

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen

Abteilung Physiologie I

Abteilungsleiter: Professor Dr. F. Lang

**Die Rolle von Sphingolipiden bei der CD95-vermittelten
Blockade von Ca²⁺-Kanälen**

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

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

**vorgelegt von
Georg Richard Dangel
aus
Stuttgart**

2005

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. A. Lepple-Wienhues

2. Berichterstatter:

Professor Dr. F. Lang

Meinen Eltern

I. Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|--|-----|
| I. | Inhaltsverzeichnis..... | I |
| II. | Abkürzungen | III |
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Immunologische Grundlagen | 1 |
| 1.1.1 | Die zelluläre Immunantwort..... | 1 |
| 1.1.2. | T-Zell-Aktivierung..... | 3 |
| 1.2. | Ionenkanäle | 4 |
| 1.2.1. | Eigenschaften des kapazitiven Ca^{2+} -Kanals (CRAC)..... | 5 |
| 1.3. | Der programmierte Zelltod | 6 |
| 1.3.1. | Der CD95-Rezeptor | 7 |
| 1.3.2. | Der CD95-induzierte Block des kapazitiven Calciumeinstroms..... | 9 |
| 1.4. | Das Onkoprotein Bcl-2 und seine Verwandten | 10 |
| 1.5. | Das Mitochondrium | 12 |
| 1.6. | Sphingolipide als Botenstoffe der Apoptose..... | 14 |
| 1.7. | Fragestellung | 16 |
| 2. | Material und Methoden..... | 17 |
| 2.1. | Verwendete Substanzen und Lösungen | 17 |
| 2.1.1. | Chemikalien | 17 |
| 2.1.2. | Lösungen | 17 |
| 2.2. | Zellkultur | 18 |
| 2.3. | Fluoreszenz-Aktiverter-Zell-Sorter (FACS) | 20 |
| 2.3.1. | Grundlagen der Durchflußzytometrie | 20 |
| 2.3.2. | Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ mit dem FACS | 21 |
| 2.3.3. | Messung des Mitochondrienpotentials $\Delta\psi$ | 23 |
| 2.4. | Fluoreszenzmikroskopie | 24 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|---|----|
| 2.4.1. | Grundlagen der Ratio-Video-Imaging Technik..... | 24 |
| 2.4.2. | Aufbau der Messapparatur | 25 |
| 2.4.3. | Messung der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ mit der Video-Imaging Technik | 26 |
| 2.5. | Statistische Auswertung der Daten | 26 |
| 3. | Ergebnisse | 27 |
| 3.1. | Sphingosin führt zum Zusammenbrechen des Mitochondrienpotentials $\Delta\varphi_m$ in Jurkat-T-Zellen..... | 27 |
| 3.2. | Sphingosin blockiert den kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom des CRAC- Kanals in Jurkat-T-Zellen | 28 |
| 3.3. | Bcl-2 verzögert den sphingosin-induzierten $\Delta\varphi_m$ - Zusammenbruch in Jurkat-T-Zellen..... | 29 |
| 3.4. | Bcl-2 schützt nicht vor sphingosin-induzierter Blockade des CRAC- Kanals in Jurkat-T-Zellen | 31 |
| 3.5. | Zusammenfassung der Ergebnisse..... | 33 |
| 4. | Diskussion..... | 34 |
| 4.1. | Inhibition des CRAC-Kanals und $\Delta\varphi_m$ -Zusammenbruch nach CD95- Stimulation | 34 |
| 4.2. | Die Rolle von Sphingosin beim $\Delta\varphi_m$ -Zusammenbruch..... | 36 |
| 4.3. | Sphingosin blockiert den CRAC-Kanal auf direktem und indirektem Weg..... | 38 |
| 5. | Zusammenfassung..... | 41 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 42 |
| 7. | Danksagung | 50 |
| 8. | Lebenslauf..... | 51 |

II. Abkürzungen

| | |
|----------------------|---|
| $\Delta\phi_m$ | mitochondriales Membranpotential |
| λ | Lamda, Maßeinheit für die Wellenlänge |
| °C | Temperaturangabe in Grad Celsius |
| μl | Mikroliter |
| μM | mikromolar |
| ρM | pikomolar |
| AIF | apoptosis inducing factor |
| AK | Antikörper |
| ANT | Adenin Nucleotid Transporter |
| APZ | Antigen präsentierende Zellen |
| ASM | saure Sphingomyelinase |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| $[\text{Ca}^{2+}]_i$ | intrazelluläre Calciumkonzentration |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| CCCP | Carbonylcyanid |
| CD95 | Apo-1/Fas-Rezeptor, für die Vermittlung des apoptotischen Signals verantwortlicher Rezeptor |
| CIF | calcium influx factor |
| CRAC | calcium release activated calcium channel |
| CsA | Cyclosporin A |
| DAG | Diacylglycerol |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DISC | death inducing signaling complex |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| FACS | Fluoreszenz-Aktivierter-Zell-Sorter |
| FADD | Fas-associating protein with death domain |
| FLICE | FADD-like ICE |

Abkürzungen

| | |
|-----------------|---|
| HEPES | (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]) |
| ICE | Interleukin-1 β -converting enzyme |
| IP ₃ | Inositoltriphosphat |
| IL-2 | Interleukin-2 |
| MHC | major histocompatibility complex |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| mM | millimolar |
| NFAT | nuclear factor activated T-cells |
| NGF | nerve growth factor |
| nm | Nanometer |
| nM | nanomolar |
| PKC | Proteinkinase C |
| PLC- γ | Phospholipase γ |
| PTP | permeability transition pore |
| SM | Sphingomyelin |
| TG | Thapsigargin |
| TNF | tumor necrosis factor |
| TRADD | TNF-associated death domain factor |
| TZR | T-Zell-Rezeptor (CD4) |
| VDAC | voltage dependent anion channel |

1. Einleitung

1.1 Immunologische Grundlagen

1.1.1 Die zelluläre Immunantwort

Leukozyten spielen für das Zustandekommen von Immunreaktionen gegen Antigene wie Mikroorganismen oder körperfremde Makromoleküle eine entscheidende Rolle. Sie sind sowohl für die spezifische als auch für die unspezifische Immunantwort verantwortlich.

Träger der unspezifischen oder auch angeborenen Immunantwort sind dabei die Phagozyten, also Monozyten, ihre ins Gewebe abgewanderten Äquivalente, die Makrophagen, und neutrophile Granulozyten. Diese Zellen werden alle im Knochenmark gebildet und durchwandern den Körper solange, bis sie, durch Chemotaxis angelockt, auf körperfremde Antigene stoßen. Ihre Hauptaufgabe besteht in der unspezifischen Erkennung dieser Partikel und ihrer Elimination durch Phagozytose. Außerdem vermögen Phagozyten Antigene zu prozessieren, d.h. Antigene werden mit Hilfe von zelleigenen Enzymen zersetzt und die entstehenden Peptide auf der Zelloberfläche präsentiert, um deren Strukturen anderen Zellen des Immunsystems zugänglich zu machen. Man ordnet sie deshalb der Gruppe der Antigen präsentierenden Zellen (APZ) zu.

Der spezifische oder auch erworbene Teil der Immunantwort entfällt auf eine andere leukozytäre Subpopulation, die Lymphozyten. Auch die Lymphozyten werden im Knochenmark gebildet, bedürfen aber noch einer „immunologischen Prägung“, bevor sie zum Einsatz kommen. Dabei reifen die T-Lymphozyten im Thymus, die B-Lymphozyten im Knochenmark.

B-Lymphozyten bilden auf ihrer Zelloberfläche einen Rezeptor mit der Struktur eines Antikörpers (IgM, IgD) aus, der dazu fähig ist, ein spezifisches Antigen zu erkennen. Beim Kontakt eines Antigens mit dem für ihn spezifischen Rezeptor eines B-Lymphozyten kommt es zur Aktivierung der Zelle. Im Rahmen der Aktivierung beginnt die Zelle zum einen mit der Produktion derselben Antikörper, die auf ihrer Oberfläche das Antigen erkannt haben, und sezerniert diese, um das zirkulierende Antigen für die anderen Immunzellen zu markieren.

Einleitung

Zum anderen wird der Antigen-Rezeptor-Komplex vom B-Lymphozyten internalisiert, das Antigen prozessiert und die entstehenden Peptide zusammen mit MHC-Molekülen (major histocompatibility complex-molecules) auf der Zelloberfläche präsentiert.

Die T-Lymphozyten werden nochmals in zwei verschiedene funktionelle Unterklassen, die T-Helferzellen (T_H) und die zytotoxischen T-Zellen (T_C), unterteilt. Sie können im Gegensatz zu B-Lymphozyten lösliche Antigene nicht selbst erkennen, sondern sind auf APZ angewiesen, die das aufbereitete Antigen mit Hilfe des MHC-Komplexes präsentieren. Auf Seiten der T-Zelle ist der T-Zell-Rezeptor (TZR) die antigenerkennende Struktur. Dieser Rezeptor kann prozessiertes Antigen zusammen mit MHC-Molekülen erkennen und so den T-Lymphozyten aktivieren. Je nach Subtyp kommt es nun entweder zu zytotoxischen Reaktionen (T_C) oder zur Stimulation anderer Immunzellen durch Synthese und Sekretion von Zytokinen (T_H).

Unserem Immunsystem ist es möglich, viele Tausende von Antigenen spezifisch zu erkennen, wobei ein bestimmtes Antigen nur von einer sehr kleinen Anzahl von Lymphozyten spezifisch erkannt werden kann. Der Vermittlung eines proliferativen Signals bei der Immunantwort kommt deshalb eine große Bedeutung zu.

Trifft ein Antigen auf die wenigen Zellen, die den spezifischen Rezeptor für dieses Antigen auf ihrer Zelloberfläche tragen, kommt es zur Proliferation speziell dieser Lymphozyten, damit diese mit einer adäquaten Immunantwort auf das körperfremde Molekül reagieren können. Dieser Vorgang wird als klonale Selektion bezeichnet. Die Zellen teilen sich und differenzieren sich in unterschiedlichen Richtungen zu reifen Zellen aus. Einige der neu entstandenen Zellen bleiben dem Immunsystem auch noch sehr lange nach dem Antigen-Angriff erhalten, um bei erneutem Kontakt zum Antigen schnell zur Verfügung zu stehen. Man nennt diese Zellen Gedächtnis-Zellen. Sie sind die Träger der manchmal lebenslangen Immunität nach einigen Infektionskrankheiten.

1.1.2. T-Zell-Aktivierung

Nach Stimulierung des TZR durch Antigen in Verbindung mit MHC-Komplexen wird im T-Lymphozyten eine Kaskade von intrazellulären Ereignissen ausgelöst, die schließlich zur Aktivierung und Proliferation der Zelle führen [19, 86]. Die variablen, kovalent miteinander verbundenen α - und β -Ketten des TZR sind dazu fähig, das von APZ aufbereitete Antigen zu erkennen und bilden nach Assoziation mit den konstanten γ -, δ -, ϵ -, ζ -, und η -Proteinketten des Rezeptors den TZR/CD3-Komplex [85]. Schließlich assoziiert der TZR/CD3-Komplex mit verschiedenen Tyrosinkinase, woraus eine Phosphorylierung membranständiger und intrazellulärer Proteine resultiert. Bei der T-Zell-Aktivierung spielen die src-ähnlichen Tyrosinkinase Fyn und Lck eine wesentliche Rolle, da sie den Phosphatidylinositolmetabolismus in Gang setzen. Dabei wird durch Phosphorylierung die Aktivierung der Phospholipase C- γ (PLC- γ) erreicht, welche wiederum die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat zum hydrophilen Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3) und zum lipophilen Diacylglycerol (DAG) katalysiert [53]. IP_3 diffundiert in das Zytosol und bindet an IP_3 -Rezeptoren, die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert sind und ligandengesteuerte Ionenkanäle darstellen. Nach ihrer Öffnung strömt Ca^{2+} aus dem Lumen des ER in das Zytosol, was zur Aktivierung speichergesteuerter Ca^{2+} -Kanäle (CRAC) in der Plasmamembran führt und die intrazelluläre Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ weiter erhöht [94]. Gleichzeitig aktiviert das plasmamembranständige DAG zusammen mit der erhöhten $[Ca^{2+}]_i$ die Proteinkinase C (PKC), die wiederum den Transkriptionsfaktor NF- κ B induziert [46].

Durch die hohe $[Ca^{2+}]_i$ kann in der Zelle neben Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase auch die Phosphatase Calcineurin aktiviert werden. Calcineurin selbst ist das Zielmolekül der Immunsuppressiva Cyclosporin A (CsA) und FK506. Es dephosphoryliert die zytoplasmatische Untereinheit von NFAT (nuclear factor activated T-cells), einem Transkriptionsfaktor, der nur im dephosphorylierten Zustand in den Zellkern gelangen kann. Dort bindet er an den Promotor für das Zytokin IL-2 und fördert zusammen mit dem durch PKC-aktivierten Transkriptionsfaktor AP-1 die IL-2-Gen-Transkription [21].

Im Rahmen der T-Zell-Aktivierung werden außerdem noch einige Rezeptoren für Zytokine wie IL-2, die für die Lymphozytenreifung sehr wichtig sind, verstärkt an der Zelloberfläche exprimiert.

1.2. Ionenkanäle

Aufgrund ihrer besonderen Struktur ermöglichen Ionenkanäle anorganischen, geladenen Teilchen (Ionen) die Passage durch die Plasmamembranen von Zellen. Es handelt sich dabei um hochspezialisierte, aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzte Transmembranproteine, die mit ihren lipophilen Teilen die Zellmembran durchziehen. Sie sind für die Signalübertragung in den meisten Lebewesen notwendig und bieten eine Grundlage für Kontakte zwischen dem Intrazellulär- und dem Extrazellulärraum. Man unterteilt die Kanäle bezüglich der Ionen, für die sie durchgängig sind, in verschiedenen Gruppen. So gibt es auf Seiten der Kationen Kanäle für Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Ionen, auf Seiten der Anionen Kanäle für Cl^- - und HCO_3^- -Ionen. Zusätzlich kann man die Ionenkanäle noch nach ihren physiologischen, pharmakologischen und physikalischen Eigenschaften unterteilen.

Zur Aktivierung der Kanäle kann es auf verschiedene Weise kommen: Bei den spannungsabhängigen Kanälen bewirken Änderungen des Membranpotentials eine Öffnung, während ligandengesteuerte Kanäle durch das Andocken eines spezifischen Botenstoffes geöffnet werden [28]. Eine weitere Gruppe stellen die speicheroperierten Kanäle dar, die im Folgenden genauer betrachtet werden, da sie für diese Arbeit eine zentrale Rolle spielen.

Bei allen drei beschriebenen Aktivierungstypen kommt es bei der Öffnung der Kanäle zu einer Konformationsänderung der Proteinuntereinheiten und so letztendlich zu Ionenbewegungen zwischen Intrazellulär- und Extrazellulärraum.

