

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen

Abteilung Physiologie I

Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. F. Lang

**Mechanismus der Hemmung von CRAC-Kanälen im Rahmen
CD95-vermittelter Apoptose**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Johannes Eugen Berschauer
aus
Ochsenhausen**

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

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

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Oßwald

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Immunologische Grundlagen.....	1
1.1.1.	Das spezifische Immunsystem	1
1.1.2.	Der T-Zell-Rezeptor-Signalweg.....	3
1.1.3.	Aktivierungsinduzierter Zelltod - die Rolle des CD95-Systems	6
1.1.4.	Weitere mögliche Funktionen von CD95	7
1.2	Der programmierte Zelltod (Apoptose).....	8
1.2.1.	Die physiologische Bedeutung der Apoptose.....	8
1.2.2.	Ablauf und Regulation der Apoptose	9
1.2.3.	Der Mechanismus der CD95-vermittelten Apoptose	11
1.2.4.	Mitochondrien im Ablauf der Apoptose.....	13
1.2.5.	Eigenschaften und Funktion von Bcl-2	15
1.3	Speicheroperierte Calcium-Kanäle.....	17
1.4	CD95-vermittelte Hemmung von CRAC-Kanälen.....	20
1.5	Fragestellung.....	20
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Verwendete Chemikalien und Lösungen.....	22
2.1.1.	Bezugsquellen.....	22
2.1.2.	Ringer-Lösungen	22
2.1.3.	Thapsigargin	23
2.1.4.	Ionomycin.....	23
2.1.5.	Anti-CD95-Antikörper	23
2.2	Zellkultur.....	24
2.2.1.	Zelllinie.....	24
2.2.1.	Kulturbedingungen	24
2.3	Überexpression von Bcl-2.....	25
2.3.1.	Vektoren	25
2.3.2.	Transfektion.....	25
2.4	Nachweis der Expression von Bcl-2 durch SDS-PAGE und Western-Blot	26
2.4.1.	Prinzip.....	26
2.4.2.	Materialien.....	26
2.4.3.	Vorgehensweise.....	28
2.5	Konfokale Mikroskopie.....	29
2.5.1.	Vorteile	29
2.5.2.	Prinzip.....	29
2.5.3.	Technische Daten	30
2.5.3.	Nachweis der intrazellulären Lokalisation von Bcl-2	30
2.5.4.	Herstellung der Präparate	31
2.6	Fluoreszenzmikroskopie und Video-Imaging.....	32
2.6.1.	Prinzip.....	32
2.6.2.	Calcium-Messung mit Fura-2.....	32
2.6.3.	Aufbau der Messapparatur	35
2.6.4.	Präparation und Messung der Zellen.....	36

2.7	<i>Durchflusszytometrie (FACS)</i>	36
2.7.1	Prinzip.....	36
2.7.2	Ratiometrische Calcium Messung mit dem FACS.....	37
2.7.3	Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$	39
2.7.4	pH-Messung per FACS	40
2.8	<i>statistische Auswertung</i>	41
3	Ergebnisse	42
3.1	<i>Sicherung der Methoden</i>	42
3.1.1	Überexpression von Bcl-2-Varianten in transfizierten Jurkat-Zellen.....	42
3.1.2	Nachweis der intrazellulären Lokalisation der Bcl-2 Varianten	43
3.1.3	Die verschiedenen Mutanten unterscheiden sich nicht in der intrazellulären H ⁺ -Ionenkonzentration.....	43
3.2	<i>Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$</i>	46
3.2.1	CCCP führt zu einem Zusammenbruch von $\Delta\Psi_m$	46
3.2.2	Überexpression von Bcl-2 verhindert den Zusammenbruch von $\Delta\Psi_m$	46
3.3	<i>Calcium-Messungen</i>	49
3.3.1	Eichung der Calcium-Messungen.....	49
3.3.2	Zeitverlauf des Calcium-Signales.....	50
3.3.3	Die verschiedenen Bcl-2-Mutanten unterscheiden sich nicht im Calcium-Signal vor CD95-Rezeptor-Stimulation.	52
3.3.4	Bcl-2 schützt vor CD95-vermitteltem CRAC-Block in Abhängigkeit von seiner intrazellulären Lokalisation.....	52
3.4	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse</i>	57
4	Diskussion	58
4.1	<i>Die physiologische Bedeutung der CD95-vermittelten Hemmung von CRAC-Kanälen</i>	58
4.2	<i>Der Mechanismus des CRAC-Blocks</i>	59
4.3	<i>Mitochondrien und Calcium</i>	61
4.4	<i>Bcl-2 und Calcium</i>	62
4.5	<i>Bcl-2 und Mitochondrien</i>	62
5	Zusammenfassung	65
6	Literaturverzeichnis	66
7	Danksagung	79
8	Lebenslauf	80

1 Einleitung

1.1 *Immunologische Grundlagen*

1.1.1. Das spezifische Immunsystem

Das spezifische Immunsystem zeichnet sich durch eine erstaunliche Leistungsfähigkeit in der Abwehr von Erregern aus, die dem Körper bis dahin nicht bekannt sein konnten. Es ist in der Lage, Antigene als fremd und potentiell schädlich zu erkennen, mit denen der Organismus bis dahin nicht konfrontiert wurde und die möglicherweise in der Evolution neu aufgetreten sind. Es unterscheidet sich dadurch grundsätzlich vom hauptsächlich von Granulozyten und dem Komplementsystem getragenen unspezifischen Immunsystem. Das Prinzip, das dieser Leistungsfähigkeit zugrunde liegt, ist die Antizipation von Antigen und die klonale Selektion von Immunzellen. Die Lymphozyten der T-Zell-Reihe und der B-Zell-Reihe erfahren postmitotisch eine Vielzahl von zufälligen genomischen Mutationen im Bereich der für einen Antigen-Rezeptor codierenden DNA. Durch die zufällige Rekombination können theoretisch bis zu 10^{11} verschiedene Antigenrezeptoren entstehen (Davis und Bjorkman, 1988). Durch diese hohe Zahl wartet praktisch auf jedes denkbare Antigen bereits ein Lymphozyt im Körper, der bei Aktivierung durch das Antigen in die Mitose eintritt und sich klonal vermehrt. Diese Vermehrung dient sowohl der Abwehr der akuten Bedrohung wie auch der Ausbildung von Gedächtniszellen, sollte derselbe Erreger noch einmal auftauchen. Die zufällige Rekombination der Antigenrezeptoren birgt natürlich die Gefahr der Entstehung autoreaktiver Lymphozyten. Dieser Gefahr wird durch Selektion der Lymphozyten im Prozess der Reifung begegnet. Autoreaktive Lymphozyten werden dabei genauso eliminiert wie Lymphozyten mit sinnlosen Mutationen. Die Reifung findet im Falle der T-Lymphozyten im Thymus, im Falle der B-Lymphozyten im Knochenmark statt. Trotz dieser Selektion sind Kontrollschritte im Laufe der Aktivierung eines Lymphozyten unbedingt erforderlich. So sind B-Lymphozyten, die durch Produktion von Antikörpern die Träger der spezifischen humoralen Immunität sind, auf die Unterstützung von T-Lymphozyten angewiesen, bevor sie mit der Produktion von Antikörpern beginnen können.

B-Lymphozyten verfügen über einen eigenen Antigenrezeptor, bei dem es sich im Wesentlichen um einen membranständigen Antikörper handelt. Damit wäre der B-Lymphozyt selbstständig in der Lage, Antigen zu erkennen. Die Bindung des

spezifischen Antigens reicht aber nicht aus, um die Aktivierung des B-Lymphozyten einzuleiten. Die Aktivierung findet erst statt, nachdem das Antigen auch von T-Lymphozyten als fremd erkannt wurde.

T-Lymphozyten sind im Gegensatz zu B-Lymphozyten nicht in der Lage, freies Antigen selbstständig zu erkennen. Vielmehr muß das Antigen den T-Lymphozyten von anderen Zellen mit Hilfe des Major-histocompatibility-Komplexes (MHC) dargeboten werden. MHC-Komplexe sind membranständige Proteine mit einer Bindungsstelle für Peptidfragmente eines Antigens. Es gibt zwei in Funktion und Struktur verschiedene Varianten: MHC-I wird von allen kernhaltigen Zellen exprimiert. MHC-II findet sich nur auf Zellen des Immunsystems.

Mit Hilfe von MHC-I werden Abbauprodukte intrazellulärer Proteine präsentiert. Auf diese Weise können intrazelluläre Erreger wie Viren oder intrazelluläre Bakterien dem Immunsystem bekannt gemacht werden. Aber auch Mutationen im Genom der Zelle und damit potentiell malignes Wachstum führen zu abnormen Proteinabbauprodukten, die über MHC erkannt werden können. Für die Erkennung von Antigen über MHC-I sind CD8-tragende sogenannte zytotoxische T-Lymphozyten (T_C) verantwortlich. Diese sind in der Lage mit Hilfe von Perforinen Poren in einer Zielmembran zu erzeugen und so von Erregern befallene oder maligne entartete Körperzellen zu töten.

MHC-II dient dagegen der Bindung von phagozytiertem Antigen. Nach der Phagozytose wird Antigen in den Lysosomen in Peptidfragmente zerlegt, bindet an MHC-II-Moleküle, die dann beladen mit Antigen in die Zellmembran geschleust werden. Zellen des Immunsystems, insbesondere Makrophagen, die in der Lage sind, diesen Vorgang durchzuführen, werden der Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen (APZ) zugerechnet. Derartig prozessiertes Antigen kann nun von CD4-tragenden sogenannten Helfer-T-Lymphozyten (T_H) erkannt werden. Eine T_H -Zelle, der so ihr spezifisches Antigen präsentiert wird, reagiert u.a. mit der Bildung von Zytokinen, darunter Interleukin 2 (IL-2) und Proliferation.

Aktivierte T_H -Lymphozyten sind für die Ausbildung einer Immunantwort essentiell wichtig, wie man an der Schwere des Krankheitsbildes AIDS erkennen kann, bei dem die Zahl der CD4-tragenden Zellen deutlich verringert ist. Im Folgenden soll der Signalweg von der Antigen-Erkennung über den T-Zell-Rezeptor zum aktivierten T_H -Lymphozyten näher dargestellt werden.

1.1.2 Der T-Zell-Rezeptor-Signalweg

Bei der Aktivierung einer T-Zelle durch fremdes Antigen kommt es zunächst zur Ausbildung eines TCR/CD3-Komplexes. Die polymorphen α - und β -Untereinheiten des TCR haben zu kurze zytoplasmatische Anteile, um das Signal nach intrazellulär weiterzuleiten. Diese Aufgabe übernehmen die Untereinheiten γ -, δ -, ϵ von CD3 und die Untereinheit ζ (Weiss und Littman, 1994). Der CD3-Komplex und die ζ -Kette enthalten mehrere „immunoreceptor tyrosine-based activation motifs“ (ITAMs) in ihrer zytoplasmatischen Domäne, die es dem Komplex erlauben, mit mehreren Protein Tyrosin Kinasen (PTKs) zu interagieren. Bei diesen PTK handelt es sich um die der src-Familie angehörigen Kinasen fyn und insbesondere Lck. Die PTK phosphorylieren die ITAMs der ϵ - und ζ -Ketten von CD3, woraufhin sich eine weitere PTK mit dem Namen ZAP-70 anlagert und zur Stabilisierung des Komplexes beiträgt (Acuto und Cantrell, 2000).

Der nun tyrosinphosphorylierte TCR/CD3-Komplex setzt zwei Schlüsselereignisse der T-Zell-Aktivierung in Gang. Dies ist zum einen die Aktivierung des Signalnetzwerkes der GTPasen der Ras- und der Rho-Familie, zum anderen die Regulation des Inositol-Phospholipid Stoffwechsels.

Unter den Angehörigen der Ras-Familie ist hier vorwiegend p21ras zu nennen. Es handelt sich um ein guaninnukleotid-bindendes Protein mit intrinsischer GTPase Aktivität. Nach der Aktivierung der T-Zelle häuft sich schnell die aktive GTP-gebundene von ras in der Zelle an. Die Funktion von ras ist für die Induktion von Genen für Zytokine erforderlich (Genot et al., 1996).

Durch Kopplung an den TCR/CD3-Komplexe wird die Phospholipase C Gamma 1 (PLC γ 1) aktiviert. Die PLC γ 1 hydrolysiert Phosphatidylinositol-(4,5)-Biphosphat (PI(4,5)P $_2$) in Inositol-1,4,5-triphosphate (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG) (Mustelin et al., 1990). Die Metaboliten dieser Reaktion, IP $_3$ und DAG, sind wichtige Signalmoleküle im weiteren Verlauf der T-Zell-Aktivierung. So aktiviert Diacylglycerol die Proteinkinase C (PKC) und ras-abhängige Signalwege (Quian und Weiss, 1997). Das Signalmolekül IP $_3$ führt zu einem deutlichen Anstieg der zytosolischen Calcium-Konzentration. IP $_3$ bindet an den IP $_3$ -Rezeptor an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Dadurch werden Calcium-Kanäle im ER geöffnet und im ER

gespeichertes Calcium wird ins Zytosol freigesetzt (Imboden und Stobo, 1985). Es kommt zu einem transienten, schnellen Anstieg des zytosolischen Calciums. Die Entleerung des intrazellulären Calcium-Speicher ER führt über einen noch zu diskutierenden Mechanismus zum Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum und damit zu anhaltend hohen Calcium-Konzentrationen im Zytosol (Berridge, 1993). Calcium ist einer der bedeutendsten Botenstoffe im Rahmen der T-Zell-Aktivierung (Lewis, 2001). Über 1-2 Stunden anhaltend hohe zytosolische Calcium-Konzentrationen sind für die Bildung von Interleukin-2 (IL-2) erforderlich, dem wichtigsten Zytokin der T-Lymphozyten (Negulescu et al., 1994). Die Bildung von IL-2 wird neben AP-1, NF κ B und Oct-1 von dem Transkriptionsfaktor nuclear factor activated T-Cell (NFAT) reguliert. In ruhenden T-Zellen ist NFAT im Zytosol lokalisiert. Unter dem Einfluß von Calcineurin transloziert NFAT in den Zellkern und wird dort als Transkriptionsfaktor aktiv (Rao et al., 1997). Dieser Vorgang ist abhängig von der Bindung von Calcium an Calmodulin und findet nur bei hohen intrazellulären Calcium-Konzentrationen statt (Liu et al., 1991; Timmermann et al., 1996) (vgl. auch Abb. 1). Die Bedeutung dieses Signalweges wird durch die immunsuppressive Wirkung der Pharmaka Cyclosporin A und FK506 unterstrichen. Cyclosporin A und FK506 binden zytosolisches Calcineurin, unterbrechen damit den Calciumabhängigen Signalweg und unterbinden so die Bildung von Interleukin-2 (Liu et al., 1991). Damit wird auch die weitere Aktivierung des Immunsystems durch T-Lymphozyten verhindert. Cyclosporin A wird erfolgreich zur Verhinderung der Transplantatabstoßung bei Organtransplantationen eingesetzt.

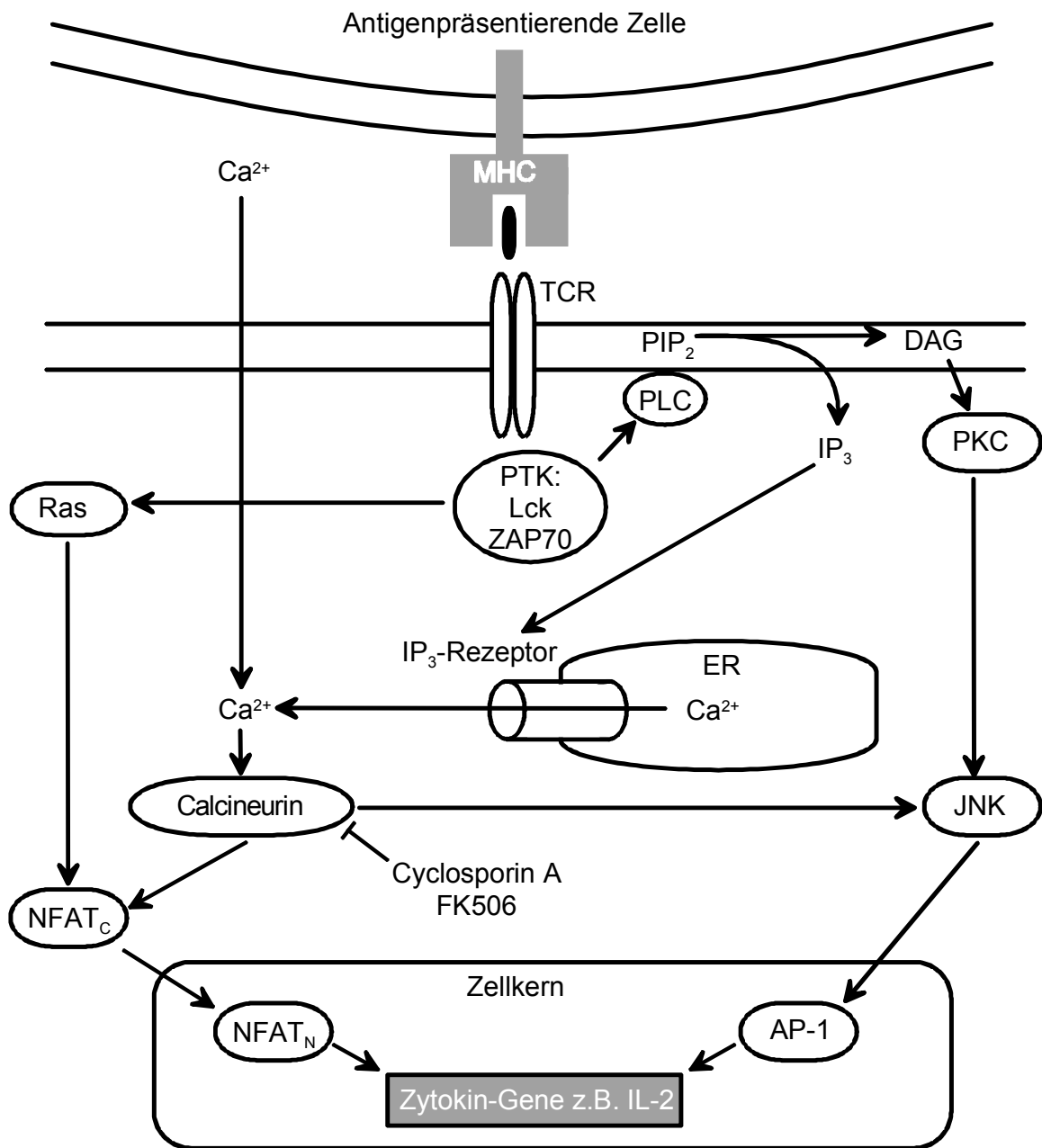


Abbildung 1: wichtige Signalwege der T-Zell-Aktivierung. Abkürzungen: DAG – Diacylglycerol, ER – Endoplasmatisches Retikulum, IP₃ – Inositoltriphosphat, JNK – Jun-Kinase, MHC – Major histocompatibility complex, NFAT_{C/N} – Nuclear factor activated t-cell (C – zytosolische / N – nukleäre Lokalisation), PIP₂ – Phosphoinositoldiphosphat, PTK – Proteintyrosinkinase, TCR – T-Zell-Rezeptor

1.1.3 Aktivierungsinduzierter Zelltod - die Rolle des CD95-Systems

Im Ablauf der Immunreaktion entsteht durch Zellproliferation eine erhebliche Anzahl von aktivierten Lymphozyten, die nach Beseitigung des Pathogens nicht mehr erforderlich ist. Die Notwendigkeit der Begrenzung der Immunreaktion durch Stopp der Zellproliferation liegt auf der Hand. Ebenso müssen überschüssige aktivierte Lymphozyten eliminiert werden. Die Ausnahme hierzu bilden diejenigen Lymphozyten, die als sogenannte Memory-Zellen das immunologische Gedächtnis bilden. Die überwiegende Anzahl der Lymphozyten, die nicht zu Memory-Zellen werden, wird durch einen Vorgang beseitigt, der als aktivierungsinduzierter Zelltod bezeichnet wird (Lenardo et al., 1999). Diese Zellen bringen sich nach einigen Tagen selbst um. Sie sterben einen sogenannten programmierten Zelltod (Apoptose). Die Signale für den Eintritt in die Apoptose werden überwiegend von dem Liganden des CD95-Rezeptors (FasL) und dem Tumor Nekrose Faktors (TNF) vermittelt (Zheng et al., 1995). Diese Zytokine werden in IL-2 stimulierten Zellen, also in aktivierten T-Lymphozyten, stark induziert (Zheng et al., 1998).

Der CD95-Rezeptor (Fas, APO-1) ist ein Mitglied der Rezeptoren der TNF-Familie. Stimulation des CD95-Rezeptors durch FasL aktiviert in der Zelle eine Signalkaskade, die mit dem apoptotischen Tod der Zelle endet (Dhein et al., 1995). Die Bedeutung des CD95-Systems für die Eindämmung der Immunantwort wird deutlich, wenn man die Folgen eines nicht funktionierenden CD95-System betrachtet. Es gibt hierfür zwei Mausmodelle: Dem Stamm der *lpr*-Mäuse (Lymphoproliferation) fehlt ein funktioneller CD95-Rezeptor (Russel et al., 1993). In *gld*-Mäusen (Generalized Lymphoproliferative Disease) liegt eine Mutation im CD95-Liganden vor (Takahashi et al., 1994). In beiden Fällen entsteht ein Krankheitsbild, das dem systemischen Lupus erythematodes beim Menschen ähnelt. Es kommt zu einer massiven Lymphadenopathie, Splenomegalie und der Entwicklung von Autoantikörpern mit verschiedensten Zeichen einer Autoimmunerkrankung wie Glomerulonephritis und Polyarthritis. Auch beim Menschen existiert mit dem autoimmunen lymphoproliferativen Syndrom (ALPS) oder Canale-Smith-Syndrom ein Krankheitsbild, das durch einen Defekt des CD95-Systems erklärt wird. Die Symptome des ALPS gleichen denen des Mausmodells (Theofilopoulos und Dixon, 1993).

1.1.4 Weitere mögliche Funktionen von CD95

Das CD95-System hat neben seiner Rolle beim aktivierungsinduzierten Zelltod noch weitere Funktionen. So verwenden CD8⁺ T_Z-Zellen den CD95-Liganden zur Abtötung von körpereigenen Zellen, die als schädlich erkannt wurden (Nagata, 1997).

CD95/CD95L wird außerdem als wichtiger Mechanismus bei der Ausbildung von immunprivilegierten Geweben im Körper diskutiert. In Geweben wie Auge, Testes und dem zentralen Nervensystem würde eine Entzündungsreaktion mehr Schaden als Nutzen anrichten. Zellen dieser Gewebe exprimieren deshalb den CD95-Liganden, um eventuell angreifende Lymphozyten durch Stimulation ihres CD95-Rezeptors auszuschalten (Griffith et al., 1995). Die Effektivität dieser Methode zeigt sich daran, dass bei der Transplantation von Cornea-Gewebe beim Menschen weder eine HLA-Typisierung noch eine immunsuppressive Therapie erforderlich ist, um eine Abstoßung des Transplantats zu verhindern (Stuart et al., 1997).

Auch in Tumorgeweben wird CD95-Ligand exprimiert. Diese Eigenschaft wurde insbesondere bei Melanomen (Hahne et al., 1996), hepatozellulären Karzinomen, Adenokarzinomen des Magens und Ösophaguskarzinomen gefunden. Unter dem Einfluß von zytotoxischen Pharmaka im Rahmen einer Chemotherapie (z.B. mit Bleomycin, Cis-Platin, Etoposid) wird in Tumorzellen eine verstärkte Expression von CD95L induziert (Friesen et al., 1996). Solche Tumorzellen entwickeln unter dem Selektionsdruck eine Resistenz gegenüber CD95-vermittelten Todessignalen wie sie von CD8⁺T_Z-Lymphozyten ausgehen, die Tumorzellen als körperfremd erkannt haben. Sie entziehen sich dadurch der Eliminierung durch das Immunsystem. Vergleichbar mit dem Mechanismus in immunprivilegierten Geweben sind sie prinzipiell auch in der Lage angreifende, sogenannte tumorinfiltrierende, Lymphozyten (TIL) durch Stimulation deren CD95-Rezeptoren zu töten oder zumindest zu inaktivieren. Entsprechend der Situation im Tumorgewebe wurde hierfür der Begriff des „tumor counterattack“ geprägt. Die klinische Relevanz des „tumor counterattack“ ist noch unklar (Igney et al., 2000). Sollte die Theorie aber zutreffen, wäre dies von klinischer Bedeutung. Zum einen stellt der „tumor counterattack“ ein Problem bei der Entwicklung therapeutischer Strategien dar, die das Immunsystem des Patienten gegen den Tumor unterstützen sollen. Eine Impfung gegen Tumorantigen wird durch die

Fähigkeit des Tumors, angreifende Lymphozyten abzutöten, erschwert. Zum anderen bietet sich der CD95-Rezeptor als rationelles Ziel einer therapeutischen Intervention an. Weiterhin wurde versucht, die Eigenschaften von CD95 für die Transplantationsmedizin nutzbar zu machen. Die Überlegung, z.B. Diabetes mellitus durch Transplantation von pankreatischem Inselzellgewebe zu therapieren, das durch Expression eines CD95-Liganden vor der Abstoßung geschützt ist, ist nach den bisherigen Überlegungen durchaus plausibel. Leider scheiterten entsprechende Versuche an der Ausbildung einer Entzündungsreaktion durch Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten durch CD95 exprimierende Transplantate (Kang et al., 1997). Letzteres führte dazu, dass das Konzept des tumor counterattack in Frage gestellt wurde.

