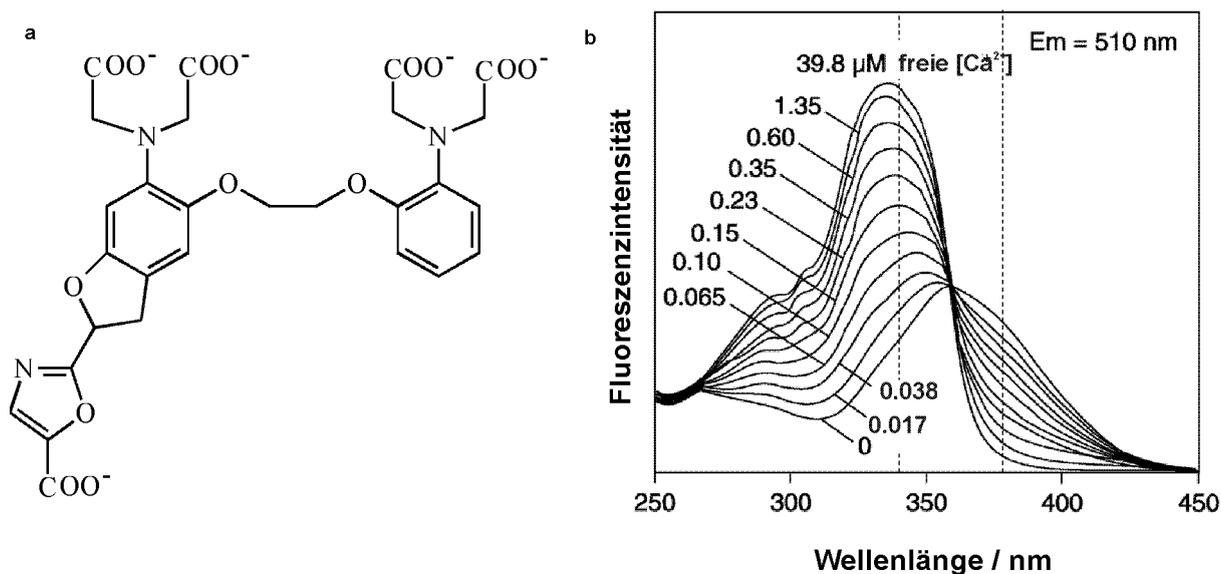


Abb. 3.1 Fura-2 als Fluoreszenzfarbstoff **a** Struktur von Fura-2. Fura-2 ist aufgrund seiner Ähnlichkeit zu EGTA in der Lage, mit hoher Affinität Ca^{2+} zu binden. **b** Anregungsspektrum von Fura-2. Dargestellt ist die Fluoreszenz bei 510 nm in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge. Das Anregungsspektrum ändert sich mit der Konzentration an freien Calciumionen in der Lösung. Die für die ratiometrisch-fluorimetrische Bestimmung der Calciumkonzentration verwendeten Anregungswellenlängen 340 und 380 nm sind mit gestrichelten Linien markiert (verändert nach [219]).

3.2.6 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion von cADPR wurde mit einem Mikromanipulator (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) durchgeführt. Wie für die Messungen der mit OKT3 stimulierten T-Zellen beschrieben, wurde eine verdünnte Zellsuspension auf mit BSA und Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen gegeben. Nach dem Anheften der Zellen wurde die Mikroinjektionspipette (Femtotip II, Eppendorf, Hamburg) zunächst auf die Injektionsebene positioniert und das zLimit für die Injektion bestimmt. Dann wurde die Pipette direkt oberhalb der Zelle positioniert und die Messung gestartet. Der Kompensationsdruck betrug 40 hPa, der Injektionsdruck 80 hPa, die Injektionszeit 0,5 s und die Injektionsgeschwindigkeit 600 $\mu\text{m/s}$ [96]. Nach der Verwendung neuer Injektionspipetten eines anderen Lots wurden die Parameter verändert: der Kompensationsdruck betrug 25-30 hPa, der Injektionsdruck 40 hPa, die Injektionszeit 0,3 s und die Injektionsgeschwindigkeit 700 $\mu\text{m/s}$. Mikroinjiziert wurden 1-1,5% des Zellvolumens, die injizierten Substanzen wurden also durch die Mikroinjektion in die Zelle ca. 1:50-1:100 verdünnt [96]. Die final wirksame Konzentration beträgt 1/50-1/100 der Pipettenkonzentration.

3.2.7 Immunhistochemische Färbungen von Zellorganellen und Ca^{2+} -Signalproteinen

Die Mitochondrien wurden mit 100 nM MitoTracker Orange angefärbt. Da es sich beim MitoTracker wie bei Fura-2/AM um einen Farbstoff handelt, der von den Zellen umgesetzt wird, wurde die Färbung genau wie die Beladung der Zellen mit Fura-2/AM durchgeführt: $1 \cdot 10^7$ Zellen wurden bei

1600 rpm 4 min zentrifugiert und anschließend in 1 ml auf 37°C vorgewärmten Komplettmedium resuspendiert. Nach 5 min wurde der MitoTracker Orange in der Endkonzentration von 100 nM zugegeben und für 15 min im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit folgte eine Verdünnung der Zellen um den Faktor 1:5 und eine weitere 15-minütige Inkubation im Dunkeln. Darauf wurden die Zellen zentrifugiert (1600 rpm, 4 min), mit 4 ml Ca²⁺ Messpuffer gewaschen und in 4 ml Ca²⁺ Messpuffer aufgenommen.

Für alle weiteren Färbungen wurden 1*10⁵ – 1*10⁷ Lymphozyten abzentrifugiert und in Ca²⁺ Messpuffer aufgenommen. Die SERCA ATPasen von intakten Zellen wurden für 30 – 60 min mit 1 µM BODIPY Thapsigargin bei Raumtemperatur im Dunkeln angefärbt. Kontrollzellen wurden mit einem Überschuss von 100 µM Thapsigargin und 1 µM BODIPY Thapsigargin inkubiert.

Für die Anfärbung des TCR/CD3 Komplexes wurden die Zellen mit 1 ml 2% Para-Formaldehyd für 15 min fixiert. Nach 2-maligem Waschen mit je 500 µl Ca²⁺ Messpuffer (Zentrifugation 4000 rpm) folgte die Inkubation mit 1 µg OKT3/ 100 µl für 60 min. Nach zwei weiteren Waschstufen (500 µl Ca²⁺ Messpuffer, Zentrifugation 4000 rpm) wurden die Zellen mit 3,5 µg/ 100 µl FITC-konjugiertem Ziege α-Maus Antikörper für 60 min im Dunkeln inkubiert.

Die Kernlokalisierung erfolgte mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff H33258. Die Fixierung wurde wie oben beschrieben durchgeführt, für die Permeabilisierung wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur mit 500 µl Methanol inkubiert und dann 2 mal gewaschen (je 500 µl Ca²⁺ Messpuffer, Zentrifugation 4000 rpm). Der Farbstoff H33258 wurde in der Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugegeben und für 15 –30 min inkubiert.

Der RyR wurde in wie oben beschriebenen fixierten und permeabilisierten Zellen durch eine Färbung für 2 h mit 25 µM BODIPY FL-X Ryanodin bei Raumtemperatur im Dunkeln lokalisiert. Bei den Kontrollen wurde zusätzlich mit einem 10-fachen Überschuss Ryanodin inkubiert.

Für die Färbung des subtyp-unspezifischen IP₃R wurden die Zellen wie oben beschrieben fixiert und permeabilisiert und dann mit 1 µg/ 100 µl α-IP₃R-Antiserum für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 2maligem Waschen (je 500 µl Ca²⁺ Messpuffer, Zentrifugation 4000 rpm) erfolgte die Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur mit 4 µg/ 100 µl Rhodamin-Rot konjugiertem Ziege α-Kaninchen Zweitantikörper. Die Kontrollen wurden parallel ohne α-IP₃R-Antiserum durchgeführt. Die subtyp-spezifischen Färbungen des IP₃R Typ 1, 2 und 3 wurden auf gleiche Weise mit den subtypspezifischen Erstantikörpern aus Ziege durchgeführt. Bei dem Zweitantikörper handelte es sich um einen mit Alexa-568 konjugierten Kaninchen α-Ziege Zweitantikörper. Als Kontrollen dienten mit Blocking-Peptid (200µg/ml Peptid in PBS) über Nacht inkubierte Erstantikörper, die nach Vorschrift des Herstellers gehandhabt wurden.

Da die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe lichtempfindlich sind, müssen die Zellen jeweils nach der Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes lichtgeschützt aufbewahrt werden.

Nach Inkubation mit H33258, BODIPY-Konjugaten oder Zweitantikörpern wurden diese Reagenzien durch Waschen mit 500 μl Ca^{2+} Messpuffer oder Verdünnung (1:10-1:100) entfernt. 100 μl der Zellsuspension wurden wie beschrieben auf ein Deckgläschen gebracht und gemessen. Die Parameter der Messungen sind in Tab. 2.1 zusammengefasst.

| Fluoreszenzfarbstoff | λ_{ex} [nm] | λ_{em} [nm] | Filter | Belichtungszeit [ms] |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|----------|----------------------|
| MitoTracker Orange | 554 | 576 | Rhodamin | 70-100 |
| BODIPY | 503 | 511 | GFP | 20-100 |
| FITC | 485 | 529 | FITC | 30-50 |
| H33258 | 350 | 460 | DAPI | 20-50 |
| Alexa 568 | 578 | 603 | Rhodamin | 5-50 |
| Rhodamin-Rot | 570 | 590 | Rhodamin | 50 |

Tab. 3.1 Parameter für die Messungen am Imaging-System. Die angegebenen Excitations- (λ_{ex}) und Emissionswellenlängen (λ_{em}) sind jeweils vom Hersteller des Fluoreszenzfarbstoffes empfohlen. Die Expositionszeiten schwanken je nach Effektivität der Färbung von Messung zu Messung.

3.3 Technische Aspekte

3.3.1 Messprinzip des Imaging-Systems

Die Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und die immunhistochemischen Färbungen wurden an einem digitalen, ratiometrischen Imaging System (Improvision Systems, Heidelberg) durchgeführt.

Das polychromatische Anregungslicht einer Xenon-Bogenlampe wird über einen Monochromator gelenkt, so dass nur die gewünschten Wellenlängen in das Mikroskop weitergeleitet werden. Für die Einkopplung der Strahlen steht eine Faseroptik/Lichtleiteroptik zur Verfügung. Das vom Objekt emittierte Fluoreszenzlicht wird über einen dichroischen Spiegel und durch einen Emissionsfilter gelenkt und von einer CCD (charge-coupled device)-Kamera (Orca C4742-95-12NRB oder -12ER, Hamamatsu) aufgenommen.

Als mögliche Grauwertabstufungen können 8 oder 12bit gewählt werden. Bei der Grauwertabstufung von 12bit wird zwischen $2^{12}=4096$ Graustufen unterschieden, im 8bit Modus zwischen $2^8=256$ Graustufen. Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde für die Ca^{2+} Messungen der 8bit Modus als Optimum für hohe zeitliche und räumliche Auflösung herausgearbeitet und im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die weiteren Ca^{2+} Messungen beibehalten. Für die Lokalisationsstudien wurde die maximale Grauwertabstufung mit 12bit gewählt.

Die an das verwendete System angeschlossene Kamera hat eine maximale räumliche Auflösung von 1280x1024 Pixel. Über das Binning kann die Auflösung verändert werden, d.h. wenn das Binning 1 ist, erhält man die höchste räumliche Auflösung von 1280x1024 Pixel. Beim Binning 2 verringert sich

die Auflösung in x und y -Richtung um 50%, $2 \times 2 = 4$ Pixel werden zu einem Pixel zusammengefasst, die Auflösung beträgt 640×512 Pixel. Das Optimum zwischen zeitlicher und räumlicher Auflösung liegt für die Ca^{2+} Messungen bei der räumlichen Auflösung von 640×512 Pixel, d.h. es wurde das Binning 2 verwendet. Bei den Lokalisationsstudien ist die maximale räumliche Auflösung von 1280×1024 Pixel gewünscht, also wurde Binning 1 eingestellt.

Die von der Kamera aufgenommenen Bilddaten werden zunächst im Arbeitsspeicher des Rechners abgelegt und von dort auf die Festplatte überschrieben. Die Bilder erscheinen dem Betrachter auf dem an den Computer angeschlossenen Bildschirm. Der Rechner steuert und regelt weiterhin den Polychromator, das Mikroskop mit Piezo-Stepper und den Kamera Controller.

Dem Polychromator werden die Excitationswellenlängen vorgegeben, beim Piezo-Stepper oder Mikroskop regelt der Computer die Veränderung der z -Ebene, die bei der konfokalen Messung eine Rolle spielt und bei dem Kamera-Controller bzw. der Kamera werden die Empfindlichkeit, Expositionszeit und das Binning vom Rechner vorgegeben. Alle diese Parameter werden durch sogenannte Automaten gesteuert, auf die in den nächsten Abschnitten eingegangen wird.

3.3.2 Messung von Ca^{2+} Signalen mit Hilfe von Automaten

Ein wesentlicher Bestandteil des Imaging-Systems und der Openlab-Software sind Automaten, Programme zur automatischen Steuerung der Einzelkomponenten des Imaging-Systems und zur Bildverarbeitung.

Ein Automator besteht immer aus einem Start- und einem Endpunkt, zwischen denen sich Variablen und Funktionen reihen (Abb. 3.2). Diese Variablen und Funktionen sind als Icons vorgefertigt und müssen noch mit ihrer Definition und/oder ihrer Aufgabe vervollständigt werden. Variablen sind z. B. die Wellenlänge, bei der gemessen wird, die Belichtungszeit (Exposure time) oder das Binning. Funktionen sind z. B. Schleifen (Loops), die das schnelle Messen von immer gleichen Parametern ermöglichen, „If“-Entscheidungen, die das Wechseln von einer Schleife in die nächste ermöglichen oder Icons wie „Delay“, wodurch eine zu definierende Pause bei der Messung eingelegt wird.

Für die Ratiobildung gibt es ebenfalls ein feststehendes Icon. Hier müssen das minimale und das maximale Ratio, der Threshold, die Namen der Bilder, aus denen das Ratio berechnet werden soll, und die Benennung des Ratios eingegeben werden. Als minimales Ratio wurde 0,3 gewählt, in der Farbgebung erscheint das Ratio von 0,3 als dunkelblau, Werte unter 0,3 sind als schwarze Pixel zu erkennen. Als maximales Ratio wurde 1,5 gewählt; das Ratio 1,5 erscheint rot, Werte über 1,5 werden als weiße Pixel dargestellt. Um die lokalen Unterschiede besser zu visualisieren, kann das minimale und maximale Ratio verändert werden. Bei der Steigerung des Minimums erschienen so Ratiowerte von 0,4 erst als blaue Pixel, bei Erniedrigung des Maximums erschienen Ratios von 1,0 als rote Pixel, sodass kleine Ratioveränderungen besser zu sehen waren. Für die Umrechnung der Ratios in Calciumkonzentrationen musste für jeden Ratiobereich eine eigene Kalibrierung durchgeführt werden.

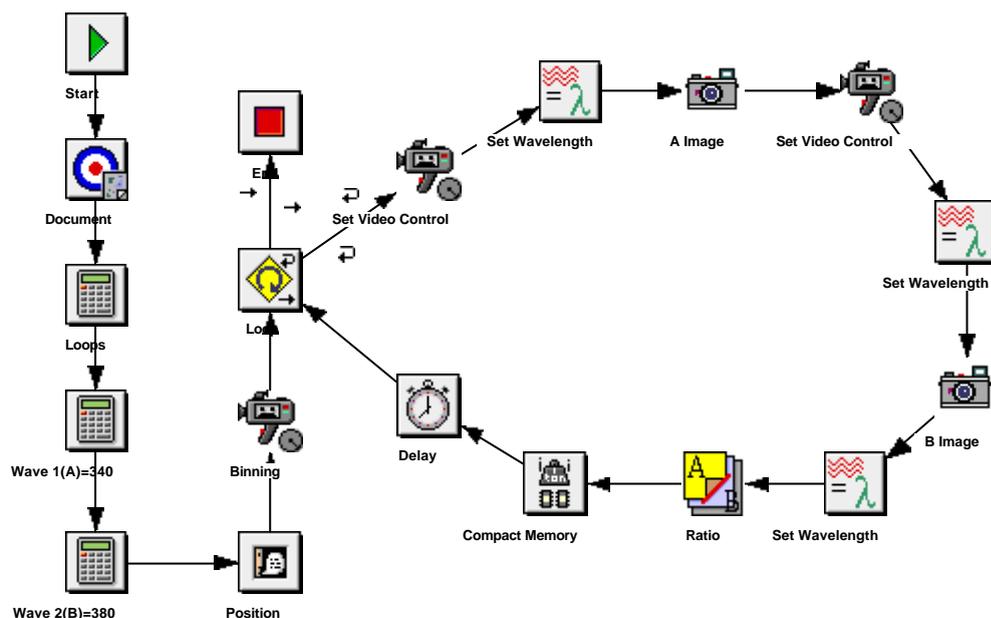


Abb. 3.2 Beispiel für einen einfachen Automator zur Messung von Ca^{2+} Signalen. Der Automator beginnt mit dem Icon „Start“. Das Icon „Document“ sagt aus, dass der Automator auf das zuletzt angeklickte Dokument angewendet werden soll und dass jeweils das zuletzt gemachte Bild der Messung oder Berechnung auf dem Bildschirm im Vordergrund erscheint. Die Variable „Loops“ wurde definiert als die Anzahl, wie oft die „Main Loop“ durchlaufen werden soll. „Wave 1(A)=340“ und „Wave 2(B)=380“ stellen Variablen dar, die als Wellenlängen definiert und auf 340 bzw. 380 nm eingestellt wurden. Über das Icon „Position“ erging die Aufforderung, das Zieldokument auf dem Bildschirm zu positionieren und den Automator zu starten. Das Icon „Binning“ bezieht sich auf die Kameraeinstellung und wurde gemäß Optimierung auf 2 gesetzt. Bei dem Icon „Loop“ teilt sich der Pfad auf. Der geschwungene Pfeil deutet auf den Eintritt in die Schleife, der gerade Pfeil weist auf den Pfad aus der Schleife heraus zum Ende („End“) des Automators. Über das Icon „Set Video Control“ wurde die Belichtungszeit definiert. Das Icon „Set Wavelength“ legte die Wellenlänge fest, bei der gemessen werden soll. Beim Icon „A Image“ wurde die Aufnahme durchgeführt und das entstandene Bild benannt. Diese drei Icons sind zwei mal hintereinander angeordnet, einmal für die Aufnahme des Bildes bei 340 nm, das zweite Mal für die Aufnahme des Bildes bei 380 nm, das als „B Image“ bezeichnet wurde. Das Excitationslicht wurde nach diesen Aufnahmen ausgestellt, was durch die Information des nächsten Icons „Set Wavelength“ geschieht. Beim Icon „A/B Ratio“ wurde das Ratio der beiden Aufnahmen bei 340 und 380 nm gebildet, wobei zuvor das minimale und maximale Ratio, die Schwellenwerte (Thresholds) und die Benennung des Ratiobildes eingestellt wurden. Das Icon „Compact Memory“ dient der Kompaktierung der Daten und damit der Beschleunigung der Messung. Über das Icon „Delay“ wurde die Messung um 10 oder 15 s verzögert, sodass hierdurch die Anzahl der Bilder pro Zeiteinheit bestimmt werden kann.

Der Threshold reicht bei den Ca^{2+} Messungen von 0 bis 255 und sagt aus, bis zu welcher Graustufe die Pixel schwarz (= 255) gesetzt werden. Wird der Threshold auf 25 gestellt, werden die Pixel, die eine geringere Lichtintensität als 25 haben als schwarze Pixel dargestellt (Abb. 3.3). Dadurch wird die geringe Hintergrund-Lichtintensität des die Zelle umgebenden Puffers unterdrückt. Das sog. Hintergrundrauschen, das von Fura-Resten im Puffer herrühren kann, ist damit ausgeschaltet, die stark fluoreszierende Zelle ist vor dem schwarzen Hintergrund gut zu erkennen. Die Anzahl der Graustufen verringert sich dadurch auf die gewählten 225.

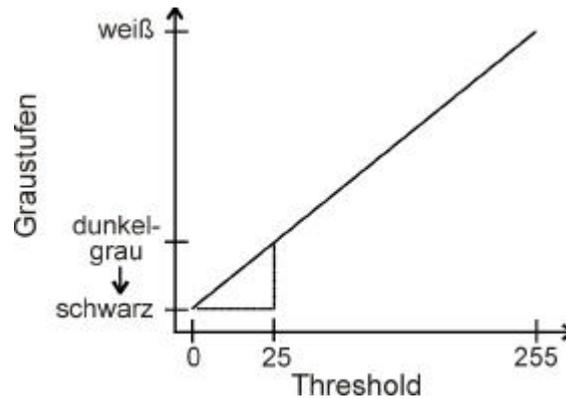


Abb. 3.3 Auftragung des Thresholds gegen die Graustufen. Angedeutet wird, dass der Threshold von 25 auf den Wert von 0 gesetzt wird. Dunkelgraue Pixel erscheinen ab einer bestimmten Graustufe also schwarz.

3.3.3 Auswertung der Daten

Bei den Messungen mit geringer Datendichte wurde das Ratio während der Messung gebildet (Abb. 3.2). Bei Messungen mit hoher Datenaufnahmedichte wurde auf die Ratiobildung während der Messung verzichtet, um die System-Ressourcen zu 100% für die schnelle Datenaufnahme nutzen zu können. Ein solcher Automator wird im Kap. 3.3.4 und Abb. 3.7 (s. Capture Loop fast) noch näher erläutert. Zur Auswertung der Daten, die mit maximaler Geschwindigkeit aufgenommen wurden, dient der Automator „A_B Ratio fast t_fit“ (Abb. 3.4), der eine Optimierung eines einfachen Automators zur Bildung von Ratios darstellt. In der ersten und zweiten Zeile wurden wie für den Automator zur Messung der Rohdaten zunächst der Startpunkt gesetzt und die verwendeten Variablen definiert. Bei den Icons in der dritten Zeile handelt es sich um sog. Input-Frames, die eine Eingabeaufforderung darstellen. So wurde bei „Start frame“ nach der Nummer des ersten Rohdatenbildes gefragt, das für die Ratiobildung verwendet werden soll. Im nächsten Icon „Ratio Pairs“ wurden die Anzahl der zu bildenden Ratios definiert, die folgenden Input-Frames beziehen sich auf den Threshold des bei 340 (tA) bzw. 380 nm (tB) aufgenommenen Bildes. Der Threshold für die Berechnung der Ratios musste wegen des Photobleachings des Fluoreszenzfarbstoffes im Laufe der Ratiobildung angeglichen werden. So konnten auch Pixel mit einer geringeren Intensität als Signal erkannt werden und der Verlust an Bildinformation kompensiert werden. Die Größe des ersten und letzten Ratiobildes der Messung wurde durch Veränderung der Thresholds an das Durchlichtbild angeglichen (Abb. 3.5). Die Ratiobildung erfolgt wie im vorherigen Kapitel beschrieben über das Icon „Ratio“, das in einer Schleife immer wieder durchlaufen wird. Die Definition der Thresholds für die jeweilige Ratiobildung ist variabel und verändert sich nach einer Funktion, die abhängig ist vom Threshold bei der Ratiobildung des ersten Paares, vom Threshold bei der Ratiobildung des letzten Paares, der Gesamtanzahl der Schleifen und der gerade durchlaufenen Schleifenanzahl (Formel s. Abb. 3.4 linke Box). Um einen kontinuierlichen Anstieg der Thresholds zu erreichen, mussten die Thresholds nach der Bildung des Ratios wieder auf ihren Ausgangswert zurückgesetzt werden („tA start“, „tB start“).

Die Problematik des Photobleachings und die Kompensation des Verlustes an Bildinformation stellt einen wichtigen Teil der vorliegenden Arbeit dar und wird im Ergebnisteil in Kapitel 4.1.2 noch ausführlicher behandelt.

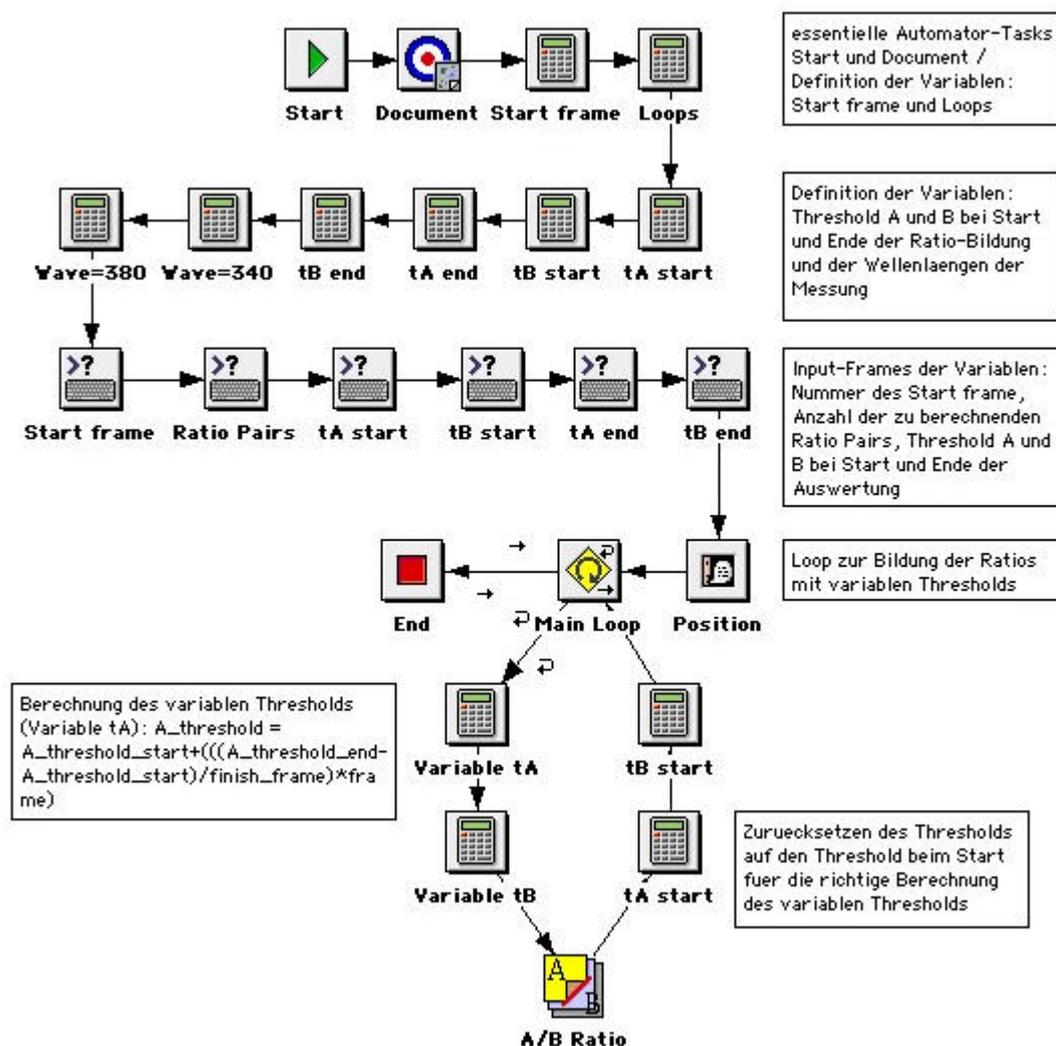


Abb. 3.4 Automator A_B Ratio fast t_fit zur Bildung der Ratios aus den Rohdaten der Messungen mit hoher Datendichte. Die einzelnen Icons wurden zum Großteil in dem Automator Abb. 3.2 genau definiert oder beschrieben. Nach dem Start und der Definition des zu verwendenden Dokumentes, wurden alle Variablen definiert: die Nummer des ersten Rohdatenpaares zur Ratiobildung („Start frame“), die Anzahl der zu bildenden Ratios, was der Anzahl der zu durchlaufenden Schleifen entspricht („Loops“), der Threshold des ersten 340 nm („tA start“) und des ersten 380 nm Bildes der Messung („tB start“), der Threshold des letzten 340 nm („tA end“) und des letzten 380 nm Bildes der Messung („tB end“), die Wellenlängen 340 und 380 nm als solche („Wave=340“, Wave=380). Bei den Icons mit Fragezeichen handelt es sich um sog. „Input-Frames“, wo nach der Definition der Variablen gefragt wird. Die Definition jeder Variabel konnte so je nach den Anforderungen angepasst werden. In der Schleife („Main Loop“) befindet sich das Icon „A/B Ratio“, das zur Bildung des Ratios 340/380 führt. Die Thresholds waren dabei variabel definiert, was die Variablen „Variable tA“ und „Variable tB“ ausdrücken. Über die Icon „tA start“ und „tB start“ wurden die Threshold wieder auf ihre Ausgangswerte zurückgesetzt. Der Automator endet nach durchlaufener Anzahl der Schleifen bzw. Bildung der definierten Anzahl Ratios mit „End“.

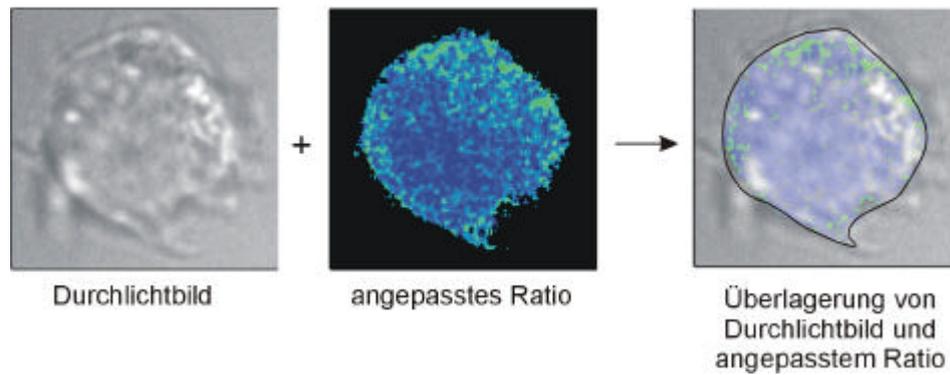


Abb. 3.5 Angleichung des Threshold anhand des Durchlichtbildes. Gezeigt ist das Durchlichtbild, das 340/380 Ratiobild und das 340/340 Ratiobild einer Jurkat T-Zelle in Falschfarbendarstellung, das mit dem Durchlichtbild der Zelle hinterlegt wurde. Das Durchlichtbild wurde vor Start der Messung aufgenommen. Die Thresholds für die Ratiobildung wurden bei der Auswertung anhand des Durchlichtbildes angeglichen (Threshold für das 340 nm Bild: 36; Threshold für das 380 nm Bild: 33).

Zur quantitativen Auswertung der Messungen wurden sogenannte „regions of interest“ (ROIs) gesetzt. Diese ROIs dienen als Messfenster für die Erfassung der Veränderung der Ca^{2+} Konzentration. Für die Messung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei subzellulären Ereignissen wurden nur kleine Bereiche der Zelle betrachtet, d.h. ein subzellulärer Bereich der Zelle stellt eine ROI dar. Von dieser ROI wurde dann das Ratio gebildet, und nach unten beschriebener Kalibrierung wurde die Ca^{2+} Konzentrationen berechnet. Nach entsprechender Längskalibrierung, die durch die Software gegeben ist, ließ sich die Größe der ROI und damit das Ausmaß des subzellulären Ereignisses bestimmen.

3.3.4 Konfokale Messung intrazellulärer Calciumkonzentrationen

Bei der oben beschriebenen, nicht-konfokalen Messung wurde die Zelle per Auflicht fokussiert, und dann wurde bei den beiden Anregungswellenlängen 340 und 380 nm je eine Aufnahme auf der vorab eingestellten Ebene gemacht; aus den beiden Bildern wurde dann das Ratio berechnet. Streulicht aus anderen Ebenen über und unter der Messebene verfälscht dabei das Emissionslicht, das von der eigentlichen Fokusebene abgegeben wird.

Bei der konfokalen Messung dagegen wurden Aufnahmen von drei Ebenen ($z-1$, z , $z+1$) gemacht (Abb. 3.6). Diese Ebenen wurden entweder durch das Mikroskop angesteuert, oder im Falle der Messungen mit maximaler zeitlicher Auflösung durch einen Piezo-Stepper angefahren. Von der betrachteten fokussierten Ebene wurde über die „Point Spread Function“ bei der Dekonvolution das kegelförmige Streulicht von den Ebenen $z-1$ und $z+1$ bestimmt und mathematisch eliminiert [204, 220].

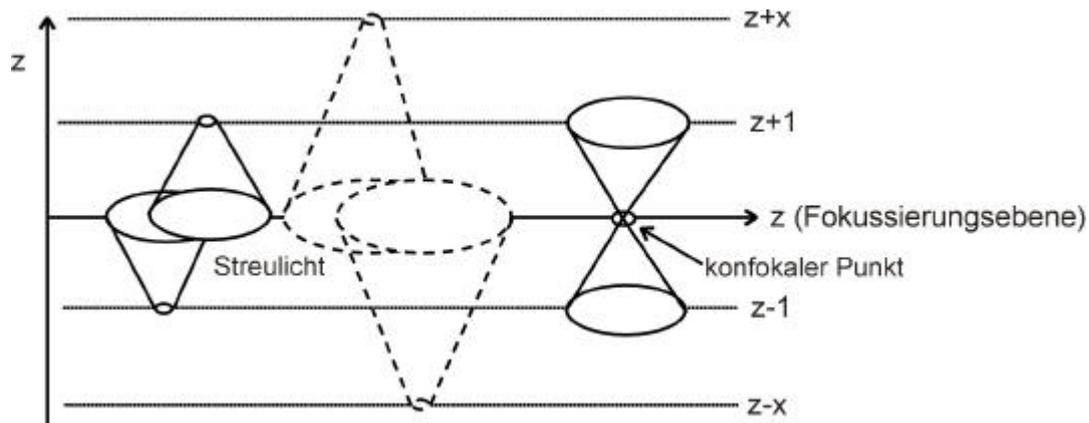


Abb. 3.6 Prinzip der konfokalen Messung mit der „Point Spread Function“. Auf die Fokussierungsebene z fällt kegelförmig Streulicht aus den Ebenen $z+1$, $z-1$ und auch aus sämtlichen anderen Ebenen über und unter der z -Ebene ($z+x$ und $z-x$). Das Streulicht der definierten Ebenen $z+1$ und $z-1$ wird bei der Dekonvolution über die „Point Spread Function“ herausgefiltert, sodass auf der Fokussierungsebene ein konfokaler Punkt übrig bleibt.

Für die Messungen wurde ein entsprechender Automator programmiert (Abb. 3.7). Der prinzipielle Aufbau entspricht dem in Abb. 3.2 dargestellten Automator. Nach dem Start wurden die Variablen für die Anzahl der Schleifen, die Wellenlängen der Messung, die Thresholds und das maximale und minimale Ratio definiert (Abb. 3.7, erste Zeile). Weiterhin wurde das Binning festgelegt, die richtige Positionierung der geöffneten Dokumente abgefragt und der Piezo-Stepper von der bestehenden Focusebene um $0,5 \mu\text{m}$ nach unten gefahren. Es folgte der Eintritt in die Hauptschleife („Main Loop“) und eine „If“-Entscheidung. Um das Photobleaching während der Messung des Basalzustandes zu minimieren wurden zunächst über 120 s langsam, d.h. mit einer Pause von 12 s zwischen den einzelnen Aufnahmen gemessen. Bei der „If“-Entscheidung wurde also geprüft, ob die Anzahl der Hauptschleife kleiner oder gleich 10 war. Wenn diese Aussage richtig („true“ – T) war, wurde der linke Teil der Schleife eingeschlagen. Innerhalb der Messschleife („Capture Loop slow“) wurden die Aufnahmen bei 340 und 380 nm gemacht. Für die konfokale Messung der Ca^{2+} Signale muss die Messschleife 3 mal durchlaufen werden, um bei der off-line Auswertung aus den Rohdaten von 3 verschiedenen Ebenen mit Hilfe der Point Spread Function ein dekonvolviertes Bild zu berechnen. Die „If“-Entscheidung bezieht sich also auf die Anzahl der durchlaufenen Messschleifen. Wenn die Messschleife einmal durchlaufen wurde, ist die Anzahl der Messschleifen nicht gleich 3, die Aussage also falsch („false“ – F), und der Piezo-Stepper bewegt sich um $0,5 \mu\text{m}$ nach oben. Die Messschleife wurde so 3 mal durchlaufen, und auf den z -Ebenen $z-0,5 \mu\text{m}$, $z=0$ und $z+0,5 \mu\text{m}$ wurden jeweils ein Bild bei 340 und bei 380 nm gemacht. Bei dem dritten Durchlauf der Messschleife ist die „If“-Entscheidung richtig („true“ – T), und der Piezo-Stepper wird wieder auf die z -Ebene $z=0,5 \mu\text{m}$ gefahren. Zur direkten Überprüfung des basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der Messung wird im Anschluss an die Messschleife ein Ratio generiert. Es folgt eine Pause von 12 s.