1.2.1. Eigenschaften des kapazitiven Ca^{2+} -Kanals (CRAC)

Kapazitive oder speichergesteuerte Ca^{2+} -Kanäle (CRAC-Kanäle, calcium-release-activated calcium channels) wurden erstmals 1993 von Hoth und Penner in Mastzellen beschrieben [32]. Man findet CRAC-Kanäle hauptsächlich in einer Reihe von nicht erregbaren Geweben [4, 44, 94]. Aktiviert werden sie nach einer Entleerung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol [32, 63], wobei der Signalmechanismus zwischen dem Calciumspeicher ER und dem kapazitiven Ca^{2+} -Kanal noch nicht hinreichend geklärt ist. Zur Diskussion stehen neben löslichen, vom ER freigesetzten Transmittern wie der Calcium influx factor (CIF) [67], auch verschiedene Tyrosinkinasen [35], direkte Protein-Protein Interaktionen, ein Ca^{2+} -Sensor im ER und eine physikalische Koppelung zwischen den CRAC-Kanälen und IP_3 -Rezeptoren [4].

In Lymphozyten konnten CRAC-Kanäle zuerst von Lewis und Calahan nachgewiesen werden. Dort spielen sie sowohl in der Vermittlung eines proliferativen Signals [4, 43, 94] als auch bei der Regulierung des Zellvolumens eine zentrale Rolle [82].

Die speichergesteuerten CRAC-Kanäle können nicht nur durch physiologische TZR-Stimulation aktiviert werden, sondern auch durch artifizielle Stimuli, wobei sich der physiologische Strom nicht von den künstlich erzeugten Calciumströmen unterscheiden läßt. Zur artifiziellen CRAC-Aktivierung kommt es entweder durch Stimulation des TZR mittels Phytohämagglutinin (PHA) oder durch Chemikalien, die den intrazellulären Entleerungsvorgang des Calciums beeinflussen [94].

Eine in diesem Zusammenhang häufig in dieser Arbeit verwendete Chemikalie ist das Sesquiterpenlacton Thapsigargin, das in einer Konzentration von $1\ \mu\text{mol/l}$ die Ca^{2+} -Pumpe (SERCA-ATPase) des endoplasmatischen Retikulums irreversibel hemmt und so die Aufnahme des Ions in diesen Ca^{2+} -Speicher verhindert [65, 81]. Weitere Möglichkeiten zur Aktivierung und Öffnung des CRAC-Kanals bieten zum einen auch noch IP_3 , das durch Bindung an den endoplasmatischen IP_3 -sensitiven Ca^{2+} -Kanal gespeichertes Calcium freisetzt [42, 61], und zum anderen das Calciumionophor Ionomycin, das ebenfalls die

zellulären Ca^{2+} -Speicher entleert. Für die später beschriebenen Versuche wurde zur CRAC-Kanal-Aktivierung jedoch ausschließlich Thapsigargin verwendet, da hiermit ein maximaler Ca^{2+} -Einstrom erreicht und Teile der Signalkaskade oberhalb des Ca^{2+} -Speichers ER umgangen werden können [80].

Bisher wurden drei Mechanismen zur Inaktivierung des CRAC-Kanals gefunden. Zum einen gibt es eine langsame Inaktivierung, die durch das Wiederauffüllen der cytosolischen Ca^{2+} -Speicher getriggert wird und einige Sekunden andauert [29, 95]. Zum anderen existieren noch zwei andere, vom Speicher unabhängige („store independent“) Inaktivierungsmechanismen, ein schneller und ein langsamer. Dabei ist der schnelle Ca^{2+} -abhängig und schließt den Kanal innerhalb von wenigen Millisekunden durch eine zytosolische Akkumulation von Calcium mit anschließender Bindung an eine Calciumbindungsstelle (fast inactivation site) direkt am CRAC-Kanal oder einem assoziierten Protein [95]. Für die langsame speicherunabhängige Inaktivierung spielt vermutlich eine Proteinkinase C eine zentrale Rolle [62].

1.3. Der programmierte Zelltod

Unter programmiertem Zelltod (Apoptose) versteht man den kontrollierten, selbstregulierten Tod einer Zelle. Es handelt sich dabei um einen fein regulierten physiologischen Mechanismus, der im Gegensatz zum Zelluntergang durch Nekrose nicht zu einer Immun- oder Entzündungsreaktion führt. Apoptose spielt sowohl für die Entwicklung vielzelliger Organismen (Eliminierung überflüssig gewordener Zellen der Embryogenese [84], postpartale Entwicklung des zentralen Nervensystems, Autoimmuntoleranz), für deren Anpassung an wechselnde Belastungen (aktivierungsinduzierte Apoptose der T-Zellen [2, 8]) als auch bei der Entfernung schädlicher Zellen (Tumorzellen, Zellen mit Chromosomenschäden, immunkompetente Zellen, die gegen den eigenen Körper gerichtet sind) eine entscheidende Rolle. Sie dient also der Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen der Neubildung von Zellen und deren Elimination. Die Effekte der Apoptose macht man sich aber

auch in der heutigen Medizin bei der Behandlung von Tumorerkrankungen durch ionisierende Strahlung und Zytostatika zu Nutzen.

Die Apoptosereaktion kann in drei verschiedene zeitliche Phasen eingeteilt werden: Induktionsphase, Effektorphase und Degradationsphase [49]. Zur Induktionsphase kann es sowohl aufgrund unspezifischer extra- oder intrazellulärer Stimuli wie z.B. zellulärer Stress, ionisierende Strahlung, reaktive Sauerstoffradikale, Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, Bakterien und Viren als auch durch Stimulation spezifischer Rezeptoren wie z.B. des CD95-Rezeptors kommen [83]. Nachfolgend tritt die Zelle in die Effektorphase ein, in der das initiale Signal der Induktionsphase in ein zytologisches Todesprogramm umgesetzt und die Degradationsphase vorbereitet wird. In der Degradationsphase (Abbauphase) beginnt die Zelle dann mit der „Eigenzerstörung“ durch Aktivierung von Proteasen und Endonukleasen. Dabei kommt es zu den für die Apoptose typischen morphologischen Erscheinungsbildern der Kondensation von Kernchromatin und Zytoplasma, Kern- und DNA-Fragmentation, Depolymerisation des Zytoskeletts, Abnahme des Zellvolumens und zuletzt zur Ausbildung von apoptotischen Membranvesikeln (apoptotic bodies) [71].

1.3.1. Der CD95-Rezeptor

Bei dem auch als Fas oder APO-1 bezeichneten CD95-Rezeptor handelt es sich um ein Glykoprotein mit nur einer membrandurchspannenden Domäne, das aufgrund seiner hohen Homologie zu anderen Rezeptoren zur Familie der TNF- (tumor necrosis factor) und NGF-Rezeptoren (nerve grow factor) gehört [15, 34, 55]. Man findet ihn vor allem auf der Oberfläche aktivierter Lymphozyten und anderer immunprivilegierten Zellen in verschiedenen Organen wie z.B. Thymus, Hoden und Auge [22, 24, 25, 76].

Auf zytosolischer Seite bildet der Rezeptor ein Areal aus, das als „death domain“ bezeichnet wird und essentiell für die Apoptoseinduktion ist [34, 79]. An diese „death domain“ vermögen verschiedene Proteine, die selbst über eine „death domain“ verfügen, zu binden [38]. Dazu gehören unter anderem TRADD

Einleitung

(TNF-R1 associated death domain protein) [33] und FADD (Fas-Rezeptor associated death domain protein) [7, 11].

Assoziiert FADD mit einem aktivierten CD95-Rezeptor, kann die Protease Caspase-8, die auch FLICE (Fas Linked Interleukin Converting Enzyme) [6] genannt wird, durch Konformationsänderungen vom inaktiven Proenzym in seine aktive Form überführt werden und an dieses Proteinaggregat binden. Der so gebildete Komplex wird als DISC (death inducing signaling complex) bezeichnet. Caspase-8 gehört zu einer Gruppe von für die Apoptose typischen Enzymen und stellt das erste Glied in der weiteren Signaltransduktion dar [6, 20, 47, 54] (Abbildung 1).

Das Ausmaß der DISC- und Caspase-8-Bildung hängt jedoch vom Zelltyp ab. Während in Typ-I-Zellen in kurzer Zeit große Mengen an DISC und Caspase-8 gebildet werden, fällt die DISC- und Caspase-8-Bildung in Typ-II-Zellen (z.B. Jurkat-T-Zellen) gering aus, so dass ein zweiter Signaltransduktionsweg als Signalverstärker („amplification loop“) ausgelöst werden muß [69]. Dabei aktiviert Caspase-8 ein proapoptotisches Protein der Bcl-2-Familie (Bid). Bid wiederum fördert die Aktivierung weiterer Caspasen durch Unterstützung verschiedener Prozesse in der mitochondrialen Membran (z.B. Cytochrom-C-Freisetzung) [45, 48].

Einleitung

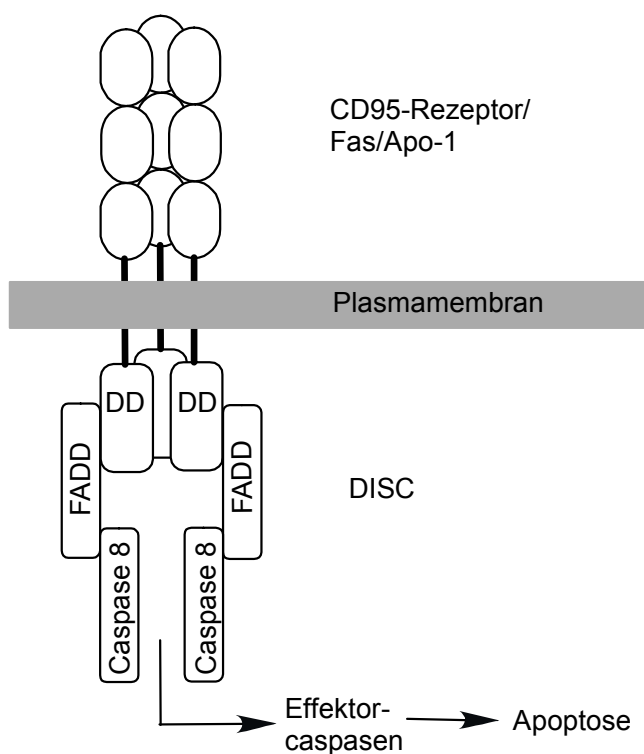


Abbildung 1: Aufbau des CD95-Rezeptors mit DISC

1.3.2. Der CD95-induzierte Block des kapazitiven Calciumeinstroms

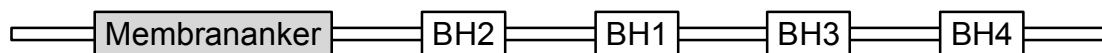
Das CD95-System induziert aber nicht nur Apoptose, sondern beeinflusst auch die Lymphozytenaktivierung. Dabei wird bei CD95-Stimulation der Ca^{2+} -Einstrom durch den CRAC-Kanal gehemmt und somit eine Erhöhung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verhindert [39]. Die Ca^{2+} -abhängigen cytosolischen Mechanismen wie Zytokinproduktion, NFAT-Translokation, die nachfolgende IL-2-Synthese und damit die Proliferation kommen zum Erliegen. Die T-Zelle wird in einen Ruhezustand versetzt, den man Anergie nennt, und kann nicht mehr aktiv am Immungeschehen teilnehmen. Dieser Mechanismus bietet eine Erklärung für die Unfähigkeit des Immunsystems, sich gegen bestimmte Tumorarten adäquat zu wehren, wenn die Tumorzellen CD95-Liganden exprimieren können („tumor escape“). Ein Beispiel hierfür ist das Glioblastom. T-Zellen von Patienten mit dieser Erkrankung können aber bei künstlich herbeigeführter Erhöhung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Eröffnung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher (z.B. durch das Calciumionophor Ionomycin) wieder reaktiviert werden [73].

1.4. Das Onkoprotein Bcl-2 und seine Verwandten

Neben den vielen schon erwähnten Induktoren der Apoptose wurde mit Bcl-2 ein Protein gefunden, das den selbstregulierten Tod einer Zelle verhindern kann. Es gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die als potentielle Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene fungieren. Eng mit Bcl-2 verwandte Moleküle schützen vor Apoptose, während weniger eng verwandte Proteine der Subfamilien Bax und BH3 pro-apoptotische Wirkungen entfalten (Abbildung 2). Der Grundbauplan der drei Subfamilien folgt jedoch demselben Prinzip: Jedes Protein besitzt mindestens eine von vier Bcl-2 Homologie-Domänen (BH1 bis BH4). Während die antiapoptotisch wirkenden Vertreter auf jeden Fall BH1 und BH2 vorweisen (enge Verwandte von Bcl-2 sogar alle vier Domänen BH1-BH4), verfügen die Todesproteine der beiden anderen Subfamilien entweder alle über BH1, BH2 und BH3 (Bax, Bak und Bok der Bax-Subfamilie) oder weisen nur die Domäne BH3 ohne weitere Verwandtschaftsmerkmale auf (BH3-Subfamilie) [1, 89].

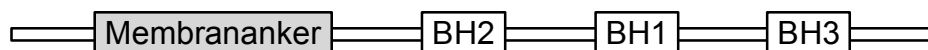
Anti-apoptotische Bcl-2-Subfamilie:

Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1, NR-13, BHRF1, LMW5-HL, ORF16, KS-Bcl-2, E1B-19K, CED-19



Pro-apoptotische Bax-Subfamilie:

Bax, Bak, Bok



Pro-apoptotische BH3-Subfamilie:

Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bim_L, Bad, Bid, EGL-1

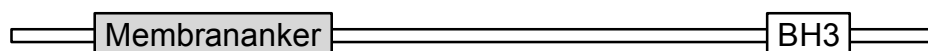


Abbildung 2: Einteilung der Bcl-2-Proteinfamilie

Pro- und antiapoptotisch wirkende Familienmitglieder können über die Domänen BH1, BH2 und BH3 miteinander heterodimerisieren und so ihre Funktionen gegenseitig beeinflussen. Einerseits wird diskutiert, ob die relativen

Einleitung

Konzentrationen der jeweiligen Dimerisierungspartner dabei entscheidend sind, ob die Zelle stirbt oder nicht [5, 60]. Andererseits scheint eine Heterodimerisierung zweier BH3-Domänen essentiell für die Entfaltung proapoptotischer Wirkungen zu sein, während das Ausbleiben einer Verknüpfung bzw. die Dissoziation zweier Proteine dieser Gruppen Schutz vor Apoptose bedeutet [9, 10, 12, 36, 37, 91].

Bcl-2 findet man auf der zytoplasmatischen Seite der äußeren mitochondrialen Membran, des endoplasmatischen Retikulums und der Kernhülle [23]. Die membranäre Verankerung und Lokalisation ist für dessen Funktion essentiell, da frei im Zytosol vorkommendes Bcl-2 keine antiapoptotische Wirkung entfalten kann [60]. Entfernt man die transmembranären Domänen von Bcl-2, Bcl-x_L oder Bax, geht ihre regulatorische Wirkung auf die Apoptose verloren [89]. Der Verankerung dient den Proteinen einerseits eine C-terminale, hydrophile COOH-Gruppe, wobei andererseits auch vermutet wird, dass auf den Organellen ein spezifisches Ankerprotein für die Bcl-2-Gruppe ausgebildet wird [57, 58, 92].