1.2 Der programmierte Zelltod (Apoptose)

1.2.1 Die physiologische Bedeutung der Apoptose

In mehrzelligen Lebewesen entstehen häufig Situationen, in denen körpereigene Zellen überflüssig geworden sind oder gefährlich für den Organismus zu werden drohen. Beispiele hierfür finden sich im Rahmen der Embryogenese (Trauth et al., 1989), bei Aufrechterhaltung der Homöostase beim Zellumsatz, der Reifung des Immunsystems, der bereits erwähnten Begrenzung einer Immunantwort, aber auch bei virusinfizierten Zellen und der Entstehung von malignen Tumoren. In all diesen Fällen müssen Zellen, möglichst ohne allzu großen Schaden in ihrer Umgebung anzurichten, eliminiert werden. Deshalb besitzen alle Zellen die genetische Ausstattung zur Durchführung eines geordneten Suizids. Da hierbei ein endogenes Selbstmordprogramm aktiviert wird, wird diese Form auch als programmierter Zelltod oder Apoptose bezeichnet.

Im Gegensatz zur anderen Form des Zelltodes, der Nekrose, ist die Apoptose ein aktiver und damit energieaufwendiger Prozess. Nekrose ist ein passiver Vorgang, der dann abläuft, wenn eine Zelle durch exogene Noxen wie Hypoxie, Hyperthermie, Toxine, Erreger, etc. so stark geschädigt wird, dass es ihr nicht mehr möglich ist, in kontrollierter Weise zu sterben. Es kommt zur Freisetzung von intrazellulären Proteinen und damit zur Ausbildung einer Entzündungsreaktion, die angrenzendes Gewebe gefährdet und den Organismus belastet. Im Unterschied hierzu wird bei der Apoptose diese Entzündungsreaktion vermieden, indem sämtliches intrazelluläres Material in

Membranvesikel verpackt wird, die von benachbarten Zellen oder Makrophagen phagozytiert und abgebaut werden (Krammer, 2000).

Entsprechend der Funktion der Apoptose können selbst geringfügige Störungen bereits schwerwiegende Erkrankungen hervorrufen. Ein Mangel an Apoptose begünstigt die Entstehung von Krebs und Autoimmunerkrankungen. Als Beispiel hierfür sei das Li-Fraumeni-Syndrom genannt, bei dem eine Mutation im Tumorsuppressorgen p53 vorliegt. Die Funktion von p53 besteht in der Einleitung der Apoptose als Reaktion auf Schäden an der genomischen DNA, wodurch potentiell maligne Zellen beseitigt werden. Entfällt diese Sicherung wie beim Li-Fraumeni-Syndrom kommt es bereits im Kindesalter zum Auftreten solider Tumoren (Fisher, 2001).

Demgegenüber wird ein Zuviel an Apoptose als Ursache der Neurodegeneration bei der Alzheimer'schen Erkrankung und multipler Sklerose diskutiert (D'Souza et al., 1996).

1.2.2 Ablauf und Regulation der Apoptose

Der zeitliche Ablauf der Apoptose ist durch eine Reihe von Veränderungen gekennzeichnet. Die Zelle schrumpft, es kommt zu einer Kondensation des Chromatins, das meist in der Peripherie des Zellkerns aggregiert. Die genomische DNA wird durch Endonukleasen in Fragmente von ca. 200 Basenpaaren zerlegt. An der Zellmembran kommt es zu Membranausstülpungen (Zeiosis), die schließlich abgeschnürt werden und als apoptotische Körperchen bezeichnet werden. Diese Phase der Apoptose wird als Effektorphase bezeichnet. Sie wird durch die Aktivierung von sogenannten Caspasen eingeleitet. Caspasen sind Proteasen, die ihren Namen einem Cystein im aktiven Zentrum und ihrer Eigenschaft, spezifisch nach einem Aspartat zu spalten, verdanken. Es wurden bislang mindestens 14 verschiedene Caspasen identifiziert (Alnemri et al., 1996). Die Aufgabe dieser Caspasen ist nicht einheitlich. Man unterscheidet Caspasen mit Initiator- und Effektor-Funktion. Andere sind nur an der Ausbildung einer Entzündungsreaktion beteiligt. Effektor-Caspasen sind durch Spaltung von Strukturproteinen an der Reorganisation der zellulären Morphologie beteiligt und aktivieren indirekt die beschriebenen Endonucleasen.

Es gibt eine Vielzahl von Stimuli, die letztendlich zur Aktivierung von Caspasen und damit zur Durchführung des apoptotischen Programms führen. Hierzu zählen Wachstumsfaktorentzug, intrazellulärer Calcium-Anstieg, DNA-Schäden, virale

Infektionen, Chemotherapeutika, Prooxidantien, Toxine und die Stimulation von proapoptotischen Rezeptoren (Susin et al., 1998). Während die Signaltransduktionswege, über die alle diese verschiedenen Auslöser zur Apoptose führen, sehr unterschiedlich sind, münden sie doch alle in eine gemeinsame Endstrecke. Vor Eintritt in die Effektorphase finden sich nochmals strenge Regulationsmechanismen. Wichtige Moleküle der Caspasen-Aktivierung und deren Regulation wurden durch Studien an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) gefunden. Der Mechanismus der Apoptose ist über die Entwicklungsgeschichte streng konserviert (Steller, 1995). So fanden sich auch beim Säuger jeweils entsprechende Moleküle, die in Tabelle 1 aufgeführt sind.

<i>C. elegans</i>	Säuger
CED-3	interleukin-1 β -converting enzyme(ICE) oder Caspase-1
CED-4	Apoptotic Protease-Activating Factor-1(Apaf-1)
CED-9	Bcl-2
EGL-1	Bik

Tabelle 1: In der Steuerung der Apoptose bedeutsame Proteine des Nematoden C. elegans und ihre Homologen beim Säuger (Conradt und Horvitz HR, 1998; Ellis und Horvitz, 1986).

CED-3 ist eine Caspase und leitet bei *C. elegans* die Effektorphase der Apoptose ein. Das strukturell homologe Protein ICE ist beim Säuger der Prototyp der Caspasen. Es hat selbst allerdings keine offensichtliche Rolle in der Apoptose. Funktionell entsprechen CED-3 eher Caspase-9 und Caspase-8 (Thornberry und Lazebnik, 1998).

CED-4/Apaf-1 ist ein wichtiges Regulatorprotein in der Apoptosemaschinerie. Apaf-1 bildet mit Cytochrom c und ATP einen Komplex, der als „Apoptosom“ bezeichnet wird (Zou et al., 1997). Das Apoptosom aktiviert Caspase-9, die wiederum Effektor-Caspasen wie Caspase-3 aktiviert. Cytochrom c wird im Laufe der Initiator-Phase aus den Mitochondrien der Zelle freigesetzt (Liu et al., 1996). Dies ist ein Hinweis auf die bedeutende Rolle der Mitochondrien im Signalweg der Apoptose, die noch gesondert erläutert werden soll.

CED-9/Bcl-2 ist wesentlich an der Regulation der Apoptose beteiligt. Im Gegensatz zu den bisher genannten Proteinen verhindert CED-9/Bcl-2 aber das Fortschreiten der Aktivierungskaskade. EGL-1/Bik ist strukturell mit CED-9/Bcl-2 verwandt, stellt aber funktionell einen Gegenspieler dar, indem es der hemmenden Wirkung von CED-9/Bcl-2 entgegenwirkt (Conradt und Horvitz HR, 1998).

1.2.3 Der Mechanismus der CD95-vermittelten Apoptose

Zu den wichtigsten Auslösern von Apoptose zählt die Stimulation von sogenannten Todesrezeptoren in der Zellmembran. Bei den Todesrezeptoren handelt es sich um Transmembranproteine, die einer Subfamilie der Tumornekrosefaktor(TNF)/Nerve growth factor (NGF) Superfamilie angehören. Zu den bedeutendsten Vertretern zählen der TNF-R1- und der CD95-Rezeptor. Der CD95-Rezeptor wurde 1989 erstmals beschrieben (Itoh et al., 1991; Trauth et al., 1989). Seine biologische Bedeutung u.a. beim aktivierungsinduzierten Zelltod wurde bereits erwähnt.

Die Stimulation des CD95-Rezeptors durch seine spezifischen Liganden (CD95L) oder durch agonistische Antikörper führt zur Ausbildung eines homotrimeren Komplexes aus einzelnen CD95-Proteinen. Die intrazelluläre Domäne des aktivierten Rezeptors wird als Todesdomäne (DD, Death Domain) bezeichnet. An diese Todesdomäne lagert sich das Adapterprotein FADD (Fas-Associating Protein with Death Domain, auch MORT1) mit seiner Todesdomäne an (Chinnaiyan et al., 1995). FADD verfügt über eine sogenannte Todeseffektordomäne (DED, Death effector domain), mit der es wiederum die Pro-Caspase-8 (FLICE – Fas linked interleukin converting enzyme, MACH oder MCH5) bindet, (Boldin et al., 1996) wodurch der DISC-Komplex (Death inducing signaling complex) ausgebildet wird (Kischkel et al., 1995). Im DISC wird Pro-Caspase-8 autoproteolytisch zu der aktiven Caspase 8 gespalten. Mit der Aktivierung von Caspase-8 wird die Caspasen-Kaskade in Gang gesetzt.

Die Ausbildung von DISC scheint nicht in allen Zelltypen gleich stark ausgeprägt zu sein. Dies führte zu der Unterscheidung zwischen Typ I und Typ II Zellen. In Typ I Zellen findet eine so starke Aktivierung von Caspase-8 durch DISC statt, dass die Caspasen-Kaskade direkt angeregt werden kann. In Typ II Zellen hingegen ist die Bildung von aktiver Caspase-8 nicht ausreichend (Scaffidi et al., 1999). In diesen Zellen wird ein Verstärkungsmechanismus notwendig, in den der mitochondriale Weg der

Apoptose eingebunden ist. Zur Aktivierung des mitochondrialen Wegs kommt es über die Spaltung von Bid durch die in geringen Mengen gebildete Caspase-8. Bid ist ein proapoptotisch wirkendes Mitglied der Bcl-2 Familie (Li et al., 1998). Der mitochondriale Weg führt über Caspase-9 ebenfalls in die Effektor-Phase der Apoptose. Im Gegensatz zur direkten Aktivierung der Caspasen-Kaskade über Caspase-8 ist der mitochondriale Weg durch Überexpression von Bcl-2 hemmbar (Scaffidi et al., 1999). So wurden Typ II Zellen als solche Zellen definiert, bei denen nach CD95-Stimulation die Apoptose durch die Überexpression von Bcl-2 verhindert werden kann (vgl. auch Abb. 2)

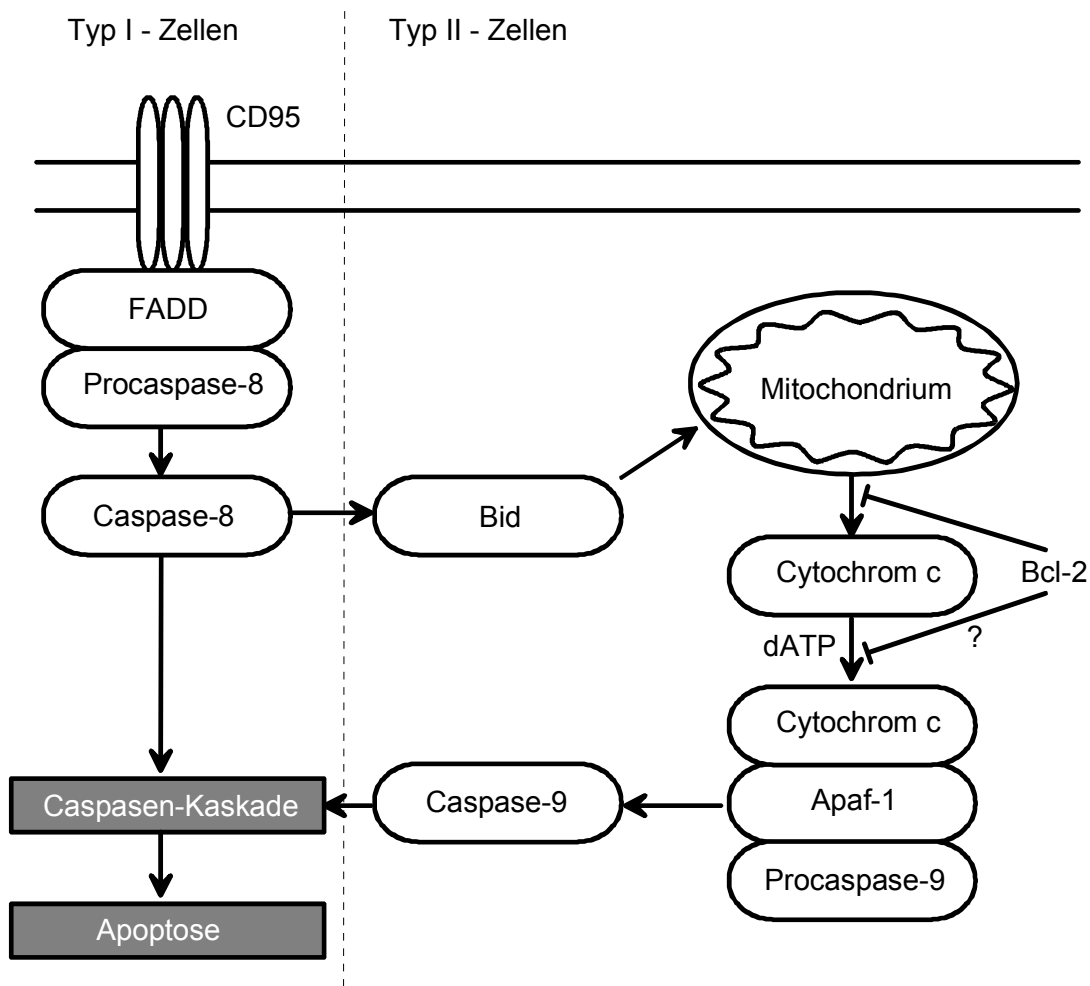


Abbildung 2: Signalwege der CD95-vermittelten Apoptose in Typ I- und Typ II-Zellen.

Es existieren noch eine Reihe weniger gut belegter Hypothesen über weitere Signalwege, die durch CD95 in Gang gesetzt werden können. So bindet Daxx ebenfalls an die Todesdomäne von CD95, wodurch die stress-aktivierte c-Jun NH₂-terminale Kinase (JNK) aktiviert wird (Yang et al., 1997). Auch die Bindung von RAIDD an die DD von CD95 soll die Caspasen-Kaskade auslösen können (Duan und Dixit, 1997). Weiterhin wird über einen noch unbekanntem Mechanismus durch CD95 die saure Sphingomyelinase (ASM) aktiviert, die Sphingomyelin aus der Zellmembran in Phosphorylcholin und den second messenger Ceramid spaltet. Das freigesetzte Ceramid ist imstande, den mitochondrialen Weg der Apoptose zu aktivieren (García-Ruiz et al., 1997).

1.2.4 Mitochondrien im Ablauf der Apoptose

In den letzten Jahren hat sich immer deutlicher eine zentrale Rolle der Mitochondrien bei der Apoptose herauskristallisiert (Susin et al., 1998). Zu dieser Erkenntnis haben u.a. folgende Beobachtungen geführt: Noch vor den klassischen Zeichen der Apoptose bricht das Membranpotential der inneren Mitochondrienmembran ($\Delta\Psi_m$) zusammen. Es kommt zur Freisetzung von Intermembranproteinen, die im Zytosol Caspasen aktivieren können. Diese Freisetzung erfolgt unter Vermittlung einer Membranpore, deren pharmakologische Hemmung Apoptose verhindern kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Funktion des antiapoptotisch wirkenden Proteins Bcl-2 von seiner Lokalisation am Mitochondrium abhängig ist. Im Folgenden soll ein Modell für die Rolle der Mitochondrien in der Apoptose vorgestellt werden.

Der mitochondriale Signalweg kann durch eine Vielzahl von Auslösern eingeleitet werden (vgl. Abb. 3). Es kommt zu einem Abfall von $\Delta\Psi_m$, der durch die Öffnung von Poren in der inneren und äußeren Mitochondrienmembran verursacht wird. Dieser Vorgang wird Permeability transition (PT) genannt. Die Poren werden entsprechend als Permeability transition pore (PTP) bezeichnet (Petit et al., 1996). An der Bildung der PTP scheinen Hexokinase, Cyclophilin D, der Adeninnucleotid-Translocator (ANT) und der voltage-dependent anion channel (VDAC) beteiligt zu sein. Die PTP ist für Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 1,5 kDa durchlässig (Kroemer und Reed, 2000). Durch die Öffnung der Poren können die Intermembranproteine Apoptosis inducing factor (AIF) und Cytochrom c in das Zytosol entweichen. AIF verursacht

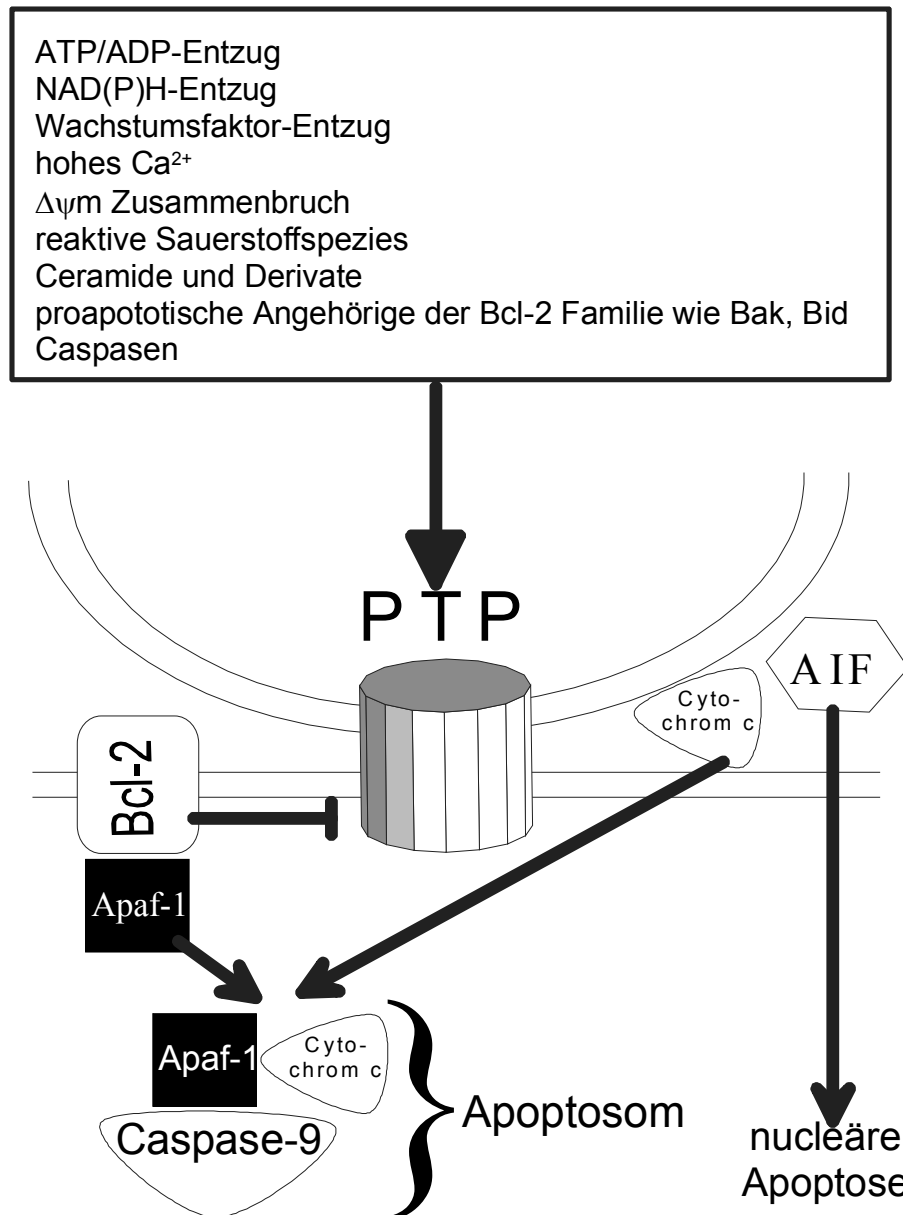


Abbildung 3: Die Permeability transition pore ist an der Freisetzung von Cytochrom c beteiligt. Cytochrom c bildet mit Apaf 1 und Procaspase 9 das Apoptosom. Dargestellt sind außerdem Auslöser des $\Delta\psi_m$ -Zusammenbruchs (Green und Reed, 1998).

durch die Aktivierung von Endonucleasen die DNA-Fragmentierung in Zellkernen, die Chromatinkondensation und aktiviert Caspase-3 (Susin et al., 1997). Cytochrom c ist ein Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette. Im Zytosol bildet Cytochrom c mit Apaf-1 und ATP einen als Apoptosom bezeichneten Komplex, der Pro-caspase-9 zu der aktiven Caspase 9 spaltet (Liu et al., 1996; Li et al., 1997).

Die Permeability transition kann pharmakologisch durch Bongkreat und Cyclosporin A blockiert werden, wodurch auch Apoptose verhindert werden kann (Zamzami et al., 1996). Noch effektiver in der Verhinderung der Permeability transition wirkt die Überexpression von Bcl-2. Man nimmt an, dass dies ein wesentlicher Mechanismus der antiapoptotischen Wirkung von Bcl-2 ist (Yang et al., 1997).

Der Ablauf der Apoptose ist ein energieaufwendiger Prozess. Der Abfall von $\Delta\Psi_m$ erlaubt aber durch die Entkopplung der Atmungskette keine weitere Erzeugung von ATP im Mitochondrium. Eine Zerstörung der Mitochondrien als Folge der PT würde eine erfolgreiche Durchführung der Apoptose unmöglich machen. In der Tat ist die PT auch nach Freisetzung von Cytochrom c und AIF keineswegs irreversibel (Partiseti et al., 1994).

1.2.5 Eigenschaften und Funktion von Bcl-2

In dieser Arbeit wurden die Eigenschaften von Bcl-2 ausgenutzt, um den $\Delta\Psi_m$ -Abfall nach CD95-Rezeptor-Stimulation zu verhindern. Bcl-2 (B-cell-leucemia-2) wurde zunächst als Onkogen identifiziert, das mit der Entstehung von B-Zell-Neoplasmen durch die Chromosomentranslokation t(14:18) in Verbindung gebracht wurde (Tsujiimoto et al., 1984). Das onkogene Potential von Bcl-2 ergibt sich aus seiner Fähigkeit, den Zelltod in genetisch geschädigten Zellen zu verhindern (Vaux et al., 1988). Die Homologie von Bcl-2 mit Ced-9 von *C. elegans* liefert Hinweise auf den Mechanismus der Verhinderung von Apoptose (Hengartner und Horvitz, 1994). Inzwischen wurden mindestens 15 verwandte Proteine gefunden, die die Bcl-2-Familie bilden. Die Angehörigen der Bcl-2 Familie verfügen über mindestens eine der vier sogenannten Bcl-2-Homologie-Domänen BH1 bis BH4 (vgl. Abb. 4), wobei aber keineswegs alle Mitglieder der Bcl-2-Familie eine antiapoptotische Funktion haben (Adams und Cory, 1998). So verhindern z.B. Bcl-2 und Bcl-X_L Apoptose, während Bax, Bcl-X_S und Bak proapoptotisch wirken (Chao und Korsmeyer, 1998). Dies legt die Vermutung nahe, dass das Schicksal der Zelle vom Verhältnis von pro- und antiapoptotisch wirkenden Bcl-2-Familienmitgliedern im Sinne einer Titration bestimmt wird. In der Tat formen Bcl-2 und Bax Heterodimere, durch deren Bildung sie sich gegenseitig neutralisieren (Oltvai et al., 1993).

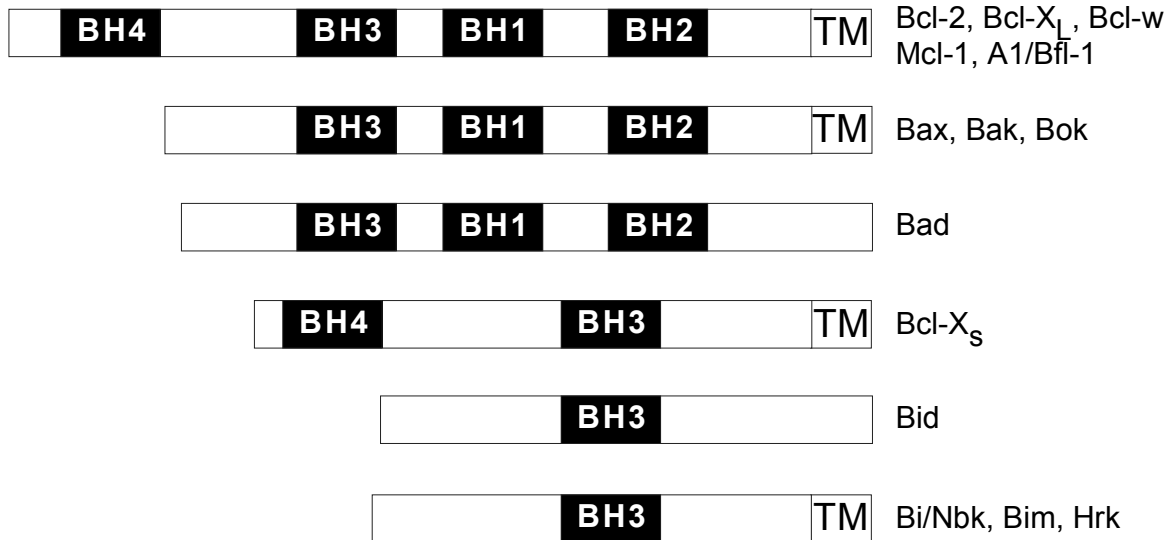


Abbildung 4: Die Homologie-Domänen der Bcl-2-Familie. Die Transmembrandomäne (TM) ist für intrazelluläre Lokalisation verantwortlich (Zamzami et al., 1998).