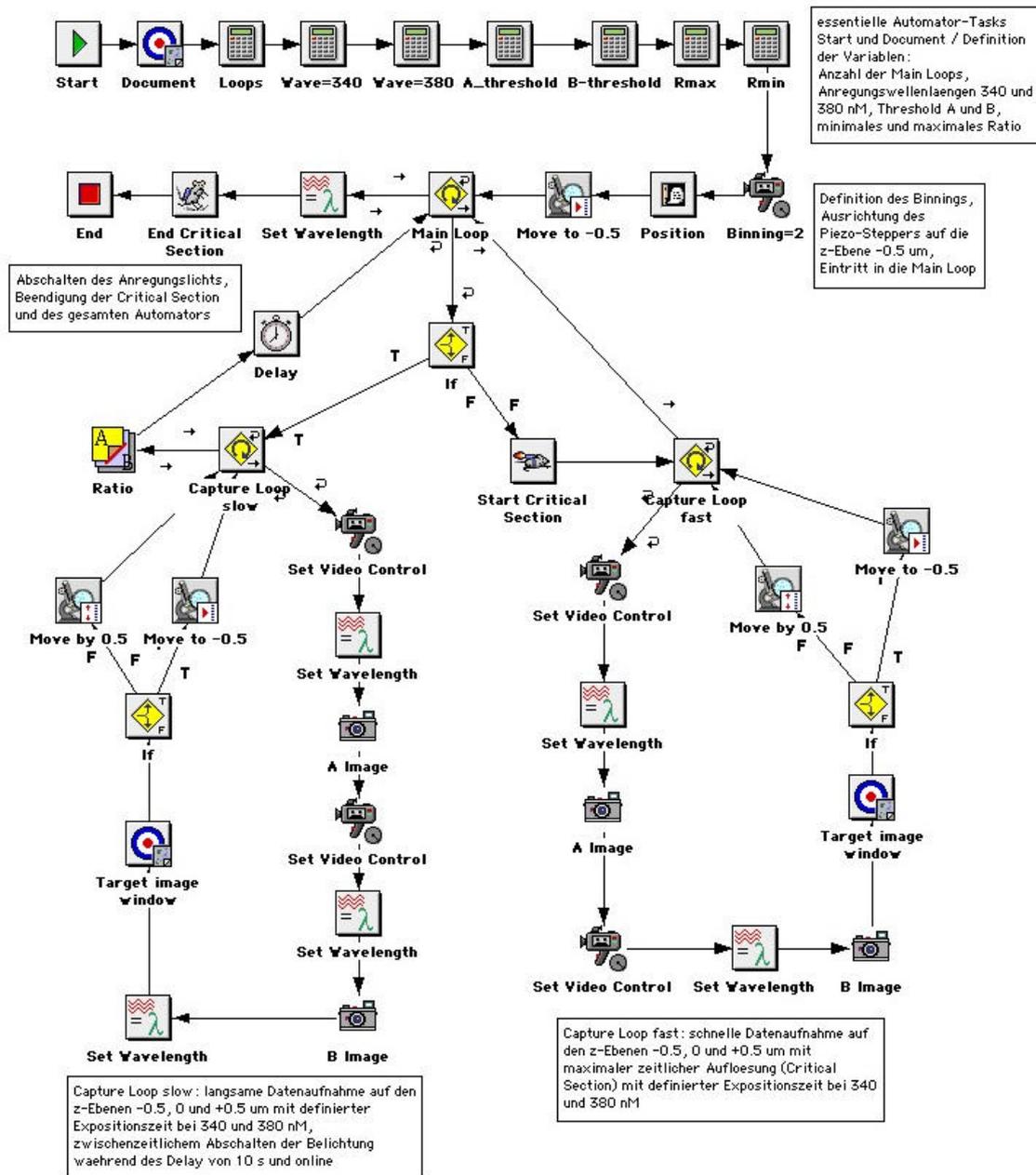


Abb. 3.7 Automator zur Messung von konfokalen Daten. Nach dem Start des Automators wurden die Variablen und das Binning definiert (genaue Definition s. Legende Abb. 3.2 und Box auf der rechten Seite oben in dieser Abbildung). Per Piezo-Stepper wurde das Objektiv von der bestehenden Focus-Ebene um $0,5 \mu\text{m}$ nach unten gefahren („Move to $-0,5$ “). Die Hauptschleife („Main Loop“) teilt sich auf: Die „If“-Entscheidung richtet sich nach der Anzahl der durchlaufenen Hauptschleifen. Wenn die Hauptschleife ≤ 10 mal durchlaufen wurde, ist die Aussage richtig („true“ – T) und der linke Teil mit der Messschleife („Capture Loop slow“) wird eingeschlagen, ist die Hauptschleife mehr als 10 mal durchlaufen worden, dann ist die Aussage falsch („false“ – F) und der rechte Teil mit der Messschleife („Capture Loop fast“) wird durchlaufen. Die Messschleifen sind parallel zu der Schleife in Abb. 3.2 aufgebaut. Zusätzlich findet sich hier in den Schleifen noch eine „If“-Entscheidung: Ist die Aussage „Anzahl der durchlaufenen Messschleife = 3“ falsch („false“ – F), wird das Objektiv per Piezo-Stepper um je $0,5 \mu\text{m}$ nach oben gefahren („Move by $0,5$ “). Beim dritten Durchlauf ist diese Aussage richtig („true“ – T), und der Piezo-Stepper fährt das Objektiv zur Ebene $0,5 \mu\text{m}$ unter der Focusebene („Move to $-0,5$ “). Eine ausführliche Beschreibung eines Großteils der Icons findet sich in der Legende der Abb. 3.2.

Nachdem die Hauptschleife 10 mal durchlaufen wurde und der Basalzustand der zu messenden Zellen über 120 s sicher gestellt wurde, ist die „If“-Entscheidung falsch („false“ – F) und der rechte Teil der Hauptschleife wurde eingeschlagen. Hier wurde eine sog. „Critical Section“ gestartet, sodass der Computer ausschließlich Daten akquiriert und keine anderen Funktionen ausführen kann. Die Messschleife („Capture Loop fast“) ist parallel zu der vorherigen Messschleife aufgebaut, es fehlen die Bildung des Ratios und die Pause zwischen den einzelnen Messungen, da die Daten mit maximaler Geschwindigkeit aufgenommen werden sollen. Nach Beendigung der Messung, d.h. die Hauptschleife wurde ca. 200 mal durchlaufen, wird das Anregungslicht ausgeschaltet und die „Critical Section“ beendet, sodass der Computer wieder normal angesteuert werden kann.

Nach der Aufnahme der Daten mussten diese über die oben beschriebene Point Spread Function dekonvolviert werden.

Für die Dekonvolution wurde festgelegt, wie viel Streulicht aus der Ebene $z=0$ beseitigt werden sollte („Removal“). Diese Funktion wird als eine Lochblende („konfokales Pinhole“) dargestellt, durch die bei den hier diskutierten Messungen ca. 40 % des Streulichts beseitigt wurden. Die Intensität der bereinigten Pixel wurde danach noch verstärkt. Die Verstärkung („Gain“) wurde für jede Zelle neu eingestellt. Durch Anklicken einer gleichmäßig hellen Stelle in der Zelle wurde der „Gain“ vom Computer eingestellt und lag je nach Fluoreszenzintensität der Rohdaten zwischen 3 und 6, was eine 3-6-fachen Verstärkung des Grauwertes jedes Pixels entspricht. Der „Offset“ ist ein Maß für die auf die Graustufe „schwarz“ gesetzten Pixel bei der Dekonvolution und wurde in der Regel auf -1 oder -2 gesetzt.

Das Ratio 340/380 wurde aus den dekonvolvierten 340 und 380 nm Bildern mit dem entsprechend angepassten Automator, wie in Abb. 3.4 dargestellt, gebildet.

3.3.5 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ und Auswertung der Rohdaten per „no neighbor“ Algorithmus bei den 3T3 Fibroblasten

Bei der Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in den 3T3 Fibroblasten wurde auf eine maximale zeitliche Auflösung geachtet, um die wellenförmige Ausbreitung des Ca^{2+} Signals nach Stimulation beobachten zu können. Zunächst wurde auch hier über 2 min beobachtet, dass die Zelle während der Basalphase keine spontanen Ca^{2+} Signale gibt. Rohdaten wurden wie für die Messungen bei den T-Zellen im Abstand von 10-12 s aufgenommen. Nach der Stimulation wurde mit maximaler Geschwindigkeit entsprechend zu der „Capture Loop fast“ in Abb. 3.7 gemessen. Im Unterschied zu den Messungen bei den T-Zellen wurden jedoch die Daten nicht auf 3 Ebenen akquiriert, sondern wie für die nicht konfokalen Messungen nur auf einer Ebene. Dadurch wird die zeitliche Auflösung um den Faktor 3 schneller.

Die Auswertung der Daten erfolgte über den sog. „no neighbor“ Algorithmus (Openlab v1.7.8). Hier werden nicht wie beim „nearest neighbor“ Algorithmus die gemessenen 3 Ebenen für die Berechnung der dekonvolvierten Bilder per Point Spread Function herangezogen, sondern es wird aus dem einen

Bild durch eine mathematische Funktion ein dekonvolviertes Bild hergestellt. Zur Bereinigung des Streulichtes dient nicht das Streulicht der gemessenen Ebenen unter und über der Fokusebene, sondern statistisch ermitteltes Streulicht. Die Angleichung der Parameter für die Dekonvolution per „no neighbor“ Algorithmus an die per „nearest neighbor“ dekonvolvierten Daten wird bei den Ergebnissen Kap. 4.1.3 näher erläutert.

3.3.6 Kalibrierung

Die Ratiowerte wurden mittels einer internen Kalibrierung nach Poenie und Tsien (1986) durchgeführt.

Zunächst wurde die Zellen auf gleiche Weise wie bei den Ca^{2+} Messungen im Basalzustand gemessen. Nach ca. 30 s wurde Ionomycin in der Endkonzentration von 2 μM zugesetzt. Ionomycin ist ein Calciumionophor und vermittelt durch die Ausbildung calciumselektiver Poren den Einstrom von Calcium aus dem Extrazellularraum und den intrazellulären Speichern in das Cytosol. Durch den Ausgleich des physiologischen Konzentrationsgradienten wurde die maximale Calciumkonzentration in den Zellen eingestellt und das maximale Ratio gemessen. Durch Zugabe von EGTA/Tris im Überschuss (8 mM/ 60 mM) wurde nahezu das gesamte Calcium entzogen; 5 min nach Zugabe der EGTA/Tris-Lösung wurde so das minimale Ratio gemessen.

Die gemittelten minimalen und maximalen Ratiowerte aus fünf 3-fach Bestimmungen wurden in folgende Formel nach Thomas und Delaville [221] bzw. Poenie und Tsien [222] eingesetzt:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d * \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} * \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

- mit:
- R - gemessenes Ratio
 - R_{\min} - minimales Ratio der Kalibrierung
 - R_{\max} - maximales Ratio der Kalibrierung
 - K_d - Dissoziationskonstante ($K_d = 224 \text{ nM}$) von Ca^{2+} für Fura-2
 - S_{f2} - minimale Fluoreszenzintensität des 380 nm Bildes
 - S_{b2} - maximale Fluoreszenzintensität des 380 nm Bildes

Diese Formel mit den entsprechend bestimmten Werten wurde dem Computer für die Berechnung der Calciumkonzentration eingegeben, sodass für die Auswertung sowohl Ratio- als auch Calciumwerte vorliegen.

3.3.7 Konfokale Messung für die immunhistochemischen Färbungen

Für die konfokale Lokalisierung der Zellorganellen und Rezeptoren wurde zunächst im Auflicht die Fokusebene eingestellt. Dann wurden Bilder auf 10 bis 25 aufeinanderfolgenden horizontalen z-Ebenen über und unter der Fokusebene gemessen, die jeweils im Abstand von 0,2 oder 0,5 μm lagen. Als Auflösung in xy-Richtung wurde bei 100-facher Vergrößerung die maximale räumliche Auflösung

von 1024x1280 Pixel gewählt, was einer Pixelgröße von 67 nm/Pixel entspricht. Die Rohdaten wurden über die beschriebene Point Spread Function dekonvolviert, wobei für die Berechnung des konfokalen Bildes zwischen 2 und 5 Nachbarn oberhalb und unterhalb der Fokusebene verwendet wurden. Beseitigt wurden zwischen 23 und 68 % des Streulichtes (variables virtuelles konfokales Pinhole). Für die entsprechenden Kontrollen zu den Lokalisationsstudien wurden jeweils die gleichen Parameter bei der Aufnahme der Rohdaten und bei der Auswertung angewendet, wie für die Proben.

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung der Methodik für die Messung subzellulärer Ca^{2+} Signale mit digitaler konfokaler Mikroskopie

4.1.1 Entstehung eines globalen Ca^{2+} Signals am Beispiel von Einzelzellmessungen

Die Entwicklung der Methodik für die Ca^{2+} Messungen wurde mit Fura-2 beladenen Jurkat T-Lymphozyten (Klon JMP) durchgeführt und für die weiteren Messungen mit peripheren T-Zellen, Tet-On T-Zell-Klonen und 3T3 Fibroblasten angewendet.

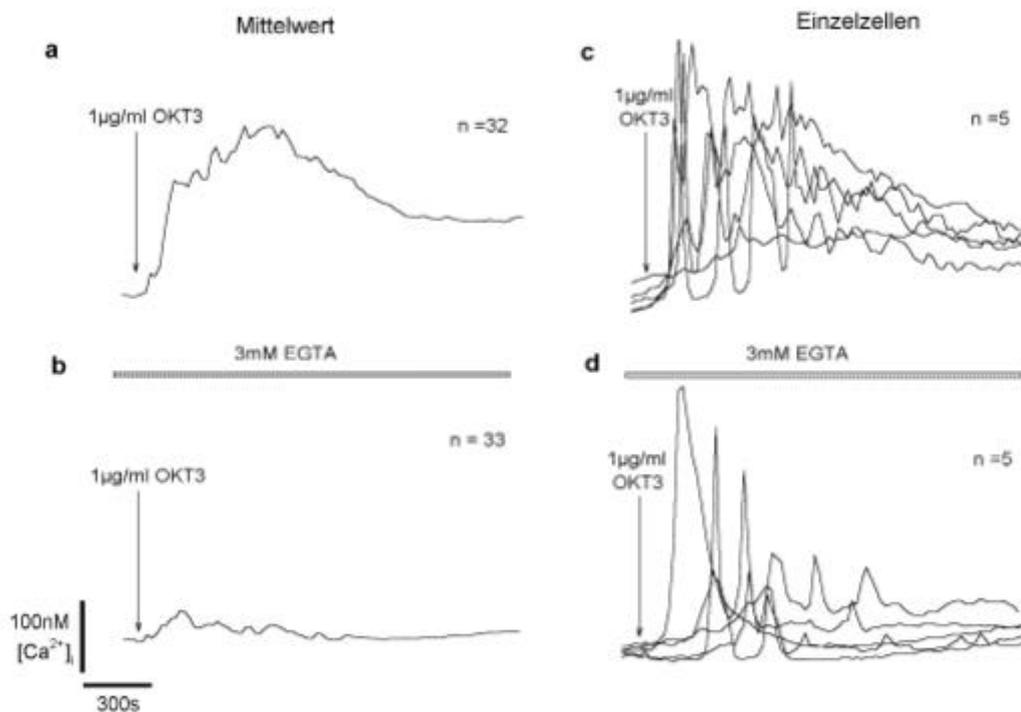


Abb. 4.1 Vergleich der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Stimulation des TCR/CD3 Komplexes von einzelnen Jurkat T-Lymphozyten in An- und Abwesenheit von $[\text{Ca}^{2+}]_{ex}$. Auf Einzelzellbasis wurde in Fura-2 beladenen T-Zellen die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Anwesenheit (a, c) und Abwesenheit (b, d) von 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{ex}$ mit einer zeitlichen Auflösung von 3 Ratios/ min gemessen. Nach 120 s erfolgte die Stimulation mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OKT3. Die Graphen a und b zeigen Mittelwerte von 32 bzw. 33 Einzelzellen. In Anwesenheit von $[\text{Ca}^{2+}]_{ex}$ steigt der mittlere Basalwert von 65 nM auf ein Maximum von 300 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach 654 s (a). In Abwesenheit von $[\text{Ca}^{2+}]_{ex}$, hervorgerufen durch die Zugabe von 3 mM EGTA vor Start der Messung, steigt das globale Signal von 50 nM im Basalzustand im Mittel auf 90 nM nach 253 s (b).

Der Verlauf der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde nach Stimulation mit dem anti-CD3-Antikörper OKT3 in Anwesenheit und Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_{ex}$ gemessen (Abb.

4.1). In Anwesenheit von 1 mM $[Ca^{2+}]_{ex}$ reagierten die Jurkat T-Lymphozyten nach Stimulation mit OKT3 mit einem globalen Signal von 300 nM im Mittel (Abb. 4.1 a). Dabei gaben einzelne Zellen oszillierende Signale von bis zu 600 nM, andere zeigten nach dem globalen Signal eine langanhaltende Plateau-Phase mit kleineren Oszillationen (Abb. 4.1 c). In Abwesenheit von $[Ca^{2+}]_{ex}$ durch Zugabe von 3 mM EGTA wurde das Ca^{2+} Signal im Mittel auf 90 nM reduziert (Abb. 4.1 b). Bei Betrachtung der Einzelzellmessung zeigte sich, dass einzelne Zellen mit einem globalen Ca^{2+} Signal von bis zu 600 nM reagierten, dabei oszillierten, die $[Ca^{2+}]_i$ dann aber auf den Basalwert zurückging (Abb. 4.1 d). Weiterhin reagierten die Zellen teilweise erst verspätet mit dem globalen Signal. An diesen Messungen zeigt sich eine entscheidende Rolle des $[Ca^{2+}]_{ex}$ für die Entwicklung und die Amplitude des globalen Signals und für die langanhaltende Plateauphase, die offensichtlich durch Ca^{2+} Einstrom von außen in die Zellen getragen wird. Allerdings hat $[Ca^{2+}]_{ex}$ keinen Einfluss auf die prinzipielle Entstehung eines globalen Ca^{2+} Signals. Das globale Signal beginnt jedoch in einigen Zellen verzögert, wenn kein $[Ca^{2+}]_{ex}$ vorhanden ist (Abb. 4.1 d).

4.1.2 Vermeidung und Kompensation des Photobleachings

Von besonderem Interesse war nun die Phase zwischen der Stimulation und dem ersten globalen Ca^{2+} Signal, genannt „Pacemaker-Phase“. Hierfür musste zunächst ein Messprotokoll entwickelt werden: Während der ersten 120 s der Messung wurde sicher gestellt, dass die Zelle nicht spontan reagiert. Um das Photobleaching des Fura-2 so gering wie möglich zu halten, wurde ein Messintervall von 10 Bildern/min gewählt. Ab dem Zeitpunkt der Stimulation wurde die Bildaufnahme mit maximaler Geschwindigkeit durchgeführt (Abb. 4.2 a), was zu einem verstärkten Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 führte (Abb. 4.2 b). Bei der Messung der Fluoreszenzintensität des Fura-2 bei 360 nm Anregungswellenlänge (Wellenlänge des isosbestischen Punktes = Ca^{2+} -unabhängig) zeigte sich eine signifikante Abnahme der Intensität in allen gemessenen Zellen (Abb. 4.2 c). Ratio-Bilder wurden mit den bei 340 und 380 nm angeregten Rohdaten-Bildern erzeugt. Hierfür wurde ein Schwellenwert für die Intensität (= Threshold) bestimmt, der die Fluoreszenz des Hintergrundes auf Null setzt. Wurde ein konstanter Threshold angewendet (Abb. 4.2 d, gepunktete Linie), verloren die Ratio-Bilder an Information, insbesondere im Randbereich, wo subzelluläre Signale erwartet werden. Um diesen Verlust an Information zu kompensieren, wurde der Threshold je nach Zelle variabel angepasst (Abb. 4.2 d). In der vorliegenden Beispielzelle wurde ab dem Zeitpunkt der Stimulation und damit einhergehenden maximalen Aufnahmegeschwindigkeit der Schwellenwert linear erniedrigt von der Graustufe 56 (auf einer Skala von 256 Graustufen bei 8 bit Geräteeinstellung) auf die Graustufe 29 am Ende der Messung. Diese Anpassung geschah technisch über die Verwendung eines Automators mit variabler Definition des Threshold (s. Kap. 3.3.3). Auf diese Weise blieb das 340/380 Ratio-Bild in der gleichen Größe wie das Durchlichtbild und stellte ein Abbild der gesamten Zelle dar. Als negativer Aspekt der Verringerung des Schwellenwertes für die Intensität stellte sich die reziproke Verstärkung des Hintergrundrauschens heraus (Abb. 4.2 e).

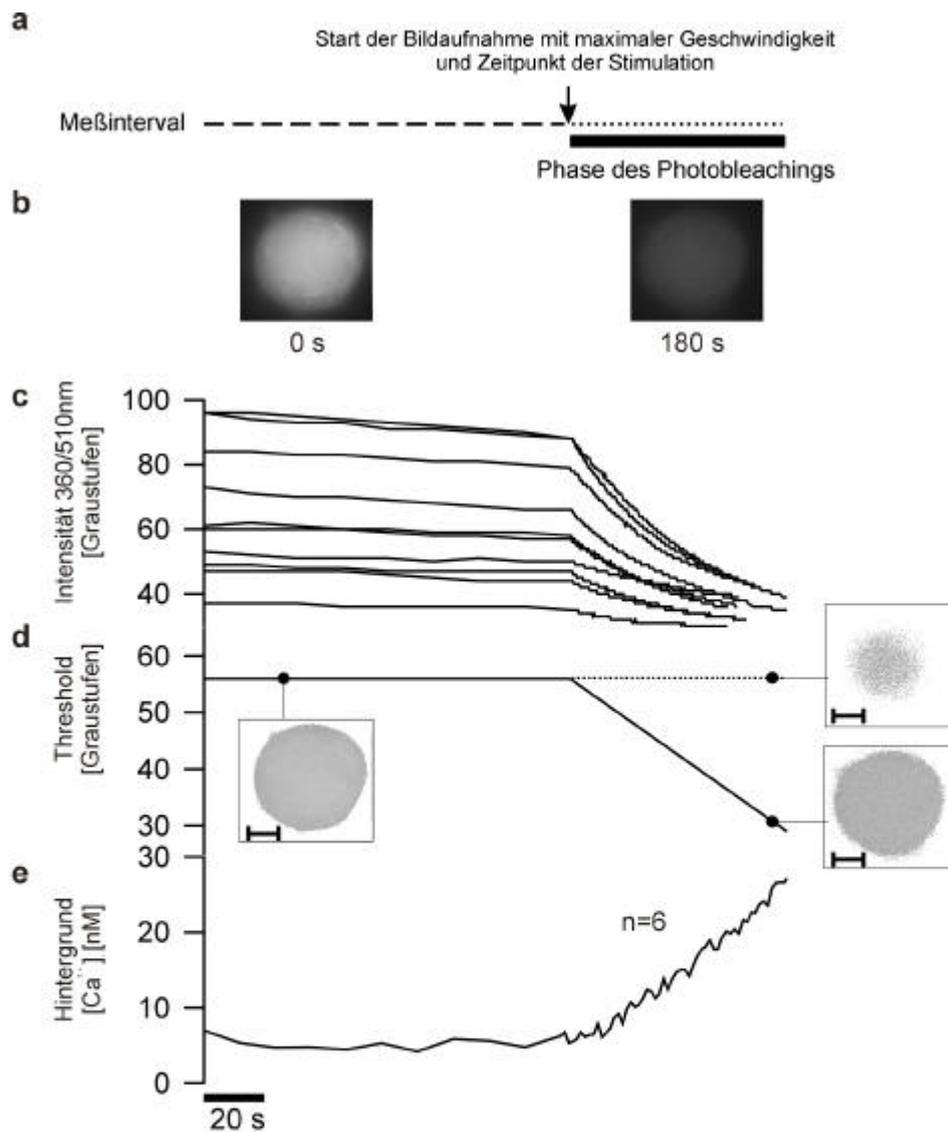


Abb. 4.2 Kompensation des Photobleachings durch Anwendung eines variablen Intensitätsschwellenwertes bei der Berechnung der Ratio-Bilder. (a) Um das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 während der Messung der Basalphase zu vermeiden, wurde zunächst mit geringer zeitlicher Auflösung (10 Bilder/ min) aufgenommen. Nach der Stimulation wurde bei maximaler zeitlicher Auflösung (240 Bildern/ min) gemessen. (b) Die Bilder der Fura-2 beladenen T-Zellen wurden bei der Anregungswellenlänge von 360 nm aufgenommen, wo die Fluoreszenz unabhängig von der $[Ca^{2+}]_i$ ist. (c) Zeitlicher Verlauf der Abnahme der Fluoreszenzintensität von 10 Zellen. (d) Ratio-Bilder als Graustufendarstellung einer Beispielzelle während der Basalphase (links) und 60 s nach dem Start der Messung mit maximaler zeitlicher Auflösung (rechts). Bei Verwendung eines konstanten Schwellenwertes für die Intensität kam es zum Verlust der Bildinformation (gepunktete Linie), bei Anpassung des Schwellenwertes konnte dieser Verlust ausgeglichen werden (durchgezogene Linie). Der Balken repräsentiert 3 μm . (e) Durch die Anpassung des Thresholds stieg die $[Ca^{2+}]_i$ während der Messung bei maximaler zeitlicher Auflösung scheinbar um 28 nM ($n=6$). Dieser scheinbare Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ ist jedoch ausschließlich auf ein ansteigendes Signal/ Rausch-Verhältnis zurückzuführen, denn die Ca^{2+} -Speicher der gemessenen Zellen wurden zuvor über Ionomycin (1 μM) entleert, und das freiwerdende Ca^{2+} über EGTA (3 mM) als Chelatkomplex gebunden.

Um zwischen Hintergrundrauschen und Ca^{2+} Signalen zu unterscheiden, wurden die Ca^{2+} Speicher über $1 \mu\text{M}$ Ionomycin entleert und das freiwerdende Ca^{2+} über Komplexierung mit 3 mM EGTA gebunden. Unter diesen Bedingungen sollten keine Ca^{2+} Signale mehr zu messen sein, da die intrazellulären Speicher entleert sind, und sich im extrazellulären Raum kein freies Ca^{2+} mehr befindet. Bei der Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über die gesamten Zellen ($n=6$) war ein Ca^{2+} Schwellenwert von 32 nM (bezeichnet als Schwellenwert 1) ausreichend für die Reduktion des Rauschens, wie die Extrapolation der ansteigenden Hintergrund- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf den Zeitpunkt 220 s zeigt (Abb. 4.3 a). Wie sich auf subzellulärer Basis bei der zeitlichen Auftragung der Ca^{2+} Signale einer sog. „region of interest“ (ROI) zeigte, waren bei diesem Schwellenwert noch über die ganze Zelle verteilt Signale zu erkennen, die im Laufe der Messung mit maximaler zeitlicher Auflösung deutlich anstiegen (Abb. 4.3 b). Da viele dieser „Rauschsignale“ offensichtlich einen relativ geringen Durchmesser aufwiesen, wurde der „Median Filter“, eine Funktion der Software zur Rauscheliminierung auf Basis eines minimalen Signaldurchmessers, angewendet. Die Verwendung des Median Filters führte zu einer Verminderung des Rauschens (Abb. 4.3 c), aber nicht zur gewünschten Rauschbereinigung. Daraufhin wurde der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Schwellenwert 2, bestehend aus dem Schwellenwert 1 und einer empirischen Sicherheit von 50 nM , definiert. Verschiedene empirische Schwellenwerte wurden getestet, aber Werte $< 50 \text{ nM}$ erwiesen sich als unzureichend, bei Werten $> 50 \text{ nM}$ war der Verlust an realen Ca^{2+} Signalen zu groß. Mit diesem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Schwellenwert 2 von insgesamt 82 nM konnten durchgängig noch Rausch-Signale am Rand der Zelle gemessen werden, im Laufe der Zeit auch Rausch-Signale im Innern der Zelle (Abb. 4.3 d). Bei zusätzlicher Verwendung des Median Filters wurden diese kleinen artifiziellen Signale nahezu vollständig beseitigt (Abb. 4.3 e).

Diese Bedingungen wurden für die weiteren Auswertungen angewendet, um das Hintergrundrauschen zu minimieren und so verlässliche Aussagen über die Signale machen zu können.

– Abbildung siehe folgende Seite –

Abb. 4.3 Rauschunterdrückung durch Anwendung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Schwellenwerten. Die intrazellulären Ca^{2+} Speicher von intakten T-Zellen wurden durch Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ Ionomycin entleert und das freie Ca^{2+} durch 3 mM EGTA über Chelatkomplexbildung gebunden. **(a)** In der exemplarisch gezeigten T-Zelle stieg die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ scheinbar im Laufe der Messung um 20 nM an. Der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Schwellenwert 1 repräsentierte den Schwellenwert, der durch den scheinbaren $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Anstieg in der Zelle durch den Ausgleich des Photobleachings zustande kam (Abb. 4.2 e). Um 100 s bei maximaler zeitlicher Auflösung messen zu können, wurde der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von $n=6$ Zellen auf den Zeitpunkt 220 s extrapoliert, wodurch sich ein mittlerer Schwellenwert 1 von 32 nM ergab. Der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Schwellenwert 2 setzt sich aus dem Schwellenwert 1 und einem empirisch ermittelten Schwellenwert von 50 nM zusammen. **(b)** stellt einen sog. „Line-Scan“ dar, d.h. die zeitliche Auftragung einer „region of interest“ (ROI) einer Einzelzelle, wie anhand des Durchlichtbildes zu erkennen ist. Die schwarzen Pixel zeigen die Rauschsignale, die über dem Schwellenwert 1 von 32 nM liegen. **(c)** Die Funktion der Software „Median Filter“ reduziert die kleinen Rauschsignale, hier angewendet zusammen mit dem Schwellenwert 1. **(d)** Rauschreduzierung durch den Schwellenwert 2. **(e)** Line-Scan, der sich nach der Rauscheliminierung durch den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Schwellenwert 2 von 82 nM und nach Anwendung des Median Filters ergibt. Die Beispielzelle zeigt ein repräsentatives Experiment ($n=6$).

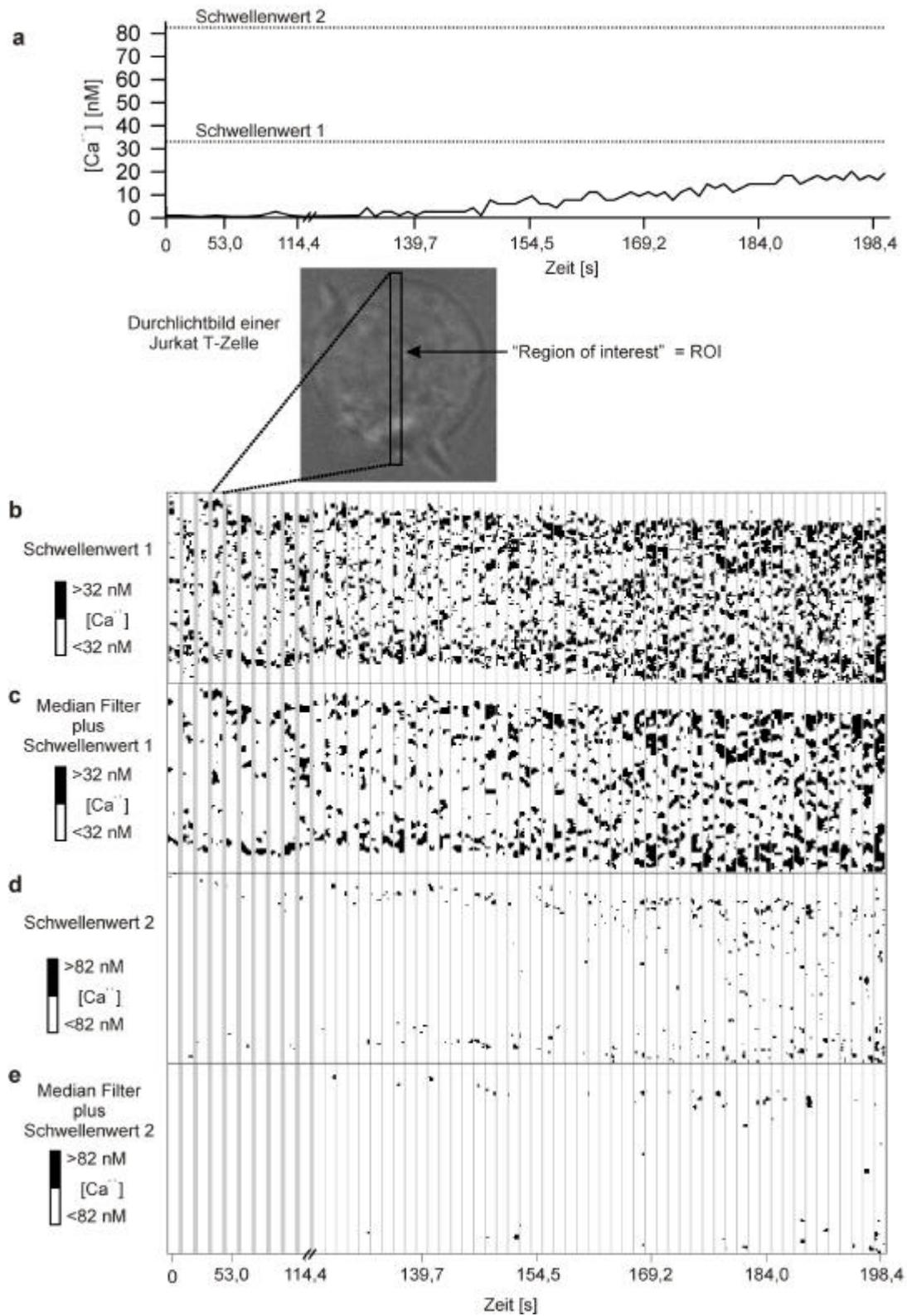


Abb. 4.3 Legende siehe vorherige Seite

4.1.3 Vergleich der Dekonvolution per „nearest neighbor“ Algorithmus mit der Dekonvolution per „no neighbor“ Algorithmus

Für die Auswertung der Daten bietet das System verschiedene Arten der Dekonvolution an: die Dekonvolution mit dem „no neighbor“ Algorithmus und die Dekonvolution mit dem „nearest neighbor“ Algorithmus. Die Rohdaten (Abb. 4.4 a links) wurden zunächst über den „nearest neighbor“ Algorithmus dekonvolviert, da bei dieser Methode das real vorhandene Streulicht aus den Ebenen über und unter der Fokusebene zur Berechnung herangezogen wird. Mit den gewählten Parametern (Removal 0,5 = 50 % des Streulichtes werden entfernt. Gain 4, Offset -2) wurden dekonvolvierte Bilder der Aufnahmen bei 340 und 380 nm berechnet, die sich in ihrer Intensität kaum von den Rohdatenbildern unterscheiden (Abb. 4.4 a, Mitte links). Die Thresholds für die Bildung des Ratiobildes sind fast gleich. Als weiteres Werkzeug der Software gibt es den Median Filter, der einen Mittelwert im Bereich von 3x3 Pixel bildet und so der Rauschverminderung dient. Ohne Dekonvolution und den Median Filter zeigte sich das Ratiobild in sehr feine Pixel differenziert, die Auflösung erreichte ein Maximum, aber subzelluläre Signale waren nicht deutlich zu erkennen (Abb. 4.4 b, links). Durch den Median Filter fand eine Glättung der Signale statt und die Unterscheidung der einzelnen Regionen der Zelle und der höheren und niedrigeren Signale fiel leichter (Abb. 4.4 c, links). Das Ratiobild aus den per „nearest neighbor“ dekonvolvierten Einzelbildern (340 und 380 nm) zeigt deutlich die subzellulären Ca^{2+} Signale am Zellrand und im Zellinneren (Abb. 4.4 b, Mitte links). Nach Glättung durch den Median Filter wurde die Lokalisierung der Signale rauschfreier dargestellt (Abb. 4.4 c, Mitte links).

Bei der Dekonvolution mit dem „no neighbor“ Algorithmus wird mit statistisch ermitteltem Streulicht rein mathematisch ein quasi-konfokales Bild errechnet. Ziel war nun, die Bedingungen des mit dem „no neighbor“ Algorithmus errechneten Ratiobildes so anzupassen, dass es dem mit dem „nearest neighbor“ Algorithmus berechneten Bild möglichst nahe kommt. Gleiche Parameter (Removal 0,5, Gain 4) wurden für die „no neighbor“ Dekonvolution angewendet, was jedoch zu einer deutlichen Intensitätssteigerung bei den dekonvolvierten Bildern führte (Abb. 4.4 a, Mitte rechts). Die Entfernung von 50 % statistischem Streulicht war nicht ausreichend, bzw. eine Verstärkung der übriggebliebenen Pixel um den Faktor 4 war zu viel. Vor allem der Threshold für das 340 nm Bild muss dementsprechend niedrig gesetzt werden, um ein dem Durchlichtbild entsprechendes Ratiobild zu bekommen. Sowohl mit als auch ohne Median Filter gleichen diese Ratiobilder denen ohne Dekonvolution (Abb. 4.4 b, c, Mitte rechts). Nach Optimierung wurden für die „no neighbor“ Dekonvolution 70 % des statistischen Streulichtes entfernt und die verbleibenden Pixel um den Faktor 4 verstärkt (Abb. 4.4 a, rechts). Die Intensität der dekonvolvierten Bilder bei 340 und 380 nm gleicht in etwa der Intensität der Rohdatenbilder bzw. der per „nearest neighbor“ dekonvolvierten Bilder, dementsprechend liegt der Threshold in einem ähnlichen Bereich. Beim Ratiobild sind ebenfalls die Unterschiede in einzelnen Regionen der Zelle deutlicher zu erkennen, wenn auch die Qualität des per „nearest neighbor“ dekonvolvierten Bildes nicht erreicht werden kann. Der Ring erhöhter $[\text{Ca}^{2+}]_i$ am

Zellrand, der bei dem nicht konfokalen Ratiobild und bei dem quasi-konfokalen Ratio auftaucht, war bei dem Removal von 0,7 am wenigsten ausgeprägt, während er bei dem per „nearest neighbor“ errechneten Ratio nicht zu erkennen war. Damit glichen die Ratiobilder der per „no neighbor“ gebildeten Ratios mit dem Removal von 0,7 und dem Gain von 4 am ehesten den aus per „nearest neighbor“ Algorithmus dekonvolvierten Bildern hergestellten Ratios.

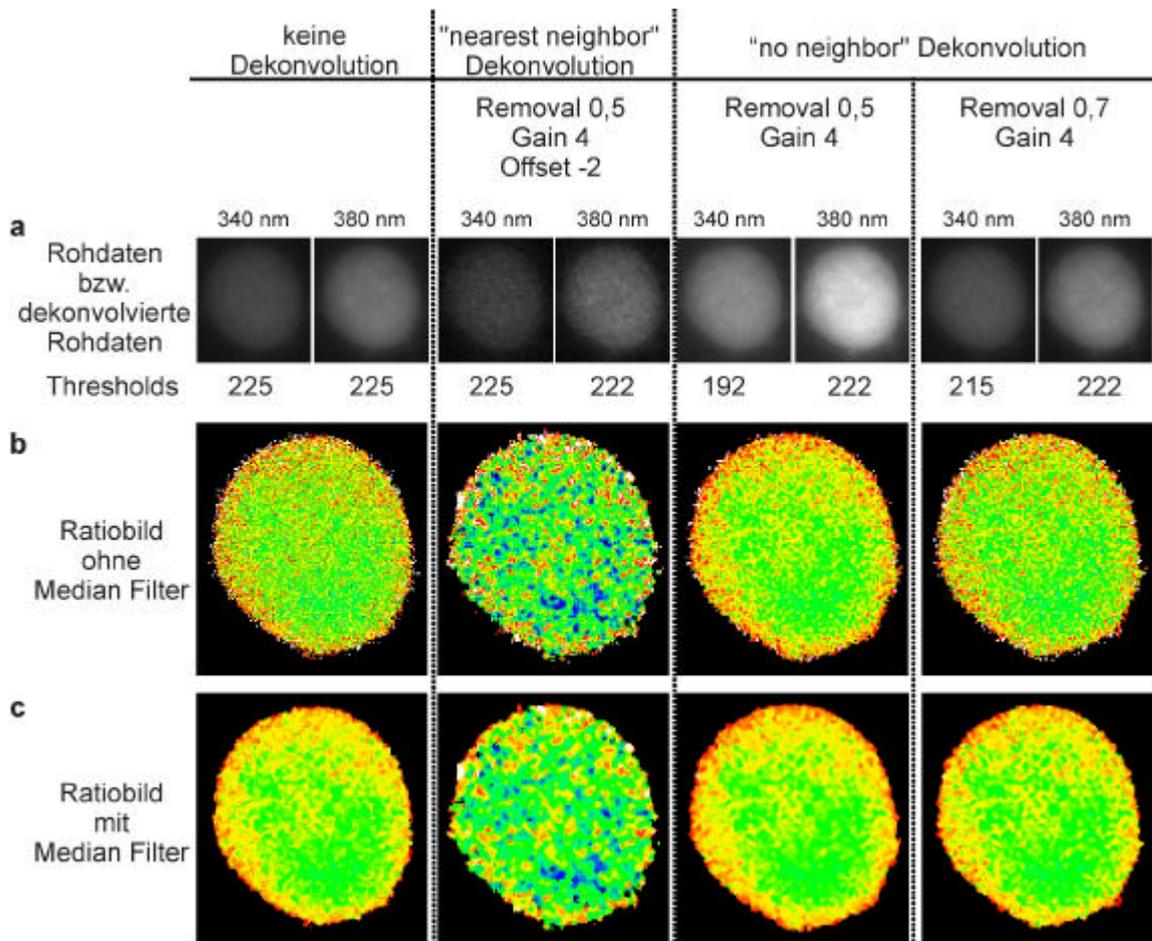


Abb. 4.4 Vergleich verschiedener Dekonvolutionen anhand von Ratiobildern einer Jurkat T-Zelle. (a) Die Rohdatenbilder der Aufnahmen bei 340 bzw. 380 nM wurden nicht dekonvolviert oder über den „nearest neighbor“ bzw. den „no neighbor“ Algorithmus dekonvolviert. Bei der „nearest neighbor“ Dekonvolution wurde der Removal von 0,5 gewählt, bei der „no neighbor“ Dekonvolution der Removal von 0,5 oder 0,7. Der Gain wurde konstant auf 4 gesetzt. Bei der „nearest neighbor“ Dekonvolution konnte die Intensität weiterhin über die Funktion „Offset“ angepasst werden. Der Offset wurde im allgemeinen auf -2 gesetzt. Das Ratiobild wurde über die Thresholds jeweils mit Hilfe des Durchlichtbildes an die reale Größe der Zelle angepasst. Die 340/380 nm Ratiobilder wurden aus den Rohdaten ohne (b) und mit Median Filter (c) generiert.