Die antiapoptotische Wirkung des Bcl-2 beruht auf verschiedenen Mechanismen: Es verhindert zum einen direkt oder indirekt die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium, welches zusammen mit Apaf-1 und Procaspase-9 das sogenannte Apoptosom bildet, das wiederum Caspase-9 aktiviert. Caspase-9 aktiviert ihrerseits weitere Caspasen und führt so zur Apoptose [23, 40, 89, 93]. Zum anderen ist es einigen Vertretern der Familie (Bcl-2, Bcl-x_L und Bax) durch ihre spezielle Molekülstruktur möglich, Poren in Organellen wie z.B. dem Mitochondrium zu bilden [52]. Dabei kann es sich sogar um selektive Ionenkanäle für bestimmte Ionenarten handeln [51, 70]. Dies ermöglicht den Bcl-2-Vertretern u.a. Volumen- und pH-Regulationen des Matrixraumes im Mitochondrium oder die Beeinflussung des mitochondrialen Ca²⁺-Haushaltes. Die Bcl-2-Familie spielt somit eine sehr wichtige regulierende Rolle für die Apoptose, die besonders die im Mitochondrium ablaufenden Reaktionen betrifft.

1.5. Das Mitochondrium

Mitochondrien nehmen eine zentrale Stellung in der Energieproduktion der Zelle ein. Sie haben etwa die Größe eines Bakteriums (1-5 μ m) und sind von einer Doppelmembran umgeben, wobei die innere Membran zur Oberflächenvergrößerung kammähnlich (Cristae) gefaltet ist. Ihre Hauptaufgaben bestehen in der ATP-Gewinnung (Adenosintriphosphat) durch Oxidation verschiedener Nährstoffe in Zitronensäurezyklus und Atmungskette, der β -Oxidation der Fettsäuren und der Bereitstellung der Abbauprodukte für weitere Synthesen in der Zelle (Aminosäuren, Phospholipide, etc.). Neben diesen Funktionen spielen sie jedoch auch eine wichtige Rolle für die Apoptose und den Ca^{2+} -Haushalt einer Zelle [31].

Von zentraler Bedeutung ist hierbei die sogenannte PTP (permeability transition pore), die auch als mitochondrialer Megakanal bezeichnet wird. Bei diesem Kanal handelt es sich um einen Multiproteinkomplex, der von der inneren Membran über den intermembranären Spalt bis in die äußere Membran reicht [16]. Zwar ist der genaue Aufbau der Pore noch nicht genau bekannt, man weiß jedoch, dass die innere Membran von ANT (adenine nucleotide translocator) durchspannt wird, dem auf Matrixseite Cyclophilin D angeheftet ist. In der äußeren Membran ist das Porin VDAC (voltage dependent anion channel) verankert, das letztendlich den Kanal durch den intermembranären Spalt bildet, der für Moleküle bis zu einer Größe von 1,5 kD durchgängig ist [3, 23, 64]. An VDAC können Benzodiazepinrezeptoren assoziieren [17, 75] (Abbildung 3).

Das Öffnen dieses für Ionen nicht-selektiven Kanals bei Apoptose führt zur Einstellung eines Ionengleichgewichtes zwischen der mitochondrialen Matrix und dem intermembranären Spalt. Hieraus resultieren eine Entkopplung der Atmungskette und das Zusammenbrechen des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\phi_m$, was ein frühes Ereignis der Apoptose darstellt. Der $\Delta\phi_m$ -Zusammenbruch scheint hinreichend für die Freisetzung von AIF (apoptosis inducing factor) zu sein, einem wichtigen, neben Cytochrom C existierenden, mitochondrialen Faktor zur Auslösung der Apoptose. Etwas später kommt es zur Volumendysregulation, durch die die nun hyperosmolare Matrix zu schwellen beginnt. Da die innere mitochondriale Membran aufgrund

Einleitung

ihrer Fältelung eine weitaus größere Oberfläche besitzt als die äußere Membran, kann aus dieser Schwellung eine Ruptur der äußeren Membran resultieren. Hierbei werden Pro-Caspasen des intermembranären Spaltes freigesetzt, die proapoptotische Caspasen aktivieren und dann zur Apoptose führen [23].

Für verschiedene Inhibitoren der PTP wie z.B. Cyclosporin A (CsA), das an Cyclophilin D bindet, konnte gezeigt werden, dass sie sowohl das Zusammenbrechen des $\Delta\varphi_m$ als auch die Aktivierung von proapoptotischen Caspasen und Endonukleasen und somit die Apoptose verhindern können. Die PTP ist außerdem Angriffsort der Bcl-2-Proteinfamilie [74]. Einige Vertreter wie Bax und Bak führen zur Öffnung der PTP [88, 90], andere Vertreter wie Bcl-2 selbst stabilisieren den Kanal [90].

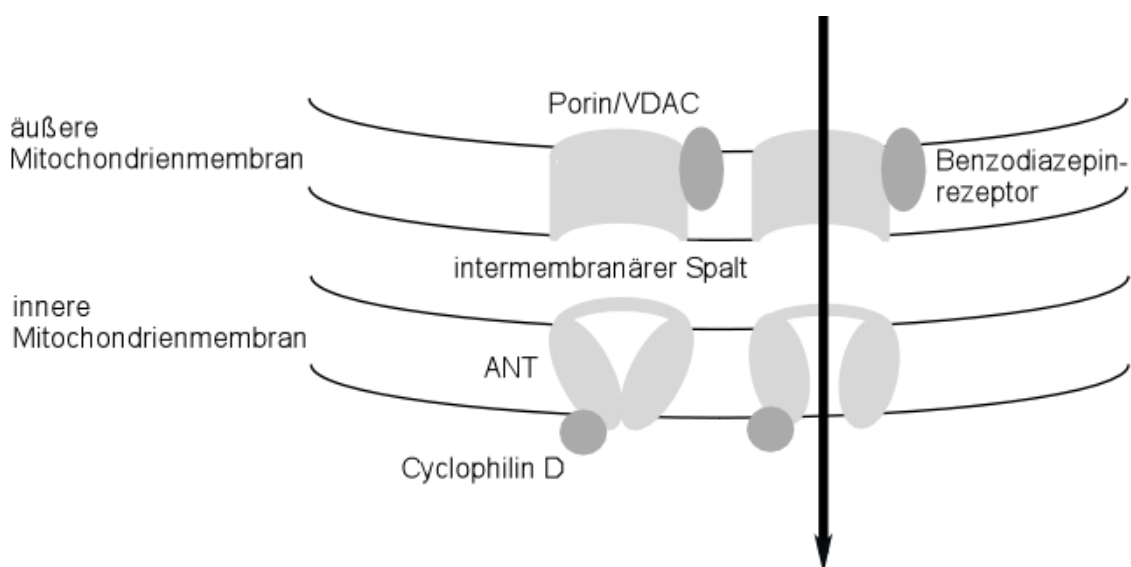


Abbildung 3: Die PTP besteht aus den zentralen Komponenten VDAC (voltage dependent anion channel), ANT (adenosin nucleotid translocator) und Cyclophilin D, um die andere Proteine wie z.B. der Benzodiazepinrezeptor angeordnet sind. Auf der linken Seite ist der Kanal geschlossen, rechts sieht man ihn in seiner geöffneten Konformation.

Wie schon angedeutet, sind Mitochondrien an der Regulation des Ca^{2+} -Haushaltes einer Zelle beteiligt. Es ist ihnen möglich, große Mengen Ca^{2+} über vielfältige Transportmechanismen aus dem Zytosol in die Matrix aufzusaugen, dieses zu speichern und gegebenenfalls wieder abzugeben [31]. Dies dient sowohl einer lokalen als auch einer mehr globalen Regulation Ca^{2+} -abhängiger Mechanismen in der Zelle. Dabei hat die PTP auch hier eine zentrale Aufgabe – sie dient als wichtigster Freisetzungsmechanismus für Ca^{2+} und wird u.a. bei Ca^{2+} -Überladung aktiviert.

1.6. Sphingolipide als Botenstoffe der Apoptose

Es konnte gezeigt werden, dass neben der bisher beschriebenen Kaskade die Sphingolipide Ceramid und Sphingosin bei der Entstehung apoptotischer Signale über das CD95-Rezeptor-System in einigen Zelltypen beteiligt sind [13, 27]. Dabei wird bei Rezeptorstimulation das Enzym saure Sphingomyelinase (ASM) vermutlich durch die beiden DISC-Proteine (death inducing signaling complex) FADD und TRADD aktiviert [72, 87]. ASM besitzt sein pH-Optimum zwischen 4,5 und 5,0 und scheint in sauren Kompartimenten wie Lysosomen oder Endosomen lokalisiert zu sein. Es spaltet Sphingomyelin, ein Phospholipid der Plasmamembran, zu Ceramid und Phosphorylcholin. Eines der wohl wichtigsten Produkte im weiteren Ceramidstoffwechsel stellt Sphingosin dar, das bei der Hydrolyse von Ceramid (katalysiert von Ceramidasen) entsteht.

Wird der CD95-Rezeptor einer Jurkat-T-Zelle (Typ-II-Zelle) stimuliert, kommt es in der Zelle zu einer sehr schnellen Ceramidproduktion, der sogleich ein Anstieg der Sphingosinkonzentration folgt. Es folgt über eine PTP-Aktivierung die Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom C mit anschließender Caspase-8- und Bid-Aktivierung [18, 41] (Abbildung 4). Dies geschieht aufgrund des Einflusses beider Lipide, obwohl diese Reaktionen zuerst nur Ceramid zugeschrieben wurden. Zwar sind Sphingosin und Ceramid in der Zelle frei konvertierbar, durch die Hemmung der entsprechenden Enzyme in Typ-II-Zellen konnte jedoch bewiesen werden, dass Sphingosin auch alleine einen potenten Induktor von Apoptose darstellt [78]. Weitere Versuche zeigten, dass auch

Einleitung

exogen auf Jurkat-Zellen gegebenes Sphingosin zum gleichen Ergebnis, also zur Apoptose, führt [18].

Durch Sphingosin induzierter Zelltod kann durch antiapoptotische Bcl-2-Abkömmlige wie Bcl-x_L verhindert werden. Das Sphingolipid scheint in Typ-II-Zellen also eine wichtige Rolle bei der CD95-induzierten, vom Mitochondrium abhängigen Apoptose zu spielen [18, 77].

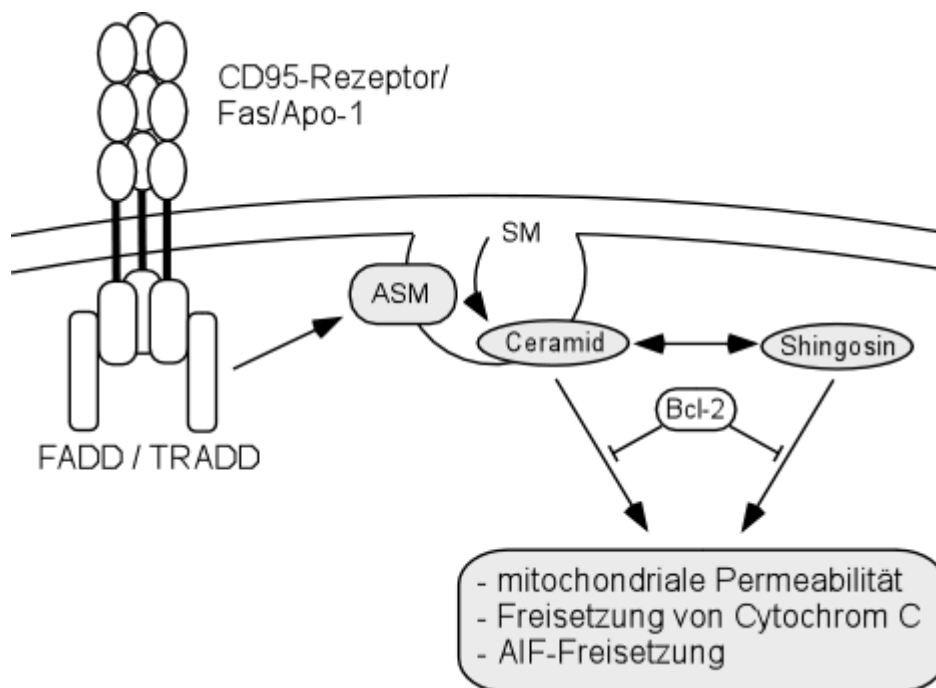


Abbildung 4: Zusammenspiel von CD95-Rezeptor, Sphingolipiden und Mitochondrium
Die DISC-Proteine FADD und TRADD aktivieren die saure Sphingomyelinase (ASM), welche aus plasmamembranärem Sphingomyelin (SM) Ceramid abspaltet. Ceramid kann zu Sphingosin hydrolysiert werden. Der Einfluß beider Lipide führt im Mitochondrium zu Eröffnung der PTP, Freisetzung von Cytochrom C und AIF-Freisetzung, was durch Bcl-2 verhindert werden kann.

1.7. Fragestellung

Diese Arbeit untersucht die Frage, ob der sphingosin-induzierte Block des speichergesteuerten Ca^{2+} -Kanals über die mitochondriale Depolarisation vermittelt wird und ob es auch hier wie beim CD95-induzierten Weg eine Möglichkeit gibt, die Mitochondrien zu schützen. Dieser Fragestellung wurde durch Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\phi_m$ und des Ca^{2+} -Signals nach CD95-Stimulation nachgegangen. In diesem Zusammenhang ist die Rolle von Mitochondrien bei der CD95-induzierten CRAC-Inhibition von Interesse. Nach CD95-Stimulation kommt es zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\phi_m$ mit anschließender Blockade des Ca^{2+} -Einstromes am CRAC-Kanal.

Dieser Fragestellung liegt der Nachweis zugrunde, dass die saure Sphingomyelinase (ASM) an der CD95-abhängigen Inhibition des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstromes am CRAC-Kanal beteiligt ist. Da mehrere ihrer Metaboliten es vermögen, den Kanal zu hemmen, sollen in dieser Arbeit die Einflüsse von Sphingosin eingehender untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Substanzen und Lösungen

2.1.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nichts anderes angegeben ist, bei der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen und in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst.

Das Calciumionophor Ionomycin (freie Säure) sowie das Protonophor Carbonylcyanid (CCCP) wurden bei Calbiochem (Bad Soden, Deutschland), die Fluoreszenzfarbstoffe Fura-2-AM, Fura-Red-AM, Fluo-3-AM, DiOC₆ und der Lösungsvermittler Pluronic F-127 bei Molecular Probes (Eugene, USA) gekauft. Das Sphingolipid Sphingosin wurde von Biomol (Hamburg, Deutschland) bezogen und in unvergälltem, reinem Ethanol gelöst.