Bcl-2 verfügt COOH-terminal über eine Membranankerdomäne, die die spezifische Lokalisation von Bcl-2 an intrazellulären Membranen bewirkt. Bcl-2 wird dadurch überwiegend in der äußeren Mitochondrienmembran sowie am ER eingebaut. Aus der Entfernung der Membranankerdomäne resultiert ein zytosolisch lokalisiertes Bcl-2, das weitgehend funktionslos ist (Nguyen et al., 1994).

Die Verankerung von Bcl-2 in der äußeren Mitochondrienmembran gibt Hinweise auf seinen Wirkmechanismus. Bcl-2 verhindert, wie bereits erwähnt, die Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran und damit die Freisetzung von Cytochrom c (Yang et al., 1997). Dadurch kommt es nicht zu Ausbildung des Apoptosoms. Bcl-2-Familienmitglieder können die Aktivierung der Caspasen-Kaskade aber auch auf andere Weise unterbinden. So interagiert Bcl-X_L direkt mit Apaf-1 und verhindert dadurch die Spaltung von Procaspase-9 (Hu et al., 1998).

Die Aufklärung der Tertiärstruktur von Bcl-2 durch Röntgenspektralanalyse und NMR zeigte eine Ähnlichkeit von Bcl-2 mit den Membraninsertionsdomänen bakterieller Toxine (Muchmore et al., 1996). Es konnte auch gezeigt werden, dass Bcl-2 Ionenkanäle in künstlichen Membranen ausbilden kann (Minn et al., 1997). Die physiologische Bedeutung dieser Eigenschaft und ob sich daraus ein möglicher

Mechanismus zur Verhinderung der Apoptose ableiten lässt ist bislang allerdings unklar.

1.3 Speicheroperierte Calcium-Kanäle

Im Rahmen der Lymphozytenaktivierung nach TZR-Stimulation sind anhaltend hohe intrazelluläre Calcium-Konzentrationen erforderlich, um die Bildung von IL-2 zu gewährleisten. Durch die Aktivierung des IP₃-Rezeptors am Endoplasmatischen Retikulum wird dort gespeichertes Calcium in Zytosol freigesetzt. Es resultieren zytosolische Calcium-Konzentrationen von bis zu 500nMol. Dieser Vorgang ist allerdings zeitlich auf ca. 100 Sekunden begrenzt und würde für eine andauernde Aktivierung von Calcineurin nicht ausreichen. Für anhaltend hohe Calcium-Spiegel ist daher extrazelluläres Calcium notwendig. Durch die Entleerung der intrazellulären Calcium-Speicher werden Calcium-Kanäle in der Zellmembran geöffnet, durch die extrazelluläres Calcium einströmt. Calcium-Kanäle, die durch die Entleerung intrazellulärer Speicher aktiviert werden, bilden die Gruppe der speicheroperierten Calcium-Kanäle (SOC, store operated channels) und werden auch als kapazitive Kanäle bezeichnet. Der Calcium-Einstrom in Lymphozyten erfolgt ganz überwiegend über einen solchen SOC mit dem Namen CRAC (Calcium release activated calcium-channel) (Lewis, 2001). Die Bedeutung des Calcium-Einstroms über CRAC (I_{CRAC}) für die Lymphozyten-Aktivierung wird durch die schwere Immundefizienz verdeutlicht, die sich in Patienten findet, in deren T-Zellen kein I_{CRAC} nachgewiesen werden kann (Partiseti et al., 1994).

CRAC wurde von Hoth & Penner 1992 erstmals in Mastzellen beschrieben und ist unter den SOC der bislang am besten untersuchte Kanal. Danach ist I_{CRAC} nicht spannungsaktiviert und zeigt eine charakteristische Einwärts-Gleichrichtung. Der Ionenstrom durch CRAC ist hochselektiv für Calcium gegenüber Ba^{2+} , Sr^{2+} und Mn^{2+} (Hoth und Penner, 1992). Das Ruhemembranpotential ist die Triebkraft für den Calcium-Einstrom. Durch die hohe Selektivität wird eine unnötige Membrandepolarisation vermieden. Die Anzahl von CRAC-Kanälen in Jurkat Zellen wurde auf 100-400 geschätzt. Die Leitfähigkeit eines einzelnen Kanales beträgt 36-40 pS (Kerschbaum und Cahalan, 1999).

Während die Eigenschaften des Calcium-Stromes gut untersucht wurden, ist die molekulare Grundlage für I_{CRAC} ist nach wie vor unklar. Die Suche nach Genen, die als

Kandidaten in Frage kämen, wurde auch dadurch erschwert, dass keine spezifischen Hemmstoffe für CRAC zur Verfügung stehen.

Ebenso ist die Frage nach den Aktivierungsmechanismen von I_{CRAC} noch unbeantwortet. Dass die Aktivierung durch die Entleerung intrazellulärer Speicher zustande kommt, und nicht etwa ein direkter Einfluß von IP_3 ist, kann allerdings als gesichert gelten. Hierfür spricht vor allem der Anstieg von I_{CRAC} nach der Applikation von Substanzen, die die Speicher unter Umgehung von IP_3 entleeren. Dazu zählen Calcium-Chelatoren wie TPEN, das Calcium-Ionophor Ionomycin und Thapsigargin (TG). Thapsigargin ist ein spezifischer Inhibitor der ATP-abhängigen Calcium-Pumpe SERCA (Sarco-endoplasmic reticulum Calcium ATPase), die Calcium aus dem Zytosol ins ER pumpt (Thastrup et al., 1990). Es verhindert so die Wiederaufnahme von Calcium ins ER und führt damit zur Speicherentleerung.

Auch durch Phythämagglutinin (PHA), das den T-Zell-Rezeptor vernetzt und dadurch zur Bildung von IP_3 führt, kann ein Calcium-Strom herbeigeführt werden. Dieser Strom unterscheidet sich in seiner Charakteristik nicht von dem durch Thapsigargin ausgelösten. Durch Thapsigargin kann also der Signalweg oberhalb der Speicherentleerung umgangen werden und somit können anderweitige Effekte ausgeschlossen werden. Die Verwendung von Thapsigargin bei der Untersuchung der Aktivierungsmechanismen von CRAC hat sich deshalb zur Standardmethode entwickelt, auf der fast alle Studien, darunter auch diese, basieren.

Es gibt mehrere Erklärungsversuche, wie das Signal der Speicherentleerung zur Öffnung von CRAC-Kanälen führt. Diese reichen von einer direkten Interaktion zwischen Proteinen in Organellen und der Plasmamembran (Berridge, 1995) über diffundierende Botenstoffe (CIFs, calcium influx factors) (Parekh et al., 1993) bis zu einer Beteiligung von SNAP-25, einem Protein, das auch bei der Sekretion von Neurotransmittern eine Rolle spielt (Yao et al., 1999). Letztendlich muss der Mechanismus aber noch immer als ungeklärt bezeichnet werden.

Mit dem Wiederauffüllen der Calcium-Speicher deaktivieren auch CRAC-Kanäle wieder (Zweifach und Lewis, 1995). Außerdem sind zwei weitere speicherunabhängige Typen der Inaktivierung bekannt. Die langsame Inaktivierung erfolgt über einige 10 Sekunden und wird durch einen deutlichen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration ausgelöst (Zweifach und Lewis, 1995; Parekh, 1999).. Die schnelle

Inaktivierung findet innerhalb einiger Millisekunden statt und ist ebenfalls calciumabhängig. Sie wird durch eine lokale Ansammlung von Calcium-Ionen verursacht (Zweifach und Lewis, 1995).

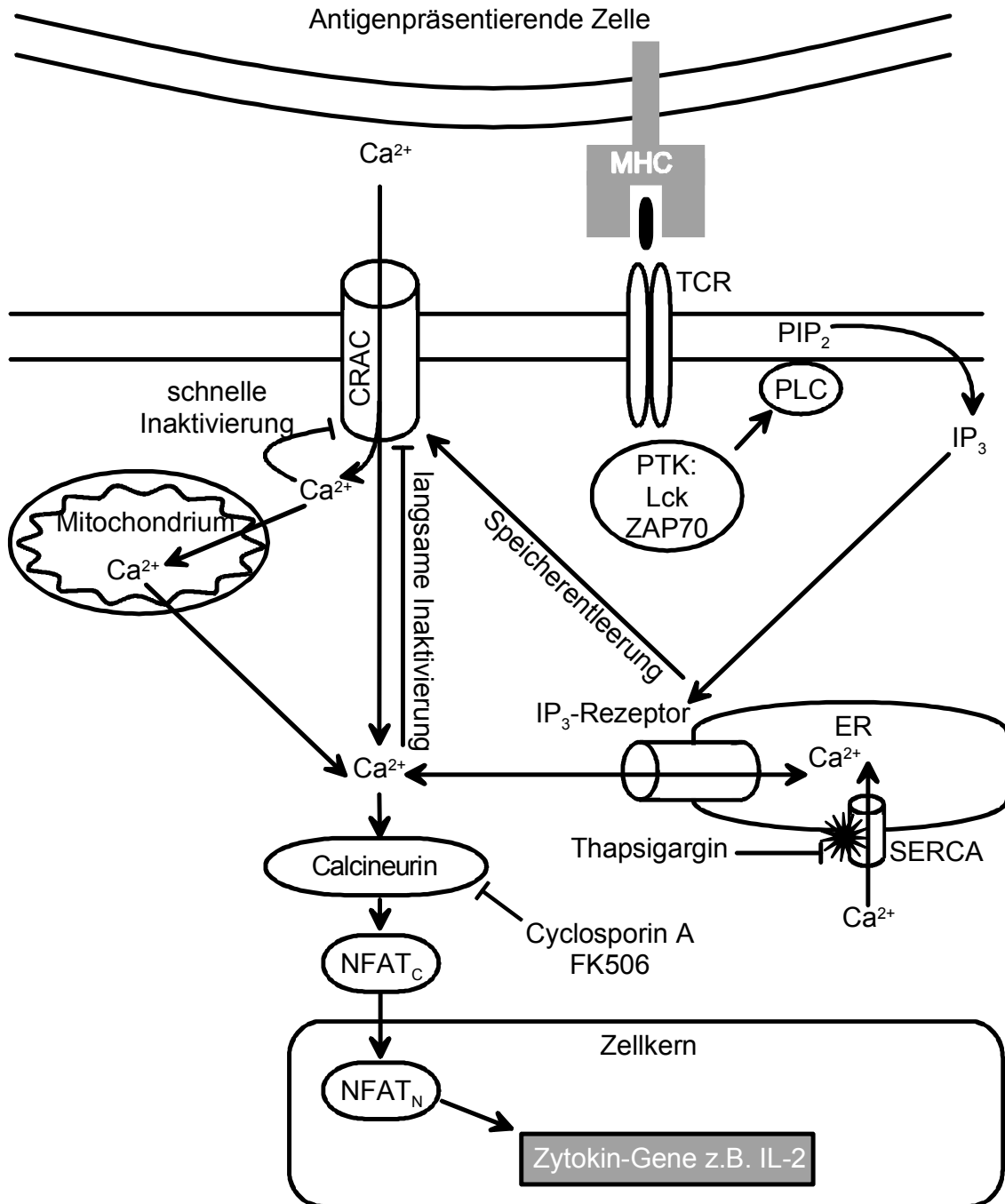


Abbildung 5: Aktivierungs- und Inaktivierungsmechanismen von CRAC und seine Rolle im Rahmen der T-Zell-Aktivierung.

Die schnelle Inaktivierung von I_{CRAC} durch lokal hohe Calcium-Konzentrationen verleiht den Mitochondrien eine entscheidende Bedeutung bei der Entstehung des Calcium-Signales. Hoth et al. fanden, dass Mitochondrien Calcium in der Nähe des Kanals aufnehmen und an anderer Stelle in der Zelle wieder freisetzen. Sie halten durch diese Verteilerfunktion die lokale Calcium-Konzentration niedrig und damit CRAC-Kanäle offen. Ist die Funktion der Mitochondrien gestört, führt dies zu einer deutlichen Hemmung des Calcium-Signales. Dies zeigen Experimente, in denen Substanzen wie CCCP (Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazon) oder Antimycin A1 und Oligomycin eingesetzt wurden, die mit mitochondrialen Atmungskette interferieren (Hoth et al., 1997).

1.4 CD95-vermittelte Hemmung von CRAC-Kanälen

Nicht alle physiologischen Auswirkungen der CD95-Rezeptorstimulation können allein durch die Auslösung von Apoptose erklärt werden. So beruht die Autoimmunerkrankung von *lpr*- und *gld*-Mäusen nicht nur auf einer Resistenz gegenüber Apoptose, sondern auch auf einer ineffizienten Induktion von Anergie, einem Zustand, in dem Lymphozyten nicht auf Antigen reagieren können (Zhou, 1991). Eine mögliche Erklärung für solche Phänomene bietet die Entdeckung, dass es nach CD95-Rezeptor-Stimulation zu einer Hemmung des Calcium-Signales kommt (Kovacs und Tsokos, 1995). Wie bereits erwähnt, ist der Calcium-Einstrom durch CRAC Voraussetzung für die Bildung von IL-2 bei der Lymphozytenaktivierung. Die Aktivierung von CD95 führt zu einer Blockade von CRAC-Kanälen, es findet kein Calcium-Einstrom statt (Lepple-Wienhues et al., 1999). Dadurch kommt es nicht zur Translokation von NFAT in den Zellkern und die Bildung von IL-2 bleibt aus. Bei geschlossenen CRAC-Kanälen kann die IL-2-Bildung wieder hergestellt werden, indem die intrazelluläre Calcium-Konzentration künstlich durch das Calcium-Ionophor Ionomycin erhöht wird (Schwartz, 1996). Letzteres zeigt, dass die Blockade von CRAC für die Hemmung des TCR-Signales ausreichend ist.

1.5 Fragestellung

Die Lymphozytenaktivierung kann durch die Stimulation des CD95-Todesrezeptors wirksam verhindert werden. Hierfür ist wahrscheinlich eine Störung in der Regulation

des Calcium-Einstromes im T-Zell-Rezeptor-Signalweg verantwortlich. Diese Störung erklärt sich durch die Blockade von CRAC-Kanälen in der Plasmamembran nach CD95-Rezeptorstimulation. In dieser Arbeit soll der Mechanismus der Blockade von CRAC-Kanälen nach CD95-Rezeptor-Stimulation näher untersucht werden.

Die Fragestellung basierte dabei auf den folgenden drei wesentlichen Beobachtungen:

- 1.) CRAC-Kanäle sind nach CD95-Rezeptor-Stimulation blockiert (Lepple-Wienhues et al., 1999).
- 2.) Mitochondrien verhindern die schnelle Inaktivierung von CRAC, indem sie lokal hohe Calcium-Konzentrationen am CRAC-Kanal verhindern. Sie tun dies durch Aufnahme von Calcium-Ionen, die sie anschließend an anderer Stelle in der Zelle wieder freisetzen. Sind die Mitochondrien in ihrer Funktion gestört, wird CRAC speicherunabhängig inaktiviert (Hoth et al., 1997).
- 3.) Im Rahmen der CD95-Rezeptor-Stimulation kommt es zu einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$. Die Überexpression von Bcl-2 kann dies verhindern (Susin et al., 1998).

Hieraus ergibt sich die Hypothese, dass die mitochondriale Depolarisation nach CD95-Stimulation für die Blockade von CRAC-Kanälen verantwortlich ist. Es sind keine weiteren Faktoren für die Hemmung des Calcium-Einstromes erforderlich. Diese Hypothese galt es in dieser Dissertation zu beweisen.

Es wurde hierfür der Ansatz verfolgt, dass eine Verhinderung des $\Delta\Psi_m$ -Abfalles auch das Calcium-Signal vollständig erhalten müsste. Die Erhaltung von $\Delta\Psi_m$ lässt sich durch die Überexpression von Bcl-2 erreichen. Es wurden Messungen des Calcium-Signales an Bcl-2 überexprimierenden Zellen nach CD95-Rezeptorstimulation durchgeführt, um zu klären, ob Bcl-2 in der Lage ist das Calcium-Signal zu retten. Ein solches Ergebnis wäre ein Beweis für die Richtigkeit der obigen Hypothese.

2 Material und Methoden

2.1 *Verwendete Chemikalien und Lösungen*

2.1.1 Bezugsquellen

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nichts anderes angegeben, bei der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) gekauft. Die Fluoreszenzfarbstoffe Fura-2-AM, Fura-Red-AM, Fluo-3-AM, DiOC₆, MitoTracker™ Orange FM, Carboxy-SNARF®-1-AM und der Lösungsvermittler Pluronic F-127 stammten von Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

2.1.2 Ringer-Lösungen

Für Experimente und für Waschschrte wurden folgende Lösungen verwendet:

Ringer

NaCl	145 mM
HEPES (#)	10 mM
Glukose	10 mM
KCl	5 mM
CaCl ₂	2 mM
MgCl ₂	1 mM

Nominell Calcium-freier Ringer

NaCl	145 mM
HEPES (#)	10 mM
Glukose	10 mM
KCl	5 mM
MgCl ₂	3 mM

EGTA-Ringer

NaCl	145 mM
HEPES (#)	10 mM
Glukose	10 mM

KCl	5 mM
MgCl ₂	3 mM
EGTA (*)	2 mM

PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4):

NaCl	136,9 mM
KCl	2,68 mM
Na ₂ HPO ₄	8,14 mM
KH ₂ PO ₄	1,4 mM

Die Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser hergestellt und auf einen pH von 7,4 eingestellt.

(*) EGTA - Ethylenglycol-bis(β-Aminoethylether)-N,N,N',N' Tetraessigsäure

(#) HEPES - (N-[2-Hydroxyethyl] piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure])

2.1.3 Thapsigargin

Thapsigargin wurde zur künstlichen Entleerung intrazellulärer Calcium-Speicher unter Umgehung des TCR-Signalweges eingesetzt. Es ist ein Hemmstoff der SERCA-ATPase (siehe Einleitung). Thapsigargin wurde in einer Konzentration von 1 mMol/l in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Nach einer Verdünnung von 1:1000 betrug die Endkonzentration 1 μMol/l.

2.1.4 Ionomycin

Ionomycin wurde zur Eichung von Calcium-Messungen verwandt. Es handelt sich um ein lipophiles Calciumionophor. Ionomycin wurde von Calbiochem (Bad Soden, Deutschland) bezogen. Ionomycin wurde in einer Konzentration von 10 mMol/l in DMSO gelöst. Die Endkonzentration betrug 10 μMol/l.

2.1.5 Anti-CD95-Antikörper

Zur Stimulation des CD95-Rezeptors wurde ein aktivierender Anti-CD95-Antikörper eingesetzt. Dieser wurde unter dem Namen CH11 (Clone-11) von Biozol (München,

Deutschland) bezogen. CH11 wurde in einer Konzentration von 100ng/ml im Nährmedium appliziert. Die Inkubationszeit im Brutschrank bei 37° betrug 1,5 Stunden.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zelllinie

Für alle Experimente wurden transfizierte Zellen der Jurkat-Zelllinie verwendet. Es handelt sich um eine humane T-Zelllinie einer akuten T-Zell-Leukämie, die 1977 aus dem peripheren Blut eines 14-jährigen Jungen isoliert wurde (Schneider et al., 1977). Die Zelllinie ist biochemisch gut charakterisiert und zeichnet sich durch eine massive Produktion von IL-2 aus (Gillis und Watson, 1980). Ein Zusatz von IL-2 war daher nicht erforderlich. Die Zellen wurden von ATCC (American American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) bezogen.

2.2.1 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in Suspension im Brutschrank (Haraeus) bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Nährmedium setzte sich zusammen aus

RPMI-1640	
fötale Kälberserum (FCS) inaktiviert bei 56 °C	10 %
HEPES (pH 7,4)	10 mM
L-Glutamin	2 mM
Natriumpyruvat	1 mM
nicht essentielle Aminosäuren	100 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
β-Mercaptoethanol	10 µM

Alle Substanzen wurden bei Life Technologies (Eggstein, Deutschland) gekauft.

Das Nährmedium wurde in Abhängigkeit von der Zelldichte alle zwei bis drei Tage erneuert.

2.3 *Überexpression von Bcl-2*

2.3.1 Vektoren

Die Transfektion des Bcl-2-Genes erfolgte mit Hilfe von pCMV-Plasmiden, die mir freundlicherweise von Brian Leber (Department of Medicine, McMaster University, Hamilton, Ontario, Kanada) zur Verfügung gestellt wurden. Es wurden insgesamt fünf verschiedene Transfektanten mit folgenden Plasmiden hergestellt:

pCMV	Vektor-Kontrolle
pCMV-Bcl-2	Wildtyp Bcl-2
pCMV-ActA	Die für die Transmembrandomäne codierende Sequenz des Bcl-2-Genes wurde durch eine Target-Sequenz für die äußere Mitochondrienmembran ersetzt.
pCMV-Cb5	Die für die Transmembrandomäne codierende Sequenz des Bcl-2-Genes wurde durch eine Target-Sequenz für das Endoplasmatische Retikulum ersetzt.
pCMV- Δ TM	In die für die Transmembrandomäne codierende Sequenz des Bcl-2-Genes wurde ein Stop-Codon eingefügt. Dieser Bcl-2-Mutation fehlt dadurch der Membrananker, was zur zytosolischen Lokalisation von Bcl-2 führt.

Das pCMV-Plasmid enthält außerdem ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Geneticin (G418). Diese Vektoren waren bereits in früheren Studien in anderen Zelllinien angewandt worden (Froesch et al., 1999).

2.3.2 Transfektion

Die Transfektion wurde durch Elektroporation vorgenommen. Hierfür wurden 20 Millionen Zellen in 400 μ l Medium und 40 μ g der Plasmid-DNA in Elektroporationsküvetten gegeben, 15 Minuten auf Eis inkubiert und im Elektroporator 5 Pulse (500 V, 99 μ sec) appliziert. Anschließend wurden die Zellen weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert und dann in normalem Medium kultiviert. 24 Stunden später wurden eine Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation (20 Minuten, 2000 rpm) durchgeführt, um die überlebenden Zellen von den toten zu trennen.

Die Selektion der Zellen, bei denen das Plasmid erfolgreich in die genomische DNA eingebaut worden war, erfolgte weitere 24 Stunden später durch Zugabe von 1 mg/ml Geniticin (G418, Life Technologies, Eggstein, Deutschland). Die Zellen wurden frühestens drei Wochen nach Transfektion für Experimente verwendet. Der Selektionsdruck durch 1 mg/ml G418 wurde in der Zellkultur ständig aufrechterhalten. G418 wurde mindestens 48 Stunden vor Versuchsbeginn abgesetzt, um Störeffekte durch das Antibiotikum auszuschließen.

2.4 Nachweis der Expression von Bcl-2 durch SDS-PAGE und Western-Blot

2.4.1 Prinzip

Western Blotting ist ein Standardverfahren zum Nachweis von Proteinen. Dabei werden die Proteine aus Zelllysaten in Abhängigkeit von Molekulargewicht und Ladung Gel-elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen (geblottet). Auf dieser Membran erfolgt die Markierung durch einen spezifischen Antikörper. Die Position des so markierten Proteins auf der Blot-Membran kann durch einen Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen werden.

2.4.2 Materialien

Die für den Western Blot verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

Lysepuffer, pH 7.5:

HEPES	25 mM
SDS	0.1 %
Desoxycholat	0.5 %
Triton X-100	1 %
EDTA	10 mM
NaF	10 mM
NaCl	100 mM
Na ₂ P ₂ O ₇	10 mM
Aprotinin/Leupeptin	10 µg/ml

SDS-Ladepuffer, pH 6.8:

Tris	125 mM
Glycerin	20 %
SDS	2 %
Bromphenolblau	0.25 %

Lösung zur Herstellung des Sammelgels, pH 6.8:

Tris	125 mM
SDS	0.1 %
Acrylamid	4.5 %
Bisacrylamid	0.12 %
APS	0.2 %
TEMED	0.2 %

Lösung zur Herstellung des Trenngels, pH 8.8:

Tris	375 mM
SDS	0.1 %
Acrylamid	10 – 14 %
Bisacrylamid	0.16 – 0.37 %
APS	0.05 %
TEMED	0.05 %

Die Substanzen zur Herstellung der Gele wurden von der Firma Roth gekauft.

Transferpuffer, pH 8.3:

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 %

Inkubationslösung für die Blot-Membranen, pH 8.0:

Tris	10 mM
NaCl	150 mM
Tween-20	0.05 %
FCS	5 %

Waschlösungen I, II und III:

Waschlösung	I	II	II
Tris	10 mM	10 mM	100 mM
NaCl	150 mM	150 mM	100 mM
Tween-20	0,05 %		
Triton X-100		0.02 %	
pH	8,0	8,0	9,5

Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
BAPTA	1,2,-bis(2-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl] piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure])
SDS	Natriumlaurylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxyethyl)aminoethan
Triton	t-Octylphenoxypolyoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat

2.4.3 Vorgehensweise

Eine Million Zellen wurden in Lysepuffer suspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren von Zelltrümmern wurden 20 µl Lysat mit 5 µl SDS-Ladepuffer und 2 µl β-Mercaptoethanol versetzt und 2 min auf 98 °C erhitzt. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine im SDS-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese-Verfahren (SDS-PAGE). Vom Trenngel wurden die Proteine in einem Tankblot (Biorad, München) auf eine Hybond Nitrozellulose-Membran (Amersham,

Braunschweig) übertragen, die zuvor in Transferpuffer eingelegt worden war. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde die Membran eine Stunde in der FCS-haltigen Inkubationslösung gehalten. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Ziege-anti-human-Bcl-2, polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) über vier Stunden bei 4°C im Kühlschrank. Nach mehreren Waschschrritten mit Waschlösung I erfolgte die Inkubation mit einem Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Ziege-IgG-Alkalische Phosphatase 1:20000, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg). Nach weiteren Waschschrritten mit Waschlösung II und III wurden die Membranen 5 min in CSPD®-Substratlösung (Tropix Biosystems, MA, USA) inkubiert. Zur Entwicklung des Filmes diente das Chemolumineszenzsystem von Amersham.