Bei der Aufnahme der Daten musste nun im Vorfeld bestimmt werden, ob eine maximale zeitliche Auflösung gewünscht ist, oder ob die räumliche Auflösung der subzellulären Signale entscheidend sein soll. Dementsprechend wurden für die maximale zeitliche Auflösung nur auf der Fokusebene bei 340 und 380 nm gemessen und ggf. konnte die Auswertung über den „no neighbor“ Algorithmus

erfolgen, um quasi-konfokale Daten zu erhalten. Die maximale zeitliche Auflösung lag bei dem verwendeten System bei ca. 80 ms pro Bild, d.h. 160 ms pro Ratio. Bei der konfokalen Messung wurde bei vergleichsweise besserer räumlicher Auflösung durch die Aufnahme jeweils in 3 Ebenen pro Wellenlänge eine maximale zeitliche Auflösung von ca. 500 ms pro Ratio erzielt.

Die im folgenden beschriebenen Messungen in T-Lymphozyten wurden im echt-konfokalen Modus akquiriert, um subzelluläre Signale bezüglich ihrer Amplitude, ihres Durchmessers und ihrer Frequenz zu analysieren. Bei den 3T3 Fibroblasten wurde zur Beobachtung der wellenförmigen Ausbreitung des Signals mit maximaler Geschwindigkeit gemessen. Für die Analyse der subzellulären Signale wurde der „no neighbor“ Algorithmus angewendet, um eine bessere räumliche Auflösung der Pacemaker-Signale zu erzielen.

4.2 Analyse subzellulärer Ca^{2+} Signale in Jurkat (Klon JMP) und peripheren T-Lymphozyten während der Pacemaker-Phase

4.2.1 Analyse subzellulärer Ca^{2+} Signale in Jurkat T-Lymphozyten unter physiologischen Bedingungen

Die subzellulären Ca^{2+} Signale wurden auf Einzelzellbasis durch konfokales $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Imaging gemessen (Abb. 4.5). Die Entwicklung der subzellulären Ca^{2+} Signale kann in 3 Phasen eingeteilt werden: Die Basalphase vor der Stimulation mit OKT3, die Pacemaker-Phase, definiert als Phase zwischen Stimulation und Beginn des globalen Signals, und das globale Signal. Abb. 4.5 zeigt charakteristische Falschfarben-Bilder dieser drei Phasen (Abb. 4.5 a). Der zeitliche Verlauf der Ca^{2+} Konzentration der gesamten Zelle ist aufgeteilt in die Basalphase mit einer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von ca. 30 nM, die Pacemaker-Phase und das globale Signal mit einer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von maximal 300 nM (Abb. 4.5 b). Der Beginn des globalen Signals wurde in Anlehnung an Bootman et al. [149] als Zeitpunkt des Erreichens der halbmaximalen globalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ definiert. Während der Pacemaker-Phase wurden charakteristische subzelluläre Ca^{2+} Signale beobachtet, die im Line-Scan als Falschfarben- und Schwarz-Weiß-Auftragung dargestellt sind (Abb. 4.5 c, e), während der Basalphase waren nur wenige Signale > 112 nM am Zellrand zu erkennen. Die Amplitude der ausgewählten ROI am Zellrand war durchgehend um ~ 50 nM höher als in der ROI des Zellkerns (Abb. 4.5 d). Thomas et al. haben jedoch gezeigt, dass die unterschiedliche Umgebung von Zellkern und Cytosol zu einer unterschiedlichen Kalibrierung der Ca^{2+} sensitiven Farbstoffe führt und nicht auf realen Unterschieden zwischen cytosolischem und nucleärem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beruht [208].

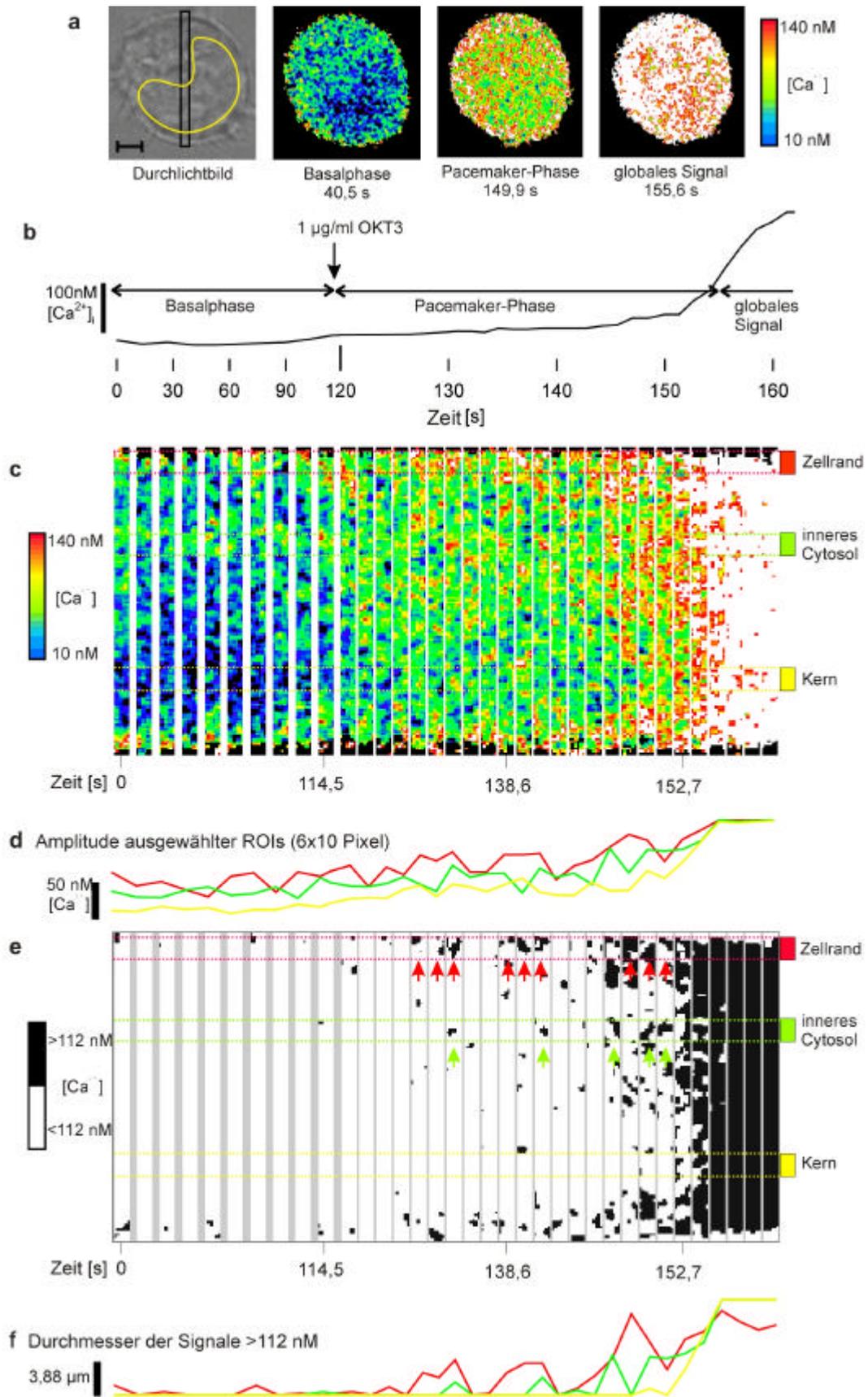


Abb. 4.5 Legende siehe folgende Seite

Abb. 4.5 Subzelluläre Ca^{2+} Signale nach Stimulation des TCR/CD3 Komplexes in einer Jurkat T-Lymphozyte in Anwesenheit von 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$. Jurkat T-Zellen wurden mit Fura-2/AM beladen und subzelluläre Ca^{2+} Signale wurden gemessen und ausgewertet wie unter Material und Methoden beschrieben. In dem Durchlichtbild der Zelle (a) wurde die Position des Kerns durch eine gelbe Umrandung markiert. Der Balken im Durchlichtbild repräsentiert 3 μm . Die Falschfarben-Bilder der Zelle (a) zeigen repräsentative konfokale Ratio-Bilder der Basalphase, der Pacemaker-Phase und des globalen Signals, wie in der zeitlichen Auftragung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$, gemittelt über die gesamte Zelle, in (b) zu erkennen ist. Der halbmaximale Wert zwischen der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ der Basalphase und des globalen Signals wurde als Beginn des globalen Signals definiert. Der Line-Scan in Falschfarben (c) zeigt die Entwicklung der subzellulären Ca^{2+} Signale nach Stimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ OKT3 bei 120 s. (d) Der rote, grüne und gelbe Verlauf der Amplitude entstammt den entsprechend gefärbten Regionen, die an der rechten Seite des Line-Scans (c) markiert sind. (e) Ein Schwellenwert von $> 112 \text{ nM}$ $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ wurde entsprechend der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ plus Schwellenwert 2 (siehe Abb. 4.3) gewählt. Ca^{2+} Signale $> 112 \text{ nM}$ sind als schwarze Pixel zu erkennen. (f) Die Verläufe der Signaldurchmesser korrespondieren mit den ROIs für Zellrand, inneres Cytosol und Kern, wie an der rechten Seite des Line-Scans markiert ist. Ähnliche subzelluläre Signale wurden in 13 Zellen analysiert.

Während der Pacemaker-Phase wurden in der Region am Zellrand die höchsten Ca^{2+} Konzentrationen gemessen, teilweise mit einer Amplitude $> 140 \text{ nM}$. Im Cytosol stieg die Amplitude von einzelnen Ca^{2+} Signalen bis zu 140 nM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$, wie anhand der roten Pixel zu sehen ist (Abb. 4.5 c). Abb. 4.5 d zeigt die Amplituden von 3 charakteristischen ROIs: Zellrand, Cytosol und Kern. Der Kern wurde anhand des Durchlichtbildes lokalisiert, wobei die Position im allgemeinen vollständig mit der Region niedrigeren $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ überlappte (Abb. 4.5 a Durchlichtbild und Ratio-Bild der Basalphase). In den Regionen des Zellrandes (roter Graph) und des Cytosol (grüner Graph) waren schon zu Beginn der Pacemaker-Phase subzelluläre Ca^{2+} Signale zu erkennen, während im Kern die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ nahezu gleich bleibt (gelber Graph) (Abb. 4.5 d). Erst kurz vor dem globalen Signal wurden im Kern subzelluläre Signale gemessen, allerdings mit deutlich geringerer Amplitude als im Cytosol oder am Rand.

Eine vereinfachte Darstellung der Ca^{2+} Signale ist in Abb. 4.5 e gegeben. Die schwarzen Pixel im Line-Scan zeigen die subzellulären Ca^{2+} Signale $> 112 \text{ nM}$. Bei ausschließlicher Betrachtung von Signalen mit einer Amplitude $> 112 \text{ nM}$ und einem Durchmesser $> 0,58 \mu\text{m}$, wurden besonders im Zellrandbereich oszillierende subzelluläre Ca^{2+} Signale gemessen (Abb. 4.5 e, rote Pfeile), die im Laufe der Zeit im Durchmesser deutlich zunehmen (Abb. 4.5 f, roter Graph, 149,2 s). Im Cytosol starteten diese Signale einige Sekunden später (Abb. 4.5 e, grüne Pfeile) und wiesen zu Beginn einen kleineren Durchmesser auf, der jedoch auch im Verlauf der Pacemaker-Phase anstieg (Abb. 4.5 f, grüne Linie). In der ROI des Zellkerns konnten keine oszillierenden subzellulären Signale mit einer Amplitude $> 112 \text{ nM}$ gemessen werden. Gegen Ende der Pacemaker-Phase stieg der Durchmesser der Ca^{2+} Signale kontinuierlich an. Nach Überschreiten einer kritischen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ wurden die subzellulären Signale Teil des globalen Signals und konnten nicht mehr voneinander unterschieden werden.

4.2.2 Analyse subzellulärer Ca^{2+} Signale in Jurkat T-Lymphozyten in Abwesenheit von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$

Die Entwicklung der subzellulären Ca^{2+} Signale in Jurkat T-Zellen in Abwesenheit von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$ war mit den Messungen in Anwesenheit von 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$ vergleichbar. Aus diesem Grund soll hier auf die detaillierte Darstellung in Falschfarben verzichtet werden. In Abwesenheit von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$ stieg die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ von 34 nM während der Basalphase (Abb. 4.6 a) beim globalen Signal auf ca. 260 nM an. Wie schon in Abb. 4.1 in manchen Zellen zu erkennen, war auch in der hier dargestellten Zelle die Pacemaker-Phase doppelt so lang, wie in der in Abb. 4.5 dargestellten Messung in Anwesenheit von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$. Während der Pacemaker-Phase konnten oszillierende Ca^{2+} Signale beobachtet werden (Abb. 4.6 b). Auch hier waren die ersten subzellulären Signale im Randbereich der Zelle zu finden, einige Sekunden später auch im inneren Cytosol (Abb. 4.6 b, Pfeile). Die Amplituden der Ca^{2+} Signale in den ROIs, die im Cytosol (Dreieck) und am Zellrand (Kreis) gesetzt wurden, waren vergleichbar mit denen unter $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}} = 1 \text{ mM}$ (Abb. 4.6 c vs. 4.4 d). Wie auch in Anwesenheit von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$ (Abb. 4.6 e), waren während der Pacemaker-Phase subzelluläre Signale mit einer Amplitude $> 114 \text{ nM}$ und einem Durchmesser $> 0,58 \mu\text{m}$ vor allem in der ROI am Zellrand und im Cytosol zu beobachten (Abb. 4.6 d).

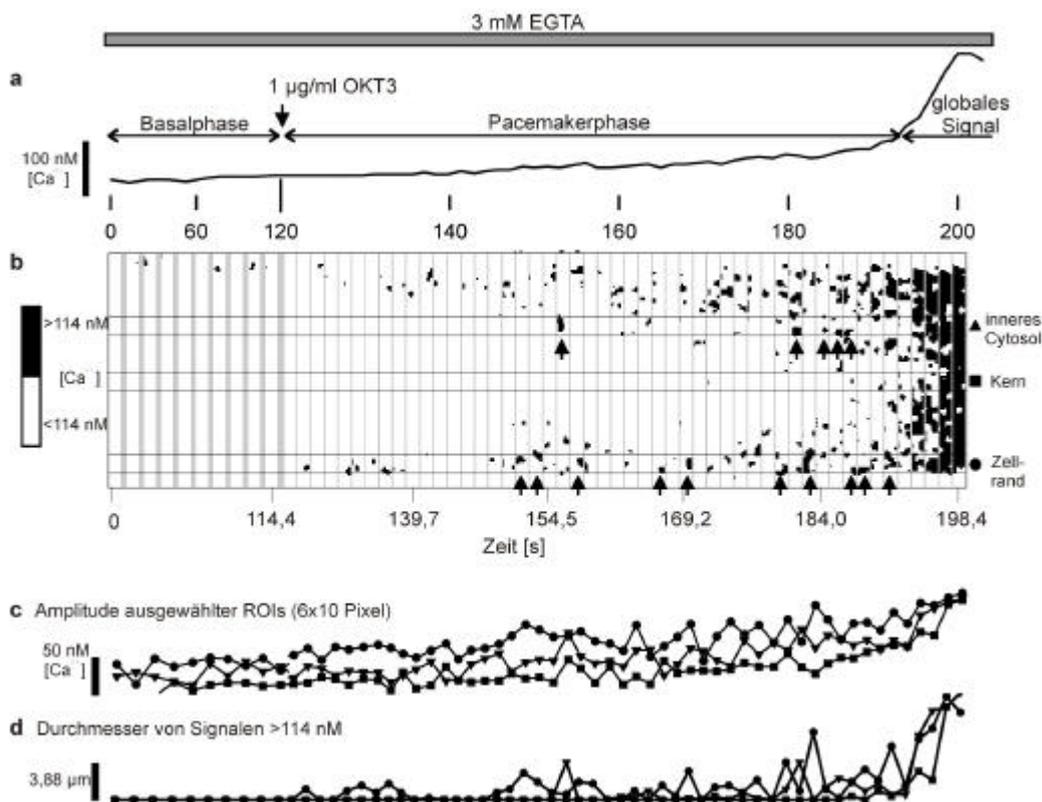


Abb. 4.6 Subzelluläre Ca^{2+} Signale nach Stimulation des TCR/CD3 Komplexes in einer Jurkat T-Lymphozyte in Abwesenheit von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$. Es wurden die gleichen experimentellen Bedingungen wie in Abb. 4.5 angewendet. Vor dem Start der Messung wurde 3 mM EGTA zu der Zellsuspension

gegeben, vorsichtig gemischt und dann wie unter Material und Methoden beschrieben auf ein beschichtetes Deckgläschen gegeben und die Messung gestartet. **(a)** Zeitlicher Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ über die gesamte Zelle gemittelt mit der Aufteilung in Basalphase, Pacemaker-Phase und globales Signal. **(b)** Für den schwarz-weiß Line-Scan wurden $[Ca^{2+}]_i > 114$ nM als Schwellenwert für einen schwarzen Pixel bestimmt. Die korrespondierenden ROIs und Symbole für die graphische Darstellung der Signalamplitude **(c)** und des Signaldurchmessers **(d)** sind an der rechten Seite des Line-Scan **(b)** markiert. Ähnliche subzelluläre Signale wurden in 10 Zellen gemessen.

Offensichtlich sind die subzellulären Ca^{2+} Signale nur geringfügig von $[Ca^{2+}]_{ex}$ abhängig, denn es wurden ähnliche Verläufe der Ca^{2+} Freisetzung während der Pacemaker-Phase in den Zellen mit $[Ca^{2+}]_{ex}$ in nominal Ca^{2+} -freiem Messpuffer und unter Zugabe des Ca^{2+} Kanalblockers SK-F 96365 gemessen. Die Amplitude der subzellulären Signale nahe bei der Plasmamembran erreichte in Anwesenheit von 1 mM $[Ca^{2+}]_{ex}$ eine Höhe von 104 ± 23 nM und im Cytosol 96 ± 18 nM. Die Fläche betrug $0,44 \pm 0,17 \mu m^2$ am Zellrand und $0,43 \pm 0,15 \mu m^2$ im Cytosol (Tab. 4.1). Die Messungen in Abwesenheit von $[Ca^{2+}]_{ex}$ zeigten sehr ähnliche, wenn auch leicht verringerte Amplituden und Signalflächen in Cytosol und Nähe der Plasmamembran (Tab. 4.1). Auch die basalen $[Ca^{2+}]_i$ waren annähernd gleich. Ein deutlicher Unterschied lag bei dem Startpunkt des globalen Signals, definiert als Zeitpunkt, bei dem die halbmaximale Amplitude des globalen Signals erreicht ist. Ohne $[Ca^{2+}]_{ex}$ begann das globale Signal ca. 20 s später, was die höhere Anzahl der analysierten Ca^{2+} Signale erklärt (Tab. 4.1). Die Frequenz, aufgetragen als Anzahl der Signale pro Sekunde, blieb mit und ohne $[Ca^{2+}]_{ex}$ annähernd konstant, nahm jedoch signifikant ab, wenn der Ca^{2+} Einstrom durch SK-F blockiert wurde (Tab. 4.1).

| | n | basale $[Ca^{2+}]_i$ [nM] | Startpunkt des globalen Signals [s] | Lokalisierung | Amplitude [nM] | Fläche [μm^2] | Frequenz [s^{-1}] | analysierte Signale |
|--|---|---------------------------|-------------------------------------|---------------|----------------|----------------------|-----------------------|---------------------|
| 1 mM $[Ca^{2+}]_{ex}$ | 6 | 31 ± 11 | $164,3 \pm 11,4$ | Zellrand | 104 ± 23 | $0,44 \pm 0,17$ | 0,68 | 30 |
| | | | | Cytosol | 96 ± 18 | $0,43 \pm 0,15$ | 0,59 | 26 |
| 3 mM EGTA | 6 | 30 ± 11 | $188,2 \pm 10,6$ | Zellrand | 93 ± 40 | $0,34 \pm 0,12$ | 0,66 | 45 |
| | | | | Cytosol | 82 ± 30 | $0,39 \pm 0,21$ | 0,44 | 30 |
| 1 mM $[Ca^{2+}]_{ex}$ & 10 mM SK-F | 3 | 36 ± 9 | $183,7 \pm 16,9$ | Zellrand | 109 ± 21 | $0,43 \pm 0,19$ | 0,33 | 21 |
| | | | | Cytosol | 99 ± 9 | $0,47 \pm 0,20$ | 0,24 | 15 |

Tab. 4.1 Charakterisierung subzellulärer Ca^{2+} Signale in Jurkat T-Zellen. Subzelluläre Ca^{2+} Signale während der Pacemaker-Phase von OKT3-stimulierten, Fura-2 beladenen Einzelzellen wurden analysiert, wie in „Material und Methoden“ und den Legenden der Abbildungen 4.5 und 4.6 beschrieben. Die Signale von zwei cytosolischen Regionen, eine nahe der Plasmamembran gelegen (Zellrand), eine mehr im inneren Cytosol gelegen (Cytosol) (s. auch Abb. 4.5 und 4.6), wurden miteinander verglichen.

4.2.3 Analyse subzellulärer Ca^{2+} Signale in peripheren T-Lymphozyten

Die peripheren T-Zellen wurden über Festphasen-gebundenes OKT3 stimuliert, da für ihre Stimulation ein quervernetzter CD3 Antikörper nötig war. Dadurch konnte keine Basalphase gemessen werden, sondern nur der Verlauf der Pacemaker-Phase und das globale Signal. Die subzellulären Ca^{2+} Signale wurden auf die gleiche Weise wie bei den Jurkat T-Zellen analysiert. Die Einzelzellbilder zeigten das schnelle Auftreten subzellulärer Ca^{2+} Signale in dem schmalen cytosolischen Streifen zwischen Plasmamembran und Kern (Abb. 4.7 a, 11,9 s). Während der fortschreitenden Pacemaker Phase breiteten sich die Signale weiter in den Kern aus (Abb. 4.7 a, 146,7 s). Verglichen mit den Jurkat T-Lymphozyten war die Pacemaker-Phase in den peripheren T-Zellen verlängert (Abb. 4.7 b vs. 4.5 b). Zu Beginn der Pacemaker-Phase war die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über die gesamte Zelle gemittelt ähnlich wie in den Jurkat T-Zellen. Das globale Signal stieg bis auf ca. 220 nM an (Abb. 4.7 b). Die Analyse der subzellulären Signale per Falschfarben oder schwarz-weiß Line-Scan zeigte jedoch deutlich die gleiche Verteilung und Entwicklung der Ca^{2+} Signale im cytosolischen Teil am Zellrand der peripheren T-Zelle wie im Zellrandbereich und im Cytosol der Jurkat T-Zellen (Abb. 4.7 c, e). Da der Kern der peripheren T-Zellen fast das gesamte Zellvolumen einnimmt, wurde bei den ROIs nicht zwischen Cytosol und Zellrand unterschieden. In der frühen Pacemaker-Phase waren hauptsächlich im schmalen Streifen Cytosol nahe der Plasmamembran subzelluläre Signale mit einer Amplitude bis über 140 nM zu beobachten (Abb. 4.7 c, rote und weiße Pixel). Ab ca. 137 s setzten sich diese Signale weiter in das Zellinnere fort. Es dauerte jedoch noch über 20 s bis die subzellulären Ca^{2+} Signale sich so weit amplifiziert hatten, dass das globale Signal begann (Abb. 4.7 c). Die Quantifizierung der Ca^{2+} Amplituden in Cytosol und Zellkern verdeutlicht die Beobachtungen des Line-Scan. Wie in den Jurkat T-Zellen war im Cytosol die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kontinuierlich um ca. 50 nM höher, und es traten während der Pacemaker-Phase oszillierende subzelluläre Ca^{2+} Signale auf. Diese oszillierenden Ca^{2+} Signale > 132 nM Schwellenwert wurden ausschließlich im cytosolischen Randbereich der Zelle gemessen, nicht in der ROI im Kern (Abb. 4.7 f).

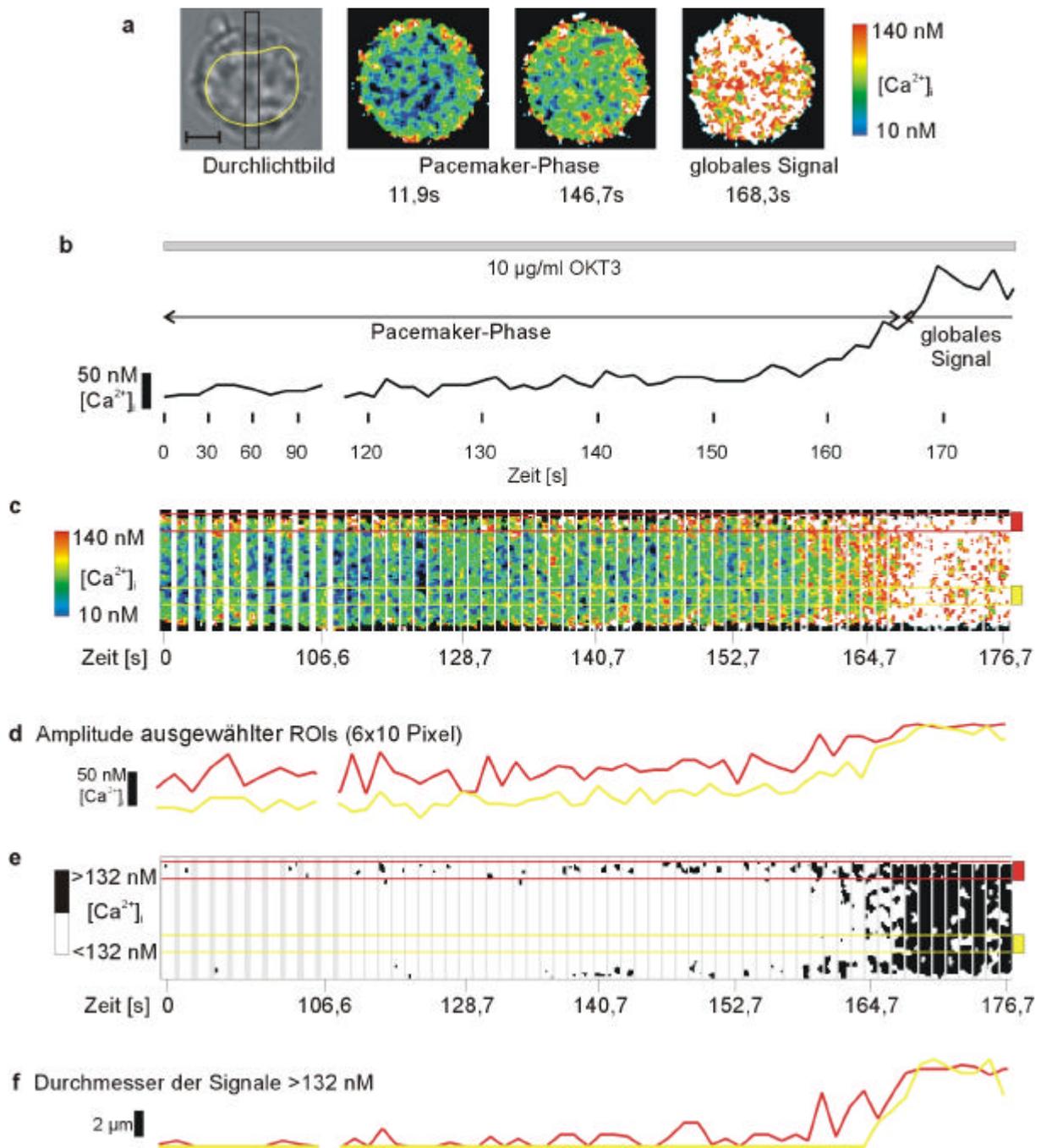


Abb. 4.7 Subzelluläre Ca²⁺ Signale nach Stimulation des TCR/CD3 Komplexes in einer peripheren humanen T-Lymphozyte. Periphere humane T-Zellen wurden präpariert, mit Fura-2/AM beladen und subzelluläre Signale wurden wie in „Material und Methoden“ beschrieben gemessen und analysiert. Im Durchlichtbild (a) der Einzelzelle ist der Kern mit einer gelben Umrandung gekennzeichnet. Der Balken repräsentiert 3 µm. Die Falschfarbenbilder der Einzelzelle zeigen repräsentative konfokale Ratio-Bilder der Pacemaker-Phase und des globalen Signals. Der zeitliche Verlauf der [Ca²⁺]_i der gesamten Zelle ist in (b) dargestellt. Der Line-Scan in Falschfarben (c) zeigt die Entwicklung der subzellulären Ca²⁺ Signale nach Stimulation mit Festphasen-gebundenem OKT3. (d) Der rote und gelbe Verlauf der Amplitude entstammt von den entsprechend gefärbten Regionen, die an der rechten Seite des Line-Scans (c) markiert sind. (e) Ein Schwellenwert von > 132 nM [Ca²⁺]_i wurde entsprechend der basalen [Ca²⁺]_i plus Schwellenwert 2 (siehe Abb. 4.3) gewählt. Ca²⁺ Signale > 132 nM sind als schwarze Pixel zu erkennen. (f) Die Verläufe für die Signaldurchmesser korrespondieren mit den auf der rechten Seite des Line-Scans (e) markierten ROIs für Cytosol und Kern. Ähnliche subzelluläre Signale wurden in 13 Zellen gemessen.

4.2.4 Lokalisierung von Organellen und Ca^{2+} Signalproteinen in Jurkat und humanen peripheren T-Zellen und Korrelation mit Pacemaker Signalen

Da die subzellulären Ca^{2+} Signale während der Pacemaker-Phase weitgehend unabhängig vom Ca^{2+} Einstrom waren, wurde mit konfokaler Immunhistochemie die Verteilung von Proteinen und Organellen untersucht, die an der Ca^{2+} Freisetzung aus den intrazellulären Speichern beteiligt sind (Abb. 4.8). SERCA ATPasen waren über die gesamte Jurkat T-Zelle verteilt (Abb. 4.8 A), mit Ausnahme des Kerns, der in den Jurkat T-Zellen zumeist nierenförmig erschien (Abb. 4.8 A). Die Mitochondrien waren in verschiedenen Regionen des Cytosols lokalisiert und überlappten teils mit der SERCA-ATPase (Abb. 4.8 A). Der TCR/CD3-Komplex wurde wie erwartet in der Plasmamembran gefunden (Abb. 4.8 A). Der RyR wurde ebenfalls wie ein Ring die Zelle umspannend nahe der Plasmamembran gefunden, teilweise auch in inneren cytosolischen Regionen (Abb. 4.8 A). Der IP_3R dagegen war punktförmig in Clustern nahe der Plasmamembran zu finden. Die Stimulation des TCR/CD3-Komplexes durch OKT3 vor der Fixierung der Zellen führte zu keiner nennenswerten Veränderung der Anordnung der Organellen oder Ca^{2+} Signalproteine, allein CD3 wurde erwartungsgemäß in Clustern zusammen gezogen.

Die gleiche Analyse wurde mit humanen peripheren T-Zellen durchgeführt. Deutlich wurde in diesen Experimenten vor allem auch der Größenunterschied zwischen der Lymphoma-Zelllinie (Abb. 4.8 A) und den peripheren T-Zellen (Abb. 4.8 B), was sich z.B. in der Verteilung der SERCA-ATPasen zeigte, die nur noch in einem kleinen Bereich nahe des Zellrandes zu finden waren (Abb. 4.8 B). Der Zellkern nahm fast das gesamte Volumen der Zelle ein, wies aber auch die nierenförmige Struktur auf (Abb. 4.8 B). Die Anzahl der Mitochondrien war verringert, der TCR/CD3-Komplex lag in Clustern vor (Abb. 4.8 B). Die Färbung des RyR war in den peripheren T-Zellen intensiver, aber auf die gleiche Weise ringförmig um die Zelle verteilt und im Innern der Zelle zu finden (Abb. 4.8 B), wie in den Jurkat T-Zellen. Der IP_3R war in den peripheren T-Zellen ringförmig in der Nähe der Plasmamembran und teilweise sogar in den Pseudopodien der Zelle zu finden (Abb. 4.8 B). Die Stimulation mit OKT3 führte zu keiner Veränderung der Verteilung von Organellen und Ca^{2+} Signalproteinen (Abb. 4.8 B).

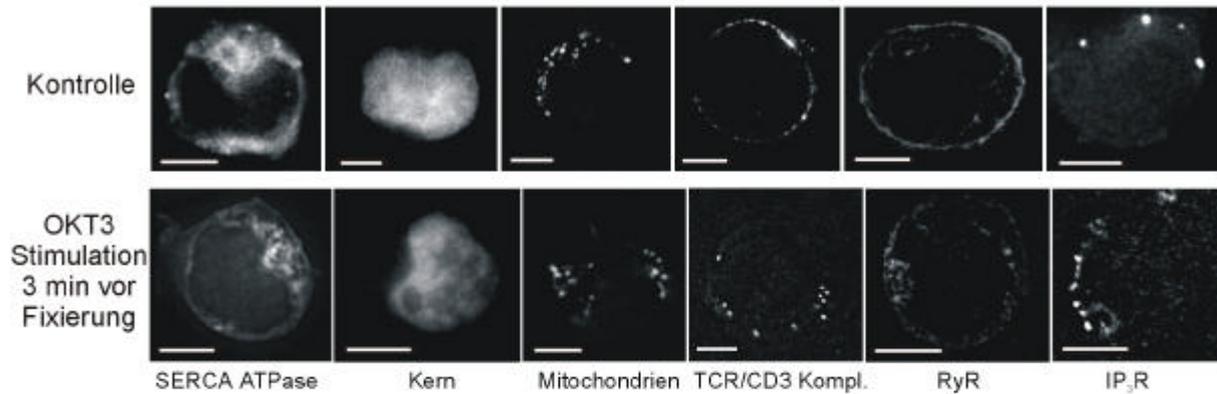
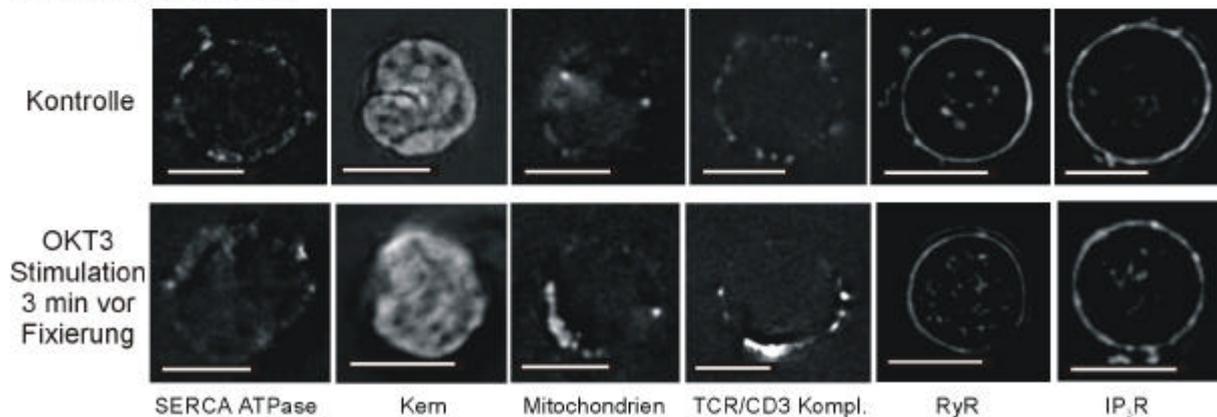
A Jurkat T-Zellen**B periphere T-Zellen**

Abb. 4.8 Lokalisation von Organellen und Ca²⁺ Signalproteinen in Jurkat und peripheren T-Lymphozyten. Jurkat T-Zellen (A) oder periphere T-Zellen (B) wurden folgendermaßen gefärbt: für die SERCA-ATPasen wurde BODIPY-Thapsigargin genutzt, für den Kern Substanz H33258, für die Mitochondrien MitoTracker Orange CMTMRos, für CD3 der anti-CD3 Antikörper (OKT3) und ein FITC-konjugierter Zweitantikörper, für den RyR BODIPY FL-X Ryanodin und für den IP₃R anti-IP₃R Antiserum und ein Rhodamin-konjugierter Zweitantikörper. Die Zellen, die jeweils in der unteren Reihe gezeigt werden, wurden 3 min vor der Fixierung mit 10 µg/ml OKT3 stimuliert und dann auf gleiche Weise gefärbt. Gezeigt sind jeweils charakteristisch gefärbte Einzelzellen, es wurden pro Bedingung zwischen 10 und 58 Zellen gemessen. Keine oder nur sehr geringe Fluoreszenz wurde in den negativen Kontrollzellen gesehen, die entweder ohne Erstantikörper oder mit einem 10- bzw. 100-fachen Überschuss Ryanodin bzw. Thapsigargin inkubiert waren. Der weiße Balken repräsentiert jeweils 5 µm.

In weiteren Versuchen wurden die IP₃R Typ 1, 2 und 3 lokalisiert und wie bei der Färbung mit dem Antiserum eine punktförmige Verteilung der Rezeptoren nahe der Plasmamembran gefunden (Abb. 4.9). Eine spezifische Verteilung der Subtypen konnte nicht beobachtet werden. Die schematische Zeichnung auf der linken Seite der Abbildung zeigt die für Jurkat T-Zellen typische Verteilung von nierenförmigem Zellkern und Cytosol. Weiterhin ist eine typische ROI für einen Line-Scan dargestellt. Von einer mit OKT3 stimulierten Jurkat T-Zelle wurde eine ROI von verschiedenen Zeitpunkten der Pacemaker-Phase dargestellt. Während der Pacemaker-Phase waren typische subzelluläre Ca²⁺ Signale > 107 nM zunächst nahe der Plasmamembran (145,6 s), im inneren Cytosol (145,6 und 165,3 s) und schließlich in der Nähe des Kerns zu erkennen (Abb. 4.9). Diese Signale korrelieren mit dem IP₃R Typ

1, 2 und 3 und dem RyR, wobei die IP₃R hauptsächlich in der Region, wo die frühen subzellulären Ca²⁺ Signale auftauchten, exprimiert wurde. Der RyR korrelierte sowohl mit den frühen Pacemaker-Signalen nahe der Plasmamembran, als auch mit den subzellulären Ca²⁺ Signalen im inneren Cytosol, was andeutet, dass der RyR zu der Entwicklung der Signale in Richtung des Zellkerns beiträgt.

