

Kalziumsignale in intestinalen Lymphozyten

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

des Doktors der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III

Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften

der Universität des Saarlandes

Von

Birgit Gisela Löffler, geb. Heß

Saarbrücken 2007

Tag des Kolloquiums: 19.05.2008

Dekan: Professor Dr. Uli Müller

Vorsitzender: Professor Dr. M.J. Schmitt

1. Prüfer: Professor Dr. M. Hoth

2.Prüfer: Professor Dr. I. Bernhardt

Akad. Mitarbeiter: Dr. E. Krause

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
Zusammenfassung	7
Summary	8
1. Einleitung	9
1.1. Kalziumsignale und Aktivierung von B- und T-Zellen	9
1.2. Das Immunsystem des Darms	16
1.3. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)	18
1.4. Zielsetzung der Arbeit	21
2. Material und Methoden	22
2.1. Material	22
2.1.1. Chemikalien	22
2.1.2. Antikörper	23
2.1.3. Lösungen für die Präparation muriner Zellen	24
2.1.4. Lösung zum Beschichten der Deckgläser	24
2.1.5. Lösungen für Kalzium-Imaging Experimente	25
2.1.6. Lösungen mit Antikörpern zur Identifikation und zur Stimulation der Zellen	25
2.1.7. Versuchstiere	25
2.1.8. Geräte	25
2.1.9. Auswertungsprogramme	26
2.2. Methoden	26
2.2.1. Isolierung von mononuklearen murinen Zellen aus dem Blut	26
2.2.2. Isolierung von mononuklearen murinen Zellen aus dem Darm	27
2.2.3. Induzierung der Kolitis bei Mäusen	29
2.2.4. Kalzium Imaging- Experimente	30
2.2.4.1. Beschichtung der Deckgläser	32
2.2.4.2. Der Messplatz	32
2.2.4.3. Kontrollversuch ohne Applikation von Substanzen	33
2.2.4.4. Experimente mit Thapsigarginlösungen	33

2.2.4.5. Experimente mit Antikörperstimulation	34
3. Ergebnisse	36
3.1. Optimierung der Zellpräparation	36
3.2. Kontrollversuche, um den Einfluss äußerer Faktoren auf die $[Ca^{2+}]_i$ der Lymphozyten zu testen	40
3.3. Vergleich von $[Ca^{2+}]_i$ in Blut- und Darmlymphozyten von Balb/cAnCrI-Mäusen nach Zugabe von unterschiedlichen Ca^{2+} -Lösungen mit Thapsigargin	42
3.5. Vergleich von $[Ca^{2+}]_i$ in Blut- und Darmlymphozyten von Balb/cAnCrI-Mäusen nach Antikörperstimulation	45
3.6. Vergleich von $[Ca^{2+}]_i$ in Blut- und Darmlymphozyten von verschiedenen TRPC-Knock-out- Mäusen nach Antikörperstimulation	50
3.6. Vergleich von $[Ca^{2+}]_i$ in Blut- und Darmlymphozyten von verschiedenen TRPC-Knock-out Mäusen nach Zugabe von unterschiedlichen Ca^{2+} -Lösungen mit Thapsigargin	53
3.7. Einfluss einer induzierten Darm-Kolitis auf die Kalziumsignale	56
4. Diskussion	61
4.1. Lymphozyten aus dem Darm	61
4.2. Isolation der Lymphozyten aus dem Darm	62
4.3. Vergleich von murinen und humanen $[Ca^{2+}]_i$ -Signale aus Lymphozyten	63
4.4. Physiologische Stimulation der Lymphozyten	65
4.5. $[Ca^{2+}]_i$ -Signale bei Lymphozyten aus verschiedenen TRPC-Knock-out Mäusen	67
4.6. $[Ca^{2+}]_i$ -Signale von Lymphozyten bei CED	68
4.7. Schlußbetrachtung und Ausblicke	70
5. Literatur	71
Lebenslauf	78

Abkürzungsverzeichnis

AM	Azetoxymethylester
AP-1	activator protein 1
APC	antigen presenting cell
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	B-cell receptor
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Kalziumkonzentration
CD	cluster of differentiation
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CRAC	calcium release activated channel
DAG	Diacylglycerol
DSS	Dextran Sulfate Sodium
DTT	DL-Dithiothreitol
ER	endoplasmatisches Retikulum
EDTA	Ethylendiaminetetra-Acetic Acid
EGTA	Ethylene Glycol-bis(β -Amino-Ethylen Ether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanat
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon γ
IP ₃	Inositol-1,4,4-trisphosphat
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
LPL	Lamina propria Lymphozyt
MHC	major histocompatibility complex
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NF κ B	nuclear factor- κ B
PBL	peripherer Blutlymphozyt
PIP ₂	Phosphatidylinositoldiphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase C- γ
PMCA	Plasma Membran Calcium ATPase

SCID	Severe combined immunodeficiency
SERCA	Sarco-endoplasmatic reticulum Calcium ATPase
SOC	store-operated channel
TCR	T-cell receptor
TG	Thapsigargin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TPP-Protein	Transient Rezeptor Potential-Protein

Zusammenfassung

Blutlymphozyten (PBL) und Lamina Propria Lymphozyten (LPL) sind Zellen des spezifischen Abwehrsystems im Organismus. Die LPL zeigen physiologischer Weise eine Hyporeaktivität gegenüber physiologischen Stimuli im Vergleich zu PBL. Kommt es zu einer Immunreaktion gegenüber nicht pathogenen Antigenen, kann dies zu einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung führen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode etabliert werden, um Lymphozyten aus dem Darm der Maus in ausreichenden Mengen zu isolieren. Bei den isolierten und nicht voraktivierten Zellen von verschiedenen Mausstämmen sollten mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und geeigneten Farbstoffen $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation gemessen, miteinander und mit Daten von Lymphozyten aus Mäusen mit experimentell induzierter Kolitis verglichen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich die Zellen aus den verschiedenen Mausstämmen durch die gewählten Stimuli, Thapsigargin und Antikörper gegen Zelloberflächenantigene, stimulieren lassen. Die Daten bestätigen eine niedrigere $[Ca^{2+}]_i$ der LPL gegenüber den PBL gesunder Mäuse, was bereits für humane Zellen gezeigt wurde.

Erste Daten von Mäusen mit induzierter Kolitis konnten aufgrund der Schwierigkeit der Präparation nur für wenige CD19⁺-Lymphozyten gewonnen werden. Bei diesen zeigte sich ein im Vergleich zu Kontrolltieren höherer $[Ca^{2+}]_i$.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass Lymphozyten aus dem Maudarm sowohl für die als Model für die Rolle von $[Ca^{2+}]_i$ Signalen bei CED, die Reproduktion der Daten mit Lymphozyten von Mäusen mit induzierter Kolitis vorrausgesetzt, als auch für die Analyse der Ca^{2+} -abhängigen Hyporeaktivität von LPLs genutzt werden können.

Summary

Peripheral blood lymphocytes (PBL) and lamina propria lymphocytes (LPL) are part of the specific immune system. LPLs are considered hypo-reactive, a phenomenon called oral tolerance. If this tolerance mechanism does not work properly, lamina propria T-cells may react to non-pathogenic antigens with an uncontrolled activation which can finally lead to chronic intestinal inflammation (inflammatory bowel disease, IBD).

The aim of this thesis included the evaluation of an method to isolate lymphocytes from mice intestine. $[Ca^{2+}]_i$ from isolated resting single cells from different mice strains were measured using suitable fluoroscopic Ca^{2+} sensitive dye. Finally $[Ca^{2+}]_i$ measurements in LPLs from healthy mice should be compared to $[Ca^{2+}]_i$ measurements from mice with an experimentally induced colitis.

The results of the present thesis show that thapsigargin as well as antibodies raised against T cell receptors (anti-CD3/anti-CD28) increase $[Ca^{2+}]_i$ in LPL from different mouse strains. Similar to previous findings for human cells show mice LPLs a much lower $[Ca^{2+}]_i$ signals as compared to PBLs from the same mice.

The isolation of LPLs from mice with experimentally induced colitis was unfortunately very difficult. Only from very few of the experiments it was possible to analyze $CD19^+$ (B-lymphocytes). However, the B-cell data show that in mice with colitis, $[Ca^{2+}]_i$ increases were on average higher than in cells from control mice.

From the results it can postulated, that LPL from mice can be used for both a model to investigate Ca^{2+} -dependent patho-physiological hyper-reactivity of lymphocytes during intestinal inflammation, assuming reproduction in mice with induced colitis, as well as for understanding the Ca^{2+} -dependent hypo-reactivity of LPLs.

1. Einleitung

1.1. Kalziumsignale und Aktivierung von B- und T-Zellen

Das Immunsystem stellt für jeden Organismus einen Schutzmechanismus dar, mit dessen Hilfe er seine biologische Identität verteidigen kann. Dieses Immunsystem ermöglicht es dem Organismus zwischen eigenen und fremden Strukturen zu unterscheiden und fremde Pathogene zu erkennen und zu zerstören. Besonders der Darm stellt eine große Eintrittspforte für Krankheitserreger dar und in dieser Arbeit sollten die Lymphozyten dieses Abwehrsystems hinsichtlich ihrer intrazellulären freien Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ näher untersucht werden.

Heute unterscheidet man zwischen dem unspezifischen Abwehrsystem, dem z.B. Granulozyten und Makrophagen angehören und dem spezifischen Abwehrsystem, das von den Lymphozyten repräsentiert wird. Die beiden verschiedenen Abwehrsysteme reagieren unterschiedlich. Das unspezifische Abwehrsystem macht die Fremdkörper durch Phagozytose und intrazellulären Abbau unschädlich, während das spezifische Immunsystem Antikörper und Effektorzellen bildet, die die Zielzelle für den Abbau markieren und zerstören. Um den Organismus wirkungsvoll zu schützen, arbeiten beide Systeme eng zusammen.

Ein erwachsener Mensch verfügt über etwa 10^{12} Lymphozyten, wobei täglich etwa 10^9 absterben. Der Nachschub an Lymphozyten kommt aus Stammzellen, die im Knochenmark lokalisiert sind und die die lymphoiden Vorläuferzellen herstellen. Diese lymphoiden Vorläuferzellen erhalten eine weitere Prägung, entweder in den lymphatischen Anteilen im Knochenmark (= Bone, B-Lymphozyten) oder im Thymus (T-Lymphozyten) [Klinke, et al., 2005].

Die Lymphozyten unterscheidet man heute aufgrund ihrer Oberflächenproteine (= Cluster of Differentiation, CD). Über 90% der B-Lymphozyten exprimieren das Oberflächenantigen CD19 auf der Zelloberfläche und sind CD3 negativ, deshalb werden das Vorkommen oder Fehlen der CD kurz als $CD19^+CD3^-$ bezeichnet. Die zwei Hauptgruppen der T-Zellen sind CD3 positiv, lassen sich aber über die CD4 und CD8 Oberflächenantigene unterscheiden.

Die T-Zellen erkennen ein Antigen nur dann, wenn es zusammen mit den MHC-Klasse-I bzw. II Antigenen (major histocompatibility complex, MHC) auf einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) präsentiert wird, während die B-Zellen mit ihren

BCR (B cell receptor) sowohl lösliche als auch zellgebundene Antigene erkennen können. Diese MHC-Antigene sind Zelloberflächenmoleküle (Rezeptoren), wobei MHC-I-Proteine auf fast allen Körperzellen vorkommen, MHC-II-Proteine kommen hauptsächlich auf antigenpräsentierenden Zellen, B-Zellen und Makrophagen vor.

Es kommt zu einer Stimulation von $CD8^+CD4^-$ -T-Zellen (zytotoxischer T-Lymphozyt), wenn diese T-Lymphozyten ein körperfremdes Antigen mit den MHC-Klasse-I-Molekülen als ihr Epitop auf einer Zelle erkennen. Viren benutzen den Syntheseapparat der Wirtszelle, um eigene Proteine herzustellen und sich zu vermehren. Es entstehen dabei endogene Antigene, die von der betroffenen Zelle zu Peptiden verdaut werden. Entstandene Antigenpeptide werden eingebettet in die MHC-Tasche auf der Zelloberfläche präsentiert. Bei Erstkontakt der T-Lymphozyten mit dem Antigen führt dies zu einer Kostimulation der T-Zellen, die die Differenzierung der T-Zellen zu reifen zytotoxischen T-Zellen und Gedächtniszellen ermöglicht. Die zytotoxischen $CD8^+CD4^-$ -T-Zellen lagern sich an befallenen Zellen mit dem als fremd erkannten Antigen an und leiten die Apoptose ein.

Die $CD4^+CD8^-$ -T-Zellen (T-Helferzellen) übernehmen immunregulatorische Aufgaben und reagieren mit MHC-Klasse-II-Molekülen. Sie aktivieren Makrophagen und liefern kostimulatorische Signale für die Proliferation und Ausdifferenzierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen [Sprent, J., 1994].

Kommt es zu einer Bindung zwischen der APC und einer T-Helferzelle, die den dazu gehörenden antigenspezifischen Rezeptor (T cell receptor, TCR) besitzt, wird die Zelle aktiviert. Die T-Helferzelle proliferiert und bildet Interleukin 2 (IL 2), die zytotoxische T-Zelle proliferiert durch das IL 2 und wird zur Effektorzelle, die Zielzellen abtöten kann [Klinke, R., et al., 2005].

Ein Schlüsselsignal für die Aktivierung von T- bzw. B-Zellen nach der Stimulation des T- bzw. B-Zell-Rezeptors (TCR, BCR) durch Antigene oder andere Substanzen, die an die Rezeptoren binden können, ist die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ [Lewis, R.S. 2001]. Um die Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale erfassen zu können, sollte zunächst in dieser Dissertation die Präparation der Lymphozyten aus dem Darm von Mäusen etabliert werden.

Der Aufbau der Rezeptoren von B- und T-Lymphozyten ist aufgeklärt. Sie werden in Rezeptorkomplexe eingeteilt, die aus variablen und konstanten Proteinbereichen bestehen. Die variablen Proteinbereiche sind zur Antigenerkennung nötig, die konstanten Proteinbereiche sind zur Signaltransduktion ins Zellinnere verantwortlich.

Wird der T- bzw. B-Zell-Rezeptor stimuliert, kommt es zur Aktivierung von Kinasen der Src-Familie, welche Tyrosinreste der ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) phosphorylieren. ITAMs sind in den zytoplasmatischen Regionen der Rezeptoren lokalisiert.

Über verschiedene Proteine wird schließlich die Phospholipase C ($PLC\gamma$) aktiviert, die das membranständige Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP_2) in Diacylglycerol (DAG) und 1,4,5-Inositoltriphosphat (IP_3) spaltet.

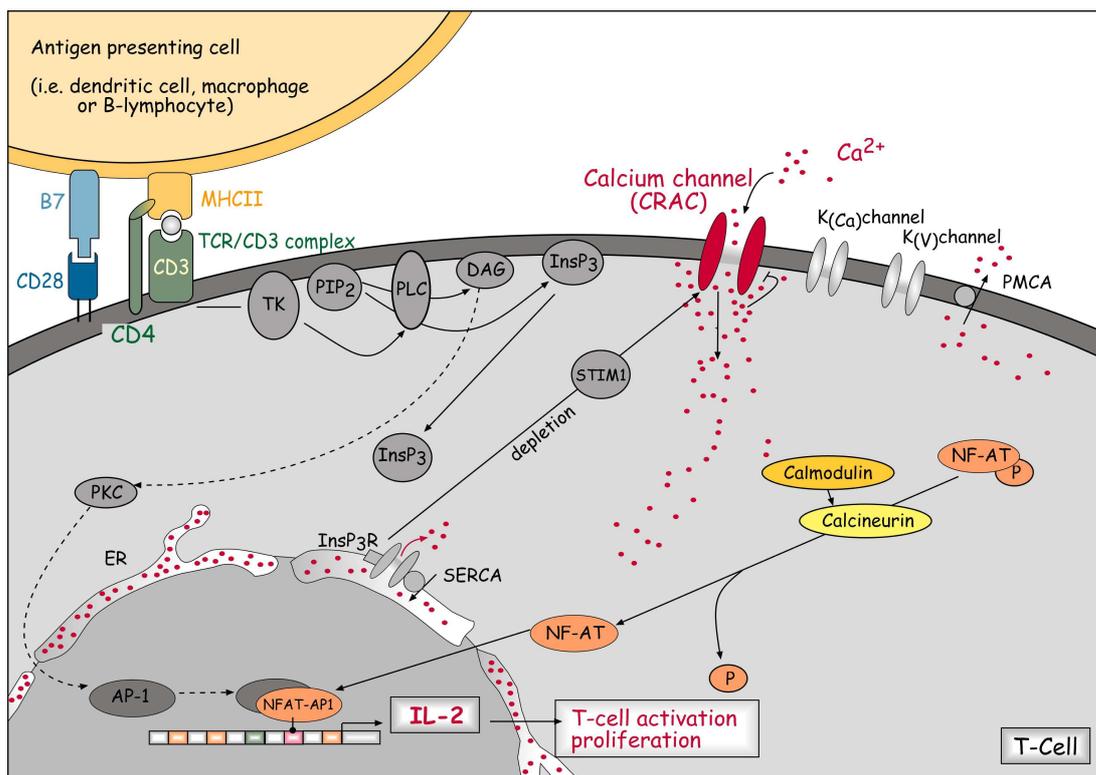


Abb.1.1. Modell der Kalziumsignalwege in T-Zellen; Die Stimulation über den TCR/CD3/CD28 Komplex durch eine antigenpräsentierende Zelle führt über mehrere Zwischenschritte zur Aktivierung von $PLC\gamma$. $PLC\gamma$ spaltet PIP_2 in DAG und IP_3 , DAG aktiviert PKC und IP_3 bindet an Rezeptoren an der ER-Membran, wodurch Ca^{2+} aus dem ER freigesetzt wird. Durch die Vermittlung von STIM-Proteinen kommt es zur Öffnung der CRAC-Kanäle in der Zellmembran und zum Einstrom von Ca^{2+} . Durch die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} wird das Signalmolekül Calcineurin aktiviert, das den Transkriptionsfaktor NFAT dephosphoryliert. Der dephosphorylierte NFAT-Faktor kann in den Kern eingeschleust werden und dort zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren (z.B. AP-1 und $NF\kappa B$) zur Zytokinexpression beitragen [nach AG Hoth].

DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC) und IP_3 bindet an die IP_3 -Rezeptoren in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), das löst wiederum die Öffnung

von Kalziumkanälen aus und es kommt zu einer Kalziumfreisetzung aus dem ER ins Zytosol [Lewis, R.S., 2001, Feldhahn, N. et al., 2002, Berridge, M.J. et al., 2003].

Der Kalziumfreisetzung aus dem ER folgt ein Kalziumeinstrom über die Plasmamembran. Hierbei kommt es durch die Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher zu einer Öffnung speichergesteuerter Kalziumkanäle (store operated channels, SOCs). Die SOCs werden in verschiedenen Zellen exprimiert, wobei die SOCs in Lymphozyten sich durch eine hohe Kalziumselektivität auszeichnen. Die SOCs in den Lymphozyten werden auch als Calcium Release-Activated Calcium (CRAC) Kanäle bezeichnet. Durch Öffnung der CRAC-Kanäle kann Kalzium aus dem extrazellulären Bereich in die Zelle einströmen [Lewis, R.S., 2001, Penner, R. et Fleig, A., 2004]. Diese Öffnung wird durch das Protein STIM vermittelt, das seine Position vom ER zum CRAC-Kanal in der Plasmamembran verändert. STIM ist ein Transmembranprotein, das in zwei homologen Formen bei menschlichen Zellen, STIM1 und STIM2, existiert [Roos, J. et al., 2005, Zhang, S.L. et al., 2005].

Die Aktivierung der CRAC-Kanäle ist nicht nur über eine Rezeptorstimulation und eine IP₃-Bildung möglich, sondern auch durch eine rezeptorunabhängige Entleerung der Kalziumspeicher des ERs, z. B. mit der Blockierung der Sarco-endoplasmatic reticulum Calcium ATPase (SERCA) durch Thapsigargin [Ebert, E.C., 2003, Penner, R. et Fleig, A., 2004]. Die SERCA in menschlichen Zellen pumpt Kalzium aus dem Zytosol ins ER im Ruhezustand der Zelle [Lewis, R., 2001] und erhält ein Kalziumkonzentrationsgefälle über die Membranen des ERs aufrecht.

Für die physiologische Funktion der T-Zellen ist es wichtig, den Ca²⁺-Einstrom über die CRAC-Kanäle zu kontrollieren. Der Einstrom, die Höhe und die Kinetik der Ca²⁺ Signale ist von entscheidender Bedeutung bei der Genexpression, der Aktivierung und Proliferation der Zelle während der Immunantwort [Zweifach, A. et Lewis, R.S., 1993, Quintana, A. et al., 2005].

Durch die Erhöhung des [Ca²⁺]_i wird die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Calcineurin dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor nuclear factor of activated T-cells (NFAT), der dadurch seine Konformation ändert und in den Kern importiert wird. NFAT kontrolliert die Expression von TNF- α und als Komplex mit AP-1 die Bildung von verschiedenen Interleukinen, GM-CSF und IFN- γ .

Der Transkriptionsfaktor nuclear factor- κ B (NF κ B) koordiniert die Aktivierung von zahlreichen Genen und vor allem von proinflammatorische Zytokine wie z.B TNF- α . Zytokine sind Proteine, die von Immunzellen gebildet und freigesetzt werden. Sie steuern als Botenstoffe die Immunreaktion, wirken als Wachstumsfaktoren, aktivieren und deaktivieren Zellen und dienen als Schutz vor Gewebsschädigungen [Klinke, R. et al., 2005]. Da aber immer noch neue Interleukine entdeckt werden, ist die Liste der Funktionen sicher noch nicht vollständig. Zytokine haben keine einheitliche Namensgebung, viele werden als Interleukine (IL-) bezeichnet. Andere Zytokine sind nach ihrer Funktion benannt, z.B. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α).

Kalziumsignale sind für viele Funktionen der T-Zellen notwendig [Lewis, R.S. et al., 2001], so ist zum Beispiel die Genexpression kalziumabhängig. Bei den Untersuchungen der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale in dieser Dissertation und in anderen Arbeiten [Lewis, R.S., 1989, Dolmetsch, R.E. et Lewis, R.S., 1997, Griesemer, D. et al., 2004] konnte festgestellt werden, dass es verschiedene Arten von Signalen, wie zum Beispiel einzelne Peaks, oszillatorische Peaks oder langanhaltende $[Ca^{2+}]_i$ -Signale, die ein Plateau bilden, gibt. Diese Vielfalt der $[Ca^{2+}]_i$ ermöglicht eine differenzierte Genexpression, die durch die unterschiedliche Affinität der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF κ B zu Kalzium gesteuert werden kann [Dolmetsch, R.E. et Lewis, R.S., 1994, Rao, A. et al., 1997] und die für die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen wichtig ist [Schottelius, A.J. et al., 1999, Schwarz, E.C. et al., 2007]. Eine Störung des $[Ca^{2+}]_i$ und eine anhaltende TCR-Stimulation führen die Zelle in die Apoptose [Sprent, J., 1994, Rizzuto, R. et Pozzan, T., 2003].

Eine wichtige Rolle bei der Generierung von Kalziumsignalen in Zellen spielen auch die kalziumspeichernden Organellen, z.B. das ER und die Mitochondrien. Mitochondrien sind Kalziumspeicher, die bei steigendem $[Ca^{2+}]_i$ Kalzium aus dem Zytosol aufnehmen und bei sinkendem $[Ca^{2+}]_i$ Kalzium ins Zytosol wieder freisetzen können. Die Mitochondrien können die CRAC-Kanal-Aktivität steuern, wenn sie nahe der Membran liegen und durch Kalziumspeicherung die kalziumabhängige Inaktivierung des CRAC-Kanals verhindern [Hoth, M. et al., 2000, 1997, Quintana, A. et al., 2005]. Somit wäre auch die Verteilung und Anzahl der Mitochondrien ein wesentlicher Aspekt für die Bildung unterschiedlicher Kalziumsignale in verschiedenen Zellen.

Der aktuellem Stand der Forschung geht davon aus, dass der Kalziumeinstrom in die Zelle fast ausschließlich über die CRAC-Kanäle erfolgt. Dies konnte eindrucksvoll gezeigt werden durch den spezifische CRAC-Kanalblocker BTP2, der die TCR-induzierten Kalziumsignale und die T-Zellproliferation blockiert [Zitt,C., et al. 2004, Quintana, A. et al., 2005]. Weiter untermauert konnte diese These durch die Erforschung der humanen Erkrankung SCID (severe combined immunodeficiency), einem schweren kombinierten Immundefekt, bei dem den Lymphozyten fast vollständig eine CRAC-Kanal-Aktivität fehlt [Feske, S. et al., 2005]. Die T-Zellen der SCID Patienten zeigen keinen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nach einer Stimulierung über den TCR, sowie keine Steigerung der Transkription, was auch das Ausbleiben der Immunantwort erklärt. Bei SCID Patienten ist mit der fast fehlenden CRAC-Aktivität auch eine Verminderung der Kv1.3-Kanal-Aktivität korreliert, was auf eine funktionale Verbindung der Kanäle hinweist [Feske, S. et al., 2005]. Die meisten Kinder mit SCID sterben innerhalb des ersten Lebensjahres, da sich die Krankheit in häufig schweren, systemisch verlaufenden Infektionen äußert. Die genetische Grundlage dieser Krankheit ist eine Punktmutation im Orai1-protein. Dieser Zusammenhang wurde von Feske gezeigt, der dieses Protein identifizierte und der Orai 1 als eine Untereinheit oder als Schlüsselregulator des CRAC-Kanals vorschlägt [Feske, S. et al., 2006].

Der molekulare Aufbau der CRAC-Kanäle ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Man geht heute davon aus, dass Transient Rezeptor Potential-Proteine(TRP-Proteine) und ORAI Proteine [Feske,S. et al.,2006] beteiligt sind. In welcher Weise die verschiedenen TRP-Proteine in den verschiedenen Zelltypen exprimiert werden, ist noch nicht geklärt [Nilius, B. et al., 2004, Ramsey, I.S. et al. 2006]. TRP-Proteine werden in verschiedene Subfamilien eingeteilt [Freichel, M. et al., 2005]. Es wurden zum Beispiel TRPC-Proteine (canonical TRP), TRPV-Proteine (vanilloid TRP) und TRPM-Proteine (melastatin TRP) charakterisiert, wobei diese Proteine Gegenstand vieler Forschungsprojekte sind und immer neue in der Literatur beschrieben werden [Kwan, H.-Y. et al., 2004, Freichel, M. et al., 2005, Erler, I. et al., 2006]. Das TRPC3-Protein des CRAC-Kanals zum Beispiel wurde zuerst von Zhu [Zhu et al. 1996] beschrieben. Kwan zeigte, indem er das TRPC3 Gen in HEK293- Zellen exprimierte, dass der Ca^{2+} -Influx in diesen Zellen größer war als in den Wildtypzellen [Kwan, H-Y. et al., 2004].

Da bestimmte defiziente Mausstämmen in den Abteilungen von Professor Flockerzi / Professor Freichel vorhanden waren, konnten in dieser Arbeit aus TRPC-Knock-out Mäusen Lymphozyten isoliert und $[Ca^{2+}]_i$ in den Zellen gemessen werden. Dadurch konnte in dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden, ob das Ausschalten von TRPC-Proteinen in TRPC-Knock-out Mäusen einen messbaren Einfluss auf das $[Ca^{2+}]_i$ in Lymphozyten von verschiedenen TRPC-Knock-out Mäusen im Vergleich zu dem entsprechenden Wildtyp hat.