2.5 Konfokale Mikroskopie

2.5.1 Vorteile

Die konfokale Mikroskopie zeichnet sich gegenüber der herkömmlichen Mikroskopie durch eine wesentlich engere fokale Ebene aus. Dadurch können Schnittbilder auch aus lebenden Zellen gewonnen werden, die sogar in kleinen Zellen die Darstellung subzellulärer Strukturen erlauben. Durch sequentielle Verlagerung der Schnittebene in der z-Achse können außerdem dreidimensionale Bilder errechnet werden.

2.5.2 Prinzip

Bei der konfokalen Mikroskopie wird immer nur ein möglichst kleiner Ausschnitt des Präparates beleuchtet. Das Bild dieses Punktes wird in einer Zwischenbildebene durch eine sehr kleine Blende (Pinhole) geführt. Das hat zur Folge, dass nur Licht aus der Fokusebene den Detektor erreichen kann. Alle anderen (unscharfen) Ebenen werden ausgeblendet. Das Präparat wird Punkt für Punkt abgerastert (gescannt). So entsteht das Schnittbild im Rechner.

In einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (cLSM) dient ein Laser als Lichtquelle, durch die Fluoreszenzfarbstoffe in der Zelle zur Fluoreszenz angeregt werden können. Das emittierte Licht gelangt über Photomultiplier und austauschbare Farb- und Graufilter zum Photodetektor.

2.5.3 Technische Daten

Für diese Arbeit wurde ein Zeiss LSM 410 Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen) verwendet, das mit einem Argon-Laser ($\lambda=488$ nm, 25 mW), einem HeNe-Laser ($\lambda=543$ nm, 1 mW) und einem HeNe-Laser ($\lambda=633$ nm, 5 mW) ausgestattet war. Es wurde das 63x/1,2 H₂O (C-Apochromat) – Objektiv gewählt.

2.5.3 Nachweis der intrazellulären Lokalisation von Bcl-2

Mit dem cLSM lassen sich in kurzem zeitlichem Abstand Bilder desselben Präparates mit den verschiedenen Anregungswellenlängen der verfügbaren Laser erstellen. Verschiedene intrazelluläre Strukturen können gleichzeitig durch mehrere spezifische Fluoreszenzfarbstoffe angefärbt werden, die sich in ihrer Anregungswellenlänge unterscheiden. So wird der eine Farbstoff beim ersten Scan-Vorgang fluoreszieren und zum ersten Bild beitragen, während der zweite Farbstoff beim Scan-Vorgang mit der zweiten Wellenlänge fluoreszieren und so zum zweiten Bild beitragen wird. Da sich die Position der gefärbten Strukturen zwischen den Scan-Vorgängen nicht ändert, können durch Überlagerung der erhaltenen Bilder Aussagen über eine mögliche Kollokalisierung der durch die verschiedenen Farbstoffe markierten Strukturen gemacht werden.

Der Nachweis der intrazellulären Lokalisation von Bcl-2 erfolgte nach diesem Prinzip. Mitochondrien wurden mit MitoTrackerTM Orange FM spezifisch angefärbt. Bcl-2 wurde mit einem polyklonalen Ziege-anti-human-Bcl-2 Primärantikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) markiert, gegen den ein CyTM5-konjugierte Kaninchen-anti-Ziege Sekundärantikörper (Dianova, Hamburg) gerichtet wurde.

Die sorgfältige Auswahl der Farbstoffkombination war von großer Bedeutung. Die Anregungsspektren sollten nach Möglichkeit keine Überlappung aufweisen, um sog. Bleed-through-Effekte zu vermeiden. Damit ist die Fluoreszenz eines Farbstoffes bei einer Anregungswellenlänge gemeint, die eigentlich nur den anderen Farbstoff zum Leuchten bringen sollte (vgl. Abb. 6). Dies war insbesondere deshalb wichtig, weil die Fluoreszenzintensität von CyTM5, bedingt durch die geringe Antikörper-Konzentration, deutlich schwächer war als die von MitoTrackerTM Orange FM. Die Anregung von MitoTrackerTM Orange FM erfolgte durch den HeNe-Laser bei einer Wellenlänge von 543nm, die von CyTM5 durch den HeNe-Laser bei einer Wellenlänge von 633 nm.

Durch geeignete Wahl der Graufilter und Emissionsfilter konnten Bleed-through-Effekte ausgeschlossen werden.

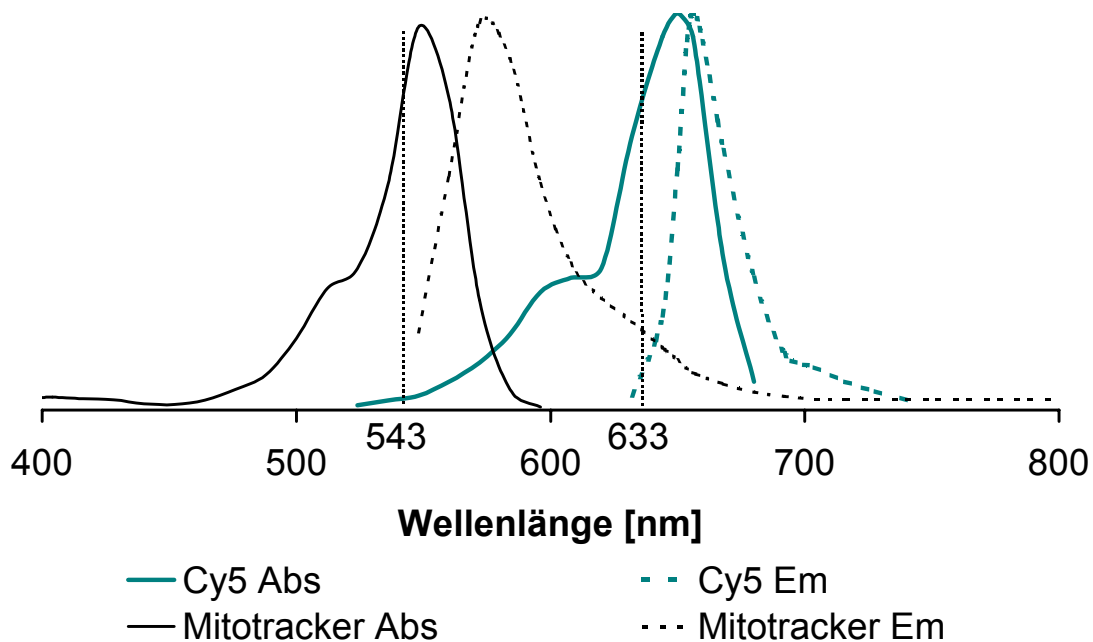


Abbildung 6: Das Diagramm zeigt die Anregungsspektren (Abs) und Emissionsspektren (Em) von Mitotracker Orange und Cy5. Die Kombination von MitoTrackerTM Orange FM und CyTM5 ist für eine Doppelfärbung geeignet. Die Anregungswellenlängen (punktierte Markierungen) liegen deutlich im Bereich der Absorptionsspektren (543nm für Mitotracker Orange, 633nm für CyTM5).

2.5.4 Herstellung der Präparate

Zur Färbung der Mitochondrien wurden lebende Zellen 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C mit 200ng/ml MitoTrackerTM Orange FM in Nährmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf 24-Well-Platten übertragen, in denen sich mit Poly-L-Lysin behandelte Deckgläschen befanden. Weitere 20 Minuten im Brutschrank dienten dem Anhaften von Zellen an die Deckgläschen. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen 15-60 Minuten mit 1 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal á 5 Minuten mit 0.5 % Tween 20 in PBS gewaschen, was auch die Waschlösung für alle weiteren Waschschriffe war. Das spätere Eindringen der Antikörper ins Zellinnere wurde durch Permeabilisieren der Zellen mit 0,05 % Triton X100 für 10 Minuten bei Raumtemperatur ermöglicht. Nach gründlichem Waschen

wurden der anti-Bcl-2-Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:100 in PBS mit 5 % FCS zugegeben und 45-60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterem gründlichen Waschen erfolgte dieselbe Prozedur mit dem CyTM5-Sekundärantikörper. Dieser wurde zum Abschluss mit PBS abgewaschen. Die Präparate wurden mit Moviol (Sigma, Deisenhofen) auf einem Objektträger eingebettet und mit Nagellack (dm-Drogeriemarkt, Tübingen) versiegelt. Bis zur Aufnahme der Bilder maximal 24 Stunden später wurden die Präparate bei 4° C lichtgeschützt aufbewahrt.

2.6 Fluoreszenzmikroskopie und Video-Imaging

2.6.1 Prinzip

Die Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen, die nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge, die im Absorptionsspektrum des Farbstoffes liegt, Licht niedrigerer Energie emittieren. Mit der Fluoreszenzmikroskopie können nicht nur intrazelluläre Strukturen oder Proteine fixierter Zellen dargestellt werden. Membrangängige Fluoreszenzfarbstoffe können auch in lebende Zellen eindringen, die sich daraufhin im Fluoreszenzmikroskop darstellen lassen. Besonders interessant sind Fluoreszenzfarbstoffe, die ihre Fluoreszenzeigenschaften in Abhängigkeit intrazellulärer Parameter wie pH oder Calcium-Konzentration verändern. Durch Messung von Änderungen in den Fluoreszenzeigenschaften können Aussagen über diese Parameter in lebenden Zellen gemacht werden. Ein solcher Farbstoff ist u.a. Fura-2 AM.

2.6.2 Calcium-Messung mit Fura-2

Zur fluoreszenzmikroskopischen Messung der zytosolischen Calcium-Konzentration in Jurkat Zellen wurde der Farbstoff Fura-2-AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) eingesetzt. Dieser Farbstoff wurde 1985 entwickelt und erlaubt eine einfache und zuverlässige Messung von intrazellulärem Calcium (Grynkiewicz et al., 1985).

Fura-2-AM liegt zunächst als Acetyloxymethylester vor. In dieser Form ist der Farbstoff lipophil und damit membrangängig. Bei der Inkubation der Zellen mit Fura-2-AM diffundiert der Farbstoff durch die Zellmembran und wird intrazellulär durch unspezifische Esterasen gespalten. Es entsteht eine hydrophile Form des Farbstoffes, die nicht mehr membrangängig ist und sich im Zytosol der Zelle anreichert.

Fura-2 zeichnet sich durch eine Reihe von Eigenschaften aus, die den Farbstoff ideal für die Messung von intrazellulärem Calcium machen. Fura-2 ist ein sehr selektiver Calcium-Chelator. Die Dissoziationskonstante (K_D) des Calcium / Farbstoff – Komplexes liegt mit 140 nMol im Bereich der physiologischen intrazellulären Calcium-Konzentration und ist vom pH weitestgehend unabhängig. Das Absorptionsspektrum von Calcium-freiem Fura-2 hat ein Absorptionsmaximum bei $\lambda=363$ nm. Durch die Bindung von Calcium an Fura-2 verschiebt sich dieses Spektrum zu einem Absorptionsmaximum von $\lambda=335$ nm. In beiden Fällen wird Licht einer Wellenlänge um $\lambda=510$ nm emittiert (vgl. Abb. 7). Die Intensität der Emission ist also von der Calcium-Konzentration abhängig. Dies gilt für alle Anregungswellenlängen mit Ausnahme des sogenannten isobestischen Punktes, der Wellenlänge, bei der die Calcium-Konzentration keinen Einfluss auf die Lichtemission hat. Der isobestische Punkt von Fura-2 liegt bei $\lambda=380$ nm.

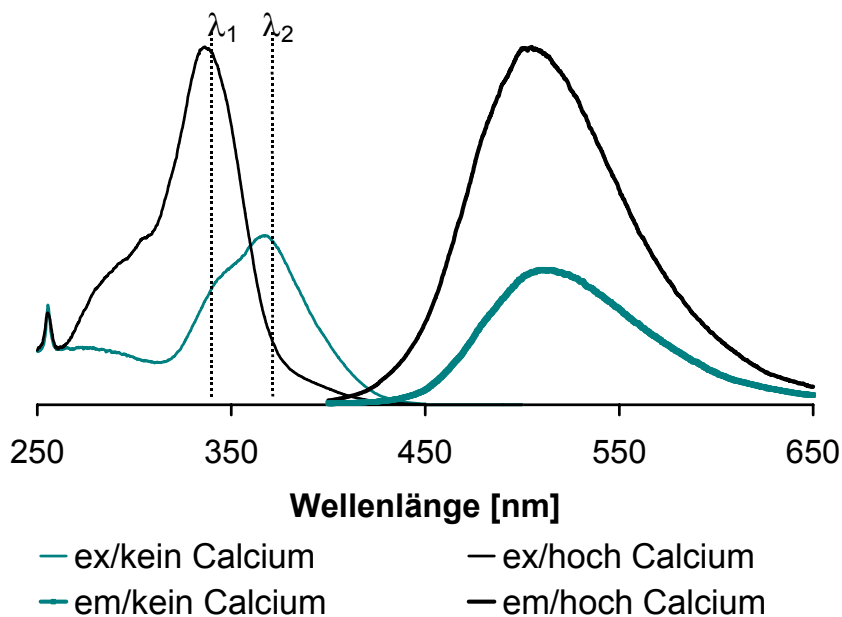


Abbildung 7: Das Exzitations(ex)- und Emmissions(em)-Spektrum von Fura-2 AM. Es wurde Licht der Wellenlängen $\lambda_1=340$ nm und $\lambda_2=380$ nm zur Anregung eingesetzt.

Nicht nur ist die Emmissionsintensität abhängig von der Calcium-Konzentration, durch Anregung von Fura-2 bei verschiedenen Wellenlängen und Bildung des Verhältnisses der gemessenen Emmissionsintensitäten (Ratio) erhält man zudem ein Maß für

Calcium, das von potentiellen Störfaktoren weitgehend unabhängig ist. Dazu zählen die Hintergrundintensität, die Zelldicke, das Ausbleichen und der Verlust durch Diffusion von Farbstoff. Vor allem aber ist die Ratio unabhängig von der unterschiedlichen Farbstoffbeladung der jeweiligen Zelle. Als Anregungswellenlängen werden idealerweise diejenigen Wellenlängen gewählt, bei denen der Unterschied in den Absorptionsspektren zwischen Calcium-beladenem und Calcium-freiem Fura-2 maximal ist. Für Calcium-beladenes Fura-2 ist dies bei $\lambda=340$ nm, für Calcium-freies Fura-2 bei $\lambda=380$ nm der Fall. Es wird also in möglichst kurzer zeitlicher Abfolge mit $\lambda=340$ nm und $\lambda=380$ nm angeregt und aus den erhaltenen Emmissionsintensitäten das Verhältnis $R_{340/380}$ gebildet.

Aus dem Verhältnis $R_{340/380}$ lässt sich unter Einsatz der Formel von Grynkiewicz direkt die zugehörige absolute Calcium-Konzentration berechnen (Grynkiewicz et al., 1985).

$$[Ca^{2+}]_i = K_D \times \frac{F_{\min \lambda 2}}{F_{\max \lambda 2}} \times \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R}$$

- K_D - Dissoziationskonstante für Fura-2 (135 nMol/l)
- $F_{\min \lambda 2}$ - Emmissionsintensität bei Anregung mit $\lambda_2=380$ nm bei minimaler Calcium-Konzentration
- $F_{\max \lambda 2}$ - Emmissionsintensität bei Anregung mit $\lambda_2=380$ nm bei maximaler Calcium-Konzentration
- R_{\min} - Ratio_{340/340} bei minimaler Calcium-Konzentration
- R_{\max} - Ratio_{340/340} bei maximaler Calcium-Konzentration
- R - Ratio_{340/380} der zu ermittelnden Calcium-Konzentration
- $[Ca^{2+}]_i$ - intrazelluläre Calcium-Konzentration

Die Werte für $F_{\min \lambda 2}$, $F_{\max \lambda 2}$, R_{\min} und R_{\max} mussten zuvor durch Eichung ermittelt werden. Hierfür wurden mit Fura-2 beladene Zellen mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin (10 μ Mol) für Calcium permeabilisiert, wodurch sich die intrazelluläre Calcium-Konzentration der extrazellulären angleicht. $F_{\min \lambda 2}$ und R_{\min} wurden in

Calcium-freien Ringer mit 2 mMol/l EGTA (EGTA-Ringer) gemessen. $F_{\max\lambda 2}$ und R_{\max} wurden in Calcium-Ringer ermittelt.

2.6.3 Aufbau der Messapparatur

Für die Calcium-Messungen stand ein Invert-Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135) der Firma Zeiss (Oberkochen, Deutschland) zur Verfügung. Es wurde überwiegend ein Ölimmersionsobjektiv mit 40-facher Vergrößerung eingesetzt. Die Lichtquelle für fluoreszenzmikroskopische Messungen bestand aus einer Quecksilberdampf-Lampe. Aus deren Licht konnten über Bandfilter Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm gewonnen werden. Die Bandfilter befanden sich in einer Filterradeneinheit der Firma Sutter Instruments (Novato, CA, USA), die von einem PC angesteuert werden konnte. In den weiteren Strahlengang konnten Graufilter verschiedener Stärke eingesetzt werden. Das Licht wurde über einen 45° zum Strahlengang gerichteten dichroischen Spiegel auf die Präparate gelenkt. Dieser Spiegel war so gewählt, dass Licht der Anregungswellenlängen (340 nm, 380 nm) reflektiert wurde, Licht der Emissionswellenlänge 510 nm aber passieren konnte. Das Fluoreszenzbild wurde von einer CCD-Videokamera (Proxitronic, Bensheim, Deutschland) erfasst, der ein stufenlos einstellbarer Photomultiplier vorgeschaltet war. Die Kamera leitete die Bilder an den PC weiter, auf dem sie mit der Software Axon Imaging Workbench (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) ausgewertet wurden. Die Software erlaubte eine separate Auswertung für jede einzelne Zelle.

Die Zellen befanden sich in einer Plexiglaskammer, deren Boden von einem Glasdeckglas (\varnothing 30 mm) gebildet wurde, das zur besseren Anhaftung der Zellen mit Poly-L-Lysin beschichtet war. Die Kammer fasste ca. 250 μ l Zellsuspension. Für Messungen des Zeitverlaufs konnte die Kammer mit verschiedenen Lösungen perfundiert werden. Dafür stand eine peristaltische Pumpe (Colora Messtechnik, Lorch/Württemberg, Deutschland) und eine Absaugeinrichtung für einen konstanten Flüssigkeitsspiegel zur Verfügung, die einen schnellen Lösungswechsel gewährleisteten.

2.6.4 Präparation und Messung der Zellen

Für Messungen mit Zeitverlauf wurden 250 μl einer Zellsuspension in eine der beschriebenen Plexiglaskammern gegeben und mit 1 μM Fura-2-AM für 30 Minuten im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde die Kammer auf dem Messstand plaziert und mindestens 15 Minuten mit Calcium-Ringer perfundiert, bevor das Experiment begann.

Für Messungen, bei denen nur ein Momentanwert ermittelt werden sollte, wurde wie folgt vorgegangen. Die Zellen wurden im Reagenzglas mit 1 μM Fura-2-AM für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf den Boden des Reagenzglases zentrifugiert (5 Minuten, 2000 rpm), um die Lösung durch Calcium-Ringer auszutauschen. In Calcium-Ringer wurden die Zellen mit dem Vortex® wieder aufgemischt und ruhten dann 20 Minuten bei Raumtemperatur. Kurz vor der Messung wurden ggf. Thapsigargin (1 $\mu\text{Mol/l}$) oder Ionomycin (10 $\mu\text{Mol/l}$) zugegeben. In der Calcium-Ringer-Lösung wurden die Zellen dann in eine Meßkammer gegeben, durch kurzes Beschleunigen auf 2000 rpm auf den Boden zentrifugiert und umgehend gemessen.

2.7 *Durchflusszytometrie (FACS)*

2.7.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie ist ein elegantes Messverfahren, mit dem in kurzer Zeit sehr viele Informationen über eine sehr große Anzahl von Zellen gewonnen werden können. Im Prinzip beruht die Durchflusszytometrie darauf, dass Zellen einzeln den Strahl eines Lasers durchkreuzen. Beim Durchtritt durch den Strahl können verschiedene Parameter erfasst werden. Dies ist zum einen die Abschwächung des Laserstrahles in seinem geraden Verlauf, was als „forward scatter“ (FSC) bezeichnet wird. Der „forward scatter“ stellt ein Maß für die Größe der Zelle dar. Zum anderen wird die Streuung des Laserstrahles beim Durchtritt durch die Zelle erfasst. Diese Streuung wird durch granuläre Zellbestandteile verursacht und wird als „side scatter“ (SSC) bezeichnet. Der „side scatter“ ist damit ein Maß für die Dichte und Granularität der Zelle. Weiterhin kann die Fluoreszenz von Farbstoffen in verschiedenen Kanälen aufgezeichnet werden, die durch das Laser-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden. Hierdurch ergeben sich vielfältige Anwendungsmöglichkeiten.

Für die Durchflusszytometrie wurde ein FACS-Gerät (fluorescence activated cell sorter) der Firma Becton-Dickinson (San Jose, USA) des Typs FACS Calibur verwendet. Dieses Gerät arbeitete mit einem Argon-Laser ($\lambda = 488 \text{ nm}$). Den Photodetektoren sind stufenlos einstellbare Photomultiplier vorgeschaltet. Der Photodetektoren für den forward scatter liegt direkt im Strahlengang des Lasers, diejenigen für „side scatter“ und für die verschiedenen Fluoreszenzen im rechten Winkel zum Strahlengang. Für die Fluoreszenzerfassung standen drei Kanäle zur Verfügung (FL1: $\lambda_{\text{FL-1}} = 530 \text{ nm}$, FL2: $\lambda_{\text{FL-2}} = 585 \text{ nm}$, FL-3: $\lambda_{\text{FL-3}} = 650 \text{ nm}$).

Die Zellen gelangen in das Messsystem, indem in einem Kunststoff-Reagenzglas ein Überdruck erzeugt wird, der die Zellsuspension in ein Stahlröhrchen presste. Vor Eintritt in die Messkammer wird eine Trägerflüssigkeit (FACSFlow, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) beigemischt, die einen schnellen Durchstrom durch die Messküvette erlaubt. Dabei werden Zellaggregate aufgetrennt und die Zellen passieren einzeln den Analysenpunkt.

Für jede einzelne Zelle wurden die Messwerte aus allen fünf Photodetektoren sowie der Zeitpunkt erfasst. Die gewonnenen Daten wurden an einen Macintosh PowerPC weitergeleitet und mit der Software CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, USA) ausgewertet.

Alle Versuche fanden bei Raumtemperatur (20° C) statt. Üblicherweise wurden 10000 Zellen pro Probe gemessen.

2.7.2 Ratiometrische Calcium Messung mit dem FACS

Eine ratiometrische Calcium-Messung mit nur einem Farbstoff wie bei der fluoreszenzmikroskopischen Messung ist in der Durchflusszytometrie leider nicht möglich, da nur eine Anregungswellenlänge zur Verfügung steht. Eine nicht-ratiometrische Messung mit einem Calcium-sensitiven Farbstoff hat den Nachteil, dass die Fluoreszenz nicht nur von der Calcium-Konzentration, sondern auch in einem erheblichen Maße von der Farbstoffbeladung der jeweiligen Zelle abhängt, so dass letztlich keine gute Aussage über die Calcium-Konzentration möglich ist. Dieses Problem konnte durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Calcium-sensitiven Farbstoffen weitgehend in den Griff bekommen werden. Unter der Annahme, dass das Aufnahmeverhalten einer jeden Zelle für den jeweiligen Farbstoff gleich ist, kann davon

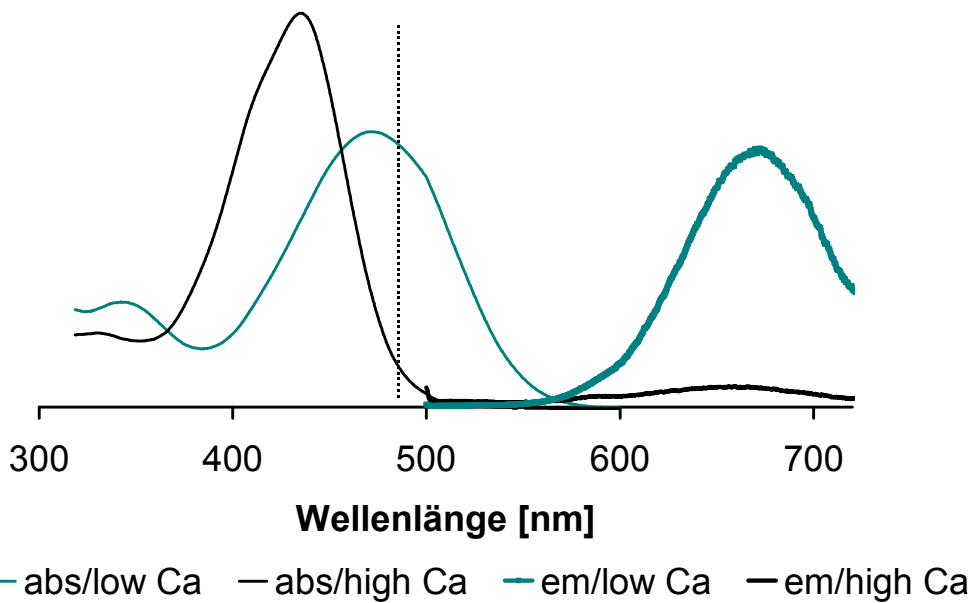
ausgegangen werden, dass auch das Verhältnis der Farbstoffkonzentrationen in einer jeden Zelle gleich ist. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten beider Farbstoffe (Ratio) ist damit wieder überwiegend von der Farbstoffbeladung unabhängig.