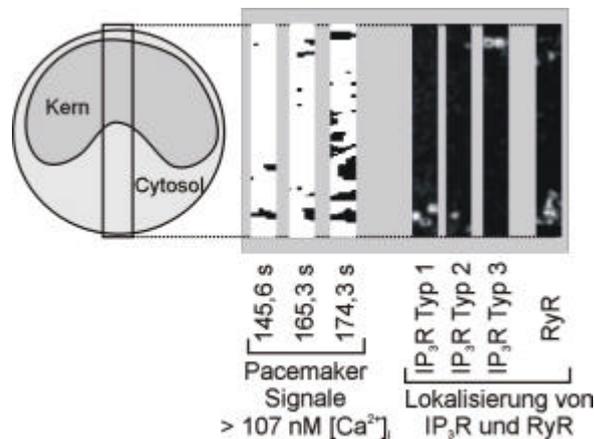


Abb. 4.9 Korrelation von Pacemaker Ca²⁺ Signalen mit IP₃R Typ 1 bis 3 und RyR. Die ROI zeigt Ca²⁺ Signale >107 nM von ausgewählten Zeitpunkten während der Pacemaker-Phase einer mit OKT3 stimulierten Jurkat T-Zelle wie in Abb. 4.5 gezeigt. Die Pacemaker-Signale sind hauptsächlich nahe der Plasmamembran und in der cytosolischen Region lokalisiert und breiten sich gegen Ende der Pacemaker-Phase in Richtung Kern aus. Im Vergleich mit den IP₃R Subtyp- und den RyR-Färbungen wurden die ersten Pacemaker-Signale in der Region gefunden, wo IP₃R und RyR lokalisiert sind. Die Färbung der IP₃R und des RyR wurden in 3 unabhängigen Experimenten durchgeführt, wie unter „Material und Methoden“ beschrieben.

4.3 Analyse subzellulärer Ca²⁺ Signale in Typ 3 RyR knock-down T-Zell-Klonen während der Pacemaker- und der Plateau-Phase

4.3.1 Analyse der subzellulären Ca²⁺ Signale während der Pacemaker-Phase nach TCR/CD3 Stimulation

Um die Aussage zu verifizieren, dass der RyR für die Weiterleitung der Ca²⁺ Signale in Richtung des Kerns mit verantwortlich ist, wurden die folgenden Untersuchungen an einem RyR Typ 3 knock-down Jurkat T-Zell-Klon im Vergleich mit einem Kontrollklon durchgeführt. Der RyR Typ 3 knock-down Klon #25 wurde durch stabile Transfektion von einer Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe mit dem RyR Typ 3 antisense-Plasmid pTRE2-511 hergestellt [223]. Als Kontrolle wurde der T-Zell-Klon #E2 stabil mit dem antisense-Plasmid pTRE2-EGFP transfiziert; pTRE2-EGFP codiert für ein irrelevantes 250 bp langes Fragment aus dem Plasmid pEGFP-N1.

Die physiologische Stimulation mit dem anti-CD3 Antikörper OKT3 induzierte in #E2 ein schnelles biphasisches Signal, wie es auch in den sonst verwendeten Jurkat Klon JMP beobachtet wurde (Abb. 4.10 a). Die Ca²⁺ Antwort von #25 zeigte eine leichte Verzögerung und ein etwas vermindertes Signal (Abb. 4.10 b). Da es sich jedoch um Einzelzellmessungen handelt, sollte diesen geringen

Unterschieden keine allzu große Bedeutung beigemessen werden. Die Mikroinjektion des RyR-Antagonisten RuRed führte in #E2 zu einer partiellen Blockierung des TCR/CD3-vermittelten Signals und somit zu einem langsamen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 4.10 c). Durch die Injektion des IP_3 -R-Antagonisten IP_3S wurde die Entstehung eines globalen Ca^{2+} Signals vollständig blockiert (Abb. 4.10 d). Diese Ergebnisse bestätigen das bereits veröffentlichte Modell, dass IP_3 für die Entwicklung eines globalen Ca^{2+} Signals von essentieller Bedeutung ist [43], und weisen darauf hin, dass auch der RyR bei der Weiterleitung des Ca^{2+} Signals während der Pacemaker-Phase eine entscheidende Rolle spielt.

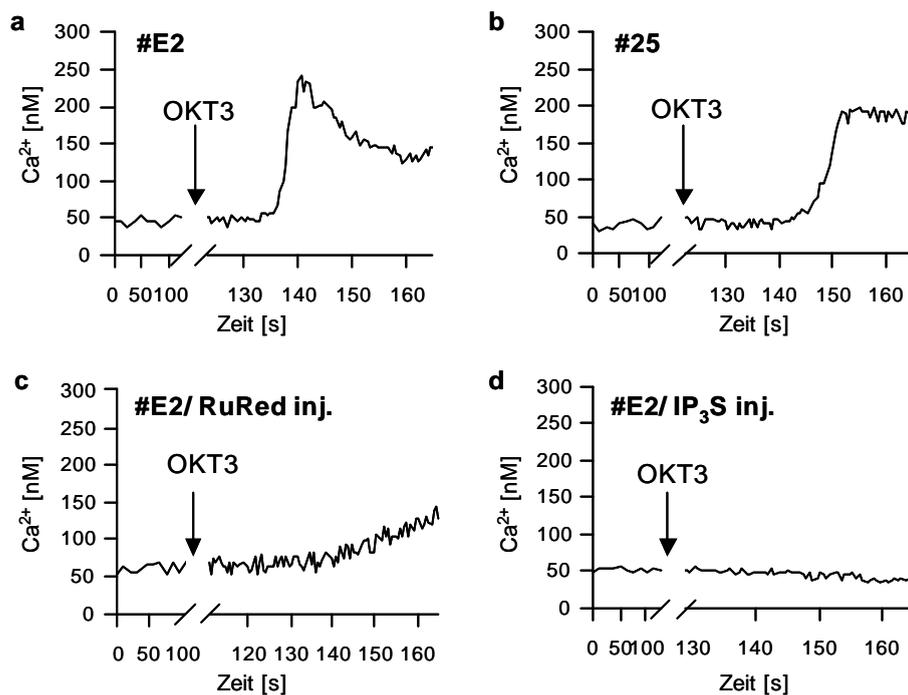


Abb. 4.10 Effekte des RyR Typ 3 knock-downs, der RyR- und IP_3 -Inhibition auf das globale Ca^{2+} Signal nach TCR/CD3-Stimulation. Fura-2 beladene T-Zellen (Klon #E2: a, c, d oder Klon #25: b) wurden per Imaging als Einzelzellen gemessen. OKT3 wurde in einer Endkonzentration von 10 μ g/ml wie gekennzeichnet zugegeben. Die Inhibitoren wurden direkt vor dem Start der Messung injiziert: c RuRed, Konzentration in der Pipette 10 μ M, d IP_3S , Konzentration in der Pipette 80 μ M. Vor der OKT3 Stimulation wurde 0,1 Ratio/s aufgenommen, nach der Stimulation 2 Ratios/s. Gezeigt sind jeweils charakteristische Verläufe von insgesamt zwischen 18 und 39 gemessenen Zellen.

Durch konfokales Imaging wurde die Rolle des RyR näher analysiert (Abb. 4.11). Zunächst wurde die Reduktion der RyR Expression über eine Färbung mit BODIPY FL-X-Ryanodin überprüft (Abb. 4.11 Aa vs. 4.11 Ba). In den Zellen des Kontrollklons #E2 war die Expression des RyR im Randbereich und teilweise auch im inneren Cytosol zu erkennen (Abb. 4.11 Aa, vergleichbar mit der RyR-Expression in Klon JMP, Abb. 4.8 A RyR), in den Zellen des RyR Typ 3 knock-down Klons ist die Expression gar nicht zu erkennen bzw. stark vermindert (Abb. 4.11 Ba). Wie von Schwarzmann et al. gezeigt wurde, ist die IP_3 R Expression in den beiden Zelltypen nahezu gleich [223]. In dem hier gezeigten Beispiel fand die Stimulation der Zellen über extrazelluläre Zugabe von OKT3 (10 μ g/ml

Endkonzentration) statt. Die Ratiobilder in Falschfarben entstammen der Pacemaker-Phase und zeigen die unterschiedliche Verteilung und Amplitude der lokalen Ca^{2+} Signale (Abb. 4.11 Ab, Bb). Der zeitliche Verlauf der Pacemaker-Signale ist jeweils von 3 charakteristischen subzellulären Regionen aufgetragen: Zellrand, Cytosol und Kern. Die Regionen sind in der Skizze links in Abb. 4.11 Ab bzw. Bb gekennzeichnet. Am Zellrand und im Kern sind in beiden Klonen #E2 und #25 vergleichbar viele bzw. wenige subzelluläre Ca^{2+} Signale ähnlicher Amplitude zu erkennen (Abb. 4.11 Ab vs. Bb rechts). Im Cytosol jedoch ist die Anzahl der subzellulären Signale bei Klon #25 gegenüber Klon #E2 vermindert, die Amplituden reichen von ca. 50 bis teilweise über 100 nM und sind in den beiden Klonen vergleichbar (Abb. 4.11 Ab vs. Bb rechts). Diese Analyse wurde ausgedehnt auf Zellen, die vor der Stimulation mit OKT3 mit RuRed bzw. IP_3S mikroinjiziert wurden (Abb. 4.11 C, D). Unter allen Bedingungen waren die Amplituden am Zellrand immer größer als im Cytosol oder im Kern. In der gleichen Region waren die Amplituden unter allen Bedingungen miteinander vergleichbar, signifikante Unterschiede wurden nicht beobachtet (Abb. 4.11 C). Bei der Analyse der Frequenz der Pacemaker-Signale zeigen sich jedoch signifikante Unterschiede in allen 3 analysierten Regionen bei den Zellen, die vor der Stimulation mit OKT3 mit RuRed oder IP_3S injiziert worden waren (Abb. 4.11 D). Die Reduktion der Signal-Frequenz durch RuRed und IP_3S in #E2 ist nahezu gleich. Die Frequenz der Ca^{2+} Signale beim RyR Typ 3 knock-down Klon #25 war nur im Cytosol deutlich vermindert. Am Zellrand und im Kern wurde eine ähnliche Frequenz wie im Kontrollklon #E2 gemessen (Abb. 4.11 D).

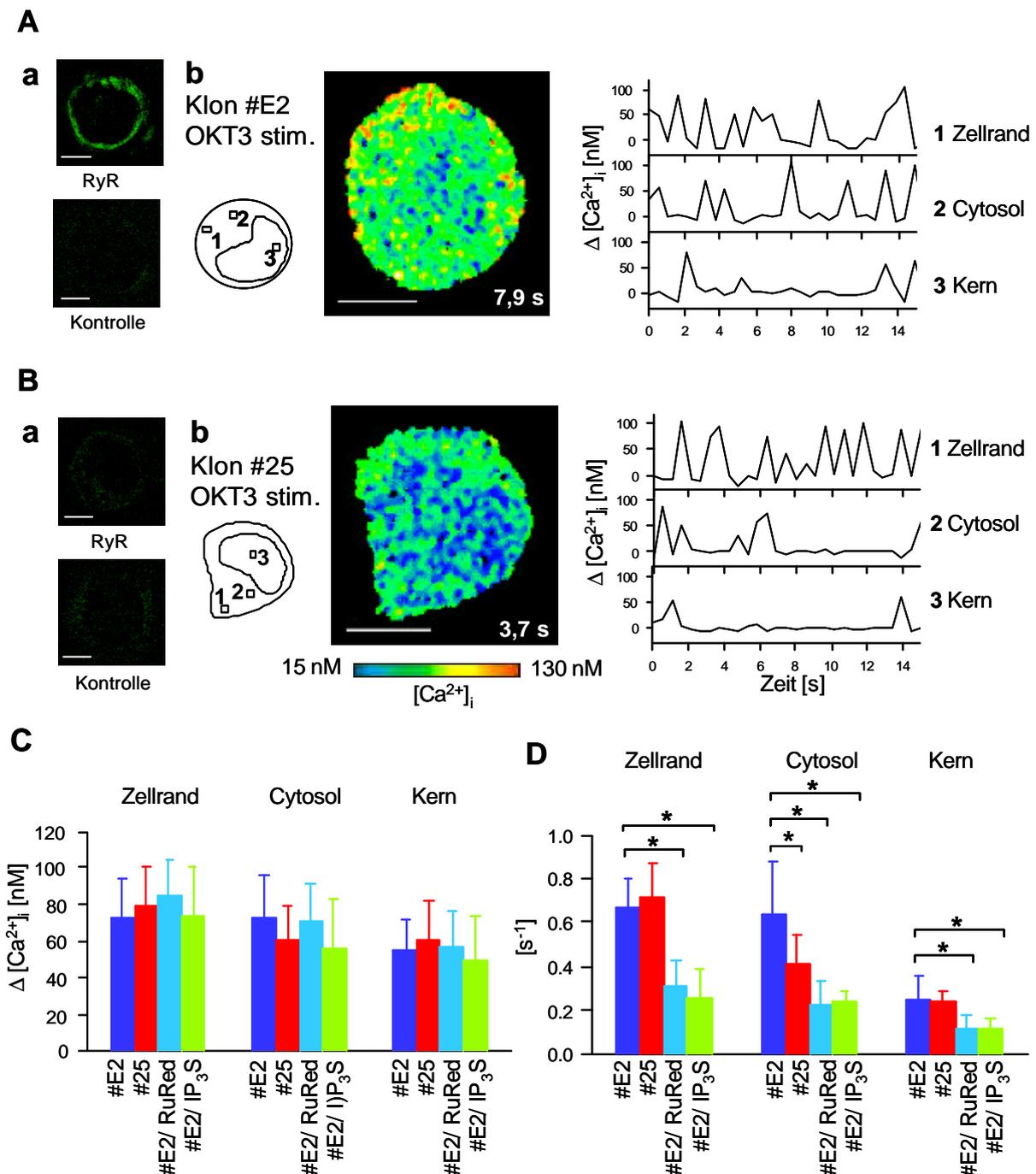


Abb. 4.11 Effekte des RyR Typ 3 knock-downs, der RyR- und der IP₃R-Inhibition auf die lokalen Pacemaker-Signale nach TCR/CD3-Stimulation. Fura-2 beladene T-Zellen (Klon #E2: **A** oder Klon #25: **B**) wurden per Imaging als Einzelzellen gemessen. OKT3 wurde in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben oder als Beschichtung auf die Deckgläschen gegeben. **A**, **B** **a** Für die Färbung des RyR wurde BODIPY-FL-X verwendet, bei den Kontrollen wurde zusätzlich ein 10-facher Überschuss an Ryanodin gegeben (Details s. „Material und Methoden“). **b** Als Ratiobilder in Falschfarben wurden charakteristische Bilder aus der Pacemaker-Phase gewählt. Der weiße Balken repräsentiert 5 µm. Die Amplituden zeigen den Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ während der Pacemaker-Phase in den Regionen Zellrand, Cytosol und Kern, wie links in der schematisch gezeigten Zelle markiert. Der Zeitpunkt 0 stellt den Beginn der Pacemaker-Phase dar. **C**, **D** Die Inhibitoren wurden direkt vor dem Start der Messung injiziert: RuRed, Konzentration in der Pipette 10 µM, IP₃S, Konzentration in der Pipette 80 µM. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SD (n = 3 Zellen mit jeweils 3 ROIs pro subzellulärer Region: Zellrand, Cytosol, Kern). *, signifikante Unterschiede wie dargestellt (p < 0,05, Student's T-Test).

4.3.2 Analyse der subzellulären Ca^{2+} Signale während der Pacemaker-Phase nach Stimulation des cADPR/ Ca^{2+} -Signalwegs

Es ist bereits bekannt, dass cADPR die Ca^{2+} Freisetzung über den RyR Typ 3 aktiviert, und dass cADPR während des langanhaltenden Ca^{2+} Signals in T-Zellen eine entscheidende Rolle spielt [43, 223]. Um die Rolle des cADPR während der Pacemaker-Phase bei der Entwicklung des Ca^{2+} Signals zu untersuchen, wurden dem vorherigen Abschnitt vergleichbare Analysen durchgeführt. Anstatt den TCR/CD3 Komplex zu stimulieren, wurde cADPR in die Einzelzelle injiziert, um ausschließlich den RyR zu stimulieren. Als Alternative zu cADPR wurde das von der Arbeitsgruppe um Li-he Zhang zur Verfügung gestellte membranpermeante cADPR-Analogon cIDPRE verwendet (Abb. 4.12).

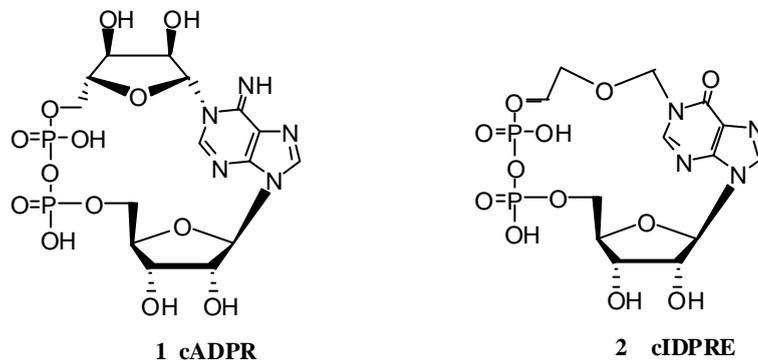


Abb. 4.12 Strukturformel von cADPR (1) und dem membranpermeanten cADPR-Analogon cIDPRE (2). Im Vergleich zum cADPR ist Adenosin durch Inosin ersetzt und es fehlt die „nördliche“ Ribose. Die cyclische Verknüpfung zwischen Phosphatgruppe und Inosin wird über eine Ether-Bindung gewährleistet, wodurch die Substanz lipophiler wird.

Die Mikroinjektion einer moderaten cADPR-Konzentration (20 μM) führte im Kontrollklon #E2 zu einem verzögerten langsamen Ca^{2+} Anstieg mit globalem Signal mit mäßiger Amplitude (Abb. 4.13 a). Dagegen konnte im RyR knock-down Klon #25 kein oder nur ein sehr geringer Anstieg der Ca^{2+} Konzentration in der Zelle gemessen werden (Abb. 4.13 b). Ein globales Signal konnte nicht beobachtet werden. Das membranpermeante cADPR-Analogon cIDPRE wurde extrazellulär zugegeben und aktivierte in der Endkonzentration von 0,5 mM in #E2 ein schnelles langanhaltendes Ca^{2+} Signal, das durch die vorherige Injektion von RuRed vollständig blockiert wurde (Abb. 4.13 c). Im Klon #25 war das Ca^{2+} Signal nach Stimulation mit cIDPRE deutlich verzögert und die Amplitude des globalen Ca^{2+} Signals reduziert (Abb. 4.13 d).

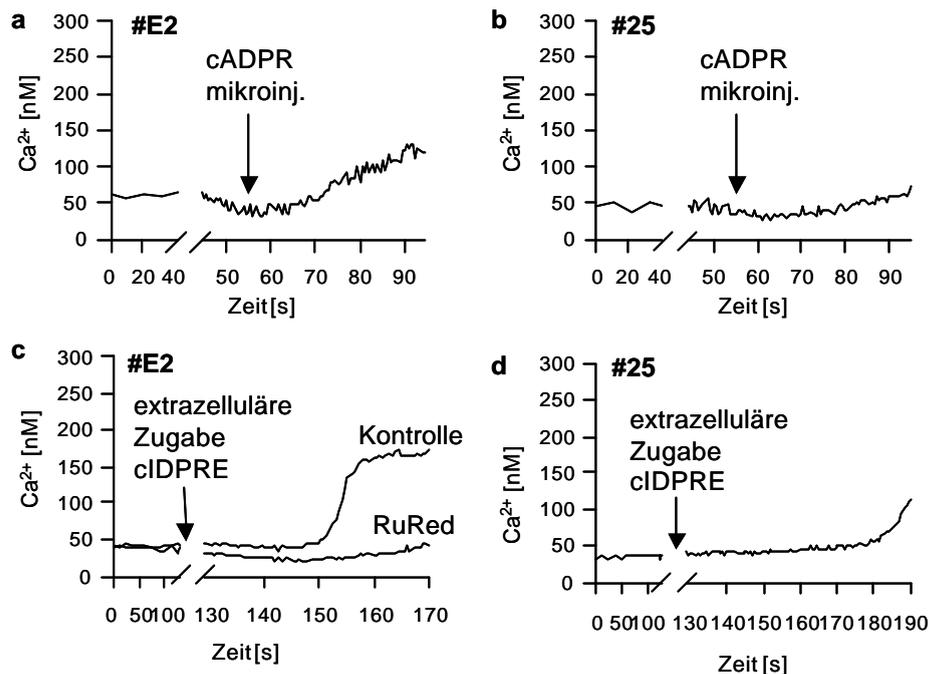


Abb. 4.13 Effekte des RyR Typ 3 knock-downs oder der RyR-Inhibierung auf das globale Ca^{2+} Signal nach Aktivierung des cADPR/ Ca^{2+} -Signalwegs. Fura-2 beladene T-Zellen (Klon #E2: **a, c** oder Klon #25: **b, d**) wurden per Imaging als Einzelzellen gemessen. **a, b**: cADPR wurde in einer Endkonzentration von 20 μM Konzentration in der Pipette injiziert. **c, d**: cIDPRE wurde extrazellulär in der Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben. RuRed wurde direkt vor dem Start der Messung injiziert (Konzentration in der Pipette 10 μM). Gezeigt sind jeweils charakteristische Verläufe von insgesamt zwischen 15 und 24 gemessenen Zellen.

Die Ratiobilder in Falschfarbendarstellung zeigen den Unterschied der beiden Klone #E2 und #25 nach der Mikroinjektion von cADPR in der Verteilung und der Amplitude der subzellulären Signale während der Pacemaker-Phase (Abb. 4.14 A vs. B). In #E2 waren am Zellrand und im Cytosol subzelluläre Signale zu beobachten, im Kern treten nur selten subzelluläre Ca^{2+} Signale auf (Abb. 4.14 A). Im RyR knock-down Klon #25 waren in allen 3 betrachteten Regionen während der Pacemaker-Phase kaum subzelluläre Signale zu finden (Abb. 4.14 B). Die detaillierte Analyse der Ca^{2+} Signale nach cADPR Mikroinjektion oder cIDPRE Stimulation zeigt Parallelen zu der TCR/CD3-Stimulation auf. Zum einen sinken die mittleren Amplituden vom Zellrand, über das Cytosol zum Kern hin (Abb. 4.14 C). Zum anderen war zwischen den einzelnen Bedingungen innerhalb der subzellulären Regionen Zellrand, Cytosol und Kern kein großer Unterschied zu erkennen. Auf die Amplitude scheint der Typ 3 RyR knock-down oder die der Stimulation mit cIDPRE vorgeschaltete RuRed-Injektion keinen Einfluss zu haben (Abb. 4.14. C). Im Unterschied zu den Amplituden hat der Typ 3 RyR knock-down, vergleichbar mit der TCR/CD3-Stimulation, einen Einfluss auf die Frequenz der Pacemaker-Signale nach der Mikroinjektion von cADPR oder der Stimulation mit cIDPRE (Abb. 4.14 D). Die Frequenz der Signale im Cytosol ist nach cADPR-Mikroinjektion oder cIDPRE-Stimulation signifikant in Klon #25 erniedrigt. Auch die Injektion von RuRed in Klon #E2 vor der cIDPRE-Stimulation führt zu einer signifikanten Abnahme der Signalfrequenz im Cytosol. Des Weiteren konnte ein signifikanter

Unterschied zwischen den Klonen bei den Pacemaker-Signalen im Kern beobachtet werden. Im Zellrandbereich gibt es keine signifikanten Unterschiede der Frequenzen (Abb. 4.14 D). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach der Stimulation des cADPR-Signalweges der Typ 3 RyR eine wichtige Rolle bei der Amplifikation der lokalen Pacemaker-Signale spielt, um durch eine steigende Ca^{2+} Signal-Frequenz die lokalen Signale ins Cytosol weiterzuleiten.

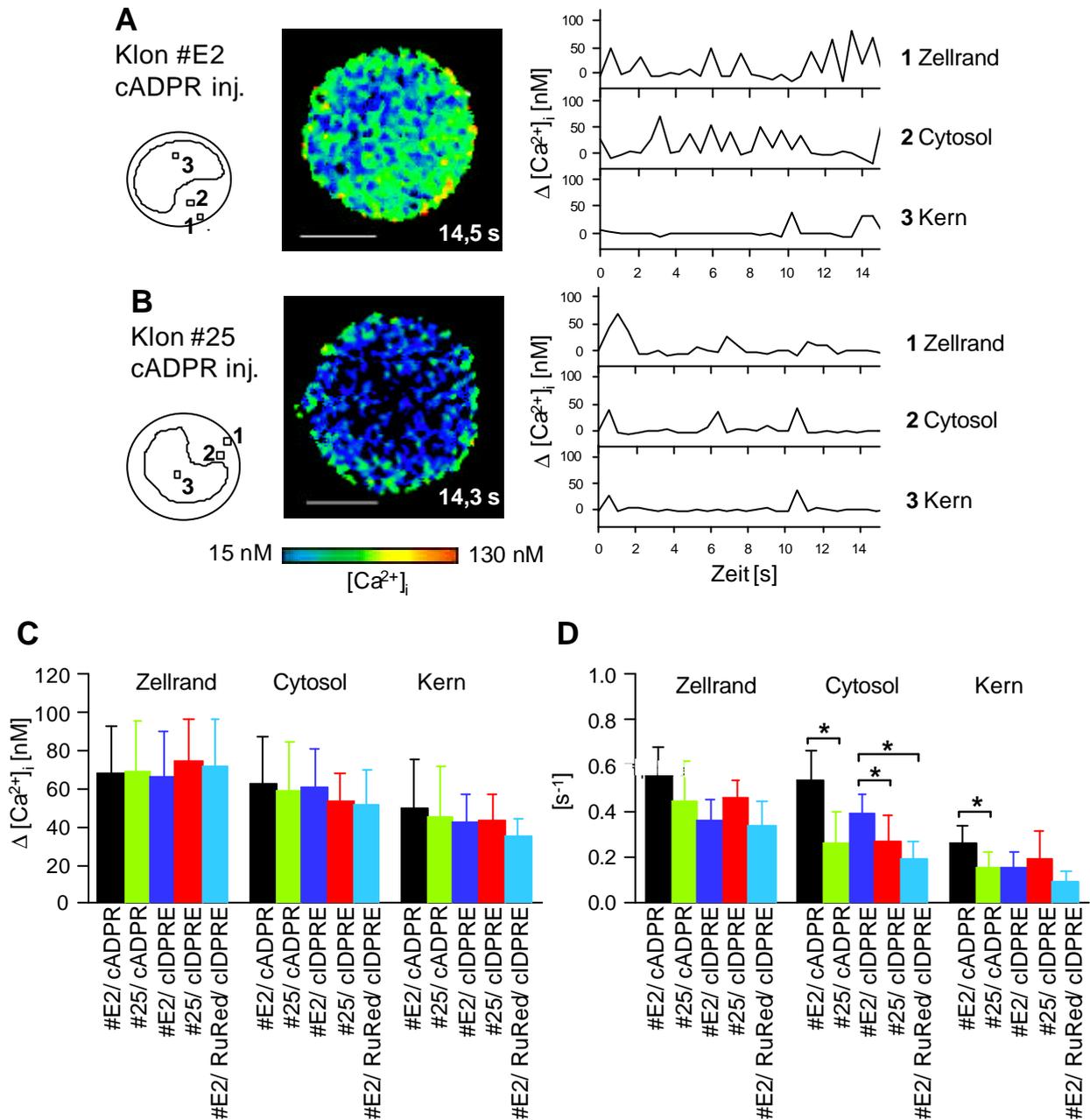


Abb. 4.14 Effekte des RyR Typ 3 knock-downs und der RyR-Inhibition auf die lokalen Pacemaker-Signale nach Aktivierung des cADPR- Ca^{2+} -Signalwegs. Fura-2 beladene T-Zellen (Klon #E2: **A** oder Klon #25: **B**) wurden per Imaging als Einzelzellen gemessen. **A**, **B** Als Ratiobilder in Falschfarben wurden charakteristische Bilder aus der Pacemaker-Phase gewählt. Der weiße Balken repräsentiert 5 μm . Die Amplituden zeigen den Verlauf der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der Pacemaker-Phase in den Regionen Zellrand, Cytosol und Kern, wie links in der schematisch gezeigten Zelle markiert. Der Zeitpunkt 0 stellt den Zeitpunkt der cADPR-Mikroinjektion (Konzentration in der Pipette 20 μM) dar.

C, D cADPR wurde in der Konzentration von 20 μM (Konzentration in der Pipette) injiziert, cIDPRE wurde in der Endkonzentration von 0,5 mM extrazellulär zugegeben, RuRed (Konzentration in der Pipette 10 μM) wurde direkt vor der Messung injiziert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n = 3 Zellen mit jeweils 3 ROIs pro subzellulärer Region: Zellrand, Cytosol, Kern). * - markiert signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, Student's T-Test).

4.3.3 Analyse der subzellulären Ca^{2+} Signale während der langanhaltenden Plateau-Phase nach TCR/CD3 Stimulation

Nach Stimulation des TCR/CD3 Komplexes steigt zunächst die IP_3 -Konzentration schnell an [43]. Die Konzentration von cADPR wird dagegen nur langsam erhöht und findet während der langanhaltenden Plateau-Phase des Ca^{2+} Signals ihr Maximum [43]. Daraus geht hervor, dass cADPR und der RyR als vermutlicher Zielort des cADPR für das langanhaltende Ca^{2+} Signal eine entscheidende Rolle spielen [43, 223]. Die subzellulären Ca^{2+} Signale vom RyR Typ 3 knock-down Klon #25 und vom Kontrollklon #E1 wurden vergleichend analysiert. In vorangegangenen fluorimetrischen Untersuchungen war die Plateau-Phase des Kontrollklons #E1 eingehender charakterisiert worden [223]. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Untersuchungen der Plateau-Phase der Klon #25 mit dem Kontrollklon #E1 verglichen.

Für die Analyse des langanhaltenden Signals wurden die Zellen mit Festphasen-gebundenem OKT3 stimuliert, was zu einem schnellen und hohen Ca^{2+} Signal führte (Abb. 4.15 Aa, Ba). Das globale Signal wurde abgewartet und erst nach ca. 16 min die Messung mit maximaler zeitlicher Auflösung gestartet (Abb. 4.15 Aa, Ba). Im Vergleich zeigte sich wie erwartet, dass auch auf Einzelzellbasis im Mittel das langanhaltende Ca^{2+} Signal im RyR Typ 3 knock-down Klon #25 reduziert war (Abb. 4.10 Aa vs. Ba, grüner Graph). In Klon #E1 lag die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Mittel bei ca. 150 nM, in Klon #25 unter 100 nM. Für die Analyse der subzellulären Ca^{2+} Signale wurde jeweils eine repräsentative Einzelzelle (roter Graph) ausgewählt, deren zeitlicher Verlauf der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ annähernd dem Mittelwert der Einzelzellmessung (grüner Graph) entsprach. In der Plateau-Phase zeigte der Klon #E1 viele subzelluläre Ca^{2+} Signale mit einer Amplitude bis teilweise über 375 nM über die gesamte Zelle verteilt. Klon #25 wies nur im cytosolischen Bereich vereinzelt höhere subzelluläre Signale bis maximal 375 nM auf (Abb. 4.15 Ab vs. Bb). In den analysierten Regionen (Abb. 4.15 Ab, Bb rechts markiert) lagen die Amplituden der subzellulären Ca^{2+} Signale bei Klon #E1 über 115 nM, bei Klon #25 kam fast kein Signal über 115 nM hinaus (Abb. 4.15 Ac, Bc gepunktete Linie). Weiterhin war die gesamte Anzahl der Ca^{2+} Signale bei Klon #25 in allen analysierten ROIs deutlich niedriger als bei Klon #E1 (Abb. 4.15 Ac, Bc).

Diese Daten zeigen zusätzlich zu der Analyse der subzellulären Ca^{2+} Signale während der Pacemaker-Phase die Notwendigkeit des RyR Typ 3 für die Amplifikation lokaler Ca^{2+} Signale während der langanhaltenden Plateau-Phase in T-Lymphozyten.

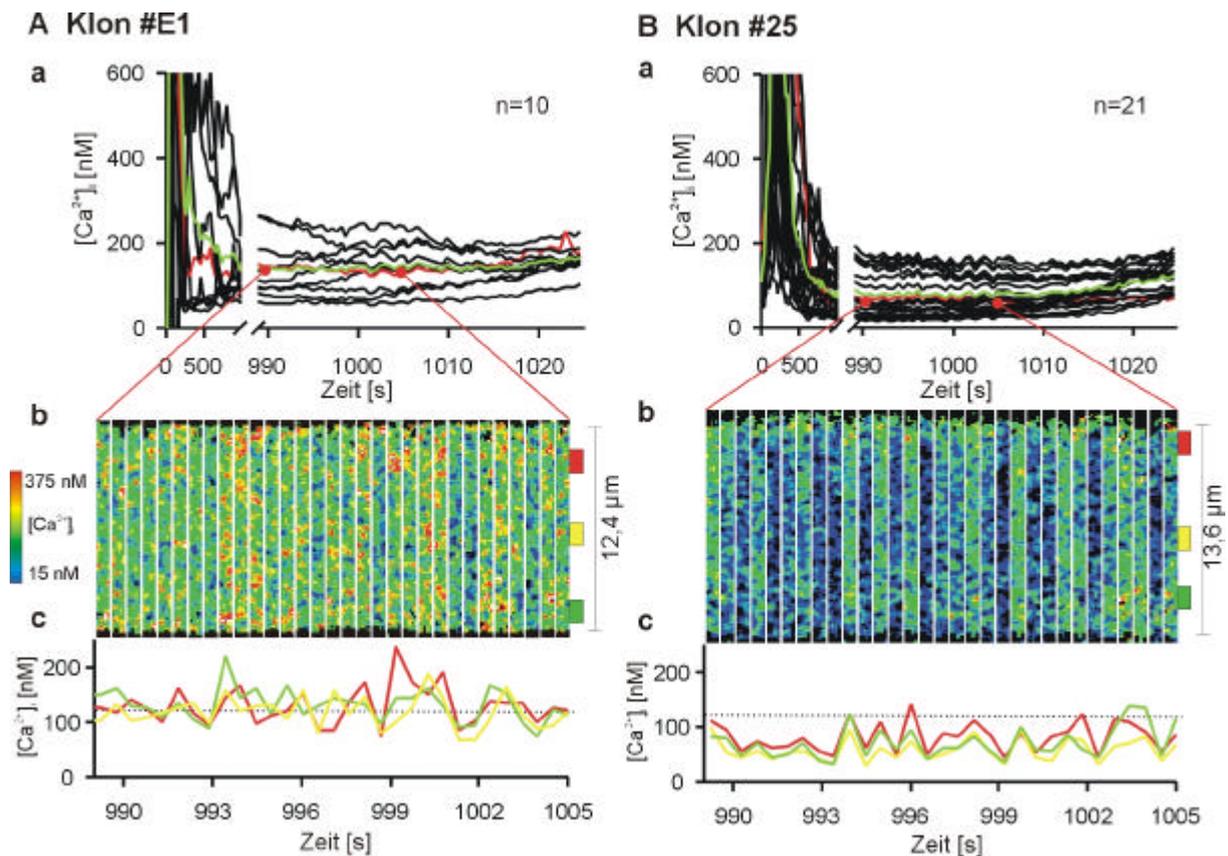


Abb. 4.15 Analyse subzellulärer Ca^{2+} Signale während der langanhaltenden Plateau-Phase im RyR Typ 3 knock-down Klon #25 im Vergleich mit dem Kontrollklon #E1. Wie unter „Material und Methoden“ beschrieben, wurden die T-Zellen mit Fura-2/AM beladen, die Ca^{2+} Signale konfokal bis 980 s bei geringer Aufnahmezeit (2 Ratios/ min) dann mit maximaler zeitlicher Auflösung (2 Ratios/ s) gemessen und die Daten off-line analysiert. **Aa** und **Ba** zeigen die mittlere $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von Einzelzellen über die Zeit. Der grüne Graph stellt den Mittelwert der Einzelzellen dar, der rote Graph stellt die globale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der repräsentativen Einzelzelle dar, die jeweils in **b** gezeigt wird. **Ab**, **Bb** Die Line-Scans zeigen den zeitlichen Verlauf der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der repräsentativen Einzelzelle in einem Ausschnitt der Zelle, der quer durch die Zelle gelegt wurde. **Ac**, **Bc** Amplituden der subzellulären Ca^{2+} Signale einzelner ROIs, die in korrespondierenden Farben jeweils rechts neben dem Line-Scan markiert sind.

4.4 Analyse von Ca^{2+} Signalen in 3T3 Fibroblasten

4.4.1 Einfluss von cADPR und Ryanodin auf die Ca^{2+} Antwort in 3T3 Fibroblasten

Nach eingehender Analyse subzellulärer Ca^{2+} Signale in T-Lymphozyten soll im folgenden auf die Wirkung von cADPR auf CD38^- murine 3T3 Fibroblasten im Vergleich zu stabil transfizierten CD38^+ 3T3 Fibroblasten eingegangen werden. Dieser Teil der Arbeit wurde in Kooperation mit Dr. Santina Bruzzone und Prof. Antonio De Flora (Universität Genua) durchgeführt. In Genua wurden 3T3 Fibroblasten stabil mit CD38 transfiziert, was zu einem erhöhten basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Zellen führte [72]. Ähnliche Anstiege der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden nach Aufnahme von extrazellulärem cADPR in die 3T3 Zellen beobachtet [73]. Diesem Anstieg liegt eine Translokation von extrazellulärem cADPR durch die Plasmamembran über äquilibrierende und konzentrierende Nucleosid-Transporter zugrunde [71].

Vorangegangene Arbeiten anderer Autoren zeigten, dass die 3T3 Fibroblasten auf Stimulation mit mikromolaren Konzentrationen ATP mit einer IP_3 -abhängigen Ca^{2+} Freisetzung über P2Y purinerge Rezeptoren reagierten [217, 218]. Die hier verwendeten $CD38^-$ Wildtyp 3T3 Fibroblasten zeigten allerdings nur eine geringe Reaktion auf die Stimulation mit 100 μM ATP, wiesen aber nach Vorinkubation mit 50 μM cADPR auf ATP-Stimulation ein Ca^{2+} Signal auf, das dem der $CD38^+$ Zellen glich. Diese Experimente wurden im Vorfeld von Dr. Santina Bruzzone mit Zellsuspensionen in Mikrotiterplatten durchgeführt [224].

Auf Einzelzellebene wurden nun vergleichbare Versuche am konfokalen Imaging zur Analyse subzellulärer Ca^{2+} Signale durchgeführt. Es wurden $CD38^-$ Zellen, mit cADPR vorinkubierte $CD38^-$ Zellen, mit Ryanodin (Ry) mikroinjizierte $CD38^-$ Zellen und $CD38^+$ Zellen analysiert (Abb. 4.16). Während in der Basalphase die $CD38^-$ Zellen eine niedrige $[Ca^{2+}]_i$ aufwiesen, zeigten die mit 50 μM cADPR vorinkubierten $CD38^-$ und die $CD38^+$ Zellen eine vergleichbare leicht erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ während der Basalphase (Abb. 4.16 A, B, C, links). Die mit Ry injizierten Zellen zeigten nur eine leichte, aber im Vergleich zu den $CD38^-$ Zellen erkennbare $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhung. Nach Stimulation mit ATP waren in den Wildtyp-Zellen nur kleine subzelluläre Ca^{2+} Signale nahe der Plasmamembran zu finden (Abb. 4.16 A, 117,9 s), während mit cADPR vorinkubierte oder mit Ry injizierte Wildtyp-Zellen oder $CD38^+$ transfizierte Zellen innerhalb von 10 – 20 s nach Stimulation mit einem globalen Ca^{2+} Signal reagierten, das sich wellenförmig über die gesamte Zelle ausbreitete (Abb. 4.16 B, C). Das Ca^{2+} Signal startete nahe der Plasmamembran, breitete sich zunächst in der perinucleären Region aus (Abb. 4.16 B 117,6 s, C 118,1 s, D 116,3 s) und wurde von dort aus weiter amplifiziert.

Die genauere Analyse der Ausbreitung des Ca^{2+} Signals wurde über ROIs vorgenommen, die über die Zellen verteilt gelegt wurden (Abb. 16 E, schematische Darstellung der Zellen mit farblich markierten ROIs). Wie schon anhand der Ratiobilder in Falschfarben zu erkennen war, liegt die $[Ca^{2+}]_i$ der $CD38^-$ Zelle unter der $[Ca^{2+}]_i$ der mit cADPR vorinkubierten $CD38^-$ Zelle und der $CD38^+$ Zelle. Der Basalwert der mit Ry injizierten Zelle liegt vor allem in der Kernregion nicht ganz so hoch wie in der cADPR vorinkubierten Wildtyp-Zelle und der $CD38^+$ Zelle. Im Kernbereich ist in allen gemessenen Zellen die $[Ca^{2+}]_i$ am niedrigsten, was jedoch auf eine anderes physikalisches Verhalten des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 im Kern zurückzuführen ist [208]. Die $[Ca^{2+}]_i$ veränderte sich in der $CD38^-$ Zelle nach Stimulation mit ATP nicht (Abb. 4.16 E, links oben). In der mit cADPR vorinkubierten $CD38^-$ Zelle war schon während der Basalphase die höchste $[Ca^{2+}]_i$ in der Nähe der Plasmamembran zu finden (Abb. 4.16 E, oben rechts, schwarzer Graph). Wie anhand der Ratiobilder (Abb. 4.16 B) schon zu erkennen war, stieg die $[Ca^{2+}]_i$ zuerst im Zellrandbereich an (schwarzer Graph), dann folgte die perinucleäre Region (rot), der Kern (grün) und als letztes breitete sich das Signal zu den Enden der Zelle hin aus (blau). Ein ähnliches Ausbreitungsmuster wurde in der mit Ry injizierten Wildtyp-Zelle und in der $CD38$ transfizierten Zelle beobachtet (Abb. 4.16 d, unten). Hier stiegen die $[Ca^{2+}]_i$ in der Regionen nahe der Plasmamembran und der perinucleären Region fast zeitgleich an (schwarzer und roter Graph), es folgte die Kernregion (grün) und schließlich die

cytoplasmatische Region jenseits der perinucleären Region (blau). Auffällig waren starke Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in der mit Ry injizierten $CD38^-$ Zelle.

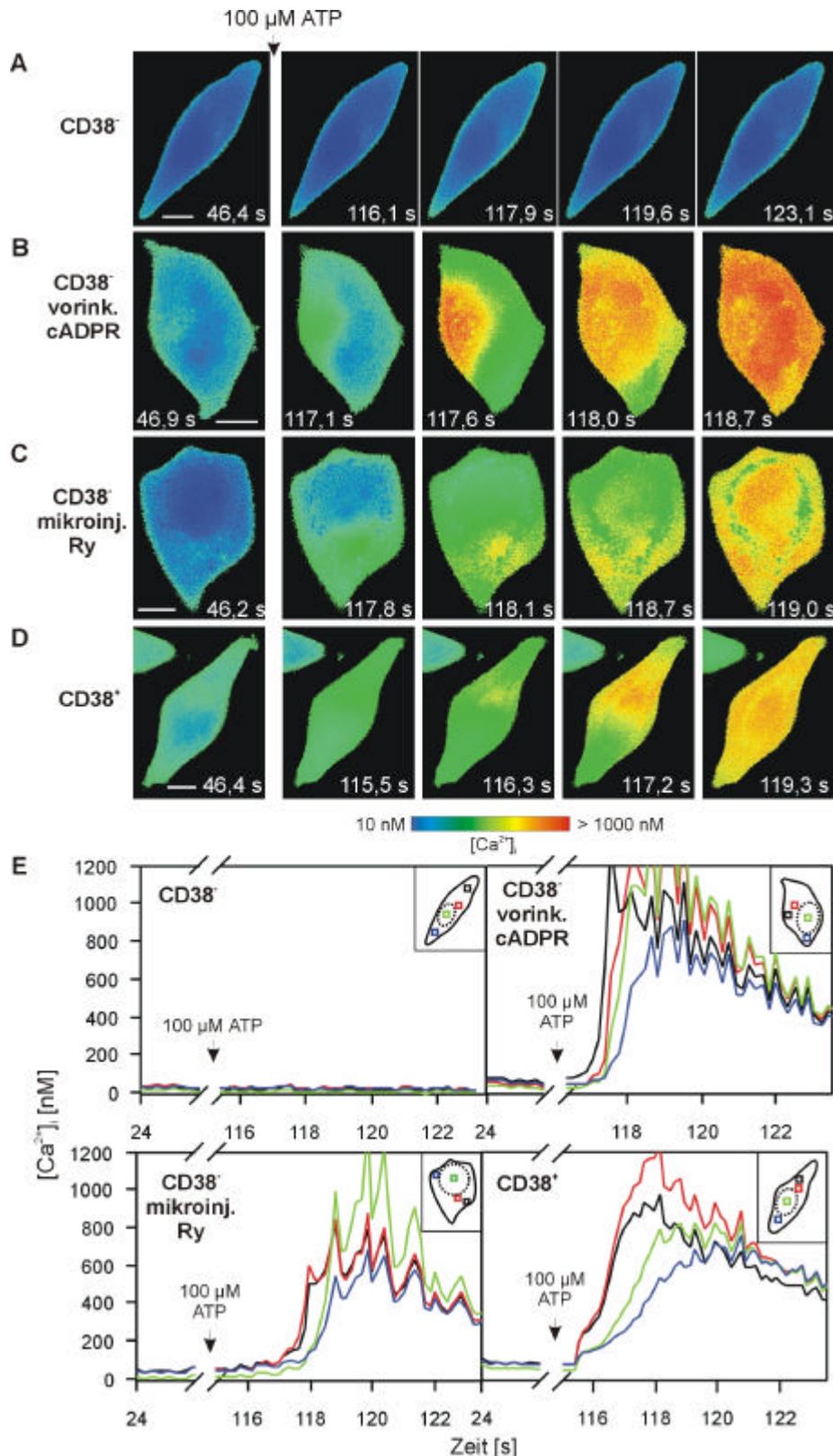


Abb. 4.16 Entwicklung der globalen Ca^{2+} Welle in 3T3 Fibroblasten. Gezeigt sind per „no neighbor“ Algorithmus dekonvolvierte Ratiobilder der $[Ca^{2+}]_i$ in Falschfarben-Darstellung einer repräsentativen $CD38^-$ Zelle (A), einer mit 50 μ M cADPR vorinkubierten $CD38^-$ Zelle (B), einer mit

Ry mikroinjizierten CD38⁻ Zelle (C) und einer CD38⁺ Zelle (D) vor und nach der Stimulation mit 100 μM ATP. Mikroinjiziert wurden 1,5% des Zellvolumens einer 100 μM Ry-Konzentration in der Pipette. Der weiße Balken repräsentiert 10 μm . (e) Quantitative Analyse der Ca²⁺ Wellen-Entwicklung der in A-D dargestellten Zellen. Aufgetragen wurde die [Ca²⁺]_i verschiedener subzellulärer Regionen, wie in den schematischen Darstellungen der jeweiligen Zelle in korrespondierenden Farben aufgezeichnet ist; die gepunktete Linie deutet die Lage des Zellkerns an, die aus den Durchlichtbildern zu erkennen war. Charakteristische Zellen wurden ausgewählt von folgender Anzahl analysierter Zellen: (A) n=18 CD38⁻; (B) n=19 CD38⁻, vorinkubiert für 10 min mit 50 μM cADPR; (C) n=15 CD38⁻, mit 100 μM Ry (Konz. in der Pipette) mikroinjiziert; (D) n=20 CD38⁺.

Da für die Entwicklung des globalen Signals lokale subzelluläre Pacemaker-Signale erforderlich sind [149, diese Arbeit], wurden auch in den 3T3 Fibroblasten die subzellulären Ca²⁺ Signale in den CD38⁻ Zellen mit und ohne cADPR Vorinkubation analysiert (Abb. 4.17). Der Vergleich der subzellulären Ca²⁺ Signale in mit cADPR beladenen und nicht beladenen Zellen zeigte schon während der Basalphase einen Anstieg in Anzahl und Größe der Signale in den mit cADPR vorinkubierten Zellen (Abb. 4.17 A, B, links). Während in den unstimulierten CD38⁻ Zellen ein schmaler Streifen im Bereich der Plasmamembran eine erhöhte [Ca²⁺]_i aufwies (Abb. 4.17 A), zeigen die mit cADPR vorinkubierten Zellen im gesamten Cytosol eine erhöhte [Ca²⁺]_i (Abb. 4.17 B). Die Vergrößerung dieser Regionen veranschaulicht, dass in Anwesenheit von cADPR subzelluläre Signale nahe der Plasmamembran und in weiter innen gelegenen perinucleären Regionen auftraten (Abb. 4.17 Bb). In Abwesenheit von cADPR waren diese subzellulären Ca²⁺ Signale kaum zu finden (Abb. 4.17 Ab). Nach Stimulation mit ATP wurden die subzellulären Ca²⁺ Signale in der perinucleären Region der mit cADPR vorinkubierten Zellen in Anzahl und Amplitude verstärkt (Abb. 4.17 Bc, ROI 1). In der unteren, jenseits des Zellkern gelegenen Region der Zelle (ROI 2) veränderten sich die Ca²⁺ Signale im Vergleich zur Basalphase in der frühen Pacemaker-Phase nicht (Abb. 4.17 Bc vs. Bb ROI 2). In den Wildtyp-Zellen zeigten die dargestellten Regionen nach der Stimulation mit ATP während der Pacemaker-Phase keine merkliche Zunahme der subzellulären Ca²⁺ Signale, weder in der perinucleären Region noch jenseits des Zellkerns (Abb. 4.17 Ac vs. Ab ROI 1&2).

Dieser Unterschied verdeutlicht die entscheidende Rolle von cADPR nicht nur für die Entwicklung der globalen Ca²⁺ Welle, sondern auch für die Ausbreitung und die Amplifikation der lokalisierten Pacemaker-Signale von der Plasmamembran, über die perinucleäre Region in das Zellinnere und schließlich über die gesamte Zelle.

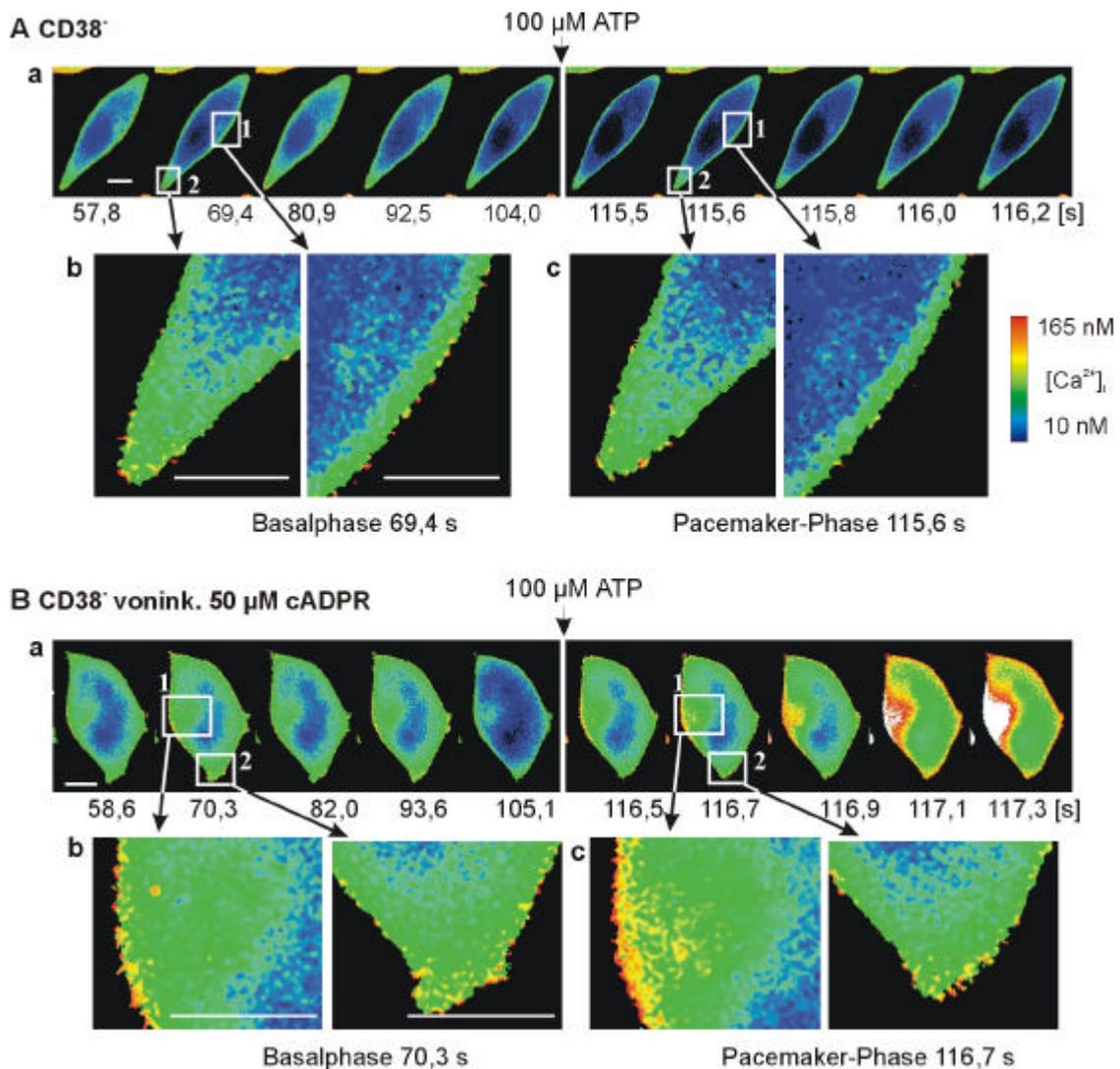


Abb. 4.17 Vergleich der subzellulären Ca²⁺ Signale in CD38⁻ und mit cADPR vorinkubierten CD38⁻ 3T3 Fibroblasten. Die in der vorherigen Abbildung 4.16 dargestellten Zellen (A) CD38⁻ und (B) CD38⁻, mit cADPR vorinkubiert, wurden in einem anderen Ratiobereich als Ratiobilder in Falschfarben dargestellt. **Ab, c** und **Bb, c** zeigen jeweils Vergrößerungen der in **a** weiß markierten ROIs 1 und 2. Der weiße Balken repräsentiert 10 μ m.

4.4.2 Quantitative Analyse der subzellulären Ca²⁺ Signale in 3T3 Fibroblasten

Die quantitative Analyse der subzellulären Ca²⁺ Signale während der Basalphase vor der Stimulation der P2Y-Rezeptoren zeigte in den mit cADPR vorinkubierten CD38⁻ Zellen einen Anstieg in Anzahl und Amplitude der Signale gegenüber den CD38⁻ und den mit Ry mikroinjizierten Zellen. Gegenüber den mit cADPR vorinkubierten CD38⁻ Zellen, war die Anzahl und die Amplitude der subzellulären Ca²⁺ Signale in den CD38 transfizierten Zellen leicht vermindert (Tab. 4.2).

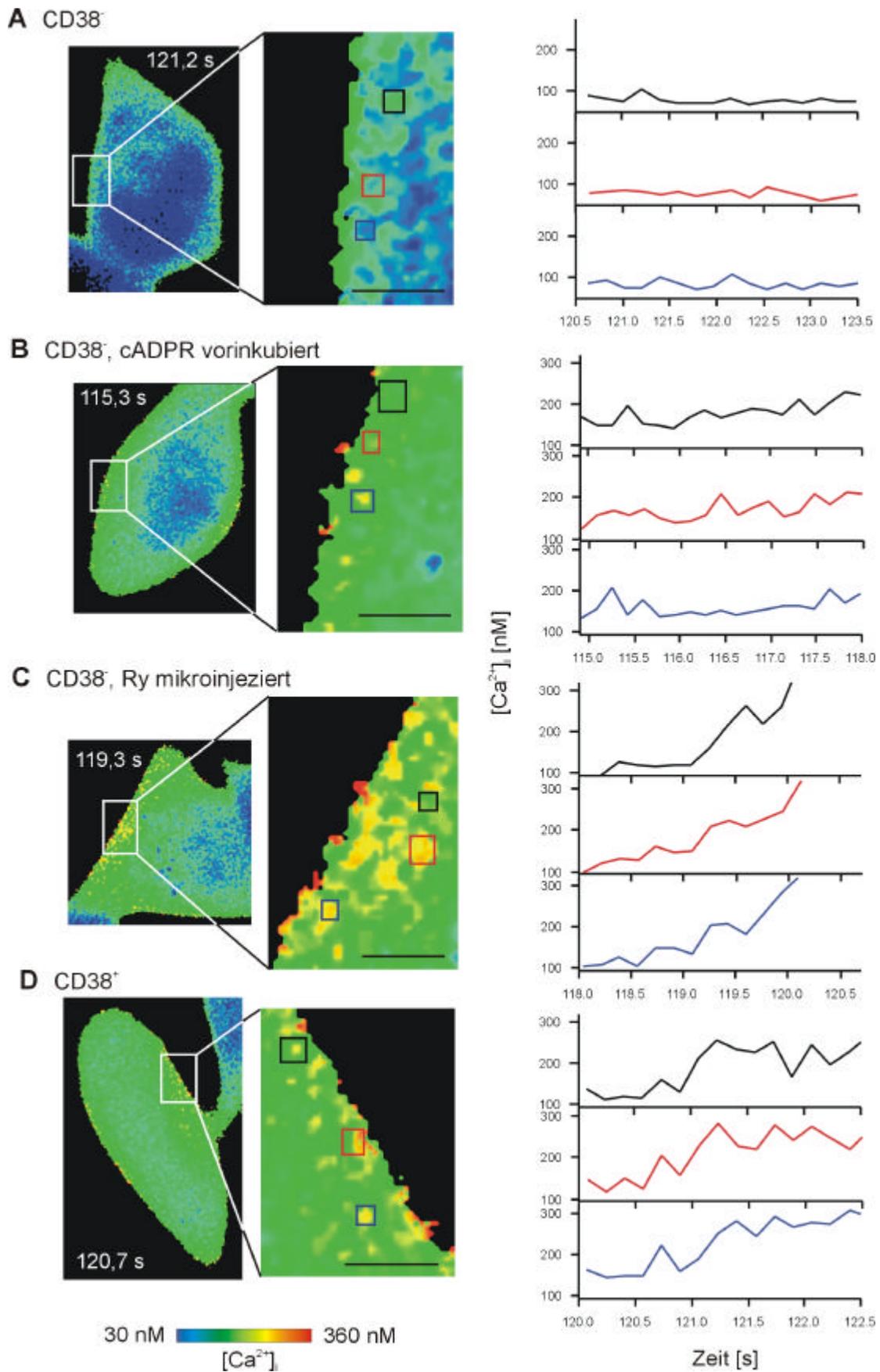


Abb. 4.18 Subzelluläre Ca²⁺ Signale in 3T3 Fibroblasten. Gezeigt sind konfokale Ratiobilder der [Ca²⁺]_i in Falschfarbendarstellung einer (A) CD38⁺, (B) mit 50 μM cADPR vorinkubierten CD38⁺, (C)

mit Ry mikroinjizierten CD38⁻ und **(D)** CD38⁺ Zelle und die entsprechend markierte Vergrößerung einer subzellulären Region (schwarzer Balken entspricht 2,5 µm). Mikroinjiziert wurden 1-1,5% des Zellvolumens einer 100 µM Ry-Konzentration in der Pipette. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt 115 s mit 100 µM ATP stimuliert. Rechte Seite: Verlauf der [Ca²⁺]_i von ausgewählten ROIs die in korrespondierenden Farben in der Vergrößerung (Mitte) gekennzeichnet sind. Es wurden charakteristische Zellen von **(A)** n=18 CD38⁻, **(B)** n=19 mit cADPR vorinkubierten CD38⁻, **(C)** n=15 mit Ry mikroinjizierten CD38⁻ und **(D)** n=20 CD38⁺ Zellen ausgewählt.

Nach der Stimulation mit ATP war in den CD38⁻ Zellen nur eine leichte Erhöhung der subzellulären Ca²⁺ Signale im Zellrandbereich zu erkennen (Abb. 4.18 A links). Signale mit größerer Amplitude fallen nicht auf (Abb. 4.18 A Graphik). Dagegen sind in CD38⁻ Zellen, die mit cADPR vorinkubiert oder mit Ry mikroinjiziert wurden, und in CD38⁺ Zellen deutlich Pacemaker-Signale im Zellrandbereich und teilweise auch in weiter innen gelegenen Regionen zu sehen (Abb. 4.18 B, C, D links). Die Auftragung der [Ca²⁺]_i einzelner ROIs dieser Zellen zeigt einen Anstieg der Amplituden mit der Zeit (Abb. 4.18 B, C, D Graphiken). So ist das subzelluläre Signal in der mit cADPR vorinkubierten CD38⁻ Zelle in der blau markierten ROI zum Zeitpunkt 115,3 s in der Graphik als Amplitude von ca. 50 nM wieder zu finden (Abb. 4.18 B). Bei der mit Ry mikroinjizierten Zelle waren zum Zeitpunkt 119,3 s Pacemaker-Signale in der roten und der blauen ROI zu sehen, die auch in der graphischen Darstellung als Ca²⁺ Erhöhungen deutlich zu erkennen sind (Abb. 4.18 C). Gleiches gilt für die in der CD38⁺ Zelle dargestellte rote und blaue ROI mit den entsprechend graphisch aufgetragenen subzellulären Ca²⁺ Signalen zum Zeitpunkt 120,7 s (Abb. 4.18 D).

Die quantitative Analyse der Pacemaker-Signale zeigte in den CD38⁻ Zellen einen leichten Anstieg der Ca²⁺ Amplituden nach ATP Stimulation (Tab. 4.2), während in den mit cADPR vorinkubierten oder mit Ry mikroinjizierten CD38⁻ Zellen signifikant höhere Amplituden auf die ATP Stimulation zu beobachten waren (Tab. 4.2). Diese Werte waren vergleichbar zu denen in CD38⁺ Zellen gemessenen Signalen nach Stimulation des P2Y-Rezeptors. Weiterhin stieg die Frequenz der Pacemaker-Signale nach ATP Stimulation signifikant, wenn die CD38⁻ Zellen zuvor mit cADPR vorinkubiert oder mit Ry mikroinjiziert waren (Tab. 4.2). Während in mit cADPR vorinkubierten CD38⁻ und in CD38⁺ Zellen eine ähnliche Frequenz beobachtet wurde, lag in mit Ry mikroinjizierten CD38⁻ Zellen die Frequenz deutlich höher (Tab. 4.2). Die räumliche Ausbreitung der subzellulären Signale zeigte eine erstaunliche Ähnlichkeit zwischen allen Konditionen. Die Fläche der Signale lag zwischen 0,33 und 0,42 µm², was darauf hindeutet, dass in der Basalphase und der frühen Pacemaker-Phase die Wahrscheinlichkeit, dass ein RyR geöffnet ist, größer ist, als dass weitere RyR für die Amplifikation der Signale rekrutiert werden.

| basal | Amplitude [nM] | Fläche [μm^2] | Frequenz [s^{-1}] | n |
|------------------------------------|-----------------------|--|--|----------|
| CD 38 ⁻ | 44 ± 18 | 0,33 ± 0,08 | n.d. | 60 |
| CD 38 ⁻ vorink. cADPR | 64 ± 23 | 0,42 ± 0,16 | n.d. | 98 |
| CD 38 ⁻ mikroinj. Ry | 46 ± 18 | 0,36 ± 0,09 | n.d. | 60 |
| CD 38 ⁺ | 52 ± 15 | 0,34 ± 0,08 | n.d. | 91 |
| <u>nach ATP Stimulation</u> | | | | |
| CD 38 ⁻ | 50 ± 15 | 0,34 ± 0,07 | 0,4 ± 0,39 | 78 |
| CD 38 ⁻ vorink. cADPR | 98 ± 30 * | 0,38 ± 0,14 | 1,13 ± 0,51 * | 111 |
| CD 38 ⁻ mikroinj. Ry | 87 ± 26 * | 0,36 ± 0,10 | 1,71 ± 0,66 * | 106 |
| CD 38 ⁺ | 96 ± 37 * | 0,35 ± 0,09 | 1,23 ± 0,42 * | 131 |

Tab. 4.2 Charakterisierung der subzellulären Ca²⁺ Signale in 3T3 Fibroblasten. Subzelluläre Ca²⁺ Signale wurden in 13-18 ROIs von 3 Zellen je Kondition analysiert. (n= Gesamtanzahl individuell analysierter Signale je Kondition). Es wurden subzelluläre Signale wie in Abb. 4.18 dargestellt analysiert. Da während der Basalphase mit geringer zeitlicher Auflösung gemessen wurde, konnte die Signalfrequenz nicht bestimmt werden (n.d. – nicht detektiert). Pacemaker-Signale wurden mit Beginn der ansteigenden Ca²⁺ Welle analysiert. Die Daten stellen Mittelwerte ± SD dar; *, Werte, die sich signifikant von denen in CD38⁻ Zellen gemessenen Werten unterscheiden (P < 0,05).

5 Diskussion

5.1 Die digitale konfokale Fluoreszenzmikroskopie zur Messung subzellulärer Ca^{2+} Signale

Die Analyse der subzellulären Ca^{2+} Signale wurde zunächst so optimiert, dass die subzellulären Signale über die Parameter Durchmesser, Amplitude und Frequenz charakterisiert werden konnten.

5.1.1 Vergleich mit der Laserscanning-Mikroskopie

Durch die Messung konfokaler Bilder der gesamten Zelle waren wir in der Lage, die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in verschiedenen Regionen der Zellen zu messen: am Zellrand, im Cytosol und im Kern. Verglichen mit der Laserscanning-Mikroskopie, wo in der Regel, d.h. bei maximaler Akquisitionsgeschwindigkeit, nur eine ein Pixel breite Linie gemessen wird und diese Linie die Information über die verschiedenen Zellkompartimente darstellt [170, 225, 226], gibt die digitale konfokale Fluoreszenzmikroskopie mit der Aufnahme von vollständigen Zellen ein weitaus besseres Bild über die Verteilung der subzellulären Ca^{2+} Signale in den einzelnen Teilen der Zelle.

Die subzellulären Signale wurden in der Literatur meist über den Durchmesser, die Dauer und die Amplitude definiert (s. Tab. 1.1 und [16, 227]). Teilweise wurde auch die Frequenz der Signale angegeben [161, 166, 167]. Der Durchmesser der subzellulären Signale konnte anhand der Aufnahme einer Linie jedoch nur in einer Dimension ermittelt werden [137, 139, 153, 158, 164], denn die Breite einer Linie ist schmaler als der Durchmesser eines typischen Ca^{2+} Signals, während in den in dieser Arbeit vorgestellten Messungen die gesamte Ausdehnung des Signals analysiert werden konnte. Ein Vorteil der Laserscanning-Mikroskopie ist die Geschwindigkeit, mit der die subzellulären Signale in Line-Scan Modus gemessen werden. Durch die Aufnahme einer einzelnen Linie durch die Zelle ist es möglich, den Anstieg und Abfall eines subzellulären Signals zu beobachten [133, 159, 160, 166]. So konnte die Dauer der Ca^{2+} Signale ermittelt werden. Bei dem von uns verwendeten digitalen konfokalen Fluoreszenzmikroskop mit der maximalen Geschwindigkeit von 160 ms pro Ratiobild unter Verwendung des no neighbor Algorithmus bzw. von ca. 500 ms pro Ratiobild unter Verwendung des nearest neighbor Algorithmus konnte die Dauer der Pacemaker-Signale nicht exakt bestimmt werden und wurde deshalb bei der Auswertung der Daten vernachlässigt. Ein Vorteil des digitalen konfokalen Fluoreszenzmikroskops ist die Möglichkeit der Verwendung von ratiometrischen Farbstoffen wie Fura-2, sodass die Kalibrierung des Systems für die Ca^{2+} Konzentrationen nach der Formel von Grynkiewicz et al. möglich ist [216]. Auf diese Weise war es möglich, die Amplituden der subzellulären Ca^{2+} Signale zu bestimmen, während bei der Messung mit Laserscanning-Mikroskopen mit nicht ratiometrischen Farbstoffen (meist Fluo-3 oder Fluo-4) gearbeitet wird, was zur Darstellung der Amplituden als gemessene Fluoreszenz bezogen auf die Ausgangsfluoreszenz (F/F_0) führt [159,

166, 170]. Von wenigen Arbeitsgruppen wurde diese Fluoreszenz F/F_0 in eine Ca^{2+} Konzentration umgerechnet [139, 163], wobei jedoch das Photobleaching des Farbstoffes, das auf die Signalintensität einen großen Einfluss hat, nicht berücksichtigt werden kann. Bei der Verwendung eines ratiometrischen Farbstoffes wie Fura-2 wird die Intensität des Farbstoffes zwar auch geringer, dieses jedoch auf beiden gemessenen Wellenlängen, sodass das Ratiobild und damit die kalibrierte Ca^{2+} Konzentration nicht beeinflusst wird. Die Bestimmung der Frequenz der subzellulären Ca^{2+} Signale ist bislang noch nicht so häufig durchgeführt worden und wurde jeweils als Anzahl der Signale pro Zeiteinheit in einer bestimmten räumlichen Abmessung (pro SR bzw. pro $100 \mu\text{m}$) definiert [161, 167]. Auf ähnliche Weise konnte mit dem digitalen konfokalen Fluoreszenzmikroskop in der hier vorliegenden Arbeit die Frequenz der Ca^{2+} Signale in einer bestimmten Region der Zelle bestimmt werden.

Ein weiterer Vorteil der digitalen konfokalen Fluoreszenzmikroskopie ist die off-line Dekonvolution. Dadurch kann nach der Messung der Grad der Konfokalität eingestellt werden, während bei der Laserscanning-Mikroskopie das sog. konfokale Pinhole in der Regel fest eingestellt ist. Für die Ca^{2+} Messungen wurde nach Optimierung für die weiteren Messungen per nearest neighbor Algorithmus das gleiche konfokale Pinhole verwendet, um die Messungen untereinander vergleichbar zu machen. Die Parameter für die Auswertungen mit dem no neighbor Algorithmus wurden so gewählt, dass das Ratio nach der no neighbor Dekonvolution möglichst dem Ratio nach der nearest neighbor Dekonvolution entsprach. Für die immunhistochemischen Studien wurde je nach Messung die Konfokalität optimiert, wobei die gleichen Parameter jeweils für die Kontrollmessungen angewendet wurden. Besonders bei schwach fluoreszenten Proben ist diese freie nachträgliche Wahl der Konfokalität im Vergleich zum Laserscanning-Mikroskop von Vorteil, da nach geeigneter Bearbeitung der Rohdaten der maximale Unterschied zwischen fluoreszenten und nicht fluoreszenten Regionen hergestellt werden kann. Dabei hilft vor allem die iterative Dekonvolution, wo Streulicht, das aus der fokussierten Ebene auf andere Ebenen unter und über die Fokusebene fällt, durch einen entsprechenden mathematischen Algorithmus wieder der Fokusebene zugerechnet wird. Die tatsächliche Fluoreszenz wird also verstärkt.

5.1.2 Rauschen und andere falsch positive Signale

Zur Untersuchung des Rauschens wurden die intrazellulären Ca^{2+} Speicher durch die Inkubation mit Ionomycin oder Thapsigargin entleert und das extrazelluläre Ca^{2+} durch EGTA chelatiert, sodass kein Ca^{2+} mehr freigesetzt werden sollte. Um das beobachtete Rauschen auf Basis der einzelnen Pixel (Länge eines Pixels $0,129 \mu\text{m}$) zu reduzieren wurde zur Messung der Amplituden ein Schwellenwert von 82 nM gesetzt und des weiteren der Median Filter, ein technisches Werkzeug der Software, bei der Auswertung der subzellulären Ca^{2+} Signale angewendet. Nach dieser stringenten Auswahl war es möglich, nahezu das gesamte Rauschen nach der Entleerung der Ca^{2+} Speicher zu unterdrücken. Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass wirkliche Ca^{2+} Signale verloren wurden, aber man

kann davon ausgehen, dass die beobachteten Signale auch wirkliche Ca^{2+} Signale sind. Auf die Rauschbereinigung wurde in der Literatur bislang nicht eingegangen, bzw. es wurde darüber nicht explizit berichtet. Allein die Verwendung des Median Filter als Werkzeug der Software zur Rauschminimierung wird teilweise erwähnt [170].

Zusätzlich zum Rauschen kann es durch die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe zu spontanen globalen Ca^{2+} Signalen kommen [228]. Diese spontanen Signale wurden in Chondrozyten durch Licht-induzierte Freisetzung von reaktivem Sauerstoff verursacht [228]. Die Reduktion der Intensität des Laserlichtes führte in diesem Bericht auch zu einer Reduktion der spontanen Signale [228]. Um diese falsch-positiven Signale nicht als Antwort der T-Zellen auf die Stimulation zu werten, wurde bei den Versuchen jeweils über 2 min die Basalphase gemessen, um sicher zu stellen, dass die Zellen sich ruhig verhalten und nicht durch das UV-Licht erregbar waren. Die Intensität der Anregungslichtes konnte zwar nicht, wie bei einem Laser teilweise möglich, verändert werden, aber es ist davon auszugehen, dass die Intensität einer Xenon-Bogenlampe nicht die Intensität eines Laserstrahls erreicht und somit die Probe auch nicht in diesem Maße geschädigt wird. Außerdem wurde mit der größtmöglichen Empfindlichkeit der Kamera gearbeitet, um die Expositionszeiten und damit die Beeinflussung der Zellen so gering wie möglich zu halten.

5.2 Subzelluläre Pacemaker Ca^{2+} Signale in T-Lymphozyten: Puffs oder Sparks?

Bislang wurden in einigen Zelltypen subzelluläre Signale während der Pacemaker Phase gemessen, die zu einem globalen Ca^{2+} Signale führen, so z.B. in HeLa-Zellen [133], neurosekretorischen PC12 Zellen [136], Vorläuferzellen von Oligodendrozyten [170], *Xenopus* Oocyten [135], in zahlreichen glatten, Herz- und Skelett-Muskelzellen [153, 155, 157, 158, 163, 225, 229] (vollständige Auflistung s. Tab. 1.1), nicht aber in T-Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum ersten Mal in T-Lymphozyten subzelluläre Ca^{2+} Signale, die den beschriebenen Pacemaker-Signalen ähneln, über die Parameter Durchmesser, Amplitude und Frequenz analysiert und in den Regionen Zellrand, Cytosol und Kern lokalisiert.

5.2.1 Puffs und Sparks in verschiedenen Zellsystemen

Meist wurden Durchmesser, Amplitude und Dauer der subzellulären Ca^{2+} Signale analysiert, um zwischen Signalen, die durch Entleerung IP_3 -sensitiver Speicher hervorgerufen wurden und in der Regel als „Puffs“ bezeichnet werden, und Signalen, die durch die Entleerung RyR-sensitiver Speicher hervorgerufen wurden und „Sparks“ genannt werden, zu unterscheiden (s. Tab. 1.1). Die bisher veröffentlichten Amplituden von Puffs liegen zwischen 42 und 171 nM in den verschiedenen Zelltypen [135, 138, 139, 149]. In Azinus-Zellen des Pankreas erreichen die Ca^{2+} Amplituden der Puffs, oder in diesen Zellen häufig auch Spikes genannt, Werte bis zu 1 μM [147]. Die Amplituden der Sparks reichen, soweit kalibriert wurde, von 71 bis 350 nM [153, 158, 163, 164]. Der Durchmesser

von Puffs liegt zwischen 2,5 und 7 μm [133, 135, 136, 139], der von Sparks zwischen 2 und 5 μm [153, 158, 162, 164]. In Durchschnitt scheinen die Sparks eine höhere Amplitude, aber einen kleineren Durchmesser als die Puffs zu haben, jeweils abhängig von den Stimulationsbedingungen und den einzelnen Zelltypen, wo sich große Unterschiede feststellen lassen. Diese Varianz warf die Frage auf, ob es überhaupt anhand der Dauer, dem Durchmesser und der Amplitude möglich ist, zwischen Sparks und Puffs zu unterscheiden.

Eine andere Möglichkeit, nur einen spezifischen Typ von subzellulären Signalen zu aktivieren, ist die Art der Stimulation. In Skelettmuskelzellen und in glatten Muskelzellen führte die Depolarisation zu subzellulären Ca^{2+} Signalen, die durch eine Speicher-Entleerung durch den RyR zustande kamen, denn diese Signale konnten durch 10 μM Ryanodin vollständig blockiert werden, jedoch nicht durch Heparin [148, 158]. Alternativ zu der antagonistischen Ryanodin-Konzentration wurden in der Gruppe von Mironneau die subzellulären Ca^{2+} Signale durch die Inkubation mit anti-RyR Antisense-Oligonucleotiden ausgeschaltet [85, 230]. Andererseits kann durch die Stimulation mit einem spezifischen extrazellulär gegebenem Agonisten nicht sicher gestellt werden, dass die entstehenden subzellulären Signale ausschließlich auf der Stimulation des RyR oder des IP_3R beruhen. So interpretierten Bootman et al. die nach der Histamin-Stimulation beobachteten Signale in HeLa-Zellen als Puffs [133], dagegen zeigten Bennet et al. anhand von RT-PCR und Bindungsassays mit [^3H]-Ryanodin, dass in den HeLa-Zellen auch der Typ 2 RyR exprimiert wird [81]. Wird durch das durch den IP_3R freigesetzte Ca^{2+} über CICR der RyR rekrutiert, könnten die von Bootman et al. beobachteten subzellulären Ca^{2+} Signale nach Histamin-Stimulation also durchaus auch vom RyR stammen. Um die subzellulären Signale spezifisch einem Rezeptor wie dem IP_3R zuzuordnen, müssten idealerweise die anderen Ca^{2+} Signalwege durch spezifische Antagonisten blockiert werden, so z. B. müsste das cADPR und das NAADP-System ausgeschaltet werden und extrazelluläres Ca^{2+} müsste entfernt werden, um den Ca^{2+} -Einstrom zu verhindern. Ob der IP_3R für sich alleine jedoch überhaupt noch in der Lage ist, subzelluläre Ca^{2+} Signale zu generieren oder ob einzelne Systeme (cADPR-, NAADP- oder CICR-System) als Schlüsselsystem zur Ausbildung der Pacemaker-Signale notwendig sind, bleibt fraglich.