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

2.1.2. Lösungen

Für die Aufbewahrung der Zellen während der Ca²⁺-Messungen am FACS-Gerät und der Video-Imaging-Experimente wurden folgende Lösungen verwendet (alle mit demineralisiertem Wasser hergestellt):

Ca²⁺-Ringer:

| | |
|-------------------|-----------|
| NaCl | 145mmol/l |
| HEPES | 10mmol/l |
| Glucose | 10mmol/l |
| KCl | 5mmol/l |
| CaCl ₂ | 2mmol/l |
| MgCl ₂ | 1mmol/l |

Calcium-freier Ringer mit 2mmol/l EGTA:

| | |
|-------------------|-----------|
| NaCl | 145mmol/l |
| HEPES | 10mmol/l |
| Glucose | 10mmol/l |
| KCl | 5mmol/l |
| MgCl ₂ | 3mmol/l |
| EGTA | 2mmol/l |

Die für den Betrieb des FACS-Gerätes notwendigen Lösungen (FACS-Flow, - Save, -Rinse und Cellwash) wurden von Becton Dickinson (San Jose, USA) bezogen.

2.2. Zellkultur

Die verwendete Zelllinie Jurkat sowie die transfizierten Jurkat-T-Zellen (s.u.) wurden in RPMI-1640 gehalten, das mit 10% FCS, 10mmol/l HEPES, 2mmol/l L-Glutamin, 1mmol/l Natrium-Pyruvat, 100µmol/l nichtessentielle Aminosäuren, 100U/ml Penizillin, 100µg/ml Streptomycin und 50µmol/l beta-Mercaptoethanol (alle Substanzen Life Technologies, Eggenstein) ergänzt wurde (RPMI-K10).

Die Passage der Zelllinien erfolgte zwei- bis dreimal pro Woche.

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

Material und Methoden

Neben der Zelllinie Jurkat fanden auch Jurkat-T-Zellen Anwendung, die mit der Erbinformation für Bcl-2, einem Inhibitor der Apoptose, permanent transfiziert waren. Als Vektor für die Transfektion diente Invitrogen pRc/CMV. Von den Bcl-2-Mutanten kamen fünf verschiedene Typen zum Einsatz, die sich in der Lokalisation des Bcl-2 unterscheiden. Den Mutanten fehlte entweder ihre Ankerdomäne für Membranen oder ihre Ankerdomäne wurde durch eine Zielsequenz für die mitochondriale Membran bzw. die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) ersetzt.

Tabelle 1: Transfizierte Zellen

| Mutanten-Name | Ort der Bcl-2-Expression |
|----------------------|---------------------------------------|
| Vektorkontrolle (VC) | - |
| Acta | Mitochondrium |
| Wildtyp (WT) | Mitochondrium und ER |
| CB5 | ER |
| Δ TM | Zytosol (ohne transmembranären Anker) |

Den permanenten Transfektanten wurde zusätzlich ein Resistenzgen gegen Geneticin (G418) zusammen mit der Ziel-DNA kotransfiziert. Die Zellen wurden unter Antibiotika (Geneticin 1mg/ml im Medium einmal pro Woche) weiter kultiviert, um durch den so aufgebauten Selektionsdruck nur die permanent-transfizierten Zellen am Leben zu halten.

2.3. Fluoreszenz-Aktiverter-Zell-Sorter (FACS)

2.3.1. Grundlagen der Durchflußzytometrie

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

So können die Größe der Zellen und die Homogenität des Zytoplasmas ohne weitere Vorbehandlung der Proben ermittelt werden. Hierzu werden die Zellen aus einem Probenröhrchen mittels Überdruck durch eine Meßkammer gedrückt und beim Eintreten in die Meßkammer mit einer Trägerflüssigkeit stark beschleunigt, wodurch sich Zellaggregate auftrennen. Die Zellen passieren dann einzeln den Strahl eines Argon-Lasers der Wellenlänge 488nm. Das Maß für die Größe einer Zelle ergibt sich aus ihrer Durchlässigkeit (Vorwärtsstreuung (FSC)) für das Laserlicht, welches mittels eines Photodetektors aufgefangen wird. Die Homogenität (oder Granularität) einer Zelle wird über das im rechten Winkel gestreute Laserlicht (Seitwärtsstreuung (SSC)) ebenfalls mit einem Photodetektor bestimmt. Über drei weitere Meßkanäle (FL1: $\lambda = 530\text{nm}$, FL2: $\lambda = 585\text{nm}$, FL3: $\lambda = 650\text{nm}$) kann gleichzeitig zu den zuvor beschriebenen Parametern Licht verschiedener Wellenlängen aufgezeichnet werden (Abbildung 5). Darüber hinaus werden zu jedem Datenfile die Einstellungen des FACS-Gerätes, die Parameter zur Aufzeichnung in der verwendeten Software (Cellquest, Becton Dickinson, San Jose, USA) und der Zeitpunkt, an dem jede einzelne Zelle den Meßstrahl passiert, aufgezeichnet.

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

Bei den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen wurden, wenn nichts anderes angegeben ist, 10 000 Zellen untersucht. Die Messungen fanden alle bei Raumtemperatur (20°C) statt.

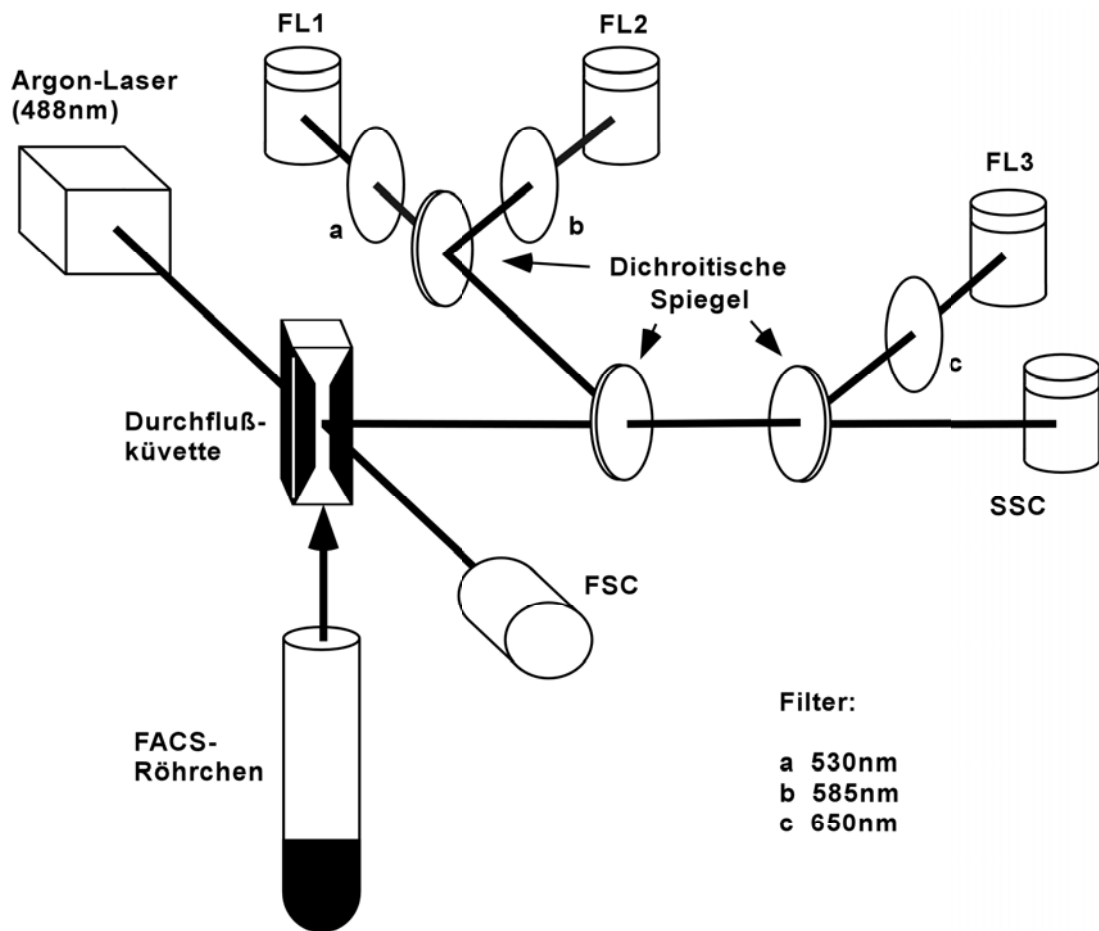


Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Durchflußzytometers

2.3.2. Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ mit dem FACS

Mit Hilfe fluoreszierender, zellmembrangängiger Substanzen ist es mit dem FACS möglich, intrazelluläre Prozesse wie die Veränderungen der cytosolischen Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in biologisch intakten Zellen sichtbar zu machen.

Die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ erfolgte im Durchflußzytometer mit zwei Fluoreszenz-Farbstoffen, da man hier im Gegensatz zur Ratio-Video-Imaging Technik (s.u.) nur eine Anregungswellenlänge zur Verfügung hat. Um dennoch möglichst viele störende Faktoren (Farbstoffkonzentration, Hintergrundfluoreszenz) zu minimieren, wurden Farbstoffe verwendet (Fura-Red-AM und Fluo-3-AM beide

Molecular Probes, Eugene, USA), die in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration gegenläufig ihre Intensität nach Anregung bei 488nm mittels eines Argon-Lasers verändern. Fura-Red zeigt mit sinkender $[Ca^{2+}]_i$ eine Zunahme in der Intensität des emittierten Lichts, gemessen im Kanal 3 (FL3) des Durchflußzytometers ($\lambda = 650\text{nm}$), Fluo-3 reagiert bei Anstieg des intrazellulären Calciums mit einer Intensitätszunahme und wurde bei $\lambda = 530\text{nm}$ in Kanal 1 (FL1) aufgezeichnet. Der Quotient der beiden Intensitäten (Fluo-3/Fura-Red) ermöglicht so eine Zwei-Farbstoff Ratiomessung [14, 59].

Für die Messung wurden die Jurkat-T-Lymphozyten 30min mit $4,5\mu\text{mol/l}$ Fura-Red-AM und 10min mit $0,5\mu\text{mol/l}$ Fluo-3-AM unter Verwendung von Pluronic F-127 (Molecular Probes, 15%-ige Lösung in DMSO, 1:1000 verdünnt im Medium) als Lösungsvermittler für Fura-Red-AM im Brutschrank bei $36,6^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 beladen. Um den Ladevorgang des Farbstoffes zu beenden, wurden die Zellen abzentrifugiert, in Ca^{2+} -Ringer resuspendiert und weitere 20min bei Raumtemperatur vor Licht geschützt inkubiert. Die Messung wurde ebenfalls bei 20° Celsius durchgeführt. Die Aktivierung des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms erfolgte durch $1\mu\text{mol/l}$ Thapsigargin, das der Zellsuspension 5min vor der Messung zugegeben wurde.

Damit Unterschiede bei der Beladung der Lymphozyten mit den Fluoreszenzfarbstoffen ausgeschlossen werden konnten und um $[Ca^{2+}]_i$ näherungsweise zu berechnen, wurde der Zellsuspension bei einigen Messungen 5min vor der Messung das Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin ($10\mu\text{mol/l}$) zugegeben, um $[Ca^{2+}]_i$ zu manipulieren. Hierbei fand die Resuspension der Zellen nach Farbstoffbeladung mit unterschiedlichen Lösungen statt: Die Ca^{2+} -Sättigung der Farbstoffe wurde mit 2mmol/l Ca^{2+} in der Eichlösung (Ca^{2+} -Ringer) erreicht, Ca^{2+} -freie Bedingungen wurden in Ringer-Lösung mit 2mmol/l EGTA ohne Ca^{2+} hergestellt.

Die Ratio (R) wurde analog dem im Kapitel 2.4. Fluoreszenzmikroskopie beschriebenen Verfahren nach Grynkiewicz [26] berechnet, wobei sich die

Ratio einer Zwei-Farbstoff Messung wie hier als Quotient aus Intensität Farbstoff 1 (Fluo-3-AM) und Intensität Farbstoff 2 (Fura-Red-AM) ergibt.

Die Aufarbeitung der Daten erfolgte zunächst mit der Software Cellquest bzw. WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, TRSI, La Jolla, Ca, USA).

In einem weiteren Schritt wurde dann mit einem selbsterstellten Algorithmus (verwendete Software Igor Pro, Wavemetrics, OR, USA) eine Häufigkeitsverteilung erstellt.

2.3.3. Messung des Mitochondrienpotentials $\Delta\phi$

Der für die Messung des Mitochondrienmembranpotentials verwendete Farbstoff heißt DiOC₆ (Molecular Probes, Eugene, USA). Hierbei handelt es sich um einen kationischen Farbstoff, der in der Doppellipidschicht der inneren, stark negativ geladenen Mitochondrienmembran akkumuliert. DiOC₆ zeigt nach Anregung durch den Argon-Laser ($\lambda = 488\text{nm}$) bei Potentialerhöhungen (Depolarisation) der Membran eine Abnahme der Intensität des emittierten Lichtes in Kanal 1 (FL1) des Durchflußzytometers ($\lambda = 530\text{nm}$).

Für die Messung wurden die Zellen 30min mit 200 $\mu\text{mol/l}$ DiOC₆ im Brutschrank bei 36,6°C und 5% CO₂ beladen. Um den Ladevorgang des Farbstoffes zu beenden wurden die Zellen abzentrifugiert und in RPMI-K10 resuspendiert. Die Messung erfolgte sofort bei 20° Celsius.

Die Auswertung der Daten und Erstellung der Häufigkeitsverteilung erfolgte mit der Software Cellquest und WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, TRSI, La Jolla, CA , USA).

2.4. Fluoreszenzmikroskopie

2.4.1. Grundlagen der Ratio-Video-Imaging Technik

Eine besondere Bedeutung bei der Ratio-Video-Imaging Technik kommt dem Farbstoff Fura-2-AM zu, der eine einfache und quantitative Bestimmung der freien cytoplasmatischen Calciumkonzentration erlaubt [26]. Die zu untersuchenden Zellen werden zunächst mit dem Acetoxymethylester des Farbstoffs Fura-2-AM (Molecular Probes, Eugene, USA) inkubiert. Der lipophile Ester diffundiert durch die Zellmembran ins Zellinnere und wird dort durch unspezifische Esterasen in seine calciumbindenden Form überführt. Durch die Esterspaltung gewinnt der Farbstoff an hydrophilen Eigenschaften und kann so die Zelle nicht mehr verlassen, was zu seiner Anreicherung im Cytosol führt. Die Dissoziationskonstante (K_D) des Fura-2 / Ca^{2+} -Komplexes im Bereich von 100 nmol/l und der maßgeschneiderte Spektralverlauf der Absorption prädestinieren diesen Farbstoff zur radiometrischen Messung von Ca^{2+} in lebenden Zellen. Die Anregung zur Fluoreszenz erfolgt bei Fura-2 im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ca^{2+} -Farbstoffen des FACS-Gerätes mit zwei verschiedenen Wellenlängen: die Ca^{2+} -freie Form absorbiert mit einem Maximum bei 380 nm, die Ca^{2+} -gebundene bei 340 nm. In beiden Fällen wird Licht der Wellenlänge 510nm emittiert. Wird nun in kurzer zeitlicher Abfolge bei beiden Wellenlängen beleuchtet, so ist die jeweilige Emissionsintensität eine Funktion der freien Ca^{2+} -Konzentration. Der Quotient der beiden Intensitäten (Ratio "R") erlaubt die näherungsweise Berechnung der $[Ca^{2+}]_i$ mit Hilfe der Formel nach Grynkiewicz [26], wobei sich Farbstoffkonzentration, Hintergrundfluoreszenz und andere Störfaktoren weitgehend herauskürzen. Hierbei wird eine K_D von 135 nmol/l für Fura-2 angenommen. Um die für jeden Zelltyp unterschiedlichen, maximal erreichbaren, niedrigsten und höchsten Calciumwerte bestimmen zu können, wurden die Zellen mit dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin (20 μ mol/l) für Calcium permeabel gemacht und je einmal in calciumfreier (Ringer-Lösung ohne Calcium mit 2 mmol/l EGTA) und einmal in Ringer-Lösung mit 2 mmol/l Calcium gemessen. Die so ermittelten Werte (R_{max} und R_{min}) werden zusammen mit der K_D in folgende Formel eingesetzt:

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

R_{\max} = Ratio gemessen in Ringer mit 2 mmol/l Calcium

R_{\min} = Ratio gemessen in Ringer ohne Calcium mit 2 mmol/l EGTA

R = gemessene Ratio im Experiment

K_D = Dissoziationskonstante für Fura-2 (135 nmol/l)

$[Ca^{2+}]_i$ = Calciumkonzentration im Cytosol der gemessenen Zellen

2.4.2. Aufbau der Messapparatur

Zur Messung der $[Ca^{2+}]_i$ wurden die Zellen in eine Plexiglaskammer (Eigenherstellung) gegeben, die von unten mit Hilfe von Silikon (Baysilone-Paste, Bayer, Leverkusen) durch ein Glasdeckglas ($\varnothing = 30$ mm) verschlossen wurde. Die Plexiglaskammer wurde sodann auf den Objektisch eines Invertmikroskops (Axiovert 135) der Firma Zeiss (Oberkochen, Deutschland) mit einem Ölimmersionsobjektiv (Vergrößerung 40x) eingespannt.