Es wurden zwei Farbstoffe verwendet, die gegenläufig auf Calcium reagieren und Fluoreszenzlicht bei deutlich unterschiedlichen Wellenlängen emittieren. Diese Eigenschaften machten Fura-Red-AM und Fluo-3-AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) zu einer sinnvollen Kombination zur ratiometrischen Calcium-Messung mit dem FACS (Novak und Rabinovitch, 1994) Beide Farbstoffe liegen als Acetoxymethylester vor, was den Farbstoffen lipophile Eigenschaften vermittelt und sie damit membrangängig macht. Die Acetoxymethylgruppe wird durch intrazelluläre unspezifische Esterasen abgespalten, wodurch der Farbstoff seine Membrangängigkeit verliert und in der Zelle gefangen bleibt. Die Absorptionsspektren von Fura-Red und Fluo-3 lassen eine Anregung mit dem 488 nm Argon-Laser zu.

Fura Red hat ein Maximum im Emmissionsspektrum bei $\lambda=670$ nm und kann im Kanal FL-3 ($\lambda=650$ nm) erfaßt werden. Es reagiert auf eine Senkung der Calcium-Konzentration mit einer deutlichen Steigerung der Fluoreszenzintensität. Wie Abbildung 8 zeigt, hat dies zwei Gründe. Zum einen rückt das Absorptionsspektrum mit seinem Maximum näher in den Bereich der Anregung durch den Laser bei $\lambda=488$ nm, zum anderen nimmt die Fluoreszenz bei $\lambda=670$ nm kräftig zu. Fura Red wurde in DMSO (1 mMol/l) gelöst und in einer Endkonzentration von 1 μ Mol/l eingesetzt.

Im Gegensatz zu Fura Red reagiert Fluo-3 auf einen Anstieg der Calcium-Konzentration mit einer Steigerung der Fluoreszenzintensität. Das Emmissionsspektrum hat ein Maximum bei $\lambda=530$ nm und kann im Kanal FL-1 ($\lambda=530$ nm) erfasst werden. Fluo-3 wurde in DMSO (1 mMol/l) gelöst und in einer Endkonzentration von 1 μ Mol/l eingesetzt.

Die Zellen wurden 30 Minuten im Brutschrank (37° C) und 5 % CO₂ unter Lichtabschluss mit Farbstoff inkubiert. Als Lösungsvermittler wurde Pluronic-127 (in 15 %iger Lösung in DMSO 1:1000 verdünnt, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) eingesetzt. Vor Versuchsbeginn wurde ein Nährmedium hergestellt, das alle Farbstoffe bereits in den Endkonzentrationen enthielt. Zur Farbstoffinkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und in farbstoffhaltigem Medium resuspendiert. Dadurch wurden



Pipettierfehler ausgeschlossen und gewährleistet, dass jede Probe exakt mit derselben Farbstoffkonzentration inkubiert wurde.

Abbildung 8: Das Absorptions-/Emissionspektrum von Fura-Red-AM bei niedrigem (low) und hohem (hi) Calcium-Konzentrationen. Die gestrichelte Linie zeigt die Anregungswellenlänge des Lasers ($\lambda=488\text{ nm}$)

Im Gegensatz zur fluoreszenzmikroskopischen Calcium-Messung konnten die erhaltenen Ratio-Werte nicht direkt in absolute Calcium-Konzentrationen umgerechnet werden. Für die Abschätzung der tatsächlichen Calcium-Konzentration wurden daher die geeichten Werte aus den Video-Imaging Experimenten herangezogen, die unter denselben Versuchsbedingungen stattgefunden hatten. Die durchschnittlichen Calcium-Werte vor und nach Zugabe von Thapsigargin in Jurkat_{pCMV} wurden mit den entsprechenden durchschnittlichen Ratio-Werten aus der Durchflusszytometrie gleichgesetzt und so eine Eichkurve erstellt.

2.7.3 Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$

Das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi_m$ ist stark negativ. Es stellt damit die Triebkraft für die Ansammlung von Kationen in den Mitochondrien dar. Lipophile, kationische Verbindungen können die Membranen durchdringen und akkumulieren in Abhängigkeit von $\Delta\Psi_m$ in den Mitochondrien. Dies gilt auch für den

Fluoreszenzfarbstoff DiOC₆(3), dessen chemische Struktur in Abbildung 9 dargestellt ist. In sehr niedrigen Konzentrationen eingesetzt, korreliert die Fluoreszenz von DiOC₆(3)-beladenen Zellen gut mit dem mitochondrialen Membranpotential $\Delta\Psi_m$, wobei das Plasmamembranpotential keine Rolle spielt (Rottenberg und Wu, 1998). Der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt zu einer Reduktion der Triebkraft für die Aufnahme von DiOC₆(3) in die Mitochondrien und zu einem Verlust von Farbstoff innerhalb weniger Minuten.

Die Zellen wurden 30 Minuten im Brutschrank (37° C, 5 % CO₂) mit 200 pMol/l DiOC₆(3) inkubiert und anschließend direkt im FACS gemessen. Die Fluoreszenz wurde bei starker Verstärkung im Kanal FL-1 ($\lambda=530$ nm) aufgezeichnet. Für Kontrollen wurde das mitochondriale Membranpotential durch 5 μ Mol/l des mitochondrialen Entkopplers CCCP (Carbonyl-Cyanid m-Chlorophenylhydrazon) vollständig depolarisiert.

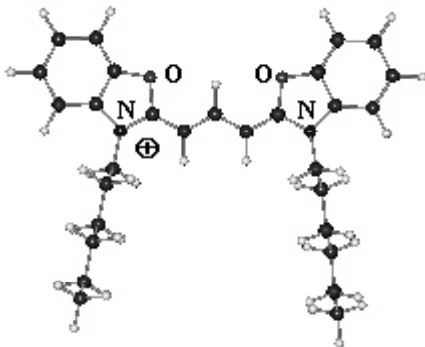


Abbildung 9: Die räumliche Struktur von DiOC₆(3) in einem Balls-and-Cylinders Modell zeigt die positive Ladung im Zentrum, die von lipophilen Gruppen umgeben ist, die den Farbstoff membrangängig werden lassen.

2.7.4 pH-Messung per FACS

Für die durchflusszytometrische Messung des intrazellulären pH-Wertes stand mit Carboxy-SNARF®-1-AM (Molecular Probes, Eugen, OR, USA) ein ratiometrischer Fluoreszenzfarbstoff zur Verfügung. Das Maximum des Emissionsspektrums von Carboxy-SNARF®-1-AM verschiebt sich mit steigendem pH in den längerwelligen Bereich. Die Fluoreszenz wurde in Kanal FL-2 ($\lambda = 585$ nm) in Kanal FL-3 ($\lambda = 650$ nm) aufgezeichnet. Das Verhältnis der beiden Werte wurde als Maß für den

intrazellulären pH herangezogen. Die Zellen wurden mit mit 5 μM SNARF-1-AM für 30 min im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, in frischem Ringer resuspendiert und ruhten 30 Minuten im Wasserbad bei 37° C vor der FACS-Analyse.

2.8 statistische Auswertung

Die Experimente wurden jeweils mindestens dreimal wiederholt und ergaben gleichwertige Ergebnisse. Aus den Versuchswerten wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Zur Untersuchung auf signifikante Unterschiede der Ergebnisse wurde der Student's t-Test verwendet. Ein signifikanter Unterschied wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.05$ angenommen. Zur statistischen Auswertung von Korrelationen wurde das Programm Jump verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Sicherung der Methoden

3.1.1 Überexpression von Bcl-2-Varianten in transfizierten Jurkat-Zellen

In den folgenden Experimenten sollte der Einfluss von Bcl-2 auf Calcium-Signale und das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi_m$ nach Stimulation des CD95-Rezeptors untersucht werden. Hierzu wurden durch stabile Transfektion fünf verschiedene Zelllinien hergestellt, die unterschiedliche Varianten von Bcl-2 überexprimierten. In eine Zelllinie (VC, vector control) wurde lediglich das pCMV-Plasmid, das in den anderen Zelllinien als Vektor für das Bcl-2-Gen diente, transfiziert. Diese Zelllinie diente als Kontrolle. In eine zweite Zelllinie (WT) wurde das Bcl-2-Gen vom Wildtyp transfiziert. In drei weiteren Zelllinien wurde ein künstlich verändertes Bcl-2-Gen transfiziert, indem die Membranankerdomäne von Bcl-2 ausgetauscht oder verändert wurde. In der Variante ActA war die Transmembrandomäne von Bcl-2 durch eine Target-Sequenz für die äußere Mitochondrienmembran ersetzt worden. Die Variante Cytochrom B5 (Cb5) erhielt einen Membrananker für die Membran des Endoplasmatischen Retikulums. In einer letzten Variante (Δ TM) wurde ein Stop-Codon in die für die Transmembrandomäne codierende Sequenz des Bcl-2-Gens eingefügt, was zum Verlust des Membranankers und damit zur zytosolischen Lokalisation des Genproduktes führte.

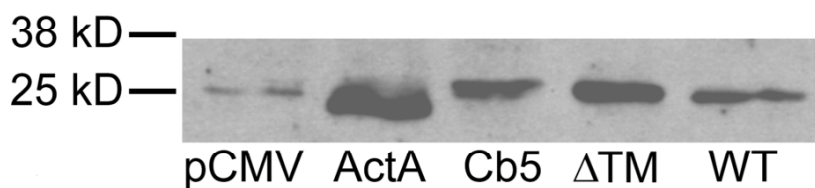


Abbildung 10: Western-Blot zum Nachweis von Bcl-2 in den transfizierten Zelllinien. Im Bereich der Molekülgröße von Bcl-2 (24kD) zeigt sich eine klare Bande. Alle Varianten von Bcl-2 wurden von dem Antikörper erkannt. In Vektor-Kontrollen ist lediglich eine basale Expression von Bcl-2 vorhanden. Die Expression von Bcl-2 in WT-, ActA-, Cb5- und Δ TM-Zellen ist deutlich erhöht.

Der Erfolg der Transfektion wurde durch Western-Blotting überprüft. Das Ergebnis ist in Abb. 10 dargestellt. Es konnte eine deutliche Überexpression von Bcl-2 in allen Zelllinien nachgewiesen werden, die mit Bcl-2 Varianten transfiziert worden waren.

3.1.2 Nachweis der intrazellulären Lokalisation der Bcl-2 Varianten

Durch die Manipulation der Transmembrandomäne von Bcl-2 in den verschiedenen Zelllinien sollte eine Steuerung der Lokalisation von Bcl-2 erreicht werden. Entsprechend der Target-Sequenzen konnte angenommen werden, dass sich Bcl-2 in ActA-Zellen an der äußeren Mitochondrienmembran, in Cb5-Zellen am ER und in Δ TM-Zellen im Zytosol befinden würde. Von Wildtyp-Bcl-2 wurde eine Lokalisation überwiegend an den Mitochondrien, aber auch am ER, erwartet.

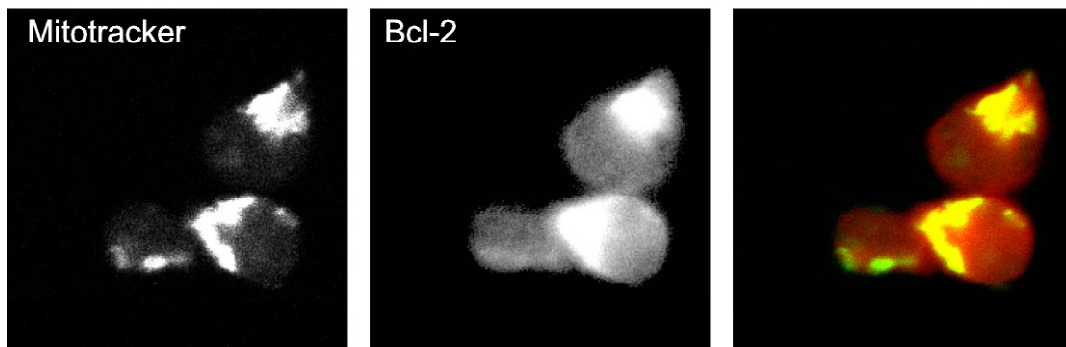
Zum Nachweis der erwarteten Lokalisation wurde die konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie eingesetzt. Mitochondrien wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTrackerTM Orange FM spezifisch angefärbt. Zellen wurden permeabilisiert und intrazelluläres Bcl-2 immunzytochemisch markiert. Hierfür wurde ein Anti-human-Bcl-2-Primärantikörper (Ziege) und ein CyTM5-Farbstoff-gekoppelter Anti-Ziege Sekundärantikörper verwendet.

Die mit der konfokalen Fluoreszenz-Mikroskopie gewonnenen Bilder zeigen eine Kolokalisation von Bcl-2 und Mitochondrien in WT- und ActA-Zellen (vgl. Abb. 11). In Cb5- und Δ TM-Zellen befindet sich deutlich mehr Bcl-2 in intrazellulären Bereichen, in denen keine Mitochondrien darstellbar sind, also entweder im Bereich des ERs (Cb5) oder im Zytosol (Δ TM).

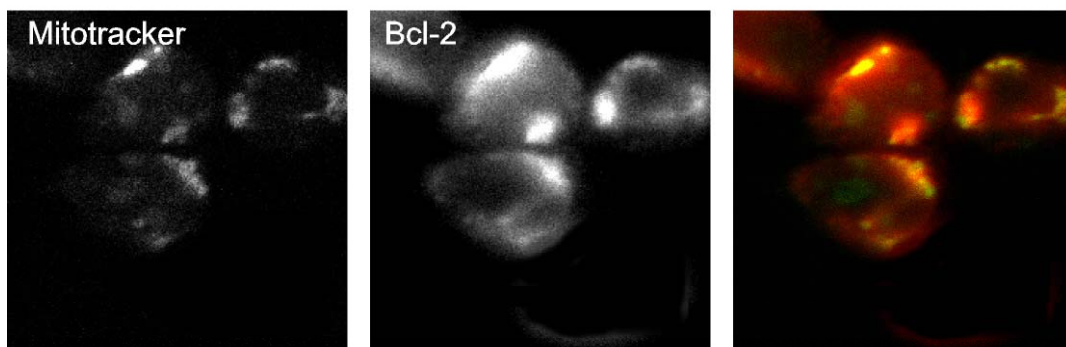
3.1.3 Die verschiedenen Mutanten unterscheiden sich nicht in der intrazellulären H⁺-Ionenkonzentration

Um auszuschließen, dass Unterschiede zwischen den verschiedenen Bcl-2-Mutanten auf Unterschieden in der intrazellulären H⁺-Ionenkonzentration beruhen, wurde der Ruhe-pH-Wert bestimmt. Hierfür wurde der ratiometrisch einsetzbare Fluoreszenz-Farbstoff SNARF®-1-AM verwendet. Die verschiedenen Bcl-2-Mutanten unterschieden sich nicht im intrazellulären pH-Wert (vgl. Abb. 12)

Wildtyp



ActA



Cb5

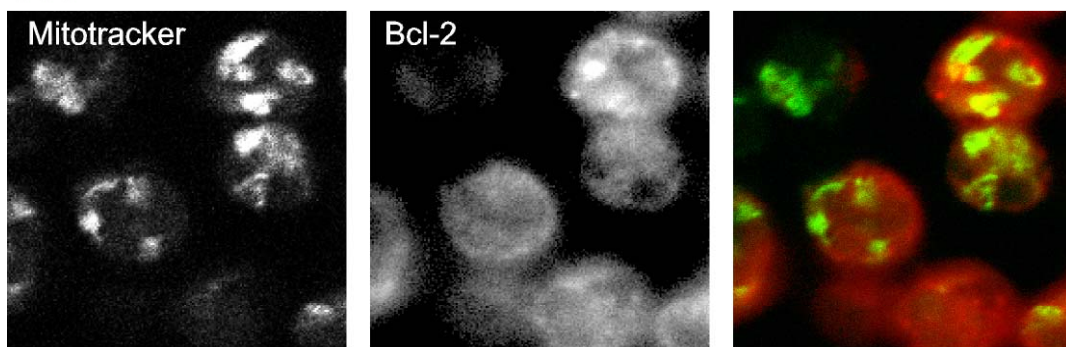
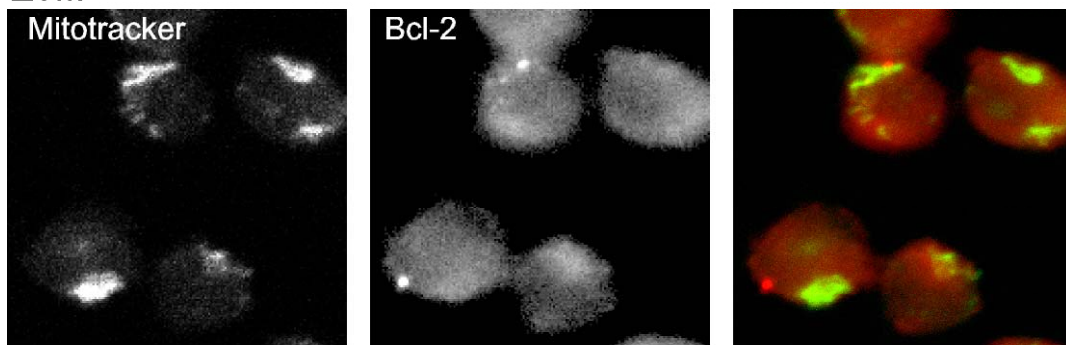
 Δ TM

Abbildung 11: Doppelfärbung von Mitochondrien und Bcl-2 in den verschiedenen transfizierten Zelllinien in Falschfarben. Mitochondrien wurden mit Mitotracker OrangeTM gefärbt und sind grün dargestellt. Bcl-2-Proteine wurde immunzytochemisch

mit einem CyTM5-gekoppelten Sekundärantikörper markiert und sind rot dargestellt. In intrazellulären Bereichen, in denen die Lokalisation von Mitochondrien und Bcl-2 übereinstimmt, führt die Addition von rot und grün zu einer gelben Darstellung. Die Kolokalisation von Mitochondrien und Bcl-2 ist in WT- und ActA-Zellen besonders ausgeprägt. In Cb5- und Δ TM-Zellen hingegen ist Bcl-2 auch in Bezirken repräsentiert, in denen sich keine Mitochondrien befinden. Dies zeigt der vermehrte rote Hintergrund in diesen Zellen.

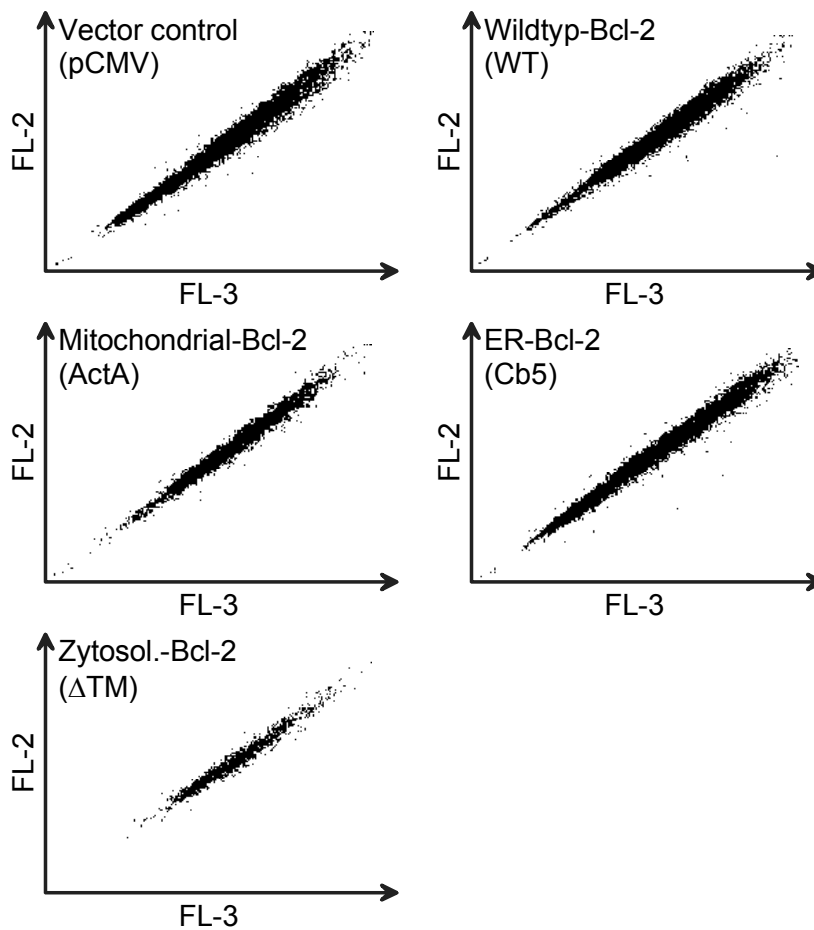


Abbildung 12: pH-Bestimmung in den verschiedenen Zelllinien. Die Diagramme zeigen die Verteilung der Zellen nach Färbung mit Farbstoff SNARF[®]-1-AM in den Kanälen FL-1 und FL-2 der FACS-Analyse. In dieser Darstellung entspricht die Steigung der Korrelationsgeraden dem intrazellulären pH-Wert. Die Steigung der Geraden ist in allen Zelllinien gleich. Unterschiede im pH-Wert konnten somit ausgeschlossen werden.

3.2 *Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$*

3.2.1 CCCP führt zu einem Zusammenbruch von $\Delta\Psi_m$

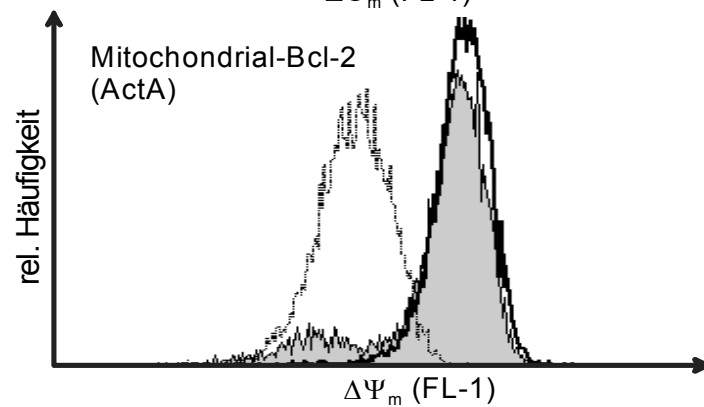
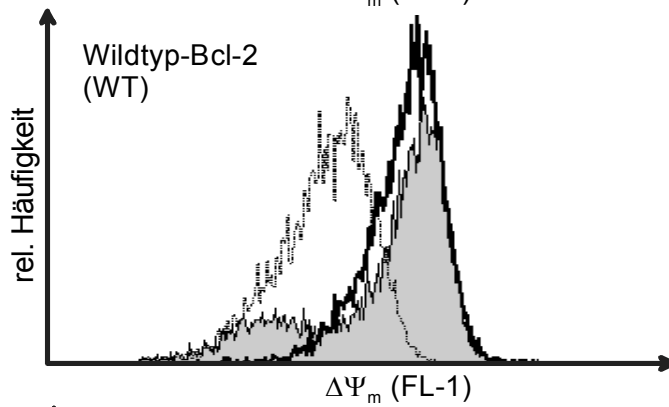
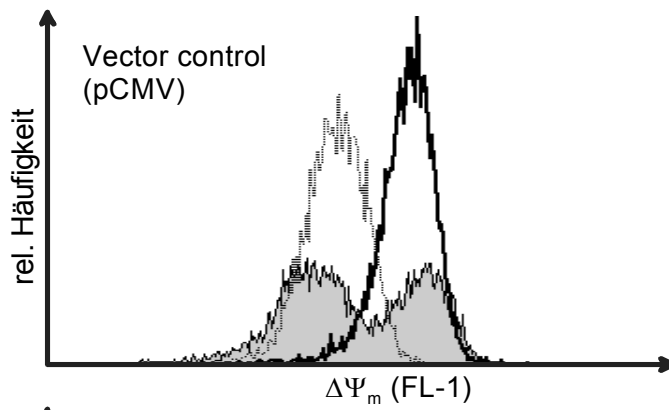
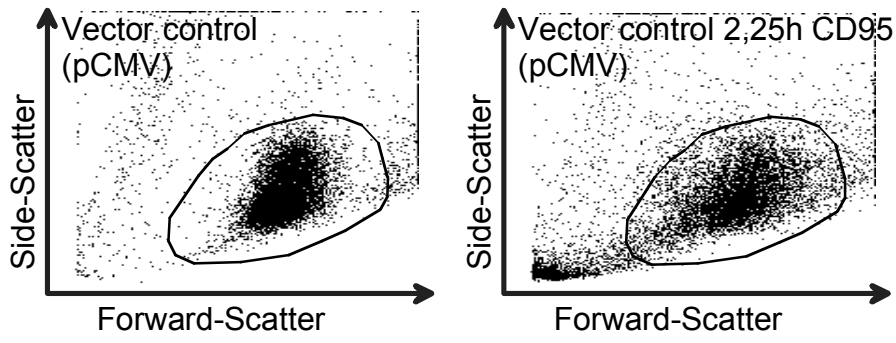
Im Rahmen CD95 vermittelter Apoptose kommt es zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$. Hier sollte untersucht werden, ob dies auch für die verwendeten Jurkat-Zellen gilt und inwiefern die Überexpression von Bcl-2 dies zu verhindern vermag. Zunächst sollte die Methode der $\Delta\Psi_m$ -Messung gesichert werden.

Das mitochondriale Membranpotential wurde mit Hilfe des lipophilen, kationischen Fluoreszenzfarbstoff DiOC₆ in der FACS-Analyse bestimmt. Der Nachweis, dass die Akkumulation und damit die Fluoreszenzintensität von DiOC₆ tatsächlich mit $\Delta\Psi_m$ korreliert, gelang, indem das mitochondriale Membranpotential mit 5 $\mu\text{Mol/l}$ des mitochondrialen Entkopplers CCCP künstlich zum Zusammenbruch gebracht wurde.