5.2.2 Zuordnung der subzellulären Ca^{2+} Signale in T-Lymphozyten

Unter diesen Gesichtspunkten wurden die Ca^{2+} Signale in T-Lymphozyten zunächst unter physiologischen Bedingungen, d.h. nach TCR/CD3 Stimulation bei extrazellulär physiologischer Ca^{2+} Konzentration gemessen. Wie gezeigt (Abb. 4.1) wird ohne extrazellulär vorhandenes Ca^{2+} ein globales Ca^{2+} Signal entwickelt, das länger zur Generierung des maximalen Ca^{2+} Signals braucht, in seiner Amplitude geringer ist und schnell wieder auf den basalen Ca^{2+} Wert abfällt. Der Startpunkt des globalen Signals war auf Einzelzellebene bei den Messungen ohne $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$ bzw. bei Blockierung des Ca^{2+} Einstroms durch SK-F 96365 deutlich verspätet. Um den kritischen Ca^{2+} Schwellenwert zur Generierung des globalen Ca^{2+} Signals zu überschreiten, ist das $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$ zwar nicht notwendig, aber es

trägt zu einer schnellen Entwicklung des globalen Signals bei. Auf subzellulärer Ebene verhalten sich die Zellen ohne $[Ca^{2+}]_{ex}$ sehr ähnlich zu denen mit $[Ca^{2+}]_{ex}$. Die Amplituden der subzellulären Ca^{2+} Signale in den Jurkat T-Lymphozyten reichten in Anwesenheit von $[Ca^{2+}]_{ex}$ von 96 bis 104 nM, die Fläche liegt zwischen 0,43 und 0,44 μm^2 (Tab. 4.1). Ohne $[Ca^{2+}]_{ex}$ sind die Amplituden und Durchmesser leicht vermindert, in Anwesenheit von SK-F zeigte sich jedoch kein Unterschied zu den Messungen mit $[Ca^{2+}]_{ex}$. Die verminderten Ca^{2+} Signal-Amplituden und -Durchmesser unter 3 mM EGTA lassen sich darin begründen, dass Ca^{2+} durch den steilen Gradienten zwischen Zelle und extrazellulärem Raum aus der Zelle diffundiert bzw. gepumpt wird und so die Ca^{2+} Speicher allmählich geleert werden.

Beim Vergleich dieser Charakteristika mit den veröffentlichten Analysen von Puffs und Sparks (Tab. 5.1) lässt sich keine eindeutige Zuordnung der gemessenen Signale zu RyR oder IP_3R machen. Die Amplituden in den Typ 3 RyR knock-down Klonen sind zwar kleiner als in den Kontrollzellen, ein signifikanter Unterschied ist jedoch nicht zu erkennen (Tab. 5.1 und Abb. 4.11). Die Pacemaker-Signale in Jurkat T-Zellen und den Kontrollzellen #E2 können von IP_3R oder RyR oder auch von beiden Rezeptoren zusammen herrühren. Wie durch die Hemmung des IP_3R gezeigt wurde, verringern sich die Amplituden der subzellulären Signale (Tab. 5.1), sodass der IP_3R für die Entwicklung größerer Signale verantwortlich zu sein scheint. Die Hemmung des RyR in den Kontrollzellen zeigt auf die Amplituden der subzellulären Signale keinen Einfluss. Deutlich wird die Rolle des RyR vor allem bei der Analyse der Signalfrequenzen, auf die im folgenden Kapitel eingegangen wird.

In den Jurkat T-Zellen verteilt sich der RyR auf den Zellrand und ist außerdem noch in Teilen des inneren Cytosols zu finden, während der IP_3R ausschließlich nahe der Plasmamembran lokalisiert wurde. Ähnliche Beobachtungen bezüglich der Verteilung des IP_3R machten auch Khan et al., die ein Cocapping zwischen dem TCR/CD3 Komplex und dem IP_3R beobachteten [39]. Die Verteilung des RyR auf Zellrand und Cytosol entspricht der in T-Lymphoma-Zellen der Maus [82]. Die unterschiedliche Verteilung der Rezeptoren in den Jurkat T-Zellen deutet darauf hin, dass der IP_3R und der RyR zusammen für die ersten subzellulären Signale, die am Rand der Zelle beobachtet wurden, verantwortlich sind, die Weiterleitung innerhalb der Zelle während der Pacemaker-Phase aber hauptsächlich durch den RyR getragen wird. In den peripheren T-Zellen wurden beide Rezeptoren nahe der Plasmamembran lokalisiert, jedoch nimmt in den peripheren T-Zellen der Kern so viel Raum ein, dass alle Bestandteile des Cytosols, auch die SERCA-ATPase und die Mitochondrien nahe des Zellrandes lokalisiert sind (Abb. 4.8). Eine Zuordnung der subzellulären Ca^{2+} Signale über die Lokalisation der Rezeptoren ist somit in den peripheren T-Zellen nicht möglich. Da beide Rezeptoren hoch exprimiert werden, spielen vermutlich sowohl der IP_3R als auch der RyR eine wichtige Rolle bei der Generierung der Pacemaker-Signale.

| Gewebe | Amplitude | Durchmesser | Ereignis | Ref. |
|--|--------------------|--------------------------------|---------------------|--------------|
| Jurkat T-Zellen in Anwesenheit von 1 mM $[Ca^{2+}]_{ex}$ | 96 – 104 nM | 0,74 – 0,75 μ m | | diese Arbeit |
| T-Zellen, Kontrollklon #E2 | 74 nM | 0,73 μ m | | diese Arbeit |
| Hemmung IP_3R | 57 nM | 0,73 μ m | | |
| Hemmung RyR | 72 nM | 0,72 μ m | | |
| T-Zellen, Typ 3 RyR knock-down Klon #25 | 61 nM | 0,73 μ m | | diese Arbeit |
| Azinus-Zellen des Pankreas | bis 1 μ M | - | Spike durch IP_3R | [147] |
| vaskuläre Endothel-Zellen | 23 nM 10 nM | - 1,3 μ m | Puff Blip | [138] |
| HeLa Zellen | > 50 nM < 40 nM | 7 μ m < 2 μ m | Puff Blip | [133, 149] |
| glatte Muskelzellen | 300 nM 20 nM | 2,38 μ m - | Spark STOC | [153] |
| Skelett-Muskelfaser | 30 nM | 0,3 μ m | einzelne RyR | [157] |
| Herz-Muskelzellen | 250 nM < 250 nM | 1,65 μ m < 1,65 μ m | Spark Quark | [163] |

Tab. 5.1 Vergleich der Charakteristika von Puffs und Sparks in T-Lymphozyten und anderen Geweben. Puffs und Blips sind als subzelluläre Ca^{2+} Signale, die auf die Öffnung mehrerer oder einzelner IP_3R zurückgehen, definiert, Sparks und Quarks gehen auf die Öffnung mehrerer oder einzelner RyR zurück. Im Fall der T-Zellen wurden die in Tab. 4.1 angegebenen Flächen in Durchmesser umgerechnet. Aufgezeigt sind für die T-Zellen jeweils die im Cytosol bestimmten Parameter. Eine umfangreiche Auflistung subzellulärer Ca^{2+} Signale und deren Charakterisierung in verschiedenen Zelltypen findet sich in Tab. 1.1. STOC – „spontaneous transient outward current“.

Werden nun die Lokalisationsstudien des IP_3R und RyR zusammen mit den Daten aus dem Kontrollklon #E2 unter Hemmung des IP_3R betrachtet, kann man schließen, dass die im Cytosol analysierten Signale vom RyR stammen müssen, da (i) der IP_3R nur am Zellrand zu finden war und (ii) der IP_3R durch einen Antagonisten blockiert war. Zwar kann wie bereits erwähnt keine Zuordnung über die Amplitude erfolgen, die äußerst geringen Durchmesser (<1 μ m) der subzellulären Signale in den T-Zellen deuten jedoch beim Vergleich mit den von Tsugorka [157] und Lipp [163] analysierten subzellulären Signalen Ca^{2+} Quarks hin, die auf die Öffnung weniger oder sogar einzelner RyR zurückgehen.

Um die Rolle des RyR während der Entwicklung des globalen Signals näher zu analysieren, wurde ein Typ 3 RyR knock-down T-Zell-Klon im Vergleich mit einem Kontrollklon analysiert. Die Ergebnisse dazu werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

5.3 Einfluss des Typ 3 RyR auf die subzellulären Ca^{2+} Signale während der Pacemaker-Phase und des langanhaltenden Signals

Die Rolle des Typ 3 RyR bei der Amplifikation der subzellulären Ca^{2+} Signale wurde vergleichend in RyR Typ 3 knock-down T-Zellen und entsprechenden Kontrollzellen analysiert. Die Signalfrequenz im Cytosol nach Stimulation des TCR/CD3 Komplexes oder nach Stimulation des cADPR/RyR Signalweges war in den knock-down Zellen signifikant niedriger als in den Kontrollzellen. In den Kontrollzellen wurde eine ähnliche Signalverminderung im Cytosol nach Blockierung des cADPR/RyR Signalweges erzielt. Weiterhin führte die Blockierung des $\text{IP}_3/\text{IP}_3\text{R}$ Signalweges in beiden T-Zelllinien zu einer signifikanten Frequenzverminderung der subzellulären Ca^{2+} Signale.

Während der langanhaltenden Plateau-Phase waren die Frequenz und die Amplitude der subzellulären Ca^{2+} Signale in den knock-down Zellen ebenfalls deutlich vermindert.

5.3.1 Rolle des Typ 3 RyR während der Pacemaker-Phase

Bei der räumlichen Ausbreitung der Ca^{2+} Signale während der Pacemaker-Phase über das Cytosol in Richtung des Kerns hat der RyR die entscheidende Aufgabe, die Frequenz der lokalen Ca^{2+} Signale im inneren Teil des Cytosol zu erhöhen (Abb. 4.11). Der knock-down des Typ 3 RyR führte, wie die Inhibition des RyR mit RuRed, zu einer Reduktion der Frequenz subzellulärer Signale im Cytosol. Dies belegt die entscheidende Rolle des Typ 3 RyR im inneren Cytosol der Zelle und steht im Gegensatz zu den Ergebnissen für den Zellrand. Obwohl der knock-down des Typ 3 RyR und die Mikroinjektion von RuRed eine deutliche Signalfrequenzminderung verursachten, wurden immer noch lokale Signale beobachtet. Diese basale Aktivität war auch nach der Injektion von IP_3S zu finden, weiterhin in unstimulierten Kontroll-Zellen und in den RyR knock-down-Zellen (Tab. 5.2). Die T-Zellen zeigen also eine grundlegende Erregbarkeit, wie die basale Aktivität zeigt, die auch durch die verwendeten Inhibitoren nicht zum Erliegen gebracht werden konnte.

| Kondition | Amplitude [nM] | Fläche [μm^2] | Frequenz [s^{-1}] | n |
|------------------------------|----------------|----------------------------|------------------------------|----|
| Basal | 65 ± 20 | $0,44 \pm 0,09$ | $0,25 \pm 0,06$ | 34 |
| RuRed / OKT3 | 72 ± 20 | $0,41 \pm 0,08$ | $0,23 \pm 0,10$ | 31 |
| IP_3S / OKT3 | 57 ± 26 | $0,42 \pm 0,12$ | $0,24 \pm 0,05$ | 33 |

Tab. 5.2 Vergleich der Charakteristika von subzellulären Ca^{2+} Signalen im Cytosol. Aufgezeigt sind stellvertretend für die untersuchten Regionen die subzellulären Ca^{2+} Signale im Cytosol, die während der Basalphase bzw. der Pacemaker-Phase von physiologisch stimulierten Kontrollzellen #E2 analysiert wurden. Vor der Stimulation mit $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ OKT3 wurde entweder der RyR durch RuRed oder der IP_3R durch IP_3S blockiert. n – Anzahl der analysierten subzellulären Ca^{2+} Signale.

Die Situation im Kern ist vergleichbar mit der am Zellrand, da die Inhibierung mit RuRed einen signifikanten Einfluss auf die Signalfrequenz zeigte, während der knock-down des RyR darauf keinen Einfluss hatte (Abb. 4.11). Da das IP₃S die Frequenz der subzellulären Signale am Zellrand und im inneren Cytosol deutlich reduzierte, scheint die Ca²⁺ Freisetzung durch IP₃ unter physiologischen Bedingungen ein entscheidender Schritt für die Entwicklung der Ca²⁺ Signale während der Pacemaker-Phase zu sein.

Eine ähnliche, initiale Rolle der IP₃-vermittelten Ca²⁺ Freisetzung wurde für HeLa Zellen beschrieben. Vergleichbar mit den vorliegenden Ergebnisse, muss ein Schwellenwert für die Entwicklung des globalen Ca²⁺ Signals überschritten werden [149]. Im Typ 3 RyR knock-down Klon waren solche initialen Ca²⁺ Signale nach der TCR/CD3 Stimulation noch zu erkennen (Abb. 4.11). Zusammen mit den Daten von der Arbeitsgruppe um Marks [42] und Daten unserer eigenen Arbeitsgruppe [43] bestätigen die vorliegenden Ergebnisse die entscheidende Rolle von IP₃-vermittelten subzellulären Ca²⁺ Signale als initiiierende Ereignisse. Bootman et al. vertreten die Meinung, dass der IP₃-vermittelte Signalweg in HeLa-Zellen, die durch Histamin aktiviert wurden, der Hauptmechanismus der Initiierung und Propagierung der subzellulären Ca²⁺ Signale ist [133, 149]. In T-Zellen dagegen, die physiologisch über den TCR/CD3-Komplex stimuliert wurden, sind sowohl der IP₃R als auch der Typ 3 RyR durch die Aktivierung über cADPR an der Initiierung und der Weiterleitung der lokalen Ca²⁺ Signale insbesondere im Cytosol beteiligt.

In verschiedenen Zelltypen wurde die Rolle des Typ 3 RyR untersucht. Die Überexpression des Typ 3 RyR in HEK 293-Zellen resultierte in einem einzigartigen Phänotyp, da im Gegensatz zu der Überexpression des Typ 1 RyR spontane subzelluläre Ca²⁺ Signale beobachtet wurden [176]. Vergleichbare Ca²⁺ Sparks wurden in Typ 3 RyR überexprimierenden 1B5 Myotuben analysiert, während in den Wildtyp-1B5-Zellen ohne RyR keine Sparks gemessen wurden [231]. Dagegen beobachteten Estrada et al. in Wildtyp-1B5 Myotuben, dass diese auf Depolarisation mit einem langanhaltenden, sich nicht weiter ausbreitendem Ca²⁺ Signal in der Nähe des Kerns reagierten. Dieses Signal wurde auf die IP₃ Produktion und auf die Expression der Typ 1 und 3 IP₃R zurückgeführt [178]. Conklin et al. haben in Skelett-Muskelzellen von RyR Typ 3 knock-out Mäuseembryonen die Ca²⁺ Sparks analysiert. Nach Stimulation mit Coffein waren die subzellulären Ca²⁺ Signale in den knock-out Zellen signifikant kleiner, von kürzerer Dauer und hatten eine kürzere Anstiegsphase als in den Wildtyp-Zellen [175]. Weiterhin wurde bei der Untersuchung von RyR Typ 1 und Typ 3 knock-out Mäusen festgestellt, dass nicht nur der Typ 3 RyR, sondern auch der Typ 1 RyR in embryonalen Skelett-Muskelzellen Ca²⁺ Sparks generieren kann [159].

Als Widerspruch zu diesen Beobachtungen wurde in RyR knock-down Zellen aus glatten Muskelzellen, die durch Mikroinjektion von subtyp-spezifischen anti-RyR antisense Oligonucleotiden generiert wurden, keine Rolle für den Typ 3 RyR nach Depolarisation oder Stimulation durch Coffein unter physiologischer extrazellulärer Ca²⁺ Konzentrationen (1 mM) festgestellt [85]. Nur unter Ca²⁺

Überladung des SR mit 10 mM Ca^{2+} wurde durch die Mikroinjektion von anti-Typ 3 RyR Oligonucleotiden zwar das globale Ca^{2+} Signal nach Stimulation mit Coffein oder Phenylephedrin vermindert, die spontanen Ca^{2+} Sparks wurden jedoch nicht beeinflusst [230].

Zusammengefasst demonstrieren die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten, dass unter physiologischen Bedingungen in T-Zellen der Typ 3 RyR von essentieller Bedeutung ist: zum einen für die Amplifikation der subzellulären Signale und zum anderen für die räumliche und zeitliche Propagation der Ca^{2+} Signale während der Pacemaker-Phase. Dass der Typ 3 RyR knock-down in einer verminderten Frequenz, nicht aber in einer kompletten Inhibierung der Signale resultiert, zeigt um so deutlicher, dass das Ca^{2+} Signalling in T-Zellen ein hochkomplexer Prozess mit vielen verschiedenen Einflussfaktoren ist.

Ein Modell der Bedeutung des Typ 3 RyR knock-down ist in Abb. 5.1 dargestellt. In den Wildtypzellen #E2 und den Typ 3 RyR knock-down Zellen #25 werden RyR durch die Injektion des cADPR aktiviert. Im Zellrandbereich sind in beiden Zelltypen entweder genügend RyR (beispielsweise Typ 1 und 2 RyR, oder aber eine Rest-Expression von Typ3 RyR) vorhanden, da es sich bei #25 nicht um einen vollständigen knock-out aller RyR handelt, oder es kommt über andere Mechanismen zum Ca^{2+} Einstrom aus dem extrazellulären Raum, sodass im Zellrandbereich sowohl in den Wildtyp-Zellen als auch den knock-down Zellen subzelluläre Ca^{2+} Signale beobachtet werden. Ein möglicher Mechanismus für den Ca^{2+} Einstrom wäre eine Interaktion zwischen RyR und einem bislang noch unbekanntem Kanal in der Zellmembran, der wie die CRAC-Kanäle Ca^{2+} von außen in die Zelle lässt, wodurch zunächst subzelluläre Ca^{2+} Signale nahe der Plasmamembran generiert werden. Möglicherweise ist für diese Interaktion auch nicht der Typ 3 RyR verantwortlich, sodass der knock-down keinen Einfluss auf diesen Signalweg hat. Weitere Signalsysteme, wie das IP_3R -System oder noch unbekanntem cADPR-sensitive Ca^{2+} Kanäle könnten in das Signalling mit einbezogen sein. So konnten auch in Muskelzellen von Typ 3 RyR knock-out Mäusen Effekte von cADPR beobachtet werden. Dies wurde als ein Effekt des cADPR auf den Typ 1 RyR ausgelegt [232].

Im Cytosol entstehen in den Wildtyp-Zellen kleine Ca^{2+} Signale durch die Stimulation des Typ 3 RyR. Durch das freigesetzte Ca^{2+} werden weitere, benachbarte Typ 3 RyR rekrutiert, die Signale steigen in ihrer Frequenz und die globale Ca^{2+} Welle breitet sich über die gesamte Zelle aus. Im Cytosol der Typ 3 RyR knock-down Zellen sind zu wenige RyR vorhanden, dass zwar vereinzelt Sparks zu erkennen sind, aber eine Rekrutierung weiterer RyR über den CICR ist nicht möglich. So kann der Schwellenwert zur Ausbildung eines globalen Ca^{2+} Signals nicht erreicht werden. Lokale Signale werden zwar in Zellrandnähe gebildet, können aber im Zellinneren nicht effizient weitergeleitet werden, sodass auch die Frequenz der subzellulären Ca^{2+} Signale im Kern deutlich vermindert ist .

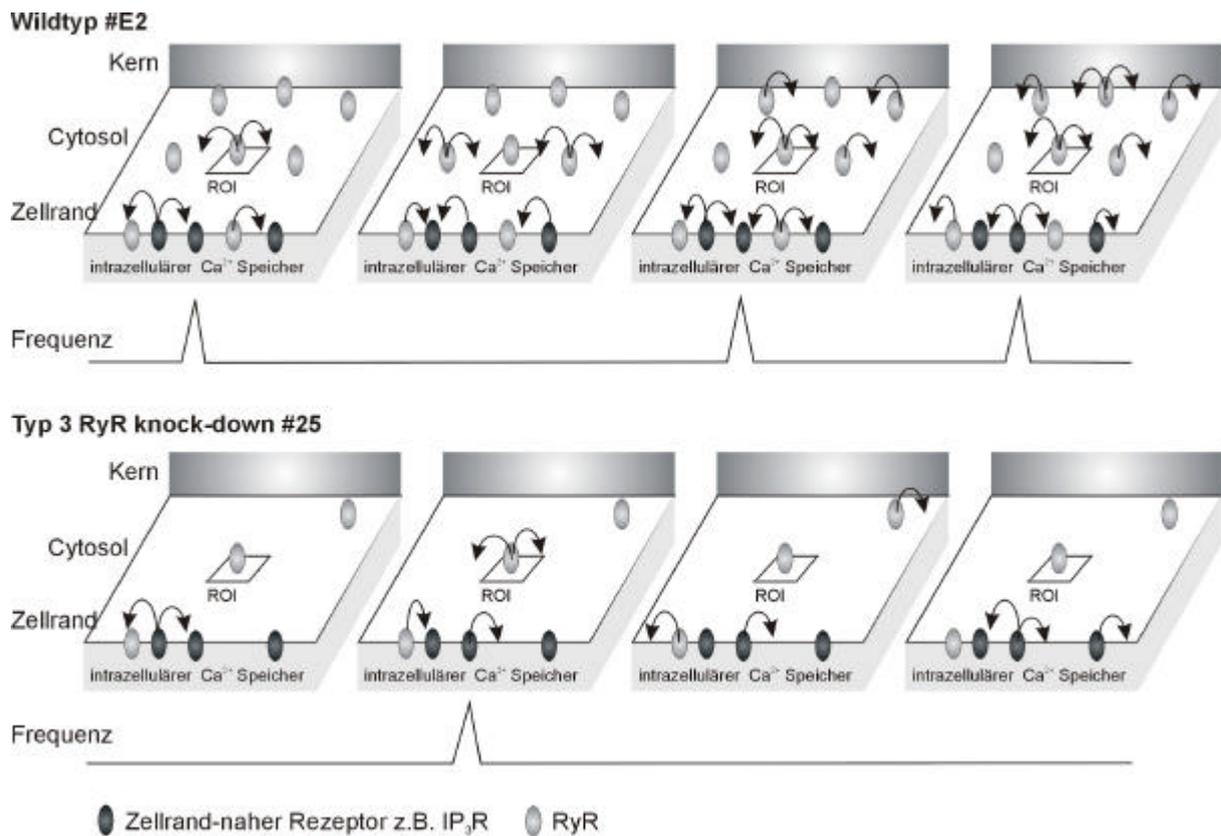


Abb. 5.1 Vergleich der Amplifikation subzellulärer Ca²⁺ Signale in Wildtyp und in Typ 3 RyR knock-down Zellen. Im Cytosol verhindert der knock-down des RyR die Amplifikation der subzellulären Ca²⁺ Signale durch den CICR; es entstehen nur in niedriger Frequenz Ca²⁺ Signale, während in den Wildtyp-Zellen die subzellulären Signale durch den CICR an benachbarte RyR weitergeleitet werden, was zur Amplifikation der subzellulären Ca²⁺ Signale führt und schließlich zur globalen Ca²⁺ Welle, die auch eine Ca²⁺ Erhöhung im Zellkern zur Folge hat.

5.3.2 Rolle des Typ 3 RyR während der langanhaltenden Plateau-Phase

Offensichtlich spielt der Typ 3 RyR vor allem beim langanhaltenden Ca²⁺ Signal eine wichtige Rolle. Diese Tatsache war anzunehmen, da cADPR während dieser Phase erhöht ist, der membranpermeante cADPR-Antagonist 7-Deaza-8-Br-cADPR zu einem Abfall des Ca²⁺ Signals während der Plateau-Phase führt [43] und so cADPR während dieser Phase den CICR durch den Typ 3 RyR kontrolliert. Die Daten zeigen direkt, dass die Typ 3 RyR knock-down Zellen deutlich weniger und kleinere subzelluläre Ca²⁺ Signale hervorbringen als die Kontrollzellen (Abb. 4.15). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der durch cADPR CICR zur Amplifikation der Signale während der Plateau-Phase dient. Wenn also die intrazellulären Ca²⁺ Speicher entleert sind, strömt Ca²⁺ von außen über CRAC-Kanäle in die Zelle, ein langanhaltendes Ca²⁺ Signal ist in T-Zellen zu sehen. Wie durch Mikroinjektionsexperimente gezeigt, aktiviert cADPR in den Jurkat Zellen den langanhaltenden Ca²⁺ Einstrom, der durch ähnliche Mechanismen wie der durch IP₃-Mikroinjektion induzierte kapazitative Ca²⁺ Einstrom aufrecht erhalten wird [131]. Neuere Ergebnisse an IP₃R-defizienten DT40-Zellen zeigen, dass der kapazitative Ca²⁺-Einstrom über den Typ 1 und 3 RyR und über cADPR reguliert

wird [233]. Ungeklärt ist weiterhin, ob die über cADPR und IP_3 regulierten Plasmamembran-ständigen Ca^{2+} Einstrom-Kanäle identisch sind, oder nicht [43]. Neueste Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass es neben den Gadolinium-sensitiven CRAC-Kanälen noch weitere Gadolinium-insensitive Kanäle gibt, die ausreichend sind, um das Ca^{2+} Plateau während der langanhaltenden Phase aufrecht zu erhalten (Ralf Fliegert, persönliche Mitteilung)

5.4 Modell für die Rolle des RyR und des cADPR-vermittelten Ca^{2+} Signals in T-Zellen

Aus den Ergebnissen lässt sich folgendes Modell für das Ca^{2+} Signalling in T-Lymphozyten entwickeln (Abb. 5.2): Während der Basalphase (Abb. 5.2 oben) finden spontane subzelluläre Ca^{2+} Signale statt, die jedoch zu selten und zu klein sind, um ein globales Signal zu entwickeln. Für die niedrige $[Ca^{2+}]_i$ ist die Ca^{2+} Pumpaktivität der SERCAs und der Plasmamembran-ständigen Ca^{2+} -ATPasen (PMCA) verantwortlich, da sie das cytosolische Ca^{2+} wieder in die Speicher zurück- oder aus der Zelle herauspumpen.

Während der Pacemaker-Phase (Abb. 5.2 Mitte) dagegen stiegen zunächst Frequenz, dann auch Amplitude und Größe der subzellulären Ca^{2+} Signale konstant in einem oszillierenden Rhythmus an, sodass mit der Zeit weitere benachbarte Ca^{2+} Kanäle rekrutiert werden. Die IP_3 -Konzentration erreicht während der Pacemaker-Phase bzw. während des globalen Ca^{2+} Signals ihr Maximum [90]. Die am Zellrand lokalisierten und geclusterten subzellulären Ca^{2+} Signale nach der physiologischen Stimulation sind vermutlich auf eine Öffnung des IP_3R zurück zu führen, der genau hier auch lokalisiert wurde. Die Expression des IP_3R ist für die Entwicklung des globalen Ca^{2+} Signals unerlässlich, wie Untersuchungen an einer Typ 1 IP_3R knock-down Jurkat T-Zelllinie zeigten [42]. Diese Ergebnisse wurden kürzlich bestätigt [43] und zeigten sich auch in den vorliegenden Untersuchungen, wo durch die Blockierung des IP_3R durch IP_3S die Frequenz der lokalen Signale und die Amplitude des globalen Signals deutlich vermindert wurden (Abb. 4.10 d, 4.11 D).

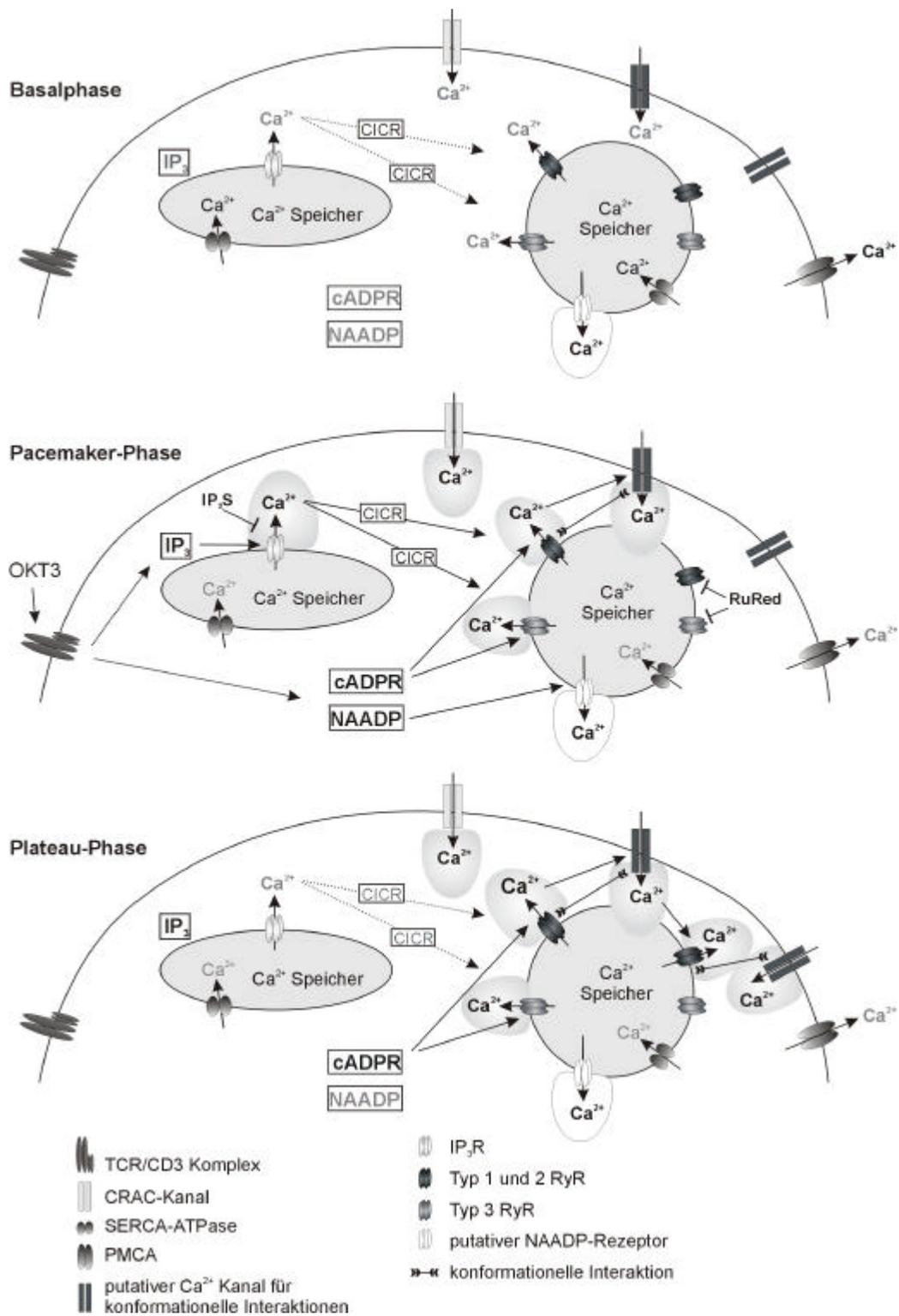


Abb. 5.2 Modell für die Entwicklung subzellulärer Ca^{2+} Signale während der Basalphase und der Pacemaker-Phase. Während der Basalphase sorgen die SERCAs und PMCA für einen relativ niedrigen Basalwert, indem sie Ca^{2+} in die Speicher oder aus der Zelle heraus transportieren. Subzelluläre Ca^{2+} Signale entstehen – wenn überhaupt – nur spontan. Während der Pacemaker-Phase wird durch die Stimulation mit OKT3 die gesamte Ca^{2+} -vermittelte Signalkaskade angeschaltet. Die Signaltransduktion verläuft zum einen über IP_3 und zum anderen über cADPR und NAADP. Während der langanhaltenden Plateau-Phase wird die erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ durch den Ca^{2+} Einstrom aus dem extrazellulären Raum aufrecht erhalten. Dieser Einstrom wird durch Ca^{2+} selbst und möglicherweise durch cADPR-sensitive, nahe der Plasmamembran gelegene Rezeptoren (Typ 3 RyR?) moduliert.

Die cADPR-Konzentration dagegen ist während der Pacemaker-Phase nur leicht erhöht und steigt vor allem während des langanhaltenden Signals [43]. Wie anhand der Wirkung eines cADPR-Antagonisten gezeigt wurde, spielt cADPR jedoch auch in der Pacemaker-Phase bei der Entstehung des globalen Ca^{2+} Signals eine entscheidende Rolle, denn in Anwesenheit des Antagonisten verzögert sich die Entstehung des globalen Signals deutlich [43]. Diese Verzögerung des globalen Ca^{2+} Signals tritt auch bei Typ 3 RyR knock-down Zellen auf und ebenso wenn der RyR durch RuRed blockiert wurde (Abb. 4.10 b, c). Durch RuRed wurde ebenfalls die Frequenz der subzellulären, lokalen Pacemaker-Signale nahe dem Zellrand reduziert, und zwar in ähnlicher Weise, wie auch IP_3S die subzellulären Signale am Zellrand verminderte. Daraus lässt sich schließen, dass die lokalen durch den IP_3R generierten Ca^{2+} Signale durch den RyR amplifiziert werden. Der RyR wird erstens durch CICR moduliert, wobei das den RyR aktivierende Ca^{2+} aus IP_3 -sensitiven Speichern stammt, zweitens durch cADPR, das nach der TCR/CD3 Stimulation gebildet wird [43] und drittens durch Phosphorylierungen [234]. Der knock-down des Typ 3 RyR resultierte nicht in einer reduzierten Frequenz der Ca^{2+} Signale am Zellrand (Abb. 4.11 D), was zeigt, dass womöglich andere RyR Subtypen in diesem Prozess beteiligt sind. Wie bereits untersucht, werden auch die RyR Typ 1 und 2 in Jurkat T-Zellen exprimiert (Nadine Schwarzmann, persönliche Mitteilung). Da jedoch noch keine gegen humane RyR subtypspezifischen Antikörper zur Verfügung stehen, kann die Expression der Subtypen 1 und 2 auf Proteinebene z.Zt. nicht geklärt werden.

Aufgrund der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs und der geringen Größe der Zellen konnte eine wellenförmige Ausbreitung des Ca^{2+} Signals bei der konfokalen Messung nicht gut analysiert werden. Bei der nicht konfokalen Messung wurden die Daten mit maximaler Geschwindigkeit aufgenommen und dann per no neighbor Algorithmus ausgewertet. Die wellenförmige Entwicklung des Signals in den T-Zellen war durch die Aufnahme bei maximaler Geschwindigkeit gut zu erkennen. Die Ca^{2+} Welle breitete sich wie bereits beschrieben [131] vom Zellrand über das Cytosol in Richtung des Kerns hin aus. Es werden also zunächst die Rezeptoren (IP_3R und vermutlich Typ 1 und 2 RyR) am Zellrand rekrutiert, und dann erst die weiter innen gelegenen RyR (vermutlich hauptsächlich Typ 3 RyR).

Während der langanhaltenden Plateau-Phase wird die erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch den Einstrom von Ca^{2+} aus dem extrazellulären Raum aufrecht erhalten (Abb. 5.2 unten). cADPR aktiviert in den Jurkat Zellen den langanhaltenden Ca^{2+} Einstrom, der durch ähnliche Mechanismen wie der durch IP_3 -Mikroinjektion induzierte kapazitative Ca^{2+} Einstrom aufrecht erhalten wird [131]. Möglicherweise handelt es sich auch um eine Interaktion zwischen einem cADPR sensitiven Rezeptor, beispielsweise dem Typ 3 RyR und einem Plasmamembran-ständigen Kanal, durch den dann Ca^{2+} in die Zelle gelangen kann.

Bei den bisherigen Betrachtungen wurde der Ca^{2+} Anstieg als Anstieg in zwei Dimensionen dargestellt, in Wirklichkeit breitet sich das Ca^{2+} Signal jedoch als Volumenelement in drei Dimensionen aus. Dadurch ist zu erklären, dass gegen Ende der Pacemaker-Phase der Anstieg zunächst der lokalen und dann des globalen Ca^{2+} Signals bedeutend schneller vonstatten geht, als zu Beginn der Pacemaker-Phase. Sobald also ein kritischer Schwellenwert erreicht ist, entwickelt sich das globale Signal sehr schnell. Modellrechnungen, die diese Drei-Dimensionalität der lokalen Signale berücksichtigen, bestätigen diese Annahme.

5.5 Einfluss von cADPR beim Ca^{2+} Signalling in 3T3 Fibroblasten

Vergleichend zu den T-Lymphozyten wurde in 3T3 Fibroblasten der Maus die Rolle von cADPR in Bezug auf die Entwicklung der subzellulären Ca^{2+} Signale analysiert. Ist intrazellulär ein Stimulus des RyR (cADPR oder Ryanodin) anwesend, entstehen in den Zellen subzelluläre Ca^{2+} Signale mit signifikant höheren Amplituden und Frequenzen, als ohne diesen Stimulus. Diese subzellulären Signale resultieren dann in einer globalen Ca^{2+} Welle.

5.5.1 Charakterisierung der subzellulären Ca^{2+} Signale

Das Ca^{2+} Signalling stellt in Fibroblasten ein wichtiges Signalsystem dar, um Prozesse nach der Stimulation des purinergen P2Y-Rezeptors zu steuern [36, 37, 217, 235]. Wie schon von Giovannardi gezeigt, war in 3T3 Wildtyp-Zellen das ATP-induzierte Signal sehr klein [217], bzw. wie in dieser Arbeit auf Einzelzellebene gezeigt wurde, reagiert nur eine geringe Anzahl von Zellen mit einem globalen Ca^{2+} Signal, während der Großteil der Zellen ruhig blieb. Allein kleine Signale im Zellrandbereich waren zu finden. Ähnlich kleine subzelluläre Ca^{2+} Signale nach P2Y-Stimulation wurden in Wildtyp L-Fibroblasten der Maus beobachtet [38]. In L-Fibroblasten mit stabiler Überexpression des Typ 1 IP_3R wurden diese kleinen Signale signifikant verstärkt und breiteten sich in einer globalen Ca^{2+} Welle über die gesamte Zelle aus. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein bestimmter Schwellenwert von Ca^{2+} Signalen erreicht werden muss, um die Ca^{2+} Signalkaskade, die durch die Stimulation des P2Y-Rezeptors in Gang gesetzt wurde, fortzuführen und hohe subzelluläre Ca^{2+} Signale in ausreichender Anzahl zu generieren, die zur globalen Ca^{2+} Welle führen.