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

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

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

2.4.3. Messung der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ mit der Video-Imaging Technik

Vor der Messung wurden 250µl der zu untersuchenden Zellen auf das Deckglas einer Plexiglaskammer für ca. 5sec bei 1000U/min aufzentrifugiert (Zentrifuge 2S, Hettich, Tuttlingen). Zuvor waren die Zellen mit 1µmol/l Fura-2-AM (aus einer 1mmol/l Stammlösung in DMSO) für 30min im Brutschrank (bei 36,6°C und 5% CO₂) inkubiert, dann abzentrifugiert und in Ca²⁺-Ringer resuspendiert worden, um den Ladevorgang des Farbstoffes zu beenden. Bis zur Messung hatten die Zellen weitere 20min lichtgeschützt bei 20° Celsius geruht. Die Messung selbst erfolgte ebenfalls bei 20° Celsius. Um den speichergesteuerten Ca²⁺-Einstrom zu aktivieren, wurde auch hier der Zellsuspension 5min vor Messung 1µmol/l Thapsigargin zugegeben.

2.5. Statistische Auswertung der Daten

Zur Datenauswertung dienten das arithmetische Mittel und der Standard Error of the Mean (SEM). Zur Untersuchung auf signifikante Unterschiede der Ergebnisse wurde der Student's t-Test verwendet. Ein signifikanter Unterschied wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0.05$ angenommen.

Auf die Angabe der Versuchsergebnisse in Form von Tabellen wurde in dieser Arbeit bewußt verzichtet. Stattdessen wurden übersichtlichere Balkendiagramme gewählt, um durchschnittliche Meßwerte anzugeben.

3. Ergebnisse

3.1. Sphingosin führt zum Zusammenbrechen des Mitochondrienpotentials $\Delta\phi_m$ in Jurkat-T-Zellen

Wie sich gezeigt hat, spielen Mitochondrien bei der CD95-induzierten Blockade des CRAC-Kanals eine wesentliche Rolle. Um den Einfluß von Sphingolipiden, den zellulären Spaltprodukten der sauren Sphingomyelinase ASM auf die Mitochondrien zu untersuchen, wurde im folgenden Experiment das Mitochondrienmembranpotential $\Delta\phi_m$ von Jurkat-T-Zellen nach Gabe von $10\mu\text{M}$ des Lipidmessengers Sphingosin mittels FACS gemessen. Dabei wiesen schon 2h nach Sphingosingabe ca. 36% der Zellen deutliche Potentialerhöhungen ihrer Mitochondrienmembranen auf. Nach 4h konnte man einen $\Delta\phi_m$ -Zusammenbruch bei ca. 68% der Jurkat-T-Zellen beobachten. Zur Kontrolle wurde eine Probe mit $50\mu\text{M}$ Carbonylcyanid (CCCP) versetzt, welches Mitochondrien maximal depolarisiert (Abbildung 6).

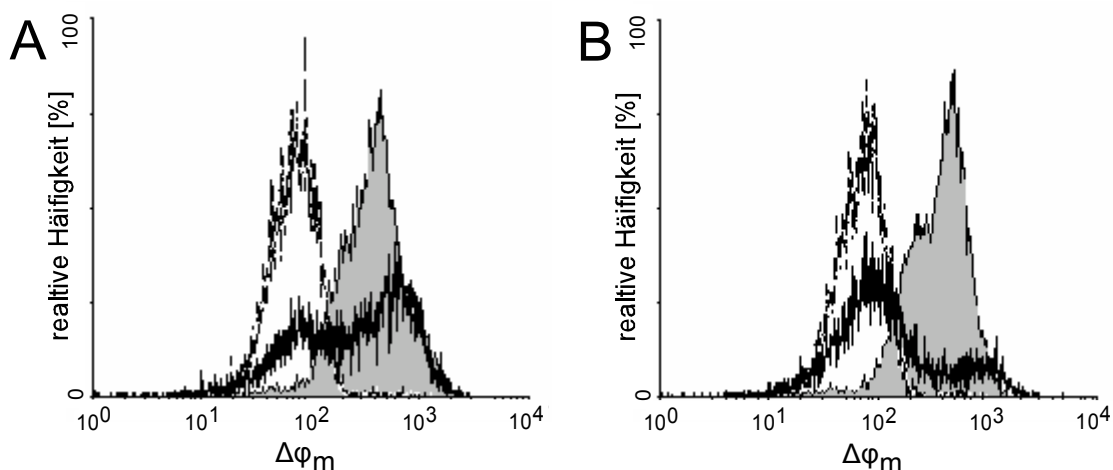


Abbildung 6: Sphingosin depolarisiert die Membranen von Mitochondrien

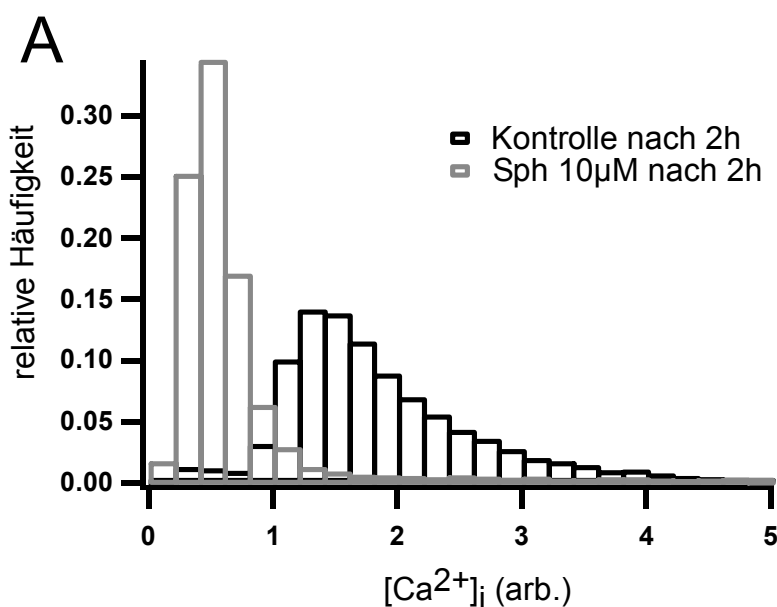
Jurkat-T-Zellen wurden mit $10\mu\text{M}$ Sphingosin inkubiert und nach Färbung mit 200pM DiOC₆ das $\Delta\phi_m$ am FACS gemessen. Nach 2h (A) weisen ca. 36% der mit Sphingosin behandelten Zellen (dicke schwarze Linie) einen $\Delta\phi_m$ -Zusammenbruch auf, während nach 4h (B) ca. 68% der Mitochondrienmembranen depolarisiert waren. Kontrollzellen

Ergebnisse

zeigten ein intaktes $\Delta\phi_m$ (grau unterlegte Kurven). Als Positivkontrolle wurde eine Probe mit 50 μ M CCCP versetzt, die $\Delta\phi_m$ zum maximalen Zusammenbruch bringt (gestrichelte schwarze Linie). Das Ergebnis ist repräsentativ für fünf Experimente mit jeweils 10 000 Zellen.

3.2. Sphingosin blockiert den kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom des CRAC-Kanals in Jurkat-T-Zellen

Um herauszufinden, ob exogen angebotenes Sphingosin bei Jurkat-T-Zellen gleiche Reaktionen in Bezug auf das zelluläre Calcium auslöst wie Liganden am CD95-Rezeptor, wurden Jurkat-T-Zellen mit Sphingosin inkubiert, der speichergesteuerte Ca^{2+} -Einstrom mittels 1 μ M Thapsigargin (TG) induziert und mit Hilfe der FACS-Technik untersucht. Bei diesen Messungen stellte sich heraus, dass Sphingosin analog zum $\Delta\phi_m$ -Zusammenbruch den kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom des CRAC-Kanals in den T-Zellen schon nach 2h blockiert, wobei die Blockierung bis 4h nach Gabe von Sphingosin anhielt (Abbildung 7).



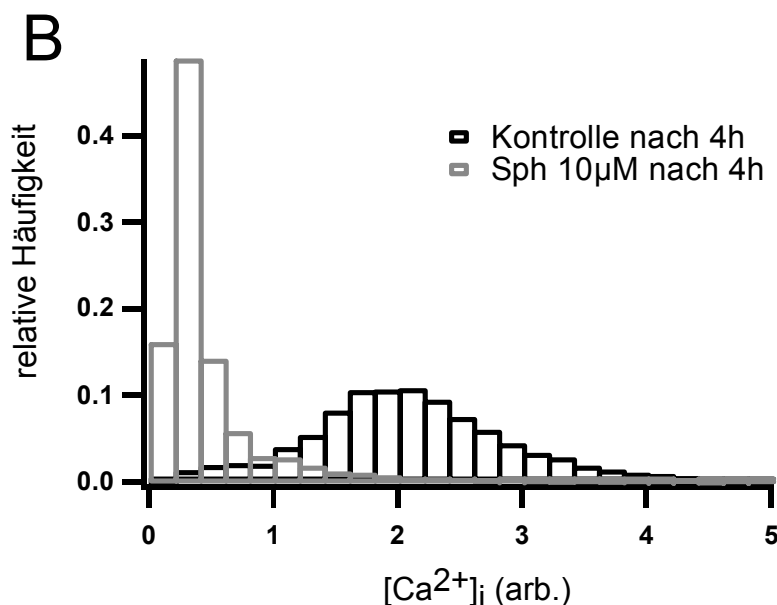


Abbildung 7: Sphingosin hemmt den kapazitiven Ca²⁺-Einstrom

Die Grafiken zeigen die Häufigkeitsverteilungen der gemessenen Intensitäten (Ratio), die direkt proportional zum [Ca²⁺]_i sind. Jurkat-Zellen wurden hier mit 10µM Sphingosin inkubiert und mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fura-Red und Fluo-3 beladen. Die [Ca²⁺]_i wurde dann nach Induktion des speichergesteuerten Ca²⁺-Einstroms mittels 1µM TG radiometrisch gemessen. Die mit Sphingosin behandelten Zellen (graue Balken) wiesen sowohl 2h (A) als auch 4h (B) nach Gabe eine erniedrigte [Ca²⁺]_i auf, während der Ca²⁺-Gehalt der Kontroll-Zellen (schwarze) Balken deutlich höher war. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mehrere Experimente mit jeweils 10 000 Zellen.

3.3. Bcl-2 verzögert den sphingosin-induzierten $\Delta\phi_m$ -Zusammenbruch in Jurkat-T-Zellen

Nach Gabe von 10µM Sphingosin zeigten die mit Bcl-2 transfizierten Zellen (s. Kapitel 2.2.) je nach Lokalisation des Bcl-2-Proteins in der Zelle deutlich andere Reaktionen als normale Jurkat-Zellen. Während mitochondriales Bcl-2 die Zelle vor der Mitochondriendepolarisation noch 2h nach Gabe von 10µM Sphingosin weitgehend schützt (Acta und WT), kann Bcl-2 den $\Delta\phi_m$ -Zusammenbruch in den Zellen, in denen das Protein außerhalb des Mitochondriums lokalisiert ist (CB5 und Δ TM), nicht aufhalten (Abbildung 8 A).

Ergebnisse

Die Vektorkontroll-Zellen, die kein Bcl-2 exprimieren, reagieren ähnlich wie normale Vertreter der Jurkat-T-Zelllinie. Nach Sphingosin-Inkubation von 2h findet man bei fast allen Zellen einen $\Delta\phi_m$ -Zusammenbruch, der 4h nach Gabe immer noch anhält.

Nach 4h findet man schließlich auch die Mitochondrienmembranen fast aller Acta- und WT-Zellen vollständig depolarisiert (Abbildung 8 B).

Auch hier wurde eine Probe mit 50 μ M CCCP versetzt und zur Kontrolle mituntersucht (in den Abbildungen nicht gezeigt).