Abbildung 13 zeigt, dass die Fluoreszenzintensität von DiOC₆-gefärbten Zellen nach Applikation von CCCP deutlich abnimmt.

3.2.2 Überexpression von Bcl-2 verhindert den Zusammenbruch von $\Delta\Psi_m$

Das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi_m$ wurde 2,25 h nach Stimulation des CD95-Rezeptors in allen Zelllinien gemessen. Dabei zeigte sich, dass $\Delta\Psi_m$ in der Kontroll-Zelllinie VC (pCMV) in 50 % der Zellen bereits zusammengebrochen war. Dahingegen war $\Delta\Psi_m$ in Bcl-2 überexprimierenden Zelllinien weitgehend erhalten. Weiterhin zeigten sich deutliche Unterschiede in der Effektivität der verschiedenen Bcl-2 Varianten in der Verhinderung der mitochondrialen Depolarisation. Wildtyp Bcl-2 (WT) und mitochondrial lokalisiertes Bcl-2 (ActA) schützten sehr erfolgreich vor der mitochondrialen Depolarisation. Am ER lokalisiertes Bcl-2 (Cb5) schützte nur bedingt und zytosolisches Bcl-2 (ΔTM) gar nicht (vgl. Abb. 13)



Kontrolle
 2,25h nach CD95
 5μMol/l CCCP

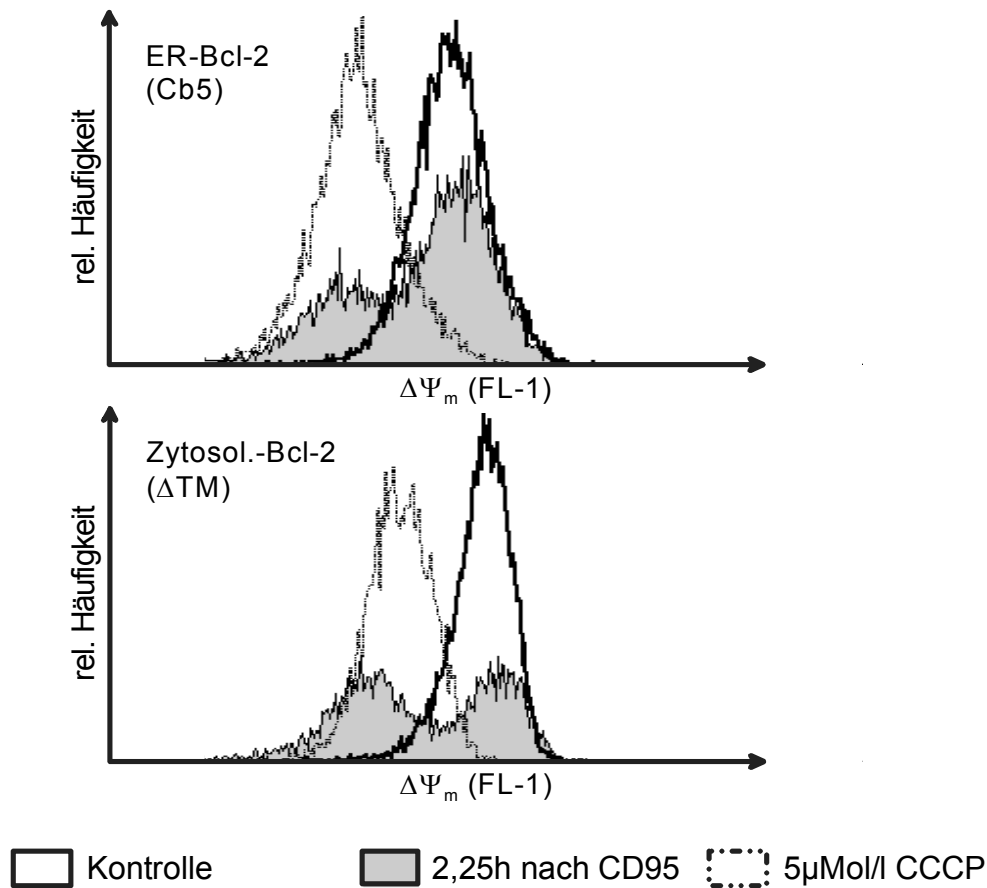


Abbildung 13: Messung des mitochondrialen Membranpotentials 2,25h nach Stimulation des CD95-Rezeptors mit einem aktivierenden Antikörper (CH11). Die Histogramme zeigen die Verteilung der Fluoreszenz der Zellen im Kanal FL-1 der FACS-Analyse nach Färbung mit DiOC₆. Die Fluoreszenz korreliert mit $\Delta\Psi_m$. In den Histogrammen sind nur lebende Zellen dargestellt, die im Forward-/Sidescatter selektiert wurden (eingerahmter Bereich).

5 μ Mol/l CCCP führt in allen Zelllinien zu einem Zusammenbruch von $\Delta\Psi_m$ (gestrichelte Linien). Die Verteilung von $\Delta\Psi_m$ in unstimulierten Kontrollen (durchgezogene Linie) und nach CCCP unterscheidet sich in den verschiedenen Zelllinien qualitativ nicht.

Deutliche Unterschiede zwischen den Zelllinien zeigen sich 2,25h nach CD95-Stimulation (grau gefüllt). In VC- und Δ TM-Zellen ist $\Delta\Psi_m$ in der Hälfte der Zellen depolarisiert, in WT- und ActA-Zellen hingegen nur ein geringer Anteil; Cb5-Zellen nehmen eine Mittelstellung ein.

3.3 Calcium-Messungen

3.3.1 Eichung der Calcium-Messungen

Für die folgenden Calcium-Messungen wurde eine Eichung des Messsystems mit Ionomycin durchgeführt. Dabei wurden die erforderlichen Faktoren für die Berechnung der absoluten Calcium-Konzentration aus den Ratio-Werten ermittelt (vgl. Abb. 14). Eine im selben Versuch durchgeführte Messung der Calcium-Konzentration in VC-Zellen nach Thapsigargin ergab eine im Median mittlere Ratio von 2,09. Unter Verwendung der mit Ionomycin ermittelten Faktoren ergibt sich hieraus eine Calcium-Konzentration von 850nMol/l. Dieser Wert diente u.a. zur Schätzung der Calcium-Konzentrationen in Calcium-Messungen per FACS. Die Eichung wurde für alle Zelllinien durchgeführt. Es ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Zelllinien in den für die Calcium-Berechnung notwendigen Faktoren. Es wurden deshalb für alle Zelllinien dieselben Faktoren veranschlagt.

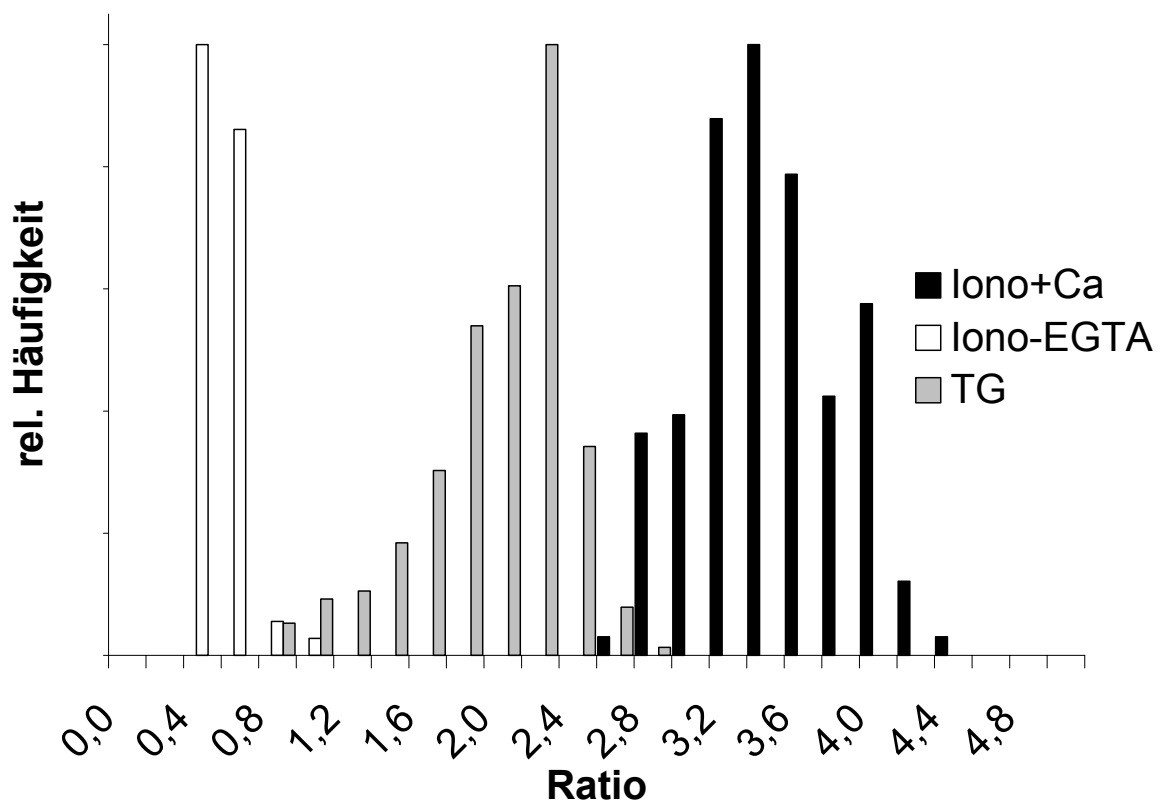


Abbildung 14: Verteilung der Ratiowerte im Video-Imaging mit Fura-2 in Calcium-freiem Ringer mit Ionomycin (20 μ Mol/l) und EGTA, Calcium-Ringer (2 mMol/l) mit Ionomycin und Calcium-Ringer und Thapsigargin (1 μ Mol/l). Aus den Median-Werten wurden die erforderlichen Faktoren für die Calcium-Berechnung ermittelt.

Zelltyp	pCMV	WT	ActA	Cb5	DTM
Ca²⁺-Ringer 2mmol + 20µmol Ionomycin					
Median Ratio	3,50	3,38	3,49	3,49	3,43
Standardabweichung	0,38	0,35	0,42	0,41	0,39
Zellzahl n	152	130	130	78	172
EGTA-Ringer +20µMol/l Ionomycin					
Median Ratio	0,58	0,58	0,61	0,60	0,57
Standardabweichung	0,11	0,11	0,09	0,10	0,10
Zellzahl n	70	39	49	73	61

	Ratio	λ_1	λ_2	
Ca²⁺-Ringer 2mmol + 20 µMol/l Ionomycin				
Median	3,38	99,00	29,00	$R_{\max} = 3,38$
Standardabweichung	0,42	30,25	7,35	
Zellzahl n	107			
EGTA-Ringer + 20 µMol/l Ionomycin				
Median	0,53	76,00	146,00	$R_{\min} = 0,53$
Standardabweichung	0,09	11,38	30,87	
Zellzahl n	66			

$\lambda_{2\max}/\lambda_{2\min} = 5,03$

Abbildung 15: Die Statistische Auswertung der Ratio-Werte ergab die Werte $R_{\max} = 3,38$; $R_{\min} = 0,53$; $\lambda_{2\max}/\lambda_{2\min} = 5,03$. Zwischen den verschiedenen Zelllinien bestanden keine größeren Unterschiede der Ratio unter dem Einfluß von Ionomycin.

3.3.2 Zeitverlauf des Calcium-Signales

Zur Simulation des Calcium-Signales der T-Zell-Rezeptoraktivierung wurde der Hemmstoff der endoplasmatischen Calcium-Pumpe (SERCA) Thapsigargin (TG) verwendet. Die Applikation von Thapsigargin führt zur Entleerung der intrazellulären Calcium-Speicher und damit zur Aktivierung von CRAC. Die CRAC-Aktivität kann durch Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration unter dem Einfluss von Thapsigargin ermittelt werden. Die Calcium-Konzentration wurde sowohl in allen FACS- wie auch in allen Video-Imaging-Experimenten 5 Minuten nach Gabe von Thapsigargin gemessen. Dieser zeitliche Abstand wurde nach Experimenten zum Zeitverlauf des Calcium-Signales festgelegt (vgl. Abb. 16). Die Experimente zeigten, dass nach 5 Minuten der Anstieg der Calcium-Konzentration durch die Entleerung intrazellulärer Speicher abgeklungen ist. In Calcium-Ringer wird 5 Minuten nach dem

ersten Calcium-Einstrom durch CRAC eine Plateau-Phase erreicht, in der sich die Calcium-Konzentration nicht mehr wesentlich ändert, und deren durchschnittliche Calcium-Konzentration ein Maß für die CRAC-Aktivität darstellt.

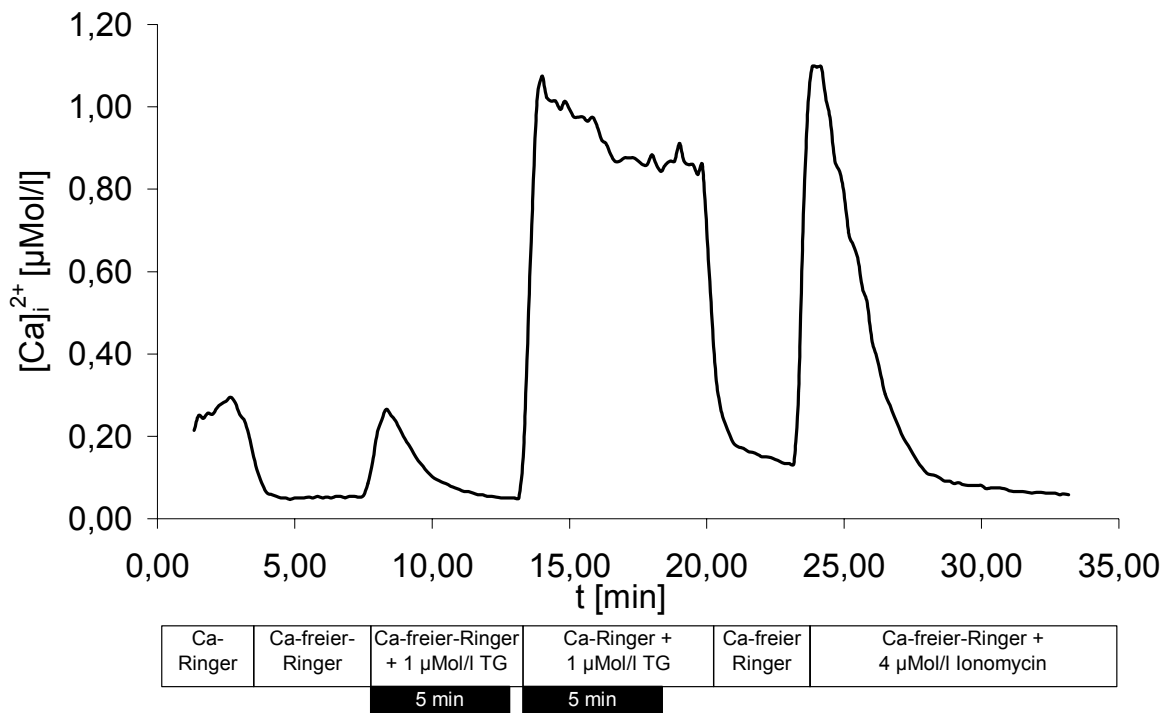


Abbildung 16: Experiment zum Zeitverlauf des Calcium-Signales im Video-Imaging unter Einsatz des Perfusionssystems zum Lösungswechsel. Die jeweiligen Lösungen sind in der unteren Zeile angegeben. Nach der Gabe von Thapsigargin in Calcium-freiem Ringer kommt es zu einem Anstieg der Calcium-Konzentration durch aus Speichern freigesetztes Calcium. Dieser ist nach 5 Minuten abgeklungen. Die Speicher sind in dieser Phase entleert und CRAC-Kanäle damit maximal aktiviert, was den starken Anstieg der Calcium-Konzentration nach der Bereitstellung von extrazellulärem Calcium erklärt. Nach der Plateauphase wurde extrazelluläres Calcium entzogen, die Calcium-Konzentration sank wieder auf den basalen Level ab. Durch 4 µMol/l Ionomycin wurde Calcium aus nicht-endoplasmatischen Calcium-Speichern freigesetzt. Dabei handelt es sich überwiegend um in Mitochondrien gespeichertes Calcium. Der Calcium-Peak unter Ionomycin stellt damit ein Maß für in Mitochondrien gespeichertes Calcium dar.

3.3.3 Die verschiedenen Bcl-2-Mutanten unterscheiden sich nicht im Calcium-Signal vor CD95-Rezeptor-Stimulation.

Das Calcium Signal wurde in allen Mutanten per FACS-Analyse gemessen. Es wurde in unstimulierten Zellen die intrazelluläre Calcium-Konzentration nach Thapsigargin bestimmt. In Abbildung 17 ist das Ergebnis eines typischen Experiments dargestellt. Die verschiedenen Zelllinien unterschieden sich weder wesentlich im Mittelwert noch in der Form der Verteilung.

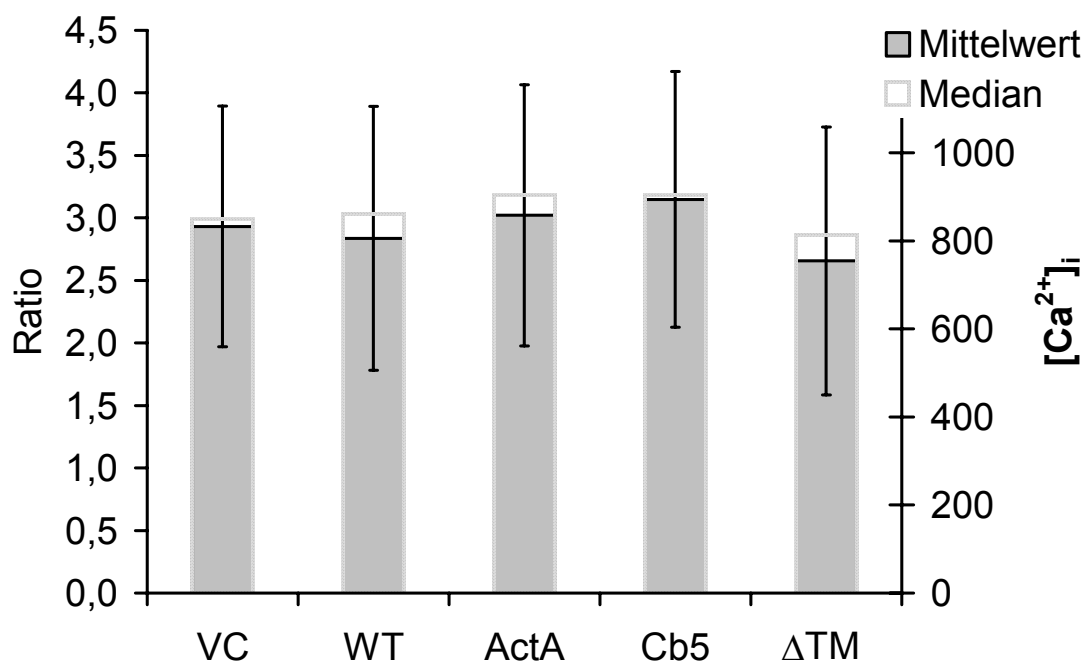


Abbildung 17: Mittlere Ratio FL-3 / FL-1 der FACS-Analyse nach 5 min 1 μ Mol/l Thapsigargin. Es sind Median und Mittelwert dargestellt, die Fehlerindikatoren zeigen eine Standardabweichung an. Die Unterschiede zwischen den Zelllinien liegen im Bereich der Standardabweichung.

3.3.4 Bcl-2 schützt vor CD95-vermitteltem CRAC-Block in Abhängigkeit von seiner intrazellulären Lokalisation.

In dieser Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob die Überexpression von Bcl-2 die Hemmung von CRAC-Kanälen nach CD95-Stimulation zu verhindern vermag. Das bedeutendste Experiment in diesem Zusammenhang war die Messung des Calcium-Signals nach Stimulation des CD95-Rezeptors. Hierfür wurde die intrazelluläre

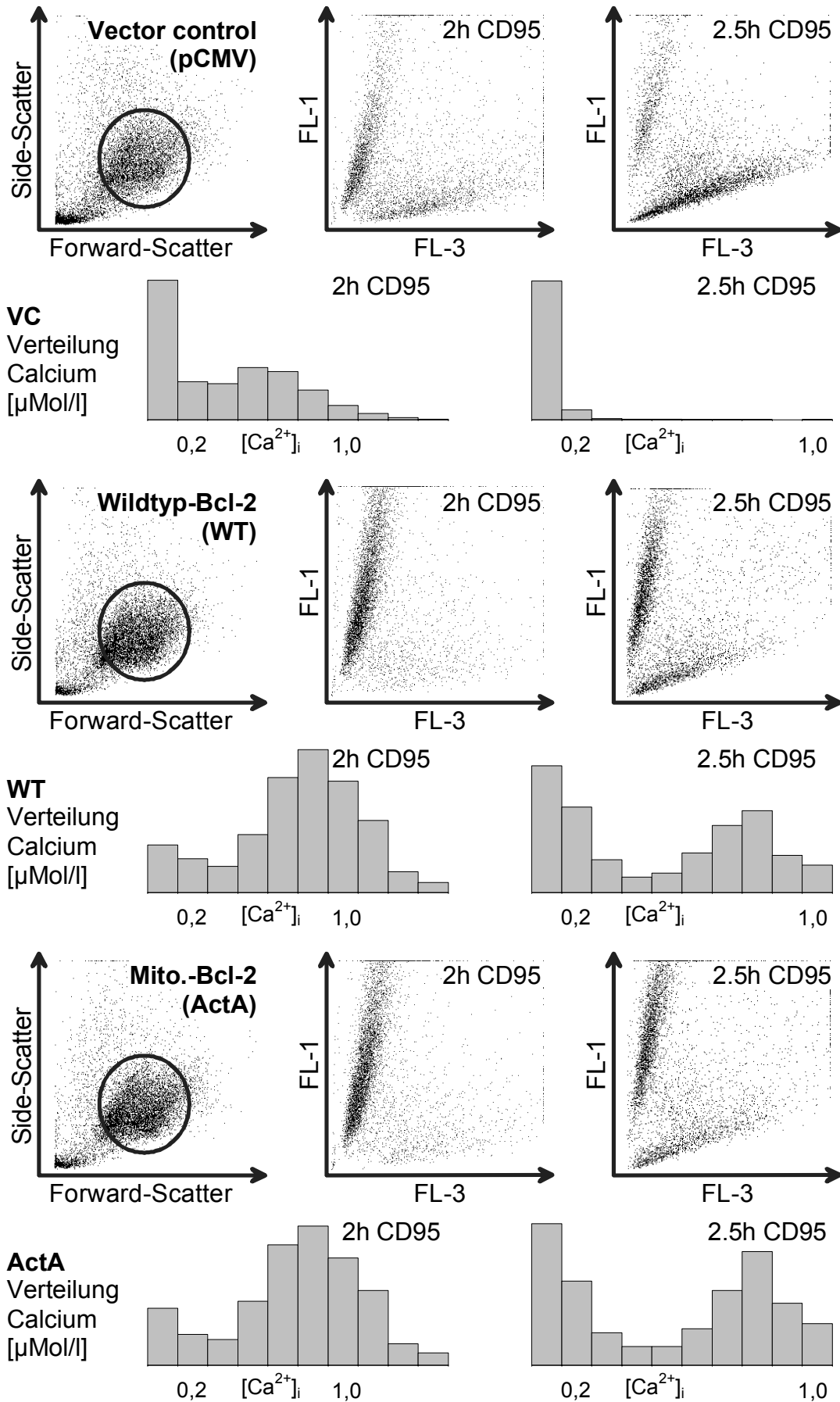
Calcium-Konzentration unter Thapsigargin nach Stimulation des CD95-Rezeptors durch einen aktivierenden Antikörper bestimmt.

Die Messungen ergaben, dass in Kontroll-Zellen (VC), sowie in der Zelllinie mit zytosolisch lokalisiertem Bcl-2 (Δ TM) bereits 2h nach CD95-Rezeptor-Stimulation in über 50 % der Zellen durch Thapsigargin kein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration mehr ausgelöst werden konnte. Die ausbleibende Reaktion auf Thapsigargin zeigt eine Hemmung von CRAC-Kanälen an. Ein vollständiger Block von CRAC-Kanälen wurde im Folgenden bei einer Ratio (FL-1/FL-3, Fluo-1/Fura Red) von 1,5 im FACS angenommen. Dies entspricht näherungsweise einer Calcium-Konzentration von 400 nMol/l.

In Zelllinien hingegen, die membrangebundenes Bcl-2 überexprimierten, blieb der CRAC-Block nach 2h weitgehend aus. Besonders effektiv im Schutz war Wildtyp-Bcl-2 (WT) und mitochondrial lokalisiertes Bcl-2 (ActA). ER-lokalisiertes Bcl-2 (Cb5) verhinderte den CRAC-Block nach 2h ebenfalls, wenngleich weniger effektiv. (Abb. 18)

Membrangebundenes Bcl-2 konnte die Hemmung von CRAC-Kanälen lediglich zeitlich verzögern, nicht aber vollständig verhindern. Dies zeigte eine Calcium-Messung 2,5 h nach CD95-Stimulation. Über 90% der Kontroll-Zellen wiesen einen CRAC-Block auf, aber auch in WT- und ActA-Zellen war in über 40% der Zellen ein CRAC-Block nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt werden die Unterschiede in der Effektivität der verschiedenen Bcl-2 Versionen besonders deutlich. Insbesondere zeigt sich, dass ER-gebundenes Bcl-2 (Cb5) dem mitochondrial lokalisierten (WT und ActA) im Schutz vor CRAC-Block unterlegen ist (Abb. 18)

Zur Bestätigung der FACS-Ergebnisse wurden Calcium-Messungen nach CD95-Stimulation auch mit der Video-Imaging-Technik durchgeführt (Abb. 19) Die Ergebnisse waren qualitativ gleich.



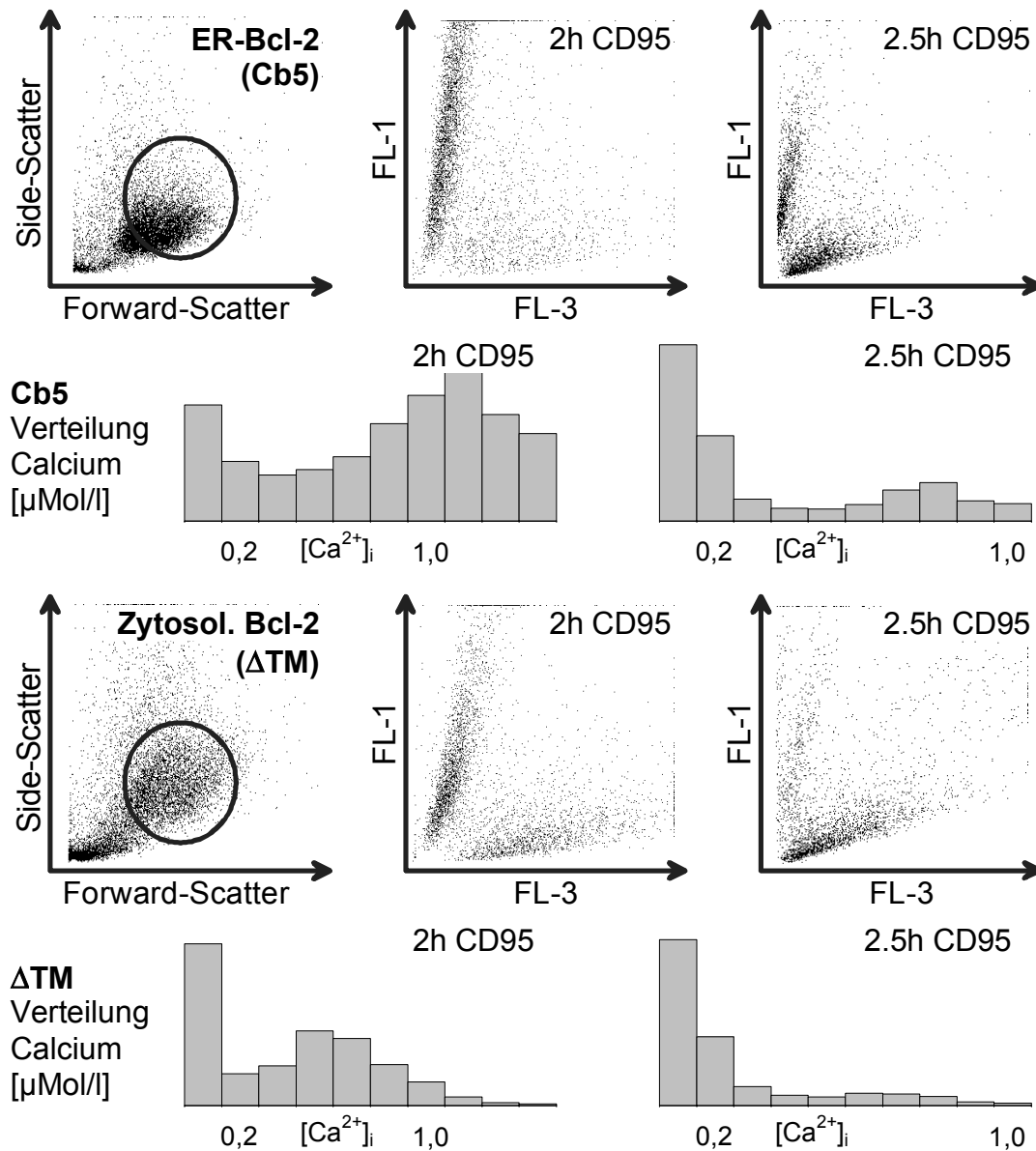


Abbildung 18: Calcium-Signale 2 h bzw 2,5 h nach CD95 Stimulation in allen Zelllinien. Die Punkt-Diagramme zeigen die Verteilung der Zellen in den FACS-Kanälen FL-1 und FL-3 nach Färbung mit Fura-Red und Fluo-1. Die Steigung der denkbaren Korrelationsgeraden entspricht der intrazellulären Calcium-Konzentration. Die Histogramme zeigen die Verteilung der entsprechenden Ratio-Werte mit zugeordneten Calcium-Werten. Es wurden nur im Forward-Side-Scatter selektierte Zellen zur Auswertung (Kreis) herangezogen. So selektierte Zellen entsprachen lebenden Zellen. Erläuterungen s. Text.

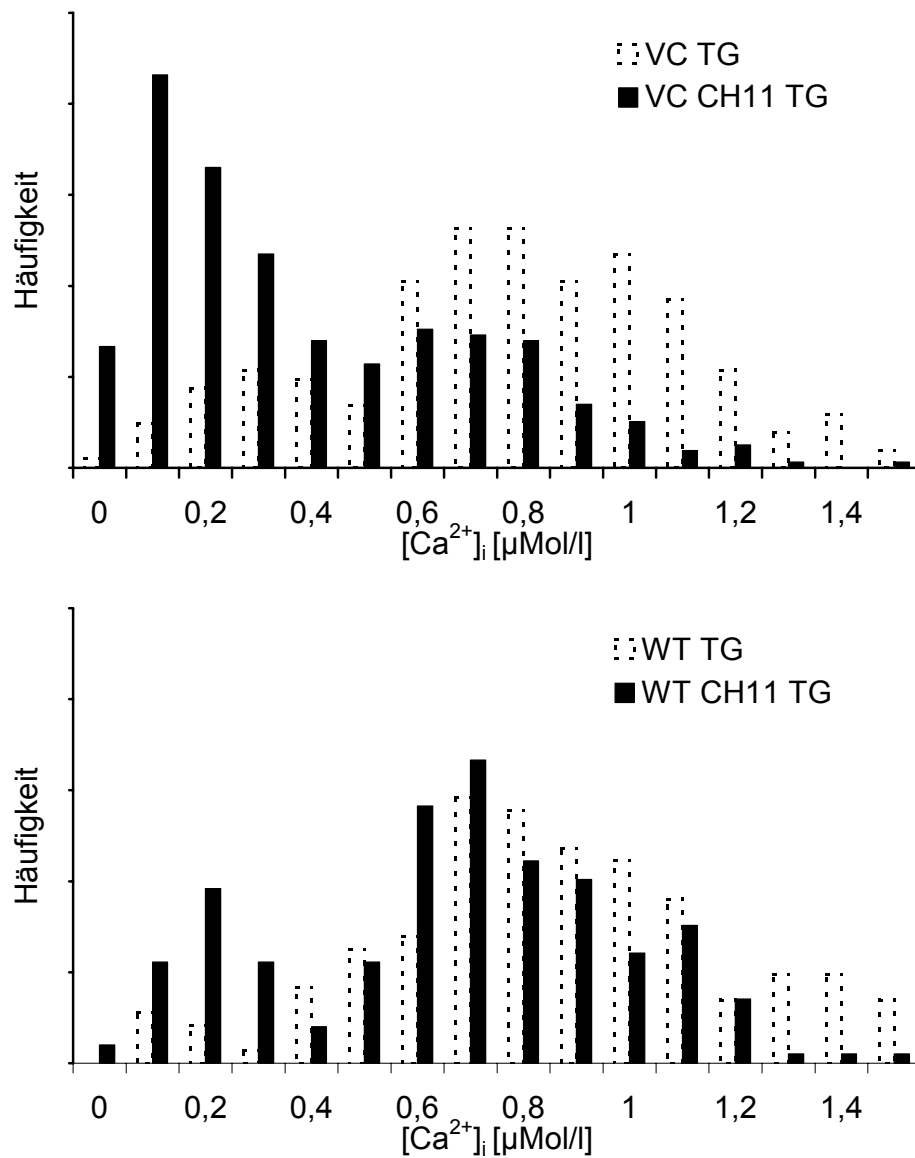


Abbildung 19: Calcium-Signal nach 2 h CD95-Stimulation in VC- und WT-Zelllinien (Thapsigargin 1 $\mu\text{Mol/l}$). Die Messung erfolgte im Video-Imaging-System unter Einsatz von Fura-2. Das Histogramm zeigt die Verteilung der Calcium-Konzentrationen in den gemessenen Zellen. Als Kontrolle sind unstimulierte Zellen dargestellt.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Überexpression und die erwartete Lokalisation von Bcl-2 in den transfizierten Zelllinien konnte mit Western-Blot und konfokaler Laser-scanning Mikroskopie nachgewiesen werden. Die einzelnen Zelllinien unterschieden sich nicht im pH-Wert, ein Einfluß der intrazellulären H^+ -Ionenkonzentration auf die Ergebnisse war damit ausgeschlossen.

Nach CD95-Stimulation bricht das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi_m$ in Kontroll-Zellen zusammen. Die Überexpression von Bcl-2 verhinderte bzw. verzögerte diesen Vorgang. Nur membrangebundenes Bcl-2 schützte vor $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch. Mitochondrial lokalisiertes Bcl-2 (WT, ActA) war effektiver als am ER-lokalisiertes Bcl-2.

CD95-Stimulation führt zu einer Blockade von CRAC-Calcium-Kanälen. Auch hiervor schützte membrangebundenes Bcl-2. Wie beim mitochondrialen Membranpotential war mitochondrial lokalisiertes Bcl-2 effektiver in der Verhinderung der CRAC-Blockade als ER-lokalisiertes Bcl-2.

Bei der simultanen Messung von $\Delta\Psi_m$ und dem Calcium-Signal nach CD95-Stimulation zeigte sich ein Zusammenhang zwischen $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch und der Blockade von CRAC-Kanälen.

4 Diskussion

4.1 *Die physiologische Bedeutung der CD95-vermittelten Hemmung von CRAC-Kanälen*

Die Hemmung von CRAC-Kanälen nach Stimulation des CD95-Rezeptors stellt einen potentiellen Mechanismus dar, über den Lymphozyten in ihrer Aktivierung gehemmt werden können. Anhaltend hohe Calcium-Konzentrationen sind für die Bildung von IL-2 notwendig (Negulescu et al., 1994). Die Öffnung von CRAC-Kanälen im Rahmen der T-Zell-Rezeptor-Aktivierung ist daher ein unumgänglicher Schritt für die Ausbildung einer Immunreaktion. Ein ausbleibendes Calcium-Signal findet sich z.B. in Patienten mit primärer Immundefizienz (Partiseti et al., 1994).

Die am besten untersuchte Aufgabe von CD95 in Lymphozyten ist die Induktion von Apoptose. Es gibt Hinweise, dass dies nicht die einzige Funktion ist. So exprimieren frisch aktivierte Lymphozyten zwar CD95, sind aber gegenüber CD95-vermittelter Apoptose resistent (Peter et al., 1997; Klas et al., 1993). Zweitens führen dominant negative Mutationen in der FADD-Domäne nicht zu der erwarteten lymphoproliferativen Erkrankung wie in *lpr-/gld*-Mäusen, sondern die Lymphozyten werden im Gegenteil schneller eliminiert (Newton et al., 1998; Walsh et al., 1998; Zhang et al., 1998). Weiterhin wurde in Mäusen, denen ein CD95-Ligand exprimierender Tumor inoculiert worden war, eine fehlerhafte Lymphozytenfunktion und nicht nur Apoptose der Lymphozyten beobachtet (Arai et al., 1997).

Die Expression von CD95-Ligand stellt prinzipiell einen Mechanismus dar, mit dem sich maligne Tumoren gegenüber dem Angriff von Lymphozyten schützen können (Strand et al., 1996). Die Injektion von Melanomzellen führte in Mäusen zur schnellen Bildung eines Tumors. In *lpr*-Mäusen, denen der CD95-Rezeptor fehlt, war das Tumorstadium deutlich verzögert (Gunter und Pfeiffer, 1990).

Die Präsenz von CD95-Ligand in Tumoren führt nicht nur zur Induktion von Apoptose in Tumor-infiltrierenden Lymphozyten. Vielmehr werden Lymphozyten in einen Zustand versetzt, in dem sie nicht mehr in der Lage sind, auf Antigen adäquat zu reagieren. Dieser Zustand wird als Anergie bezeichnet (Staveley-O'Carroll et al., 1998). Eine solche Tumor-Anergie wird z.B. in Glioblastom-Patienten beobachtet. Es wurde nachgewiesen, dass die vorhandene Immunsuppression nicht auf clonaler Deletion von T-Lymphozyten, sondern auf einer defekten Lymphozyten-Funktion beruht (Morford et

al., 1997). Das Phänomen der Anergie ist mit der Induktion von Apoptose allein nicht zu erklären. Periphere T-Zellen sind unter bestimmten Umständen resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Dieser Resistenz liegt eine mangelnde Aktivierung von Caspase 8 zugrunde. Erst nach mehrtägiger Behandlung mit IL-2 werden diese Zellen sensitiv gegenüber CD95-Aktivierung (Peter et al., 1997).

Auch in früheren Studien war bereits eine durch CD95 verursachte Störung im T-Zell-Rezeptor-Signalweg als Erklärung für die funktionelle T-Zell-Anergie vorgeschlagen worden (Kovacs und Tsokos, 1995; Bossu et al., 1993). In den Lymphozyten von *lpr*-Mäusen wurde ein Defekt in der Induktion und Erhaltung clonaler Anergie nachgewiesen, indem ein autoreaktiver T-Zell-Rezeptor eingeführt wurde. Lymphozyten, die den autoreaktiven T-Zell-Rezeptor enthielten, wiesen in *lpr*-Mäusen gegenüber Kontrollen eine erhöhte Zytotoxizität auf (Zhou et al., 1991).

Die auch in dieser Arbeit nachgewiesene Hemmung des Calcium-Einstromes über CRAC im Rahmen der T-Zell-Aktivierung bietet u.a. eine elegante Erklärung für eine Immunsuppression durch CD95 trotz Apoptose-Resistenz, wie sie in Tumorpatienten beobachtet wird.

Nicht nur der CD95-Rezeptor kann über eine Hemmung des Calcium-Einstroms durch CRAC zu einer Immunsuppression führen. Von Progesteron wurde ebenfalls gezeigt, dass es in Lymphozyten den Calcium-Einstrom blockieren kann. So könnte eine lokale Unterdrückung des Immunsystems in der Plazenta in der Schwangerschaft erklärt werden, die die Abstoßung des Fetus verhindert (Ehring et al., 1998). Auch vom Tumor-Nekrose-Faktor α wurde gezeigt, dass es in dessen Signalweg zu einer CRAC-Blockade kommt (Törnquist et al., 1999).

4.2 *Der Mechanismus des CRAC-Blocks*

In dieser Arbeit wurde der Mechanismus der Hemmung von CRAC-Kanälen nach CD95-Stimulation untersucht. Die Hypothese wurde geprüft, ob die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ im Rahmen der CD95-Aktivierung für den beobachteten CRAC-Block verantwortlich ist. Dieser Hypothese lag eine Studie von Hoth et al. zugrunde (Hoth et al., 1997). Hoth et al. hatten darin gezeigt, dass Mitochondrien Calcium in der Nähe von CRAC-Kanälen aufnehmen und an anderer Stelle in der Zelle wieder freigeben. Mitochondrien verhindern so, dass über CRAC

einströmendes Calcium lokal am Kanal akkumuliert und so zur schnellen Inaktivierung des Kanals führt. Eine Hemmung der Atmungskette durch eine Kombination Antimycin/Oligomycin oder durch CCCP führte in dieser Studie zu einer Hemmung von CRAC-Kanälen. Außerdem nahm der mitochondriale Calciumgehalt rapide ab, was zeigt, dass depolarisierte Mitochondrien kein Calcium mehr aufnehmen können. Für die Aufnahme von Calcium in Mitochondrien ist der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher der inneren Mitochondrienmembran verantwortlich. Die Triebkraft für diesen Austausch stellt in gesunden Mitochondrien das stark negative mitochondriale Membranpotential dar (Gunter und Pfeiffer, 1990). Mitochondriale Entkoppler wurden auch in anderen Studien eingesetzt, in denen ebenfalls in Jurkat-Zellen gezeigt wurde, dass die mitochondriale Depolarisation zu einer Hemmung des Calcium-Einstroms über CRAC führt (Makowska et al., 2000). Funktionierende Mitochondrien sind somit notwendig für die NFAT-Translokation im Rahmen der Lymphozytenaktivierung. Akute Depolarisation (1 $\mu\text{Mol/l}$ CCCP) von Mitochondrien verhindert die NFAT-Translokation (Hoth et al., 2000)

Im Rahmen der CD95-Aktivierung kommt es zu einem Zusammenbruch von $\Delta\Psi_m$ durch mitochondriale Permeability Transition (Narita et al., 1998). Die Überexpression von Bcl-2 wurde als Werkzeug verwendet, das die Depolarisation der Mitochondrien hemmen sollte. Wie die Ergebnisse zeigen, verhindert Bcl-2 den Zusammenbruch von $\Delta\Psi_m$. In genau derselben Weise schützt Bcl-2 auch vor CRAC-Block. In $\Delta\Psi_m$ -Messungen und Calcium-Messungen zeigte sich dabei ein identisches Muster im Vergleich der Effektivität der verschiedenen Lokalisationen von Bcl-2. Wildtyp-Bcl-2 und mitochondrial lokalisiertes Bcl-2 schützten in beiden Fällen besser als ER-lokalisiertes Bcl-2. Es konnte erwartet werden, dass mitochondrial lokalisiertes Bcl-2 (WT, ActA) den $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch effektiver verhindern würde, als am ER lokalisiertes Bcl-2. ER-lokalisiertes Bcl-2 vermag den CRAC-Block nicht durch andere Mechanismen zu verhindern, sondern hat genau soviel Einfluss auf den CRAC-Block wie auf das Mitochondrienpotential. Folglich scheint ausschließlich das zusammengebrochene Mitochondrienpotential für die CRAC-Hemmung verantwortlich zu sein.

Neben der Inaktivierung von CRAC durch eine Beeinflussung des Mitochondrienpotentials wurde auch eine mögliche Rolle von Sphingolipiden als

Botenstoff beschrieben (Lepple-Wienhues et al., 1999). Die Aktivierung von CD95 führt möglicherweise über die Aktivierung der sauren Sphingomyelinase (ASM) zur Abspaltung von Ceramiden aus Sphingolipiden der Zellmembran (Gulbins et al., 1995). Sphingolipide sind prinzipiell in der Lage, direkt einen CRAC-Block hervorzurufen (Mathes et al., 1998; Törnquist et al., 1999; Breittmayer et al., 1994). Ceramid selbst induziert Cytochrom-Release in isolierten Mitochondrien, $\Delta\Psi_m$ bleibt dabei aber erhalten (Ghafourifar et al., 1999). Über Bildung des Gangliosids GD3 kann jedoch auch Ceramid eine mitochondriale Permeability Transition hervorrufen, ein Schritt, der wiederum durch Bcl-2 hemmbar ist (Kristal und Brown, 1999). Unter Einbeziehung der Ergebnisse dieser Arbeit ergeben sich die folgenden Schlussfolgerungen. Bcl-2 verhindert den CRAC-Block nach CD95-Stimulation zunächst vollständig. Die direkte Hemmung von CRAC durch Sphingolipide, die durch die saure Sphingomyelinase (ASM) gebildet werden, kann als Mechanismus also weitgehend ausgeschlossen werden. Entweder werden Sphingolipide in nicht ausreichender Konzentration hierfür gebildet oder die ASM-Aktivierung ist selbst durch Bcl-2 hemmbar. In jedem Fall zeigt die Korrelation zwischen $\Delta\Psi_m$ -Verfall und CRAC-Block aber, dass die mitochondriale Depolarisation ein unumgänglicher Schritt bei der Blockierung von CRAC durch CD95 ist.

4.3 Mitochondrien und Calcium

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine neue Rolle der Mitochondrien im Rahmen der CD95-Aktivierung, indem sie das Calcium-Signal der Aktivierung des T-Zell-Rezeptors modulieren. Das Zusammenwirken zwischen Mitochondrien und Calcium ist sehr komplex und war Gegenstand einer Vielzahl von Studien (Duchen, 2000). So spielt Calcium eine Rolle bei der Signaltransduktion vom Zytosol in Mitochondrien und kann dort die Aktivität der Atmungskette regulieren (Robb-Gaspers et al., 1998; Ichas et al., 1997; Duchen et al., 1998). Außerdem wurde gezeigt, dass intrazelluläre Calcium-Signale, unter anderem die des IP_3 -Rezeptors, die Öffnung der PT-Pore induzieren können. Dieser Prozess ist reversibel (Minamikawa et al., 1999). So kann es zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien kommen, ohne dass die Fähigkeit der Mitochondrien zur ATP-Bildung längerfristig eingeschränkt würde (Szalai et al., 1999). Die Öffnung der PT-Pore durch hohe Calcium-Konzentrationen wäre durchaus

auch ein denkbarer Mechanismus, über den es im Rahmen der Apoptose zu einer Rückkopplungshemmung zur Steuerung des intrazellulären Calciums kommen könnte. Wie in dieser Arbeit und in der Arbeit von Hoth et al. (Hoth et al., 1997) gezeigt wurde, kommt es nach einer Depolarisation der Mitochondrien zur Hemmung des Calcium-Einstromes aus dem Extrazellulärraum. Dafür spricht auch, dass Mitochondrien als Calcium-Puffer für intrazelluläres Calcium agieren und so die langsame Aktivierung und Inaktivierung von CRAC-Kanälen steuern (Gilibert und Parekh, 2000; Gilbert et al., 2001).

4.4 *Bcl-2 und Calcium*

Die Beobachtung, dass Bcl-2 Ähnlichkeiten mit einem porenformenden bakteriellen Toxin aufweist (Minn et al., 1997; Muchmore et al., 1996), hat zu vielfältigen Spekulationen geführt, wie Bcl-2 den Calciumgehalt intrazellulärer Speicher beeinflussen soll. So reduziert Bcl-2 die Beladung der Calcium-Speicher und den kapazitiven Calcium-Einstrom in HeLa-Zellen (Pinton et al., 2000). Andererseits verhindert Bcl-2 aber auch deren Entleerung (He et al., 1997). Solche Effekte könnten eventuell das etwas veränderte Proliferationsverhalten von Zellen erklären, die ER-gerichtete Bcl-2 überexprimieren. Diese Zellen waren in der Regel kleiner als die anderen Bcl-2 Mutanten oder Kontrollen. In Messungen des durch Thapsigargin aus dem ER freigesetzten Calciums in den hier verwendeten Jurkat-Zellen waren allerdings keine Unterschiede zwischen den Bcl-2 Mutanten aufgefallen. In der akuten Situation der CD95-Rezeptor-Stimulation dürften solche eher geringfügigen Effekte keinen Einfluss haben.

4.5 *Bcl-2 und Mitochondrien*

In Abhängigkeit von der Hemmbarkeit CD95-vermittelter Apoptose durch Bcl-2 werden zwei Zelltypen unterschieden. In Typ-I-Zellen ist die Apoptose durch CD95 nicht durch Bcl-2 verhinderbar, da die Caspasen-Aktivierung nach der Ausbildung der DISC ausreicht, die Apoptose-Maschinerie in Gang zu setzen. In Typ-II-Zellen ist die Caspase-8 Aktivierung an der DISC nach CD95-Stimulation schwach ausgeprägt. Diese Zellen benötigen den mitochondrialen Signalweg als Verstärkungsmechanismus.

Mitochondriale apoptotische Aktivität wie $\Delta\Psi_m$ -Verlust und Freisetzung von Cytochrom c wird durch Bcl-2 komplett unterbunden (Scaffidi et al., 1999). In den Jurkat-Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, ließ sich die Apoptose durch die Überexpression von Bcl-2 deutlich verzögern, wenngleich nicht völlig verhindern. Jurkat-Zellen gehören also den Typ-II-Zellen an. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen in anderen Studien überein (Linsinger et al., 1999). Die Caspase-8 Aktivierung war zwar zu schwach ausgeprägt, als dass der mitochondriale Signalweg keine Rolle gespielt hätte, aber dennoch ausreichend, um die Apoptose auch bei blockiertem mitochondrialen Signalweg voranzutreiben. Die Versuche wurden in einem Zeitfenster durchgeführt, in dem Bcl-2 die mitochondriale Depolarisation wirksam verhinderte.

Der genaue Mechanismus, über den es im Rahmen der CD95-vermittelten Apoptose zu der mitochondrialen Depolarisation kommt, ist noch umstritten. Es spricht aber einiges dafür, dass Caspase 8 das proapoptotische Mitglied der Bcl-2-Familie BID spaltet, das dann den $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch vermittelt (Li et al., 1998).

In dieser Arbeit wurden genetisch manipulierte Bcl-2-Varianten eingesetzt, um den Einfluss der Lokalisation von Bcl-2 in der Zelle zu untersuchen. Die verwendeten Vektoren waren schon in anderen Studien eingesetzt worden, in denen die intrazelluläre Lokalisation bereits nachgewiesen worden war (Froesch et al., 1999). Dennoch wurde die Lokalisation der verschiedenen Bcl-2-Versionen in dieser Studie nochmals mittels konfokaler Mikroskopie untersucht, um sicher zu gehen, dass die erwartete Lokalisation auch in Jurkat-Zellen vorhanden war.