Für die Zelle ist auch die Funktion der Kalziumclearance von Bedeutung, die hauptsächlich durch die Plasmamembran Ca^{2+} ATPase (PMCA) gesteuert wird [Bautista, D.M. et Lewis, R.S., 2004]. Dadurch ist die Zelle in der Lage, große Kalziumeinströme während der CRAC-Kanal-Aktivität zu kompensieren.

Zusätzlich zu den genannten Mechanismen, die den Ca^{2+} -Einstrom kontrollieren, wie z.B. die CRAC-Kanäle, Kalziumpumpen, Ca^{2+} -Aufnahme und Freisetzung aus den vorhandenen Speichern, bauen die Kalium-Kanäle das elektrische Membranpotential für den Ca^{2+} -Eintritt in die Zelle auf. Da aber ein Ca^{2+} -Einstrom auf Dauer die Depolarisation der Plasmamembran verursachen würde, ist ein ausgleichender Kationausstrom aus der Zelle notwendig [Fanger, C.M. et al, 2001], damit das Membranpotential über der Plasmamembran aufrecht erhalten wird.

Durch die Arbeit von Tutsch [Tutsch, E. et al., 2004] wurde auf die erniedrigten $[Ca^{2+}]_i$ -Signale der Darmlymphozyten gegenüber den PBLs hingewiesen. Ebenso wurde in der Arbeit von Tutsch der Vergleich von dissoziierten und im Gewebeverband gemessenen Lymphozyten durchgeführt, der dieses Ergebnis bestätigte. Ein verringerter Nettoeinstrom ist wahrscheinlich die Ursache, womit die niedrigeren $[Ca^{2+}]_i$ der LPLs teilweise erklärt werden kann. Diese Verringerung des Nettokalziumstromes kann durch verschiedene Mechanismen zustandekommen, prinzipiell bestehen folgende Möglichkeiten, die reduzierten $[Ca^{2+}]_i$ in den LPLs zu erklären.

Eine Blockade vorhandener Kanäle oder die Hemmung des Signalfusses zwischen Speicherentleerung und Kanalöffnung können die CRAC-Kanäle und somit die $[Ca^{2+}]_i$ beeinflussen. Das Protein STIM 1 ist in die Signalkaskade eingebunden und eine Hemmung dieses Proteins würde den Kalziumstrom reduzieren. So sind von z.B. einer verminderten Expression bis hin zur Mutation des STIM-Proteins [Liou, J. et al., 2005, Marchant, J.S., 2005, Zhang, S.L. et al., 2005] viele Möglichkeiten denkbar, die direkt den Kalziumstrom beeinflussen können.

Eine weitere Ursache für den erniedrigten Strom könnte darin liegen, dass z.B. in LPLs eine geringere Anzahl von CRAC-Kanälen in der Plasmamembran exprimiert ist, oder es wird ein anderer Kanaltyp in den LPLs als in den PBLs exprimiert.

Aber auch die Aktivität der Kaliumkanäle, die das Membranpotential bestimmen, könnte eine Ursache eines verminderten Kalziumeinstromes darstellen. So könnten auch hier unterschiedliche Expressionen verschiedener spannungsabhängiger Kanäle, z.B. des Kv1.3 Kanals oder des kalziumaktivierten IKCa1 Kanals, und die unterschiedliche Anzahl in der Membran eine entscheidende Rolle spielen [Chandy, K.G. et al., 1993, Panyi, G. et al., 2003, Feske, S., et al. 2005]. Eine Blockade des Kv1.3 Kanals depolarisiert zum Beispiel die T-Lymphozyten [Panyi, G., 2003]. Eine Herunterregulierung der Kaliumkanäle könnte der Teil eines Regelkreises sein, der durch die verminderte Aktivität eine Depolarisierung des Membranpotentials auslöst [Kerschbaum, H.H. et al., 1997]. Das hätte zur Folge, dass eine Verminderung des Kalziumeinstromes eintreten würde.

Schließlich ist auch ein erhöhter Kalziumexport eine der Möglichkeiten, die das $[Ca^{2+}]_i$ -Signal beeinflussen können. Um diese Regulation der Zellen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit bei allen Thapsigarginexperimenten nach 1200 Sekunden nach dem Start ein Lösungswechsel zu kalziumfreier Lösung durchgeführt. Dadurch kann die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ -Signalen von den untersuchten Zellen, die durch Kalziumpumpen hervorgerufen werden, abgeschätzt werden.

Um die Basis für die geplanten Experimente zu schaffen, sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich die $[Ca^{2+}]_i$ -Signale der isolierten murinen Blut- und Darmlymphozyten ohne Stimulation durch applizierte Substanzen über den Zeitraum von 2000 Sekunden verändern. Sollten von den Zellen über diesen Zeitraum konstante $[Ca^{2+}]_i$ -Signale aufgezeichnet werden, schafft dieses die Grundlage, auf der weitere $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen durchgeführt werden können.

1.2. Das Immunsystem des Darms

Das Leben von Vertebraten hängt unter anderem davon ab, dass die Homöostase des Körpers aufrechterhalten wird [Pschyrembel, 1994]. Ein Faktor ist dabei das Blut, das im Organismus zirkuliert und mit sämtlichen Organen und der Luft in Verbindung steht. Die Organe entnehmen dem Blut Substanzen, die sie für ihre Funktion benötigen und geben ihre Stoffwechselprodukte ab. Darüber hinaus wird mit dem Blut auch Wärme transportiert und es übernimmt eine Abwehrfunktion gegen

Fremdkörper und veränderte Körperzellen durch die Leukozyten. Durchschnittlich besitzt ein Mensch 5000 – 10000 Leukozyten/ μ l Blut, davon sind 20 – 40 % Lymphozyten (B- und T-Lymphozyten) [Klinke, R. et al., 2005].

Einen weiteren wichtigen Teil des Immunsystems stellt das intestinale Immunsystem dar, das gut-associated lymphoid tissue (GALT), dessen Oberfläche über 300 m² groß ist. Eine der großen Leistungen dieses Systems liegt darin, zwischen schädlichen Organismen und harmlosen Antigenen, die mit dem Nahrungsbrei durch das röhrenförmige Darmsystem geschleust werden bzw. den Bakterien der Darmflora, zu unterscheiden [Duchmann, R. et al., 1999]. Das Unterscheiden von harmlosen Antigenen, wie z.B. Proteinen der Nahrung oder Bakterien der Darmflora, und pathogenen Keimen wird täglich tausendfach gefordert [Mayer, L., 1996]. Während gegen pathogene Keime eine Immunantwort notwendig ist, kann eine Immunreaktion gegen nicht pathogene Antigene die Ursache für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) sein.

Der Darm wird gegenüber dem Darmlumen von einer Epithelschicht (Lamina epithelialis mucosae) begrenzt, die durch apikale Mikrovilli, Zotten, Krypten und makroskopische Falten stark vergrößert ist. Die Aufgaben dieser Schicht sind insbesondere die Absorption von Nährstoffen, Elektrolyten und Wasser. Diese Schicht der Epithelzellen wird durch eine Schleimschicht (Muzin) geschützt, wobei der Schleim von Becherzellen sezerniert wird [Specian, R.D. et Neutra, M.R., 1982]. Unter der Epithelschicht befindet sich ein lockeres Bindegewebe (Lamina propria mucosae), das Kapillaren, Neurone, Immunzellen und eine dünne Muskelschicht (Lamina muscularis mucosae) enthält. Es folgt die Submucosa, zwei Muskelschichten (Ring- und Längsmuskelschicht) und die äußere Bindegewebsschicht (Serosa), die den Darm nach außen hin begrenzt.

Die Abwehrfunktion des Darmes beruht auf dem Zusammenspiel von verschiedenen Systemen. Zuerst werden von den Mundspeicheldrüsen Enzyme in den Nahrungsbrei abgegeben, die Krankheitserreger abtöten sollen. Hierzu gehören Lysozym, das die Zellwände gram-positiver Bakterien hydrolysiert und die Komplementaktivität gegen gram-negative Bakterien stimuliert und Antikörper vom Typ Ig A. Die Ig A markieren die Zelle, dadurch wird die Immunantwort und letztlich der Abbau eingeleitet. Sollten die Keime nicht schon vorher durch den sauren pH-Wert des Magensaftes abgetötet worden sein, verhindern der Schleim und die Epithelzellen des Darms ein Eindringen in den Organismus und die Keime werden

mit dem Stuhl ausgeschieden. Die Darmflora verhindert zudem, dass sich pathologische Keime einnisten.

Das Immunsystem des Darmes besteht aus organisiertem Lymphgewebe (z.B. Peyer Plaques) und verteilten Immunzellen, den Lymphozyten und den Mastzellen in der Lamina propria [Duchmann, R. et al., 1999]. Die Funktion der T-Lymphozyten in dem mukosalen Immunsystem aufzuklären ist das Ziel vieler Arbeitsgruppen. Schon 1991 zeigten Qiao [Qiao,L. et al 1991], dass die Lamina propria T-Lymphozyten nach Stimulation über den T-Zell-Rezeptor eine deutlich geringere Aktivierungs- und Proliferationsrate als die T-Zellen des peripheren Blutes aufwiesen und eine Stimulation über den CD2 Rezeptor möglich ist. Nach CD2-Stimulation produzieren Lamina propria T-Lymphozyten mehr IL-10 (Interleukin-10) als die Blut-Lymphozyten. [Braunstein,J. et al., 1997]. Ist die Aktivierungs- und Proliferationsrate der intestinalen T-Lymphozyten gestört, führt dies zu Darmerkrankungen.

1.3. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Das Immunsystem des Darmes ist vor allem durch die Krankheiten Colitis ulcerosa und Morbus Crohn in den Mittelpunkt der Forschung gestellt worden. Unter dem Begriff CED sind diese beiden Krankheiten zusammengefasst. Die Ursachen der zwei verschiedenen Krankheiten sind zur Zeit noch nicht geklärt. Auf der einen Seite gibt es deutliche Überschneidungskriterien, wie z.B. Manifestationsalter und Symptomatik. Andererseits bestehen deutliche Unterschiede wie z.B. die Verteilung der veränderten Darmabschnitte und das histologische Erscheinungsbild. Einige klinische Beobachtungen und Tierversuche weisen auf den Einfluss von Bakterien hin [Swidsinski,A. et al., 2002], aber auch genetische Faktoren und Umwelteinflüsse scheinen die Krankheit zu beeinflussen [Targan,S.R. et al., 2005, Podolsky,M.J. et al., 2006].

Bakterien, genetische Faktoren, Umwelteinflüsse und womöglich noch nicht entdeckte Einflüsse scheinen im Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf der CED in ein gemeinsames pathogenes Erscheinungsbild zu münden, indem sie zu einer anhaltenden Aktivierung des Darmimmunsystems führen. Bei dieser Aktivierung spielen die T-Zellen der Lamina propria eine entscheidende Rolle. Wie es zu dieser anhaltenden Aktivierung kommt, gilt es jedoch noch aufzuklären. Gesteigerte Proliferation, gestörte Apoptosis und eine fehlerhafte Regulation von Zytokinen der

T-Lymphozyten sind wichtige Faktoren der Colitis ulcerosa [Pawlowski, N.N., et al., 2005] und der Morbus Crohn [Hara, J. et al. 1997].

Der Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran ist, wie schon vorher beschrieben, wichtig für die T-Zell vermittelte Immunantwort. Die Messungen mit dissoziierten Lymphozyten konnten die große Vielfalt der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale in den Zellen zeigen [Lewis, R.S., 1989, Dolmetsch, R.E. et Lewis, R.S., 1994, Griesemer, D. et al., 2004]. Die Veränderung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hat einen Einfluss auf die Transkriptionsfaktoren NFAT und $\text{NF}\kappa\text{B}$, die eine unterschiedliche Affinität zu Ca^{2+} haben. Der $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Faktor spielt z. B. eine Schlüsselrolle bei der CED, da seine Aktivierung die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen induziert. Ein Zusammenhang zwischen CED-Patienten und hohen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivitäten konnte dadurch hergestellt werden, dass in Entzündungsherden hohe $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivitäten festgestellt werden konnten. Erkrankungen, die sich durch Entzündungen von bestimmten Geweben gekennzeichnet sind, konnten auch durch spezifische Blockierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ behandelt werden [Schottelius, A.J. et al., 1999]. So könnten erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale in Lymphozyten aus chronisch entzündeten Darmabschnitten die vermehrte Produktion von $\text{NF}\kappa\text{B}$ fördern und damit wiederum eine Verstärkung der Erkrankung bewirken.

Ebenso konnte auch festgestellt werden, dass bei CED-Patienten durch T-Zell-Rezeptor-Stimulation eine überschießende Proliferationsantwort zu beobachten ist. Die gemessenen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale der LPLs von CED-Patienten erreichen oft die Höhe von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signalen der PBLs, bei gesunden Spendern sind die gemessenen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale der LPLs niedriger als die der PBLs. Die erhöhte T-Zell-Aktivität im Darm bei CED ist möglicherweise eine Ursache für die Entzündung des Darms [Schwarz, A. et al., 2004, Tutsch et al., 2004]. Dazu sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Methode entwickelt werden, gezielt murine Blut- und Darmlymphozyten zu isolieren, um die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu vergleichen. Dabei sollte analysiert werden, ob sich die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von gesunden und kranken Tieren unterscheiden.

Die Faktoren, die die chronische Entzündung des Darms initiieren, sind noch nicht völlig identifiziert. Daher ist es wichtig für die Erforschung der Erkrankung geeignete Tiermodelle einzusetzen, um die einzelnen Prozesse, die dann als Erkrankung des Darms gipfeln, besser frühzeitig erkennen und bekämpfen zu können. Es wurden viele unterschiedliche Tiermodelle in den letzten Jahren entwickelt, die aber nicht in

allen Aspekten dem Verlauf der Erkrankung der CED beim Menschen entsprechen [Jurjus, A.R., et al., 2003]. Einige Tiermodelle, die in verschiedenen Labors etabliert wurden, sollen bei der Aufklärung der Rolle von T-Zellen bei CED helfen [Melgar S. et al, 2004]. Ein Modell für CED in Tieren ist das DSS (Dextran-sodium-sulfad)-induzierte Kolitismodell bei der Maus. In diesem Modell wird die Kolitis bei den Tieren über DSS-versetztes Trinkwasser induziert, das über einen bestimmten Zeitraum verabreicht wird. Mit dieser Methode entsteht bei den Tieren eine akute Erkrankung mit Eiterung des Darms, Gewichtsverlust und blutigem Durchfall, die den Symptomen der CED in der akuten Phase entspricht, allerdings existiert noch kein Modell für jede Form der chronischen Darmerkrankungen [Melgar, S. et al., 2004].

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Die Erhöhung des $[Ca^{2+}]_i$ ist ein zentrales Schlüsselsignal für die Aktivierung von Lymphozyten. Mit der Methode der Fluoreszenzmessung von $[Ca^{2+}]_i$ ist es möglich, den Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ in einer intakten Zelle über einen bestimmten Zeitraum zu verfolgen. Durch die Möglichkeit der Identifikation der eingesetzten Zellen, können Vergleiche zwischen den B- und T-Lymphozyten und gleichzeitig der Einfluss von verschiedenen Substanzen auf die $[Ca^{2+}]_i$ in den verschiedenen Zelltypen untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Isolation der Lymphozyten aus dem Darm der Maus etabliert werden. Darüber hinaus sollten verschiedene Antikörperstimulationen und Thapsigarginexperimente bei den isolierten Lymphozyten aus verschiedenen Mäusen miteinander verglichen werden. Zur Antikörperstimulation der Lymphozyten wurden OKT3 oder eine Kombination von Anti-maus CD3e⁺- und Anti-maus CD28⁺-Antikörper verwendet. Diese Antikörper stimulieren den T-Zellrezeptor und im Fall der Anti-maus CD28⁺ auch den CD28 Ko-Rezeptor. Dadurch wird, wie in diesem Kapitel beschrieben, die Kaskade in den Zellen gestartet, die zur Aktivierung des Calcium Release-Activated Calcium-Kanals (CRAC-Kanals) und zu einer Erhöhung des $[Ca^{2+}]_i$ führen.

Da bei chronischen Darmerkrankungen erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ der humanen T-Lymphozyten aus dem Darm gemessen wurden, ist die Frage interessant, ob die $[Ca^{2+}]_i$ der murinen Lymphozyten aus erkranktem Darm im Vergleich zu Lymphozyten aus gesundem Darm auch verändert sind. Zu diesem Zweck sollten Zellen aus dem entzündeten Darm der Maus isoliert werden, die $[Ca^{2+}]_i$ der Lymphozyten aus dem Darm gemessen und mit $[Ca^{2+}]_i$ der Lymphozyten aus dem Darm von gesunden Kontrolltieren verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Chemikalien	Firma / Artikelnummer
Amphotericin B 500x	(Boehringer, 14977600)
C ₅ H ₁₂ O (Amylalkohol tertiärer)	(Merck, 999.1000)
CaCl ₂ 2H ₂ O (Calciumchlorid-2-hydrat)	(J.T.Baker, 0504)
Cell tak Cell and Tissue Adhesive	(BD Pharmingen, 4240)
Collagenase III (CIII-22)	(Biochrom AG, M2E5586)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	(Sigma, A-0808)
DNase I	(Roche, 1284932)
DSS (Dextran Sulfate Sodium)	(MP Biomedicales, 0216011080)
DTT (DL-Dithiothreitol)	(Sigma, D-9779)
EDTA (Ethylendiaminetetra-Acetic Acid)	(Sigma, E-9884)
EGTA (Ethylene Glycol-bis(β-Amino-Ethylen Ether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid	(Sigma, E-4378)
FCS (Fetales Kälberserum)	(Gibco, 10270-106)
Ficoll-Paque Plus	(Amersham Biosciences, 17-1440-03)
Fura-2/AM (Azetoxymethylester-Derivat)	(Molecular Probes, F1221)
Gentamycin	(Biochrom, A2410)
D-(+)-Glucose-Monohydrat	(Merck, 1.08342)
Dulbecco's PBS (1x)	(PAA Laboratories GmbH, H15-002)
Hank's Balanced Salt Solution	(PAA Laboratories GmbH, H15-009)
Haemocult	(Beckman Coulter GmbH, 9490)
Heparin	(Sigma, H-7523)
HEPES (4 (2-hydroxyethyl) - Säure 1-piperazineethanesulfonic)	(Sigma, H7523)
KCl (Kaliumchlorid)	(Merck, 104933)
KHCO ₃ (Kaliumhydrogencarbonat)	(Aldrich, 23,720-5)
β-Mercaptoethanol	(Acros, 125472500)

MgCl ₂ (Magnesiumchlorid-Hexahydrat)	(Merck, 105833)
NaCl (Natriumchlorid)	(Sigma, S9889)
NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat)	(Merck, 1.063290500)
NaOH (Natriumhydroxid)	(J.T.Baker, 0402)
NH ₄ Cl (Amoniumchlorid)	(Sigma, A-0171)
Penicillin – Streptomycin(Pen/Strep)	(Gibco, 15140-122)
Percoll	(Amersham Biosciences, 17-0891-01)
Poly-L-Lysin Hydrobromid	(Sigma, P-6282)
Poly-L-Ornithin	(Sigma, P3655)
RPML-1640 + L-Glutamin Medium	(Invitrogen, 21875-034)
Silikon-Fett	(Merck, 107746)
Thapsigargin	(Molecular Probes, T7459)
2,2,2 – Tribromomethanol	(Fluka, 90710)
Trypanblau	(Sigma, T8154)

2.1.2. Antikörper

FITC konjugierter Monoclonal Hamster Anti-maus CD 19 ⁺ (1D3) Antikörper	(BD Pharmingen, 553785)
FITC konjugierter Monoclonal Hamster Anti-maus CD 4 ⁺ (L3T4)(H129.19) Antikörper	(BD Pharmingen, 553650)
PE konjugierter Monoclonal Hamster Anti-maus CD8a ⁺ (Ly2)(53-6.7) Antikörper	(BD Pharmingen, 553032)
PE konjugierter Monoclonal Hamster Anti-maus CD19 ⁺ (1D3) Antikörper	(BD Pharmingen, 553786)
PE-Cy5 konjugierter Monoclonal Hamster Anti-maus CD3e ⁺ (CD3 εchain) (145-2c11)Antikörper	(BD Pharmingen, 553065)
PE-Cy5 konjugierter Monoclonal Hamster Anti-maus CD4 ⁺ (L3T4)(H129.19) Antikörper	(BD Pharmingen, 553654)
Gereinigter Anti-maus CD3e (CD3ε chain) (145-2C11) Antikörper 0,1mg/ml	(BD Pharmingen, 553057)

Gereinigter Anti-maus CD28 (37,51)	(BD Pharmingen, 553294)
OKT3 (Muromonab-CD3) Antikörper	(Universitätsklinik Homburg, Innere Medizin II, AG A. Stallmach)

2.1.3. Lösungen für die Präparation muriner Zellen

Avertin Stocklösung: 1,59 g Tribromomethanol / ml C₅H₁₂O

Avertin Gebrauchslösung: 600µl Stocklösung + 50 ml NaCl 0,9%

Ery-Lyse-Puffer: 0,156 mM NH₄CL + 99,8 mM KHCO₃ + 0,9 mM EDTA, pH 7,3

DNase-Medium: 98 ml RPMI-Medium mit Zusätzen + 2 mM HEPES-Puffer + 0,1 mg/ml DNase

DSS im Trinkwasser: Das Trinkwasser zur Induzierung der Kolitis beinhaltete 45 g/l DSS für BALB/c Mäuse und 25 g/l DSS für C57/BL6 Mäuse

HBSS (1) – Lösung: 500 ml HBSS + 100µg/ml Pen/Strep + 25 mM HEPES

HBSS - DTT- Lösung: 500 ml HBSS + 100 µg/ml Pen/ Strep + 25 mM HEPES-Puffer + 2,5 ml Gentamycin +1 ml Amphotericin B 500x + 0,05 mM Mercaptoethanol + 1 mM DTT

HBSS - EDTA- Lösung: 500 ml HBSS + 100 µg/ ml Pen/Strep + 25 mM HEPES-Puffer + 0,05 mg/ml Gentamycin + 0,0025mg/ml Amphotericin B 500x + 0,5 ml Mercaptoethanol (0,05 M Stammlösung) + 12,5 ml EDTA (500 mM, pH 8)

HBSS-EDTA-DTT-Lösung: 1 Teil HBSS-EDTA-Lösung + 3 Teile HBSS-DTT-Lösung

Kollagenasemedium: 30 ml DNase-Medium + 0,167 mg/ml Collagenase III

Percoll 90%: 90 ml Percoll (Stammlösung) + 10 ml HBSS

Percoll 36%: 40 ml Percoll 90% + 60 ml HBSS

RPMI –Medium: 500 ml RPMI-Medium + 100 µg/ml Pen/Strep + 11% FCS

gepuffertes RPMI –Medium: 24 ml RPMI-Medium + 41,7 mM HEPES-Puffer (pH 7,4)

2.1.4. Lösung zum Beschichten der Deckgläser

Cell-tak-Puffer-Lösung: 20 µl Cell tak (Stammlösung) + 0,275 mM NaHCO₃-Puffer (pH 8) + 5 µM NaOH

Poly-L-Ornitin-Lösungen: 1mg/ml Poly-L-Ornitin, 0,5µg/ml Poly-L-Ornitin, 0,1mg/ml Poly-L-Ornitin

Poly-L-Lysin Hydrobromid: 0,5 mg/ml Poly-L-Lysin Hydrobromid, 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin Hydrobromid

Mikroskopische Deckgläser Ø 12mm und Ø 25mm, Fa.Kindler

2.1.5. Lösungen für Kalzium-Imaging Experimente

0 mM Ca-Lösung, pH 7,4 mit Tg: 155 mM NaCl +4,5 mM KCl +10 mM Glucose + 5 mM HEPES + 3 mM MgCl₂ + 1 mM EGTA + 1µM Thapsigargin (pH 7,4 mit NaOH). EGTA ist dieser Lösung zugesetzt, um kontaminierendes Ca abzufangen, HEPES wurde den Lösungen zugesetzt, um den pH-Wert konstant zu halten.

0,5 mM Ca-Lösung, pH 7,4: 155 mM NaCl + 4,5 mM KCl +10 mM Glucose + 5 mM HEPES + 2,5 MgCl₂ + 0,5 mM CaCl₂ (pH 7,4 mit NaOH)

1 mM Ca-Lösung, pH 7,4 mit Tg: 155 mM NaCl +4,5 mM KCl +10 mM Glucose + 5 mM HEPES +2 mM MgCl₂ + 1 mM CaCl₂ + 1µM Thapsigargin (pH 7,4 mit NaOH)

2.1.6. Lösungen mit Antikörpern zur Identifikation und zur Stimulation der Zellen

Antikörper-Lösung zur Identifikation der Zelltypen: 28 µl RPMI-Medium + 26 µg/ml FITC konjugierter Monoclonaler Hamster Anti-maus CD 19⁺ (1D3) Antikörper + 26 µg/ml PE-CY5 konjugierter Monoclonaler Hamster Anti-maus CD 4⁺ (L3T4)(H129.19) Antikörper + 26 µg/ml PE konjugierter Monoclonaler Hamster Anti-maus CD8a⁺ (Ly2)(53-6.7) Antikörper

Antikörper-Lösung zur Stimulation der Zellen: 1 ml Ca²⁺-Lösung (1 mM) + 5 µg/ml gereinigter Anti-maus CD3e⁺ (CD3ε chain)(145-2C11) Antikörper + 5µg/ml gereinigter Anti-maus CD28⁺ (37,51) Antikörper

2.1.7. Versuchstiere

Die Balb/cAnCrI-Mäuse (17,6-23,6 g, 8-12 Wochen alt) und die C57/BL6-Mäuse (20,0-30,6 g, 12-14 Wochen alt) wurden von der Fa. Charles River bezogen.

Die 129 B6F1-Mäuse, die 1295VJ-Mäuse, die TRPC1C4C6 (-/-)³ TRPC4C6(-/-)² und die TRPC6(-/-)-Mäuse wurden von dem Institut der Universitätsklinik Homburg, Pharmakologie und Toxikologie, AG Freichel zur Verfügung gestellt.

2.1.8. Geräte

Heidolph Duomax 1030, Plattformschüttler

Heidolph Inkubator unimax 1010

Captair flow by erlab

Sartorius analytic Feinwaage

Mikroskope

Olympus CK30 (Durchlicht)

Olympus IX70 (Fluoreszenz), Objektiv 40x

Till Photonics Polychrome V

Zentrifugen, Schüttler

Eppendorf Zentrifuge 5415 C

Hettich Universal 30F, Zentrifuge

Hettich Universal 32, Zentrifuge

Vibrofix VF1 Electronic, Schüttler

2.1.9. Auswertungsprogramme

Mikrosoft Exel (Version 6.0), Statistikprogramm

Till Photonics Vision (Version 4.0), Programm zur Erfassung der Experimentdaten

Wavemetrics Igor Pro (Version 4.01, Analyse und Präsentation der Daten)

2.2. Methoden**2.2.1. Isolierung von mononuklearen murinen Zellen aus dem Blut**

Die Blutentnahme bei der Maus erfolgte aus dem retrobulbären Venenplexus. Die Versuchstiere wurden leicht mit Kohlendioxid betäubt. Anschließend wurde eine Avertinlösung (25 µl/g Körpergewicht) durch peritoneale Injektion verabreicht, um die Tiere zu narkotisieren. Zur Blutentnahme wurde eine heparinisierte Glaskapillare am nasalen Augenwinkel in Richtung auf das gegenüberliegende Kiefergelenk bis zur knöchernen Orbita eingeführt. Die Kapillare wurde geringfügig bewegt und das austretende Blut in einem Eppendorfgefäß mit Heparin (50 µl) aufgefangen. Die Blutmenge variierte pro Versuchstier zwischen ca. 500-800 µl. Danach wurden die narkotisierten Versuchstiere durch Genickbruch getötet.

Das mit Heparin gemischte Blut wurde in ein 5 ml Tube überführt, 1:1 mit PBS verdünnt und mit 1,5 ml Ficoll-Plaque unterschichtet. Bei 740 x g, mit den Einstellungen Beschleunigung/Bremse 2 und 20 min, erfolgte bei Raumtemperatur die Dichtegradientenzentrifugation (Hettich Universal 32R). Der Interphasenring mit den Lymphozyten wurde abgenommen und einmal mit 5 ml HBSS gewaschen. Zur Erythrozyten-Lyse wurde das Pellet mit 500 µl Ery-Lyse-Puffer resuspendiert. Nach 3 Minuten wurde der Vorgang durch Verdünnen der Suspension mit 2,5 ml HBSS und

anschließender Zentrifugation gestoppt. Das Pellet wurde in 500 µl Medium aufgenommen und die Zellen in der Neubauerkammer gezählt. Dazu wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt, um ihre Vitalität zu überprüfen. Bis zur Kalzium-Imaging-Messung wurden die Zellen im Kühlschrank bei 10°C ca. 2 Stunden aufbewahrt. Die Blutlymphozyten werden im Folgenden auch mit **periphere Blut Lymphozyten = PBL** bezeichnet. Die Blutentnahmen wurden von Anja Ludes und Daniela Franze durchgeführt.

2.2.2. Isolierung von mononuklearen murinen Zellen aus dem Darm

Nach der Blutentnahme erfolgte die Isolierung der mononuklearen Zellen aus den verschiedenen Darmabschnitten. Nach dem Eröffnen des Abdomens erfolgte die Entnahme des Dünndarms, wobei der orale Schnitt unterhalb des Pylorus und der aborale Schnitt oberhalb des Caecums erfolgte und die Resektion des Kolons, wobei der orale Schnitt unterhalb des Caecums und der aborale Schnitt oberhalb des Analkanals gesetzt wurde.



Abb.: 2.1. Isolierter Darm einer Balb/cAnCrI-Maus: vom Caecum (links im Bild) bis zum Kolon ohne After.

Bis zur Reinigung der einzelnen Darmabschnitte wurden diese in HBSS getrennt aufbewahrt. Die verschiedenen Darmresektate wurden von Bindegewebe und

Fettanteilen gereinigt, das Darmrohr wurde aufgeschnitten und der Darminhalt mit einer Spritze abgespült. Das HBSS wurde erneuert und der Darm wurde in ca. 2–3 mm² große Stücke geschnitten. Diese Darmstücke wurden dann 1 Stunde in HBSS bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Darmstücke in EDTA-DTT-Lösung 15 min bei 37°C mit 200 U/min (Vibrofix VF1 Electronic) geschüttelt. DTT löst Disulfidbrücken und wurde in dieser Präparation eingesetzt, um den Schleim, der von den Becherzellen sezerniert wird, aufzulösen. Die Kolonstücke wurden ein Mal in HBSS gewaschen, um das DTT zu entfernen und dann in Kollagenasemedium 90 min bei 37°C bei 200 U/min geschüttelt. Das Kollagenasemedium wurde eingesetzt, um das Gewebe des Darmes aufzulösen.

Die Dünndarmstücke wurden ein zweites Mal in der EDTA-DTT-Lösung 15 min bei 37°C mit 200 U/min geschüttelt, da sich während der Präparation herausstellte, dass in diesem Abschnitt mehr Schleim von der Darmschicht zu entfernen war. Die Dünndarmstücke wurden solange mit HBSS gewaschen bis der Überstand klar blieb. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation in Kollagenasemedium (60 min, 37°C und 200 U/min). Nach der Inkubation in Kollagenasemedium wurden die Darm-Kollagenase-Suspensionen in eine Perfusorspritze hineingesaugt und wieder herausgedrückt. Durch die Scherkräfte wurden der restliche Schleim und die Epithelzellen von der Mucosa abgelöst. Dieser Prozess wird im Folgenden mit *gepurged* bezeichnet („to purge“ bedeutet reinigen). Nachdem sich die Darmstücke wieder abgesetzt hatten, wurde der Überstand bei 240 x g für 7 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (Hettich, Universal 30F). Das Pellet wurde in 11 ml DNase-Medium resuspendiert und für 7 min bei Raumtemperatur bei 240 x g zentrifugiert (Hettich Universal 30F). Dieses Pellet wurde wieder in 11 ml DNase-Medium resuspendiert und zweimal gefiltert (100 µm und 70 µm Filter). Gleichzeitig wurde auf die Darmstücke 11 ml DNase-Medium gegeben und 30 min bei 37°C und 200 U/min inkubiert (Vibrofix VF1 Electronic). Die Suspension wurde *gepurged* und der Überstand bei Raumtemperatur bei 240 x g zentrifugiert (Hettich Universal 30F). Das Pellet wurde in 11 ml DNase-Medium resuspendiert und zweimal gefiltert (100 µm und 70 µm Filter). Anschließend wurden die Suspensionen der identischen Darmstücke zusammen geführt und für 7 min bei Raumtemperatur bei 240 x g pelletiert (Hettich Universal 30F). Das Pellet wurde in 5 ml 36% Percoll resuspendiert und mit 5 ml 90 % Percoll unterschichtet. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte

bei 580 x g bei Raumtemperatur ohne Bremsvorgang (Hettich Universal 32 R). Der Ring zwischen den Phasen 36% und 90% Percoll wurde abgenommen, in ein neues Falcon überführt und mit gepuffertem RPMI-Medium auf 4 ml aufgefüllt und anschließend für 7 min bei Raumtemperatur bei 240 x g zentrifugiert (Hettich Universal 30F). Das Pellet wurde in gepuffertem RPMI-Medium ein Mal gewaschen. Die Zellen wurden in RPMI-Medium über Nacht bei 10° C aufbewahrt. Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauerkammer mit Trypanblaufärbung. Die Lymphozyten, die aus diesem Gewebe isoliert wurden, werden als LPL (Lamina Propria Lymphozyten) bezeichnet.

2.2.3. Induzierung der Kolitis bei Mäusen

Bei Balb/cAnCrI-Mäusen und C57/BL6-Mäusen kann eine Entzündung des Darmes induziert werden, wenn über 7 bis 9 Tagen DSS (Dextran Sulfate Sodium) im Trinkwasser verabreicht wird. Diese Methode ist ein im Labor etabliertes Modell.



Abb.2.2 Isolierter Darm einer an Kolitis erkrankten Maus. Der isolierte Darm, vom Caecum bis zum Kolon ist bei den durchgeführten Experimenten kürzer als der einer gesunden Maus (vergleiche Abb.2.1)

Die Tiere wurden über 7 bzw. 9 Tage mit DSS versetztem Trinkwasser behandelt, das Gewicht der Tiere täglich notiert und ab dem 5.Tag wurde ein Haemoculttest durchgeführt, der Blut im Darm durch eine Blaufärbung des Kots aufzeigt. Die Kolitis bei C57/BL6 Mäusen war am 7. Tag voll ausgeprägt, bei Balb/cAnCrI-Mäusen erst nach 9 Tagen. Nachdem der Haemoculttest positiv getestet war, wurden bei den erkrankten Tieren, wie zuvor beschrieben, das Blut und der Darm entnommen und die Lymphozyten daraus isoliert.

2.2.4. Kalzium Imaging- Experimente

Die Messung der freien zytosolischen Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ in lebenden Zellen ist möglich durch die Verwendung von Indikatorfarbstoffen. Diese Kalziumindikatoren, z.B. Fura-2/AM, wurden in den 80iger Jahren von Tsien und Mitarbeitern entwickelt [Grynkiewicz, G. et al., 1985]. Diese Farbstoffe besitzen negative Ladungen, an die das Kalzium binden kann. Die Bindung eines Liganden an diese Moleküle verändert die optische Eigenschaft der Farbstoffe. Bindet Kalzium an Fura-2, so ändert sich vor allem das Anregungsspektrum. Gemessen wurde bei 340 nm und 380 nm, da sich die Excitationseigenschaften bei den beiden Wellenlänge 340 nm und 380nm bei Kalziumbindung unterschiedlich ändern.

Die optischen Eigenschaften dieser Farbstoffe ermöglichen es, eine Ratio-Messung von Kalziumkonzentrationen in lebenden Zellen durchzuführen. Verwendet man Fura-2/AM, werden die Emissionsintensitäten bei einer Emissionswellenlänge nach Anregung des Fura-2-Moleküls mit zwei unterschiedlichen Anregungswellenlängen gemessen und zueinander ins Verhältnis (Ratio) gesetzt. Bei Fura-2 werden am besten Wellenlängen gewählt, bei denen sich die Emissionsintensitäten abhängig von der Kalziumkonzentration gegensätzlich verhalten. In den Experimenten für diese Arbeit wurden als Anregungswellenlängen die Anregungsmaxima 340 nm und 380 nm gewählt. Das Ratio 340 nm/380 nm ist in diesem Fall ein gutes Maß für $[Ca^{2+}]_i$ und wurde durchgängig verwendet. Für Ratios zwischen 0.3 und 1.5 haben wir in der Vergangenheit eine nahezu lineare Korrelation mit $[Ca^{2+}]_i$ gefunden. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Ratios mit 1000 multipliziert.

Die Berechnung der Kalziumkonzentration kann mit der Gleichung [Grynkiewicz, G. et al., 1985] aus den Ratiowerten erfolgen:

$$[Ca^{2+}] = K_d Q (R-R_{min}) / (R_{max}-R)$$

Erläuterung der Abkürzungen:

R entspricht dem Fluoreszenzintensitätsratio ($F_{\lambda_1}/F_{\lambda_2}$), mit $\lambda_1 = 340$ nm und $\lambda_2 = 380$ nm, gemessen zum jeweiligen Zeitpunkt des Experimentes, R_{\min} entspricht dem Ratio des vollständig kalziumfreien Indikators, R_{\max} dem Ratio der kalziumgesättigten Form des Farbstoffes. K_d ist die effektive Dissoziationskonstante des Indikators. Q ergibt sich aus dem Ratio F_{\min}/F_{\max} gemessen bei λ_2 , wobei F_{\min} , die Fluoreszenzintensität unter kalziumfreien Bedingungen und F_{\max} , die Fluoreszenzintensität unter kalziumgesättigten Bedingungen ist.

Verwendet wurden in den Experimenten Fura-2/AM. Dieser Farbstoff ist ein Azetoxymethylester-Derivat, d.h. durch eine Modifikation der Carbonsäuregruppe des Farbstoffes mit den Azetoxymethylester-Gruppen entstehen ungeladene, lipophile Moleküle, die über die Plasmamembran der Zelle gelangen können. Im Zytosol werden die Azetoxymethylester durch unspezifische Esterasen vom Farbstoffmolekül abgespalten. Dadurch werden die Carboxylatgruppen wieder frei, so dass Kalzium an den Farbstoff binden kann. Aufgrund Polarität des Moleküls kann der Farbstoff auch nicht so schnell aus der Zelle heraus diffundieren.

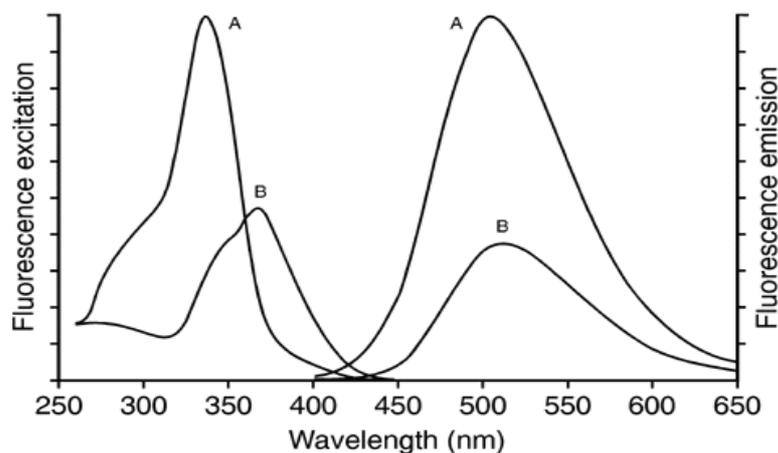


Abb.2.3. Fluoreszenzspektren der Exzitation und der Emission von Ca^{2+} -gesättigtem (A) und Ca^{2+} -freiem (B) Fura-2 (pH7.2)

Für die Bestimmung der einzelnen Werte sind Kalibrationsexperimente mit dem Farbstoff und geeigneten Zellen durchzuführen. Der Vorteil der ratiometrischen

Messung von $[Ca^{2+}]_i$; liegt darin, dass Faktoren wie z.B. die Verteilung des Farbstoffes in den Zellen oder das Photobleaching als Einfluss auf die Messergebnisse minimiert werden, da diese Faktoren Zähler und Nenner des Ratios in gleicher Weise beeinflussen.

2.2.4.1. Beschichtung der Deckgläser

Die Deckgläser wurden mit Ethanol (70%) gereinigt, danach wurden 12 μ l Cell-tak-Puffer-Lösung auf die Deckgläser aufgetragen. Nach 30 min Inkubationszeit wurde die Cell-tak-Puffer-Lösung abgesaugt und die Deckgläser mit H_2O_{dest} abgespült. Die beschichteten Deckgläser wurden im Kühlschrank bis zur Messung der Zellen aufbewahrt.

Ebenso wurden die gereinigten Deckgläser mit zwei weiteren Lösungen beschichtet. Dazu wurden 18 μ l Poly-L-Ornithin der verschiedenen Konzentrationen 1 μ g/ml, 0,5 μ g/ml, 0,1 μ g/ml und 18 μ l Poly-L-Lysin Hydrobromid der Konzentrationen 0,5 μ g/ml und 0,1 μ g/ml gewählt.

2.2.4.2. Der Messplatz

Der Messplatz, mit dem die Kalzium-imaging Experimente durchgeführt wurden, ist ausgestattet mit einem Till Photonics Polychrome V, einem Olympus IX70 (Fluoreszenz)-Mikroskop, in das die Sandwichkammer eingebaut werden kann.

Die, wie zuvor beschrieben, isolierten Zellen wurden bei Raumtemperatur 30 min in RPMI-Medium mit 2 μ g Fura-2/AM (gelöst in DMSO, 1 mM) lichtgeschützt inkubiert. Danach wurden die Zellen in gepuffertem RPMI-Medium gewaschen und in 12 μ l gepuffertem RPMI-Medium resuspendiert. In dieser Form wurden die Zellen auf ein Cell-tak beschichtetes Deckglas aufgetragen. Nach einer Ruhezeit von 25 min wurde die Sandwichkammer zusammengebaut. Dazu wurde eine Plexiglasvorrichtung, die über einen Zulauf und einen Ablauf verfügt, mit Silikon auf das Deckglas geklebt. Anschließend wurde ein kleineres Deckglas auf die Decke der Plexiglaskammer geklebt, so dass ein geschlossener Raum entstand. Die Kammer ist so konstruiert, dass ein Austausch der Flüssigkeit in der Kammer möglich ist, ohne dass die Flüssigkeit über den Zellen abgesaugt wird. In den Versuchen wurden die neuen Lösungen mit einer Spritze in die Kammer gespült, so dass die Flüssigkeit in der Kammer verdrängt und durch eine Pumpe abgesaugt werden konnte.

Die Zellen wurden während des Versuches abwechselnd mit 340nm und 380nm angeregt. Die Emissionsfluoreszenz > 440nm wurde über eine CCD Kamera (Till imago) über die gesamte Versuchslänge alle 5 Sekunden mit der Till Vision Software aufgezeichnet und nach dem Versuch mit der Wavematrix Igor Pro Software analysiert.

2.2.4.3. Kontrollversuch ohne Applikation von Substanzen

Um sicher zu stellen, dass die Zellen nicht auf die Scherkräfte der Lösungswechsel oder auf die Versuchsbedingungen wie etwa die Bestrahlung mit Licht reagieren, wurden Kontrollversuche durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in die Kammer eingebracht, wie zuvor beschrieben. Anschließend wurde mit 1 mM Ca^{2+} -Lösung die nicht adherenten Zellen aus dem gewählten Messbereich gespült. Der so vorbereitete Versuch wurde gestartet und nach 100 Sekunden wurde mit 1 mM Ca^{2+} -Lösung durch die Kammer gespült. Die Emissionsfluoreszenz wurde über 2000 Sekunden aufgezeichnet.

Um eine Beeinflussung der Kalziumsignale während der Experimente zu vermeiden, wurde erst im Anschluss an die Kalziummessung eine Identifikation der Zellen durchgeführt. Dazu wurden Antikörper, die einen fluoreszierenden Farbstoff tragen und gegen Oberflächenmarker der verschiedenen Zelltypen gerichtet sind, benutzt. 40µl RPMI-Medium mit 3 verschiedenen Antikörpern (je 5 µg/µl) wurde in die Kammer gespült und nach 15 Minuten Inkubationszeit mit 0,5 mM Ca^{2+} -Lösung wieder ausgewaschen. Danach wurden mit HQ-Standardfiltersets (AHF) bei 460 nm, 540 nm und 640 nm die Zellen identifiziert, indem an der exakt gleichen Stelle des Messbereiches Bilder der Zellen bei verschiedenen Wellenlängen aufgezeichnet wurden.

2.2.4.4. Experimente mit Thapsigarginlösungen

Um eine passive Entleerung der Kalziumspeicher zu induzieren, wurden Versuche mit Thapsigargin durchgeführt. Thapsigargin hemmt die SERCA-Pumpen (Sarco-endoplasmic reticulum Calcium ATPases) des endoplasmatischen Retikulums. Aus dem endoplasmatischen Reticulum entweicht permanent Kalzium in das Zytosol, welches entweder über SERCA ins ER zurückgepumpt wird oder über PMCA in den Extrazellulärraum gepumpt wird (T-Zellen verfügen über keinen funktionellen Na^{+} -

Ca²⁺-Antiporter). Wird nun die SERCA-Pumpe durch Thapsigargin gehemmt, führt diese Blockade zu einer passiven Entleerung der Kalziumspeicher.

In unserem Versuchsaufbau wurde die Kammer mit 0,5 mM Ca²⁺-Lösung gespült, so dass nicht haftende Zellen gewaschen wurden und die verbleibenden Zellen auf ihre Haftung überprüft werden konnten. Danach wurde der Versuch gestartet. In den ersten 99 Sekunden wurden die [Ca²⁺]_i- Signale aufgezeichnet, die das Ruhekalzium in den Zellen vor der Stimulation angeben. 100 Sekunden nach Versuchsbeginn wurde 0 mM Ca²⁺- Lösung mit EGTA/1µM Thapsigargin durch die Kammer gespült. Durch die Zugabe dieser Lösung zu den Lymphozyten kommt es zu einer transienten Erhöhung von [Ca²⁺]_i und zur Entleerung der ER-Kalziumspeicher. [Ca²⁺]_i sinkt nach wenigen Minuten auf ein Minimum ab. 700 Sekunden nach dem Start des Experiments wurde 1 mM Ca²⁺-Lösung/1µM Thapsigargin zu den Zellen gegeben. Es folgte ein steiler Anstieg von [Ca²⁺]_i in der Zelle, der sich schließlich einem Plateauwert annäherte. Nach 1200 Sekunden wurde wieder 0 mM Ca²⁺-Lösung mit EGTA/1µM Thapsigargin in die Kammer gespült, was wiederum zu einem starken Abfall von [Ca²⁺]_i führte. Nach Abschluss der Messung wurde wie zuvor beschrieben, eine Identifikation der Zellen durchgeführt.

2.2.4.5. Experimente mit Antikörperstimulation

In diesen Experimenten wurden die Zellen wie zuvor beschrieben mit Fura2/AM beladen und in die Kammer eingebracht. Danach wurde die Haftung der Zellen auf dem Deckglas mit 1 mM Ca²⁺-Lösung überprüft. Um eine physiologischere Stimulation der Zellen zu erreichen, wurden in diesen Experimenten 100 Sekunden nach Versuchstart 1 mM Ca²⁺-Lösung mit je 5 µl Anti-maus CD3e⁺ Antikörper und Anti-maus CD28⁺ Antikörper in die Kammer gespült und [Ca²⁺]_i gemessen. Die beiden Antikörper stimulieren sowohl den T-Zellrezeptor als auch den CD28 Ko-Rezeptor, was eine optimale T-Zellstimulation ermöglicht. Nach Ende des Versuches wurden die Zellen wie zuvor beschrieben identifiziert.

Ebenso wurden einige Versuche mit Muromonab-CD3 (OKT3) durchgeführt, einem klassischen Antikörper gegen den humanen T-Zellrezeptor (der erste zugelassene monoklonale Antikörper war OKT3). OKT3 bindet spezifisch an die ε-Kette des CD3-Moleküls, das auf allen reifen T-Zellen exprimiert wird und für die Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors verantwortlich ist. OKT3 ist ein monoklonaler, gentechnisch

hergestellter Maus-Antikörper, der im Gegensatz zu den polyklonalen Antikörpern, nur von einem Zellklon produziert wird (NOVARTIS Pharma. de, 2006).

Bei diesen Versuchen wurden die Zellen wie zuvor beschrieben in die Kammer eingebaut. Um den Messbereich für die Messung vorzubereiten, wurde mit 1 mM Ca^{2+} -Lösung durch die Kammer gespült und auf diese Art die nicht haftenden Zellen weggespült. 250 Sekunden nach dem Start wurde 750 μl 1 mM Ca^{2+} -Lösung mit 1 μg OKT3 zu den Zellen gegeben. Nach 2000 Sekunden, am Ende des Experimentes, wurden die Zellen wie zuvor beschrieben identifiziert.

3. Ergebnisse

3.1. Optimierung der Zellpräparation

Ein Ziel dieser Arbeit war die Messung der freien zytosolischen Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ von Lymphozyten aus dem Blut und dem Darm der Maus. Zunächst musste die Präparationsmethode an die Zielsetzung der Arbeit angepasst und optimiert werden. Es wurden die im vorherigen Kapitel beschriebenen Methoden verwendet, um Lymphozyten aus dem Blut mit Hilfe der Gradientenzentrifugation zu isolieren. Andererseits mussten, um die Lymphozyten des Darmes zu isolieren, Gewebe aufgelöst und die gewünschten Zellen aus den Präparationslösungen herausgefiltert werden. Diese Arbeitsschritte bedeuten für die Zellen, dass sie aus ihrer natürlichen Umgebung herausgelöst werden müssen, um zur Messung von $[Ca^{2+}]_i$ in die Experimentkammer eingebracht werden zu können.

Die Optimierung der Methode gliederte sich in zwei Schritte, die einerseits eine höhere Ausbeute an nicht voraktivierten Zellen umfasst und andererseits eine verbesserte Haftung der Lymphozyten auf den Deckgläsern beinhaltet. Hinsichtlich der Verwendung der Zellen für $[Ca^{2+}]_i$ Experimente sind 2 Faktoren entscheidend: Adhärenz und nicht voraktivierte Zellen

In den ersten Versuchen zur Optimierung der Zellpräparation sollte getestet werden, wie hoch der Ruhekalziumwert der Zellen nach der Präparation war. Dazu wurden Zellen aus Balb/cAnCrI-Mäusen isoliert, mit Fura2/AM beladen und in die Messkammer eingebracht. Es zeigte sich, dass sich bei älteren Tieren mehr Fett um den Darm bildet, was die Präparation der Lymphozyten erschwert. Außerdem trat bei Tieren, die älter als 13 Wochen waren, mehr Schleim bei der Präparation auf, was dazu führte, dass die Zellen schlecht mit Fura2/AM zu beladen waren und nicht mehr auf den Deckgläsern hafteten. Tiere von 8 bis 12 Wochen waren zur Isolation der Zellen optimal, da um den Darm herum fast kein Fett ausgebildet war. Bei diesen Tieren konnte auch der Schleim, der von den Becherzellen in das Darmlumen abgegeben wird, durch mehrmaliges Waschen der isolierten Darmstückchen mit HBSS entfernt werden, so dass die Zellen gut mit Fura2/AM beladen werden konnten.

Die Blutzellen konnten schon 2 Stunden nach der Isolation zu Versuchen verwendet werden, da bei Experimentstart kein erhöhtes $[Ca^{2+}]_i$ gemessen wurde, im Vergleich

zu späteren Messungen, so dass die Zellen durch die Präparation nicht voraktiviert waren. Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen aus dem Darm nach 2 Stunden Ruhezeit im Kühlschrank ein sehr hohes $[Ca^{2+}]_i$ von 700 bis 1100 a.u. (arbitrary units). Die hohe $[Ca^{2+}]_i$ unter Ruhebedingungen ist wahrscheinlich auf den Stress der Zellen während der Präparation zurückzuführen. Bei den menschlichen LPL wurden von der Arbeitsgruppe in vorher durchgeführten Experimenten keine so hohen Ruhekalziumkonzentrationen, auch direkt nach der Präparation, gefunden [Schwarz et al., 2004, Tutsch et al. 2004]. Um dieses hohe zytosolische $[Ca^{2+}]_i$ zu senken, wurden die Zellen in verschiedenen Experimenten im Brutschrank von 2 bis zu 14 Stunden aufbewahrt (Daten nicht gezeigt). Diese verschiedenen Ruhezeiten führten allerdings nicht zu einer Senkung des hohen Kalziumniveaus, erst eine Ruhezeit über Nacht im Kühlschrank ließ die intrazelluläre Kalziumkonzentration auf einen Ratiowert (340 nm/380 nm) zwischen 300-400 a.u. absinken, was etwa einem $[Ca^{2+}]_i$ von 50-100 nm an diesem Messplatz entspricht. In allen folgenden Versuchen wurden die Ratiowerte 340 nm/380 nm als Maß für $[Ca^{2+}]_i$ benutzt, da diese proportional zu $[Ca^{2+}]_i$ sind. Wenn im folgenden von $[Ca^{2+}]_i$ gesprochen wird, ist strenggenommen der Ratiowert 340 nm/380 nm gemeint.

Bei den Balb/cAnCrI-Mäusen von 8-12 Wochen wurden Versuchsreihen durchgeführt, um herauszufinden, auf welchen Deckgläsern, die unterschiedlich beschichtet wurden, die meisten Zellen haften. Dazu wurden parallel Zellen aus einer Präparation auf Deckgläser, die entweder mit Poly-L-ornitin, Poly-L-Lysin oder Cell tak beschichtet waren, gemessen. Zunächst wurden die Messungen auf Deckgläsern durchgeführt, die mit Polyornithin (0,5 mg/ml) beschichtet waren. Die Abb. 3.1. zeigt das Ergebnis der ersten 40 Versuche der Darmlymphozyten (schwarze Kurve) und zum Vergleich eine Zelle aus einem späteren Experiment (rote Kurve). Die Zellen hafteten sehr schlecht auf dem Polyornithin, so dass aus 40 Versuchen nur 66 CD3⁺-Lymphozyten gemessen werden konnten (schwarze Kurve). Die Zellen aus diesen ersten Experimenten zeigen ebenfalls ein immer noch relativ hohes Ruhekalzium im Vergleich zu den Ergebnissen der späteren Experimente, bei denen verschiedene Schritte der Präparation nach und nach optimiert wurden (u.a. andere Beschichtungen, siehe unten).