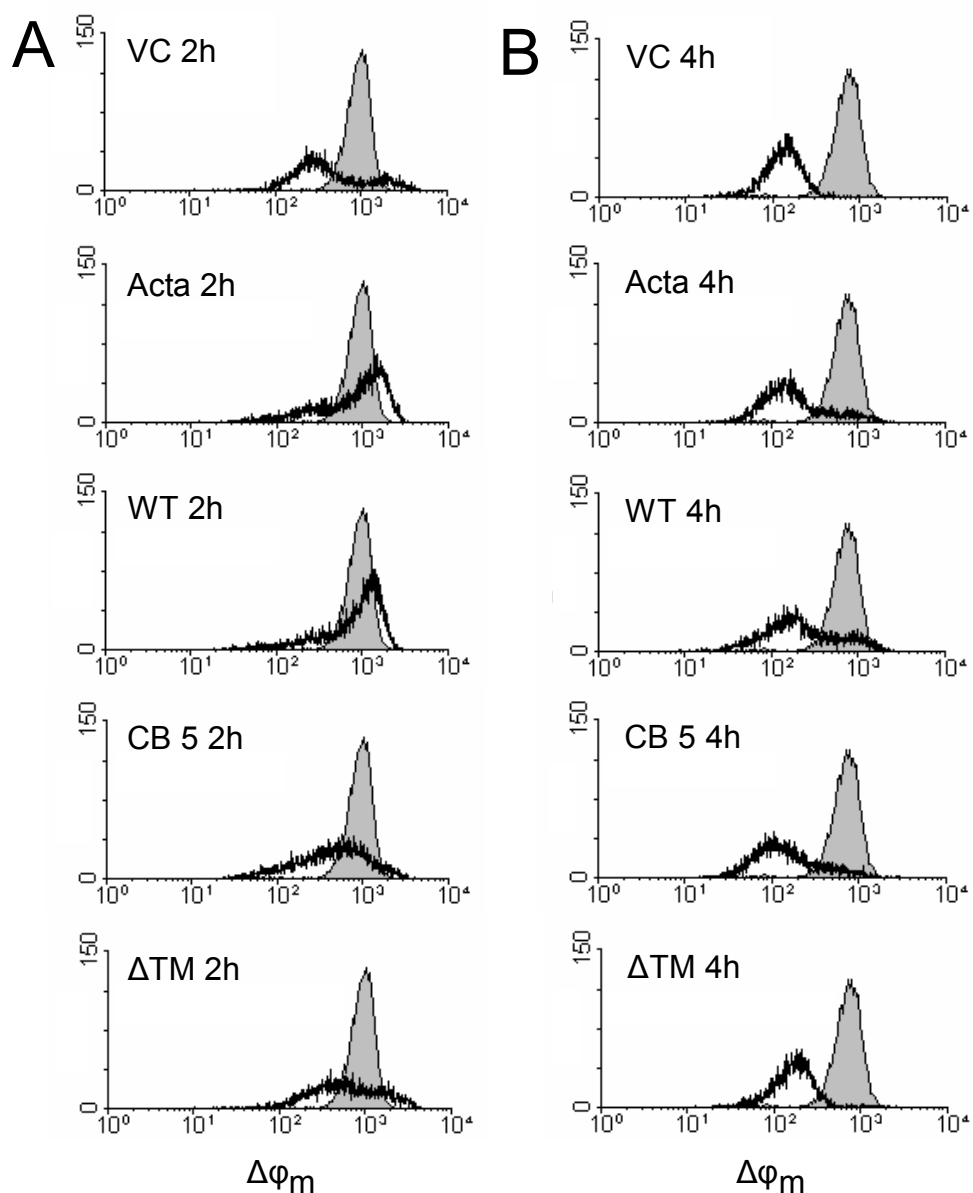


Abbildung 8

Ergebnisse

Zu Abbildung 8: Bcl-2 verzögert den $\Delta\phi_m$ -Zusammenbruch durch Sphingosin

Mit Bcl-2 transfizierte Jurkat-Zellen wurden mit 10 μ M Sphingosin inkubiert und das $\Delta\phi_m$ am FACS gemessen (schwarze Linien). Kontrollzellen aller Zelltypen wiesen ein intaktes $\Delta\phi_m$ auf (grauunterlegte Kurven). (A) Nach 2-stündiger Sphingosin-Inkubation schützte mitochondriales Bcl-2 fast komplett vor dem $\Delta\phi_m$ -Zusammenbruch (Acta, WT), während eine Überexpression von Bcl-2 am endoplasmatischen Retikulum nur moderat schützte (CB 5). Zytosolisches Bcl-2 (Δ TM) hatte keinen inhibierenden Effekt auf $\Delta\phi_m$. (B) Nach 4h zeigten die Zellen mit mitochondrialer Bcl-2-Überexpression nur noch einen geringen hemmenden Effekt (Acta, WT), ähnlich verhielt es sich bei den CB 5-Zellen. Vektorkontrollen (VC) und Δ TM reagierten mit einem totalen Zusammenbruch des $\Delta\phi_m$.

Das Ergebnis ist repräsentativ für mehrere Experimente mit jeweils 10 000 Zellen.

3.4. Bcl-2 schützt nicht vor sphingosin-induzierter Blockade des CRAC-Kanals in Jurkat-T-Zellen

Analog zur normalen Jurkat-T-Zellpopulation wurde auch bei Jurkat-T-Zellen mit Bcl-2-Expression der kapazitive Ca^{2+} -Einstrom nach Sphingosingabe untersucht. Die Zellen wurden wieder mit 10 μ M Sphingosin inkubiert und der speichergesteuerte Ca^{2+} -Einstrom mittels 1 μ M Thapsigargin induziert. Bei der FACS-Messung zeigte sich, dass Sphingosin den CRAC-Kanal sowohl in den Vektorkontrollzellen als auch in Zellen mit Bcl-2-Expression am Mitochondrium (Acta, WT) schon nach 2h blockiert (nicht gezeigt).

Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurden die Proben zusätzlich mit der Videoimaging-Technik untersucht, da diese Technik sensitiver ist als die Zwei-Farbstoff-Ratiomessung des FACS-Gerätes.

Bei diesem Versuch wurden außerdem auch die Zellen gemessen, die Bcl-2 nur im ER oder Zytosol exprimieren (CB5 und Δ TM). Gabe von 10 μ M Sphingosin blockierte bei allen fünf Zelltypen den CRAC-Kanal nach spätestens 2h nach Induktion des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms mit Hilfe von 1 μ M Thapsigargin (Abbildung 9).

Ergebnisse

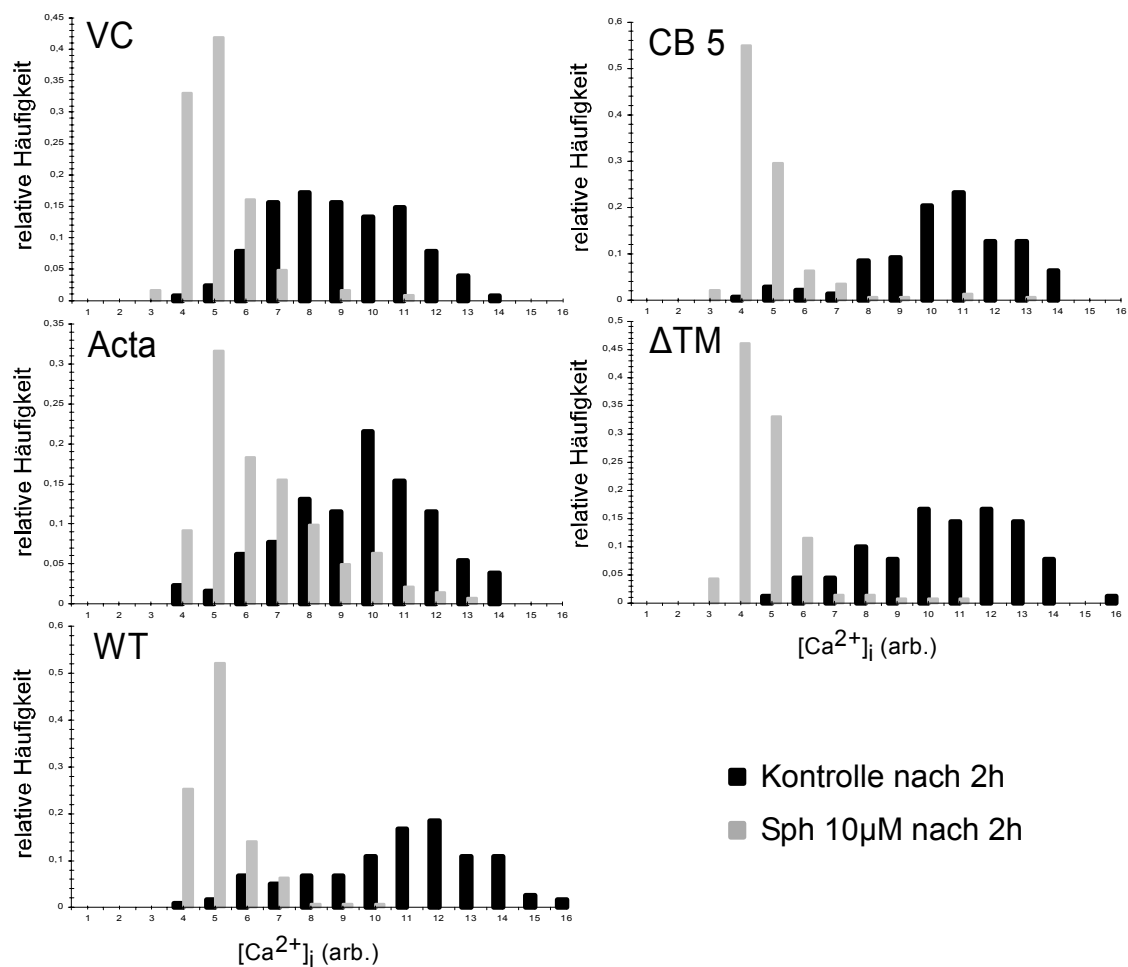


Abbildung 9: Einfluß von Bcl-2 auf den sphingosin-induzierten CRAC-Block

Die Balkenhistogramme zeigen die Häufigkeitsverteilungen der gemessenen Intensitäten (Ratio), die direkt proportional zum $[Ca^{2+}]_i$ sind. Mit Bcl-2 transfizierte Jurkat-Zellen wurden auch hier mit 10 μ M Sphingosin inkubiert und nach Färbung mit Fura-2-AM mit Hilfe der Ratio-Video-Imaging-Technik untersucht, nachdem der kapazitive Ca^{2+} -Einstrom mittels 1 μ M TG induziert wurde. Während in den Kontrollzellen (schwarze Balken) die $[Ca^{2+}]_i$ nach 2h erwartungsgemäß anstieg, wurde der Ca^{2+} -Einstrom aller mit Bcl-2-transfizierten Zellen nach 2-stündiger Sphingosin-Inkubation ebenso inhibiert wie in Kontrollzellen (graue Balken). Dies zeigt, dass Bcl-2 nicht vor einem durch Sphingosin hervorgerufenen Block des CRAC-Kanals schützt.

Die Ergebnisse sind repräsentativ für vier Experimente mit jeweils ca. 150 Zellen.

3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Nach Inkubation von Jurkat-T-Zellen mit Sphingosin kommt es zum $\Delta\phi_m$ -Zusammenbruch am Mitochondrium und einer zeitgleichen Inhibition des Ca^{2+} -Einstromes durch den CRAC-Kanal.

Das antiapoptotisch wirkende Protein Bcl-2 schützt bei mitochondrialer Lokalisation die Jurkat-Zellen zwar vor einem Potentialverlust durch Sphingosin, die Inhibition des CRAC-Kanals wird gleichzeitig aber nicht verhindert, wodurch der Ca^{2+} -Einstrom geblockt ist.

Aufgrund hoher Analogien zu den Ergebnissen nach CD95-Rezeptor-Stimulation sind diese Daten vereinbar mit einer Rolle von Sphingosin bei der CD95-vermittelten Signaltransduktion.

4. Diskussion

4.1. Inhibition des CRAC-Kanals und $\Delta\phi_m$ -Zusammenbruch nach CD95-Stimulation

Speichergesteuerter Ca^{2+} -Einstrom durch den kapazitiven CRAC-Kanal und somit die Erhöhung der intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration sind eine wichtige Voraussetzung für verschiedene Funktionen im T-Lymphozyten wie Zellaktivierung, Proliferation, Zytokinfreisetzung und Differenzierung [43]. Nach Stimulation des TZR-Komplexes kommt es zur Bildung von Inositoltriphosphat (IP_3), welches Ca^{2+} über den IP_3 -Rezeptor aus den intrazellulären Speichern des ER freisetzt [4]. Durch die Speicherentleerung werden die kapazitiven CRAC-Kanäle geöffnet und es beginnt ein langanhaltender Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle, wobei der Mechanismus der Kanalaktivierung noch weitgehend unbekannt ist [66]. Der anhaltende Ca^{2+} -Einstrom führt via Calmodulin/Calcineurin und NFAT zur Synthese von IL-2, welches die T-Lymphozyten zur Proliferation anregt [56].

Die Immunantwort bedarf jedoch auch einer inhibierenden Regulation. Die Aktivierung, Differenzierung und Proliferation der T-Lymphozyten muss kontrolliert werden, damit diese sich nicht gegen körpereigene Proteine richten (Selbsttoleranz) [83] oder deren Anzahl nicht ins Unermessliche steigt und nach der Antwort wieder abfallen kann (aktivierungsinduzierte Apoptose) [2, 8]. Bei diesen regulierenden Prozessen spielt die CD95-vermittelte Apoptose eine wichtige Rolle.

Durch eine Blockade des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms, die auch apoptoseunabhängig durch CD95-Stimulation induziert wird, werden lymphozytenaktivierende Ca^{2+} -abhängige Signale unterdrückt, woraufhin Differenzierung, Zytokinfreisetzung und Proliferation der Zellen ausbleiben.

Die Regulation des CRAC-Kanals läuft zu großen Teilen über das Mitochondrium. Wie schon früher beschrieben, greifen sie bei der T-Zellaktivierung in den Ca^{2+} -Haushalt ein, indem sie die einströmenden Ionen

aufnehmen, um kontinuierlich Ca^{2+} für die IL-2-Synthese freigegeben zu können [31]. Nahe am CRAC-Kanal gelegene Mitochondrien verhindern durch die Ca^{2+} -Aufnahme eine Akkumulierung von Ca^{2+} in der Pore und damit eine Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung des Kanals [30] (siehe Kapitel 1.5.). Die Ca^{2+} -Aufnahme des Mitochondriums wird durch das stark negative Potential der mitochondrialen Membranen ($\Delta\phi_m$) angetrieben. Bricht $\Delta\phi_m$ zusammen, verliert das Mitochondrium die Fähigkeit zur Ca^{2+} -Aufnahme und der CRAC-Kanal schließt durch Selbstinaktivierung.

Da die Inaktivierung des CRAC-Kanals und der Zusammenbruch von $\Delta\phi_m$ zeitgleich nach CD95-Stimulation auftreten, lag die Hypothese nahe, dass die CD95-induzierte Blockade des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms über den Zusammenbruch von $\Delta\phi_m$ vermittelt wird. Dies wurde sowohl mit Hilfe verschiedener Versuche mit mitochondrialen Hemmstoffen wie Antimycin A1 und Oligomycin, als auch durch Experimente mit Zellen, die das vor Apoptose schützende Protein Bcl-2 an unterschiedlichen zellulären Lokalisationen überexprimieren, bewiesen.

Die Versuche zeigten, dass die Bcl-2-Mutanten Acta und WT den CD95-induzierten Zusammenbruch des $\Delta\phi_m$ und die Blockade des CRAC-Kanals verhindern und die Lymphozytenaktivierung so aufrechterhalten konnten. In beiden Zelltypen befindet sich Bcl-2 am Mitochondrium. CB5-Mutanten, die Bcl-2 am ER aufweisen, zeigten nur einen geringen Effekt auf $\Delta\phi_m$ und den Ca^{2+} -Block am CRAC-Kanal, zytosolisches Bcl-2 in ΔTM -Zellen gar keinen.

Am Mitochondrium lokalisiertes Bcl-2 stabilisiert das Mitochondrium, so dass es nicht zu einer Depolarisation der Mitochondrienmembran kommt und die Triebkraft für die Ca^{2+} -Aufnahme erhalten bleibt. Freies Ca^{2+} kann in der Porenregion des CRAC-Kanals somit nicht akkumulieren und die Selbstinaktivierung des Kanals wird verhindert. Der anhaltende Ca^{2+} -Einstrom sichert die Aufrechterhaltung der nachfolgenden zellulären Ca^{2+} -abhängigen Prozesse: Aktivierung, Differenzierung und Proliferation.