Die Bindung von Bcl-2 an intrazelluläre Membranen ist eine notwendige Voraussetzung für die antiapoptotische Funktion von Bcl-2. Entsprechend schützte zytosolisch lokalisiertes Bcl-2 nicht vor Apoptose, während membrangebundenes Bcl-2 (WT, ActA, Cb5) einen deutlich antiapoptotischen Effekt zeigten. Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Studien überein (Froesch et al., 1999). Auch in dieser Arbeit schützte ER-gebundenes Bcl-2 (Cb5) nicht ganz so effektiv. In einer Studie, in der Bcl-2-Vektoren in verschiedenen Zelllinien getestet wurden, zeigte sich, dass Cb5 in Rat-1/myc-Zellen vor Apoptose schützte, mitochondrial lokalisiertes Bcl-2 hingegen nicht. In MDCK-Zellen war es dagegen genau umgekehrt (Zhu et al., 1996). Daraus kann man schließen, dass ER-gebundenes Bcl-2 (Cb5) nicht generell weniger wirksam in der

Verhinderung von Apoptose ist als mitochondrial lokalisiertes. Vielmehr hemmt Bcl-2 die Apoptose durch unterschiedliche Wirkmechanismen, die auf verschiedene zelluläre Kompartimente beschränkt sind. Die Verhinderung des CRAC-Blocks war überwiegend auf den mitochondrialen Wirkmechanismus zurückzuführen.

5 Zusammenfassung

Zielsetzung dieser Arbeit war es, den Signalweg aufzuklären, über den die Stimulation des CD95-Rezeptors CRAC-Kanäle hemmt. Da das Calcium-Signal der T-Zellrezeptor-Aktivierung für die Proliferation und Zytokinproduktion erforderlich ist, stellt die Hemmung von CRAC-Kanälen einen Mechanismus dar, über den Lymphozyten in einen Zustand versetzt werden, in dem sie nicht mehr auf Antigen reagieren können. So könnten sich CD95-Ligand exprimierende Tumoren der Immunabwehr entziehen.

Unter Verwendung von Bcl-2 überexprimierenden Zellen konnte gezeigt werden, dass Bcl-2 in der Lage ist, den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ im Rahmen der CD95-vermittelten Apoptose zu verhindern. Damit wird auch der CRAC-Block vollständig verhindert. Beide Vorgänge stehen nicht nur zeitlich in engem Zusammenhang. Die Verwendung von Bcl-2 in unterschiedlichen intrazellulären Lokalisationen zeigte außerdem, dass die Verhinderung der mitochondrialen Depolarisation und der Schutz vor CRAC-Block durch unterschiedlich lokalisiertes Bcl-2 nach genau dem selben Muster verlief. Nur mitochondrial lokalisiertes Bcl-2 konnte den CRAC-Block wie auch den $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch uneingeschränkt wirksam verhindern. Am ER lokalisiertes Bcl-2 oder gar zytosolisches Bcl-2 waren weniger wirksam bzw. wirkungslos.

Die Ergebnisse dieser Arbeit schliessen eine unmittelbare Hemmung von CRAC durch den CD95-Rezeptor aus. Dafür zeigen sie einen direkten Zusammenhang zwischen $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch und CRAC-Block. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass nur funktionierende Mitochondrien CRAC-Kanäle offen halten, indem sie Calcium aufnehmen und so eine Selbsthemmung der Kanäle verhindern.

Diese Studie beweist erstmals, dass der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ ein essentieller und hinreichender Schritt für die Hemmung von CRAC-Calcium-Kanälen nach CD95-Rezeptorstimulation ist.

6 Literaturverzeichnis

Acuto, O. Cantrell, D.

T cell activation and the cytoskeleton

Annu. Rev. Immunol. 2000; 18: 165-184

Adams, J.M. Cory, S.

The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival

Science 1998; 281: 1322-1326

Alnemri, E.S. Livingston, D.L., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A.,

Wong, W.W., Yuan

Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature

Cell 1996; 87: 171

Arai, H. Chan, S.Y., Bishop, D.K., Nabel, G.J.

Inhibition of the alloantibody response by CD95 ligand

Nat. Med. 1997; 3: 843-8

Berridge, M.J.

Inositol trisphosphate and calcium signalling

Nature 1993; 361: 315-25

Berridge, M.J.

Capacitive calcium entry

Biochem. J. 1995; 312: 1-11

Boldin, M.P. Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., Wallach, D.

Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1-
and

TNF receptor-induced cell death

Cell 1996; 85: 803-15

Bossu, P. Singer, G.G., Andres, P., Ettinger, R., Marshak-Rothstein, A., Abbas, A.K.

Mature CD4⁺ T lymphocytes from MRL/lpr mice are resistant to receptor- mediated
tolerance and apoptosis

J. Immunol. 1993; 151: 7233-7239

Breitmayer, J.P. Bernard, A., Aussel, C.

Regulation by sphingomyelinase and sphingosine of Ca²⁺ signals elicited by CD3
monoclonal antibody, thapsigargin, or ionomycin in the Jurkat T cell line

J. Biol. Chem. 1994; 269: 5054-5058

Chao, D.T. Korsmeyer, S.J.

Bcl-2 family: Regulators of cell death

Annu. Rev. Immunol. 1998; 16: 395-419

- Chinnaiyan, A.M. O'Rourke, K., Tewari, M., Dixit, V.M.
FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis
Cell 1995; 81: 505-12
- Conradt, B. Horvitz HR, H.R.
The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9
Cell 1998; 93: 519-529
- Davis, M.M. Bjorkman, P.M.
T cell antigen receptor genes and T cell recognition
Nature 1988; 334: 395-402
- Dhein, J. Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Kneitz, B., Herrmann, T., Yonehara, S.
Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95)
Nature 1995; 373: 438-41
- D'Souza, S.D. Bonetti, B., Balasingam, V., Cashman, N.R., Barker, P.A., Troutt, A.B., Raine, C.S., Antel, J.P.
Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death
J. Exp. Med. 1996; 184: 2361-2370
- Duan, H. Dixit, V.M.
RAIDD is a new 'death' adaptor molecule
Nature 1997; 385: 86-9
- Duchen, M.R. Leyssens, A., Crompton, M.
Transient mitochondrial depolarisations reflect focal sarcoplasmic reticular calcium release in single rat cardiomyocytes
J. Cell Biol. 1998; 142: 975-988
- Duchen, M.R.
Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death
J. Physiol. 2000; 529: 57-68
- Ehring, E.R. Kerschbaum, H.H., Eder, C., Neben, A.L., Fanger, C.M., Khoury, R.M., Negulescu, P.A., Cahalan, M.D.
A nongenomic mechanism for progesterone-mediated immunosuppression: inhibition of K⁺ channels, Ca²⁺ signaling, and gene expression in T lymphocytes
J. Exp. Med. 1998; 188: 1593-602
- Ellis, H.M. Horvitz, H.R.
Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*
Cell 1986; 44: 817-829

Fisher, D.E.

The p53 tumor suppressor: critical regulator of life & death in cancer
Apoptosis 2001; 6: 7-15

Friesen, C. Herr, I., Krammer, P.H., Debatin, K.-M.

Involvement of the CD95 (Apo-1, Fas) receptor/ligand system in drug-induced
apoptosis in leukemia cells
Nat. Med. 1996; 2: 574-577

Froesch, B.A. Aimé-Sempé, C., Leber, B., Andrews, D., Reed, J.C.

Inhibition of p53 Transcriptional Activity by Bcl-2 requires its membrane-anchoring
domain
J. Biol. Chem. 1999; 274: 6469-6475

García-Ruiz, C. Colell, A., Marí, M., Morales, A., Fernández-Checa, J.C.

Direct Effect of Ceramide on the Mitochondrial Electron Transport Chain Leads to
Generation of Reactive Oxygen Species
J. Biol. Chem. 1997; 272: 11369-11377

Genot, E. Cleverley, S., Cantrell D.A.

Multiple p21ras effector pathways regulate nuclear factor of activated T cells
EMBO J. 1996; 15: 3923-33

Ghafourifar, P. Klein, S.D., Schucht, O., Schenk, U., Pruschy, M., Rocha, S., Richter,
C.

Ceramide induces cytochrome c release from isolated mitochondria
J. Biol. Chem. 1999; 274: 6080-6084

Gilabert, J.A. Parekh, A.B.

Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the
store-operated Ca²⁺ current ICRAC
EMBO J. 2000; 19: 6401-6407

Gilabert, J.A. Bakowski, D., Parekh, A.B.

Energized mitochondria increase the dynamic range over which inositol 1,4,5
triphosphate operates store-operated calcium influx
EMBO J. 2001; 20: 2672-2679

Gillis, S. Watson, J.

Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V.
Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line
J. Exp. Med. 1980; 152: 1709-19

Green, D.R. Reed, J.C.

Mitochondria and Apoptosis
Science 1998; 281: 1309-1312

Griffith, T.S. Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R., Ferguson, T.A.
Fas-ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege
Science 1995; 279: 1189-1192

Grynkiewicz, G. Poenie, M., Tsien, R.Y.
A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties
J. Biol. Chem. 1985; 260: 3440-50

Gulbins, E. Bissonnette, R., Mahboubi, A., Martin, S., Nishioka, W., Brunner, T., Baier, G., Baier-Bitterlich, G., Byrd, C., Lang, F.
FAS-induced apoptosis is mediated via a ceramide-initiated RAS signaling pathway
Immunity 1995; 2: 341-51

Gunter, T.E. Pfeiffer, D.R.
Mechanisms by which mitochondria transport calcium
Am. J. Physiol. 1990; 258: C755-C786

Hahne, M. Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L.E., Schreier, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J., Tschopp, J.
Melanoma cell expression of Fas (APO-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape
Science 1996; 274: 1363-1366

He, H. Lam, M., McCormick, T.S., Distelhorst, C.W.
Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by bcl-2
J. Cell Biol. 1997; 138: 1219-1228

Hengartner, M.O. Horvitz, H.R.
C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2
Cell 1994; 76: 665-76

Hoth, M Fanger, C.M., Lewis, R.S.
Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes
J. Cell Biol. 1997; 137: 633-648

Hoth, M. Penner, R.
Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells
Nature 1992; 355: 353-6

Hoth, M. Button, D.C., Lewis, R.S.
Mitochondrial control of calcium-channel gating: A mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes
Proc. Natl. Acad. Sci. 2000; 97: 10607-10612

- Hu, Y. Benedict, M.A., Wu, D., Inohara, N., Núñez, G.
Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation
Proc. Natl. Acad. Sci. 1998; 95: 4386-4391
- Ichas, F. Jouaville, L.S., Mazat, J.-P.
Mitochondria are excitable organelle capable of generating and conveying electrical and calcium signals
Cell 1997; 89: 1145-1153
- Igney, F.H. Behrens, C.K., Krammer, P.H.
Tumor counterattack - concept and reality
Eur. J. Immunol. 2000; 30: 725-731
- Imboden, J.B. Stobo, J.D.
Transmembrane signalling by the Tcell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores.
J. Exp. Med. 1985; 161: 446-56
- Itoh, N. Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., Nagata, S.
The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis.
Cell 1991; 66: 233-243
- Kang, S.-M. Schneider, D.B., Lin, Z., Hanahan, D., Dichek, D.A., Stock, P.G., Baekkeshow, S.
Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targest them for rapid destruction
Nat. Med. 1997; 3: 738-743
- Kerschbaum, H.H. Cahalan, M.D.
Single-channel recording of a store-operated Ca²⁺ channel in Jurkat T lymphocytes
Science 1999; 283: 836-839
- Kischkel, F.C. Hellbardt, S., Behrmann, I. Germer, M. Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E.
Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor
EMBO J. 1995; 14: 5579-88
- Klas, C Debatin, K.M., Jonker, R.R., Krammer, P.H.
Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells
Int. Immunol. 1993; 5: 625-630

Kovacs, B. Tsokos, G.C.

Cross-linking of the Fas/APO-1 antigen suppresses the CD3-mediated signal transduction events in human T lymphocytes

J. Immunol. 1995; 155: 5543-9

Kovacs, B. Tsokos, G.C.

Cross-Linking of the Fas/APO-1 Antigen Suppresses teh CD3-Mediated Signal Transduction Events in Human T Lymphocytes

J. Immunol. 1995; 155: 5543-5549

Krammer, P.H.

Apoptose

Dt. Ärzteblatt 2000; 97: 1752-1759

Kristal, B.S. Brown, A.M.

Apoptogenic ganglioside GD3 directly induces the mitochondrial permeability transition

J. Biol. Chem. 1999; 274: 23169-23175

Kroemer, G. Reed, J.C.

Mitochondrial control of cell death

Nat. Med. 2000; 6: 513 - 519

Lenardo, M. Chan, F.K-M., Hornung, F., McFarland, H., Siegel, R., Wang, J., Zheng, L.

Mature T Lymphocyte Apoptosis - Immune Regulation in a Dynamic and Unpredictable

Antigenic Environment

Annu. Rev. Immunol. 1999; 17: 221-53

Lepple-Wienhues, A. Belka, C., Laun, T., Jekle, A., Walter, B., Wieland, U., Welz, M., Heil, L., Kun, J., Busch, G., Weller, M., Bamberg, M., Gulbins, E., Lang, F.

Stimulation of CD95 (Fas) blocks T lymphocyte calcium channels through sphingomyelinase and sphingolipids

Proc. Natl. Acad. Sci. 1999; 96: 13795-13800

Lewis, R.L.

Calcium signaling mechanisms in T-lymphocytes

Annu. Rev. Immunol. 2001; 19: 497-521

Lewis, R.S.

Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes

Annu. Rev. Biochem. 2001; 19: 497-521

Li, H. Zhu, H., Xu, C., Yuan, J.

Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis

Cell 1998; 94: 491-501

- Li, P. Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X.
Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade
Cell 1997; 91: 479-89
- Linsinger, G. Wilhelm, S., Wagner, H., Häcker, G.
Uncouplers of oxidative phosphorylation can enhance a Fas death signal
Mol. Cell. Biol. 1999; 19: 3299-3311
- Liu, J Farmer, J.D.J., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I, Schreiber, S.L.
Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes
Cell 1991; 66: 807-815
- Liu, X Kim, Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X.
Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c
Cell 1996; 86: 147-157
- Makowska, A. Zablocki, K., Duszynski, J.
The role of mitochondria in the regulation of calcium influx into Jurkat cells
Eur. J. Biochem. 2000; 267: 877-884
- Mathes, C. Fleig, A., Penner, R.
Calcium release-activated calcium current (ICRAC) is a direct target for sphingosine
J. Biol. Chem. 1998; 273: 25020-30
- Minamikawa, T. Williams, D.A., Bowser, D.N., Nagley, P.
Mitochondrial permeability transition and swelling can occur reversibly without inducing cell death in intact human cells
Exp. Cell Res. 1999; 246: 26-37
- Minn, A.J. Velez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M., Thompson, C.B.
Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membrane
Nature 1997; 385: 353-357
- Morford, L.A. Elliott, L.H., Carlson, S.L., Brooks, W.H., Roszman, T.L.
T cell receptor-mediated signaling is defective in T cells obtained from patients with primary intracranial tumors
J. Immunol. 1997; 159: 4415-4425

Muchmore, S.W. Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., Ng, S.L., Fesik, S.W. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death Nature 1996; 381: 335-41

Mustelin, T. Coggeshall, K.M., Isakov, N., Altman, A. T-cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C requires tyrosine phosphorylation Science 1990; 247: 1584-1587

Nagata, S. Apoptosis by death factor Cell 1997; 88: 355-65

Narita, M. Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R. J., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria Proc. Natl. Acad. Sci. 1998; 95: 14681-6

Negulescu, P.A. Shastri, N, Cahalan, M.D. Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes Proc. Natl. Acad. Sci. 1994; 91: 2873-2877

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

Newton, K. Harris, A.W., Bath, M.L., Smith, G.C., Strasser, A. A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes EMBO J. 1998; 17: 706-718

Nguyen, M. Branton, P.E., Walton, P.A., Oltvai, Z.N., Korsmeyer, S.J., Shore, G.C. Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus J. Biol. Chem. 1994; 269: 16521-16524

Novak, E.J. Rabinovitch, P.S. Improved sensitivity in flow cytometric intracellular ionized calcium measurement using fluo-3/Fura Red fluorescence ratios Cytometry 1994; 17: 135-141

Oltvai, Z.N. Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death Cell 1993; 74: 609-19

- Parekh, A.B. Terlau, H., Stühmer, W.
Depletion of InsP3 stores activates a Ca²⁺ and K⁺ current by means of a phosphatase and a diffusible messenger
Nature 1993; 364: 814-818
- Parekh, A.B.
Slow feedback inhibition of calcium release-activated calcium current by calcium entry
J. Biol. Chem. 1999; 273: 14925-14932
- Partiseti, M Le Deist, F., Hivroz, C., Fischer, A., Korn, H., Choquet, D.
The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency
J. Biol. Chem. 1994; 269: 32327-32335
- Peter, M.E. Kischkel, F.C., Scheuerpflug, C.G., Medema, J.P., Debatin, K.M., Krammer, P.H.
Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signaling complex.
Eur. J. Immunol. 1997; 27: 1207-12
- Petit, P.X. Susin, S.A., Zamzami, N., Mignotte, B., Kroemer, G.
Mitochondria and programmed cell death: back to the future
FEBS-Lett. 1996; 396: 7-13
- Pinton, P. Ferraria, D., Magalhães, P., Schulze-Osthoff, K., Di Virgilio, T., Pozzan, T., Rizzuto, R.
Reduced loading of intracellular Ca²⁺ stores and downregulation of capacitative Ca²⁺ influx in Bcl-2 overexpressing cells
J. Cell Biol. 2000; 148: 857-862
- Quian, D Weiss, A
T cell antigen receptor signal transduction.
Curr. Opin. Cell Biol. 1997; 9: 205-12
- Rao, A. Luo, C., Hogan P.G.
Transcription factors of the NFAT family: regulation and function
Annu. Rev. Immunol. 1997; 15: 707-47
- Robb-Gaspers, L.D. Burnett, P., Rutter, G.A., Denton, R.M., Rizzuto, R., Thomas A.P.
Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses
EMBO J. 1998; 17: 4987-5000

- Rottenberg, H. Wu, S.
Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells
Biochim-Biophys-Acta 1998; 1404: 393-404
- Russel, J.H. Rush, B., Weaver, C., Wang,R.
Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigenstimulated suicide
Proc. Natl. Acad. Sci. 1993; 90: 4409-13
- Scaffidi, C. Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S.J., Krammer, P.H., Peter, M.E.
Differential Modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells
J. Biol. Chem. 1999; 274: 22532-8
- Schneider, U. Schwenk, H.U., Bornkamm, G.
Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma.
Int. J. Cancer 1977; 19: 621-6
- Schwartz, R.H.
Models of T cell anergy: is there a common meolecular mechanism
J. Exp. Med. 1996; 184: 1-8
- Staveley-O'Carroll, K. Sotomayor, E., Montgomery, J., Borrello, I., Hwang, L., Fein, S., Pardoll, D., Levitsky, H.
Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression
Proc. Natl. Acad. Sci. 1998; 95: 1178-1183
- Steller, H.
Mechanisms and genes of cellular suicide
Science 1995; 267: 1445-9
- Strand, S. Hofmann, W.J., Hug, H., Muller, M., Otto, G., Strand, D., Mariani, S.M., Stremmel, W., Krammer, P.H., Galle, P.R.
Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells - a mechanism of immune evasion
Nat. Med. 1996; 2: 1361-1366
- Stuart, P.M. Griffith, T.S., Usui, N., Pepose, J., Yu, X., Ferguson, T.A.
CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival
J. Clin. Invest. 1997; 99: 396-402
- Susin, S.A. Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.R., Penninger, J.M., Kroemer, G.
Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor
Nature 1997; 397: 441-446

- Susin, S.A. Zamzami, N., Kroemer, G.
Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more
Biochim-Biophys-Acta 1998; 1366: 151-165
- Szalai, G. Krishnamurthy, R., Hajnóczky, G.
Apoptosis driven by IP₃-linked mitochondrial calcium signals
EMBO J. 1999; 18: 6349-6361
- Takahashi, T. Tanaka, M., Brannan, C.I., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Suda, T., Nagata, S.
Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand
Cell 1994; 76: 969-76
- Thastrup, Cullen, P.J., Drobak, B.K., Hanley, M.R., Dawson, A.P.
Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase
Proc. Natl. Acad. Sci. 1990; 87: 2466-2470
- Theofilopoulos, A.N. Dixon, F.J.
Murine models of systemic lupus erythematosus.
Adv. Immunol. 1993; 37: 269
- Thornberry, N.A. Lazebnik, T.
Caspases: Enemies within
Science 1998; 281: 1312-7
- Timmermann, L.A. Clipstone, N.A., Ho, S.N., Northrop, J.P., Crabtree, G.R.
Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression
Nature 1996; 383: 837-40
- Törnquist, K. Malm, A.M., Pasternack, M., Kronqvist, R., Bjorklund, S., Tuominen, R., Slotte, J.P.
Tumor necrosis factor-alpha, sphingomyelinase, and ceramide inhibit store-operated calcium entry in thyroid FRTL-5 cells
J. Biol. Chem. 1999; 274: 9370-7
- Trauth, B.C. Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K.M., Krammer, P.H.
Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis
Science 1989; 245: 301-305
- Tsujimoto, Y. Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., Croce, C.M.
Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation
Science 1984; 226: 1097-9

- Vaux, D.L. Cory, S., Adams, J.
Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells
Nature 1988; 335: 440-2
- Walsh, C.M. Wen, B.G., Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Dixit, V.M., Hedrick, S.M.
A role for FADD in T cell activation and development
Immunity 1998; 8: 439-49
- Weiss, A Littman, DR
Signal transduction by lymphocyte antigen receptors
Cell 1994; 76: 263-74
- Yang, J Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T., Jones, D.P., Wang, X.
Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked
Science 1997; 275: 1129
- Yang, X Khosravi-Far, R., Chang, H.Y., Baltimore, D.
Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis
Cell 1997; 89: 1067-76
- Yao, Y. Ferrer-Montiel, A.V., Montal, M., Tsien, R.Y.
Activation of store-operated Ca²⁺ current in Xenopus oocytes requires SNAP-25 but not a diffusable messenger
Cell 1999; 98: 475-485
- Zamzami, N Brenner, C., Marzo, I., Susin, S.A., Kroemer, G.
Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins
Oncogene 1998; 16: 2265-2282
- Zamzami, N. Marchetti, P., Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S.A., Mase, B., Kroemer, G.
Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis
FEBS-Lett. 1996; 384: 53-7
- Zhang, J Cado, D., Chen, A., Kabra, N.H., Winoto, A.
Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1
Nature 1998; 392: 296-300
- Zheng, L. Fisher, G., Miller, R.E., Peschon, J., Lynch, D.H., Lenardo, M.J.
Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor
Nature 1995; 377: 348-51

- Zheng, L. Trageser, C.L., Willerford, D.M., Lenardo, M.J.
T cell growth cytokines cause the superinduction of molecules mediating
antigen-induced T lymphocyte death
J. Immunol. 1998; 160: 763-69
- Zhou, T. Bluethmann, H., Eldridge, J., Brockhaus, M., Berry, K., Mountz, J.D.
Abnormal thymocyte development and production of autoreactive T cells in T cell
receptor transgenic autoimmune mice
J. Immunol. 1991; 147: 466-74
- Zhu, W Cowie, A., Wasfy, G.W., Penn, L.Z., Leber, B., Andrews, D.W.
Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for
apoptosis in different cell types
EMBO J. 1996; 15: 4130-41
- Zou, H. Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X.
Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome
c-dependent activation of caspase-3
Cell 1997; 90: 405-13
- Zweifach, A Lewis, RS
Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current.
Store-dependent and -independent mechanisms
J. Biol. Chem. 1995; 270: 14444-51
- Zweifach, A. Lewis, R.S.
Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (ICRAC) due to local calcium
feedback
J. Gen. Physiol. 1995; 105: 209-26

7 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei Herrn PD Dr. Albrecht Lepple-Wienhues für die interessante Fragestellung und die kompetente wissenschaftliche und technische Unterstützung bedanken. Auch dafür, dass er auch in Zeiten größerer Arbeitsbelastung noch jederzeit für Fragen zur Verfügung stand.

Herrn Prof. Dr. Florian Lang gilt mein Dank für die Möglichkeit, in seinem Institut zu arbeiten und für die motivierende Unterstützung.

Insbesondere möchte ich meinen Laborkollegen Dr. Luzia Heil, Martina Welz, Georg Dangel, Achim Seeger, Arvid Schäfer, Birgit Heberle, Angelika Enzensberger, Anja Bialkowski und Dr. Klaus Ferlinz für ihren wissenschaftlichen und moralischen Beistand danken. Sie haben ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und auch dazu, dass ich mich immer gerne an die Zeit in und ausserhalb der Physiologie erinnern werde.

Bei Herrn Dr. Andreas Jekle bedanke ich mich herzlich für die tatkräftige Hilfe bei der Transfektion der Lymphozyten und für die freundliche Unterstützung beim Erlernen biochemischer Arbeitstechniken. Auch allen anderen Mitarbeitern des Physiologischen Institutes danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Zum Schluss möchte ich mich besonders bei meinen Eltern für die Förderung meines Studiums und den Rückhalt bedanken, den sie mir immer geboten haben.

8 Lebenslauf

Name Johannes Berschauer

Eltern Hans Berschauer
Hedwig Berschauer-Braunger

Geburtsdatum/-ort 05.04.1975 in Ochsenhausen

Staatsangehörigkeit deutsch

Ausbildung

1981 - 1985 Grundschule Ummendorf

1985 - 1986 Hauptschule Ummendorf

1986 - 1992 Pestalozzi-Gymnasium Biberach

1992 - 1995 Technisches Gymnasium Biberach

Abschluss: Abitur

01.04.1997: Studium der Medizin an der Universität Tübingen

Ende WS 98/99: Ärztliche Vorprüfung

Ende WS 00/01: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

SS 02: Studium der Japanologie am Zentrum für japanische Sprache der Universität Tübingen an der Doshisha Universität in Kyoto

Ende SS 02: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

12. November 2003: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Zivildienst

01.08.1995 - 31.08.1996

Zivildienst bei den Heggbacher Einrichtungen

Werkstatt für Behinderte Biberach