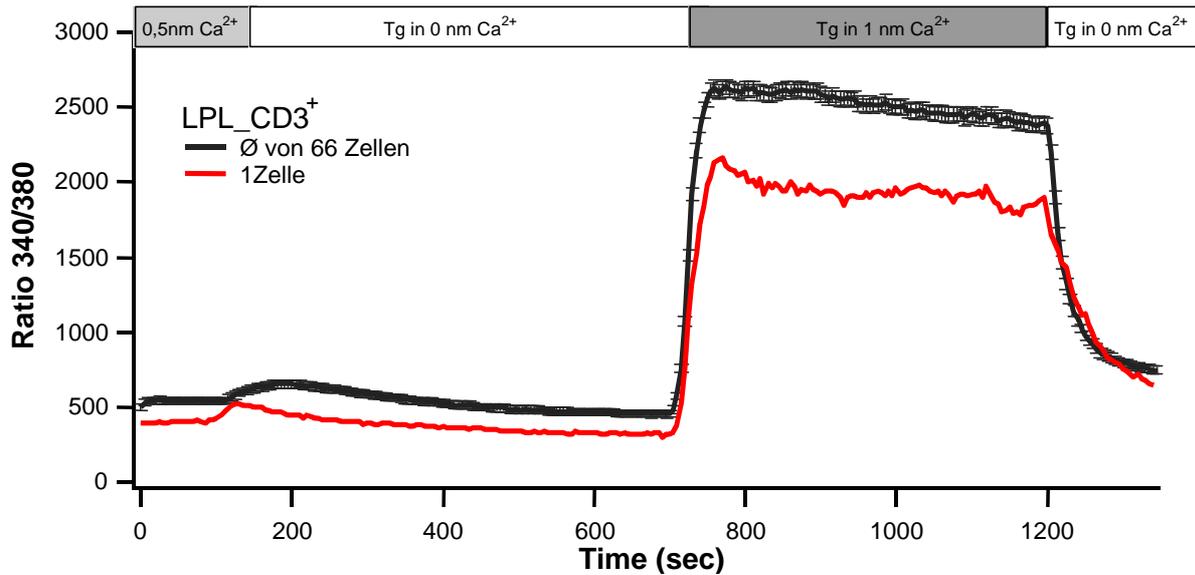


Abb. 3.1. Experimente mit Thapsigargin. Schwarze Kurve: Durchschnitt (\bar{x}) von 66 CD3⁺ positiven Lymphozyten mit Standardabweichung aus dem Kolon der Balb/cAnCrI-Maus. Thapsigargin in 0 mM Ca²⁺-Lösung mit EGTA und in 1 mM Ca²⁺-Lösung, 40 Versuche, Deckgläser mit Polyornitin beschichtet. Dazu im Vergleich eine CD8⁺-Zelle aus einer späteren Messung (rote Kurve).

Um mehr Zellen auf dem Deckglas zu fixieren, wurden andere Beschichtungen gewählt. Der Versuch mit Poly-L-Lysin (0,5 mg/ml) brachte keinen Erfolg, da noch weniger Zellen nach dem Spülen auf dem Deckglas hafteten als mit Polyornithin. Die Beschichtung mit Cell-tak (0,061 mg/ml) zeigte, dass die beste Haftung der Zellen aus Balb/cAnCrI-Mäusen auf Cell tak zu erreichen war, deshalb wurden für die weiteren Versuche die Beschichtung der Deckgläser mit Cell tak gewählt.

Im Anschluss an die [Ca²⁺]_i-Messung wurden die T- und B-Lymphozyten identifiziert. Dazu wurden CD19⁺, CD4⁺ und CD8⁺-Antikörper verwendet, um B-Lymphozyten und verschiedene T-Lymphozyten zu identifizieren. An der oben gezeigten CD8⁺-Zelle (Abb.3.1, rote Kurve) wird im folgenden das Thapsigarginexperiment erklärt.

Die Lymphozyten wurden mit Fura2/AM beladen und auf einem Deckglas in die Versuchskammer eingebracht. Vor Beginn des Experimentes wurden die nicht haftenden Zellen mit 0,5 mM Ca²⁺-Lösung weggespült und in dieser Lösung wurde über die ersten 99 Sekunden die Ruhekalziumkonzentration der Zellen bestimmt. Die Stimulation der Zellen erfolgte 100 Sekunden nach dem Start durch die Zugabe von 0 mM Ca²⁺-Lösung mit EGTA + 1µM Thapsigargin. Thapsigargin blockiert die SERCA-Pumpen, die Ca²⁺ aus dem Zytosol in das Endoplasmatische Retikulum pumpen, wodurch es zu einer passiven Entleerung der Ca²⁺-Speicher kommt. Durch

diese Entleerung werden die CRAC-Kanäle aktiviert. Der Ca^{2+} -Ausstrom aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) zeigt sich in einer kleinen Erhöhung der Emissionskurve (nach 100 Sekunden). Dieses Ca^{2+} wird von Pumpen aus der Zelle gepumpt, was sich dadurch zeigt, dass die Kurve danach wieder langsam zum Ruhekalziumwert absinkt. 700 Sekunden nach Versuchsbeginn erfolgt die Erhöhung des extrazellulären Kalziums auf 1 mM durch Zugabe 1 mM Ca^{2+} -Lösung + 1 μM Thapsigargin. Es kommt zu einem steilen Anstieg der Kurve durch den Ca^{2+} Einstrom durch die CRAC Kanäle. Nach Erreichen eines Peaks erfolgt die langsame Abnahme von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bis zu einem Plateau, was das Ergebnis eines Fließgleichgewichts zwischen Ca^{2+} Ein- und Ausstrom darstellt. Nach 1200 Sekunden, ausgehend von Start des Experimentes, wurde wieder die 0 mM Ca^{2+} -Lösung mit EGTA + 1 μM Thapsigargin in die Kammer gespült, was eine Senkung der Kalziumkonzentration im Zytosol nach sich zog.

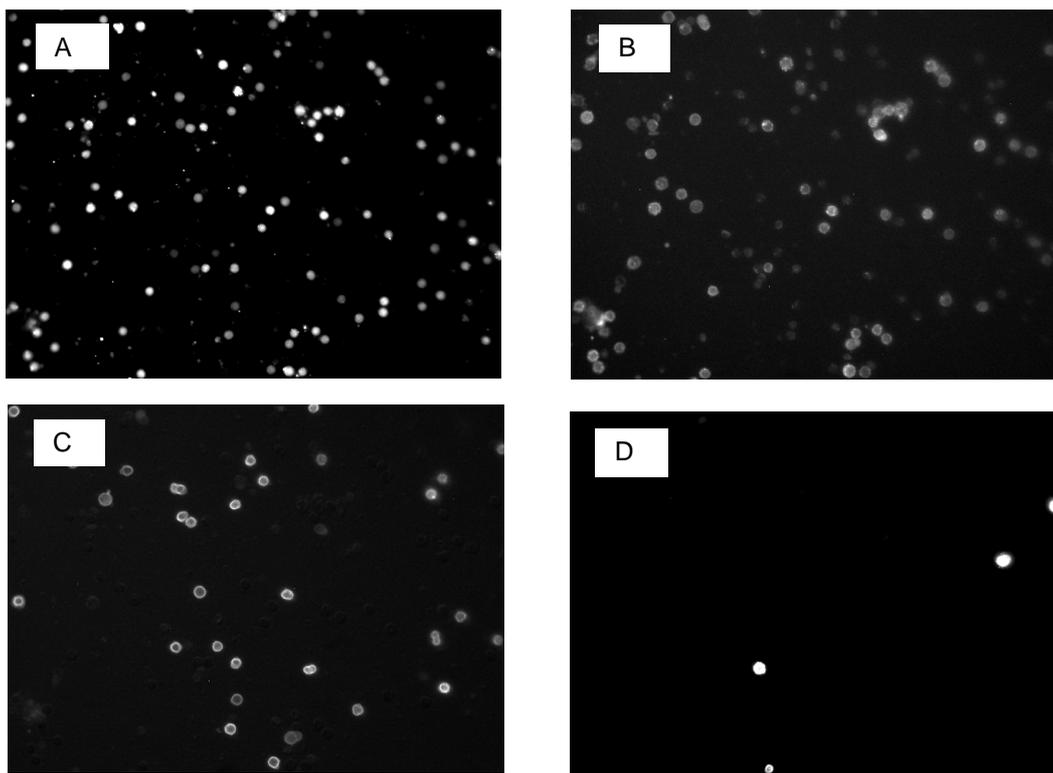


Abb. 3.2. Bilder zur Identifikation der Zellen, A: 360 nm alle Zellen des Versuches, die mit Fura2/AM beladen sind, B: 460 nm alle $\text{CD}19^+$ -Zellen, C: 640 nm alle $\text{CD}4^+$ -Zellen, D: 540 nm alle $\text{CD}8^+$ -Zellen.

Der Zeitraum zwischen Erhöhung des $[\text{Ca}^{2+}]_a$ und dem Wechsel zu kalziumfreier extrazellulärer Lösung reicht aus, damit sich $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf ein fast gleichbleibendes

Plateau einstellt, dessen Endwert statistisch analysiert wurde. Mit diesem Protokoll wurden alle Thapsigarginexperimente mit den verschiedenen Lymphozyten durchgeführt.

Um die Messergebnisse nicht zu beeinflussen wurden die Zellen erst nach Ende der Datenaufzeichnung mit Antikörpern, die gegen spezifische Oberflächenantigene gerichtet sind, identifiziert. Dazu wurden 40 µl Medium mit verschiedenen Antikörperlösungen, wie im Kap. Material und Methoden beschrieben, in die Messkammer gespült. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden die nicht gebundenen Antikörper aus der Kammer mit 0,5 mM Ca^{2+} -Lösung ausgewaschen und die Zellen mit Hilfe von HQ-Standardfiltersets (AHF) bei 470, 540 und 640 nm identifiziert (siehe Abb. 3.2).

3.2. Kontrollversuche, um den Einfluss äußerer Faktoren auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Lymphozyten zu testen

Um den Einfluss der Faktoren, wie z.B. Belichtung mit UV-Licht oder Scherkräfte beim Lösungswechsel, auf die Zellen zu testen, wurden bei den Blut- und Darmzellen Kontrollversuche gemacht. Dazu wurden die Zellen wie vorher beschrieben mit Fura2/AM beladen und in die Experimentkammer eingebracht. Danach wurden die nicht haftenden Zellen mit 1 mM Ca^{2+} -Lösung weggespült. 100 Sekunden nach Versuchsstart wurde 1 mM Ca^{2+} -Lösung ohne weitere Substanzen durch die Kammer durchgespült und die Emissionsintensitäten über 2000 Sekunden aufgezeichnet (Abb. 3.3., 3.4.). Nach Versuchsende wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben, identifiziert.

Die Abbildung 3.3. zeigt den Kontrollversuch mit Darmlymphozyten, indem nur mit 1 mM Ca^{2+} -Lösung die Kammer durchgespült wurde. Die Abbildung zeigt deutlich, dass die Zellen nicht mechanisch durch die Perfussion der Lösung durch die Messkammer und auch nicht unspezifisch durch z.B. Licht über einen Zeitraum von 2000 Sekunden aktiviert wurden.

Die nachfolgende Abbildung 3.4. mit den isolierten Blutzellen zeigt den gleichen Kontrollversuch wie Abbildung 3.3. mit isolierten Darmzellen. Die $\text{CD}19^+$ -Blutlymphozyten reagieren zu 54% und die $\text{CD}3^+$ -Blutlymphozyten zu 0,1% mit einer leichten Oszillation des $[\text{Ca}^{2+}]_i$, die deutlich schwächer ist als die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale in den später durchgeführten Thapsigarginexperimenten.

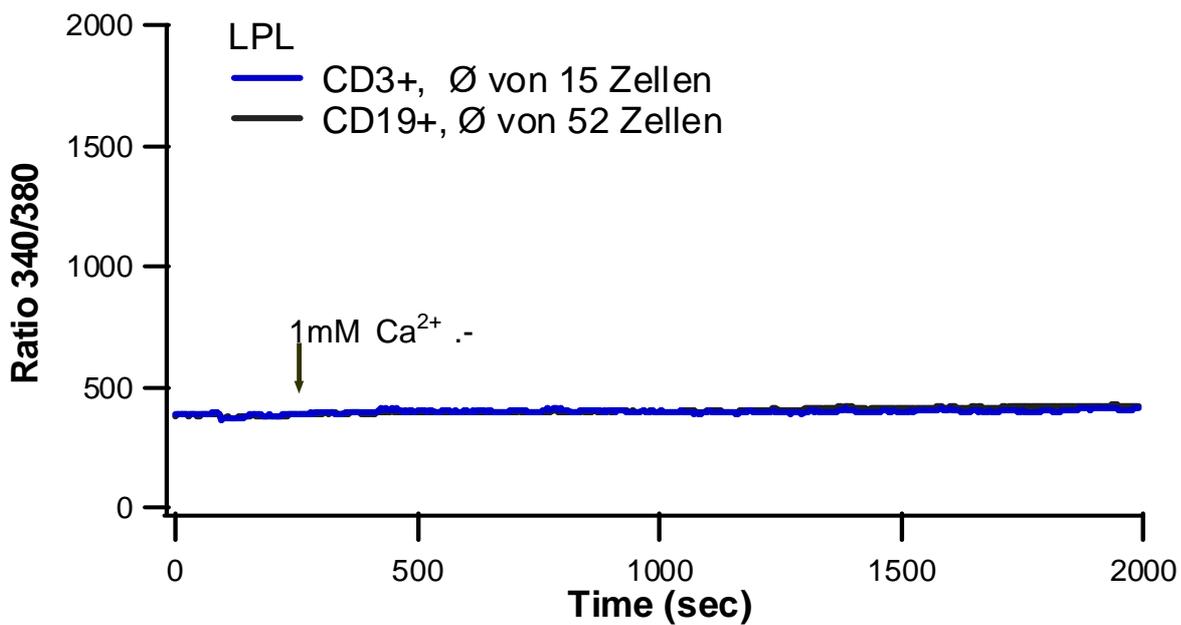


Abb.3.3. Kontrollversuch mit 1 mM Ca²⁺-Lösung. Mononukleare Darmzellen der Balb/cAnCrI-Maus Experiment in 1mM Ca²⁺-Lösung mit Zellen von der Balb/cAnCrI-Maus, LPL = Lymphozyten aus der Lamina Propria, Ø = Durchschnitt der [Ca²⁺]_i der Zellen, die beiden Kurven zeigen keine Reaktion auf den Lösungswechsel in der Kammer nach 100 sec, Ratio 340/380 = Ratio 340 nm/380nm,

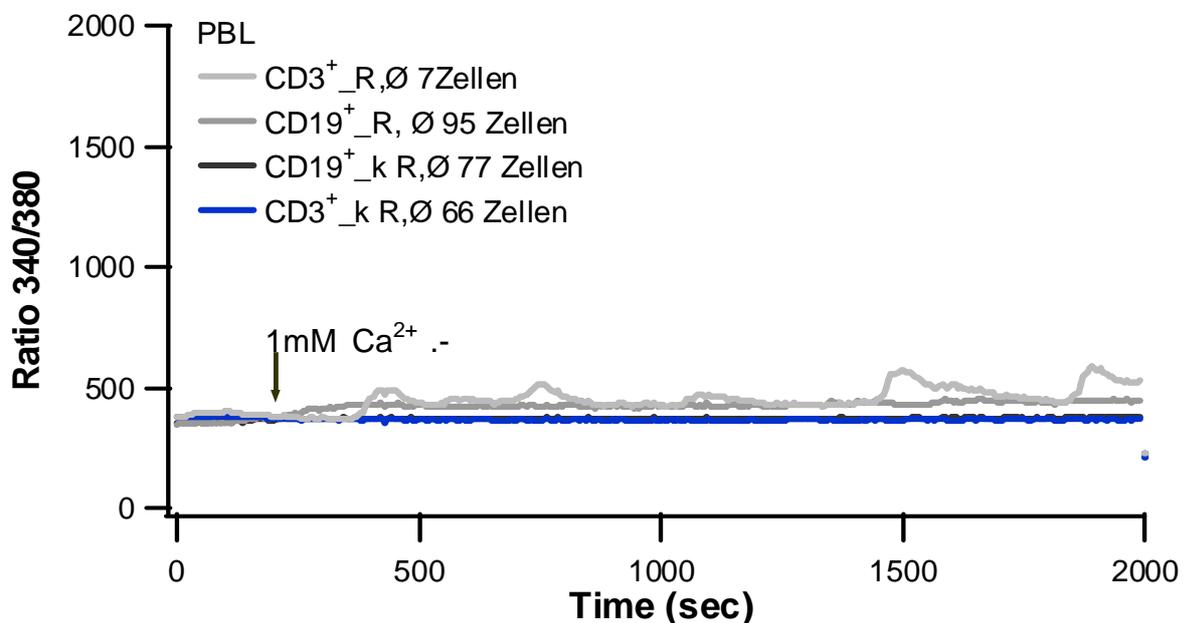


Abb.3.4. Kontrollversuch mit 1 mM Ca²⁺-Lösung. Mononuklearen Blutzellen der Balb/cAnCrI-Maus, Experiment in 1mM Ca²⁺-Lösung, PBL = periphere Blutlymphozyten, Ø= Durchschnitt der [Ca²⁺]_i der Zellen, kR = keine Reaktion, R = Reaktion auf den Lösungswechsel in der Kammer nach 100 sec, Ratio 340/380 = Ratio 340 nm/380nm

Die Ergebnisse der Optimierung sowie die Kontrollversuche ohne Stimulation durch zugegebene Substanzen (Abb.3.3, 3.4.) schafften die Grundlage, $[Ca^{2+}]_i$ in LPLs und PBLs miteinander zu vergleichen. Es zeigt sich, dass die Zellen nicht (bzw. wenn, dann nur sehr schwach, wie teilweise die PBL) durch den Lösungsmittelwechsel, der bei den Versuchen notwendig ist, aktiviert werden. Fast alle Zellen bleiben auch über den Zeitraum von 2000 Sekunden ruhig, so dass sichergestellt wurde, dass die Versuche innerhalb dieser Zeit durchgeführt werden konnten.

Die isolierten Lymphozyten aus dem Kolon hafteten besser auf den Deckgläsern als die Lymphozyten aus dem Dünndarm, deshalb wurden für die folgenden Versuche nur noch die Lymphozyten aus dem Kolon verwendet.

Auf dieser Grundlage sind die Vergleiche zwischen Zellen aus verschiedenen Mausstämmen in den Experimenten mit Thapsigargin und mit physiologischen Stimulationen in den folgenden Abbildungen dargestellt. Dazu wurden Zellen aus verschiedenen Mausstämmen isoliert und mit Thapsigargin oder mit Antikörpern stimuliert.

3.3. Vergleich von $[Ca^{2+}]_i$ in Blut- und Darmlymphozyten von Balb/cAnCrI- Mäusen nach Zugabe von unterschiedlichen Ca^{2+} -Lösungen mit Thapsigargin

Die folgenden Abbildungen zeigen die Experimente mit Balb/cAnCrI- Mausezellen aus Blut und Darm, die mit unterschiedlichen Ca^{2+} -Lösungen, die Thapsigargin enthalten, durchgeführt wurden. In den ersten Abbildungen sind die Ergebnisse von Thapsigarginexperimenten dargestellt, die an den beiden uns zur Verfügung stehenden Messplätzen aufgezeichnet wurden. Die Zellen wurden wie zuvor im Kapitel Material und Methoden beschreiben, isoliert. Anschließend wurden die Zellen mit Fura2/AM beladen und in die Messkammer eingebracht.

Die gemessenen Zellen zeigten an den beiden verschiedenen Messplätzen ein gleiches Verhalten, die $CD3^+$ -Zellen aus Blut und Darm liegen im Plateauwert über den Daten der $CD19^+$ -Zellen. Die Signale im Plateaubereich am Messplatz 2 sind etwas höher im Vergleich zum Messplatz 1, was durch die unterschiedliche technische Ausstattung des Messplatzes zu erklären ist.

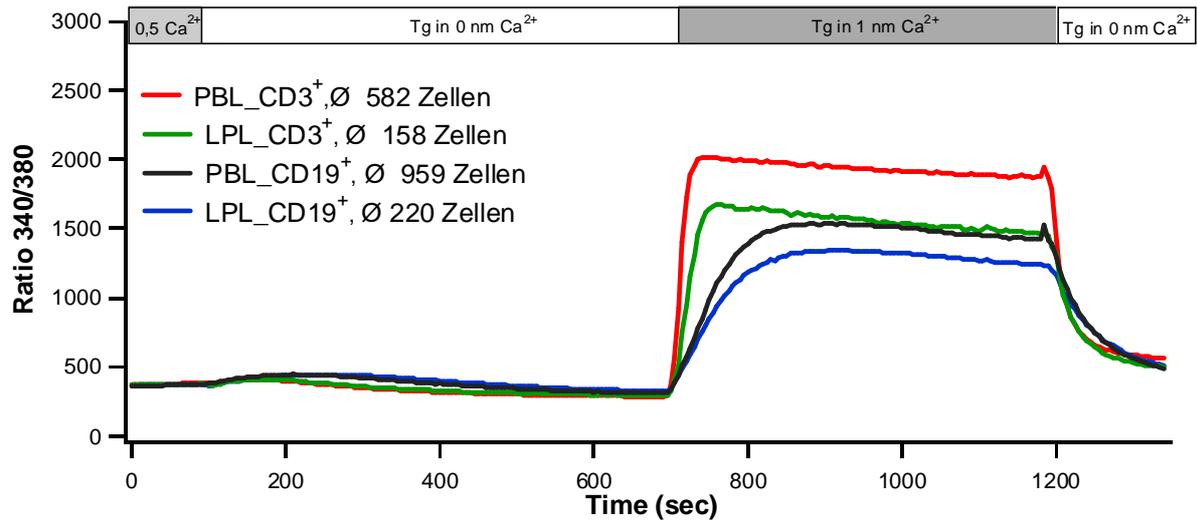


Abb. 3.5. Vergleich von CD3⁺- und CD19⁺-Zellen aus Blut und Darm von Balb/cAnCrI-Mäusen, aufgenommen am Messplatz 1 mit Thapsigargin in kalziumfreier Lösung und in 1 mM Ca²⁺-Lösung, PBL-Daten aus 5 Versuchen, LPL-Daten aus 2 Versuchen, Ratio 340/380 = Ratio 340 nm/380nm, Ø = Durchschnitt von den in der Kurve zusammengefaßten Zellen.

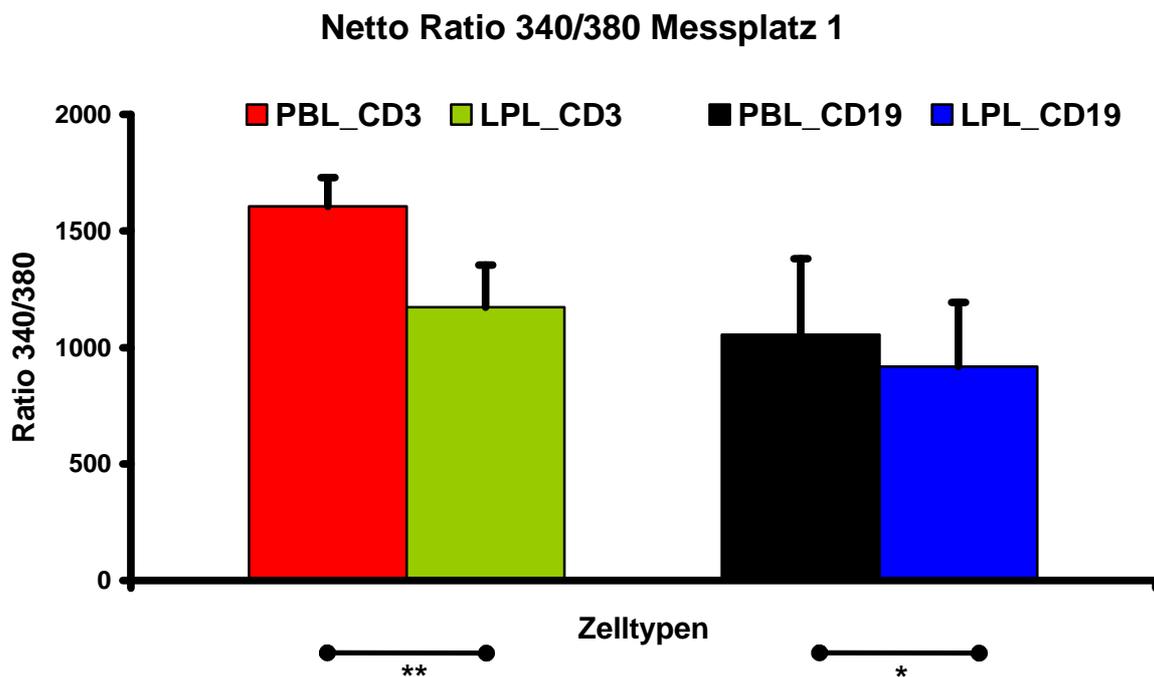


Abb. 3.6. Statistische Auswertung Messplatz 1, Vergleich der netto [Ca²⁺]_i-Erhöhung (Plateau-Ruhezustand) mit Standartabweichung für CD3⁺ und CD19⁺-Zellen.

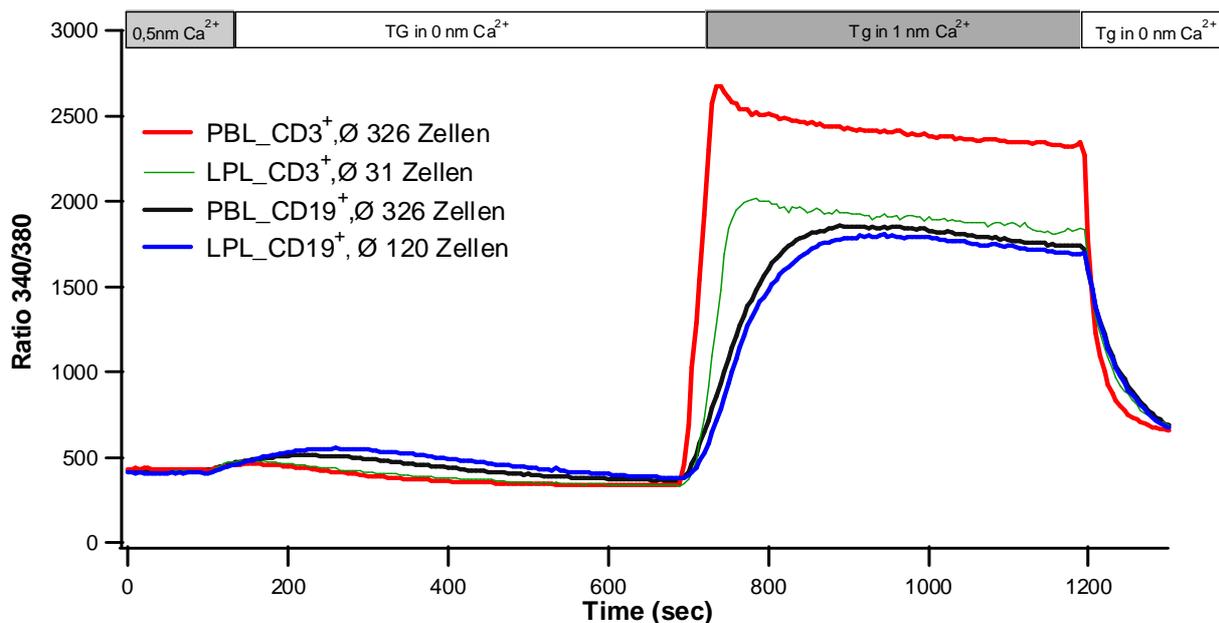


Abb. 3.7. Vergleich von CD3⁺- und CD19⁺-Zellen aus Blut und Darm von Balb/cAnCrI - Mäusen, gemessen an Messplatz 2, Thapsigargin in kalziumfreier Lösung und in 1 mM Ca²⁺-Lösung, PBL-Daten und LPL-Daten jeweils aus 3 Versuchen.