Untersucht wurde im Rahmen dieser Arbeit, inwiefern der cADPR/ Ca^{2+} Signalweg zur Generierung des globalen Ca^{2+} Signals, ausgehend von subzellulären Ca^{2+} Signalen während der Pacemaker-Phase eine Rolle spielt. Über die folgenden Wege sollte dieses ermittelt werden: Erstens wurden die CD38⁻ Fibroblasten mit cADPR inkubiert, da sie über äquilibrierende und konzentrierende Transporter in der Plasmamembran cADPR aufnehmen können [71]. Zweitens wurde eine aktivierende Konzentration Ryanodin in die CD38⁻ Zellen mikroinjiziert. Als dritte Kondition wurden mit humaner CD38-cDNA stabil transfizierte (CD38⁺) 3T3 Fibroblasten verwendet [72]. Unter diesen Bedingungen erhielten die CD38 Wildtyp-Zellen die Fähigkeit, auf die P2Y Stimulation wie CD38⁺ Zellen zu reagieren.

Schon in der Basalphase wurde ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in den 3T3 Fibroblasten nach der cADPR- oder Ryanodin-Inkubation gemessen. Während in $CD38^-$ Zellen der Basalwert bei ca. 20 nM lag, war der Wert in $CD38^+$ Zellen und mit cADPR oder Ryanodin inkubierten $CD38^-$ Zellen auf ca. 50-100 nM erhöht. Die intrazelluläre cADPR-Konzentration in den $CD38^+$ Fibroblasten betrug $50,48 \pm 8,03$ pmol/mg Protein, in den $CD38^-$ Zellen war die Konzentration nur schwer zu erfassen und wurde mit $0,25 \pm 0,11$ pmol/mg Protein angegeben [224]. cADPR wird (i) aus dem extrazellulären Raum internalisiert [71], (ii) an der Oberfläche außerhalb der Zelle gebildet und dann aktiv durch transmembranes CD38 internalisiert [68], oder (iii) in intrazellulären Vesikeln gebildet und dann in das Cytosol geschleust [70]. Somit gelangt in den $CD38^-$ Fibroblasten während der Inkubationszeit das cADPR zu seinem Ziel, den intrazellulären Ca^{2+} Speichern, und führt schon während der Basalphase zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, vergleichbar mit der $[Ca^{2+}]_i$ von $CD38^+$ Zellen, die von sich aus cADPR bilden und internalisieren können. Möglicherweise wird durch das cADPR oder alternativ durch das Ryanodin eine leichte Stimulation des RyR hervorgerufen, was zu einer erhöhten $[Ca^{2+}]_i$ schon während der Basalphase führt.

Weiterhin stellen 3T3 Fibroblasten ein gutes Modell zur Beobachtung funktioneller Interaktionen zwischen IP_3R und RyR dar, vergleichbar mit dem von Patel et al. beschriebenen „channel chatter“ [236]. Die verstärkte Aktivität der beiden in Fibroblasten Zellen beschriebenen Ca^{2+} Freisetzungssysteme durch Überexpression vom Typ 1 IP_3R [38] oder durch die Induktion der intrazellulären cADPR Produktion [72] resultierte wie auch in den gezeigten Versuchen in einer erhöhten $[Ca^{2+}]_i$ in unstimulierten Zellen. Wie die Analyse der Ca^{2+} Signale auf Einzelzellebene per ratiometrischen Imaging zeigte, waren vermehrt subzelluläre Signale mit höherer Ca^{2+} Konzentration sowohl in den Typ 1 IP_3R überexprimierenden L-Fibroblasten [38] als auch in den mit cADPR oder Ryanodin vorinkubierten $CD38^-$ 3T3 Zellen zu finden (Abb. 4.16, 4.18, Tab. 4.2).

Die Analyse der subzellulären Ca^{2+} Signale ergab Signalamplituden von 44-98 nM und Signalflächen von $0,33-0,42 \mu m^2$, was einem Durchmesser von $0,57-0,65 \mu m$ entspricht. Diese Werte sind bei weitem kleiner als die der typischen Sparks mit einer Amplitude von 71-350 nM und einem Durchmesser von $1,65-5 \mu m$ (s. Tab. 1.1). Einzig die fundamentale Ca^{2+} Freisetzung durch einen oder nur wenige RyR kommt den erhobenen Daten recht nahe. Tsugorka et al. beschrieben diese Sparks in Skelett-Muskelfasern als „triadic Ca^{2+} release“ und vermuteten, dass es sich um die Ca^{2+} Freisetzung aus einem einzigen RyR handelt. Die Amplitude betrug ca. 30 nM und das Signal hatte einen Durchmesser von $0,3 \mu m$ [157]. Die von Lipp und Niggli analysierten „ Ca^{2+} Quarks“ hatten Amplituden von 37 nM und Durchmesser von ca. $0,85 \mu m$ [165] und sind mit den subzellulären Signale in 3T3-Zellen und T-Zellen (s. o.) durchaus ähnlich. Die subzellulären Ca^{2+} Signale während der Basalphase und der frühen Pacemaker-Phase in 3T3 Zellen sind also vergleichbar mit den fundamentalen Ca^{2+} Quarks, die in der Literatur bislang nur in erregbaren Zellen und im Verlauf der vorliegenden Arbeit erstmals in T-Lymphozyten und Fibroblasten beschrieben wurden.

Weiterhin erhöhte sich zwar die Amplitude und die Frequenz der Quark-ähnlichen Signale nach der Stimulation mit ATP, nicht jedoch der Durchmesser. Die Frequenz lässt sich über den Anstieg der Frequenz gegenüber den Kontrollen mit in ventrikulären Myozyten und in Skelettmuskelzellen gemessenen Frequenzen vergleichen: In den ventrikulären Myozyten [167] ist der Frequenzanstieg nach cADPR-Stimulation mit dem Faktor 1,4 deutlich geringer als der Frequenzanstieg in den 3T3 Fibroblasten. Hier steigt die Frequenz nach Stimulation des P2Y-Rezeptors gegenüber den CD38⁻ Zellen in den mit cADPR vorinkubierten Zellen um den Faktor 2,8, in den mit Ry mikroinjizierten Zellen um den Faktor 4,3 und in den CD38⁺ Zellen um den Faktor 3,1. Im Skelettmuskel erhöht sich die Sparkfrequenz nach Stimulation des Typ 1 RyR auf das 4,5-fache im Vergleich zu den Kontrollzellen, wobei die Frequenz abhängig von der Stimulus-Konzentration ist. Der Anstieg der Frequenz gegenüber den CD38⁻ Zellen zeigt, dass längere und häufigere Öffnung eines RyR, nicht aber die Rekrutierung einer größeren Anzahl von RyR der Hauptmechanismus für die Amplifikation der Ca²⁺ Signale durch cADPR und Ryanodin in der Pacemaker-Phase ist.

5.5.2 Charakterisierung der globalen Ca²⁺ Welle

Die Entwicklung der globalen Ca²⁺ Welle nach der P2Y Stimulation wird durch die Überexpression des IP₃R [38] oder durch die Bereitstellung von cADPR und damit die Ausnutzung des cADPR/Ca²⁺ Signalweges (diese Arbeit) vermittelt. Durch die Überexpression des Typ 1 IP₃R in 3T3 Fibroblasten sinkt die zur Stimulation notwendige Konzentration um den Faktor 3 auf 100 nM UTP [38]. Das globale Ca²⁺ Signal ist in den IP₃R überexprimierenden Zellen bei der Stimulation mit der gleichen UTP-Konzentration (300 nM) deutlich höher [38]. Der Übergang vom lokalen zum globalen Signal ist also abhängig von der Häufigkeit der IP₃R. In anderen RyR-exprimierenden Zellen ist der cADPR/Ca²⁺ Signalweg steuerbar, entweder über CD38, das cADPR bildet, oder über cADPR direkt: In HL60-Zellen ist die CD38-Produktion verbunden mit der durch Retinsäure-induzierten Granulozyten-Differenzierung [237]; in humanen mononucleäre Blutzellen steigt die intrazelluläre cADPR-Konzentration durch die Inkubation mit Lipopolysacchariden [57]; und in CD38⁻ Zellen, die den RyR exprimieren, kann durch die Aufnahme von extrazellulärem cADPR aus CD38⁺ Nachbarzellen eine cADPR-abhängige Ca²⁺ Antwort ausgelöst werden [238].

Die Entwicklung der globalen Ca²⁺ Welle in den 3T3 Fibroblasten ist vergleichbar mit der Ausbreitung der Ca²⁺ Welle in Megakaryozyten [239]. Nach der Stimulation steigt das Ca²⁺ zunächst in der Region, wo der RyR bzw. der IP₃R lokalisiert wurde, dann erfolgt eine Ausbreitung des globalen Ca²⁺ Signals über den Rest der Zelle. In den Megakaryozyten verlief das Signal also zuerst am Rand der Zelle entlang, wo der IP₃R lokalisiert wurde, und breitete sich dann in die Mitte der Zelle aus [239]. In den 3T3 Fibroblasten verlief die globale Ca²⁺ Welle vom Zellrand ausgehend in den perinucleären Raum, wo der RyR lokalisiert wurde, dann in Richtung des Kerns und als letztes zu den entgegengesetzten Enden der Zelle (Abb. 4.16 & 4.17). Um die Rekrutierung des IP₃R genauer zu analysieren, müssten diese noch durch entsprechende immunhistochemische Färbungen im Vergleich

zum RyR lokalisiert werden. Ebenso wäre die Frage zu klären, wo die RyR in den Megakaryozyten lokalisiert sind.

In Pankreas-Zellen des Azinus konnte über die Lokalisierung des IP₃R und des RyR bestimmt werden, wie bei der Ca²⁺ Wellenentwicklung die beiden Rezeptoren RyR und IP₃R zeitlich versetzt rekrutiert werden und dass sich bei der Blockierung des RyR oder des IP₃R allein keine globale Ca²⁺ Welle über die gesamte Zelle ausbreiten kann [240]. Auch in den 3T3 Fibroblasten tragen beide Rezeptoren entscheidend zur Entwicklung des globalen Ca²⁺ Signals bei, was anhand der höheren Sensitivität nach Stimulation in den IP₃R überexprimierenden Zellen für den IP₃R gezeigt wurde [38] und durch die vorliegenden Ergebnisse durch die Erregbarkeit der Zellen durch cADPR-Inkubation für das cADPR-vermittelte Signal, das als Ziel den RyR hat, gezeigt wurde.

Zusammenfassend verhält sich cADPR in den 3T3 Fibroblasten als parakriner Botenstoff, der die Fibroblasten von einer geringen zu einer hohen Erregbarkeit schaltet [73, 241, 242]. Die Untersuchungen zeigen, dass die Ca²⁺ Quark-ähnlichen subzellulären Signale sowohl in der Basalphase als auch in der frühen Pacemaker-Phase durch cADPR amplifiziert werden. Die globale Ca²⁺ Welle beruht unter anderem auf den durch den cADPR/Ca²⁺ Signalweg amplifizierten subzellulären Ca²⁺ Signalen.

5.6 Modell für das Ca²⁺ Signalling in 3T3 Fibroblasten

Die subzellulären Ca²⁺ Signale in den Fibroblasten (CD38⁻ mit cADPR oder Ry inkubiert oder CD38⁺) weisen ähnliche Charakteristika bezüglich Amplitude und Durchmesser wie in den T-Zellen auf.

In den T-Zellen kann nach physiologischer Stimulation trotz eines knock-downs des Typ 3 RyR mit Verzögerung ein globales Signal entwickelt werden. Die verbleibenden Typ 3 RyR könnten also noch ausreichen, um das Ca²⁺ Signal zu amplifizieren oder Typ 1 und 2 RyR sind zusammen mit den IP₃R bei der physiologischen Stimulation ausreichend, um den Schwellenwert für die Amplifikation des globalen Signals zu überschreiten. Bei der Stimulation über cADPR reichen jedoch in den Typ 3 RyR knock-down Zellen die Möglichkeiten zur Amplifikation der subzellulären Signale nicht aus, um ein globales Signal zu entwickeln.

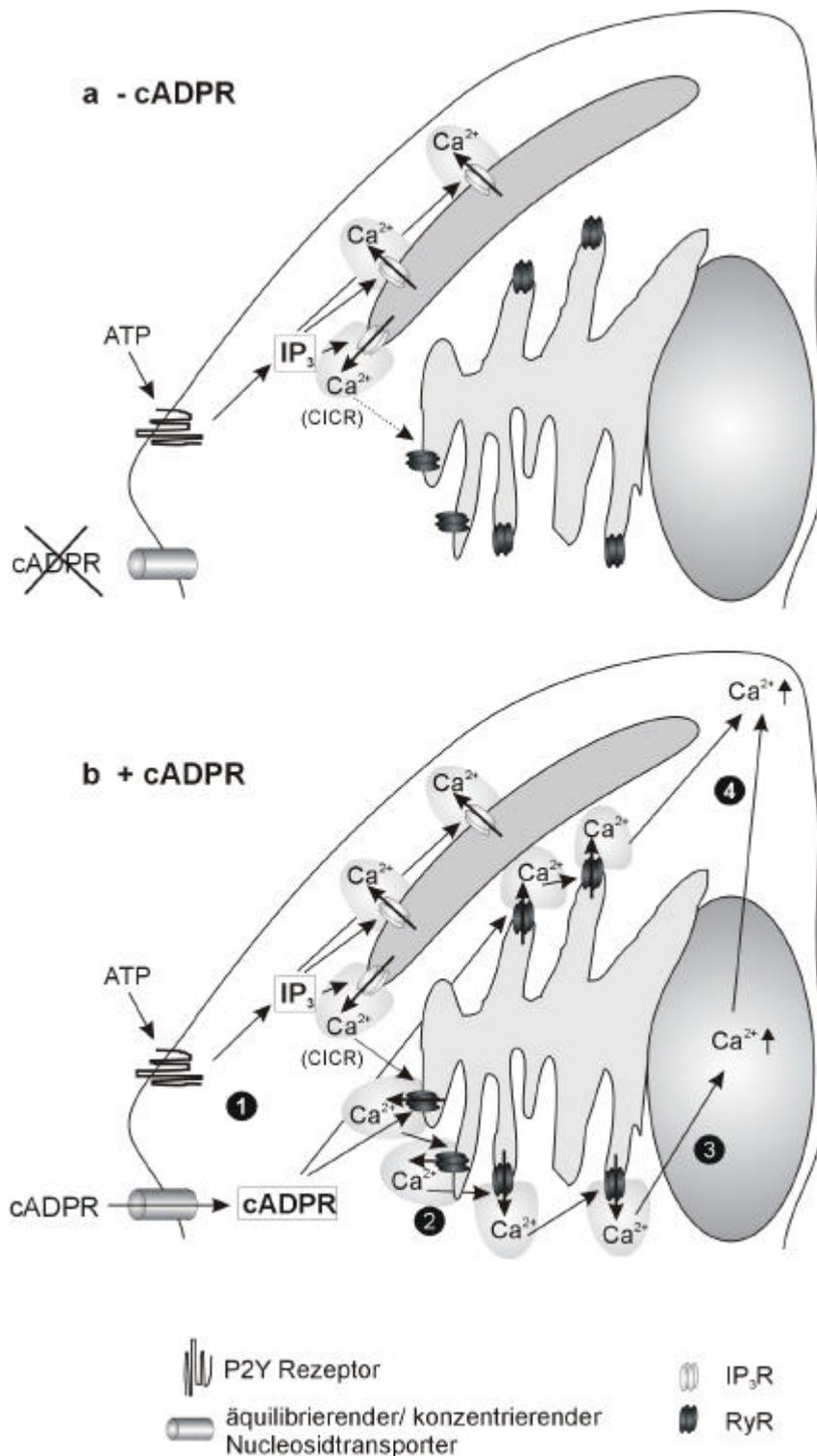


Abb. 5.3 Modell für die Entwicklung der globalen Ca²⁺ Welle in 3T3 Fibroblasten. **a** In Abwesenheit von extrazellulärem cADPR führt die Stimulation des P2Y Rezeptors nur zu lokalen subzellulären Ca²⁺ Signalen im Zellrandbereich, die über den IP₃/IP₃R-Signalweg generiert werden. **b** In Anwesenheit von extrazellulärem cADPR wird dieses über äquilibrierende und konzentrierende Nucleosidtransporter in die Zelle transportiert. Nach der Stimulation des P2Y Rezeptors kann ausgehend von den subzellulären Signalen über den IP₃/IP₃R-Signalweg und vor allem über den cADPR/RyR-Signalweg das globale Ca²⁺ Signal entwickelt werden. Diese Entwicklung erfolgt in Form einer Ca²⁺ Welle vom Zellrand (1), über die perinucleäre Region (2) in den Zellkern (3) und erreicht schließlich die entgegengesetzten Enden der Zelle (4).

Das Modell für die 3T3 Fibroblasten sieht wie folgt aus (Abb. 5.3): Ohne cADPR kann das Signal nicht in das Zellinnere weitergeleitet werden, ein globales Signal entsteht nicht, es bleibt bei kleinen subzellulären Ca^{2+} Signale im Zellrandbereich (Abb. 5.3 a). Diese rühren wahrscheinlich von der Öffnung des IP_3R her. Der Weg des Ca^{2+} führt nur in Richtung der IP_3 generierten Signale (Abb. 5.3 a). Wie Davis et al. zeigten, kann die Sensitivität gegenüber der Stimulation des P2Y-Rezeptors durch die Überexpression des IP_3R noch erhöht werden [38]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in den 3T3 Fibroblasten zusätzlich zum IP_3 -vermittelten Signalweg auch der durch cADPR-vermittelte Signalweg zur Generierung des globalen Ca^{2+} Signals benötigt wird (Abb. 5.3 b). Steht also intrazellulär cADPR zur Verfügung, geht der Weg bei Punkt 1 außer über IP_3 noch über cADPR. Dieses setzt Ca^{2+} aus den cADPR sensitiven Speichern frei, vermutlich den RyR, die außerdem noch durch den CICR aus den IP_3R stimuliert werden. Die Signalkaskade läuft über CICR und cADPR vom Zellrand in die perinucleäre Region, wo ein Großteil der RyR lokalisiert wurde (Abb. 5.3 b, Punkt 2). Darauf findet auch im Zellkern eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ statt (Abb. 5.3 b, Punkt 3), und schließlich erreicht das globale Ca^{2+} Signal die entgegengesetzten Enden der Zelle (Abb. 5.3 b, Punkt 4).

6 Zusammenfassung

Subzelluläre Ca^{2+} Signale werden durch die Ca^{2+} Freisetzung aus intrazellulären Speichern, die über die Second-Messenger IP_3 , cADPR und NAADP aktiviert werden, erzeugt. Während der Pacemaker-Phase werden diese subzellulären Ca^{2+} Signale amplifiziert, überschreiten dann einen Ca^{2+} Schwellenwert und führen zur Entwicklung eines globalen Ca^{2+} Signals. Sowohl subzelluläre als auch globale Ca^{2+} Signale sind je nach Zelltyp und physiologischer Antwort für die weitere Signaltransduktion unerlässlich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Auswertung zur Analyse der subzellulären Ca^{2+} Signale so optimiert, dass diese Signale über die Parameter Durchmesser, Amplitude und Frequenz charakterisiert werden konnten.

Die subzellulären Ca^{2+} Signale während der Pacemaker-Phase wurden in Jurkat und peripheren T-Lymphozyten analysiert und lokalisiert. Dabei hat der Einstrom von Ca^{2+} aus dem extrazellulären Raum kaum Einfluss auf die subzellulären Signale, allein die Entstehung des globalen Ca^{2+} Signals wird deutlich verzögert. Protein-Lokalisationsstudien deuten darauf hin, dass die am Zellrand und im Cytosol analysierten Pacemaker-Signale von IP_3R und RyR stammen.

Um die Rezeptoren ($\text{IP}_3\text{R}/\text{RyR}$), die für die subzellulären Ca^{2+} Signale verantwortlich sind, genauer zu definieren, wurde einerseits mit Inhibitoren gearbeitet, andererseits die Rolle des Typ 3 RyR für die Amplifikation der subzellulären Ca^{2+} Signale vergleichend in Typ 3 RyR knock-down T-Zellen und entsprechenden Kontrollzellen analysiert. Sowohl nach physiologischer Stimulation (anti-CD3) als auch nach spezifischer Stimulation des RyR (cADPR, cADPR Analogon) war die Signalfrequenz in den knock-down T-Zellen insbesondere im Cytosol erniedrigt. Eine ähnlich signifikante Frequenzverringering im Cytosol wurde in den Kontrollzellen durch die Hemmung des cADPR/RyR-Signalwegs hervorgerufen. Eine signifikante Abnahme der Frequenz der subzellulären Ca^{2+} Signale wurde außerdem nach der Blockierung des IP_3R beobachtet. Eine Reduktion der Frequenz und Amplitude der subzellulären Ca^{2+} Signale wurde auch während der langanhaltenden Plateau-Phase in den Typ 3 RyR knock-down Zellen nach physiologischer Stimulation gefunden.

Alternativ zu den T-Lymphozyten wurde in 3T3 Fibroblasten der Maus die Rolle von cADPR in Bezug auf die subzellulären Ca^{2+} Signale während der Pacemaker-Phase und die Entwicklung der globalen Ca^{2+} Welle charakterisiert. Bei Anwesenheit von intrazellulärem cADPR entwickelten die subzellulären Ca^{2+} Signale während der Pacemaker-Phase eine signifikant höhere Amplitude und Frequenz und trugen maßgeblich zur globalen Ca^{2+} Welle bei.

Zum ersten Mal wurden innerhalb dieser Arbeit subzelluläre Ca^{2+} Signale in T-Lymphozyten und 3T3 Fibroblasten analysiert, charakterisiert und subzellulär lokalisiert. In T-Lymphozyten wurde die

Bedeutung des Typ 3 RyR für die Entwicklung der lokalen Ca^{2+} Signale im Cytosol aufgeklärt: der Typ 3 RyR ist im inneren Cytosol für die Amplifikation der lokalen subzellulären Ca^{2+} Signale, die am Zellrand gebildet werden, verantwortlich und bewirkt somit das Entstehen der globalen Ca^{2+} Welle in den Kern. Diese Aussagen wurden durch die Ergebnisse mit den 3T3 Fibroblasten bestätigt, denn nur in Anwesenheit von cADPR, das die Ca^{2+} Freisetzung über den RyR stimuliert, können subzelluläre Ca^{2+} Signale von ausreichender Amplitude und Frequenz generiert werden, sodass sich eine globale Ca^{2+} Welle über die Zellen ausbreiten kann. Die Pacemaker-Signale in 3T3 Zellen stimmen bezüglich Amplitude und Durchmesser in etwa mit den Ca^{2+} -Quarks überein, die subzelluläre Ca^{2+} Signale aufgrund der Öffnung eines oder weniger RyR darstellen.

In T-Lymphozyten und Fibroblasten ist mit dieser Arbeit die entscheidende Rolle der subzellulären Ca^{2+} Signale im cADPR/RyR Signalweg aufgeklärt worden. So bietet es sich an, modulierende Pharmaka schon auf der Ebene der subzellulären Signale einzusetzen, da der Verlauf des globalen Signals von der Amplifikation der subzellulären Pacemaker-Signale abhängt.

7 Summary

Subcellular Ca^{2+} signals are generated by Ca^{2+} release from intracellular stores by the second messengers IP_3 , cADPR, and NAADP. These subcellular signals are amplified during the pacemaker phase, pass a threshold $[\text{Ca}^{2+}]_i$, and finally develop into a global Ca^{2+} signal. Local and global Ca^{2+} signals in general are imperative for further signal transduction.

In this thesis, data acquisition and off-line analysis of subcellular Ca^{2+} signals by digital confocal Ca^{2+} imaging was optimised to characterise signal diameters, amplitudes, and frequencies.

Subcellular Ca^{2+} signals during the pacemaker phase were analysed and localised in Jurkat and peripheral T lymphocytes. Transmembrane Ca^{2+} influx from the extracellular space did not influence the subcellular signalling, except that the development of the global Ca^{2+} signal was clearly delayed. Protein localisation studies indicate that pacemaker signals near the edge of the cell and in the cytosol are generated by IP_3R and RyR.

Type 3 RyR knock-down T cells were compared to control cells to elucidate a function of type 3 RyR in the amplification of subcellular Ca^{2+} signals. Furthermore, different inhibitors were used to characterise in detail the role of both IP_3R and RyR in the generation of subcellular Ca^{2+} signals. After physiological stimulation using anti-CD3 as well as after specific stimulation of the RyR using cADPR or a cADPR analogue the frequency of single Ca^{2+} signals was significantly diminished in the cytosolic region of the knock-down T-cells. A similar significant reduction of the frequency in the cytosol was achieved in the control cell by pharmacological blocking the cADPR/RyR signalling pathway. Furthermore, a significant decrease of the frequency of subcellular Ca^{2+} signals was observed after blocking the IP_3R . In addition, subcellular signals were reduced during the longlasting plateau phase in type 3 RyR knock-down cells after physiological stimulation.

In comparison to the T lymphocytes, the role of cADPR in mouse 3T3 fibroblasts was characterised concerning the subcellular Ca^{2+} signals during the pacemaker phase and the development of the global Ca^{2+} wave. In the presence of intracellular cADPR during the pacemaker phase, the subcellular Ca^{2+} signals showed significantly higher amplitudes and frequencies and substantially contributed to the global Ca^{2+} wave.

For the first time, in the current thesis subcellular Ca^{2+} signals were analysed, characterised and localised in T lymphocytes and 3T3 fibroblasts. In T lymphocytes the importance of the type 3 RyR in generation of local Ca^{2+} signals was elucidated: in the inner cytosol the type 3 RyR is responsible for the amplification of local subcellular Ca^{2+} signals generated near the edge of the cell, and causes the formation of a global Ca^{2+} wave towards the nucleus. These findings were supported by the results from 3T3 fibroblasts since only in the presence of cADPR by stimulating of RyR, subcellular Ca^{2+}

signals of sufficient amplitude and frequency were generated. This resulted in a global Ca^{2+} wave spreading throughout the cells. In 3T3 cells the amplitude and diameter of the pacemaker signals correspond to these determined Ca^{2+} quarks. Such elemental signal events represent subcellular Ca^{2+} signals caused by opening events of one or a few RyR.

In summary, in this thesis evidence for a significant role of the subcellular Ca^{2+} signals in the cADPR/RyR signalling pathway in T lymphocytes and 3T3 fibroblasts is accumulated. In the future, pharmaceuticals modulating subcellular signals may be used to control the effector systems of cellular Ca^{2+} signalling, since the development of global signals depends on the amplification of subcellular pacemaker signals.

8 Literatur

1. Janeway, C. A. und P. Travers. 1997. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
2. Berridge, M. J. 1993. Cell signalling. A tale of two messengers. *Nature* 365:388.
3. Wange, R. L. und L. E. Samelson. 1996. Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity* 5:197.
4. Foletta, V. C., D. H. Segal und D. R. Cohen. 1998. Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *J Leukoc Biol* 63:139.
5. Berridge, M. J. 1997. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Exp Biol* 200 (Pt 2):315.
6. Cantrell, D. 1996. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol* 14:259.
7. Berridge, M. J., M. D. Bootman und H. L. Roderick. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517.
8. Meyer, T. 1991. Cell signaling by second messenger waves. *Cell* 64:675.
9. Tsien, R. W. und R. Y. Tsien. 1990. Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu Rev Cell Biol* 6:715.
10. van Gorp, R. M., M. A. Feijge, W. M. Vuist, M. B. Rook und J. W. Heemskerk. 2002. Irregular spiking in free calcium concentration in single, human platelets. Regulation by modulation of the inositol trisphosphate receptors. *Eur J Biochem* 269:1543.
11. Albrieux, M., H. C. Lee und M. Villaz. 1998. Calcium signaling by cyclic ADP-ribose, NAADP, and inositol trisphosphate are involved in distinct functions in ascidian oocytes. *J Biol Chem* 273:14566.
12. da Silva, C. P. und A. H. Guse. 2000. Intracellular Ca²⁺ release mechanisms: multiple pathways having multiple functions within the same cell type? *Biochim Biophys Acta* 1498:122.
13. Lee, H. C. 1997. Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol Rev* 77:1133.
14. Masuda, W., S. Takenaka, S. Tsuyama, M. Tokunaga, R. Yamaji, H. Inui, K. Miyatake und Y. Nakano. 1997. Inositol 1,4,5-trisphosphate and cyclic ADP-ribose mobilize Ca²⁺ in a protist, *Euglena gracilis*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 118:279.
15. Guse, A. H. 2002. The role of cADPR and NAADP in T cell Ca²⁺ signaling and activation. In *Cyclic ADP-ribose and NAADP: structures, metabolism and functions*. H. C. Lee, ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht ; Boston, p. 301.

16. Bootman, M. D. und M. J. Berridge. 1995. The elemental principles of calcium signaling. *Cell* 83:675.
17. Cancela, J. M., O. V. Gerasimenko, J. V. Gerasimenko, A. V. Tepikin und O. H. Petersen. 2000. Two different but converging messenger pathways to intracellular Ca^{2+} release: the roles of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, cyclic ADP-ribose and inositol trisphosphate. *Embo J* 19:2549.
18. Streb, H., R. F. Irvine, M. J. Berridge und I. Schulz. 1983. Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306:67.
19. Berridge, M. J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361:315.
20. Bootman, M. D., T. R. Cheek, R. B. Moreton, D. L. Bennett und M. J. Berridge. 1994. Smoothly graded Ca^{2+} release from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} stores. *J Biol Chem* 269:24783.
21. Putney, J. W., Jr. 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7:1.
22. Bird, G. S., M. F. Rossier, A. R. Hughes, S. B. Shears, D. L. Armstrong und J. W. Putney, Jr. 1991. Activation of Ca^{2+} entry into acinar cells by a non-phosphorylatable inositol trisphosphate. *Nature* 352:162.
23. Boittin, F. X., F. Coussin, J. L. Morel, G. Halet, N. Macrez und J. Mironneau. 2000. Ca^{2+} signals mediated by $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -gated channels in rat ureteric myocytes. *Biochem J* 349:323.
24. Carafoli, E., L. Santella, D. Branca und M. Brini. 2001. Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36:107.
25. Yokoyama, K., I. H. Su Ih, T. Tezuka, T. Yasuda, K. Mikoshiba, A. Tarakhovsky und T. Yamamoto. 2002. BANK regulates BCR-induced calcium mobilization by promoting tyrosine phosphorylation of IP_3 receptor. *Embo J* 21:83.
26. Bezprozvanny, I. und B. E. Ehrlich. 1994. Inositol (1,4,5)-trisphosphate (InsP_3)-gated Ca channels from cerebellum: conduction properties for divalent cations and regulation by intraluminal calcium. *J Gen Physiol* 104:821.
27. Lechleiter, J. D. und D. E. Clapham. 1992. Spiral waves and intracellular calcium signalling. *J Physiol Paris* 86:123.
28. Bootman, M. D., C. W. Taylor und M. J. Berridge. 1992. The thiol reagent, thimerosal, evokes Ca^{2+} spikes in HeLa cells by sensitizing the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 267:25113.
29. Thorn, P., P. Brady, J. Llopis, D. V. Gallacher und O. H. Petersen. 1992. Cytosolic Ca^{2+} spikes evoked by the thiol reagent thimerosal in both intact and internally perfused single pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch* 422:173.
30. Lipp, P., D. Thomas, M. J. Berridge und M. D. Bootman. 1997. Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs. *Embo J* 16:7166.

31. Fox, J. L., A. D. Burgstahler und M. H. Nathanson. 1997. Mechanism of long-range Ca^{2+} signalling in the nucleus of isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 326:491.
32. Gerasimenko, O. V., J. V. Gerasimenko, A. V. Tepikin und O. H. Petersen. 1995. ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca^{2+} from the nuclear envelope. *Cell* 80:439.
33. Echevarria, W., M. F. Leite, M. T. Guerra, W. R. Zipfel und M. H. Nathanson. 2003. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 5:440.
34. Guse, A. H., E. Roth und F. Emmrich. 1993. Intracellular Ca^{2+} pools in Jurkat T-lymphocytes. *Biochem J* 291 (Pt 2):447.
35. Ng, J., J. Gustavsson, M. Jondal und T. Andersson. 1990. Regulation of calcium influx across the plasma membrane of the human T-leukemic cell line, JURKAT: dependence on a rise in cytosolic free calcium can be dissociated from formation of inositol phosphates. *Biochim Biophys Acta* 1053:97.
36. Meszaros, J. G., A. M. Gonzalez, Y. Endo-Mochizuki, S. Villegas, F. Villarreal und L. L. Brunton. 2000. Identification of G protein-coupled signaling pathways in cardiac fibroblasts: cross talk between G_q and G_s . *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C154.
37. Homolya, L., W. C. Watt, E. R. Lazarowski, B. H. Koller und R. C. Boucher. 1999. Nucleotide-regulated calcium signaling in lung fibroblasts and epithelial cells from normal and P2Y_2 receptor (-/-) mice. *J Biol Chem* 274:26454.
38. Davis, R. J., J. Challiss und S. R. Nahorski. 1999. Enhanced purinoceptor-mediated Ca^{2+} signalling in L-fibroblasts overexpressing type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Biochem J* 341:813.
39. Khan, A. A., J. P. Steiner, M. G. Klein, M. F. Schneider und S. H. Snyder. 1992. IP_3 receptor: localization to plasma membrane of T cells and cocapping with the T cell receptor. *Science* 257:815.
40. Bourguignon, L. Y. und H. Jin. 1995. Identification of the ankyrin-binding domain of the mouse T-lymphoma cell inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) receptor and its role in the regulation of IP_3 -mediated internal Ca^{2+} release. *J Biol Chem* 270:7257.
41. Sugiyama, T., M. Yamamoto-Hino, A. Miyawaki, T. Furuichi, K. Mikoshiba und M. Hasegawa. 1994. Subtypes of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in human hematopoietic cell lines: dynamic aspects of their cell-type specific expression. *FEBS Lett* 349:191.
42. Jayaraman, T., E. Ondriasova, K. Ondrias, D. J. Harnick und A. R. Marks. 1995. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for T-cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6007.

43. Guse, A. H., C. P. da Silva, I. Berg, A. L. Skapenko, K. Weber, P. Heyer, M. Hohenegger, G. A. Ashamu, H. Schulze-Koops, B. V. Potter und G. W. Mayr. 1999. Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature* 398:70.
44. Thorn, P., A. M. Lawrie, P. M. Smith, D. V. Gallacher und O. H. Petersen. 1993. Local and global cytosolic Ca^{2+} oscillations in exocrine cells evoked by agonists and inositol trisphosphate. *Cell* 74:661.
45. Gafni, J., J. A. Munsch, T. H. Lam, M. C. Catlin, L. G. Costa, T. F. Molinski und I. N. Pessah. 1997. Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron* 19:723.
46. Maruyama, T., T. Kanaji, S. Nakade, T. Kanno und K. Mikoshiba. 1997. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -induced Ca^{2+} release. *J Biochem (Tokyo)* 122:498.
47. Bilmen, J. G. und F. Michelangeli. 2002. Inhibition of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by 2-aminoethoxydiphenylborate. *Cell Signal* 14:955.
48. Bootman, M. D., T. J. Collins, L. Mackenzie, H. L. Roderick, M. J. Berridge und C. M. Peppiatt. 2002. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca^{2+} entry but an inconsistent inhibitor of InsP_3 -induced Ca^{2+} release. *Faseb J* 16:1145.
49. Braun, F. J., O. Aziz und J. W. Putney, Jr. 2003. 2-aminoethoxydiphenyl borane activates a novel calcium-permeable cation channel. *Mol Pharmacol* 63:1304.
50. Schottelndreier, H., B. V. Potter, G. W. Mayr und A. H. Guse. 2001. Mechanisms involved in $\alpha 6\beta 1$ -integrin-mediated Ca^{2+} signalling. *Cell Signal* 13:895.
51. Guse, A. H. 2000. Cyclic ADP-ribose. *J Mol Med* 78:26.
52. Lee, H. C., T. F. Walseth, G. T. Bratt, R. N. Hayes und D. L. Clapper. 1989. Structural determination of a cyclic metabolite of NAD^+ with intracellular Ca^{2+} -mobilizing activity. *J Biol Chem* 264:1608.
53. Lee, H. C. und R. Aarhus. 1991. ADP-ribosyl cyclase: an enzyme that cyclizes NAD^+ into a calcium-mobilizing metabolite. *Cell Regul* 2:203.
54. Graeff, R. M., L. Franco, A. De Flora und H. C. Lee. 1998. Cyclic GMP-dependent and -independent effects on the synthesis of the calcium messengers cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *J Biol Chem* 273:118.
55. Higashida, H. 1997. ADP-ribosyl cyclase coupled with receptors via G proteins. *FEBS Lett* 418:355.
56. Guse, A. H. 1999. Cyclic ADP-ribose: a novel Ca^{2+} -mobilising second messenger. *Cell Signal* 11:309.
57. Bruzzone, S., A. De Flora, C. Usai, R. Graeff und H. C. Lee. 2003. Cyclic ADP-ribose is a second messenger in the lipopolysaccharide-stimulated proliferation of human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem J* 375:395.

58. Sternfeld, L., E. Krause, A. H. Guse und I. Schulz. 2003. Hormonal control of ADP-ribosyl cyclase activity in pancreatic acinar cells from rats. *J Biol Chem* 278:33629.
59. Lee, H. C. und R. Aarhus. 1993. Wide distribution of an enzyme that catalyzes the hydrolysis of cyclic ADP-ribose. *Biochim Biophys Acta* 1164:68.
60. Kim, H., E. L. Jacobson und M. K. Jacobson. 1993. Synthesis and degradation of cyclic ADP-ribose by NAD glycohydrolases. *Science* 261:1330.
61. Howard, M., J. C. Grimaldi, J. F. Bazan, F. E. Lund, L. Santos-Argumedo, R. M. Parkhouse, T. F. Walseth und H. C. Lee. 1993. Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science* 262:1056.
62. States, D. J., T. F. Walseth und H. C. Lee. 1992. Similarities in amino acid sequences of Aplysia ADP-ribosyl cyclase and human lymphocyte antigen CD38. *Trends Biochem Sci* 17:495.
63. Ziegler, M., D. Jorcke und M. Schweiger. 1997. Identification of bovine liver mitochondrial NAD⁺ glycohydrolase as ADP-ribosyl cyclase. *Biochem J* 326:401.
64. Sun, L., O. A. Adebajo, A. Koval, H. K. Anandatheerthavarada, J. Iqbal, X. Y. Wu, B. S. Moonga, X. B. Wu, G. Biswas, P. J. Bevis, M. Kumegawa, S. Epstein, C. L. Huang, N. G. Avadhani, E. Abe und M. Zaidi. 2002. A novel mechanism for coupling cellular intermediary metabolism to cytosolic Ca²⁺ signaling via CD38/ADP-ribosyl cyclase, a putative intracellular NAD⁺ sensor. *Faseb J* 16:302.
65. Schweitzer, K., G. W. Mayr und A. H. Guse. 2001. Assay for ADP-ribosyl cyclase by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 299:218.
66. da Silva, C. P., K. Schweitzer, P. Heyer, F. Malavasi, G. W. Mayr und A. H. Guse. 1998. Ectocellular CD38-catalyzed synthesis and intracellular Ca²⁺-signalling activity of cyclic ADP-ribose in T-lymphocytes are not functionally related. *FEBS Lett* 439:291.
67. Bruzzone, S., L. Guida, L. Franco, E. Zocchi, G. Corte und A. De Flora. 1998. Dimeric and tetrameric forms of catalytically active transmembrane CD38 in transfected HeLa cells. *FEBS Lett* 433:275.
68. Franco, L., L. Guida, S. Bruzzone, E. Zocchi, C. Usai und A. De Flora. 1998. The transmembrane glycoprotein CD38 is a catalytically active transporter responsible for generation and influx of the second messenger cyclic ADP-ribose across membranes. *Faseb J* 12:1507.
69. Bruzzone, S., L. Guida, E. Zocchi, L. Franco und A. De Flora. 2001. Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *Faseb J* 15:10.
70. Bruzzone, S., L. Franco, L. Guida, E. Zocchi, P. Contini, A. Bisso, C. Usai und A. De Flora. 2001. A self-restricted CD38-connexin 43 cross-talk affects NAD⁺ and cyclic ADP-ribose metabolism and regulates intracellular calcium in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 276:48300.