4.2. Die Rolle von Sphingosin beim $\Delta\phi_m$ -Zusammenbruch

Neben dem mitochondrialen Weg wurden bisher noch einige andere Signale beschrieben, die den kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom am CRAC-Kanal verhindern. Ein zentrales Signal stellt dabei die Aktivierung der sauren Sphingomyelinase (ASM) dar. Bereits kurze Zeit nach CD95-Stimulation kommt es zu einer raschen Aktivierung dieses Enzyms. Es spaltet aus der Zellmembran stammendes Sphingomyelin zu Ceramid, das wiederum durch Ceramidasen zu Sphingosin hydrolysiert wird [13, 27]. Die Rolle der beiden ASM-Metaboliten in der weiteren Signaltransduktion wurde schon früher mit Hilfe von Wholecell-Patch-Clamp-Experimenten bei Jurkat-T-Zellen untersucht. Ceramid und Sphingosin inhibierten dabei den Ca^{2+} -Einstrom durch den CRAC-Kanal [41].

Den endgültigen Beweis, dass ASM am CD95-vermittelten Weg beteiligt ist, zeigten Versuche mit Zellen von Patienten, die an der Niemann-Pick-Krankheit (NPK) leiden. Bei der Niemann-Pick-Krankheit handelt es sich um einen vererbten Defekt der zellulären ASM. B-Lymphozyten der betroffenen Patienten wiesen nach CD95-Stimulation keine Inhibition des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms auf. Durch Transfektion von NPK-Zellen mit einem Expressionsvektor für ASM gelang es jedoch, die ASM-Aktivität wieder herzustellen, wonach die Zellen auf CD95-Stimulation mit einem Block des CRAC-Kanals und damit einem einwärts gerichteten Ca^{2+} -Strom reagierten [41].

Untermauert wurden diese Ergebnisse durch Versuche anderer Arbeitsgruppen, die NPK-Lymphoblasten und ASM-knockout-Mäuse untersuchten. Sowohl die NPK-Zellen, als auch Zellen verschiedener Organe der ASM-knockout-Mäuse wiesen nach Behandlung mit ionisierender Strahlung eine unzureichende Apoptosereaktion auf. Man erreichte auch hier mit der retroviralen Transfektion menschlicher ASM-cDNA in den NPK-Lymphoblasten den zu erwartenden Apoptoseablauf nach Bestrahlung [68].

Ceramid und Sphingosin inhibieren zwar den Ca^{2+} -Einstrom am CRAC-Kanal. Welcher Mechanismen sich die beiden ASM-Metaboliten jedoch bedienen, ist noch nicht genau bekannt. Läuft das notwendige Signal zur Blockade des Kanals wie nach CD95-Stimulation auch über das Mitochondrium oder gibt es noch einen anderen Weg, der zur CRAC-Inhibition führt? Dass Ceramid und vor

allem Sphingosin einen Einfluss auf das Mitochondrium haben, wurde von Cuvillier et al. bereits bewiesen (siehe Kapitel 1.6.). Sie fanden Sphingosin als potenten Induktor von Apoptose, der nach exogener Gabe zu einer mitochondrialen PTP-Aktivierung mit nachfolgender Freisetzung von Cytochrom C und Caspase-8- und Bid-Aktivierung führt [18]. Ob es das Mitochondrium jedoch auf direktem oder indirektem Weg beeinflusst ist bisher noch nicht geklärt. Versuche mit exogen verabreichtem Ceramid am isolierten Mitochondrium führten zumindest nicht zu einer Aktivierung der PTP mit nachfolgender Cytochrom-Freisetzung, was eher auf einen indirekten Weg hindeutet. Diese Versuche wurden durchgeführt, um zu klären, ob die Jurkat-T-Zellen apoptotische Veränderungen durchmachen [78]. Ein Zusammenhang zum CRAC-Kanal wurde nicht hergestellt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass ein Zusammenhang zwischen $\Delta\phi_m$ -Zusammenbruch und CRAC-Blockade besteht. Exogen auf Jurkat-Zellen gegebenes Sphingosin führt nach kurzer Zeit zu einem Zusammenbruch des $\Delta\phi_m$. Die Depolarisation der Mitochondrienmembran findet dabei zeitgleich mit einer Inhibition des kapazitiven Ca^{2+} -Einstromes durch den CRAC-Kanal statt. Diese Resultate sind analog zu den Ergebnissen, die man nach CD95-Stimulation von Jurkat-Zellen erhält. Es kommt im gleichen zeitlichen Rahmen zu den beschriebenen Ereignissen.

Neben normalen Jurkat-T-Zellen wurden auch Bcl-2-Mutanten untersucht. Dabei schützte mitochondriales Bcl-2 (Acta- und WT-Zellen) nach Sphingosingabe vor einem $\Delta\phi_m$ -Zusammenbruch, während am ER lokalisiertes Bcl-2 (CB5) die Depolarisation nur mäßig verhinderte. Im Zytosol vorliegendes Bcl-2 (ΔTM) hatte keinen Effekt auf $\Delta\phi_m$. Auch diese Ergebnisse stimmen mit denen nach CD95-Stimulation überein.

Unterschiedliche Resultate ergaben sich in Bezug auf den CRAC-Kanal. Während die Bcl-2-Mutanten den Kanal nach CD95-Stimulation teilweise vor einer Blockade retteten (Acta, WT), wiesen nach exogener Sphingosingabe alle Zelltypen eine Inhibition des CRAC-Kanals auf.

4.3. Sphingosin blockiert den CRAC-Kanal auf direktem und indirektem Weg

Die Hemmung kapazitiver CRAC-Kanäle durch den CD95-Rezeptor in Jurkat-T-Zellen ist vollständig abhängig von der Depolarisation der Mitochondrienmembranen. Einem Zusammenbruch des $\Delta\phi_m$ folgt eine Blockade des CRAC-Kanals. Da die Gabe von Sphingosin ebenfalls zu einem $\Delta\phi_m$ -Zusammenbruch in den Jurkat-Zellen führt, der zeitgleich mit der Hemmung des Ca^{2+} -Einstroms auftritt, spricht dies dafür, dass die sphingosin-induzierte CRAC-Blockade ebenfalls über die Mitochondrien vermittelt wird. Dies wird von der Tatsache untermauert, dass die Mitochondrien vor den Einflüssen von Sphingosin durch mitochondriales Bcl-2 geschützt werden [18]. Sowohl das transmembranäre Potential als auch die davon abhängende Triebkraft zur Ca^{2+} -Aufnahme bleiben durch Bcl-2 im Mitochondrium erhalten. Ca^{2+} kann weiterhin vom Mitochondrium aufgenommen werden und wird von der Porenregion des CRAC-Kanals entfernt, was die Selbstinaktivierung des Kanals verhindert.

Erstaunlicherweise wird mit Bcl-2 zudem nur ein einziges Protein benötigt, um das Mitochondrium vor dem Potentialzusammenbruch zu bewahren. Sphingosin scheint daher eine sehr spezifische Wirkung auf die PTP zu haben und nicht von unspezifischer Natur zu sein. Dies stellt einen weiteren Hinweis für die Teilnahme von Sphingosin an der mitochondrium-vermittelten CRAC-Inhibition dar.

Wie die Ca^{2+} -Versuche mit den Bcl-2-Mutanten erkennen lassen, muss es allerdings noch eine andere Möglichkeit der CRAC-Hemmung durch Sphingosin geben. Obwohl die Mutanten, die Bcl-2 am Mitochondrium exprimieren, den $\Delta\phi_m$ -Zusammenbruch verzögern konnten, reagierten auch sie auf die Gabe von Sphingosin mit einer Inhibition des Ca^{2+} -Einstroms durch den CRAC-Kanal.

Dieses Verhalten spricht für eine direkte Hemmung des Kanals durch Sphingosin und wurde von Mathes et al. bereits in Mastzellen eingehender untersucht. Sie fanden schon 200s nach Sphingosin-Gabe eine Blockade des Ca^{2+} -Kanals, die mit einer Zunahme der Ganzzellkapazität verbunden war. Dies lässt den Rückschluß zu, dass die Lipidmoleküle in der Plasmamembran

Diskussion

akkumulieren und den CRAC-Kanal direkt hemmen. Versuche mit verschiedenen anderen Sphingolipiden führten auch zu einer Kanal-Blockade, sofern sie nahe mit Sphingosin verwandt waren [50].

Prinzipiell könnte der CRAC-Kanal auch durch Sphingosinvorläufer, Abbauprodukte von Sphingosin oder weitere Metaboliten des SM-Stoffwechsels verursacht werden. Experimente mit SM, Palmitoyl Coenzym A, Sphingosin-1-Phosphat oder Fumonisin B₁ zeigten Mathes et al. zufolge jedoch keinerlei Auswirkungen auf den den Ca²⁺-Kanal [50].

Des Weiteren konnte von dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass intrazellulär appliziertes Sphingosin keinen inhibierenden Effekt auf den Ca²⁺-Einstrom durch den CRAC-Kanal hat. Dieses wird zellulär entweder sehr schnell metabolisiert oder verlässt die Zellmembran nach extrazellulär und kann somit nicht in die Membran eingebaut werden, was wiederum für den Zusammenhang zwischen der Akkumulation von Sphingosin in der Zellmembran und einer Kanal-Blockade spricht [50].

Die beschriebenen und selbst durchgeführten Experimente mit Sphingosin verdeutlichen, dass die Applikationsweise von Sphingosin in Bezug auf die Ergebnisse eine große Rolle spielen. Es bleibt dabei zu klären, inwiefern sich die Wirkung von exogen auf die Zellen gegebenem Sphingosin mit der von intrazellulär produziertem Sphingosin vergleichen lässt, da exogenes Sphingosin in Zellen vermutlich anders verteilt ist als endogen produziertes Sphingosin [18].

Die Ergebnisse dieser Arbeit im Vergleich mit den Resultaten nach direkter CD95-Stimulation erlauben folgende Schlüsse in Bezug auf das zelluläre Ca²⁺-Signal: Sphingosin blockiert den kapazitiven Ca²⁺-Einstrom des CRAC-Kanals sowohl direkt, als auch über einen mitochondrialen, $\Delta\phi_m$ -abhängigen Weg, wobei letzterer durch den direkten Effekt auf den Kanal maskiert wird (Abbildung 10).

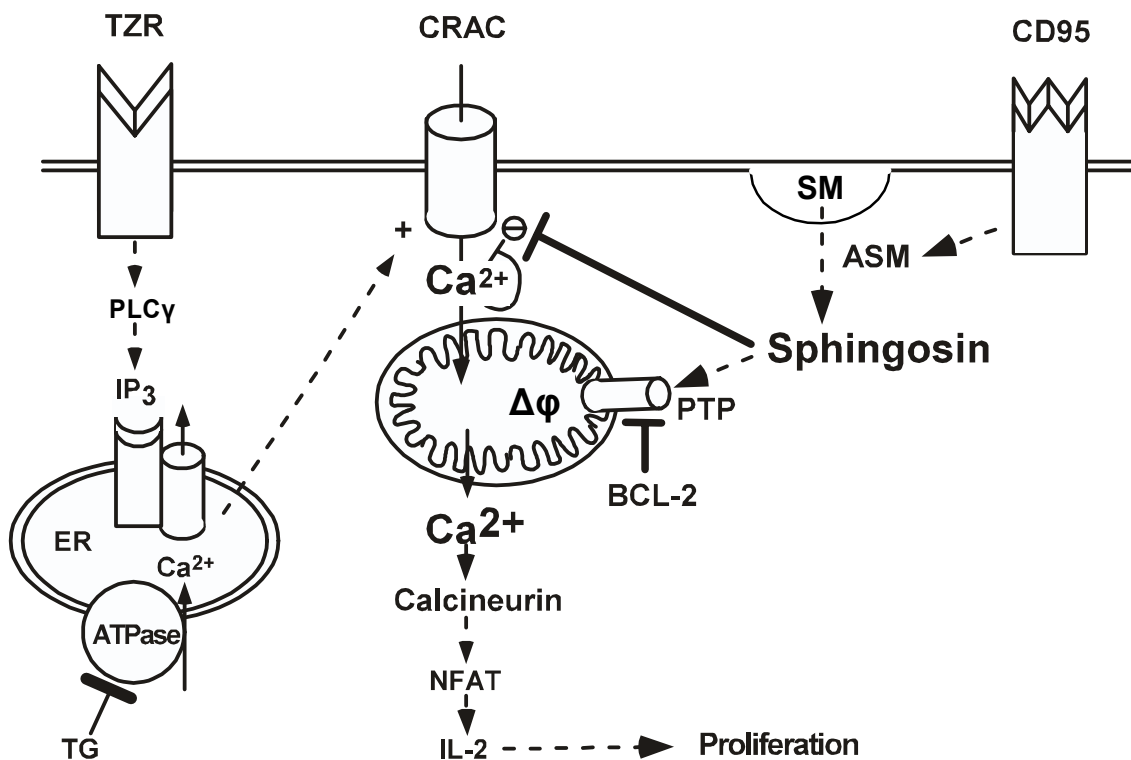


Abbildung 10: Der Einfluss von Sphingosin auf $\Delta\phi_m$ und CRAC-Kanal

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen folgendes Modell: Während der Stimulation des CD95-Rezeptors wird das Lipid Sphingosin aus Sphingomyelin freigesetzt. Es inhibiert den CRAC-Kanal sowohl indirekt über seine Einflüsse auf das Mitochondrium, die zum $\Delta\phi_m$ -Zusammenbruch führen, als auch direkt.

Das Schaubild zeigt vereinfacht auch die TZR-Aktivierungskaskade einer T-Zelle über PLC γ und IP₃, die Freisetzung von Ca²⁺ aus den intrazellulären Speichern und die bisher noch nicht genau bekannte Übertragung des Signals vom ER zum CRAC-Kanal. Der anhaltende Ca²⁺-Einstrom durch den CRAC-Kanal führt über verschiedene Schritte schließlich zur Synthese von IL-2 und so zur Proliferation des Lymphozyten.

5. Zusammenfassung

Das Zustandekommen einer zellulären Immunantwort hängt maßgeblich vom Aktivierungszustand der T-Lymphozyten ab. Für ihre Aktivierung benötigen die Zellen freies Calcium, das durch spezifische Ionenkanäle ins Zellinnere gelangt. Calciumsignale und Ionenkanäle sind aber nicht nur an der Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von Zellen, sondern auch am programmierten Zelltod, der Apoptose, beteiligt. Diese wird durch eine Stimulation des CD95-Rezeptors induziert und führt nach ASM-Aktivierung über eine Depolarisation der mitochondrialen Membran zur Blockierung des CRAC-Kanals, was einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle verhindert. Welche Rolle ASM und ihre Metaboliten dabei spielen, ist bisher noch nicht ganz geklärt.