Netto Ratio 340/380 Messplatz 2

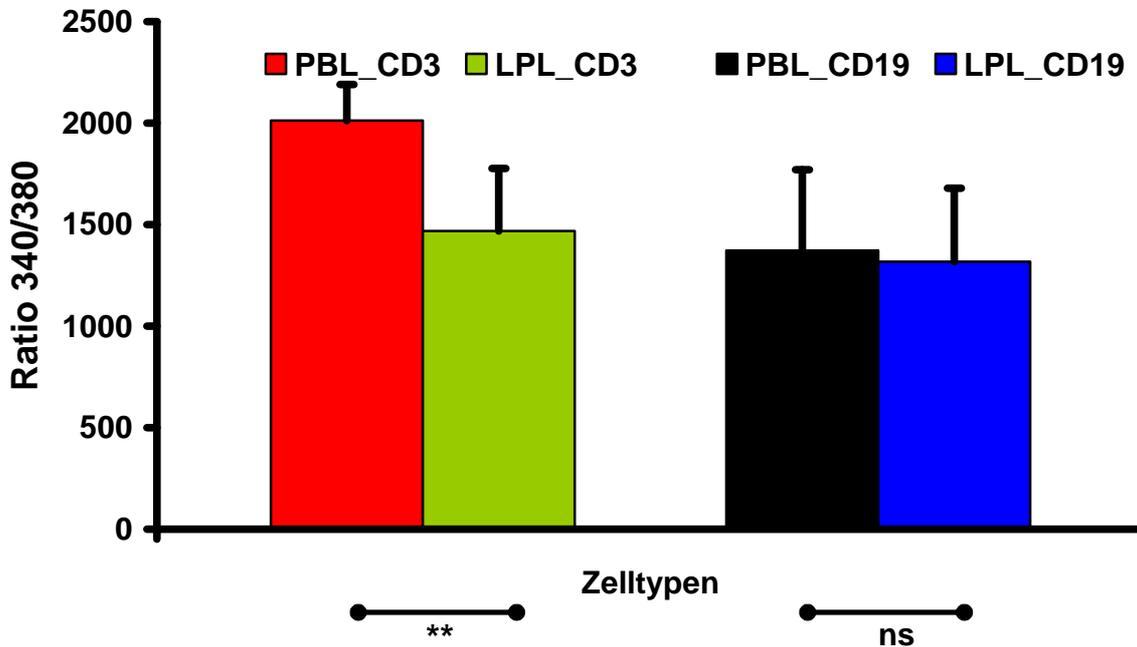


Abb. 3.8. Statistische Auswertung Messplatz 2, Vergleich der netto [Ca²⁺]-Erhöhung (Plateau-Ruhezustand) mit Standardabweichung für CD3⁺ und CD19⁺-Zellen.

Die statistische Analyse der Daten ergab für den Messplatz 1 einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den CD3⁺-Zellen für Blut und Darm von $p < 0,004$

und einen signifikanten Unterschied für die CD19⁺-Zellen von $p < 0,05$. Für den Messplatz 2 konnte nur ein hoch signifikanter Unterschied für die CD3⁺-Zellen von $p < 2,3 \times 10^{-5}$ festgestellt werden, für die CD19⁺-Zellen ergab der t-test ein $p < 0,09$.

Diese Ergebnisse bei den Balb/cAnCrI-Mäusen zeigen, dass das $[Ca^{2+}]_i$ -Plateau der PBL-Zellen über dem $[Ca^{2+}]_i$ -Plateau der LPL-Zellen liegt. Dieses Ergebnis ist konsistent mit Ergebnissen aus unserer Arbeitsgruppe bezüglich humaner T-Lymphozyten aus Blut und Darm [Schwarz, A. et al, 2004, Tutsch et al., 2004] und es ist ein Hinweis, dass die Maus als Modellorganismus für die Untersuchungen der erniedrigten $[Ca^{2+}]_i$ -Signale in T-Lymphozyten aus dem Darm und die damit wahrscheinlich verbundene T-Zell-Hyporeaktivität benutzt werden kann.

3.5. Vergleich von $[Ca^{2+}]_i$ in Blut- und Darmlymphozyten von Balb/cAnCrI-Mäusen nach Antikörperstimulation

Die Stimulation der Blut- und Darmlymphozyten kann physiologisch über Antikörper erfolgen. In diesem Zusammenhang war die Frage interessant, ob diese Stimulation in diesem Versuchsaufbau anhand der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale zu erkennen ist. Dazu wurden die Antikörper Anti-CD3⁺, Anti-CD28⁺ und OKT3 eingesetzt. Die Anti-CD3⁺/Anti-CD28⁺-Antikörper stimulieren sowohl den T-Zellrezeptor als auch den CD28⁺-Ko-Rezeptor, während OKT3 einen der klassischen Antikörper gegen den T-Zellrezeptor darstellt.

In dieser Versuchsreihe wurden die Lymphozyten wie zuvor in Kapitel Material und Methoden beschrieben, isoliert und mit Fura2/AM beladen. Danach konnten die Zellen in die Messkammer eingebracht werden. Die nachfolgenden Experimente wurden an Messplatz 1 durchgeführt. In den Versuchen mit Antikörperstimulation wurden die nicht haftenden Zellen mit 1 mM Ca^{2+} -Lösung vor Versuchsstart weggespült. Die physiologische Stimulation erfolgte in 1 mM Ca^{2+} -Lösung mit den ausgewählten Antikörpern. Dazu wurde eine Kombination von 2 Antikörpern, Anti-CD3⁺ und Anti-CD28⁺, oder eine Stimulation mit OKT3 verwendet.

Bindet ein Antikörper an den korrespondierenden Rezeptor an der Plasmamembran, löst diese Bindung eine Kaskade aus, wodurch es im weiteren Verlauf zu der Öffnung der CRAC-Kanäle und damit zu einem Einstrom von Ca^{2+} in das Zytosol kommt. Durch die Öffnung der Kanäle und den gleichzeitigen Export von Ca^{2+} über

die Plasmamembran kommt es zu einem Fließgleichgewicht des Ca^{2+} , was am Ende jeder Antikörperstimulation zu beobachten ist (siehe auch Abb.3.9 und 3.10.).

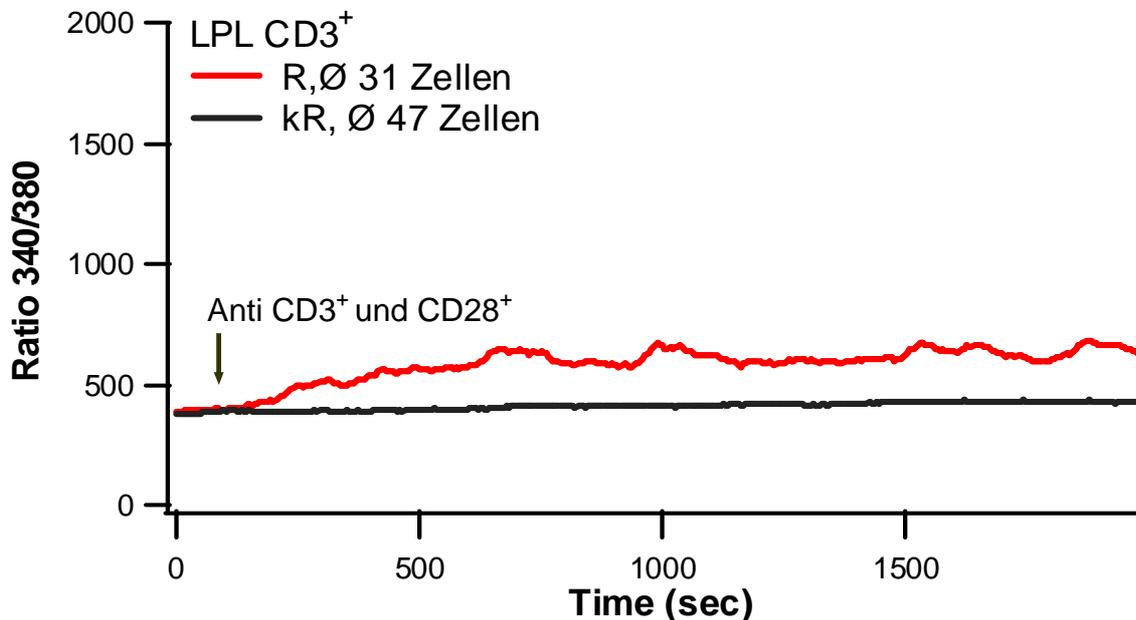


Abb. 3.9. Antikörperstimulation der CD3^+ -LPLs von Balb/cAnCrI-Mäusen in 1 mM Ca^{2+} -Lösung, Stimulation 100 sec nach Versuchsstart mit 1mM Ca^{2+} -Lösung mit je 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Anti- CD3^+ und Anti- CD28^+ kR = keine Reaktion, R = Reaktion

Die Abbildungen 3.9. und 3.10. zeigen die Ergebnisse der Antikörperstimulation mit Anti- CD3^+ und Anti- CD28^+ von den Darm- und den Blutlymphozyten. Die roten Kurven zeigen die durchschnittlichen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale der Zellen, die durch einen Anstieg des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eine Reaktion auf die Stimulation zeigen, während die schwarzen Kurven die durchschnittlichen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale der Zellen zusammenfassen, die keine Erhöhung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aufweisen. Die Zellen reagieren auf die Stimulation mit Antikörpern verschieden, dies zeigt sich in einem unterschiedlichen Kurvenverlauf, was am Beispiel von 5 verschiedenen Blutlymphozyten in Abbildung 3.11. gezeigt wird.

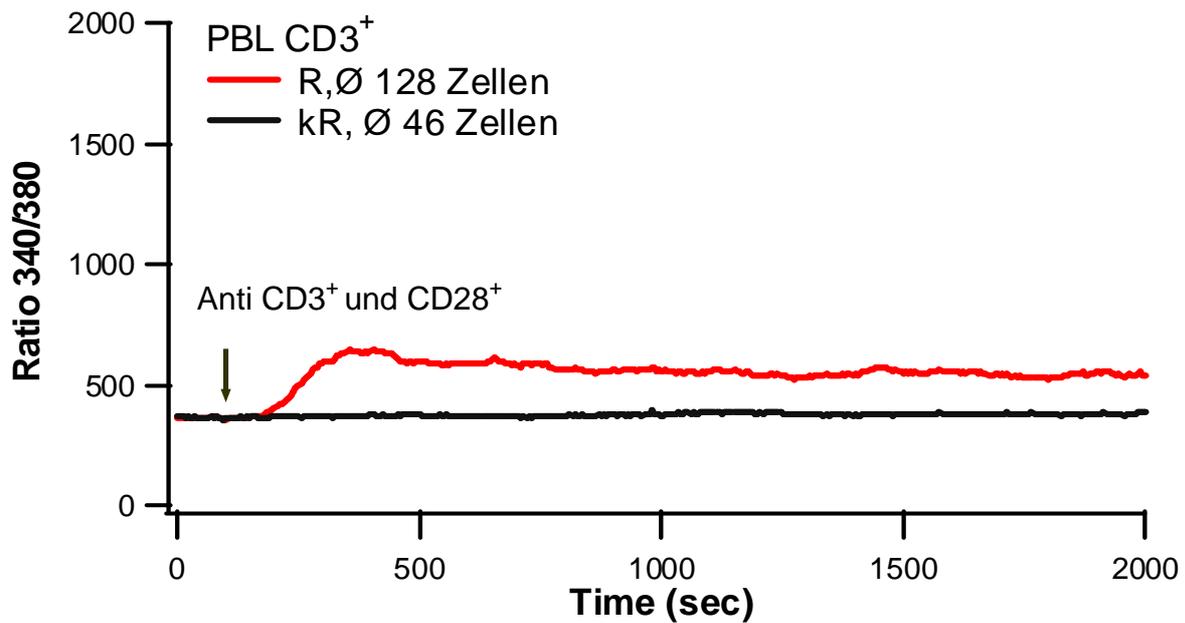


Abb. 3.10. Antikörperstimulation der CD3⁺-Zellen aus dem Blut der Balb/cAnCrI Maus in 1 mM Ca²⁺-Lösung nach 100 sec. Stimulation mit 1 mM Ca²⁺-Lösung mit je 5 µg/ml Anti-CD3⁺ und Anti-CD28⁺, kR = keine Reaktion, R = Reaktion

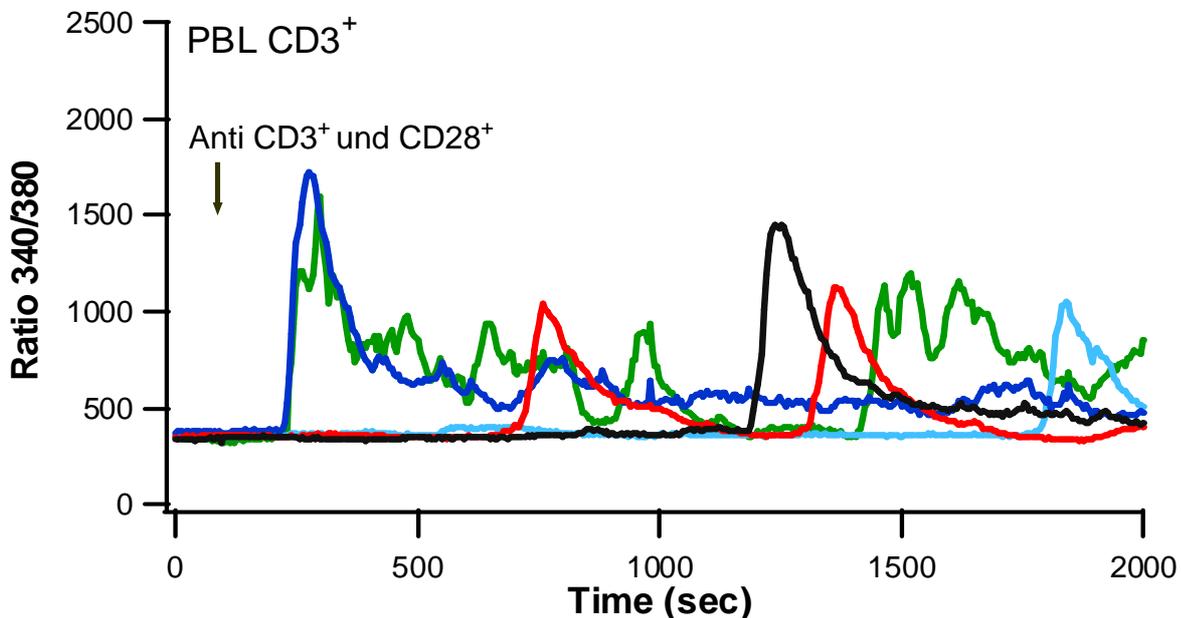


Abb. 3.11. Beispiel für 5 verschieden reagierende CD3⁺-Zellen aus dem Blut einer Balb/cAnCrI Maus, die in Abb. 3.9 in der roten Kurve gewertet wurden

Der Vergleich zwischen der Stimulation der Zellen mit den Antikörpern Anti-CD3⁺ und Anti-CD28⁺ und mit den Kontrollversuchen (Abb. 3.3., 3.4.), indem nur 1 mM Ca²⁺-

Lösung durch die Kammer gespült wurde, zeigt deutlich, dass die CD3⁺-Zellen aus dem Blut und dem Darm der Maus durch die Antikörper stimuliert wurden (siehe Abb.3.9., 3.10., 3.11.). Bei den Kontrollversuchen reagierten 10% der Blut-T-Lymphozyten und 12% der Darm-T-Lymphozyten während bei der Antikörperstimulation 74% der Blut-T-Lymphozyten und 40% der Darm-T-Lymphozyten reagierten.

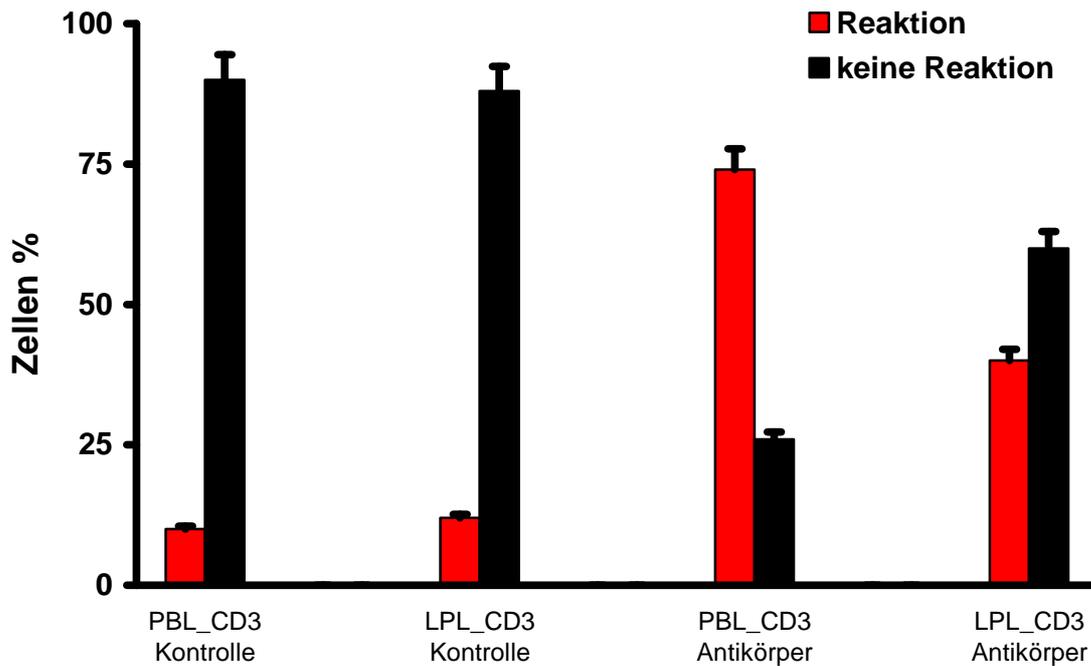


Abb.3.12. Vergleich der CD3⁺-Zellen von Blut (PBL) und Darm (LPL) von Balb/cAnCrI Mäusen aus den Kontrollversuchen und den Versuchen mit Antikörperstimulation (anti-CD3⁺ und anti-CD28⁺), R = Reaktion, kR = keine Reaktion

Der Vergleich zwischen den Blut- und Darmlymphozyten der folgenden Abbildung zeigt, dass die Blutzellen eine kleinere Latenz aufweisen, d.h. die Zeit zwischen der Stimulation der Zellen und dem messbaren Signal ist kürzer und es konnten höhere [Ca²⁺]_i Signale gemessen werden. Außerdem erreichen die Blutzellen durchschnittlich die maximale [Ca²⁺]_i Werte in 600 sec, während es bei den Darmzellen 1120 sec dauert. Im Plateau = steady state erreichen PBL und LPL fast das gleichen Niveau. Aus den Ergebnissen läßt sich feststellen, dass insgesamt mehr PBLs auf die Stimulation mit Antikörpern reagieren als LPLs, sie reagieren auch etwas schneller (siehe Abb. 3.13.). Dieser Befund weist auf eine Hyporeaktivität der LPLs gegenüber den PBLs hin. Die LPL Zellen, die auf die Antikörper reagieren,

erreichen jedoch ähnlich $[Ca^{2+}]_i$ Werte wie die PBLs. Diese Daten legen insgesamt den Schluss nahe, dass es sich um ein Schwellenphänomen handelt, das heißt, im Mittel überschreiten weniger LPLs als PBLs die Aktivierungsschwelle.

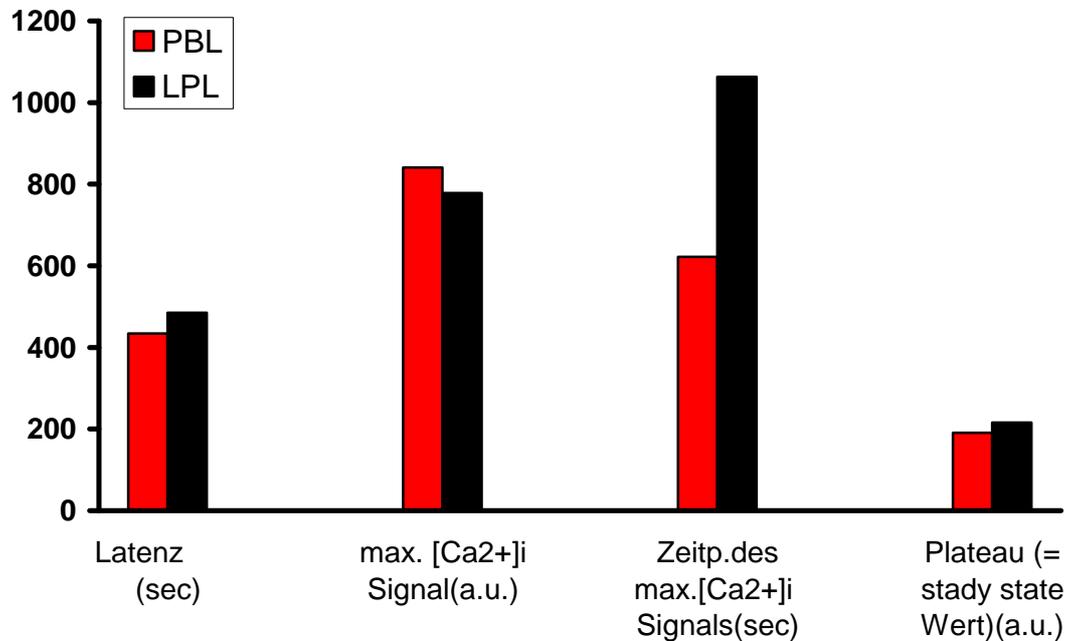


Abb.3.13. Vergleich der Blut- und Darmzellen der Balb/cAnCrl-Maus, Latenz= Zeit zwischen der Stimulation mit Antikörpern CD3⁺/CD28⁺ und Beginn der Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$, max $[Ca^{2+}]_i$ Signal = Mittelwert der höchsten $[Ca^{2+}]_i$, Zeitp. des max $[Ca^{2+}]_i$ Signals = Mittelwert des Zeitpunktes des höchsten $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation, Plateau (steady state Wert)= $[Ca^{2+}]_i$ 1000 sec nach Stimulation,

Als weitere physiologische Stimulation der Darmlymphozyten wurde eine Stimulation mit OKT3 durchgeführt. Die folgende Abbildung 3.14. zeigt die Ergebnisse dieser Stimulation mit Darmzellen der Balb/cAnCrl-Maus. Bei diesen Versuchen reagierten 25 % der Darm-T-Lymphozyten, während 75 % der Zellen nicht reagierten. Bei der OKT3-Stimulation reagierten also weniger Zellen als bei der Antikörperstimulation Anti-CD3⁺/Anti-CD28⁺, aber deutlich mehr als in den Kontrollversuchen, in denen lediglich 12 % der ausgewerteten Zellen reagierten.

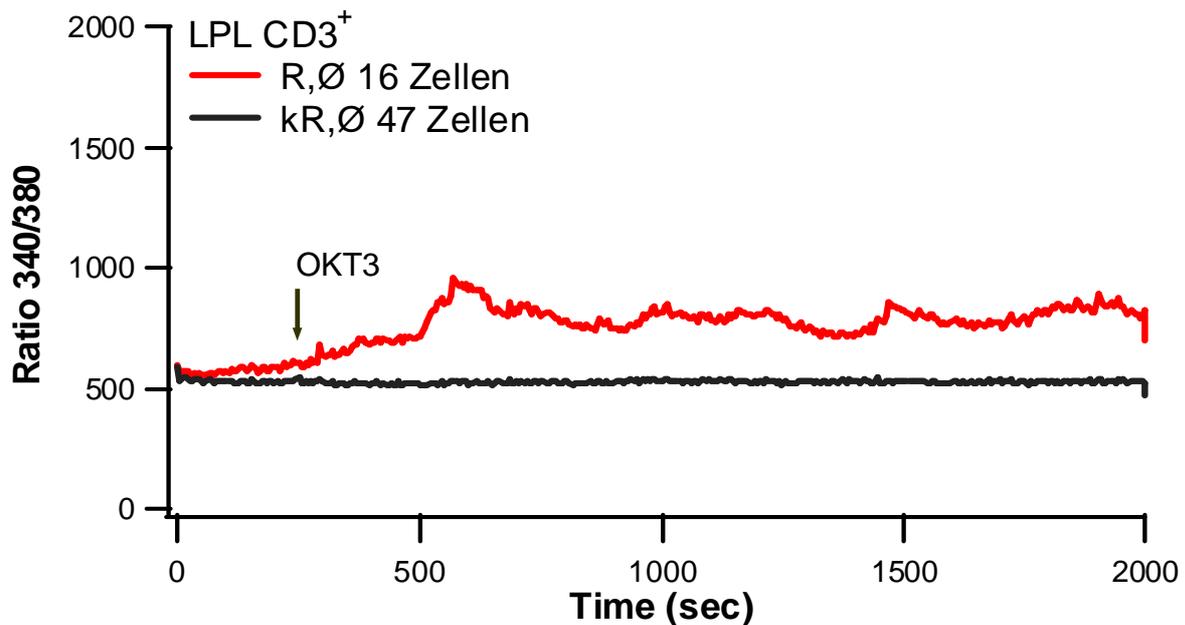


Abb. 3.14. OKT3-Stimulation der CD3⁺-LPLs von der Balb/cAnCrI-Maus in 1 mM Ca²⁺-Lösung, nach 250 sec Stimulation mit 1 mM Ca²⁺-Lösung mit 4 µg/ml OKT3.

Insgesamt zeigen die Versuche mit Antikörperstimulation, dass weniger LPLs als PBLs durch die Antikörperstimulation Anti-CD3⁺/Anti-CD28⁺ reagieren (Abb. 3.12.), was auch konsistent mit Schwarz ist [Schwarz et al., 2004]. Auch in diesem Fall ist die Maus ein mögliches Modell, um die unterschiedlichen [Ca²⁺]_i-Signale zwischen LPL und PBL zu untersuchen.

3.6. Vergleich von [Ca²⁺]_i in Blut- und Darmlymphozyten von verschiedenen TRPC-Knock-out-Mäusen nach Antikörperstimulation

Die CRAC-Kanäle spielen bei der Generierung der Kalziumsignale eine entscheidende Rolle, allerdings ist der exakte molekulare Aufbau der Kanäle noch nicht vollständig aufgeklärt. Man geht zur Zeit davon aus, dass TRP-Proteine am Aufbau der CRAC-Kanäle beteiligt sind. Als Kandidatengene kommen unter anderem die Proteine der TRPC-Familie in Frage [Freichel, M. et al., 2005]. Durch die Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe M. Freichel, war die Möglichkeit gegeben, aus TRPC-Knock-out Mäusen Lymphozyten zu isolieren. Dadurch konnten Experimente durchgeführt werden, die der Frage nachgehen, ob das Ausschalten von verschiedenen TRPC-Proteinen Unterschiede in den gemessenen [Ca²⁺]_i von

Lymphozyten gegenüber dem entsprechenden Wildtyp in diesem Versuchsaufbau erkennen lässt. Dazu wurden die Lymphozyten der verschiedenen Knock-out Mäuse und dem entsprechenden Wildtyp in Thapsigarginexperimenten untersucht. Auch die Möglichkeit, die Zellen mit Antikörpern physiologisch zu stimulieren, wurde in dieser Arbeit genutzt, um eine OKT3-Stimulationen der Lymphozyten bei verschiedenen Mausstämmen zu testen.

In den folgenden Abbildungen sind der Vergleich von LPLs aus TRPC6(-/-)-Knock-out Mäusen mit dem Wildtyp (WT) 1295 VJ und ein Beispiel für 3 verschiedene CD3⁺-LPLs, die auf die OKT3- Stimulation reagieren, dargestellt.

Die Stimulation der Zellen durch OKT3 bei den Zellen der TRPC6(-/-)-Knock-out Maus, ebenso bei dem entsprechenden Wildtyp 1295VJ lässt sich durch einen Anstieg des [Ca²⁺]_i, der in der grünen und roten Kurve der Abb. 3.15. dargestellt ist, ablesen.

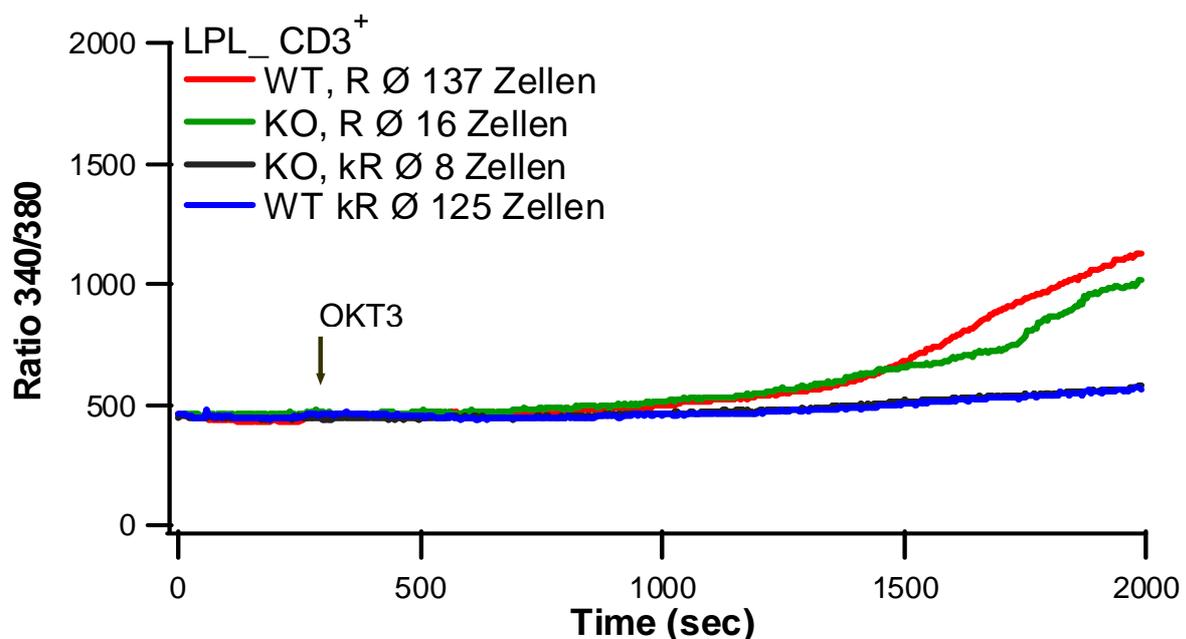


Abb. 3.15. Vergleich der LPLs von TRPC6(-/-)-Knock-out Mäusen mit dem Wildtyp (WT) 1295 VJ in 1 mM Ca²⁺-Lösung, Stimulation nach 250 sec mit 1 mM Ca²⁺-Lösung mit 4 µg/ml OKT3.

Die Darmlymphozyten reagieren auf die Stimulation durch OKT3 unterschiedlich, was schon in der Abb.3.11. für die Antikörperstimulation durch Anti-CD3⁺/Anti-CD28⁺ gezeigt werden konnte. Die Abb. 3.16 zeigt 3 Beispiele für die unterschiedlichen [Ca²⁺]_i-Signale nach OKT3 Stimulation.

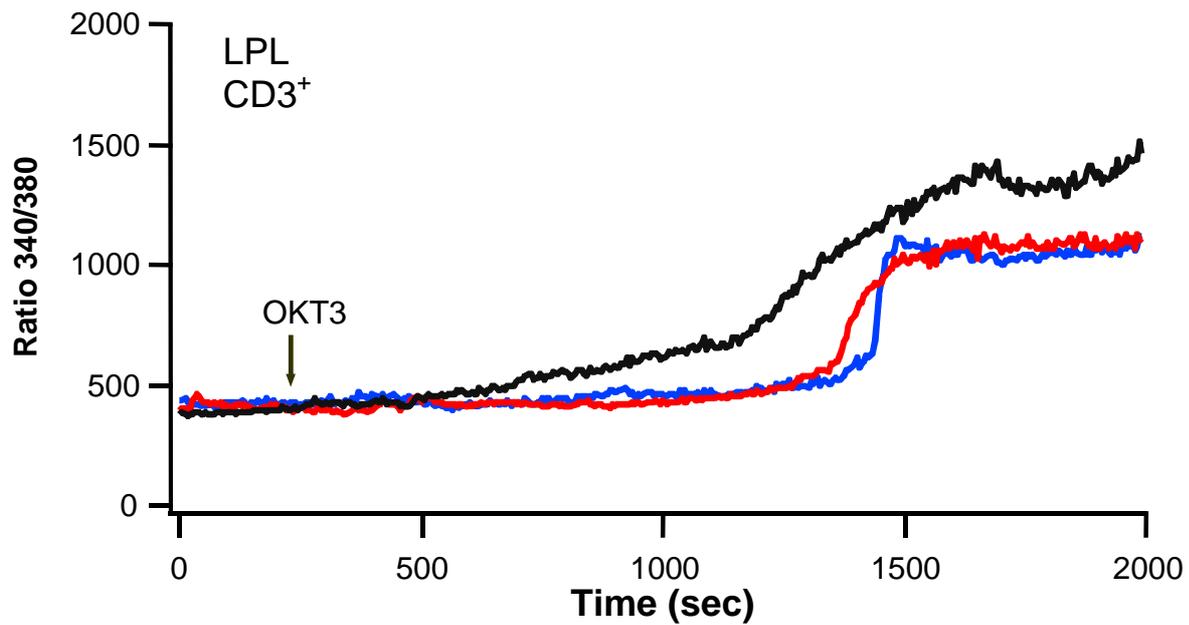


Abb. 3.16. Beispiel für 3 unterschiedlich reagierende CD3⁺- LPL aus TRPC6(-/-)-Knock-out Mäusen, die in Abb.3.15 n der grünen Kurve gewertet wurden

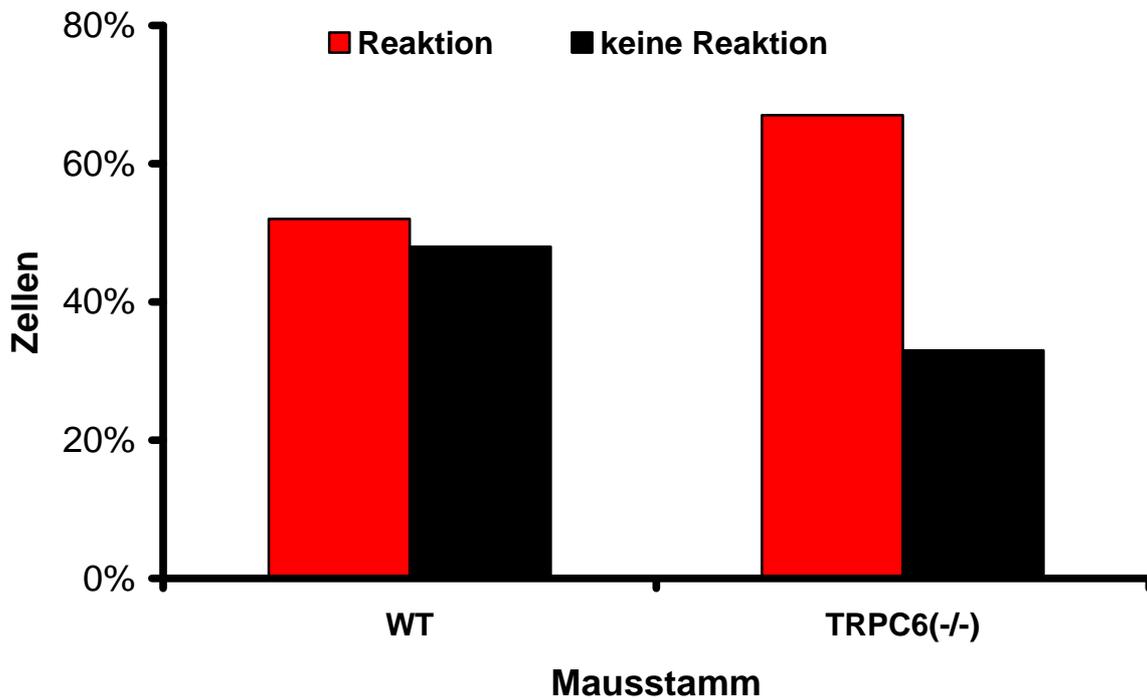


Abb. 3.17. Vergleich der Reaktionen nach OKT3-Stimulation der CD3⁺ positiven Zellen aus dem Darm von WT= Wildtyp1295VJ und TRPC6(-/-)-Knock-out Mäusen, R = Reaktion, kR = keine Reaktion

Es reagierten bei den TRPC6(-/-)-Knock-out Mäusen (67%) und dem Wildtyp 1295VJ (52%) prozentual mehr Zellen auf die OKT3-Stimulation als bei den Balb/cAnCrl-Mäusen (25%) (siehe Abb.3.14). Bei den Knock-out-Mäusen reagierten die CD3⁺-LPL auf die Stimulation durch OKT3 prozentual besser, aber es konnten nur wenige Zellen von den TRPC6(-/-)-Knock out Mäusen ausgewertet werden. Die Isolation der Darmzellen von den TRPC6(-/-)-Knock-out Mäusen ist noch nicht so weit optimiert, dass viele Zellen isoliert und gemessen werden können. Deshalb musste auf eine statistische Auswertung verzichtet werden und aus diesem Ergebnis ist kein direkter Einfluss auf das [Ca²⁺]_i der Lymphozyten erkennbar, der durch das Ausschalten des TRPC6-Protein entstehen könnte.

Für die weiteren Versuche mit Lymphozyten aus dem Darm und dem Blut wurden Zellen von den TRPC4C6(-/-)²- Knock-out Mäusen und den TRPC1C4C6(-/-)³- Knock-out Mäusen isoliert.

3.6. Vergleich von [Ca²⁺]_i in Blut- und Darmlymphozyten von verschiedenen TRPC-Knock-out Mäusen nach Zugabe von unterschiedlichen Ca²⁺-Lösungen mit Thapsigargin

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Thapsigarginexperimente der Zellen von der TRPC4C6 (-/-)²-Knock-out Maus und dem Wildtyp 129 B6F1. Es gestaltete sich sehr schwierig, aus TRPC-Knock-out Mäusen die Lymphozyten aus dem Darm zu isolieren und auf dem Deckglas zu fixieren. Deshalb konnten bei den Experimenten von den Lymphozyten aus dem Darm nur wenige CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten fixiert und [Ca²⁺]_i-Daten aufgezeichnet werden. In den Abbildungen 3.18. und 3.20. der LPLs wurden die [Ca²⁺]_i-Daten aus den CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten als [Ca²⁺]_i-Daten aus CD3⁺-Lymphozyten zusammengefasst.

Ebenso wie bei der Balb/cAnCrl-Maus, liegen die [Ca²⁺]_i-Signale der CD3⁺-Lymphozyten aus dem Darm der TRPC4C6(-/-)²- Knock-out Maus und des Wildtyps 129 B6F1 über den [Ca²⁺]_i-Daten der CD19⁺-Lymphozyten (siehe Abb. 3.18.).

Der Abstand der Kurven im Plateaubereich von den CD19⁺-PBLs zu den CD4⁺- und CD8⁺-PBLs ist größer als der Abstand der Kurven der LPLs in diesem Bereich (Vergleiche Abb.3.18. und 3.19.). Allerdings konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den [Ca²⁺]_i-Signalen der Knock-out Mäusen und dem Wildtyp festgestellt werden.

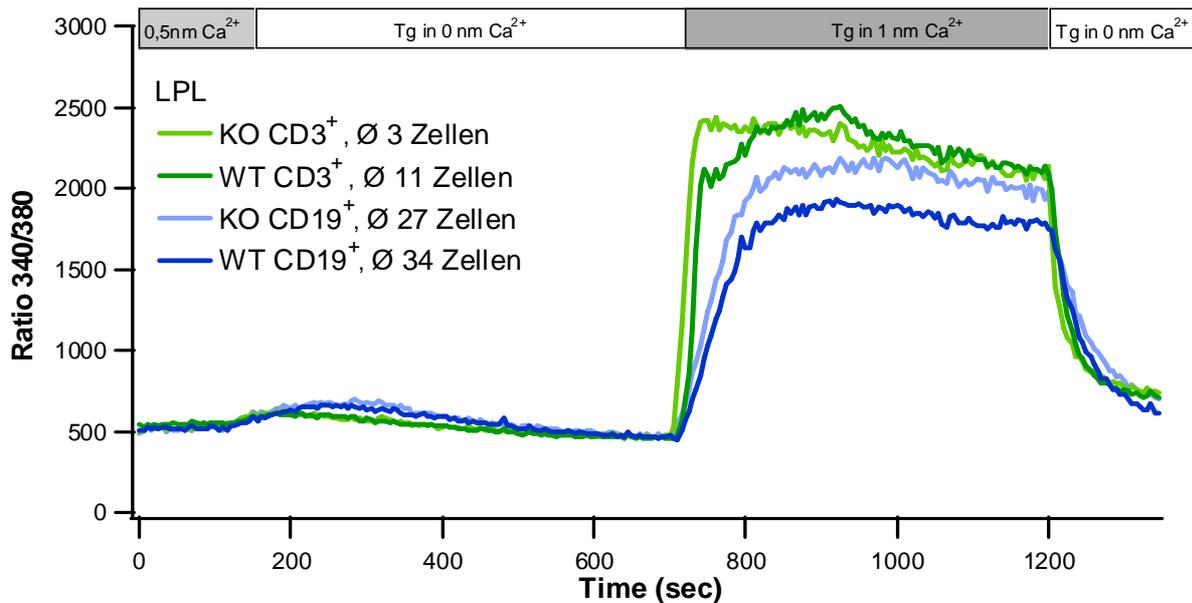


Abb.3.18. Vergleich der LPLs der TRPC4C6 (-/-)²- Knock-out Maus (KO) mit dem Wildtyp 129 B6F1 (WT) mit Thapsigargin in 0 mM Ca²⁺-Lösung mit EGTA und in 1 mM Ca²⁺-Lösung

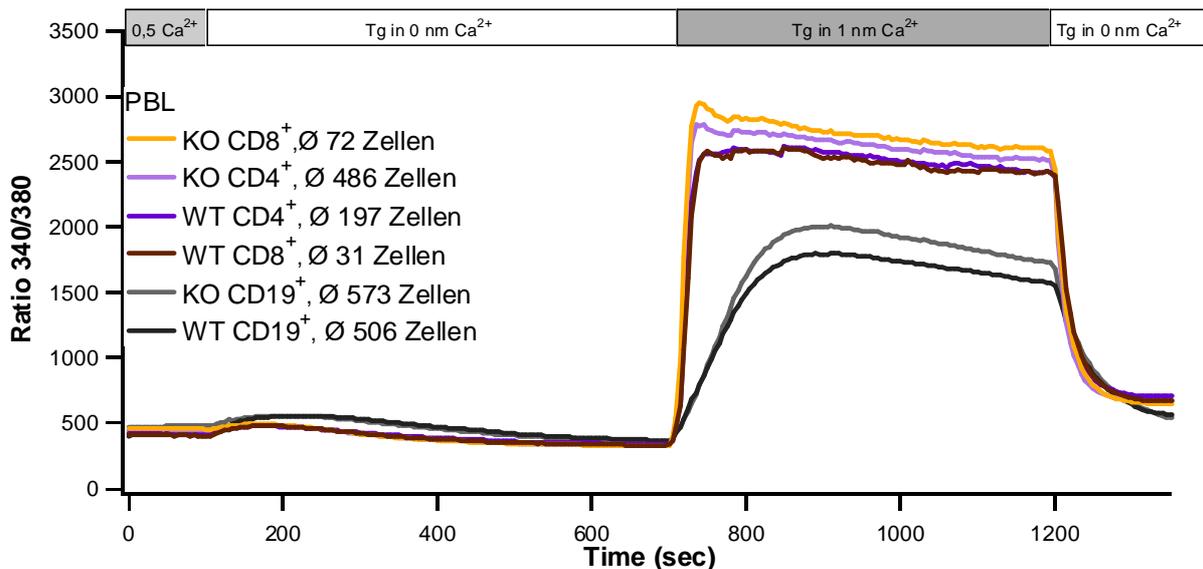


Abb.3.19. Vergleich der PBLs der TRPC4C6 (-/-)²- Knock-out Maus (KO) mit dem Wildtyp 129 B6 F1 (WT) mit Thapsigargin in 0 mM Ca²⁺-Lösung mit EGTA und in 1 mM Ca²⁺-Lösung

Betrachtet man die folgende Abbildung, die die Ergebnisse von je 3 Thapsigarginexperimenten mit TRPC1C4C6(-/-)³-Kock-out Mäusen und dem Wildtyp 1295 VJ zeigt, sind die [Ca²⁺]_i-Werte der CD3⁺-Zellen im Plateaubereich nicht mehr von den CD19⁺-Zellen zu unterscheiden. Die Ursache könnte darin liegen, dass bei der TRPC1C4C6(-/-)³-Knock-out Maus trotz identischer Versuchsdurchführung bei

der Isolation der Darmzellen wesentlich geringere Zellmengen isoliert wurden. In Folge dessen war die eingesetzte Zellmenge geringer und es konnten nur wenige Zellen ausgewertet werden.

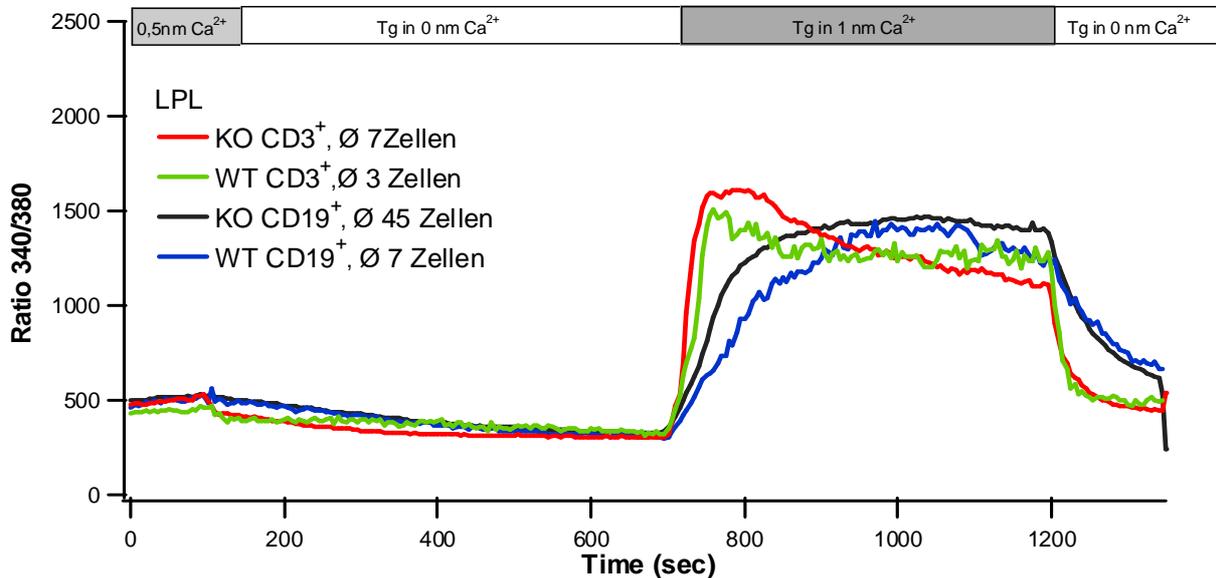


Abb.3.20. Vergleich der LPLs der TRPC1C4C6 (-/-)³- Knock-out Maus (KO) mit dem Wildtyp 1295VJ (WT) mit Thapsigargin in 0 mM Ca²⁺-Lösung mit EGTA und in 1 mM Ca²⁺-Lösung.

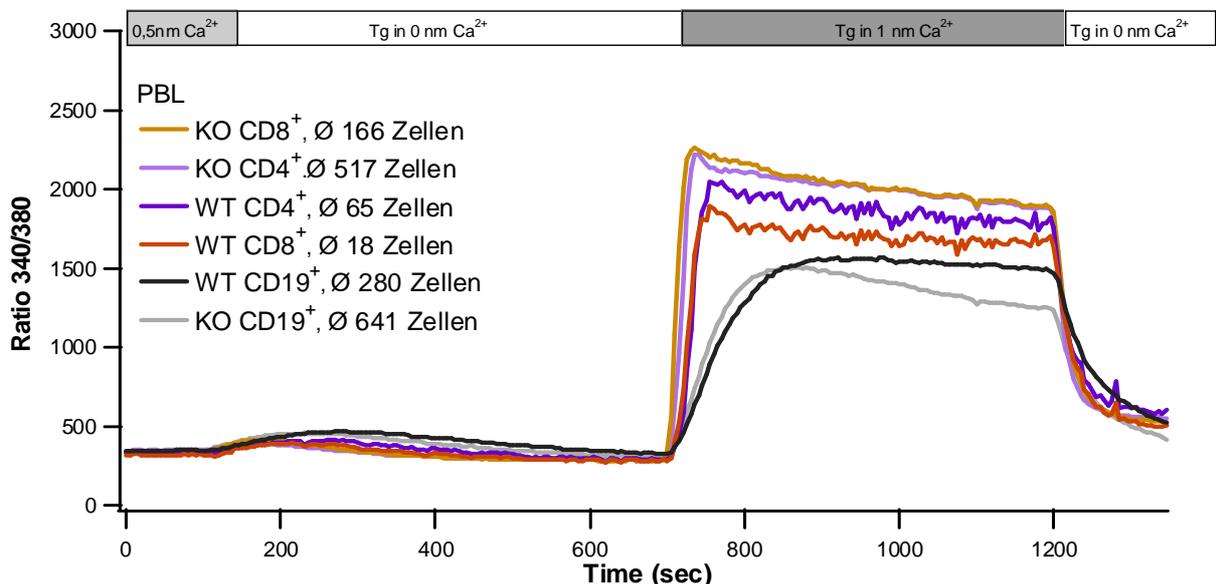


Abb.3.21. Vergleich der PBLs von der TRPC1C4C6 (-/-)³- Knock-out Maus (KO) mit dem Wildtyp 1295 VJ (WT) mit Thapsigargin in 0 mM Ca²⁺-Lösung mit EGTA und in 1 mM Ca²⁺-Lösung

Der Vergleich von Blut- und Darmzellen der TRPC4C6(-/-)²- Knock-out Maus und der TRPC1C4C6(-/-)³- Knock-out Maus zeigt, dass sich die CD3⁺-Zellen im Vergleich zu den CD19⁺-Zellen so verhalten, wie die Lymphozyten der Balb/cAnCr-Mäuse.

Lediglich der Abstand des Plateaus des $[Ca^{2+}]_i$ zwischen den CD3⁺- und CD19⁺-Zellen nimmt ab.

Die Unterschiede zwischen den Wildtyp-Mäusen und den TRPC-Knock-out Mäusen sind nicht signifikant. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass das Ausschalten von verschiedenen TRPC-Proteine keinen Einfluss auf die Höhe der $[Ca^{2+}]_i$ in den Lymphozyten bei diesem Versuchsaufbau hat. Es konnte aber gezeigt werden, dass Lymphozyten aus dem Darm der verschiedenen TRPC-Knock-out Mäusen isoliert werden können. Die zur Verfügung stehenden Tiere waren über das geeignete Alter von 8 bis 12 Wochen hinaus, was schon bei der Balb/cAnCr-Maus die Ausbeute an Lymphozyten senkte. Mit TRPC-Knock-out Mäusen von 8 bis 12 Wochen könnte ebenso wie bei der Balb/cAnCrI-Maus eine höhere Ausbeute an Lymphozyten erreicht werden werden.

3.7. Einfluss einer induzierten Darm-Kolitis auf die Kalziumsignale

Neben den Untersuchungen der Zellen aus verschiedenen TRPC-Knock out-Mäusen und dem entsprechenden Wildtyp sollten auch Tiere mit induzierter Kolitis untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Modell der experimentell induzierten Kolitis benutzt, um ein Modell zur Untersuchung der potentiellen Funktion von $[Ca^{2+}]_i$ der T-Zellen bei CED zu etablieren. Dazu wurde ein Protokoll verwendet, das den Tieren über 7-9 Tagen gleichmäßig Dextran sulfate sodium (DSS) zuführt. Durch Haemoculttests wurde sichergestellt, dass die Tiere zum Zeitpunkt der Experimente erkrankt waren. Danach wurde den Tieren das Blut und der Darm, wie in Kapitel Material und Methoden beschrieben, entnommen und die Lymphozyten isoliert.

Die ersten Ergebnisse der Blutlymphozyten bei Mäusen mit induzierter Kolitis zeigen, dass $[Ca^{2+}]_i$ in den Lymphozyten der Kolitistiere nach Stimulation höher ist als in den Zellen aus Kontrolltieren. Die Experimente mit Darmzellen haben sich als sehr schwierig herausgestellt, da die Zellpräparation aufgrund der Kolitis erschwert war und viele der isolierten Zellen nicht gut hafteten. Aus diesem Grund konnten nur Ergebnisse von PBLs von bislang zwei Balb/cAnCrI-Mäusen gewonnen werden. Diese Experimente müssen reproduziert werden. Insbesondere ist der initiale Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ der CD3⁺-Zellen aus dem Blut der Tiere mit Kolitis ungewöhnlich langsam (Abb. 3.22.)

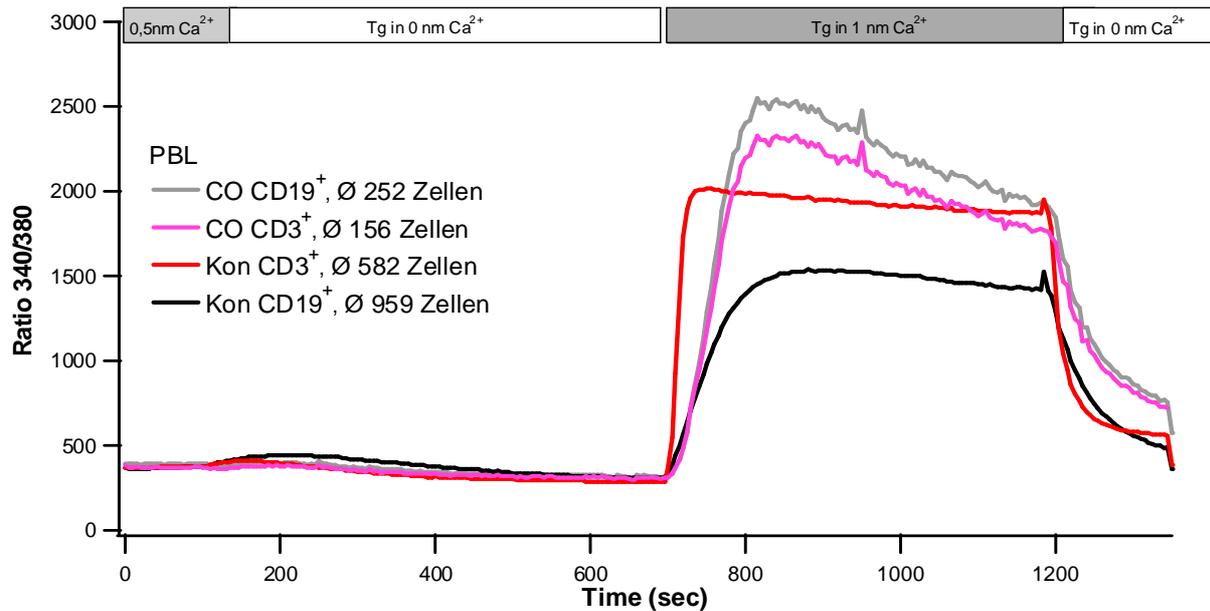


Abb. 3.22. Vergleich der PBLs von Balb/cAnCrI-Mäusen, Kontrolltiere (Kon) und Tiere mit induzierter Kolitis (CO), mit Thapsigargin in 0 mM Ca^{2+} -Lösung mit EGTA und in 1 mM Ca^{2+} -Lösung.

Für die nächsten Versuche wurden die C57BL6-Mäuse eingesetzt, da bei diesem Tierstamm die Tiere schneller die Symptome der Kolitis ausbilden. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Thapsigarginexperimente mit Lymphozyten der C57BL6-Mäuse aus dem Blut und dem Darm. Bei diesen Experimenten wurden Tiere mit induzierter Kolitis und Tiere ohne Kolitis, hier als Kontrolltiere bezeichnet, verglichen. Die Präparation der LPLs gestaltete sich selbst bei den Kontrolltieren besonders schwer. So gelang es bisher nicht, mehr als 120 000 LPLs von einer C57BL6-Maus zu isolieren, wohingegen bei der Balb/cAnCrI-Maus in einem Experiment bis zu 450 000 LPLs isoliert werden konnten.

Aus dem Kolon der an Kolitis erkrankter Tiere gelang es bisher noch nicht, CD3^+ -Zellen zu isolieren und zu messen. Durch die Entzündung des Darms ist das Gewebe verändert und für die weiteren Isolationsversuche sind weitere Optimierungen nötig, z.B. eine Verlängerung der Kollagenase-Inkubationszeit, um das Gewebe stärker aufzulösen und mehr CD3^+ -Zellen zu isolieren.

Die folgende Abbildung zeigt den Vergleich der Blut-T-Lymphozyten von an Kolitis erkrankten und gesunden C57BL6-Mäusen.

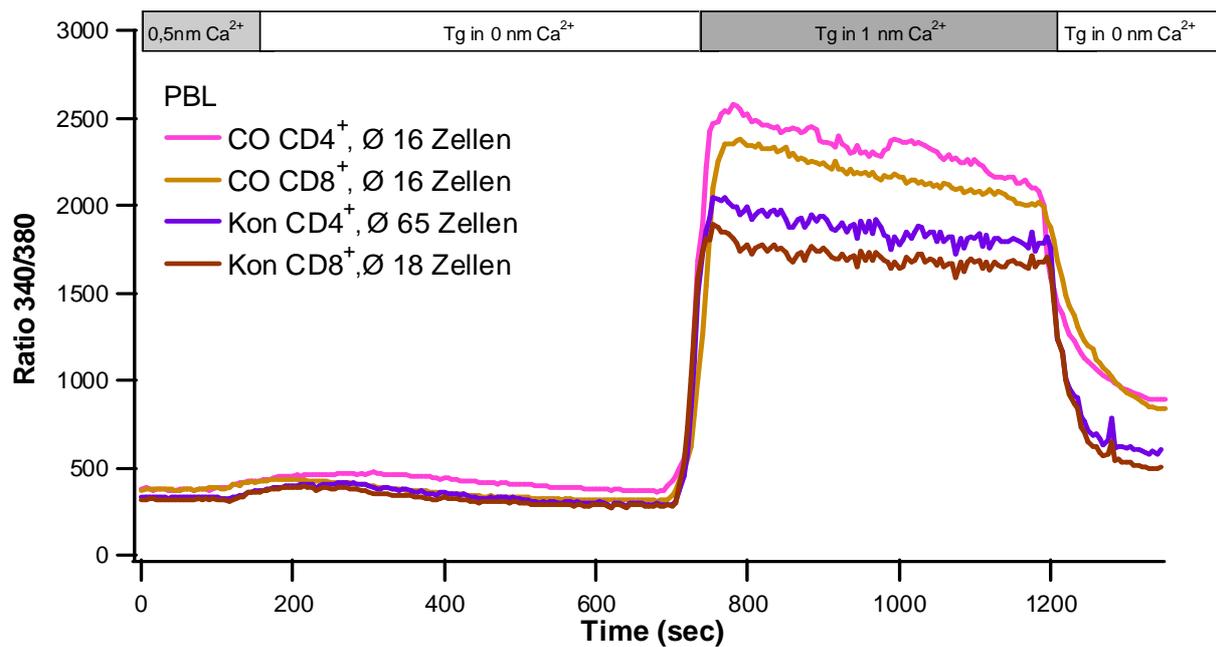


Abb.3.23. Vergleich der PBLs von C57BL6-Mäusen, Kontrolltiere (Kon) und Tiere mit induzierter Kolitis (CO), mit Thapsigargin in 0 mM Ca²⁺-Lösung und in 1 mM Ca²⁺-Lösung

Es gelang allerdings CD19⁺-Lymphozyten aus entzündetem Darm zu isolieren. Die Abb. 3.24. zeigt die ersten Ergebnisse mit diesen CD19⁺-LPLs aus dem Darm und CD19⁺-Blutlymphozyten.

Der Vergleich der Ergebnisse (Abb. 3.24.) von den Blut und Darmzellen der C57BL6-Mäuse liefert folgendes Ergebnis. Während die verschiedenen [Ca²⁺]_i im Plateaubereich von den CD3⁺-PBLs der Mäuse mit Kolitis über den der Kontrolltiere liegen, zeigt der Vergleich der CD19⁺-Zellen ein anderes Ergebnis. Die durchschnittlichen [Ca²⁺]_i-Signale aus den CD19⁺-LPLs der an Kolitis erkrankten Tieren liegen 800 Sekunden nach Experimentstart über den [Ca²⁺]_i-Signalen der Kontrolltiere. Aber bei den CD19⁺-PBLs der Kontrolltiere wurden höhere [Ca²⁺]_i-Werte im Plateau gemessen als bei den CD19⁺-PBLs der erkrankten Tiere.

Aus dem Dünndarm einer an induzierter Kolitis erkrankten Maus konnte bislang ein Versuch mit CD3⁺-Zellen durchgeführt werden, die mit der Antikörperstimulation Anti-CD28⁺/Anti-CD3⁺ stimuliert wurden. Die Zellen aus dem Dünndarm hafteten leider sehr schlecht auf den beschichteten Deckgläsern und deshalb konnten nur wenige Zellen gemessen werden (Abb. 3.25.).

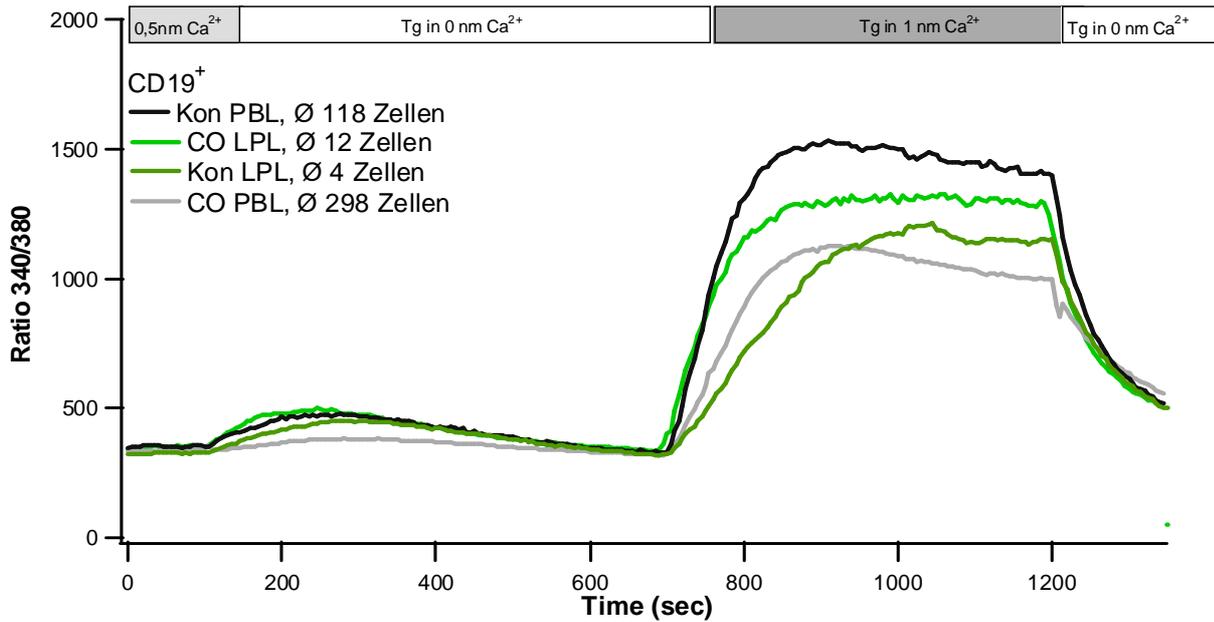


Abb. 3.24. Vergleich der CD19⁺-Zellen von PBL und LPL aus C57BL6-Mäusen, Kontrolltiere (Kon) und Tiere mit induzierter Kolitis (CO) mit Thapsigargin in 0 mM Ca²⁺-Lösung mit EGTA und in 1 mM Ca²⁺-Lösung.

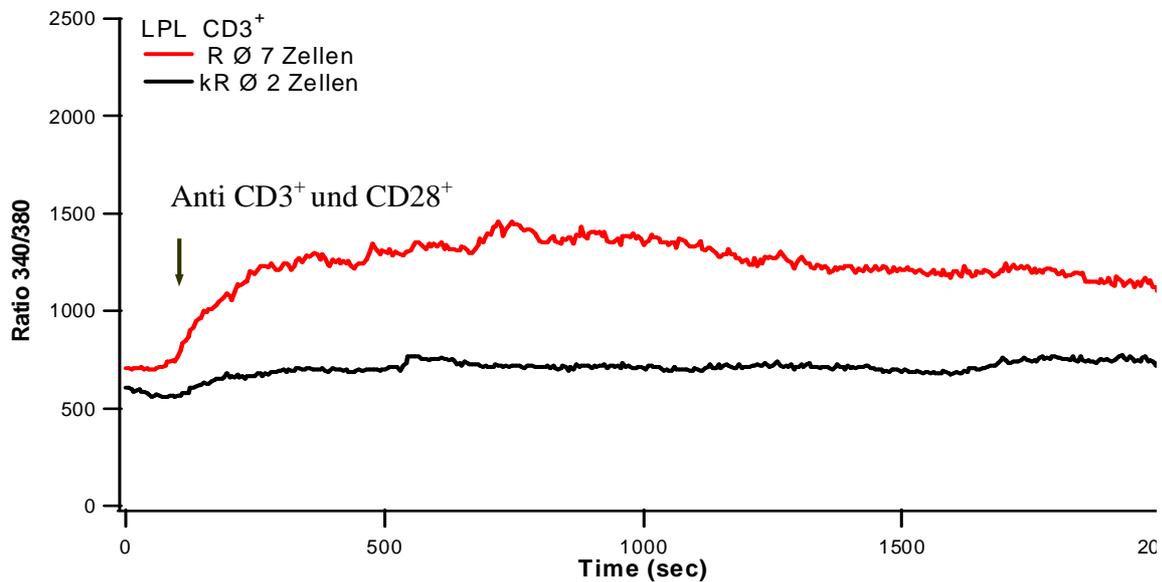


Abb. 3.25. Beispiel für ein Experiment von LPL-CD3⁺-Zellen aus dem Dünndarm der Balb/cAnCrI- Maus mit induzierter Kolitis in 1 mM Ca²⁺-Lösung und nach 100 sec. Stimulation mit 1 mM Ca²⁺-Lösung mit je 5 µg/ml Anti-CD3⁺ und Anti-CD28.

Sollten sich die Ergebnisse mit den CD3⁺-Zellen der an Kolitis erkrankten Maus reproduzieren lassen, würden sie die Ergebnisse von humanen Zellen bestätigen

und zeigen, dass auch bei der Maus $[Ca^{2+}]_i$ in den Lymphozyten des Darms eines erkrankten Tieres erhöht sind und es reagieren prozentual mehr Zellen auf den gewählten Stimulus (Abb. 3.9., 3.25). Bereits in den Arbeiten von Tutsch und Schwarz [Schwarz, A. et al. 2004, Tutsch, E. et al., 2004] wurde auf ein erhöhtes $[Ca^{2+}]_i$ in den Lymphozyten der Darmzellen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmkrankheiten hingewiesen. Das würde bedeuten, dass dieses Kolitismodell der Maus ein gutes Modell für die Untersuchung der Rolle von $[Ca^{2+}]_i$ bei der pathologischen Aktivierung der Lymphozyten bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist.

4. Diskussion

4.1. Lymphozyten aus dem Darm

Ausgehend von der Arbeit von Schwarz [Schwarz et. al., 2004], der die intrazelluläre Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ für isolierte humane Lymphozyten untersuchte, wurde in dieser Dissertation der Frage nachgegangen, ob die isolierten murinen Lymphozyten als Modell für die Erforschung von $[Ca^{2+}]_i$ und der Hyporeaktivität verwendet werden können.

Das Darmsystem bildet ein Mikroenviroment, in das die T- und B- Zellen des Immunsystems eingebettet sind. Die Isolation der Zellen bedeutet einerseits gleichzeitig eine Zerstörung der natürlichen Umgebung dieser Zellen. Andererseits kann man Untersuchungen an einzelnen Zellen nur durchführen, wie zum Beispiel die Analyse der Veränderungen des $[Ca^{2+}]_i$ einer bestimmten Zelle, wenn die Signale aus einzelnen Zellen und nicht aus Zellen, die im Gewebe liegen, gewonnen werden können. Von Tutsch wurden Lymphozyten im intakten Gewebe mit Hilfe der 2 Photonenmikroskopie hinsichtlich des $[Ca^{2+}]_i$ untersucht. Da die Daten von Tutsch [Tutsch.E. et al. 2004], die von humanen Lymphozyten im Gewebeverband gewonnen wurden, gut mit den Daten von Schwarz [Schwarz, A. et al, 2004] aus isolierten humanen Lymphozyten korrelieren, scheint die Zerstörung des gewohnten Umfeldes der Zellen keinen unmittelbaren Einfluss auf die $[Ca^{2+}]_i$ -Signale zu haben. Dass ein langanhaltender Einfluss des Mikroenviromentes auf die Zellen durchaus vorstellbar ist, wurde von Mowat [Mowat, A.M. et al. 2003] verdeutlicht.

Ausgehend von den Ergebnissen für humane Zellen von Schwarz und Tutsch [Schwarz et. al., 2004, Tutsch.E. et al., 2004], wurde in dieser Dissertation der Frage nachgegangen, ob sich die Ergebnisse, die sich aus isolierten Lymphozyten aus der Balb/cAnCrI-Maus erfassen lassen, sich von den humanen Daten unterscheiden.

Interessant ist die Frage, warum die LPL eine niedrigere $[Ca^{2+}]_i$ nach Zugabe von Thapsigargin aufweisen als PBL. Sehr deutlich sind die Ergebnisse für die unterschiedliche Höhe des Kalziumsignals für PBL- und LPL-Zellen bei Balb/cAnCrI-Mäusen, die im Kapitel Ergebnisse dieser Dissertation dargestellt sind. Dies entspricht den Ergebnissen von Schwarz [Schwarz, A. et al, 2004], der bei humanen LPLs aus gesunden Spendern eine niedrigere $[Ca^{2+}]_i$ nach Zugabe von Thapsigargin festgestellt hat als bei humanen PBL.

4.2. Isolation der Lymphozyten aus dem Darm

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode in der Arbeitsgruppe etabliert, die es ermöglicht, aus dem Darm der Maus die Lymphozyten zu isolieren. Die Probleme dieser Isolation sind vielfältig. Die Lamina Propria Lymphozyten befinden sich im Organismus in einer intakten Gewebsschicht, die bei der Isolation so entfernt werden muss, dass die Zellen nicht zerstört werden. Bei Tieren, die älter als 16 Wochen waren, zeigte sich ein Fettpolster, das um den Darm herum ausgebildet war und erst entfernt werden musste. Bei diesen Tieren stellte zusätzlich der Schleim, der als Schutzschicht im Lumen des Darmes gebildet wird, auch während der ganzen Präparation ein weiteres Problem dar. Die Lymphozyten verteilten sich während der Präparation im Schleim, waren somit gegen die eingesetzten Lösungen isoliert, nahmen fast kein Fura2/AM auf und hafteten nicht mehr auf dem Deckglas. Auch der Versuch, den Schleim gegen Ende der Präparation mit DTT zu lösen und die Zellen zu messen, schlug fehl, da die Zellen keine Reaktion auf eingesetzte Thapsigaginlösungen zeigten. Es zeigte sich während des Optimierens des Versuchsaufbaus, dass Tiere zwischen 8 und 12 Wochen das ideale Alter hatten, da bei diesen Tieren die Fettpolster um den Darm herum noch nicht ausgebildet waren, so dass während der Präparation das Entfernen dieser Fettanteile entfiel.

Durch eine zusätzliche Inkubationszeit der Darmstücke in HBSS für 1 Stunde und die Optimierung der Inkubationszeiten der eingesetzten Lösungen wurden aus den Balb/cAnCrI-Mäusen mehr Zellen (> 450 000 Zellen) als zu Beginn (30 000 Zellen) isoliert, und bei den Messungen zeigten diese Zellen ein niedrigeres Ruhekalzium als die Zellen aus den ersten Versuchen.

Da bei der Isolation B- und T-Lymphozyten aus dem Blut und Darm isoliert wurden, konnte als weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit die Messung von $[Ca^{2+}]_i$ -Signalen aus verschiedenen Lymphozyten aus dem Darm und dem Blut der Maus verfolgt werden. Die im Kapitel Ergebnisse dargestellten Daten zeigen nach der Optimierung der Präparation aus den Balb/cAnCrI-Mäusen kein unterschiedliches Ruhekalzium von Blut- und Darmlymphozyten zu Beginn des Experimentes. Das entspricht den Ergebnissen die in der Arbeitsgruppe Hoth schon für humane Lymphozyten gemacht wurden [Tutsch, E. et al., 2004, Schwarz, A. et al, 2004]. Dies bezüglich konnten die Ergebnisse, dass die intrazellulären Ruhekalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ in T-LPL höher als die in T-PBL, die von de Maria mittels FACS- Analyse gemacht wurden, auch für

die Maus nicht bestätigt werden [De Maria, R. et al.1993]. Bei der FACS- Analyse müssen die Antikörper schon vor Experimentstart zugegeben werden, was unter Umständen zu einer Aktivierung führen könnte. Ein entscheidender Vorteil bei den in dieser Arbeit erhobenen Daten ist die Möglichkeit, die Zellen erst im Anschluss an die Versuche mit Hilfe von Antikörpern zu identifizieren.

Ein erhöhter Kalziumexport ist eine der Möglichkeiten, die das $[Ca^{2+}]_i$ -Signal beeinflussen können. In der vorliegenden Arbeit wurden bei allen Thapsigarginexperimenten nach 1200 Sekunden nach dem Start ein Lösungswechsel zu kalziumfreier Lösung durchgeführt, um diesen Regulationsmechanismus der Zellen zu untersuchen. Dabei konnten in unseren Versuchen keine wesentlichen Unterschiede zwischen dem Verhalten der PBLs und der LPLs festgestellt werden, da die $[Ca^{2+}]_i$ -Signale in unseren Experimenten etwa gleich schnell abfallen. Aus diesem Ergebniss kann man feststellen, dass der Kalziumexport in beiden Zelltypen etwa gleich hoch ist.

Eine weitere Beobachtung konnte bei der vorliegenden Arbeit in den Thapsigarginexperimenten gemacht werden. Bei den B-Zellen konnte ein verzögerter Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale zu dem Plateau in der 1 mM Ca^{2+} -Lösung festgestellt werden. Die $[Ca^{2+}]_i$ -Signale der B-Zellen erreichten auch nicht die gleiche Höhe im Plateaubereich wie T-Zellen. Dies entspricht den Beobachtungen von Feldhahn [Feldhahn, N. et al., 2002], der bei der Stimulation von B-Zellen über den BCR, einen verzögerten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale bei B-Gedächtniszellen festgestellt hat.

Da in dieser Dissertation der Frage nachgegangen werden sollte, ob murine Lymphozyten als Modellorganismus zur Untersuchung für $[Ca^{2+}]_i$ -Signale verwendet werden können, und gezeigt werden konnte, dass die PBL und LPL kein unterschiedliches Ruhekalzium bei Experimentstart aufweisen, wurde nun der Frage nachgegangen, ob experimentebedingte exogen Faktoren den Ruhekalziumwert über den Zeitraum von 2000 Sekunden beeinflussen.

4.3. Vergleich von murinen und humanen $[Ca^{2+}]_i$ -Signale aus Lymphozyten

Um die $[Ca^{2+}]_i$ -Signale von Zellen aufzeichnen zu können, wurden die isolierten Zellen auf einem Deckglas fixiert und in den Strahlengang eines Mikroskopes eingebracht. Nun sollte in Kontrollversuchen der Einfluß der verwendeten zwei

unterschiedlichen Anregungswellenlängen und der Einfluß des Lösungswechsels auf die $[Ca^{2+}]_i$ -Signale getestet werden und der Frage nachgegangen werden, ob die $[Ca^{2+}]_i$ -Signale auf der Höhe des Ruhekalziumwertes konstant bleiben, wenn die Zellen nicht zusätzlich durch weitere Substanzen stimuliert werden.

In den im Kapitel Ergebnisse abgebildeten Kontrollversuchen, in denen nur 1 mM Kalziumlösungen zu den Zellen gegeben wurde, konnte gezeigt werden, dass die Zellen nach einer, in einer Reihe von Experimenten ermittelten Ruhezeit von 2 bzw. 12 Stunden, keinen Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ während der gewählten Experimentlänge von 2000 sec aufzeigten. Somit ist die Grundlage geschaffen, an den, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, isolierten Lymphozyten Experimente durchzuführen, um diese Ergebnisse mit den Ergebnissen von humanen Lymphozyten, die in der Arbeit von Schwarz [Schwarz, A. et al.,2004] aufgezeichnet wurden, zu vergleichen.

In der Arbeit von Schwarz [Schwarz, A. et al.,2004] wurden $[Ca^{2+}]_i$ von isolierten T-Lymphozyten aus der Mukosa des Menschen aufgezeichnet. Bei den Experimenten mit Thapsigargin konnte von Schwarz [Schwarz, A. et al.,2004] ein typischer Kurvenverlauf festgestellt werden. Die aufgezeichnete Kurve beginnt damit, dass die Zellen in 1 mM Ca^{2+} -Lösung eingebettet sind, wodurch die Höhe des Ruhekalziums der Zellen bestimmt werden kann. Nach Zugabe von 0 mM Ca^{2+} -Lösung mit EGTA + Thapsigargin kommt es zu einer passiven Speicherentleerung, da Thapsigargin die SERCA Pumpen blockiert. Dies wird sichtbar in einer kleinen Erhöhung der aufgezeichneten Experimentkurve, die nach kurzer Zeit wieder auf die Höhe des Ausgangswertes der Kurve zurückgeht. Werden zu den Zellen 1 mM Ca^{2+} -Lösung gegeben, folgt ein steiler Anstieg der Kurve, die sich nach einem Peak auf einem etwas niedrigerem Plateau einpendelt. Bei der anschließenden Zugabe von 0 mM Ca^{2+} -Lösung mit EGTA und Thapsigargin geht die aufgezeichnete Kurve schnell auf Plateauwerte, die nur ein wenig höher sind als zu Beginn des Experimentes, zurück.

Um die Daten der humanen Zellen mit den murinen Daten vergleichen zu können, sollten Experimente mit den gleichen Lösungen und mit murinen Lymphozyten durchgeführt werden. Die aufgezeichneten Kurven der Experimente mit murinen Lymphozyten sollten dann mit den Kurven der humanen Zellen verglichen werden.

Bei den Experimenten dieser Dissertation konnte folgendes festgestellt werden. Ebenso wie bei den von Schwarz und Tutsch eingesetzten Zellen des Menschen liegen die $[Ca^{2+}]_i$ der murinen PBL über den der murinen LPL in Bereich des Plateaus,

während sich die Zellen in der 1 mM Ca^{2+} -Lösung befinden [Schwarz et al., 2004, Tutsch et al., 2004]. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die T-Zellen des Darmes von Balb/cAnCrI-Mäusen nach Stimulierung über den T-Zellrezeptors eine geringere Aktivierungsrate haben als die Blutzellen, was auch für humane Zellen gezeigt wurde [Qiao, L. et al., 1991, Schwarz, A. et al., 2004]. Da auch bei der Balb/cAnCrI-Maus die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in LPLs in 1 mM Ca^{2+} -Lösung niedriger sind als in den PBLs, gemessen in der gleichen Lösung, könnte das auf eine Hyporeaktivität der murinen LPL-Zellen gegenüber den murinen PBLs hindeuten.

Durch den Vergleich der intrazellulären Kalziumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der isolierten humanen Lymphozyten, die in der Arbeit von Schwarz dargestellt sind und den intrazellulären Kalziumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der murinen Lymphozyten, die der vorliegenden Arbeit vorgestellt wurden, bestätigt den gleichen Kurvenverlauf der intrazellulären Kalziumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der humanen und murinen Lymphozyten in den eingesetzten Thapsigarginlösungen. Dieses Ergebnis spricht für die Verwendung der Mauslymphozyten als Modellzellen für Untersuchungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale in Lymphozyten. Eine weitere Frage in diesem Zusammenhang ist, wie reagieren die Balb/cAnCrI-Lymphozyten auf physiologischere Stimuli.

4.4. Physiologische Stimulation der Lymphozyten

Für LPLs und PBLs wurde ein Zusammenhang zwischen Proliferation und Kalziumeinstrom gezeigt [Schwarz, A. et al., 2004]. Durch die Costimulation mit Anti- $\text{CD}3^+$ und Anti- $\text{CD}28^+$ Antikörpern, kommt es zu einer Steigerung der Proliferation und IL-2 Produktion, was schon von Ebert [Ebert, E.C. et Roberts, A.I., 1996] gezeigt werden konnte.

Von Targan [Targan, S.R., et al., 1995] konnte gezeigt werden, dass nach einer Anti- $\text{CD}2^+$ /Anti- $\text{CD}28^+$ -Antikörper Stimulation mehr Zytokine bei den LPLs gebildet werden, als durch eine Anti- $\text{CD}3^+$ -Antikörper Stimulation alleine. Zytokine docken an ihren Rezeptor auf der Zielzelle an und durch diese Bindung werden in der Zielzelle Reaktionen ausgelöst. Von Targan [Targan, S. et al., 1995] wurden die Zytokinproduktion der LPLs und PBLs nach Antikörperstimulation verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass bei den LPLs die Stimulierbarkeit über dem Weg Anti- $\text{CD}2^+$ /Anti- $\text{CD}28^+$ gegenüber den PBLs gesteigert ist, es werden sogar mehr Zytokine als bei einer Anti- $\text{CD}3^+$ Stimulation gebildet.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die ersten Experimente die Anti-CD3⁺-Stimulation gewählt, dabei konnten aber kein Anstieg der der [Ca²⁺]_i-Signale festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Erst die Anti-CD3⁺/Anti-CD28⁺-Antikörper Stimulation zeigte eine Stimulation der murinen Lymphozyten in einer 1 mM Ca²⁺-Lösung, die durch den Anstieg der [Ca²⁺]_i-Signale in den Lymphozyten festgehalten werden konnte. Dies zeigt, dass bei gleichem Versuchsaufbau, nur bei Kostimulation ein Anstieg der [Ca²⁺]_i-Signale erkennen lies und die Stimulation mit Anti-CD3⁺-Antikörper Stimulation keinen messbaren Effekt lieferte. In den Experimenten dieser Dissertation konnte festgestellt werden, dass von den eingesetzten murinen Blut-T-Lymphozyten (74%) deutlich mehr als bei den Darm-T-lymphozyten (40%) reagieren. Dies zeigt auch bei physiologischer Stimulation die bessere Stimulierbarkeit der Blutlymphozyten gegenüber den Darmlymphozyten.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde als weitere physiologische Stimulationsmöglichkeit der Antikörper OKT3 eingesetzt. Das OKT3, das in den Experimenten eingesetzt wurde, ist gegen Oberflächenantigene auf menschlichen T-Zellen gerichtet und bindet an die ε-Kette des CD3-Moleküls. Vergleicht man die [Ca²⁺]_i-Signale der Darmlymphozyten nach der Stimulation mit OKT3, die in den Abbildungen 3.14 und 3.17 dargestellt sind, wird deutlich, dass bei verschiedenen Mausstämmen eine unterschiedlich gute Stimulierbarkeit der LPLs festgestellt werden konnte. Es reagierten bei den TRPC6(-/-)-Mäusen 67%, dem Wildtyp 1295VJ 52% und bei den Balb/cAnCrl-Mäusen 25% der erfassten Lymphozyten. Die Maus-T-Lymphozyten lassen sich im Vergleich zu den Ergebnissen für humane T-Zellen besser stimulieren, wie sie in der Arbeit von Schwarz für humane LPLs (16%) dargestellt sind [Schwarz, A. et al.,2004]. In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu den Kontrollversuchen ohne Stimulus, die murinen Lymphozyten durch OKT3 stimuliert werden können, obwohl das verwendete OKT3 gegen humane T-Zellantigene gerichtet ist.

Wie schon in den Thapsigarginexperimenten gezeigt werden konnte, reagieren mehr PBL als LPL auf die gewählten Antikörper Anti-CD3⁺/Anti-CD28⁺-Stimulation. Auch in diesem Fall zeigt sich eine Hyporeaktivität der Balb/cAnCrl-Maus Darmlymphozyten gegenüber den Blutlymphozyten. Da bei den TRPC-Knock-out Tiere eine bessere Stimulierbarkeit durch OKT3 festgestellt werden konnte und eine Stimulation bei der Balb/cAnCrl-Mauslymphozyten erfolgreich durchgeführt wurde, war die Frage

interessant, wie Experimente mit Lösungen, die Thapsigargin enthalten, und Lymphozyten aus anderen Mausstämmen verlaufen würden.

4.5. $[Ca^{2+}]_i$ -Signale bei Lymphozyten aus verschiedenen TRPC-Knock-out Mäusen

Die Funktion der CRAC-Kanäle ist gut charakterisiert [Lewis, R.S. et al., 2001], aber hinsichtlich des molekularen Aufbaus besteht noch kein exaktes Modell des Kanals. Es wird angenommen, dass unter anderem TRP-Proteine am Aufbau beteiligt sind. TRPC-Knock out Tiere sind für unsere Experimente interessant, da in diesen Tieren gezielt verschiedene Proteine der TRPC-Familie ausgeschaltet werden können [Freichel, M. et al., 2005]. Eine interessante Fragestellung dieser Arbeit war, ob das Ausschalten von verschiedenen TRPC-Proteine eine Änderung des Kalziumsignals in den Lymphozyten in dem in dieser Arbeit gewählten Versuchsaufbau erkennen lässt. Dazu wurden T- und B-Lymphozyten aus verschiedenen TRPC-Knock out-Tieren, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, isoliert.

Der Vergleich der Thapsigargin induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Signale bei verschiedenen Knock out Mäusen zeigte, dass das Ausschalten der TRPC6 (-/-)-, TRPC4C6 (-/-)²- und TRPC1C4C6 (-/-)³Proteine keinen in unserem Versuchsaufbau messbaren Einfluss auf den Kalziumeinstrom in die Zelle hat. Aus diesen Ergebnissen kann nur geschlossen werden, dass die TRPC-Proteine bei der Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ keine Rolle spielen.

Obwohl die Präparation von Lymphozyten aus dem Darm der Balb/cAnCrl-Maus gut optimiert werden konnte, erwies sich die Präparation der drei verschiedenen Knock out Mäuse, TRPC6 (-/-), TRPC4C6 (-/-)² und TRPC1C4C6 (-/-)³, als sehr schwierig und ließ keine statistische signifikante Auswertung zu.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Tiere waren über das optimale Alter von 8 bis 12 Wochen hinaus, was auch schon die Präparation bei der Balb/cAnCrl-Maus erheblich erschwerte. Dadurch wurden durchschnittlich 45 % weniger Zellen als bei der Balb/cAnCrl-Maus pro Tier isoliert. Zusätzlich hafteten die isolierten Zellen auch sehr schlecht auf den Deckgläsern, obwohl in verschiedenen Versuchsreihen Poly-L-Lysin, Poly-L-Ornithin und Cell-tak in verschiedenen Konzentrationen ausprobiert wurden. Trotz der Optimierung der Präparation der Lymphozyten bei der Balb/cAnCrl-Maus, konnten in den Experimenten mit TRPC-Knock out Tieren wenig

Zellen isoliert und eingesetzt werden und daher mussten viele Experimente durchgeführt werden.

Hätten die TRPC6(-/-), TRPC4C6(-/-)²- und TRPC1C4C6(-/-)³Proteine einen deutlichen Einfluss auf den Ca²⁺ Einstrom wie zu Beginn der Arbeit angenommen, so müsste ihr Einfluss trotz der methodischen Schwächen nachweisbar sein. Dies war nicht der Fall und deckt sich mit der Interpretation mit der aktuellen Bewertung der TRPC6(-/-), TRPC4C6(-/-)²- und TRPC1C4C6(-/-)³Proteine hinsichtlich ihrer Beteiligung am CRAC. Wie in der Einleitung ausgeführt wird mittlerweile die zentrale Bedeutung der ORAI1 und STIM1-Proteine am CRAC beschrieben [Zhang, S.L. et al., 2005, Liou, J. et al., 2005, Marchant, J.S., 2005, Freske, S. et al., 2006].

4.6. [Ca²⁺]_i-Signale von Lymphozyten bei CED

In der Fachliteratur wurden von Qiao beschrieben, dass bei LPLs von CED-Patienten die natürliche Hemmung der Proliferation aufgehoben ist [Qiao, L. et al., 1994]. Zudem wurden in den Arbeiten von Tutsch und Schwarz bei Kalzium-Imaging-Experimenten erhöhte [Ca²⁺]_i-Signale bei LPLs betroffener Patienten festgestellt [Schwarz, A. et al, 2004, Tutsch,E. et al., 2004]. Da beim Menschen erhöhte [Ca²⁺]_i-Signale der T-Zellen des Darmes in erkrankten Gewebe gemessen wurden, war ein weiteres Ziel dieser Dissertation, [Ca²⁺]_i-Signale von murinen Lymphozyten aus erkranktem Gewebe zu untersuchen. Danach sollten die Ergebnisse von murinen Lymphozyten mit den Ergebnissen, die für humane Lymphozyten von Schwarz gezeigt wurden [Schwarz, A. et al.,2004] verglichen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Optimierung der Präparation von LPLs aus der gesunden Balb/cAnCrI-Maus, die Experimentdaten gut mit den Ergebnissen aus humanen Zellen korrelieren. Dies ist die Grundlage für die Möglichkeit, die Zellen aus der Maus als Modell für die Messung der [Ca²⁺]_i-Signale zu verwenden. Gleichzeitig war auch die Möglichkeit gegeben, ein bereits existierendes Kolitismodell der Maus als Modell für die Messung der [Ca²⁺]_i-Signale in LPLs zu verwenden. Die entwickelten murinen Modelle haben verschiedene Ansätze, aber sie bilden letztlich alle eine Entzündungsreaktion der Schleimhaut des Darmes aus, die auch durch T-Zellen induziert wird. Wie schon im Kapitel Ergebnisse erwähnt, konnten nur CD19⁺-Zellen aus Mäusen mit induzierter Kolitis in unseren Experimenten gemessen werden. Es zeigen sich folgende Tendenzen: Die PBL [Ca²⁺]_i-Signale aus der an Kolitis erkrankten Mäuse liegen im Plateaubereich

unter denen der gesunden Kontrolltiere. Die LPL-[Ca²⁺]_i-Signale aus der an Kolitis erkrankten Tiere liegen im Plateau über dem der Kontrolltiere. Obwohl die LPL-[Ca²⁺]_i-Signale erhöht sind, erreichen die Daten aber nicht die Höhe der PBL-[Ca²⁺]_i-Signale der Kontrolltiere, wie das für humane Zellen von Schwarz gezeigt wurde [Schwarz, A. 2004]. Es scheint, dass auch bei der Maus die LPL-[Ca²⁺]_i-Signale aus erkrankten Tieren erhöht sind, so dass die Hyporeaktivität der Zellen aus an Kolitis erkranktem Darm gegenüber den isolierten Zellen aus gesunden Tieren aufgehoben sein kann.

Bei der Präparation stellte sich heraus, dass auch die Zellen aus der C57BL6-Maus schwieriger zu isolieren waren als die aus den Balb/cAnCrl-Mäusen. Trotz einiger Versuchsreihen mit Veränderung der Inkubationszeiten konnte die Antwort auf die Frage, warum wesentlich weniger Zellen aus dem Darm dieses Mäusestammes isoliert wurden, nicht gefunden werden.

Ein weiteres Problem stellte die Isolierung der Zellen aus entzündetem Gewebe dar, so dass bei diesen Experimenten nur zwischen 15 000 und 150 000 Zellen isoliert werden konnten. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist das Gewebe histologisch verändert. Je nach Erkrankungsintensität und Grad der Entzündungsprozesse kommt es zu Darmvernarbungen. Da es während der Experimente nicht gelang, intakte CD3⁺-Zellen aus diesen Darmsegmenten zu isolieren, stellt sich die Frage, ob das vernarbte Gewebe mit unserer Methode ausreichend aufgelöst wurde. Es könnte sein, dass eine Verlängerung der Kollagenase-Inkubationszeit oder eine stärkere mechanische Zerstörung des Gewebes mehr Zellen freisetzen würde. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass mehr T-Zellen im Bereich von erkrankten Darmabschnitten nur in äußeren Bereichen sitzen und bei der Isolation zusammen mit dem Schleim weggespült werden. In dem Schleim waren unter dem Mikroskop Zellen erkennbar, da aber die von uns verwendeten Antikörper zur Identifikation der Zellen, nicht an die durch den Schleim abgeschirmten Zellen heran kamen, kann über die Zellart keine Aussage gemacht werden.

In unseren Zellpellets aus dem entzündeten Darm wurden durch die Antikörperfärbung Zellfragmente von CD3⁺-Lymphozyten gefunden. Das bedeutet, dass während der Isolation Lymphozyten platzen, was trotz identischer Versuchsdurchführung bei der Isolation der LPLs aus der Balb/cAnCrl-Maus nicht festgestellt werden konnte. Zusätzlich werden bei unserem Versuchsaufbau sehr viele Zellen aus der Experimentkammer weggespült. Bei der in dieser Arbeit

verwendeten Methode der Identifikation der Zellen ist es nötig, die Experimentkammer nach Zugabe der Antikörper durchzuspülen, um nicht haftende Antikörper zu entfernen. Dadurch kann über die weggespülten Zellen keine Aussage gemacht werden, da sie zur Identifikation nicht zur Verfügung standen. Voraktivierte Zellen haften schlechter auf dem Deckglas als nicht aktivierte Zellen, was sich im Laufe unserer Optimierungsversuche herausgestellt hat. Da von Schwarz und Tutsch [Schwarz, A. et al, 2004, Tutsch,E. et al., 2004] gezeigt wurde, dass LPLs aus erkranktem Gewebe höhere $[Ca^{2+}]_i$ -Signale generieren, ist es möglich, dass bei Zellen aus entzündetem Gewebe die Haftung so schlecht ist, dass sie bevorzugt aus der Experimentkammer gespült werden oder platzen.

4.7. Schlußbetrachtung und Ausblicke

Von Schwarz und Tutsch [Schwarz, A. et al, 2004, Tutsch,E. et al., 2004] wurde für humane Zellen gezeigt, dass die $[Ca^{2+}]_i$ -Signale sowohl für dissoziierte Zellen als auch für Zellen im Gewebeverband, niedrigere $[Ca^{2+}]_i$ der LPL gegenüber den PBLs bestätigen. Zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, konnte gezeigt werden, dass die Balb/cAnCrI-Maus als Modellorganismus für die Untersuchungen der erniedrigten $[Ca^{2+}]_i$ -Signale in T-Lymphozyten aus dem Darm und die wahrscheinlich damit verbundene T-Zell-Hyporeaktivität benutzt werden kann. Außerdem besteht die Möglichkeit, nach Optimierung der Zellpräparation, auch das eingesetzte Kolutismodell für weitere Untersuchungen von $[Ca^{2+}]_i$ -Signalen in T-Lymphozyten zu verwenden. Das bessere Verständnis der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale könnte dazu führen, Krankheiten wie CED genauer zu untersuchen und bessere Therapien zu finden. Denn die Kalziumabhängigkeit vieler zellulärer Prozesse, wie von z.B. dem Transkriptionsfaktor NFAT, der auch bei CED eine wichtige Rolle spielt, zeigt den Zusammenhang zwischen Kalziumsignalen und Steuerung der Zellen [Schottelius, A.J.et al., 1999].

Da die Daten von Tutsch gut mit den Daten von Schwarz und den Daten dieser Arbeit korrelieren, liegt der Rückschluss nahe, dass die Maus als Modell zur Untersuchung der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale geeignet ist. So konnte in der vorliegenden Dissertation gezeigt werden, dass sowohl pathophysiologische Experimente durchgeführt als auch grundlegende, physiologische Fragestellungen untersucht werden können.

5. Literatur

Bautista, D.M., Lewis, R.S., 2004. Modulation of plasma membrane calcium-ATPase activity by local calcium microdomains near CRAC channels in human T cells. *J Physiol* **556**.3: 805-817

Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis And Remodelling. *Molecular Cell Biology* **4**:517-529.

Braunstein, J., Qiao, L., Autschbach, F., Schürmann, G., Meuer, S., 1997. T cells of the human intestinal propria are high producers of interleukin-10. *Gut* **41**:215-220.

Chandy, K.G., Gutman, G.A., Grissmer, S., 1993. Physiological role, molecular structure and evolutionary relationships of voltage-gated potassium channels in T lymphocytes. *The Neurosciences*, 5:pp125-134.

Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., 1994. Signaling between intracellular Ca^{2+} stores and depletion-activated Ca^{2+} channels generates $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations in T lymphocytes. *J Gen Physiol* **103**:365-388.

Dolmetsch, R.E., Xu, K., Lewis, R.S., 1998. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* **392**:933-936.

Duchmann, R., Hoffmann, J., Marth, T., Schneider, T., Stallmach, A., Zeitz, M., 1999. Mukosales Immunsystem im Darm. *Magazin Forschung* **1**:47-62.

Ebert, E.C., Roberts, A.I., 1996. Costimulation of the CD3 pathway by CD28 ligation in human intestinal lymphocytes. *Cellular Immunology* **171**:211-216.

Ebert, E.C., 2003. Activation of human intraepithel lymphocytes reduces CD3 expression. *Clin Exp Immunol* **132**:424-429.

Erler, I., Al-Ansary, D.M.M., Wissenbach, U., Wagner, T.F.J., Flockerzi, V. Niemeyer, B.A., 2006. Trafficking and assembly of the cold-sensitive TRPM8 channel. *J Biol Chem* **281**:38396-38404.

Fanger, C.M., Rauer, H., Neben, A.L., Miller, M.J., Rauer, H., Wulff, H., Rosa, C.J., Ganellin, C.R., Chandy, K.G., Cahalan, M.D., 2001. Calcium-activated potassium channels sustain calcium signaling in T lymphocytes. Selective blockers and manipulated channel expression levels. *J Biol Chem* **275**:12249-12256.

Feldhahn, N., Schwering, I., Lee, S., Wartenberg, M., Klein, F., Wang, H., Zhou, G., Wang, S.M., Rowley, J.D., Hescheler, J., Krönke, M., Rajewsky, K., Küppers, R., Müschen, M., 2002. Silencing of B cell receptor signals in human naïve B cells. *J Exp Med* **196**:1291-1305.

Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M., Rao, A., 2006. A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**:179-185.

Feske, S., Prakriya, M., Rao, A., Lewis, R.S., 2005. A severe defect in CRAC Ca^{2+} channel activation and altered K^+ channel gating in T cells from immunodeficient patients. *J Exp Med* **202**:651-662.

Freichel, M., Vennekens, R., Olausson, J., Stolz, S., Philipp, S.E., Weissgerber, P., Flockerzi, V., 2005. Functional role of TRPC proteins in native systems: implications from knockout and knock-down studies. *J Physiol* **567**: 59-66.

Griesemer, D., Quintana, A., Mery, L., Schwarz, E., Hoth, M., 2004. Calcium Transport in Lymphocytes. *Nova Acta Leopoldina NF 89*, 336:75-80.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**:3440-3450.

Hara, J., Ohtani, H., Matsumoto, T., Nakamura, S., Kitano, A., Arakawa, T., Nagura, H., Kobayashi, K., 1997. Expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 in

macrophages and granulomas of Crohn's disease: demonstration of cell-to-cell contact with T lymphocytes. *Lab Invest* **77**:175-184.

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

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 USA* **97**:10607-10612.

Jurjus, A.R., Khoury, N.N., Reimund, J.M., 2004. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods* **50**:81-92.

Kerschbaum, H.H., Negulescu, P.A., Cahalan, M.D., 1997. Ion channels, Ca²⁺ signaling, and reporter gene expression in antigen-specific mouse T cells. *J Immunol* **159**:1628-1638.

Klinke, R., Pape, H.-C., Silbernagel, S., 2005. *Physiologie*. 5. Auflage, Thieme

Kwan, H.Y., Huang, Y., Yao, X., 2004. Regulation of canonical transient receptor potential isoform 3 (TRPC3) channel by protein kinase G. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:2625-2630.

Lewis, R.S., Cahalan, M.D., 1989. Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca²⁺ and transmembrane Ca²⁺ current in human leukemic T-cells. *Cell Regul* **1**:99-112.

Lewis, R.S., 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **19**:497-521.

Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E. Jr., Meyer, T., 2005. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol* **15**:1235-1241.

De Maria, R., Fais, S., Silvestri, M., Frati, L., Pallone, F., Santoni, A., Testi, R., 1993. Continuous in vivo activation and transient hyporesponsiveness to TcR/CD3 triggering of human gut lamina propria lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **23**:3104-3108.

Mayer, L., 1996. Yin and Yang of mucosal immunology. *Transplant Proc* **28**:2435-2437.

Marchant, J.S., 2005. Cellular Signalling : STIMulating Calcium Entry. *Curr Biol* **13**:R493-R496.

Melgar, S., Karlsson, A., Michaëlsson, E., 2005. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**: G1328-1338.

Mowat, A.M., 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* **3**:331-341.

Nilius, B., Prenen, J., Tang, J., Wang, C., Owsianik, G., Janssens, A., Voets, T., Zhu, M.X., 2005. Regulation of the Ca²⁺ sensitivity of the nonselective cation channel TRPM4. *J Biol.Chem.* **280**:6423-6433.

Novatis Pharm de. 2006

Panyi, G., Bagdány, M., Bodnár, A., Vámosi, G., Szentesi, G., Jenei, A., Mátyus, L., Varga, S., Waldmann, T.A., Gáspár, R. Damjanovich, S., 2003. Colocalization and non-random distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:2592-2597

Pawlowski, N.N, Kakirman, H., Kühl, A.A., Liesenfeld, O., Grollich, K., Loddenkemper, C., Zeitz, M. Hoffmann, J.C., 2005. Alpha-CD2 mAb treatment safely attenuates adoptive transfer colitis. *Lab Invest* **85**:1013-1023.

Penner, R., Fleig, A., 2004. Store-operated calcium entry: a tough nut to CRAC. *Sci.STKE* 2004: pe38

Podolsky, M.J., Lasker, A., Flaminio, M.J. Gowda, L.D., Ezekowitz, R.A., Takahashi, K., 2006. Characterization of an equine mannose-binding lectin and its roles in disease. *Biochem Biophys Res Commun* **343**:928-936.

Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch*, 257. Auflage, 1994. Walter de Gruyter.

Qiao, L., Schürmann, G., Betzler, M., Meuer, S.C., 1991. Activation and signaling status of human lamina propria T lymphocytes. *Gastroenterology* **101**:1529-1536.

Qiao, L., Golling, M., Autschbach, F., Schürmann, G., Meuer, S.C., 1994. T cell receptor repertoire and mitotic responses of lamina propria T lymphocytes in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* **97**:303-308.

Quintana, A., Hoth, M., 2004. Apparent cytosolic calcium gradients in T-lymphocytes due to fura-2 accumulation in mitochondria. *Cell Calcium* **36**:99-109.

Quintana, A., Griesemer, D., Schwarz, E.C. and Hoth, M., 2005. Calcium-dependent activation of T-lymphocytes. *Pflugers Arch* **450**:1-12.

Ramsey, I.S., Delling, M., Clapham, D.E., 2006. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* **68**:619-647.

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

Rizzuto, R. et Pozzan, T., 2003. When calcium goes wrong : genetic alterations of a ubiquitous signaling route. *Nature Genetics* **2**:135-141.

Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, A.V., Ohlsen, K., Liudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J.A., Wagner, S.L., Cahalan, M.D., Velicebi, G., Stauderman, K.A., 2005. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function. *J Cell Biol* **189**:435-445.

Schottelius, A.J., Mayo, M.W., Sartor, R.B. Baldwin, A.S. jr., 1999. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of κ B kinase activity and nuclear factor kappa B DNA binding. *J Biol Chem* **274**:31868-31874.

Schwarz, A., Tutsch,E., Ludwig,B., Schwarz,E.C., Stallmach,A., Hoth, M., 2004. Ca^{2+} signaling in identified T-lymphocytes from human intestinal mucosa. *J Biol Chem* **7**:5641-5647.

Schwarz, E.C., Kummerow, C., Wenning, A.S., Wagner,K., Sappok, A., Wagershausen, K., Griesemer, D., Strauß, B., Wolfs, M.J., Quintana, A., Hoth, M., 2007. Calcium dependence of T cell proliferation following focal stimulation. *Eur J Immunol*, **37**:2723-2733.

Specian, R.D., Neutra, M.R., 1982. Regulation of intestinal goblet cell secretion. I. Role of parasympathetic stimulation. *Am J Physiol* **242**: G370-G379.

Sprent, J., 1994. T and B memory cells. *Cell* **76**:315-322.

Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler,A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M., Lochs, H., 2002. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**:44-54.

Targan, S.R., Deem, R.L., Liu, M., Wang,S., Nel, A., 1995. Definition of a lamina propria T cell responsive state. *J Immunol* **154**:664-675.

Targan, S.R., Karp, L.C., 2005. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunol Rev* **206**:296-305.

Tutsch,E., Griesemer, D., Schwarz, A., Stallmach, A., Hoth, M., 2004. Two-photon analysis of calcium signals in T lymphocytes of intact lamina propria from human intestine. *Eur J Immunol* **34**:3477-3484.

Zhang, S.L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J.A., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Stauderman, K.A. Cahalan, M.D., 2005. Stim1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membran. *Nature* **437**:902-905.

Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., Boulay, G., Hurst, R., Stefani, E., Birnbaumer, L., 1996. Trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry. *Cell* **85**:661-671.

Zitt, C., Strauss, B., Schwarz, E.C., Spaeth, N., Rast, G., Hatzelmann, A., Hoth, M., 2004. Potent inhibition of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2. *J Biol Chem* **279**:12427-12437.

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

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Birgit Gisela Löffler, geb. Heß
 Geburtsdatum/-ort 24.09.1964 in Quierschied
 Familienstand verheiratet

Berufserfahrung und Hochschulstudium

3/2007 – 8/2007 **mibeg-Institut Medizin** Köln,
 Weiterbildung Klinische Forschung, CRA
 Praktikum beim BfArM, Bonn

7/2003 – 2/2007 **Universitätsklinik Homburg, Physiologisches Institut**
Wissenschaftliche Mitarbeiterin
 Promotion (zur Begutachtung eingereicht), auf dem Gebiet
 der fluoreszenzmikroskopischen Messung der freien
 zytosolischen Kalziumkonzentration in Lymphozyten

10/1990 – 6/2003 **Firma FESTO AG & Co**, Rohrbach,
Mitarbeiterin (30 Stunden/Woche) in der Abteilung
 Fertigung von Ventilgruppen,

- Urlaubsvertreterin der Teamleitung der Inselgruppen
- Bearbeitung der Sonderaufträge
- Beteiligung am KVP
- Einarbeitung von neuen Mitarbeitern

10/1988 – 9/2002 **Universität des Saarlandes, Studium der Biologie**
 Studienschwerpunkte: Genetik, Botanik, Biochemie,
 Biophysik, Abschluss: **Diplom Biologin**
 Diplomarbeit auf dem Gebiet von atomabsorbti-
 onsspektroskopischen Untersuchungen von Ionenkanälen in
 der Erythrozytenmembran

6/1985 – 6/1991 **Bäckerei Heß**; Krankheitsbedingte Vertretung der
 Geschäftsleitung im elterlichen Betrieb

- Betreuung der Auszubildenden
- Herstellung, Kalkulation und Verkauf der Waren

Schul- und Berufsausbildung

10/1985 – 4/1988	Technikum Landau Abschluss: Biologisch- Technische -Assistentin ,
8/1981 – 7/1985	Wirtschaftsgymnasium Saarbrücken Abschluss: Abitur
8/1979 – 7/1981	Wirtschaftsschule Saarbrücken Abschluss: Mittlere Reife
8/1971 – 7/1979	Grundschule Fischbach, Hauptschule Quierschied

Sprachkenntnisse

Englisch	in Wort und Schrift
Französisch	Grundkenntnisse

Weitere Kenntnisse

Qualitätsmanagement	Teilnahme an einem KVP – Team Schulungszyklus im Lernzentrum FESTO
Buchführung	fundierte Kenntnisse durch elterlichen Betrieb
Hobbys	Aquarell- und Seidenmalerei

Veröffentlichung

Griesemer D., Löffler B., Kummerow C., Quintana A., Schwarz E.C., Hoth M., 2006. CRAC calcium channels as signal transducers in T-cells, Signal Transduction 6, 233-239.

Saarbrücken 2007

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Universitätsklinik Homburg, Physiologisches Institut, in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Markus Hoth erstellt.

Meinem Betreuer, Herrn Professor Dr. Markus Hoth, möchte ich für die Vergabe des Themas, sowie für die gute Betreuung danken. Bedanken möchte ich mich auch bei dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Hoth, insbesondere bei Frau Anja Ludes, Frau Bettina Strauss und Herr Dr. Ariel Quintana, für die gute Zusammenarbeit. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Lutz Sternfeld für die interessanten Diskussionen bedanken.