71. Guida, L., S. Bruzzone, L. Sturla, L. Franco, E. Zocchi und A. De Flora. 2002. Equilibrative and concentrative nucleoside transporters mediate influx of extracellular cyclic ADP-ribose into 3T3 murine fibroblasts. *J Biol Chem* 277:47097.
72. Zocchi, E., A. Daga, C. Usai, L. Franco, L. Guida, S. Bruzzone, A. Costa, C. Marchetti und A. De Flora. 1998. Expression of CD38 increases intracellular calcium concentration and reduces doubling time in HeLa and 3T3 cells. *J Biol Chem* 273:8017.
73. Franco, L., E. Zocchi, C. Usai, L. Guida, S. Bruzzone, A. Costa und A. De Flora. 2001. Paracrine roles of NAD⁺ and cyclic ADP-ribose in increasing intracellular calcium and enhancing cell proliferation of 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 276:21642.
74. Clapper, D. L., T. F. Walseth, P. J. Dargie und H. C. Lee. 1987. Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J Biol Chem* 262:9561.
75. Noguchi, N., S. Takasawa, K. Nata, A. Tohgo, I. Kato, F. Ikehata, H. Yonekura und H. Okamoto. 1997. Cyclic ADP-ribose binds to FK506-binding protein 12.6 to release Ca²⁺ from islet microsomes. *J Biol Chem* 272:3133.
76. Bootman, M. D., M. J. Berridge und H. L. Roderick. 2002. Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr Biol* 12:R563.
77. Lee, H. C. und R. Aarhus. 1995. A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem* 270:2152.
78. Ashby, M. C., O. H. Petersen und A. V. Tepikin. 2003. Spatial characterisation of ryanodine-induced calcium release in mouse pancreatic acinar cells. *Biochem J* 369:441.
79. Lee, H. C. und R. Aarhus. 2000. Functional visualization of the separate but interacting calcium stores sensitive to NAADP and cyclic ADP-ribose. *J Cell Sci* 113:4413.
80. da Silva, C. P., B. V. Potter, G. W. Mayr und A. H. Guse. 1998. Quantification of intracellular levels of cyclic ADP-ribose by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 707:43.
81. Bennett, D. L., T. R. Cheek, M. J. Berridge, H. De Smedt, J. B. Parys, L. Missiaen und M. D. Bootman. 1996. Expression and function of ryanodine receptors in nonexcitable cells. *J Biol Chem* 271:6356.
82. Bourguignon, L. Y., A. Chu, H. Jin und N. R. Brandt. 1995. Ryanodine receptor-ankyrin interaction regulates internal Ca²⁺ release in mouse T-lymphoma cells. *J Biol Chem* 270:17917.
83. Meszaros, L. G., J. Bak und A. Chu. 1993. Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor Ca²⁺ channel. *Nature* 364:76.
84. Sitsapesan, R. und A. J. Williams. 1995. Cyclic ADP-ribose and related compounds activate sheep skeletal sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release channel. *Am J Physiol* 268:C1235.

85. Coussin, F., N. Macrez, J. L. Morel und J. Mironneau. 2000. Requirement of ryanodine receptor subtypes 1 and 2 for Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in vascular myocytes. *J Biol Chem* 275:9596.
86. Guse, A. H., C. P. da Silva, K. Weber, C. N. Armah, G. A. Ashamu, C. Schulze, B. V. Potter, G. W. Mayr und H. Hilz. 1997. 1-(5-phospho-beta-D-ribose)2'-phosphoadenosine 5'-phosphate cyclic anhydride induced Ca^{2+} release in human T-cell lines. *Eur J Biochem* 245:411.
87. Guse, A. H., C. Cakir-Kiefer, M. Fukuoka, S. Shuto, K. Weber, V. C. Bailey, A. Matsuda, G. W. Mayr, N. Oppenheimer, F. Schuber und B. V. Potter. 2002. Novel hydrolysis-resistant analogues of cyclic ADP-ribose: modification of the "northern" ribose and calcium release activity. *Biochemistry* 41:6744.
88. Yusufi, A. N., J. Cheng, M. A. Thompson, J. C. Burnett und J. P. Grande. 2002. Differential mechanisms of Ca^{2+} release from vascular smooth muscle cell microsomes. *Exp Biol Med (Maywood)* 227:36.
89. Lee, H. C. 2001. Physiological functions of cyclic ADP-ribose and NAADP as calcium messengers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:317.
90. Guse, A. H., C. P. da Silva, F. Emmrich, G. A. Ashamu, B. V. Potter und G. W. Mayr. 1995. Characterization of cyclic adenosine diphosphate-ribose-induced Ca^{2+} release in T lymphocyte cell lines. *J Immunol* 155:3353.
91. Aarhus, R., R. M. Graeff, D. M. Dickey, T. F. Walseth und H. C. Lee. 1995. ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J Biol Chem* 270:30327.
92. Chini, E. N., K. W. Beers und T. P. Dousa. 1995. Nicotinate adenine dinucleotide phosphate (NAADP) triggers a specific calcium release system in sea urchin eggs. *J Biol Chem* 270:3216.
93. Lee, H. C. und R. Aarhus. 1997. Structural determinants of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate important for its calcium-mobilizing activity. *J Biol Chem* 272:20378.
94. Aarhus, R., D. M. Dickey, R. M. Graeff, K. R. Gee, T. F. Walseth und H. C. Lee. 1996. Activation and inactivation of Ca^{2+} release by NAADP⁺. *J Biol Chem* 271:8513.
95. Chini, E. N. und T. P. Dousa. 1996. Nicotinate-adenine dinucleotide phosphate-induced Ca^{2+} -release does not behave as a Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release system. *Biochem J* 316:709.
96. Berg, I., B. V. Potter, G. W. Mayr und A. H. Guse. 2000. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP⁺) is an essential regulator of T-lymphocyte Ca^{2+} -signaling. *J Cell Biol* 150:581.
97. Cancela, J. M., G. C. Churchill und A. Galione. 1999. Coordination of agonist-induced Ca^{2+} -signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. *Nature* 398:74.

98. Genazzani, A. A. und A. Galione. 1996. Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate mobilizes Ca^{2+} from a thapsigargin-insensitive pool. *Biochem J* 315:721.
99. Hohenegger, M., J. Suko, R. Gscheidlinger, H. Drobny und A. Zidar. 2002. Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate activates the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochem J* 367:423.
100. Mojzisoava, A., O. Krizanova, L. Zacikova, V. Kominkova und K. Ondrias. 2001. Effect of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate on ryanodine calcium release channel in heart. *Pflugers Arch* 441:674.
101. Gerasimenko, J. V., Y. Maruyama, K. Yano, N. J. Dolman, A. V. Tepikin, O. H. Petersen und O. V. Gerasimenko. 2003. NAADP mobilizes Ca^{2+} from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors. *J Cell Biol* 163:271.
102. Patel, S., G. C. Churchill, T. Sharp und A. Galione. 2000. Widespread distribution of binding sites for the novel Ca^{2+} -mobilizing messenger, nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, in the brain. *J Biol Chem* 275:36495.
103. Barritt, G. J. 1999. Receptor-activated Ca^{2+} inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular Ca^{2+} signalling requirements. *Biochem J* 337:153.
104. Mignen, O. und T. J. Shuttleworth. 2000. I_{ARC} , a novel arachidonate-regulated, noncapacitative Ca^{2+} entry channel. *J Biol Chem* 275:9114.
105. Clapham, D. E., L. W. Runnels und C. Strubing. 2001. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2:387.
106. Minke, B. und B. Cook. 2002. TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev* 82:429.
107. Montell, C., L. Birnbaumer und V. Flockerzi. 2002. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108:595.
108. Lewis, R. S. 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 19:497.
109. Irvine, R. F. 1990. 'Quantal' Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates-- a possible mechanism. *FEBS Lett* 263:5.
110. da Silva, C. P., F. Emmrich und A. H. Guse. 1994. Adriamycin inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase activity in vitro and blocks formation of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate in stimulated Jurkat T-lymphocytes. Does inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate play a role in Ca^{2+} -entry? *J Biol Chem* 269:12521.
111. Pouillon, V., R. Hascakova-Bartova, B. Pajak, E. Adam, F. Bex, V. Dewaste, C. Van Lint, O. Leo, C. Erneux und S. Schurmans. 2003. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate is essential for T lymphocyte development. *Nat Immunol* 4:1136.
112. Putney, J. W., Jr. 1990. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11:611.

113. Hoth, M. und R. Penner. 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355:353.
114. Zweifach, A. und 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 U S A* 90:6295.
115. Zweifach, A. 2000. Target-cell contact activates a highly selective capacitative calcium entry pathway in cytotoxic T lymphocytes. *J Cell Biol* 148:603.
116. Parekh, A. B. und R. Penner. 1997. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 77:901.
117. Guse, A. H. 1998. Ca^{2+} signaling in T-lymphocytes. *Crit Rev Immunol* 18:419.
118. Randriamampita, C. und R. Y. Tsien. 1993. Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature* 364:809.
119. Kiselyov, K., X. Xu, G. Mozhayeva, T. Kuo, I. Pessah, G. Mignery, X. Zhu, L. Birnbaumer und S. Muallem. 1998. Functional interaction between InsP_3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* 396:478.
120. Berridge, M. J. 1995. Capacitative calcium entry. *Biochem J* 312:1.
121. Zweifach, A. und R. S. Lewis. 1995. Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (I_{CRAC}) due to local calcium feedback. *J Gen Physiol* 105:209.
122. Zweifach, A. und R. S. Lewis. 1995. Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 270:14445.
123. Hoth, M., D. C. Button und R. S. Lewis. 2000. Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10607.
124. Dolmetsch, R. E., K. Xu und R. S. Lewis. 1998. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392:933.
125. Timmerman, L. A., N. A. Clipstone, S. N. Ho, J. P. Northrop und G. R. Crabtree. 1996. Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca^{2+} signals and immunosuppression. *Nature* 383:837.
126. Berridge, M. J., M. D. Bootman und P. Lipp. 1998. Calcium--a life and death signal. *Nature* 395:645.
127. Ishikawa, J., K. Ohga, T. Yoshino, R. Takezawa, A. Ichikawa, H. Kubota und T. Yamada. 2003. A pyrazole derivative, YM-58483, potently inhibits store-operated sustained Ca^{2+} influx and IL-2 production in T lymphocytes. *J Immunol* 170:4441.
128. Gebert, B., W. Fischer, E. Weiss, R. Hoffmann und R. Haas. 2003. Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* 301:1099.
129. Partiseti, M., F. Le Deist, C. Hivroz, A. Fischer, H. Korn und D. Choquet. 1994. The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency. *J Biol Chem* 269:32327.

130. Feske, S., J. Giltneane, R. Dolmetsch, L. M. Staudt und A. Rao. 2001. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol* 2:316.
131. Guse, A. H., I. Berg, C. P. da Silva, B. V. Potter und G. W. Mayr. 1997. Ca^{2+} entry induced by cyclic ADP-ribose in intact T-lymphocytes. *J Biol Chem* 272:8546.
132. Kotturi, M. F., D. A. Carlow, J. C. Lee, H. J. Ziltener und W. A. Jefferies. 2003. Identification and functional characterization of voltage-dependent calcium channels in T lymphocytes. *J Biol Chem* 278:46949.
133. Bootman, M., E. Niggli, M. Berridge und P. Lipp. 1997. Imaging the hierarchical Ca^{2+} signalling system in HeLa cells. *J Physiol* 499 (Pt 2):307.
134. Bootman, M. D. und M. J. Berridge. 1996. Subcellular Ca^{2+} signals underlying waves and graded responses in HeLa cells. *Curr Biol* 6:855.
135. Yao, Y., J. Choi und I. Parker. 1995. Quantal puffs of intracellular Ca^{2+} evoked by inositol trisphosphate in Xenopus oocytes. *J Physiol* 482 (Pt 3):533.
136. Reber, B. F. und B. Schindelholz. 1996. Detection of a trigger zone of bradykinin-induced fast calcium waves in PC12 neurites. *Pflugers Arch* 432:893.
137. Koizumi, S., M. D. Bootman, L. K. Bobanovic, M. J. Schell, M. J. Berridge und P. Lipp. 1999. Characterization of elementary Ca^{2+} release signals in NGF-differentiated PC12 cells and hippocampal neurons. *Neuron* 22:125.
138. Huser, J. und L. A. Blatter. 1997. Elementary events of agonist-induced Ca^{2+} release in vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 273:C1775.
139. Tovey, S. C., P. de Smet, P. Lipp, D. Thomas, K. W. Young, L. Missiaen, H. De Smedt, J. B. Parys, M. J. Berridge, J. Thuring, A. Holmes und M. D. Bootman. 2001. Calcium puffs are generic InsP_3 -activated elementary calcium signals and are downregulated by prolonged hormonal stimulation to inhibit cellular calcium responses. *J Cell Sci* 114:3979.
140. Kidd, J. F., K. E. Fogarty, R. A. Tuft und P. Thorn. 1999. The role of Ca^{2+} feedback in shaping InsP_3 -evoked Ca^{2+} signals in mouse pancreatic acinar cells. *J Physiol* 520:187.
141. Tinel, N., S. Diochot, M. Borsotto, M. Lazdunski und J. Barhanin. 2000. KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *Embo J* 19:6326.
142. Straub, S. V., D. R. Giovannucci und D. I. Yule. 2000. Calcium wave propagation in pancreatic acinar cells: functional interaction of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, ryanodine receptors, and mitochondria. *J Gen Physiol* 116:547.
143. Collins, T. J., P. Lipp, M. J. Berridge, W. Li und M. D. Bootman. 2000. Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release is inhibited by mitochondrial depolarization. *Biochem J* 347:593.
144. Rizzuto, R., P. Bernardi und T. Pozzan. 2000. Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J Physiol* 529:37.

145. Rizzuto, R., P. Pinton, W. Carrington, F. S. Fay, K. E. Fogarty, L. M. Lifshitz, R. A. Tuft und T. Pozzan. 1998. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. *Science* 280:1763.
146. Thorn, P., R. Moreton und M. Berridge. 1996. Multiple, coordinated Ca^{2+} -release events underlie the inositol trisphosphate-induced local Ca^{2+} spikes in mouse pancreatic acinar cells. *Embo J* 15:999.
147. Gerasimenko, O. V., J. V. Gerasimenko, O. H. Petersen und A. V. Tepikin. 1996. Short pulses of acetylcholine stimulation induce cytosolic Ca^{2+} signals that are excluded from the nuclear region in pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch* 432:1055.
148. Neylon, C. B., J. Hoyland, W. T. Mason und R. F. Irvine. 1990. Spatial dynamics of intracellular calcium in agonist-stimulated vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 259:C675.
149. Bootman, M. D., M. J. Berridge und P. Lipp. 1997. Cooking with calcium: the recipes for composing global signals from elementary events. *Cell* 91:367.
150. Yagodin, S. V., L. Holtzclaw, C. A. Sheppard und J. T. Russell. 1994. Nonlinear propagation of agonist-induced cytoplasmic calcium waves in single astrocytes. *J Neurobiol* 25:265.
151. Callamaras, N. und I. Parker. 1999. Radial localization of inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} release sites in *Xenopus* oocytes resolved by axial confocal linescan imaging. *J Gen Physiol* 113:199.
152. Zholos, A. V., S. Komori, H. Ohashi und T. B. Bolton. 1994. Ca^{2+} inhibition of inositol trisphosphate-induced Ca^{2+} release in single smooth muscle cells of guinea-pig small intestine. *J Physiol* 481:97.
153. Nelson, M. T., H. Cheng, M. Rubart, L. F. Santana, A. D. Bonev, H. J. Knot und W. J. Lederer. 1995. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 270:633.
154. ZhuGe, R., K. E. Fogarty, R. A. Tuft, L. M. Lifshitz, K. Sayar und J. V. Walsh, Jr. 2000. Dynamics of signaling between Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} -activated K^+ channels studied with a novel image-based method for direct intracellular measurement of ryanodine receptor Ca^{2+} current. *J Gen Physiol* 116:845.
155. Lohn, M., W. Jessner, M. Furstenau, M. Wellner, V. Sorrentino, H. Haller, F. C. Luft und M. Gollasch. 2001. Regulation of calcium sparks and spontaneous transient outward currents by RyR3 in arterial vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 89:1051.
156. Herrera, G. M., T. J. Heppner und M. T. Nelson. 2001. Voltage dependence of the coupling of Ca^{2+} sparks to BK_{Ca} channels in urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C481.
157. Tsugorka, A., E. Rios und L. A. Blatter. 1995. Imaging elementary events of calcium release in skeletal muscle cells. *Science* 269:1723.

158. Klein, M. G., H. Cheng, L. F. Santana, Y. H. Jiang, W. J. Lederer und M. F. Schneider. 1996. Two mechanisms of quantized calcium release in skeletal muscle. *Nature* 379:455.
159. Conklin, M. W., C. A. Ahern, P. Vallejo, V. Sorrentino, H. Takeshima und R. Coronado. 2000. Comparison of Ca^{2+} sparks produced independently by two ryanodine receptor isoforms (type 1 or type 3). *Biophys J* 78:1777.
160. Kirsch, W. G., D. Uttenweiler und R. H. Fink. 2001. Spark- and ember-like elementary Ca^{2+} release events in skinned fibres of adult mammalian skeletal muscle. *J Physiol* 537:379.
161. Shtifman, A., C. W. Ward, T. Yamamoto, J. Wang, B. Olbinski, H. H. Valdivia, N. Ikemoto und M. F. Schneider. 2002. Interdomain interactions within ryanodine receptors regulate Ca^{2+} spark frequency in skeletal muscle. *J Gen Physiol* 119:15.
162. Cannell, M. B., H. Cheng und W. J. Lederer. 1995. The control of calcium release in heart muscle. *Science* 268:1045.
163. Lipp, P. und E. Niggli. 1996. Submicroscopic calcium signals as fundamental events of excitation-contraction coupling in guinea-pig cardiac myocytes. *J Physiol* 492 (Pt 1):31.
164. Lopez-Lopez, J. R., P. S. Shacklock, C. W. Balke und W. G. Wier. 1995. Local calcium transients triggered by single L-type calcium channel currents in cardiac cells. *Science* 268:1042.
165. Lipp, P. und E. Niggli. 1998. Fundamental calcium release events revealed by two-photon excitation photolysis of caged calcium in Guinea-pig cardiac myocytes. *J Physiol* 508:801.
166. Lukyanenko, V. und S. Gyorke. 1999. Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} waves in saponin-permeabilized rat ventricular myocytes. *J Physiol* 521:575.
167. Lukyanenko, V., I. Gyorke, T. F. Wiesner und S. Gyorke. 2001. Potentiation of Ca^{2+} release by cADP-ribose in the heart is mediated by enhanced SR Ca^{2+} uptake into the sarcoplasmic reticulum. *Circ Res* 89:614.
168. Marrion, N. V. und P. R. Adams. 1992. Release of intracellular calcium and modulation of membrane currents by caffeine in bull-frog sympathetic neurones. *J Physiol* 445:515.
169. Cheng, H., W. J. Lederer und M. B. Cannell. 1993. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 262:740.
170. Haak, L. L., L. S. Song, T. F. Molinski, I. N. Pessah, H. Cheng und J. T. Russell. 2001. Sparks and puffs in oligodendrocyte progenitors: cross talk between ryanodine receptors and inositol trisphosphate receptors. *J Neurosci* 21:3860.
171. Xia, S. L. und J. Ferrier. 1996. Localized calcium signaling in multinucleated osteoclasts. *J Cell Physiol* 167:148.
172. Huser, J., L. A. Blatter und S. L. Lipsius. 2000. Intracellular Ca^{2+} release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells. *J Physiol* 524:415.

173. Lipp, P., M. Laine, S. C. Tovey, K. M. Burrell, M. J. Berridge, W. Li und M. D. Bootman. 2000. Functional InsP₃ receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Curr Biol* 10:939.
174. Mironneau, J., N. Macrez, J. L. Morel, V. Sorrentino und C. Mironneau. 2002. Identification and function of ryanodine receptor subtype 3 in non-pregnant mouse myometrial cells. *J Physiol* 538:707.
175. Conklin, M. W., V. Barone, V. Sorrentino und R. Coronado. 1999. Contribution of ryanodine receptor type 3 to Ca²⁺ sparks in embryonic mouse skeletal muscle. *Biophys J* 77:1394.
176. Rossi, D., I. Simeoni, M. Micheli, M. Bootman, P. Lipp, P. D. Allen und V. Sorrentino. 2002. RyR1 and RyR3 isoforms provide distinct intracellular Ca²⁺ signals in HEK 293 cells. *J Cell Sci* 115:2497.
177. Powell, J. A., M. A. Carrasco, D. S. Adams, B. Drouet, J. Rios, M. Muller, M. Estrada und E. Jaimovich. 2001. IP₃ receptor function and localization in myotubes: an unexplored Ca²⁺ signaling pathway in skeletal muscle. *J Cell Sci* 114:3673.
178. Estrada, M., C. Cardenas, J. L. Liberona, M. A. Carrasco, G. A. Mignery, P. D. Allen und E. Jaimovich. 2001. Calcium transients in 1B5 myotubes lacking ryanodine receptors are related to inositol trisphosphate receptors. *J Biol Chem* 276:22868.
179. Giannini, G., A. Conti, S. Mammarella, M. Scrobogna und V. Sorrentino. 1995. The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J Cell Biol* 128:893.
180. Jaffe, L. F. 1991. The path of calcium in cytosolic calcium oscillations: a unifying hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9883.
181. Bootman, M. D. 1996. Hormone-evoked subcellular Ca²⁺ signals in HeLa cells. *Cell Calcium* 20:97.
182. Lipp, P. und E. Niggli. 1993. Microscopic spiral waves reveal positive feedback in subcellular calcium signaling. *Biophys J* 65:2272.
183. Lechleiter, J., S. Girard, E. Peralta und D. Clapham. 1991. Spiral calcium wave propagation and annihilation in *Xenopus laevis* oocytes. *Science* 252:123.
184. Kasai, H., Y. X. Li und Y. Miyashita. 1993. Subcellular distribution of Ca²⁺ release channels underlying Ca²⁺ waves and oscillations in exocrine pancreas. *Cell* 74:669.
185. Nathanson, M. H., A. D. Burgstahler und M. B. Fallon. 1994. Multistep mechanism of polarized Ca²⁺ wave patterns in hepatocytes. *Am J Physiol* 267:G338.
186. Thorn, P., O. Gerasimenko und O. H. Petersen. 1994. Cyclic ADP-ribose regulation of ryanodine receptors involved in agonist evoked cytosolic Ca²⁺ oscillations in pancreatic acinar cells. *Embo J* 13:2038.
187. Petersen, O. H. und J. M. Cancela. 1999. New Ca²⁺-releasing messengers: are they important in the nervous system? *Trends Neurosci* 22:488.

188. Churchill, G. C. und A. Galione. 2000. Spatial control of Ca^{2+} signaling by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate diffusion and gradients. *J Biol Chem* 275:38687.
189. Churchill, G. C. und A. Galione. 2001. NAADP induces Ca^{2+} oscillations via a two-pool mechanism by priming IP_3 - and cADPR-sensitive Ca^{2+} stores. *Embo J* 20:2666.
190. Churchill, G. C. und A. Galione. 2001. Prolonged inactivation of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate-induced Ca^{2+} release mediates a spatiotemporal Ca^{2+} memory. *J Biol Chem* 276:11223.
191. Tregear, R. T., A. P. Dawson und R. F. Irvine. 1991. Quantal release of Ca^{2+} from intracellular stores by InsP_3 : tests of the concept of control of Ca^{2+} release by intraluminal Ca^{2+} . *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 243:263.
192. Donnadieu, E., G. Bismuth und A. Trautmann. 1992. Calcium fluxes in T lymphocytes. *J Biol Chem* 267:25864.
193. Hess, S. D., M. Oortgiesen und M. D. Cahalan. 1993. Calcium oscillations in human T and natural killer cells depend upon membrane potential and calcium influx. *J Immunol* 150:2620.
194. Maltsev, V. A., B. Wolff, J. Hess und G. Werner. 1994. Calcium signalling in individual T-cells measured by confocal microscopy. *Immunol Lett* 42:41.
195. Weismann, M., A. H. Guse, L. Sorokin, B. Broker, M. Frieser, R. Hallmann und G. W. Mayr. 1997. Integrin-mediated intracellular Ca^{2+} signaling in Jurkat T lymphocytes. *J Immunol* 158:1618.
196. Wulfiging, C., J. D. Rabinowitz, C. Beeson, M. D. Sjaastad, H. M. McConnell und M. M. Davis. 1997. Kinetics and extent of T cell activation as measured with the calcium signal. *J Exp Med* 185:1815.
197. Lewis, R. S. 2003. Calcium oscillations in T-cells: mechanisms and consequences for gene expression. *Biochem Soc Trans* 31:925.
198. De Koninck, P. und H. Schulman. 1998. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca^{2+} oscillations. *Science* 279:227.
199. Scheenen, W. J. J. M. 1998. Cytosolic calcium measurements with confocal microscopy. In *Signal transduction - single cell techniques*. B. van Dnijn und A. Wiltink, eds. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, p. 442.
200. Rudolf, R., M. Mongillo, R. Rizzuto und T. Pozzan. 2003. Looking forward to seeing calcium. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:579.
201. Egner, A., V. Andresen und S. W. Hell. 2002. Comparison of the axial resolution of practical Nipkow-disk confocal fluorescence microscopy with that of multifocal multiphoton microscopy: theory and experiment. *J Microsc* 206:24.
202. Rubart, M., E. Wang, K. W. Dunn und L. J. Field. 2003. Two-photon molecular excitation imaging of Ca^{2+} transients in Langendorff-perfused mouse hearts. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C1654.

203. Centonze, V. E. und J. G. White. 1998. Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging. *Biophys J* 75:2015.
204. Carter, K. C., D. Bowman, W. Carrington, K. Fogarty, J. A. McNeil, F. S. Fay und J. B. Lawrence. 1993. A three-dimensional view of precursor messenger RNA metabolism within the mammalian nucleus. *Science* 259:1330.
205. Russ, J. C. 2000. *The image processing handbook - 2nd edition*. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.
206. Verveer, P. J. 1998. Computational and optical methods for improving resolution and signal quality in fluorescence microscopy. In *Physical Department*. Technical University Delft, Delft; The Netherlands.
207. Wagner, W. W., Jr. 1993. Invited editorial on "demonstration of pulmonary vascular perfusion by electron and light microscopy". *J Appl Physiol* 75:1437.
208. Thomas, D., S. C. Tovey, T. J. Collins, M. D. Bootman, M. J. Berridge und P. Lipp. 2000. A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺ signals. *Cell Calcium* 28:213.
209. Reichmann, J. 2000. *Handbook of optical filters for fluorescence microscopy*. Chroma Technology Corp, Vermont.
210. Lorenzon, P., D. Zacchetti, F. Codazzi, G. Fumagalli, J. Meldolesi und F. Grohovaz. 1995. Ca²⁺ waves in PC12 neurites: a bidirectional, receptor-oriented form of Ca²⁺ signaling. *J Cell Biol* 129:797.
211. O'Rourke, B., D. K. Reibel und A. P. Thomas. 1990. High-speed digital imaging of cytosolic Ca²⁺ and contraction in single cardiomyocytes. *Am J Physiol* 259:H230.
212. D'Andrea, P. und F. Vittur. 1995. Spatial and temporal Ca²⁺ signalling in articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 215:129.
213. Heemskerk, J. W., J. Hoyland, W. T. Mason und S. O. Sage. 1992. Spiking in cytosolic calcium concentration in single fibrinogen-bound fura-2-loaded human platelets. *Biochem J* 283:379.
214. Zimmermann, T., J. Rietdorf und R. Pepperkok. 2003. Spectral imaging and its applications in live cell microscopy. *FEBS Lett* 546:87.
215. Koch-Nolte, F., T. Duffy, M. Nissen, S. Kahl, N. Killeen, V. Ablamunits, F. Haag und E. H. Leiter. 1999. A new monoclonal antibody detects a developmentally regulated mouse ecto-ADP-ribosyltransferase on T cells: subset distribution, inbred strain variation, and modulation upon T cell activation. *J Immunol* 163:6014.
216. Grynkiewicz, G., M. Poenie und R. Y. Tsien. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440.
217. Giovannardi, S., C. Racca, L. Bertollini, E. Sturani und A. Peres. 1992. P2Y purinoceptors in normal NIH 3T3 and in NIH 3T3 overexpressing c-ras. *Exp Cell Res* 202:398.

218. Di Virgilio, F., P. Chiozzi, D. Ferrari, S. Falzoni, J. M. Sanz, A. Morelli, M. Torboli, G. Bolognesi und O. R. Baricordi. 2001. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97:587.
219. Haugland, R. P. 1996. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*, Eugene, Leiden; The Netherlands.
220. Carrington, W. A., K. E. Fogarty, L. Lifschitz und F. S. Fay. 1989. Three-dimensional imaging on confocal and wide-field microscopes. In *Confocal microscopy handbook*, Vol. Chapter 14. V. Systems, ed, p. 151.
221. Thomas, A. P. und F. Delaville. 1991. The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic free concentration in cell populations and single cells. In *Cellular calcium - a practical approach*. J. G. Mc Cormack und P. H. Cobbold, eds. Oxford University Press, New York, p. 1.
222. Poenie, M. und R. Tsien. 1986. Fura-2: a powerful new tool for measuring and imaging $[Ca^{2+}]_i$ in single cells. *Prog Clin Biol Res* 210:53.
223. Schwarzmann, N., S. Kunerth, K. Weber, G. W. Mayr und A. H. Guse. 2002. Knock-down of the type 3 ryanodine receptor impairs sustained Ca^{2+} signaling via the T cell receptor/CD3 complex. *J Biol Chem* 277:50636.
224. Bruzzone, S., S. Kunerth, E. Zocchi, A. De Flora und A. H. Guse. 2003. Spatio-temporal propagation of Ca^{2+} signals by cyclic ADP-ribose in 3T3 cells stimulated via purinergic P2Y receptors. *J Cell Biol* 163:837.
225. Yang, Z. und D. S. Steele. 2001. Effects of cytosolic ATP on Ca^{2+} sparks and SR Ca^{2+} content in permeabilized cardiac myocytes. *Circ Res* 89:526.
226. Marchant, J. S. und I. Parker. 2001. Role of elementary Ca^{2+} puffs in generating repetitive Ca^{2+} oscillations. *Embo J* 20:65.
227. Bootman, M. D., P. Lipp und M. J. Berridge. 2001. The organisation and functions of local Ca^{2+} signals. *J Cell Sci* 114:2213.
228. Knight, M. M., S. R. Roberts, D. A. Lee und D. L. Bader. 2003. Live cell imaging using confocal microscopy induces intracellular calcium transients and cell death. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C1083.
229. Boittin, F. X., N. Macrez, G. Hakl und J. Mironneau. 1999. Norepinephrine-induced Ca^{2+} waves depend on $InsP_3$ and ryanodine receptor activation in vascular myocytes. *Am J Physiol* 277:C139.
230. Mironneau, J., F. Coussin, L. H. Jeyakumar, S. Fleischer, C. Mironneau und N. Macrez. 2001. Contribution of ryanodine receptor subtype 3 to Ca^{2+} responses in Ca^{2+} -overloaded cultured rat portal vein myocytes. *J Biol Chem* 276:11257.

231. Ward, C. W., M. F. Schneider, D. Castillo, F. Protasi, Y. Wang, S. R. Chen und P. D. Allen. 2000. Expression of ryanodine receptor RyR3 produces Ca^{2+} sparks in dyspedic myotubes. *J Physiol* 525 Pt 1:91.
232. Fulceri, R., R. Rossi, R. Bottinelli, A. Conti, E. Intravaia, A. Galione, A. Benedetti, V. Sorrentino und C. Reggiani. 2001. Ca^{2+} release induced by cyclic ADP ribose in mice lacking type 3 ryanodine receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 288:697.
233. Kiselyov, K., D. M. Shin, N. Shcheynikov, T. Kurosaki und S. Muallem. 2001. Regulation of Ca^{2+} -release-activated Ca^{2+} current (I_{CRAC}) by ryanodine receptors in inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-deficient DT40 cells. *Biochem J* 360:17.
234. Guse, A. H., A. Y. Tsygankov, K. Weber und G. W. Mayr. 2001. Transient tyrosine phosphorylation of human ryanodine receptor upon T cell stimulation. *J Biol Chem* 276:34722.
235. Zheng, J. S., L. O'Neill, X. Long, T. E. Webb, E. A. Barnard, E. G. Lakatta und M. O. Boluyt. 1998. Stimulation of P2Y receptors activates c-fos gene expression and inhibits DNA synthesis in cultured cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 37:718.
236. Patel, S., G. C. Churchill und A. Galione. 2001. Coordination of Ca^{2+} signalling by NAADP. *Trends Biochem Sci* 26:482.
237. Munshi, C. B., R. Graeff und H. C. Lee. 2002. Evidence for a causal role of CD38 expression in granulocytic differentiation of human HL-60 cells. *J Biol Chem* 277:49453.
238. De Flora, A., L. Guida, L. Franco, S. Bruzzone und E. Zocchi. 2002. Subcellular and extracellular trafficking of NAD^+ and cyclic ADP-ribose: A new way for regulating intracellular calcium homeostasis. In *Cyclic ADP-ribose and NAADP: structures, metabolism and functions*. H. C. Lee, ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht ; Boston, p. 241.
239. Thomas, D., M. J. Mason und M. P. Mahaut-Smith. 2001. Depolarisation-evoked Ca^{2+} waves in the non-excitable rat megakaryocyte. *J Physiol* 537:371.
240. Leite, M. F., A. D. Burgstahler und M. H. Nathanson. 2002. Ca^{2+} waves require sequential activation of inositol trisphosphate receptors and ryanodine receptors in pancreatic acini. *Gastroenterology* 122:415.
241. Franco, L., S. Bruzzone, P. Song, L. Guida, E. Zocchi, T. F. Walseth, E. Crimi, C. Usai, A. De Flora und V. Brusasco. 2001. Extracellular cyclic ADP-ribose potentiates ACh-induced contraction in bovine tracheal smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L98.
242. Zocchi, E, M. Podesta, A. Pitto, C. Usai, S. Bruzzone, L. Franco, L. Guida, A. Bacigalupo und A. De Flora. 2001. Paracrinally stimulated expansion of early human hemopoietic progenitors by stroma-generated cyclic ADP-ribose. *Faseb J* 15:1610.

9 Veröffentlichungen/ Abstracts

Veröffentlichungen

- Schwarzmann, N., S. Kunerth, K. Weber, G. W. Mayr und A. H. Guse. 2002. Knock-down of the type 3 ryanodine receptor impairs sustained Ca^{2+} signaling via the T cell receptor/CD3 complex. *J Biol Chem* 277:50636.
- Kunerth, S., G. W. Mayr, F. Koch-Nolte und A. H. Guse. 2003. Analysis of subcellular calcium signals in T-lymphocytes. *Cell Signal* 15: 783.
- Bruzzone, S.*, S. Kunerth*, E. Zocchi, A. De Flora und A. H. Guse. 2003. Spatio-temporal propagation of Ca^{2+} signals by cyclic ADP-ribose in 3T3 cells stimulated via purinergic P2Y receptors. *J Cell Biol* 163: 837.
- Kunerth, S., M. F. Langhorst, N. Schwarzmann, X. Gu, L. Huang, Z. Yang, L. Zhang, S. J. Mills, L. Zhang, B. V. L. Potter und A. H. Guse. 2003. Amplification and propagation of pacemaker Ca^{2+} signals by cyclic ADP-ribose and the type 3 ryanodine receptor in T-lymphocytes. *J Cell Sci* 117: 2141.
- Gu, X., L. Huang, Z. Yang, L. Zhang, S. Kunerth, R. Fliegert, K. Weber, A. H. Guse und L. Zhang. 2003. A membrane-permeant cADPR mimic: synthesis and calcium-mobilizing evaluation of *N*¹-ethoxymethyl substituted cIDPR analogue in T-lymphocytes. *J Med Chem*, Manuskript eingereicht

Abstracts

- Heidbrink, S. und A. H. Guse. 2001. Analysis of subcellular Ca^{2+} signals in T cells by high resolution confocal Ca^{2+} imaging. „Scandinavian Physiological Society Meeting“, Aarhus
- Heidbrink, S. und A. H. Guse. 2002. Analysis of subcellular Ca^{2+} signals in T-lymphocytes by high resolution confocal Ca^{2+} imaging. „7th European Symposium on Calcium Signalling“, Brüssel
- Kunerth, S., F. Koch-Nolte und A. H. Guse. 2003. Analysis of subcellular calcium signals in T-lymphocytes. „Focus on Microscopy“, Genua
- Kunerth, S. und A. H. Guse. 2003. Rapid confocal imaging of subcellular calcium signals in living cells. „Focus on Microscopy“, Genua

* gleichberechtigte Autorenschaft

10 Lebenslauf

Svenja Kunerth (geb. Heidbrink)
geboren am 16. März 1975 in Bielefeld
verheiratet

Schulbildung

08/81 – 06/85 Grundschule; Herford
08/85 – 05/94 Friedrichs-Gymnasium; Herford

Hochschulbildung

10/94 – 01/01 Studium der Biotechnologie an der Technischen Universität Berlin mit dem Abschluss als Diplom Ingenieur für Biotechnologie
04/00 – 01/01 Diplomarbeit mit dem Thema „Analyse intrazellulärer Calcium-Signale in T-Lymphozyten durch hoch-auflösende, bildgebende Verfahren“ am Institut für Zelluläre Signaltransduktion an der Universität Hamburg (Arbeitskreis Prof. Guse)

Auslandsaufenthalt

07/97 – 10/97 3-monatiger Aufenthalt an der Napier University in Edinburgh/ Schottland zur Anfertigung einer Studienarbeit im Fachgebiet Technische Biochemie im Rahmen eines ERASMUS-Stipendiums

Praktika

07/94 – 08/94 6-wöchiges Praktikum im chemisch- technischen und im mikrobiologischen Labor der Brauerei Felsenkeller; Herford
03/95 3-wöchiges Praktikum im Bereich der Abwasseranalytik der Kläranlage Heepen
03/96 3-wöchiges Praktikum im Bereich der verfahrenstechnischen Industrie; FMC-Fiedler Motoren; Aken/ Elbe
08/99 – 10/99 3-monatiges Praktikum in der Abteilung Wirkstoffforschung der AnalytiCon AG; Potsdam (Isolierung von Naturstoffen per HPLC)

Promotion

02/01 – 02/04 Doktorandin am Institut für Zelluläre Signaltransduktion der Universität Hamburg (Arbeitskreis Prof. Guse) mit dem Ziel der Analyse subzellulärer Ca^{2+} -Signale in T-Lymphozyten und 3T3 Fibroblasten unter Nutzung der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie
05/03 – 10/03 Betreuung biochemischer Praktika für Mediziner