Die hier vorgelegte Arbeit hatte deshalb zum Ziel, die Rolle von Sphingosin bei der Inhibition des CRAC-Kanals genauer zu ermitteln. Als Zellmodell dienten dabei sowohl normale Jurkat-T-Zellen als auch Bcl-2-überexprimierende Jurkat-T-Zellen, die mit Hilfe der FACS- und der Video-Imaging-Technik untersucht wurden. Die Versuche zeigten einerseits, dass eine durch Sphingosin induzierte Blockade des kapazitiven Ca^{2+} -Einstromes zeitgleich mit einer Depolarisation der Mitochondrienmembranen auftritt. Andererseits kann am Mitochondrium lokalisiertes Bcl-2 zwar vor einem Sphingosin-induzierten $\Delta\phi_m$ -Zusammenbruch schützen, hat aber keinen Einfluß auf die Blockade des CRAC-Kanals.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass Sphingosin den CRAC-Kanal auf zwei verschiedene Arten blockieren kann: sowohl indirekt über den Zusammenbruch des $\Delta\phi_m$, wobei die Triebkraft der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme verloren geht und zu einer Selbstinaktivierung durch lokale Ca^{2+} -Akkumulation führt, als auch durch eine direkte Beeinflussung des Kanals.

6. Literaturverzeichnis

1. Adams, J.M. and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281(5381), 1322-6.
2. Alderson, M.R., Tough, T.W., Davis-Smith, T., Braddy, S., Falk, B., Schooley, K.A., Goodwin, R.G., Smith, C.A., Ramsdell, F. Lynch, D.H. (1995). Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* 181(1), 71-7.
3. Bernardi, P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79(4), 1127-55.
4. Berridge, M.J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361(6410), 315-25.
5. Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G. Thompson, C.B. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74(4), 597-608.
6. Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85(6), 803-15.
7. Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H. Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 270(14), 7795-8.
8. Brunner, T., Mogil, R.J., LaFace, D., Yoo, N.J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S.J., Force, W.R., Lynch, D.H., Ware, C.F. et al. (1995). Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 373(6513), 441-4.
9. Chang, B.S., Kelekar, A., Harris, M.H., Harlan, J.E., Fesik, S.W. Thompson, C.B. (1999). The BH3 domain of Bcl-x(S) is required for inhibition of the antiapoptotic function of Bcl-x(L). *Mol Cell Biol* 19(10), 6673-81.
10. Cheng, E.H., Levine, B., Boise, L.H., Thompson, C.B. Hardwick, J.M. (1996). Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* 379(6565), 554-6.
11. Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M. Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81(4), 505-12.

Literaturverzeichnis

12. Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A.B., Ebb, R.G., Gallo, G.J., Elangovan, B., Chinnadurai, G. Lutz, R.J. (1995). A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *Embo J* 14(22), 5589-96.
13. Cifone, M.G., De Maria, R., Roncaioli, P., Rippo, M.R., Azuma, M., Lanier, L.L., Santoni, A. Testi, R. (1994). Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. *J Exp Med* 180(4), 1547-52.
14. Coligan, J., Kruisbeek, A., Margulies, D., Shevach, E. Strober, W. (1995). *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, Inc., USA 5.5.1-5.5.21.
15. Cosman, D. (1994). A family of ligands for the TNF receptor superfamily. *Stem Cells* 12(5), 440-55.
16. Crompton, M. (2000). Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J Physiol* 529(1), 11-21.
17. Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341(2), 233-49.
18. Cuvillier, O., Edsall, L. Spiegel, S. (2000). Involvement of sphingosine in mitochondria-dependent Fas-induced apoptosis of type II Jurkat T cells. *J Biol Chem* 275(21), 15691-700.
19. DeFranco, A.L. (1994). Signaling pathways activated by protein tyrosine phosphorylation in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 6(3), 364-71.
20. Enari, M., Hug, H. Nagata, S. (1995). Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature* 375(6526), 78-81.
21. Flanagan, W.M., Corthesy, B., Bram, R.J. Crabtree, G.R. (1991). Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 352(6338), 803-7.
22. French, L.E., Hahne, M., Viard, I., Radlgruber, G., Zanone, R., Becker, K., Muller, C. Tschopp, J. (1996). Fas and Fas ligand in embryos and adult mice: ligand expression in several immune-privileged tissues and coexpression in adult tissues characterized by apoptotic cell turnover. *J Cell Biol* 133(2), 335-43.
23. Green, D.R. and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281(5381), 1309-12.
24. Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R. Ferguson, T.A. (1995). Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270(5239), 1189-92.

Literaturverzeichnis

25. Griffith, T.S., Yu, X., Herndon, J.M., Green, D.R. Ferguson, T.A. (1996). CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity* 5(1), 7-16.
26. Grynkiewicz, G., Poenie, M. Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260(6), 3440-50.
27. Gulbins, E., Bissonnette, R., Mahboubi, A., Martin, S., Nishioka, W., Brunner, T., Baier, G., Baier-Bitterlich, G., Byrd, C., Lang, F. et al. (1995). FAS-induced apoptosis is mediated via a ceramide-initiated RAS signaling pathway. *Immunity* 2(4), 341-51.
28. Hille, B. (1992). Ionic channels of excitable membranes. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates Inc. 127-135.
29. Hofer, A.M., Fasolato, C. Pozzan, T. (1998). Capacitative Ca²⁺ entry is closely linked to the filling state of internal Ca²⁺ stores: a study using simultaneous measurements of ICRAC and intraluminal [Ca²⁺]. *J Cell Biol* 140(2), 325-34.
30. Hoth, M., Button, D.C. Lewis, R.S. (2000). Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(19), 10607-12.
31. Hoth, M., Fanger, C.M. Lewis, R.S. (1997). Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol* 137(3), 633-48.
32. Hoth, M. and Penner, R. (1993). Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol* 465, 359-86.
33. Hsu, H., Xiong, J. Goeddel, D.V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81(4), 495-504.
34. Itoh, N. and Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 268(15), 10932-7.
35. Jenner, S., Farndale, R.W. Sage, S.O. (1994). The effect of calcium-store depletion and refilling with various bivalent cations on tyrosine phosphorylation and Mn²⁺ entry in fura-2-loaded human platelets. *Biochem J* 303(2), 337-9.
36. Kelekar, A., Chang, B.S., Harlan, J.E., Fesik, S.W. Thompson, C.B. (1997). Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL. *Mol Cell Biol* 17(12), 7040-6.

37. Kelekar, A. and Thompson, C.B. (1998). Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 8(8), 324-30.
38. Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14(22), 5579-88.
39. Kovacs, B. and Tsokos, G.C. (1995). Cross-linking of the Fas/APO-1 antigen suppresses the CD3-mediated signal transduction events in human T lymphocytes. *J Immunol* 155(12), 5543-9.
40. Kroemer, G. (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 3(6), 614-20.
41. 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. (1999). Stimulation of CD95 (Fas) blocks T lymphocyte calcium channels through sphingomyelinase and sphingolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(24), 13795-800.
42. Lewis, R.S. (1999). Store-operated calcium channels. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 33, 279-307.
43. Lewis, R.S. and Cahalan, M.D. (1995). Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 13, 623-53.
44. Lewis, R.S., Ross, P.E. Cahalan, M.D. (1993). Chloride channels activated by osmotic stress in T lymphocytes. *J Gen Physiol* 101(6), 801-26.
45. Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94(4), 491-501.
46. Liu, J., Farmer, J.D., Jr., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I. Schreiber, S.L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66(4), 807-15.
47. Los, M., Van de Craen, M., Penning, L.C., Schenk, H., Westendorp, M., Baeuerle, P.A., Droge, W., Krammer, P.H., Fiers, W. Schulze-Osthoff, K. (1995). Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis. *Nature* 375(6526), 81-3.
48. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94(4),

49. Martin, S.J. and Green, D.R. (1995). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82(3), 349-52.
50. Mathes, C., Fleig, A. Penner, R. (1998). Calcium release-activated calcium current (ICRAC) is a direct target for sphingosine. *J Biol Chem* 273(39), 25020-30.
51. Minn, A.J., Velez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M. Thompson, C.B. (1997). Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385(6614), 353-7.
52. Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettlesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., Ng, S.L. Fesik, S.W. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381(6580), 335-41.
53. Mustelin, T., Coggeshall, K.M., Isakov, N. Altman, A. (1990). T cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C requires tyrosine phosphorylation. *Science* 247(4950), 1584-7.
54. Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. Dixit, V.M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85(6), 817-27.
55. Nagata, S. and Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* 267(5203), 1449-56.
56. Negulescu, P.A., Shastri, N. Cahalan, M.D. (1994). Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(7), 2873-7.
57. Ng, F.W., Nguyen, M., Kwan, T., Branton, P.E., Nicholson, D.W., Cromlish, J.A. Shore, G.C. (1997). p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 139(2), 327-38.
58. Ng, F.W. and Shore, G.C. (1998). Bcl-XL cooperatively associates with the Bap31 complex in the endoplasmic reticulum, dependent on procaspase-8 and Ced-4 adaptor. *J Biol Chem* 273(6), 3140-3.
59. Novak, E.J. and Rabinovitch, P.S. (1994). Improved sensitivity in flow cytometric intracellular ionized calcium measurement using fluo-3/Fura Red fluorescence ratios. *Cytometry* 17(2), 135-41.
60. Oltvai, Z.N., Milliman, C.L. Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74(4), 609-19.

Literaturverzeichnis

61. Parekh, A.B. and Penner, R. (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 77(4), 901-30.
62. Parekh, A.B. and Penner, R. (1995). Depletion-activated calcium current is inhibited by protein kinase in RBL-2H3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(17), 7907-11.
63. Penner, R., Fasolato, C. Hoth, M. (1993). Calcium influx and its control by calcium release. *Curr Opin Neurobiol* 3(3), 368-74.
64. Petit, P.X., Susin, S.A., Zamzami, N., Mignotte, B. Kroemer, G. (1996). Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett* 396(1), 7-13.
65. Premack, B.A., McDonald, T.V. Gardner, P. (1994). Activation of Ca²⁺ current in Jurkat T cells following the depletion of Ca²⁺ stores by microsomal Ca(2+)-ATPase inhibitors. *J Immunol* 152(11), 5226-40.
66. Putney, J.W., Jr. (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11(10), 611-24.
67. Randriamampita, C. and Tsien, R.Y. (1993). Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx. *Nature* 364(6440), 809-14.
68. Santana, P., Pena, L.A., Haimovitz-Friedman, A., Martin, S., Green, D., McLoughlin, M., Cordon-Cardo, C., Schuchman, E.H., Fuks, Z. Kolesnick, R. (1996). Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* 86(2), 189-99.
69. Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Kramer, P.H. Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17(6), 1675-87.
70. Schendel, S.L., Xie, Z., Montal, M.O., Matsuyama, S., Montal, M. Reed, J.C. (1997). Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(10), 5113-8.
71. Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. Peter, M.E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254(3), 439-59.
72. Schwandner, R., Wiegmann, K., Bernardo, K., Kreder, D. Kronke, M. (1998). TNF receptor death domain-associated proteins TRADD and FADD signal activation of acid sphingomyelinase. *J Biol Chem* 273(10), 5916-22.
73. Schwartz, R.H. (1996). Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* 184(1), 1-8.

74. Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Waguri, S., Uchiyama, Y., Matsuda, H. Tsujimoto, Y. (1996). Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene* 13(1), 21-9.
75. Shimizu, S., Narita, M. Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399(6735), 483-7.
76. Singer, G.G. and Abbas, A.K. (1994). The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1(5), 365-71.
77. Susin, S.A., Zamzami, N. Kroemer, G. (1998). Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1366(1-2), 151-65.
78. Susin, S.A., Zamzami, N., Larochette, N., Dallaporta, B., Marzo, I., Brenner, C., Hirsch, T., Petit, P.X., Geuskens, M. Kroemer, G. (1997). A cytofluorometric assay of nuclear apoptosis induced in a cell-free system: application to ceramide-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 236(2), 397-403.
79. Tartaglia, L.A., Rothe, M., Hu, Y.F. Goeddel, D.V. (1993). Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 73(2), 213-6.
80. Thastrup, O., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Hanley, M.R. Dawson, A.P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(7).
81. Thastrup, O., Dawson, A.P., Scharff, O., Foder, B., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Bjerrum, P.J., Christensen, S.B. Hanley, M.R. (1989). Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions* 27(1-2), 17-23.
82. Tinel, H., Wehner, F. Sauer, H. (1994). Intracellular Ca²⁺ release and Ca²⁺ influx during regulatory volume decrease in IMCD cells. *PG - F130-8. Am J Physiol* 267(1 Pt 2).
83. Van Parijs, L. and Abbas, A.K. (1998). Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280(5361), 243-8.
84. Vaux, D.L., Haecker, G. Strasser, A. (1994). An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76(5), 777-9.
85. Weiss, A. (1991). Molecular and genetic insights into T cell antigen receptor structure and function. *Annu Rev Genet* 25, 487-510.

Literaturverzeichnis

86. Weiss, A. and Littman, D.R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76(2), 263-74.
87. Wiegmann, K., Schwandner, R., Krut, O., Yeh, W.C., Mak, T.W. Kronke, M. (1999). Requirement of FADD for tumor necrosis factor-induced activation of acid sphingomyelinase. *J Biol Chem* 274(9), 5267-70.
88. Xiang, J., Chao, D.T. Korsmeyer, S.J. (1996). BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25), 14559-63.
89. Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S.A. Kroemer, G. (1998). Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* 16(17), 2265-82.
90. Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M. Kroemer, G. (1996). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 183(4), 1533-44.
91. Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87(4), 619-28.
92. Zhu, W., Cowie, A., Wasfy, G.W., Penn, L.Z., Leber, B. Andrews, D.W. (1996). Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *Embo J* 15(16), 4130-41.
93. Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90(3), 405-13.
94. Zweifach, A. and Lewis, R.S. (1993). Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(13), 6295-9.
95. Zweifach, A. and Lewis, R.S. (1995). Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (ICRAC) due to local calcium feedback. *J Gen Physiol* 105(2), 209-26.

7. Danksagung

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn PD Dr. Albrecht Lepple-Wienhues am Physiologischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen angefertigt. Für seine stets gute Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Albrecht Lepple-Wienhues herzlich bedanken.

Meinen Laborkollegen Luzia Heil, Johannes Berschauer, Anja Bialkowski, Angelika Enzensberger, Birgit Heberle, Arvid Schäfer, Achim Seeger und Martina Welz danke ich für ihre guten Ratschläge und das sehr angenehme Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gehört meinen Eltern, Edith und Gunter Dangel, für den Rückhalt und die Unterstützung während meines Werdeganges.

8. Lebenslauf

| | |
|----------------------------|--|
| Name: | Dangel |
| Vorname: | <u>Georg</u> Richard |
| Geburtsdatum: | 21. November 1977 |
| Geburtsort: | Stuttgart |
| Staatsbürgerschaft: | deutsch, österreichisch |
| Eltern: | Gunter Dangel Edith Dangel |
| Schulbildung: | |
| 1984 – 1988 | Grundschule Birkach, Stuttgart |
| 1988 – 1997 | Paracelsus-Gymnasium-Hohenheim, Stuttgart Abschluss Abitur |
| Studium: | |
| WS 1997/98 | Studium der Medizin an der Eberhard-Karls- Universität Tübingen |
| Herbst 1999 | Ärztliche Vorprüfung |
| Frühjahr 2001 | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| Frühjahr 2003 | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 12. Mai 2004 | Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |