

Aus der Fachrichtung Physiologie
Bereich Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Analyse der Rolle von TRP Proteinen
für die Aktivierung humaner CD4⁺-Zellen
mittels siRNA Technologie**

Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2008

vorgelegt von: Anna Silvia Wenning
geboren am 09.04.1982 in Münster

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	05
1. Zusammenfassung / Summary	09
1.1 Zusammenfassung	09
1.2 Summary	10
2. Einleitung	12
2.1 T-Lymphozyten als Steuerelemente des menschlichen Immunsystems	12
2.2 Aktivierung von CD4⁺-Zellen	12
2.2.1 Stimulation des T-Zell-Rezeptors und T-Zell-Rezeptor-induzierte Signalkaskaden.....	12
2.2.2 Aktivierungsmechanismen des CRAC-Kanals.....	15
2.2.3 BTP2: ein CRAC-Kanal-Inhibitor mit noch ungeklärtem Mechanismus	18
2.3 Familie der TRP-Känale	19
2.4 STIM1 und ORAI1: Wichtige Komponenten zur Aktivierung des CRAC-Kanals und des CRAC-Kanals selbst	22
2.5 SiRNA Technologie	25
2.6 Fragestellungen	27
3. Material und Methodik	28
3.1 Material	28
3.1.1 Substanzen	28
3.1.2 Antikörper.....	29
3.1.3 Medien und Puffer.....	29
3.1.4 Filtersysteme.....	30
3.1.5 Geräte und Platten	30
3.1.6 Auswertungsprogramme.....	31
3.2 Zellbiologische Methodik	31
3.2.1 Aufreinigung humaner peripherer Blutlymphozyten (PBLs) über	

Dichtegradientenzentrifugation.....	31
3.2.2 Isolierung von CD3 ⁺ -und CD4 ⁺ -Zellen durch „Negative Isolation“	31
3.2.3 Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen aufgereinigter Zellen mittels Antikörperfärbung	32
3.2.4 Transfektion humaner PBLs und CD4 ⁺ -Zellen durch Elektroporation	32
3.2.5 Präparation von Antikörper-beschichteten Beads.....	33
3.2.6 Proliferationsexperimente.....	33
3.2.7 Zellkultur TRPC3-überexprimierender HEK 293 Zellen	35
3.2.8 Transfektion von HEK 293 Zellen mit siRNA	36
3.3 Molekularbiologische Methodik	36
3.3.1 Isolierung totaler RNA	36
3.3.2 Reverse Transkription.....	37
3.3.3 Amplifikation spezifischer DNA mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	37
3.3.4 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren	37
3.3.5 Agarose-Gelelektrophorese	38
3.4 Proteinchemische Methodik	38
3.4.1 Proteinisolierung aus TRPC3 überexprimierenden HEK 293 Zellen	38
3.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	38
3.4.3 Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen (Western Blot)	38
4. Ergebnisse	40
4.1 Entwicklung und Validierung der Methodik	40
4.1.1 Identifizierung und Quantifizierung der Lymphozytensubpopulationen in peripheren Blutlymphozyten (PBLs) und in aufgereinigten CD4 ⁺ -Zellen	40
4.1.2 Proliferation von PBLs und CD4 ⁺ -Zellen in Abhängigkeit von der Zellzahl.....	40
4.1.3 Proliferation von PBLs und CD4 ⁺ -Zellen in Abhängigkeit vom Stimulus.....	41
4.1.4 Interleukin-2-Sekretion von PBLs und CD4 ⁺ -Zellen in Abhängigkeit vom Stimulus	44
4.2 Ca²⁺-Abhängigkeit der Proliferation von CD4⁺-Zellen	46
4.3 Proliferationsexperimente unter Blockade des CRAC-Kanals	48
4.4 Etablierung der siRNA-Technologie	50
4.4.1 Bestimmung der Transfektionsrate von siRNA-transfizierten, TRPC3-überexprimierenden HEK 293 Zellen und CD4 ⁺ -Zellen	51
4.4.2 Quantifizierung der TRPC3-siRNA-Effizienz in transfizierten, TRPC3-überexprimie- renden HEK 293 Zellen durch quantitative PCR.....	52
4.4.3 Quantifizierung der TRPC3-siRNA-Effizienz in transfizierten, TRPC3-überexprimie- renden HEK 293 Zellen mittels Western Blot Analyse.....	53

4.5	Bestimmung und Etablierung optimaler Kontroll-siRNAs	54
4.5.1	Negativkontrollen	54
4.5.2	STIM1-siRNA-transfizierte Zellen als Positivkontrolle	54
4.6	Screening von TRP-siRNA-transfizierten CD4⁺-Zellen auf Differenzen in der Proliferation	56
4.7	Expression einzelner TRP-Kanäle in stimulierten CD4⁺-Zellen	59
4.8	Experimente zum TRPC3-Kanal	61
4.8.1	Proliferation TRPC3-siRNA-transfizierter CD4 ⁺ -Zellen unter variierenden Bedingungen	61
4.8.2	IL-2-Sekretion TRPC3-siRNA-transfizierter CD4 ⁺ -Zellen	66
5.	Diskussion	67
5.1	Proliferation nach Inhibition des CRAC-Kanals	67
5.2	Die Rolle des TRPC3-Kanals	69
5.3	Schwierigkeiten und offene Fragen	74
5.4	Ausblick	75
6.	Literaturverzeichnis	77
7.	Anhang	87
7.1	Übersichtstabelle über die verwendeten siRNAs	87
7.2	Übersichtsgrafik über das Screening der TRP-siRNA-transfizierten CD4⁺-Zellen	89
7.3	Unbedenklichkeitserklärung der Ethikkommission	90
7.4	Publikationen, Abstracts	90
7.4.1	Publikationen	90
7.4.2	Abstracts	90
7.5	Danksagung	91
8.	Lebenslauf	93

Verzeichnis der Abkürzungen

α	anti
Ag	Antigen
APC	Antigen-präsentierende Zelle
asRNA	antisense RNA
ATP	Adenosintrisphosphat
BSA	bovine serum albumine
BTP2	3,5-Bis-Trifluoromethyl-Pyrazol 2
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	freie, intrazelluläre Kalziumkonzentration
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CIF	Calcium Influx Factor
CRAC	calcium release-activated calcium
CRACM1	CRAC Modulator 1
CTB	CellTiter Blue
c/w	cells per well
Cy-5	Cyanin 5
Ø	Durchschnitt
d	day
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelsträngige RNA
EGTA	Ethylenglycol-bis-(aminoethylether-)tetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanat
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEK	Human Embryonic Kidney
HUP 0	Human acidic protein 0
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule
ICP-OES	inductively coupled plasma optical emission spectroscopy

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon- γ
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
iPLA ₂	Ca ²⁺ -unabhängige Phospholipase A ₂
IS	immunologische Synapse
ITAM	immunoreceptor tyrosin-based activation motifs
kD	kilo Dalton
λ	Wellenlänge
M	molar
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
NFATc/n	nuclear factor of activated T-cells cytosol/nucleus
NF κ B	nuclear factor- κ B
NK	natural killer
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
ON	over night
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	periphere Blutlymphozyten
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHA	Phytohemagglutinin
PIP ₂	Phosphatidylinositoldiphosphat
PKC	Proteinkinase C
pm	plasma membrane
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RBL	Rat Basophilic Leukaemia
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RPE	R-Phycoerythrin
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAM	Sterile Alpha Motif
SCID	Severe Combined Immuno Deficiency
SERCA	sarco-endoplasmatic reticulum calcium ATPases

siRNA	small interfering RNA
SOC	Store Operated Channel
ss	Einzelstrang
STIM	Stromal Interaction Molecule
TBP	TATA box binding protein
TCR	T-cell receptor
TEMED	Tetramethylethylenediamid
TRP	Transient Receptor Potential
U	Unit
YFP	Yellow Fluorescent Protein
Z/W	Zellen pro Well

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Im menschlichen Immunsystem übernehmen $CD4^+$ -Zellen wichtige regulatorische Funktionen. Sie sind dadurch ein unabdingbarer Bestandteil der adaptiven Immunantwort. Die Präsentation eines Antigenes und die darauf folgende Ausbildung einer immunologischen Synapse zwischen Antigen-präsentierender Zelle und $CD4^+$ -Zelle führen zur Induktion einer durch den T-Zell-Rezeptor vermittelten Signalkaskade. Der Ca^{2+} -Einstrom durch „ Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} “ (CRAC)-Kanäle ist hierbei ein notwendiger Schritt zur Aktivierung der $CD4^+$ -Zelle. Er reguliert die Expression mehrerer Transkriptionsfaktoren (zum Beispiel NFAT und NF κ B), über die die Produktion von Zytokinen wie Interleukin (IL) -2, -4 und Interferon- γ und die Proliferation der Zellen gesteuert werden. Eine Interaktion des Kanals mit den Proteinen STIM1, das die Kommunikation zwischen endoplasmatischem Retikulum und Zellmembran vermitteln könnte, und Orai1, welches einen Teil der Porenregion des CRAC-Kanals selbst zu sein scheint, konnte im Rahmen von Screening-Studien gezeigt werden. Fehlt der CRAC-Strom, wie es unter anderem bei dem heterozygot vererbten Krankheitsbild des SCID (severe combined immuno deficiency) Syndroms der Fall ist, können $CD4^+$ -Zellen nicht mehr adäquat und effektiv auf Krankheitserreger reagieren.

Der vollständige molekulare Aufbau des Kanals sowie sein exakter Aktivierungsmechanismus sind bislang noch ungeklärt. Im zeitlichen Verlauf der vorliegenden Dissertation wurde das Orai1-Protein als Teil der CRAC-Kanal-Pore identifiziert, was zu der weiteren Aufklärung der $CD4^+$ -Zell-Aktivierung beitrug. Unter der Familie der TRP (transient receptor potential)-Kanäle, die eine heteromere Gruppe von Kationen-Kanälen zusammenfasst, wurden verschiedene Mitglieder beschrieben, die in unterschiedlichen Kriterien mit dem CRAC-Kanal übereinstimmen. Dazu gehören zum Beispiel der Aktivierungsmechanismus über die Entleerung der Ca^{2+} -Speicher des endoplasmatischen Retikulums, die Ca^{2+} -Selektivität und die Interaktion mit weiteren Proteinen wie STIM1 und Orai1. Darum wurde als Hauptfragestellung der vorliegenden Dissertation eine mögliche Beteiligung eines oder mehrerer TRP-Kanäle am Ca^{2+} -Einstrom und somit an der Aktivierung von $CD4^+$ -Zellen formuliert.

Um die Aktivierung der Zellen zu messen, wurden die IL-2-Sekretion und die Proliferation quantitativ erfasst. Die Realisierbarkeit des Projektes wurde in Voruntersuchungen (die auch Teil dieser Arbeit waren) analysiert, in denen unter anderem getestet wurde, ob Proliferation ein ausreichend sensitiver Parameter für die $CD4^+$ -Zell-Aktivierung ist. Durch verschiedene Experimente wie zum Beispiel die Messung der Proliferation unter dem Einfluss des CRAC-Kanal-Blockers BTP2, dessen Zugabe zu den Zellen die Proliferation erheblich reduzierte, konnte bestätigt werden, dass ein Screening auf Basis der $CD4^+$ -Zell-Proliferation gut durchführbar ist. Mittels siRNA-Technologie wurden die TRP-

Proteine herunterreguliert, die in CD4⁺-Zellen konsistent exprimiert sind. Dazu gehören TRPC1 und TRPC3, TRPM2, TRPM5 und TRPM7, TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV5 und TRPV6. Wird eine siRNA gegen ein bestimmtes Zielprotein in die Zelle gebracht, erfolgt der Abbau der mRNA des jeweiligen Zielproteins, sodass das Protein nicht mehr translatiert werden kann. So bewirkt die siRNA sekundär die Herunterregulierung des Zielproteins.

Im Rahmen des Screenings wurde gezeigt, dass CD4⁺-Zellen, die mit siRNA gegen den TRPC3-Kanal transfiziert wurden, signifikant schlechter proliferieren als Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden. Parallel dazu sank die IL-2-Sekretion von TRPC3-siRNA-transfizierten Zellen. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die TRPC3-Expression nach TCR-vermittelter Aktivierung der Zellen hochreguliert wurde. Daraus wurde gefolgert, dass der TRPC3-Kanal für die CD4⁺-Zell-Aktivierung eine wichtige Rolle spielt. In Verbindung mit den Ergebnissen weiterer Experimente, die die CRAC-Kanal- und die Ca²⁺-Abhängigkeit der CD4⁺-Zell-Proliferation untersuchten, wurden mehrere Modelle aufgestellt, in deren Rahmen dem TRPC3-Kanal eine Rolle für die CD4⁺-Zell-Aktivierung zugesprochen wird.

1.2 Summary

Analysis of the role of TRP proteins for human CD4⁺-cell activation using siRNA technology

CD4⁺-cell activation is central to the adaptive immune response. Following antigen presentation and the formation of the immunological synapse several signaling cascades are induced by the T-cell receptor (TCR). Ca²⁺ entry through Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels is an essential step during CD4⁺-cell activation. Ca²⁺ influx controls the expression of several transcription factors (e.g. NFAT, NFκB), which regulate proliferation and the production of cytokines such as Interleukin (IL) - 2, -4 and Interferon-γ. The complex molecular identity of CRAC channel is still unknown although a recent screening analysis could demonstrate interactions with the protein STIM1. Another protein, Orai1, was found to be part of the CRAC channel. Whereas STIM1 plays a role in signaling transduction between endoplasmatic reticulum and the plasma membrane, Orai1 seems to form the pore unit of the CRAC channel. The absence of the CRAC current causes severe immuno deficiency syndroms (amongst others SCID (severe combined immuno deficiency) disease) which lead to an inefficient immune response of CD4⁺-cells.

Several members of the TRP (transient receptor potential) channel family have some properties similar to CRAC channels, for exemple activation through endoplasmatic Ca²⁺-release, Ca²⁺ selectivity of the pore unit and in addition, they interact STIM1 and Orai1. Based on this knowledge, the main question of this work was to analyze a possible participation of one or even more TRP channels on the Ca²⁺-influx and on the activation of CD4⁺-cells.

To measure the activation of CD4⁺-cells, IL-2 secretion and proliferation of stimulated cells was quantified. Preliminary investigations showed that these two parameters are sensitive to determine CD4⁺-cell activation following stimulation through the TCR.

Using siRNA technology, proteins of those TRP channels, that are consistently expressed in CD4⁺-cells were down-regulated (in particular TRPC1 and TRPC3, TRPM2, TRPM5 and TRPM7, TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV5 and TPV6).

It could be demonstrated that proliferation of CD4⁺-cells, which had been transfected with TRPC3-siRNA, is significantly reduced in comparison to control cells. In parallel, measurement of IL-2-secretion showed a decreased IL-2 production of the transfected cells. Besides, TRPC3-mRNA was highly upregulated in CD4⁺-cells after stimulation of the TCR by antibody-coated beads.

Combining these results, we present several models, in which TRPC3 takes part in the signaling cascade of stimulated CD4⁺-cells. We conclude, that TRPC3 plays an important role for the activation of CD4⁺-cells.

2. Einleitung

2.1 T-Lymphozyten als Steuerelemente des menschlichen Immunsystems

Im menschlichen Immunsystem spielen T-Lymphozyten (T-Zellen) eine essentielle Rolle. Sie sind neben Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) und B-Lymphozyten wesentliches Element der adaptiven Immunität, in deren Rahmen diese Zellen in der Lage sind, auf spezifische Strukturen (Antigene) gezielt zu reagieren und zelluläre Abwehrmechanismen und Antikörperproduktion zu deren Bekämpfung zu aktivieren. Funktionell differenziert man zwischen zwei Haupttypen von T-Zellen, den $CD4^+$ - und $CD8^+$ -Zellen. CD4 und CD8 sind Oberflächenproteine (CD = cluster of differentiation), die mit den zwei verschiedenen MHC-Molekülen (major histocompatibility complex) MHCI und MHCII interagieren. $CD8^+$ -Zellen haben in Interaktion mit MHCI-Molekülen wichtige Aufgaben im Bereich der Abwehr viraler Infekte. Durch die Fähigkeit, Virus-befallene Zellen abzutöten, werden sie auch zytotoxische T-Zellen oder T-Killer-Zellen genannt. $CD4^+$ -Zellen hingegen übernehmen immunregulatorische Funktionen. Dazu gehört die über Sekretion von stimulatorischen Signalsubstanzen eingeleitete Aktivierung von Makrophagen und B-Lymphozyten oder auch NK-Zellen (natural killer cells) und eosinophilen Granulozyten. Um ihre Signale zu verstärken, proliferieren stimulierte $CD4^+$ -Zellen klonal. Dabei regt eine aktivierte Zelle über Wachstumsfaktoren sowohl sich selbst als auch weitere $CD4^+$ -Zellen zur Proliferation an. Während B-Lymphozyten nach Aktivierung ebenfalls klonal proliferieren und zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen ausdifferenzieren, dienen aktivierte Makrophagen der Eliminierung von Bakterien. Aufgrund ihrer Funktion, weitere Zellen zu stimulieren, werden $CD4^+$ -Zellen auch T-Helfer-Zellen genannt. Außerdem können sich $CD4^+$ -Zellen nach Antigen-Kontakt zu T-Gedächtnis-Zellen entwickeln. Darüber vermitteln sie sekundäre Immunität. Diese besteht in der Fähigkeit, bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen eine direkte, spezifische und dadurch schnellere Immunantwort in Form der Antikörperproduktion in Gang zu setzen.

2.2 Aktivierung von $CD4^+$ -Zellen

2.2.1 Stimulation des T-Zell-Rezeptors und T-Zell-Rezeptor-induzierte Signalkaskaden

Grundlegend für eine effiziente, erworbene Immunantwort ist die $CD4^+$ -Zell-Aktivierung. Antigene werden den T-Zell-Rezeptoren (TCRs) der $CD4^+$ -Zellen über MHCII-Moleküle von APCs präsentiert. Erfolgt die Aktivierung von $CD4^+$ -Zellen auf diese Weise, wird dies „fokale Stimulation“ genannt. Dadurch kommt es zur Ausbildung einer "immunologischen Synapse" (IS), in der die Zelle durch eine

Vielzahl von Prozessen aktiviert wird. Der Begriff der IS wurde Ende der 90er Jahre von M.L. Dustin geprägt [17]. Sie entsteht bei dem Aufeinandertreffen einer APC und einer CD4⁺-Zelle. In einem Bereich von 15 nm kommt es durch Zusammenlagerung von Signal- und Adhäsionsmolekülen zu einer starken Verbindung der beiden Zellen, in deren Mitte der TCR auf der CD4⁺-Zell-Seite und das Antigen mit dem MHCII-Komplex auf der APC-Seite liegen [11]. Die Ausbildung einer IS ist notwendig für eine effiziente Immunantwort.

Der TCR ist aus mehreren Komponenten zusammengesetzt. Zentral liegt ein Heterodimer, das bei CD4⁺-Zellen aus einer α - und einer β -Kette aufgebaut ist. Diese Ketten besitzen einen variablen Teil, der der Antigenerkennung und Antigenbindung dient, und einen konstanten Teil, der mit seinem Ende in der Zellmembran verankert ist. Mit der α - und β -Kette assoziiert ist ein Homodimer aus ζ -Ketten und ein Komplex aus Proteinen, der in seiner Gesamtheit CD3 genannt wird. Darunter fallen eine γ -, eine δ - und je zwei ϵ -Ketten. Neben CD3 sind in CD4⁺-Zellen das costimulatorische CD28-Molekül und das mit MHCII-Molekülen interagierende CD4 mit dem TCR verbunden. CD28 wirkt als Signalverstärker des TCR-Signals. CD4 ist als Corezeptor für die Erkennung des Antigens nötig. Das Protein besteht aus vier hintereinander angeordneten Immunglobulindomänen, die in den extrazellulären Raum hineinragen [36, 62].

Bei Kontakt des TCR mit einem Antigen, kommt es durch Kinasen der Src-Familie zu einer Phosphorylierung der "immunoreceptor tyrosin-based activation motifs" (ITAMs), welche auf den CD3- und den ζ -Ketten liegen. Dem folgt die Aktivierung des ζ -Ketten assoziierten Proteins ZAP-70. Dieses phosphoryliert das Adapterprotein SLP76, wodurch sowohl Ras-induzierte Kinasekaskaden als auch Phospholipase C- γ (PLC- γ) aktiviert werden. In die Plasmamembran eingelagertes Phosphatidylinositol-diphosphat (PIP₂) wird durch PLC- γ in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃) gespalten. DAG aktiviert Proteinkinase C (PKC), IP₃ initiiert durch die Bindung an den IP₃-Rezeptor im Endoplasmatischen Retikulum (ER) die Ca²⁺-Speicherentleerung. Freies Ca²⁺ wird in das Zytosol der Zellen freigesetzt. Das Ca²⁺-Signal wird durch die Öffnung von Ca²⁺ release-activated Ca²⁺- (CRAC-) Kanälen, die einen Ca²⁺-Einstrom über die Plasmamembran ermöglichen, verstärkt und aufrechterhalten. Der CRAC-Kanal, der nach dem zuerst in Mastzellen gefundenen Kanal benannt ist [27], gehört zur Gruppe der speichergesteuerten Kanäle („store-operated channels“, SOCs). Diese öffnen sich auf das Signal der Speicherentleerung des ER [54]. Im Gegensatz zu anderen SOCs zeichnet sich der CRAC-Kanal durch eine besonders hohe Selektivität für Ca²⁺ aus. Die Eigenschaften des CRAC-Stroms sind seit seiner Entdeckung gut charakterisiert, allerdings besteht hinsichtlich des molekularen Aufbaus und des Aktivierungsmechanismus noch Unklarheit (Abschnitt 2.2.2) [4, 5, 6, 37].

Die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration gilt als Schüsselsignal für die Aktivierung der Zelle. Dadurch wird Calcineurin aktiviert, das Calmodulin bindet und den Transkriptionsfaktor NFATc (nuclear factor of activated T-cells, cytosol) dephosphoryliert [8, 77]. Bereits 1991 konnten Liu *et al.* über die Inhibition von Calcineurin durch Cyclosporin A und FK506 mit der Folge einer schweren Immunsuppression die Wichtigkeit dieser Calcium-abhängigen Kaskade zeigen. Die

Dephosphorylierung von NFATc hat die Translokation in den Zellkern zur Folge. Dort bildet es einen Komplex mit dem Transkriptionsfaktor NFATn (nuclear factor of activated T-cells, nucleus), dessen Synthese durch DAG über PKC aktiviert wurde. Dies führt zur Transkription für die Immunantwort wichtiger Zytokine wie zum Beispiel des Interleukin-2 (IL-2)-Gens. Die IL-2-Produktion beginnt binnen Sekunden bis Minuten nach Aktivierung der Zellen. IL-2 stimuliert die Zelle und andere B- und T-Zellen über den IL-2-Rezeptor im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus zur klonalen Proliferation. Neben NFAT werden weitere Transkriptionsfaktoren wie NF κ B (nuclear factor- κ B), Sp1, CTF und Gal4 (als Cofaktoren) aktiviert [38]. Über die Produktion und Sekretion zahlreicher Zytokine werden weitere Zellen aktiviert und zur Abwehr des Antigens eingesetzt.

Der bedeutsame Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran ist durch das Schließen der CRAC-Kanäle limitiert. Durch einen negativen Feedback-Mechanismus kommt es bei einer starken Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Inaktivierung der Kanäle [27]. In die Regulation der CRAC-Kanäle und somit des Ca^{2+} -Einstroms sind Mitochondrien involviert. Wird die Zelle fokals stimuliert, wandern die Mitochondrien in Richtung IS [63]. Sie fungieren nahe der Plasmamembran als Ca^{2+} -Puffer, indem sie Ca^{2+} über einen Ca^{2+} -Uniporter aufnehmen und in einer Ruhephase der Zelle über einen Na^+ -Austauscher wieder abgeben können [18]. Somit wird die schlagartige Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in der akuten Aktivierungsphase verhindert, aber gleichzeitig eine Rückkehr zur Ruhe- Ca^{2+} -Konzentration verzögert [28, 29]. Es kommt zur Ausbildung eines Plateaus, in dem die Ca^{2+} -Konzentration gleichmäßig erhöht bleibt.

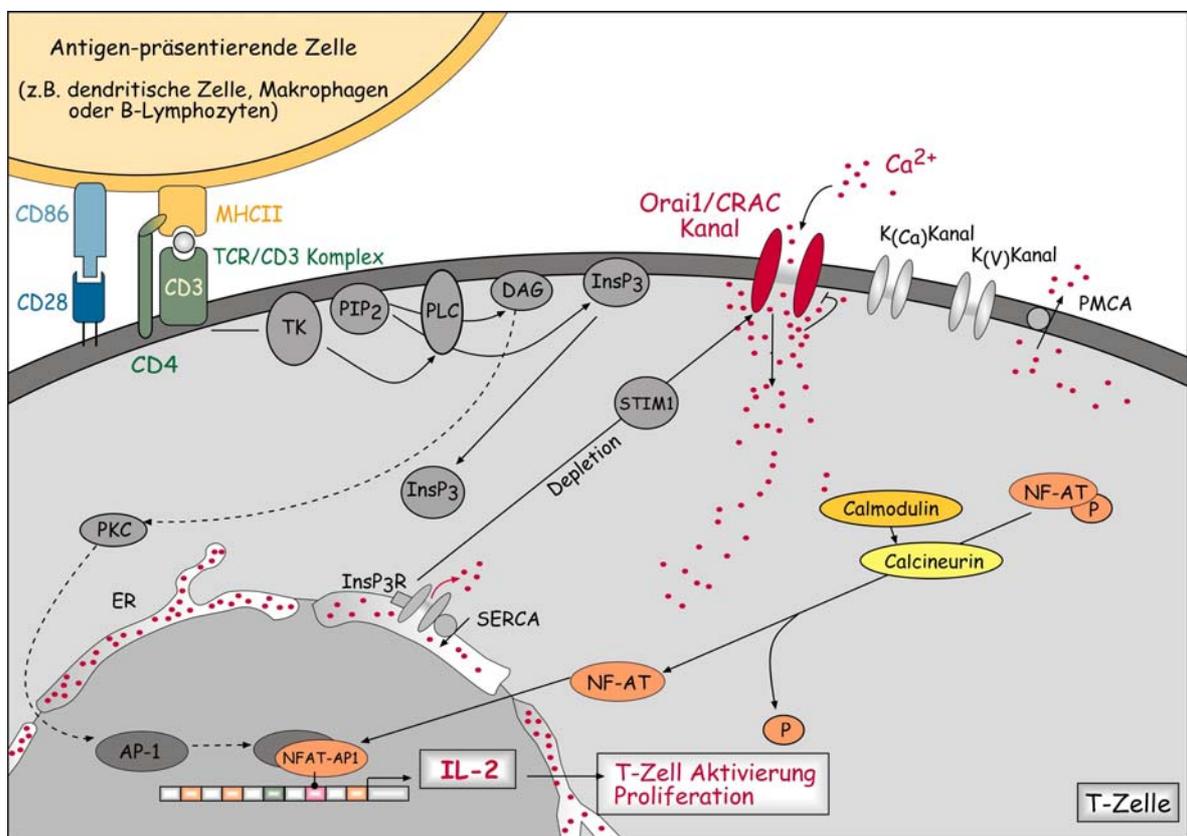


Abb. 2.1 Modell der Signalkaskaden in aktivierten CD4^+ -Zellen. Die Stimulation des TCR-Komplexes durch den Antigen/MHCII-Komplex einer APC führt über mehrere Zwischenschritte, an denen Tyrosinkinasen beteiligt

sind, zur Aktivierung der PLC. PLC spaltet plasmamembranständiges PIP₂ in DAG und IP₃. DAG aktiviert PKC, die die NFATn-Synthese anregt. IP₃ dagegen bindet an IP₃-Rezeptoren in der Membran des ER, was zu einer Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER führt. Dadurch kommt es zur Öffnung von CRAC-Kanälen in der Plasmamembran, durch die Ca²⁺ aus dem Extrazellulärraum in die Zelle einströmt. Eines der Signalmoleküle, die durch Ca²⁺ aktiviert werden, ist Calcineurin. Durch die Ausbildung eines Calcineurin/Calmodulin-Komplexes kommt es über eine Dephosphorylierung zur Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT in den Nukleus, welcher eine Schlüsselrolle bei der Expression wichtiger Cytokine spielt. Die SERCA-Pumpen, die in der Membran des ERs lokalisiert sind, sorgen für die Wiederauffüllung der Ca²⁺-Speicher im ER.

In der vorliegenden Dissertation wurden IL-2-Sekretion und Proliferation aktivierter CD4⁺-Zellen bestimmt. Dadurch ließ sich die Immunantwort der Zellen quantifizieren. Die physiologische Stimulation von CD4⁺-Zellen wird im menschlichen Körper über APCs vermittelt. Im Rahmen der Proliferationsbestimmung weisen APCs jedoch eine eigene Stoffwechselaktivität auf, die nicht differenziert aus der Gesamtstoffwechsellaage herausgerechnet werden kann. Deswegen konnten APCs für diese Messungen nicht als CD4⁺-Zell-Stimulus eingesetzt werden. Um die CD4⁺-Zellen dennoch auf möglichst physiologische Weise zu aktivieren, wurden Polystyrenmikropartikel (= Beads) mit einem Durchmesser von 5,7 µm als Imitat von APCs eingesetzt. Um eine spezifische Stimulation des TCRs der Zellen zu erreichen, wurden die Beads mit Antikörpern gegen CD3 und das costimulatorische CD28 beschichtet. So konnte sicher davon ausgegangen werden, dass die Zellen nur über oben beschriebene Kaskaden aktiviert wurden und die gemessene Aktivität des Proliferationsassays ausschließlich auf dem Stoffwechsel der CD4⁺-Zellen beruhte. Die Antikörper-beschichteten Beads werden in der Forschung zur klonalen T-Zell-Expansion zum Beispiel bei Tumor-Patienten eingesetzt, deren Mangel an T-Zellen zur Immundefizienz führt [10, 33].

2.2.2 Aktivierungsmechanismen des CRAC-Kanals

Der CRAC-Kanal wird durch die Entleerung intrazellulärer Ca²⁺-Speicher aktiviert. Dies geschieht in CD4⁺-Zellen physiologisch durch Stimulation des TCR mit anschließender IP₃-Produktion und IP₃-Rezeptor-Interaktion. Mit Thapsigargin, welches durch Inhibierung der sarkoplasmatischen Retikulum Calcium ATPase (SERCA) eine Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER generiert, wurde eine pharmakologische Stimulationsalternative gefunden (Abbildung 2.1).

Der exakte Mechanismus, wie der CRAC-Kanal als Folge der Speicher-Entleerung aktiviert wird, ist noch ungeklärt. Es herrschen drei Hypothesen vor (siehe auch Abschnitt 2.4):

1. Aktivierung über einen Botenstoff, der vom ER freigegeben wird und zum CRAC-Kanal diffundiert
2. Aktivierung über eine direkte Interaktion von ER und Plasmamembran
3. Aktivierung über Fusion von CRAC-Kanal-enthaltenden Vesikeln mit der Plasmamembran

Zu 1. Aktivierung über einen Botenstoff

Das erste Erklärungsmodell besteht darin, dass bei Eingang eines Signals zur Speicherentleerung ein CRAC-aktivierender Botenstoff im ER gespeichert ist oder auch de novo synthetisiert wird. Dieser

könnte durch die ER-Entleerung ins Zytosol gelangen und zu den in der Plasmamembran gelegenen CRAC-Kanälen diffundieren.

In diesem Zusammenhang gelang es Randriamampita und Tsien [64] im Jahre 1993, einen Faktor aus aktivierten Jurkat-T-Zellen zu isolieren, der einen Ca^{2+} -Einstrom evoziert. Dieser Faktor wurde Calcium Influx Factor (CIF) genannt. Jurkat-T-Zellen entstammen einer immortalisierten, humanen T-Zelle und werden üblicherweise als Modell-Zelllinie zur Untersuchung der T-Zell-vermittelten Immunantwort eingesetzt. Die Injektion von CIF führte in verschiedenen Zell-Typen zu Ca^{2+} -Einstrom, was bedeutete, dass die CIF-Produktion offensichtlich nicht spezifisch für T-Zellen ist [9]. Ein möglicher Wirkmechanismus wurde in der Arbeitsgruppe um V. M. Bolotina aufgezeigt: CIF aktiviert die Ca^{2+} -unabhängige Phospholipase A_2 (iPLA₂), die die Öffnung von SOCs triggert [70]. Jedoch werden in Jurkat-T-Zellen auch unselektive Kanäle durch CIF geöffnet, die nicht durch Speicherentleerung aktiviert werden können [74]. Deswegen bleibt die These der Aktivierung des CRAC-Kanals ausschließlich durch CIF eher zweifelhaft. Sowohl dessen Proteinzusammensetzung als auch sein exakter Wirkmechanismus sind bis heute ungeklärt.

Um die Annahme der Existenz eines Botenstoffs zu festigen, bedarf es im Wesentlichen erst der molekularen Identifizierung und der Isolierung eines der Inhaltsstoffe von CIF oder eines neuen Botenstoffes.

Zu 2. Interaktion von ER und Plasmamembran

Die Hypothese, die Aktivierung des CRAC-Kanals könne, ähnlich wie in Muskelzellen, durch eine Verknüpfung von ER und Plasmamembran geschehen, wurde zuerst von R. F. Irvine [32] aufgestellt und von M. J. Berridge [04] weiterentwickelt. Während im Muskel Dihydropyridin-sensitive Ca^{2+} -Kanäle der Plasmamembran direkt an Ca^{2+} -freisetzende Ryanodin Typ I-Rezeptoren des Sarkolemms gekoppelt sind, wurde äquivalent dazu in T-Zellen angenommen, dass die IP₃-Rezeptoren im ER unmittelbar mit den speichergesteuerten Kanälen in der Plasmamembran verbunden sind. Wie in Muskelzellen müsste so der Ca^{2+} -Einstrom innerhalb weniger Millisekunden aktiviert werden können. Allerdings öffnen speichergesteuerte Kanäle trotz der schnell eintretenden Speicherentleerung in den meisten Zelltypen eher langsam. Dies führte die Arbeitsgruppe um D. L. Gill zu der Theorie, die unter der Bezeichnung „secretion-like coupling model“ bekannt ist [55]. Nach wie vor geht Gill davon aus, dass speichergesteuerte Kanäle durch Bindung des IP₃-Rezeptors aktiviert werden; allerdings sind in diesem Modell die Komplexe nicht vorgeformt, sondern müssen erst gebildet werden. Auf die Entleerung der Ca^{2+} -Speicher hin bewegt sich das ER zur Plasmamembran. Erst nach optimaler Anpassung der beiden Membransysteme findet die Verkopplung zwischen IP₃-Rezeptor und Kanal statt. Dieser Ablauf mit einer relativ langsamen ER-Bewegung passt besser zu der verzögerten Aktivierung von speichergesteuerten Kanälen.

1997 veröffentlichten H. Sugawara *et al.* Experimente in IP₃-knock-out Zellen. In dieser speziellen B-Zelllinie wurde eine normale Entwicklung des Ca^{2+} -Einstroms und der CRAC-Aktivierung detektiert

[75]. Dies wiederum würde bedeuten, dass keine Interaktion zwischen IP₃-Rezeptor und Kanal für Ca²⁺-Einstrom notwendig ist.

Dennoch ist nicht ausgeschlossen, dass sich nicht andere Proteine des ERs mit den Kanälen der Plasmamembran verbinden und diese durch die Verkopplung aktivieren. STIM1 (stromal interaction molecule) könnte solch ein Protein darstellen, das eine derartige Verknüpfung ermöglicht (Abschnitt 2.4).

Zu 3. Fusion von CRAC-Kanal-enthaltenden Vesikeln mit der Plasmamembran

Das Fusionsmodell nimmt an, dass CRAC-Kanäle in Ruhe nicht in die Membran eingebaut sind, sondern in Vesikeln im Zytoplasma vorliegen. Der Mechanismus, über den die Vesikel nach Speicherentleerung in die Membran gelangen, wurde dabei allerdings nicht geklärt. Das Modell wurde durch Experimente unterstützt, in denen Exozytose oder Vesikelfusion beeinträchtigt wurden. Zum Beispiel konnte speichergesteuerter Ca²⁺-Einstrom in HEK-Zellen durch Botulinumtoxin A oder Tetanustoxin antagonisiert werden [01]. Die beiden Toxine hemmen SNAP-25, das zu der Gruppe der SNARE-Komplex-Proteine gehört. Diese sind unabdingbar für die Fusion von Vesikeln mit der Zellmembran. Die Inhibition der Kanäle durch Blockierung einer Vesikelfusion bot einen Anhaltspunkt dafür, dass die Kanäle erst in die Membran eingebaut werden. Zudem erklärte dieses Modell die zeitlich verzögerte Aktivierung der CRAC-Kanäle.

Drei Jahre später wurde jedoch von der Arbeitsgruppe um S. Grinstein gezeigt, dass SNAP-25 von HEK-Zellen nicht exprimiert wird [68], sodass eine beeinträchtigte Vesikelfusion nicht mehr für die Inhibition des Ca²⁺-Einstroms verantwortlich gemacht werden konnte. Da der CRAC-Kanal bislang ausschließlich über seine elektrophysiologischen Eigenschaften detektiert wurde und sich in Vesikeln keine Ströme ableiten lassen, bleibt es unmöglich, den CRAC-Kanal in Vesikeln nachzuweisen, solange seine molekulare Struktur nicht bekannt ist. Deswegen wurde das Fusionsmodell seither nicht mehr weiterentwickelt.

Die Familie der TRP-Kanäle (Abschnitt 2.3) stellen seit langem einige potentielle Kandidaten, Teile des CRAC-Kanals oder den CRAC-Kanal selbst zu bilden. Mitglieder der TRP-Kanal-Familie wurden sowohl mit rezeptor- als auch mit speichergesteuertem Ca²⁺-Einstrom in Verbindung gebracht, wobei eine Aktivierung über Speicherentleerung für manche Kanäle in unterschiedlichen Zelltypen nachgewiesen werden konnte [49]. Dazu zählen insbesondere die Mitglieder der TRPC-Familie [41, 42, 52, 78, 87, 88, 89].

Die Identifizierung des Proteins Orai1 und die Entdeckung der wichtigen Rolle von STIM1 für den CRAC-Strom (Abschnitt 2.4) fielen zeitlich gesehen etwa in die Mitte der vorliegenden Dissertation. Damit wurden zwei weitere wichtige Proteine gefunden, die die CD4⁺-Zell-Aktivierung essentiell beeinflussen. Durch diese beiden für den CRAC-Strom entscheidenden Proteine ist die vollständige Aufklärung des Aktivierungsmechanismus des CRAC-Kanals bedeutend näher gerückt.

2.2.3 BTP2: ein CRAC-Kanal-Inhibitor mit noch ungeklärtem Mechanismus

CRAC-Kanäle weisen aufgrund ihrer Lokalisation in der Plasmamembran eine gute Zugänglichkeit auf und stellen somit ein exzellentes, pharmakologisches Ziel zur Modulation der Immunantwort dar. Um die Funktion der CRAC-Kanäle noch detaillierter zu untersuchen, wurde ein spezifischer Blocker gesucht, der den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom inhibiert. Die Arbeitsgruppe um M. Hoth fand 2003 heraus, dass 3,5-Bis-Trifluoromethyl-Pyrazol 2 (BTP2) den Ca^{2+} -Einstrom und die IL-2-Produktion in Lymphozyten hemmt [94]. Die genaue Wirkung von BTP2 auf die Zelle ist noch ungeklärt. Bislang bestehen diesbezüglich drei Thesen:

1. Die Inhibition des CRAC-Kanals

Im Jahre 2003 wurde von Zitt *et al.* gezeigt, dass BTP2 den CRAC-Strom in primären T-Zellen mit einem IC_{50} -Wert von ca. 10 nM blockiert [94]. BTP2 hatte keinen Einfluss auf die Speicherentleerung, Mitochondrien, K^{+} -Kanälen oder Ca^{2+} -Pumpen, sodass von einer hochspezifischen Inhibition ausgegangen wurde. Außerdem blockierte BTP2 den CRAC-Strom unabhängig von der Stimulationsmethode der Zellen. Sowohl nach Stimulation mit αCD3 -Antikörpern oder mit IP_3 als auch nach Speicherentleerung durch Thapsigargin wurde der Ca^{2+} -Einstrom inhibiert. Neben CRAC-Kanälen wurden die Ca^{2+} -abhängige Genexpression von IL-2, IL-5 und Interferon- γ sowie die Proliferation der T-Zellen gehemmt. BTP2 wurde als erster hochpotenter und hochspezifischer CRAC-Kanal-Inhibitor bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass BTP2 nach intrazellulärer Injektion keine Wirkung auf den CRAC-Strom hat, d.h. es wirkt nicht intrazellulär. Allerdings ließ sich das BTP2 nicht auswaschen. Es wurde kein Weg gefunden, die Wirkung der Kanal-Blockade wieder aufzuheben. Dies bedeutet, dass die Bindung an den Kanal - möglicherweise durch den Einbau des BTP2 in die Membran - irreversibel ist. Wie genau allerdings BTP2 am Kanal selbst agiert und blockiert, blieb ungeklärt.

Im Gegensatz zu späteren Arbeiten wurde die 50%ige Inhibition des Ca^{2+} -Einstroms erst nach etwa 1,5-stündiger Inkubation der Zellen mit BTP2 (200 nM) gemessen.

2. Die Inhibition von TRPC3 und TRPC5

In der Arbeitsgruppe um D. Gill wurde 2005 gezeigt, dass durch BTP2 der Ca^{2+} -Einstrom in HEK 293 Zellen, B-Zellen (DT40 B-Zellen) und glatten Muskelzellen (A7r5 Zellen) schon nach 10 Minuten blockiert wird [24]. Der IC_{50} -Wert wurde um 200 nM angegeben. BTP2 blockierte TRPC3- und TRPC5-Ströme nach Aktivierung durch DAG. Der Ca^{2+} -selektive Kanal TRPV6 wurde durch BTP2-Zugabe nicht inhibiert. Im Zuge dieser Experimente wurde außerdem gezeigt, dass BTP2 die Zellmembran nicht depolarisiert. Das bedeutet, dass BTP2 nicht die treibenden Kräfte für die einzelnen Ionenströme über die Zellmembran verändert.

3. Die Aktivierung von TRPM4

Im Gegensatz zu Zitt *et al.* wiesen Takezawa *et al.* in Jurkat-T-Zellen einen inhibierenden BTP2-Effekt nach einer Inkubationszeit von nur wenigen Minuten nach [76]. Neben der Blockade des CRAC-Stroms wies die Arbeitsgruppe um R. Penner einen Anstieg der TRPM4-Aktivität nach BTP2-Zugabe im nanomolaren Bereich nach. TRPM4 ist ein unselektiver Kationenkanal, der durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert wird und bei seiner Öffnung den Einstrom von vorrangig Na^+ -Ionen entlang des Konzentrationsgradienten in die Zelle induziert. Über die daraus resultierende Depolarisation der Plasmamembran wird die treibende Kraft für den Ca^{2+} -Einstrom gesenkt. So wird die CRAC-Aktivität gesenkt. Die Inhibition des CRAC-Kanals ist entlang dieses Mechanismus als indirekt anzusehen. Dennoch wurde BTP2 wie schon von Zitt *et al.* als hochspezifischer, momentan potentester und selektivster CRAC-Kanal-Blocker bezeichnet.

Diese inhibierende Eigenschaft wurde in der vorliegenden Dissertation benutzt. Die Blockade des CRAC-Stroms in primären CD4^+ -Zellen durch BTP2 wurde als Kontrolle eingesetzt. Nach der Behandlung mit BTP2 war die Proliferation der CD4^+ -Zellen deutlich reduziert (Abschnitt 4.3 und 5.1).

2.3 Familie der TRP-Kanäle

Transient receptor potential (TRP) Ionenkanäle bezeichnen eine Superfamilie von Kationen-Kanälen. Sie wurden nach ihrer Rolle in Drosophila-Zellen benannt, wo TRP-Kanäle über einen PLC-abhängigen Prozess die Signaltransduktion in Fotorezeptoren generieren [22]. TRP-Kanäle in Säugetierzellen zeigen eine außerordentliche Vielfalt an Ionenselektivität und Aktivierungsmechanismen, manche scheinen sogar über bislang nicht bekannte Mechanismen reguliert zu sein. Die Funktionen der verschiedenen Kanäle reichen von wichtigen Rollen in der Wahrnehmung von Schmerz und Temperatur über Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Absorption zu Endothelpermeabilität und der Proliferation glatter Muskelzellen [7, 21, 47].

Im Jahre 2002 wurde von Montell *et al.* eine neue und einheitliche Nomenklatur für die TRP-Kanal-Familie eingeführt [50]. Nach dieser umfasst die Familie der TRP-Kanäle drei Unterfamilien, TRPC- (canonical-), TRPM- (melastatin-) und TRPV- (vanilloid receptor-) Kanäle (Abbildung 2.2). Die TRPC-Unterfamilie umfasst TRPC1 bis TRPC7, wobei das humane und bovine TRPC2 als Pseudogen gilt, das nicht exprimiert wird. Zur TRPM-Gruppe gehören TRPM1 bis TRPM8, zu den TRPV-Kanälen TRPV1 bis TRPV6. Von D.E. Clapham wurden später noch drei weitere Untergruppen beschrieben, deren Mitglieder in keine der bereits bestehenden Gruppen passen [7]. Dazu gehören TRPA, TRPP und TRPML.

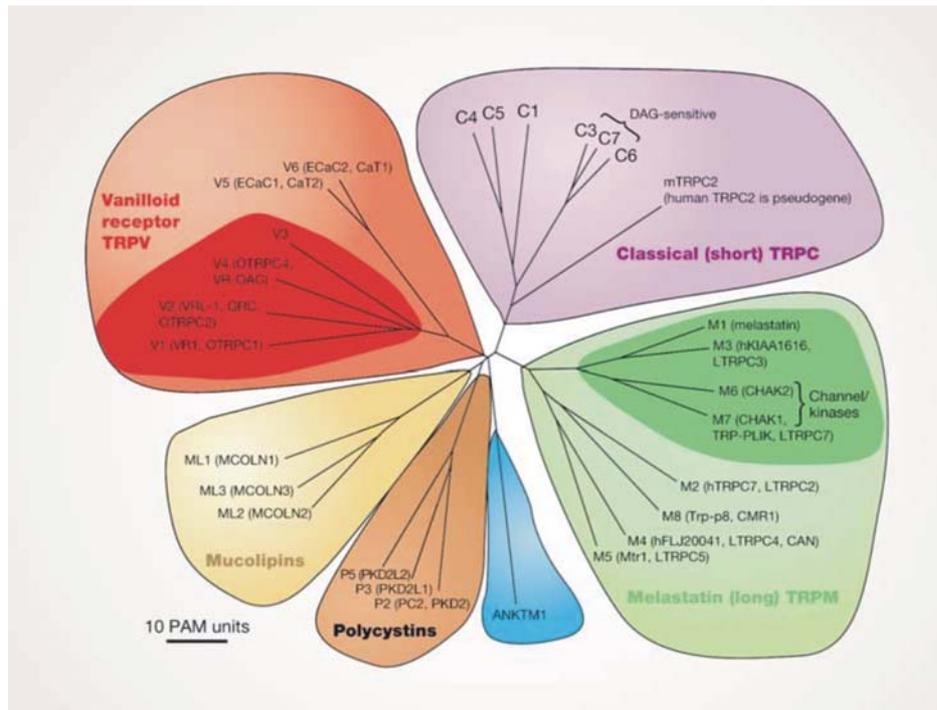


Abb. 2.2 Der Stammbaum der in Säugerzellen vorkommenden TRP-Kanälen besteht aus den drei großen Unterfamilien TRPC, -M und -V und den drei kleineren Unterfamilien TRPA, -P und -L. Durch die Angabe der PAM (point accepted mutations) Einheiten wird auch die evolutionäre Entfernung zwischen den einzelnen Kanälen dargestellt. (Abbildung entnommen aus D.E. Clapham, Nature rev. (2003) 426.)

In Säugetierzellen werden TRP-Kanal-Proteine ungefähr 30 Genen kodiert. Allen Kanälen gemeinsam sind sechs Transmembrandomänen (Abbildung 2.3). Die fünfte und sechste werden von einem hydrophoben Segment getrennt, von dem angenommen wird, dass es für die Porenbildung verantwortlich ist. Vier solcher Proteine können sich in der Plasmamembran zu Tetrameren zusammenlagern und dadurch eine kationendurchlässige Pore bilden. Im Detail wurden die Poren- und Permeabilitätseigenschaften der TRP-Kanäle von B. Nilius untersucht [53].

In der vorliegenden Dissertation wurde ein Fokus auf die Untersuchung der drei Hauptgruppen TRPC, TRPM und TRPV gelegt. Durch die Arbeit mit primären $CD4^+$ -Zellen wurde eine weitere Selektion aus der TRP-Familie getroffen, da nicht alle TRP-Kanäle in jedem Zelltyp exprimiert sind. Das Expressionsmuster von TRP-Kanälen in primären, unstimulierten $CD4^+$ -Zellen wurde in der Diplomarbeit von Melodie-Jo Wolfs ausführlich untersucht. Aus der TRPC-Unterfamilie fand sie lediglich TRPC1 und TRPC3. In der TRPM-Gruppe wies sie zunächst nur von TRPM2, TRPM5 und TRPM7 eine konstante Expression nach. Später wurde im Zuge der Arbeit mit stimulierten $CD4^+$ -Zellen noch TRPM4 in das Expressionsmuster aufgenommen. Außer TRPV4 wurden alle Mitglieder der TRPV-Unterfamilie gefunden. Daraus ergab es sich, dass zehn Kandidaten aus der TRP-Kanal-Familie auf ihre Funktion für die Aktivierung in primären $CD4^+$ -Zellen untersucht wurden: TRPC1, TRPC3, TRPM2, TRPM5, TRPM7, TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV5 und TRPV6.

Im Verlauf der Untersuchungen der vorliegenden Dissertation wurde durch viel versprechende erste Ergebnisse ein Schwerpunkt auf TRPC3 gelegt (Abschnitt 4.6 und 4.7). TRPC3 ist einer der am längsten bekannten und am besten untersuchten TRP-Kanäle. Die humane TRPC3-cDNA wurde schon 1996 aus HEK 293 Zellen isoliert [95]. Die meisten Studien belegen, dass TRPC3 PLC-abhängig aktiviert wird und einen unselektiven Kationenkanal formt [48]. Wichtig hierbei ist, dass es bislang nicht

gelungen ist, die Existenz eines homomeren TRPC3-Kanals nachzuweisen. Homomer meint in diesem Sinne ein TRP-Tetramer, welches aus vier identischen TRP-Protein-Einheiten besteht. Stattdessen scheint TRPC3 mit einer Vielfalt an Partnerproteinen assoziieren zu können und dadurch in der Lage zu sein, unterschiedliche, heteromere Kationenkanäle zu formen. Deswegen spricht man von einem heteromeren Aufbau des TRPC3-Kanals. Hofmann *et al.* zeigten, dass sich die nahen Verwandten TRPC6 und TRPC7 mit TRPC3 zusammenlagern können, um eine Kanalpore zu formen [26]. Bei der Ausschaltung von entweder TRPC3 oder TRPC6 ersetzen sich sogar die jeweiligen Kanäle. Auch TRPC1-TRPC3- und TRPC4-TRPC3-Interaktionen wurden beschrieben [41, 58, 79, 88].

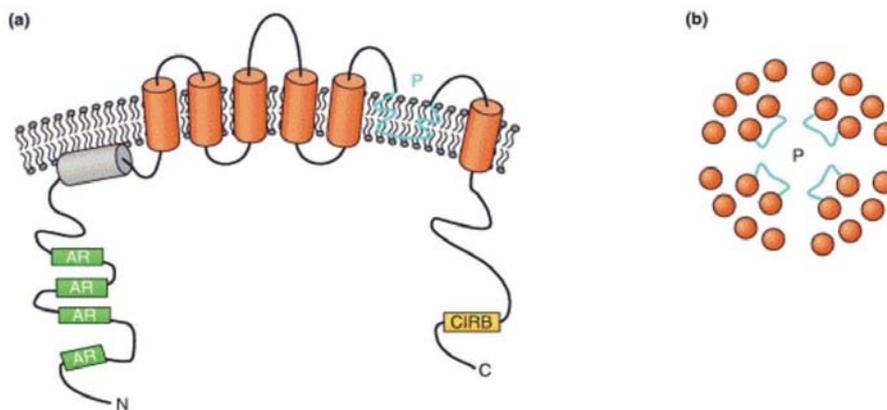


Abb. 2.3 Aufbau eines TRP-Kanals am Beispiel des TRPC3-Proteins: (a) Die TRPC3-Untereinheiten bestehen aus sechs Transmembran-Segmenten, einem hydrophoben Segment (P), welches an der Porenbildung beteiligt ist und einem weiteren hydrophoben Segment, das der Innenseite der Membran anliegt (grau). Der N-Terminus enthält vier „ankyrin-like“ Einheiten („ankyrin-like repeats“, AR), der C-Terminus enthält die CIRB-Region, die sowohl an Calmodulin als auch an den IP_3 -Rezeptor binden kann (calmodulin inositol-triphosphate-receptor binding region). (b) Die Formation des Kanals erfordert die Zusammenlagerung von vier Untereinheiten. Die Abbildung zeigt, wie sich die Untereinheiten mit den Transmembran-Domänen und dem hydrophoben Segment P in der Plasmamembran räumlich anordnen. Ein Tetramer aus vier TRPC3-Untereinheiten konnte allerdings bislang nicht nachgewiesen werden. (Abbildung entnommen aus J.W. Putney Jr, Cell Biology (2004) 14.)

Eine erste Verbindung zwischen TRPC3 und der Aktivierung humaner $CD4^+$ -Zellen wurde von Philipp *et al.* geknüpft [57]. Nachdem 1995 die Jurkat-T-Zell-Mutanten CJ1 bis CJ5 generiert wurden, deren CRAC-Strom signifikant reduziert war [13], konnten Philipp *et al.* in diesen Zellen einen Defekt im TRPC3-Gen zeigen. Die Überexpression von TRPC3 in den Mutanten-Zellen führte zu einer Wiederherstellung des TCR-abhängigen Ca^{2+} -Einstroms und zu einer Erhöhung der CRAC-Strom-Amplitude in Patch-Clamp-Experimenten. Weitere wichtige Hinweise lieferten die Untersuchungen der Aktivierungsmechanismen von TRPC3. Der Kanal kann durch DAG [25], durch Ca^{2+} [93] wie auch durch Speicherentleerung [80] aktiviert werden. Außerdem reguliert eine Src-Kinase die Kanal-Öffnung [81]. Diese Src-Kinase ist eine in T-Zellen bedeutsame, vom TCR gesteuerte Kinase.

Ein Zusammenspiel von Orai1 (Abschnitt 2.4) und TRPC-Kanälen wurde von der Arbeitsgruppe um L. Birnbaumer gezeigt [39]. In dieser Publikation wird berichtet, dass durch Coexpression von Orai1 in TRPC3- und TRPC6-überexprimierenden HEK 293 Zellen der speichergesteuerte Ca^{2+} -Einstrom erhöht werden konnte. Als Modell wurde Orai als regulatorische Untereinheit von speichergesteuerten

Kanälen beschrieben, die aus TRPC-Untereinheiten bestehen (Abschnitt 5.2, Abbildung 5.2). Insgesamt gibt es viele, voneinander unabhängige Hinweise, dass TRPC3-Kanäle in CD4⁺-Zellen eine bedeutsame Rolle spielen.

2.4 STIM1 und Orai1: Wichtige Komponenten zur Aktivierung des CRAC-Kanals und des CRAC-Kanals selbst

Mit der Entdeckung der wichtigen Rollen von STIM1 und Orai1 für T-Zell-Aktivierung wurden zwei Proteine gefunden, welche die Aufklärung um den Aktivierungsmechanismus des CRAC-Kanals entscheidend beeinflussen. Die Wichtigkeit der beiden Proteine für den CRAC-Strom wurde im Jahre 2006 durch die Nutzung von RNA-Interferenz-Technik (RNAi, Abschnitt 2.5) nachgewiesen.

Das erste Protein wurde zeitgleich von zwei unterschiedlichen Gruppen in *Drosophila* S2- und in humanen HeLa-Zellen entdeckt [40, 65]. Beide Gruppen zeigten, dass es bei einer Reduktion entweder des STIM Proteins in *Drosophila* Zellen oder des STIM1 Proteins in Säugetierzellen mittels siRNA (small interfering RNA, Abschnitt 2.5) zur Störung des Ca²⁺-Einstroms kam: nach einer Thapsigargin induzierten Ca²⁺-Speicherentleerung waren die Zellen nicht mehr dazu in der Lage, den speichergesteuerten Ca²⁺-Einstrom zu aktivieren.

Während für die Identifizierung des STIM1 ein auf die Gene mit möglicher Ionenkanal- oder Signalübermittlungsfunktion begrenzter Screen durchgeführt wurde, wurde in einem Screen des gesamten *Drosophila*-Genoms das zweite Protein entdeckt [15, 82, 91]. Dieses Protein, genannt Orai1 oder CRACM1, besitzt weder Ähnlichkeit noch Homologie zu allen bisher bekannten funktionellen Proteinen. Nach der erst-publizierten Beschreibung des Proteins wurde seine Identifizierung durch die Tatsache ermöglicht, dass seine Mutation eine Immundefizienz (SCID = severe combined immunodeficiency) hervorruft. Die Entdeckung dieser beiden Proteine STIM1 und Orai1 belebte die Erforschung der molekularen Struktur des CRAC-Kanals und der Kontrollmechanismen des CRAC-Stroms.

STIM1

Durch Roos *et al.* wurde ein umfangreicher RNAi Screen in *Drosophila* S2 Zellen erarbeitet [65]. Dieser zielte auf jedes Protein mit transmembranen Domänen ab und beinhaltete TRP-Kanäle sowie jedes weitere Protein, das im Zusammenhang mit speichergesteuertem Ca²⁺ Einstrom stand. STIM (stromal interaction molecule), das als Phosphoprotein schon vor mehreren Jahren entdeckt wurde [44, 83], war als einziges von 170 Genen unabdingbar für die Aktivierung des CRAC-Stroms. Die parallele Studie von Liou *et al.*, welche 2304 Proteine erfasste, identifizierte die zwei Säugetier-Homologe STIM1 und STIM2, deren Herunterregulierung den Ca²⁺ Einstrom in HeLa-Zellen reduzierte [40]. Roos *et al.* konnten nur in STIM1- und nicht in STIM2-siRNA-transfizierten Jurkat-T-Zellen einen Effekt auf den Ca²⁺ Einstrom nachweisen [65].

Die Ergebnisse dieser Experimente belegen die wesentliche Rolle von STIM (Drosophila) und von STIM1 (Säugetier) für die Aktivierung von speichergesteuerten Kanälen. Allerdings erhöht die Überexpression von STIM1 den Ca^{2+} -Einstrom nur gering [45, 56]. Außerdem hat das Protein nur eine Transmembran-Domäne. Dadurch ist es unwahrscheinlich, dass STIM1 den CRAC-Kanal selbst bildet. Neue Wege, um die Frage nach der Funktion und Wirkung von STIM1 zu beantworten, wurden in Struktur und Lokalisation des Proteins gesucht.

STIM1 ist sowohl in der Plasmamembran [23, 43, 44, 73, 83, 92] als auch im ER [40, 45, 86] gefunden worden (Abbildung 2.4). Es hat eine Transmembran-Domäne, wobei der N-Terminus entweder ins Lumen des ER oder in den Extrazellularraum zeigt. Dieser Teil des Proteins enthält ein so genanntes EF-Hand-Motif. Roos *et al.* [65] belegten 2005, dass diese EF-Hand als Ca^{2+} -Sensor im ER funktioniert. Außerdem kommen in STIM1 „protein-protein interaction domains“ vor, wozu ein „sterile-alpha motif“ (SAM) auf der luminalen Seite des ERs bzw. im Extrazellularraum und eine „coiled coil region“ im Zytoplasma zählt. Am C-Terminus hat das Protein eine Prolin-Serin-reiche und eine Lysin-reiche Region.

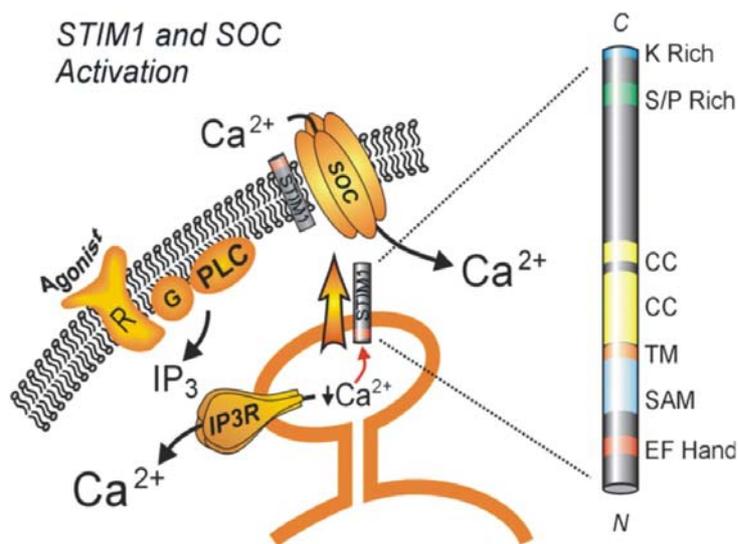


Abb. 2.4 Schematischer Aufbau des STIM1-Proteins und seine Lokalisationen. Durch Bindung von IP_3 an seinen Rezeptor (IP3R) wird Ca^{2+} aus dem ER ins Zytoplasma entleert. Die im ER sinkende Ca^{2+} -Konzentration wird durch die EF-Hand des STIM1 registriert. Dadurch wird STIM1 entweder mit den STIM1-Proteinen der Plasmamembran zu Komplexen multimerisiert (Modell 1), in die Plasmamembran eingelagert (Modell 2) oder zu „punctae“ zusammengelagert, die innerhalb des ER liegen (Modell 3) um von dort aus die SOC-Aktivierung zu regulieren. (Abbildung entnommen aus J.W. Putney: Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores, J Cell Biol 2005 comment.)

Drei mögliche Mechanismen des STIM1-Effektes wurden bislang beschrieben. Die erste Erklärung besagt, dass STIM1 im ER auf den Reiz der sinkenden Ca^{2+} -Konzentration während der Speicherentleerung hin mit den STIM1-Proteinen in der Plasmamembran Komplexe bildet [65]. Diese Komplexe werden zur Aktivierung der CRAC-Kanäle benötigt. Dieser Mechanismus würde auch eine Erklärung dafür liefern, warum sich STIM1 sowohl im ER als auch in der Zellmembran befindet. Das zweite Modell nimmt an, dass alle STIM1-Moleküle vor Stimulation im ER lokalisiert sind. Nach der Speicherentleerung wird STIM1 auf noch ungeklärte Art und Weise zur Plasmamembran transportiert und dort eingebaut [92]. Wie es daraufhin den CRAC-Strom aktiviert, ist ebenfalls unklar. Im dritten, momentan favorisierten Mechanismus wird beschrieben, dass STIM1 sich im ER befindet. In der Arbeitsgruppe um T. Meyer wurden „punctae“ aus zusammengelagerten YFP- (Yellow Fluorescent Protein-)

STIM1 zeigt, die sich nach Speicherentleerung bilden. Sie sind sehr dicht an der Plasmamembran lokalisiert, aber nicht dort eingebaut. In diesem Modell könnten die zytosolisch gelegenen C-Termini mit CRAC-Kanälen interagieren oder sogar selbst einen Teil des Kanals darstellen. Es wird nicht ausgeschlossen, dass STIM1 unter bestimmten Umständen auch in die Plasmamembran eingelagert ist.

Auch wenn der Mechanismus noch nicht eindeutig geklärt ist, steht fest, dass STIM1 essentieller Bestandteil der T-Zell-Aktivierung ist. Dieses Wissen wurde in der vorliegenden Dissertation genutzt. Als Hypothese wurde angenommen, dass die durch Herunterregulierung von STIM1 mittels siRNA hervorgerufene Reduktion des CRAC-Stroms eine Reduktion der Proliferation mit sich bringt. Der Nachweis der reduzierten Proliferation von CD4⁺-Zellen, die zuvor mit siRNA gegen STIM1 transfiziert wurden, war eine wichtige Positivkontrolle für die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation (Abschnitt 2.5 und 4.5.2).

Orai1

Das zweite, für die CRAC-Aktivierung wesentliche Protein wurde Orai1 genannt. In der griechischen Mythologie sind Orai Wächter des Himmels [15]. Zur Orai-Familie gehören Orai1, -2 und -3. Im Zuge einer Linkage-Gen-Analyse, durch die die Lokalisation der Mutation einer seltenen Form von SCID herausgefunden werden sollte, wurde Orai1 identifiziert. Bei der untersuchten SCID-Variante handelte es sich um eine Immundefizienz, die sich durch fehlenden CRAC-Strom in CD4⁺-Zellen auszeichnet. Diese Experimente liefen in Kombination mit einem auf das gesamte Drosophila-Genom ausgeweitete Screening nach Genen, die für die nukleare Translokation des Ca²⁺-aktivierten NFATc benötigt werden [14]. Es wurde gezeigt, dass Orai1 essentiell für Ca²⁺-Einstrom in Drosophila ist. Zusätzlich konnten in T-Zellen von zwei SCID-Patienten und 13 Verwandten niedrigere CRAC-Ströme gemessen werden, die nach Transfektion mit Orai1-Protein wieder hergestellt wurden. Die gefundene Mutation führte bei allen Probanden zu einer veränderten Aminosäure innerhalb der Porenregion des CRAC-Kanals (Arginin zu Tryptophan).

Orai-Proteine sind membrandurchspannende Proteine mit vier Transmembrandomänen [15, 56, 91]. Außer diesen kommen keine bekannten Domänen vor. Im Gegensatz zu STIM1 scheint Orai1 nur in der Plasmamembran lokalisiert zu sein.

In mehreren Arbeitsgruppen wurde eine beträchtliche Erhöhung des CRAC-Stroms um das 50 bis 100-fache nachgewiesen, sobald STIM1 und Orai1 zusammen überexprimiert wurden [56, 72, 91]. Diese Erhöhung konnte durch alleinige Transfektion mit STIM1 nicht erreicht werden. Wurde nur Orai1 transfiziert, ließ sich in Jurkat-T-Zellen [56], RBLs [72] und HEK-Zellen [45] eine Inhibition des CRAC-Stroms detektieren. Aus diesen Versuchen wurde zum Einen geschlossen, dass STIM1 und Orai1 die beiden einzigen benötigten Komponenten sind, um CRAC-Strom zu generieren. Interessanterweise entsprachen jedoch die CRAC-Ströme, die in den STIM1 und Orai1-überexprimierenden Zellen gemessen wurden, nicht exakt den bekannten Charakteristika des CRAC-Stroms. So war zum Bei-

spiel die Durchlässigkeit für Ba^{2+} und Sr^{2+} erniedrigt [27, 56, 96]. Dies spricht dafür, dass für den CRAC-Strom noch weitere Proteine benötigt werden, die allerdings keine limitierende Rolle für die Aktivierung und die Ca^{2+} -Permeabilität des Kanals spielen.

Die Tatsache, dass die Überexpression von Orai1 den CRAC-Strom hemmt, legt die wichtige Vermutung nahe, dass Orai1 mit mindestens zwei weiteren, CRAC-bestimmenden Komponenten interagiert (genauer dazu [60], Abbildung 2). Eine davon stellt vermutlich STIM1, es muss aber noch eine weitere Komponente geben, ansonsten reichte es aus, das endogene STIM1 und das überexprimierte Orai1 zusammenzulagern, um CRAC-Strom zu aktivieren. Wahrscheinlich kommt die Inhibition dadurch zustande, dass es durch ein Überangebot an Orai1 statistisch unwahrscheinlicher wird, dass sich die Komplexe richtig zusammenfinden. Dass sich das überexprimierte Orai1 auch in der Plasmamembran einlagert, wurde von der Arbeitsgruppe um Anjana Rao gezeigt [19].

Die Entdeckung von STIM1 und Orai1 haben die Forschung um speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom entscheidend beeinflusst. Selbst wenn die exakten Mechanismen der Proteine und der Proteininteraktionen noch ungeklärt sind, stehen sie nun als molekulare Werkzeuge zur Verfügung, CRAC-Ströme zu analysieren. Besonders das Zusammenspiel der beiden Proteine und die Interaktion mit weiteren Proteinen wie zum Beispiel TRPC3 [39] birgt möglicherweise Antworten für die ungeklärten Mechanismen der Aktivierung des CRAC-Stroms und damit für die Aufklärung der Entstehung einer effizienten Immunantwort.

2.5 SiRNA Technologie

Seit 1984 von Mizuno *et al.* gezeigt wurde, dass in Bakterien über komplementäre RNA die Expression eines Gens spezifisch inhibiert wird, ist die Genausschaltung durch Antisense-RNA (asRNA) ausführlich untersucht worden [46]. Besonders für Organismen, in denen Knock-Outs nicht möglich sind (wie zum Beispiel primäre, humane Zellen), bot dieser Mechanismus eine neue Möglichkeit der Genregulierung. Von der Arbeitsgruppe um C.C. Mello wurde 1998 publiziert, dass doppelsträngige RNA (dsRNA) in *C. elegans* Gene deutlich effektiver als die jeweiligen Einzelstränge herunterreguliert [16]. Dieselben Autoren führten den Begriff „RNA Interferenz“ (RNAi) für diese Art der Geninhibition ein. Diese wurde nicht als Knock-Out, sondern treffender als Knock-Down bezeichnet. Das Auffinden von in die Zelle gebrachter, größer als 30 Basenpaare langer dsRNA und der komplementären mRNA in Form von 20 bis 23 Nukleotide langer dsRNA trug entscheidend zur Aufklärung des genauen Mechanismus des Gen-Knock-Downs bei [12]. Die RNA-Stücke wurden small interfering RNAs (siRNAs) genannt. In *Drosophila* konnte der Proteinkomplex „Dicer“ als Auslöser für das Zustandekommen der kurzen siRNA-Stücke identifiziert werden [3] (Abbildung 2.5). Dieser zerlegt die lange dsRNA in 21 Nukleotide lange siRNA. Durch die Entdeckung von „RISC“ (RNA induced silencing complex) wurde der Wirkmechanismus der siRNA geklärt [20]. Der Proteinkomplex hat ss-(Einzelstrang-) RNase Aktivität und enthält ein 21mer als RNA Komponente. Die Bindung von RISC an die

siRNA entwindet diese, wobei der Antisense-Strang am Komplex verbleibt. Der neu entstandene Komplex findet die Ziel-mRNA und führt durch Zerstückelung deren Degradation herbei.

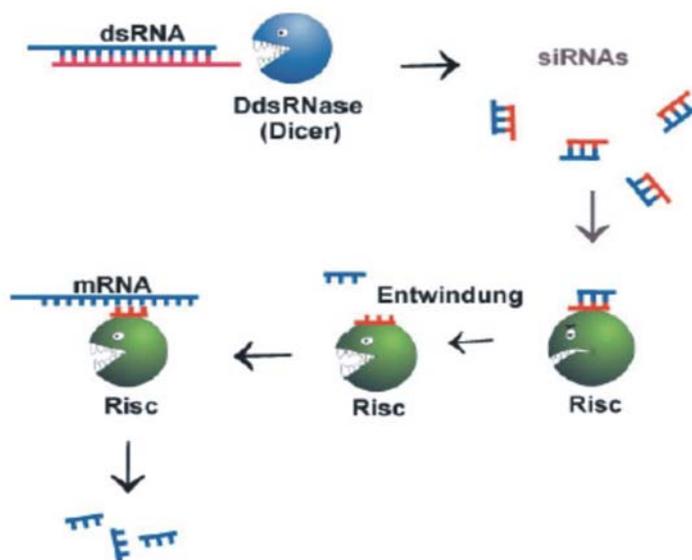


Abb. 2.5 Standardmodell für RNA Interferenz: dsRNA wird von Dicer (ein Homolog der dsRNA-spezifischen RNase-III) in siRNAs zerlegt, siRNAs werden von RISC (RNA Induced Silencing complex mit ssRNase Aktivität) gebunden und entwunden, der Antisense-Strang spezifiziert RISC zur Degradation der Ziel-mRNA. (Abbildung entnommen aus Martens und Nellen, BIOSpektrum Überblick (2002))

RNAi wird in zahlreichen Organismen gefunden. Sie stellt einen wichtigen Abwehrmechanismus gegen Pathogene dar. Hierbei wirken die RISC-Komplexe durch die RNA-Stücke als Träger konservierter, molekularer Marker für den jeweiligen Erreger. Insbesondere bei der Replikation vieler Viren werden dsRNA-Stücke hergestellt, die in Zusammenarbeit von Dicer mit RISC-Komplexen abgebaut werden. Außerdem wird durch RNAi ein Springen mobiler Elemente im Genom verhindert. Dadurch trägt der Mechanismus zur Stabilität des Genoms bei.

SiRNAs werden heute in Medizin und Naturwissenschaft eingesetzt, um spezifische Gene herunterzuregulieren. Durch Einbringen der siRNA in eine Zelle (Transfektion), wird über einen bestimmten Zeitraum die jeweilige mRNA abgebaut. Das entsprechende Protein kann nicht mehr translatiert werden, wodurch die Zelle dann zum Beispiel hinsichtlich der Funktion dieses Proteins analysiert werden kann.

Um die siRNA-Technik optimal in Laborversuchen einsetzen zu können, müssen einige wichtige Bedingungen erfüllt sein. Die siRNA muss zu 100 % komplementär zur Ziel-mRNA sein, denn selbst die Abweichung von nur einem Nukleotid kann die Effizienz der siRNA beeinträchtigen [31]. Außerdem muss geprüft werden, ob die gewählte Sequenz spezifisch für die Ziel-mRNA ist. Das heißt, dass die Sequenz nicht zu weiteren im menschlichen Genom vorkommenden mRNAs komplementär sein darf. Dies kann Computer-gesteuert analysiert werden. Für die Fragestellungen der vorliegenden Dissertation wurden siRNAs gegen die verschiedenen Mitglieder der TRP-Kanal-Familie benötigt. Durch die Ähnlichkeit der einzelnen Proteine und somit der einzelnen mRNAs untereinander lag eine besondere Schwierigkeit darin, spezifische siRNAs herzustellen, die nicht zu den mRNAs weiterer Familienmitglieder komplementär sind.

Die Kriterien für eine effiziente siRNA beruhen aufgrund der Neuigkeit der Technik nicht auf Langzeiterfahrungen. Selbst innerhalb des Zeitraumes der vorliegenden Dissertation wurden neue Bedingungen gewählt, um eine optimale Wirkung der siRNA zu erzielen. Von der anfänglichen Position, siRNA-Sequenzen nach definierten Regeln (wie zum Beispiel für PCR-Primer) zu erstellen, ging man zur Computer-unterstützten Sequenzsuche über. In einer Zusammenarbeit der Firmen Qiagen und Novartis wurden mit einem umfangreichen Screen zahlreiche siRNA-Sequenzen nach einem nicht veröffentlichten Algorithmus auf ihre Effizienz getestet. Mittlerweile kann man die Struktur der jeweiligen mRNA in die Sequenzsuche einbeziehen. Die verschiedenen Arten der siRNA-Ermittlung wurden in der vorliegenden Dissertation berücksichtigt. Deshalb wurden pro Protein jeweils mehrere siRNAs getestet, um über mehrere Algorithmen eine funktionierende siRNA zu finden. Für TRPC3 zum Beispiel wurden acht verschiedene siRNA-Sequenzen eingesetzt, die mit drei verschiedenen Methoden erstellt wurden.

2.6 Fragestellungen

Die Rolle von TRP-Kanälen in primären, humanen CD4⁺-Zellen wurde bislang nicht erforscht. In der vorliegenden Dissertation werden in einem Screening die einzelnen TRP-Kanäle insbesondere im Hinblick auf ihre Funktion für T-Zell-Aktivierung und für die T-Zell-vermittelte Immunantwort untersucht. Hierbei wurden als Parameter für T-Zell-Aktivierung die IL-2-Sekretion und die Proliferation der Zellen gewählt. Die wichtigste Fragestellung lag in der Auswirkung des Knock-downs einzelner Kanäle auf die Proliferation der Zellen. Um dies zu realisieren, musste in Voruntersuchungen die praktische Durchführbarkeit des Projektes überprüft werden. Die Arbeit mit primären Zellen eröffnete weitere Problemstellungen.

- Etablierung einer Methode, mit der IL-2-Sekretion und Proliferation von primären, humanen CD4⁺-Zellen valide bestimmt werden kann. Hierunter fällt auch die Untersuchung optimaler Proliferationsbedingungen für die Zellen, wie zum Beispiel die Untersuchung der Zelldichte und des Zellstimulus.
- Anwendung der Methode auf wechselnde Bedingungen, zum Beispiel die Messung der Zell-Proliferation unter Blockade des CRAC-Kanals oder unter variierenden Ca²⁺-Bedingungen.
- Etablierung der siRNA-Technologie durch qualitative und quantitative Bestimmung der Effizienz der siRNAs und durch Ausarbeitung optimaler Negativ- und Positivkontrollen.
- Quantitative Auswertung der Effekte des Knock-downs einzelner TRP-Kanäle auf die CD4⁺-Zell-Aktivierung, die durch Messung der IL-2-Sekretion und der Zell-Proliferation ermittelt wurden.

3. Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Substanzen

Hier nicht aufgeführte Standardlaborchemikalien und Lösungen wurden von den Firmen Roche, Sigma und VWR in der Qualität „zur Analyse“ bezogen. Die für die Arbeit verwendeten siRNA und die dazugehörigen Sequenzen sind im Anhang aufgelistet.

Substanz	Firma	Katalog-Nr.
Acrylamid/bis-Acrylamid	Sigma	A-7168
Agarose Multi Purpose	Bioline	BIO-41025
Bromphenolblau	Eurobio	018069
BSA (Serumalbumin vom Kalb)	Sigma	A7906-506
BTP2 (3,5-BisTrifluoromethyl Pyrazol 2)	Altana	
CellTiter-Blue	Promega	G8080/1/2
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma	H15-009
DMSO (Dimethylformamid)	Sigma	D-8418
EDTA (Ethyl-Diamin-Tetraessigsäure)	Sigma	E-9884
EGTA (Ethylenglykol-Tetraessigsäure)	Sigma-Aldrich	E4378
Ethidiumbromid	Sigma	E8751
FCS (fetales Kälberserum)	Invitrogen	10270-106
Ficoll-Paque™ Plus	AmershamBiosciences	17-1440-03
G418 (Geneticin)	Invitrogen	10131-019
Glycogen (5 µg/µl)	Invitrogen	10814-010
HiPerfekt Transfection Reagent	Qiagen	301705
Interleukin-2 (IL-2, 10.000 U/ml)	Roche	1204700
2-Mercaptoethanol 99%	Acros Organics	125472500
NaN₃ (Natriumazid)	Sigma	S-8032
Nucleofector Solution für T-Zellen	Amaxa	VPA-1002
PHA (Phytohemagglutinin, 10 mg/ml in H₂O)	Sigma	L-9132
10.000 U/ml Penicillin / 10 mg/ml Streptomycin	PAA Laboratories GmbH	P11-010
Poly-Ornithin	Sigma	3655
Polystyrene Microparticles, ø 5,68 µm	Polysciences Europe	07312
Ponceau S Solution	Sigma	P-7170
Proteinase-Inhibitor-Tablette (EDTA-free)	Roche	10266500
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	Acros Organics	327315000

TEMED (Tetramethylethylethylendiamid)	Sigma	T-9281
Tris-Base	Sigma	T-6066
TRIzol Reagent	Invitrogen	15596
Trockenmilch, fettfrei	Biorad	80171B
TrypanBlue Solution 0,4%	Sigma	T8154
0,25% Trypsin / 1 mM EDTA	Invitrogen	25300
Tween-20	Sigma	P-1379

3.1.2 Antikörper

Antikörper	Firma	Katalog-Nr.
Maus anti-humaner CD3 Antikörper	Serotec	MCA463XZ
Maus anti-humaner CD28 Antikörper	BD Pharmingen	555725
Maus anti-humaner ICAM Antikörper	Sigma	C2969
FITC-konjugierter Maus anti-humaner CD3 Antikörper	DAKO	F0818
RPE-konjugierter Maus anti-humaner CD4 Antikörper	DAKO	R0805
RPE / Cy5-konjugierter Maus anti-humaner CD8 Antikörper	DAKO	C7079
Maus anti-HA Antikörper	Roche	1583816
Kaninchen anti-IgG Antikörper	Sigma	A5545
Kaninchen anti-TRPC3 Antikörper	Alamone	ACC-016

3.1.3 Medien und Puffer

Medium/Puffer	Firma	Katalog-Nr.
AIM-V Medium	Invitrogen	12055-091
D-MEM Medium	Invitrogen	31095
HBSS	PAA Laboratories GmbH	H15-009
PBS	Invitrogen	14190-094
6 x Auftragspuffer	pH 8,5 40% Saccharose in 10 mM Tris/Cl	
Boratpuffer	pH 8,5 0,1 M Borsäure	
10 x Elektrophorese-Puffer für PAGE	pH 8,4 0,25 M Tris-Cl, 1,92 M Glycin, 1% SDS, 2 mM EDTA	
EMBL-Puffer	48 mM Tris-Base, 39 mM Gycin, 1,3 mM SDS, 20% Methanol	
Erythrozytenlyse-Puffer	pH 7,3 155 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 0,1 mM EDTA	
3 x Lämmli-Probenpuffer für PAGE	pH 6,8 187,5 mM Tris-Cl, 30% Glycerol, 6,9% SDS, 300 mM DTT, Bromphenolblau	
Lyse-Puffer	pH 7,4 10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 0,5% NP40, Proteinase-Inhibitor-Tablette	

1 x PBS / 0,1% BSA	PBS, 0,1% BSA, steril filtriert
1 x PBS / 0,5% BSA	PBS, 0,5% BSA, steril filtriert
6 x Proben-Puffer	40% Saccharose in H ₂ O
Storage-Puffer	pH 7,4 0,1 M Phosphatpuffer, 15 mM NaCl, 1% BSA, 5% Glycerol, 0,1% NaN ₃
Stripping-Puffer	pH 6,7 62,5 mM Tris-Cl, 2% SDS, 1% Mercaptoethanol
10 x TBE	pH 8 0,5 M Tris-Cl, 0,5 M Borsäure, 10 mM EDTA
10 x TBS	pH 8,0 248 mM Tris-Cl, 1,4 M NaCl, 27 mM KCl
1 x TBST	1 x TBS, 0,05% Tween 20
1 x TE	pH 8,0 10 mM Tris-Base, 1 mM EDTA

3.1.4 Filtersysteme

Filter Nr.	Fluorochrom	Anregung [nm]	Anregungsfilter	dichroischer Spiegel	Emissionsfilter
F 41-017	FITC (anti-CD3)	490	HQ 470/40	Q 495 LP	HQ 525/50
F41-007	RPE (anti-CD4)	550	HQ 545/30	Q 570 LP	HQ 610/75
F41-008	RPE/Cy5 (anti-CD8)	620	HQ 620/60	Q 660 LP	HG 700/75

Alle Filter stammen von AHF-Analysetechnik, Tübingen.

3.1.5 Geräte und Zellkultur-Platten

Gerät / Platten	Firma
Elektroporator: Nucleofector™ II	Amaxa
Mikroskope: IX70 (Fluoreszenz) CK30 (Durchlicht)	Olympus
Photometer: BioPhotometer	Eppendorf
Überkopfschüttler	Heidolph
PCR-Gerät: TPersonal Thermocycler	Biometra
Universal-Mikroplattenmessgerät: Genius Pro ELX800UV	Tecan
Zentrifugen: Centrifuge 5415 R, Universal 32 R	Eppendorf, Hettrich
6-Well-Zellkulturplatten, transparent/flacher Boden	BD Falcon #353046
24-Well-Zellkulturplatten, transparent/flacher Boden	BD Falcon #353047
96-Well-Microtest™ -Platten, schwarz/transparenter, flacher Boden	BD Falcon #353948

3.1.6 Auswertungsprogramme

Programm	Firma
Excel	Microsoft
Igor Pro	Wave Metrics, Inc.
Till Vision	Till Photonics

3.2 Zellbiologische Methodik

3.2.1 Aufreinigung humaner peripherer Blutlymphozyten (PBLs) über Dichtegradienten-Zentrifugation

Die für die Aufreinigung benötigten peripheren Blutmonozyten wurden aus Leukozyten-Reduktions-Filtern der Blutbank gewonnen. Durch vorsichtige Injektion von 60 ml HBSS entgegen der ursprünglichen Laufrichtung des Blutes ließen sich die Zellen aus den Filtern zurückspülen. Sie wurden dann über Dichtegradienten-Zentrifugation (450xg, 30 Minuten, Raumtemperatur (RT)) in 50 ml Leucoseptubes (Greiner, #227290) isoliert. Der Monozytenring wurde abgenommen und in HBSS auf 50 ml verdünnt. Durch die anschließende Zentrifugation (250xg, 10 Minuten, RT) wurden die Monozyten gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml Lysepuffer aufgenommen (1 Minute, RT), wodurch vorhandene Erythrozyten lysiert wurden. Nach Erhöhung des Volumens mit HBSS auf 50 ml wurden die Zellen erneut zentrifugiert (200xg, 10 Minuten, RT). Durch die niedrige g-Zahl verblieben die Thrombozyten im Überstand.

Entweder wurden die Zellen in AIM-V Medium mit 10% FCS im Inkubator oder für die weitere Aufreinigung in PBS/0,5% BSA bei 4°C aufbewahrt. Die Zellen in Medium wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in einer Dichte von 2-3x10⁶ Zellen/ml in Kultur gehalten. Die Zellzählung erfolgte in der Neubauerkammer (Labor Optics, #718606), wobei die Verwendung von Trypan-Blue Solution der Markierung nicht-vitaler Zellen diente (Gebrauch in 1:2 Verdünnung).

3.2.2 Isolierung von CD3⁺- und CD4⁺-Zellen durch „Negative Isolation“

Um eine Vorstimulation der T-Zellen zu vermeiden, wurde nach dem Prinzip der „Negative Isolation“ (Invitrogen, 113.11D, 113.19D) gemäß des Herstellerprotokolls gearbeitet. Die Isolierung erfolgte mit Hilfe von magnetischen Polystyrenmikropartikeln („Dynabeads“). Den in PBS/0,5% BSA aufgenommenen PBLs wurde FCS und der Antikörpermix mit Antikörpern gegen Nicht-CD4⁺-Zellen zugegeben. Neben den Nicht-CD4⁺-Zellen werden auch voraktivierte CD4⁺-Zellen (HLA II-positive Zellen) durch den Antikörpermix erfasst. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 4°C wurden die

Zellen zentrifugiert (500xg, 8 Minuten, 4°C) und in PBS/0,5% BSA aufgenommen. Die gewaschenen Dynabeads wurden den Zellen beigefügt. Zur Ausbildung der Bindung zwischen Antikörper und Dynabeads wurde die Suspension erneut 15 Minuten bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Das Volumen wurde mit PBS/0,5% BSA auf das Doppelte erhöht und das 50 ml Falcon Tube in einen passenden Magneten gestellt. Auf diese Art wurden die Dynabeads mit den gebundenen Antikörpern herausgezogen. Der Überstand mit den verbleibenden Zellen (CD3⁺- oder CD4⁺-Zellen) wurde abgenommen und zentrifugiert (200xg, 10 Minuten, 4°C). Für eine anschließend geplante Transfektion wurden die Zellen in PBS/0,5% BSA (4°C) aufgenommen. Ansonsten wurden die Zellen in AIM-V Medium mit 10% FCS in einer Dichte von etwa 3×10^6 Zellen/ml aufgenommen und bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.2.3 Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen aufgereinigter Zellen mittels Antikörperfärbung

Um in den aufgereinigten Zellen die Höhe des CD3⁺- bzw. des CD4⁺-Zellanteils zu ermitteln, erfolgte eine Färbung der Oberflächenantigene mit fluoreszierenden Antikörpern. Eine parallele Färbung derselben Zellen mit drei Antikörpern gegen CD3 (Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-gekoppelt), CD4 (R-Phycoerythrin (RPE)-gekoppelt) und CD8 (Cyanin5-Phycoerythrin (RPE/Cy5)-gekoppelt) wurde durchgeführt. Ungefähr 350.000 Zellen wurden für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln mit den Antikörpern inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden sie durch kurze Zentrifugation und Aufnahme in PBS gewaschen und auf ein mit Poly-Ornithin (0,1 mg/ml) beschichtetes Deckglas gegeben. Dieses wurde im Fluoreszenzmikroskop (IX 70, Olympus) mit dem 20er Objektiv (Olympus) eingestellt und betrachtet. Danach wurde das Signal eines jeden Fluorochroms im entsprechenden Filter als Einzelaufnahme festgehalten. Außerdem wurde zusätzlich eine Aufnahme unter Verwendung von Transmissionslicht angefertigt. Die verwendeten Antikörper sowie die entsprechenden Anregungswellenlängen, Belichtungszeiten und Filtersysteme sind unter Abschnitt 3.1 aufgelistet.

3.2.4 Transfektion humaner PBLs und CD4⁺-Zellen durch Elektroporation

Die Zellen wurden nach erfolgter Aufreinigung in 4°C kaltem PBS/0,5% BSA aufgenommen. Für je eine Transfektion wurden $4-6 \times 10^6$ Zellen eingesetzt, wobei schrittweise den Angaben des Herstellerprotokolls (Amaxa) gefolgt wurde. Die einzelnen Proben wurden zentrifugiert (200xg, 8 Minuten, 4°C) und in 100 µl T-Zell-Nucleofector-Lösung (RT) aufgenommen. Nach der Zugabe von 0,9 µg siRNA (3 µl einer 20 µM Lösung (297 µg/ml)) wurden die Proben in eine Küvette (Amaxa) überführt. Die Transfektion erfolgte im Elektroporator mit dem Programm U-14 für unstimulierte humane T-Zellen. Unmittelbar im Anschluss an die Transfektion wurden 500 µl AIM-V-Medium (37°C) in die

Küvette gegeben. Die transfizierten Zellen wurden mit einer eigens dafür vorgesehenen Plastikpipette (Amaxa) in ein Well einer 24-Well-Platte überführt. Nach Erhöhung des Volumens mit AIM-V-Medium auf 2 ml (Zellkonzentration: 3×10^6 Zellen/ml) wurden die Zellen mindestens 12 Stunden bei 37°C , 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.2.5 Präparation von Antikörper-beschichteten Beads

Die Beschichtung von Polystyrenmikropartikeln (von hier ab als „Beads“ bezeichnet) mit azidfreien αCD3 - und αCD28 -Antikörpern oder αICAM -Antikörpern erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll. Es wurden 100 μl der Bead-Lösung in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 900 μl Boratpuffer wurde die Suspension zentrifugiert (8.000xg, 5 Minuten, RT). Durch die erneute Aufnahme des Bead-Pellets in Boratpuffer und die zweimalige Wiederholung der letzten beiden Schritte wurden die Beads gewaschen. Nach der dritten Zentrifugation wurden die Beads in 450 μl Boratpuffer aufgenommen und entweder 12,5 μl αCD3 -Antikörper und 37,5 μl αCD28 -Antikörper oder 50 μl αICAM -Antikörper zugegeben. Es folgte die Inkubation der Beads mit den Antikörpern über Nacht bei RT auf dem Überkopfschüttler. Am folgenden Tag wurde die Bead-Suspension zunächst zentrifugiert (8.000xg, 10 Minuten, RT). Das Pellet wurde in Boratpuffer aufgenommen, der zur Stabilisierung der Antikörper-Bead-Bindung mit BSA (10 mg/ml) versetzt war. Danach wurde die Lösung 30 Minuten bei RT rotierend inkubiert und erneut zentrifugiert. Diese letzten drei Schritte wurden zweimal wiederholt. Am Ende wurden die mit Antikörper beschichteten Beads in einen Aufbewahrungspuffer (storage buffer) aufgenommen. Dieser Puffer ermöglichte die Verwendung der Beads über einen Zeitraum von etwa einem Monat. Die Beads wurden bei 4°C gelagert und vor Benutzung gezählt und zweimal in AIM-V-Medium gewaschen. Für die Proliferationsexperimente wurden die Beads den T-Zellen in einem Bead/Zell-Verhältnis von 1/1 zugeführt.

3.2.6 Proliferationsexperimente

Alle Proliferationsexperimente wurden in schwarzen 96-Well-Zellkulturplatten durchgeführt. Soweit es nicht anders erwähnt ist, wurden 50.000 Zellen pro Well (Z/W) in einem Gesamtvolumen von 200 μl eingesetzt. Dafür wurden untransfizierte Zellen zunächst gezählt, zur Auswaschung von Zellresten zentrifugiert (200xg, 10 Minuten, RT) und in einer Konzentration von 500.000 Zellen/ml in AIM-V Medium (37°C) aufgenommen. So konnten sie in 100 μl in die Wells der 96-Well-Platte pipettiert werden. Zellen, die mit siRNA transfiziert worden waren, wurden vorsichtig aus den Wells der 24-Well-Platte entnommen und in ein 15 ml Falcontube überführt. Das Well wurde mit 2 - 4 ml AIM-V Medium (37°C) nachgespült, um den Zellverlust möglichst gering zu halten. Die Zellen wurden zentrifugiert (200xg, 8 Minuten, RT) und in 2 ml AIM-V Medium (37°C) aufgenommen.

Nach der Zellzählung wurde das für die Endkonzentration von 500.000 Zellen/ml benötigte Volumen AIM-V Medium (37°C) zugegeben. Wiederum wurde in 100 µl pipettiert.

Beim Einsatz von siRNA-transfizierten Zellen wurde die Proliferation zumeist unter den zwei Bedingungen 1. Zugabe von EGTA und 2. keine Zugabe von EGTA gemessen. Also wurden jeweils zwei Lösungen angesetzt, eine 2,0 - 2,4 mM EGTA-Lösung für eine Endkonzentration von 1,0 - 1,2 mM in den Wells und AIM-V-Medium ohne EGTA. Dahinein wurden die Beads in einer Konzentration von 500.000 Beads/ml gegeben. Die Lösungen wurden in 100 µl auf die Platten pipettiert. Nach einer kurzen Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit erfolgte die Zugabe der Zellen.

Für Experimente, in denen EGTA-Konzentrationsreihen getestet wurden, wurden die gewaschenen, αCD3-/αCD28-beschichteten Beads als Stimulus direkt zu den Zellen gegeben. Die Menge wurde so gewählt, dass die Endkonzentration ebenfalls 500.000 Beads/ml ergab (Bead/Zell-Verhältnis 1/1). Die EGTA-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen wurden zuvor angesetzt und in 100 µl auf die Platten pipettiert. Eine mehrstündige Inkubation der Platten bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit erlaubte die pH-Wert-Einstellung des Mediums. Danach wurden die Zellen mit Beads in 100 µl dazugegeben.

Bei der Verwendung von PHA als Stimulus wurde es in einer Endkonzentration von 2 µg/ml in den Wells benutzt. Um in 100 µl zu pipettieren, wurde eine Lösung der Konzentration von 4 µg/ml hergestellt. Dafür wurde das PHA (Stammlösung 10 mg/ml) in AIM-V Medium verdünnt. In Experimenten mit den Kanalblockern BTP2 und Econazol wurde die Substanzen ebenfalls in AIM-V Medium verdünnt auf die Platten gegeben. Sowohl BTP2 (Stammlösung 10 mM) als auch Econazol (Stammlösung 50 mM) wurden in einer Konzentration von 200 nM eingesetzt.

Die Platten wurden für 1 Stunde (Tag 0), 24 Stunden (Tag 1), 48 Stunden (Tag 2), 72 Stunden (Tag 3), 96 Stunden (Tag 4) und 120 Stunden (Tag 5) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Um einen Flüssigkeitsverlust durch Verdunstung zu vermeiden, wurden die äußeren Wells ausgespart und mit 200 µl Wasser gefüllt. Außerdem wurden die Platten kontinuierlich in „feuchten Kammern“ (Instrumentenkästen (VWR, #216-1383) mit je 100 ml destilliertem Wasser) aufbewahrt. Nach der Inkubationszeit wurde mit dem CellTiter-Blue™ Assay die Zahl der lebenden Zellen ermittelt. Die Funktionsweise des Assays basiert auf der Eigenschaft lebender Zellen, den Redox-Farbstoff Resazurin in das fluoreszierende Endprodukt Resorufin umzusetzen (Abbildung 3.2.5). Resorufin zeichnet sich durch ein starkes Fluoreszenzsignal mit einem Anregungs- bzw. Emissionsmaximum der Wellenlängen 579 nm bzw. 584 nm aus. Es wurden zu jedem Well 20 µl CellTiter-Blue gegeben, die Platten weitere drei Stunden zu den oben genannten Bedingungen inkubiert und schließlich das Fluoreszenzsignal mit dem Universalmikroplattenleser Genios Pro bei 535_{Ex}/590_{Em} (Anregungswellenlänge [nm] / Emissionswellenlänge [nm]) ausgemessen. Um das optimalste Signal/Rausch-Verhältnis zu bestimmen, wurden mit unterschiedlichen Filtern verschiedene Anregungs- und Emissionswellenlängen getestet (darunter 535_{Ex}/590_{Em}, 560_{Ex}/590_{Em}, 535_{Ex}/620_{Em} und 560_{Ex}/620_{Em}). Das beste Signal/Rausch-Verhältnis wurde bei 535_{Ex}/590_{Em} gemessen, obwohl diese Wellenlängen nicht exakt in den Maxima

der Fluoreszenzkurven liegen. Somit wurden die weiteren Messungen bei dieser Anregungs- und dieser Emissionswellenlänge durchgeführt. Die weiteren Einstellungen des Mikroplattenlesers lauteten: Gain (manual) = 38, Lag time = 0 μ s, Integration time = 40 μ s, Number of flashes = 10, Time between move and flash = 0 μ s, Read mode = bottom, Shaking time = 15-30 s, Settle time = 15-30 s. Die Messwerte wurden als Triplikate bestimmt und anschließend gemittelt.

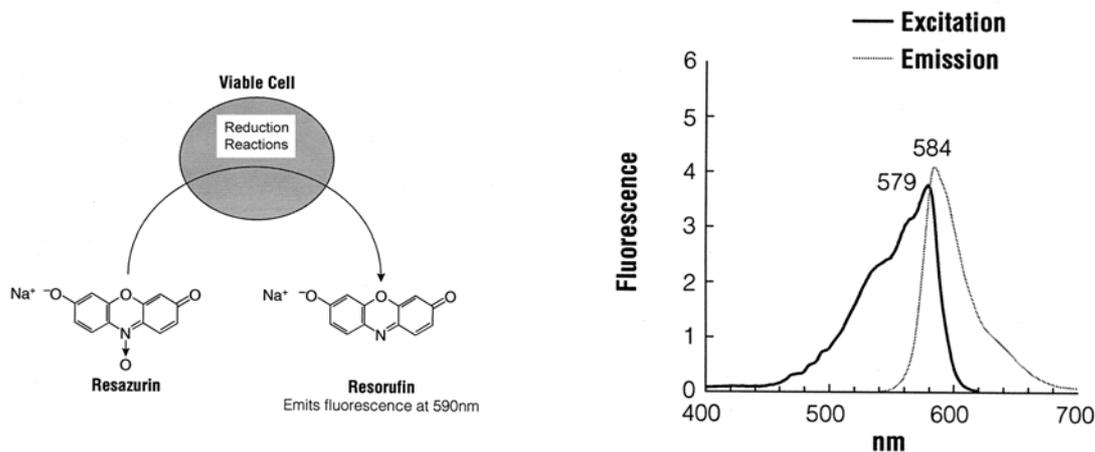


Abb. 3.2.5 Die Reduktion von Resazurin durch metabolisch aktive Zellen führt zu dem fluoreszierenden Endprodukt Resorufin. Das Fluoreszenzsignal ist proportional zu der Zahl der lebenden Zellen. Die rechte Abbildung zeigt das Anregungs- und Emissionsspektrum von Resorufin. (Die Abbildungen wurden aus dem „Technical Bulletin No 317“ von Promega entnommen.)

3.2.7 Zellkultur TRPC3-überexprimierender HEK 293 Zellen

Die Effizienzüberprüfung der siRNA wurde in der Zelllinie Human Embryonic Kidney (HEK) 293 Zellen durchgeführt. Stabil-transfizierte TRPC3-überexprimierende HEK 293 Zellen wurden freundlicherweise von Mike Zhu zur Verfügung gestellt. Sie wurden in D-MEM Medium (10% FCS, 10% Penicillin/Streptomycin) mit zugegebenem G418 (0,5%) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Für die folgenden Experimente wurden die Zellen am Vortag mit etwa 1 ml 0,25% Trypsin/1 mM EDTA vom Zellkulturflaschenboden abgelöst. Nach einer Zählung in der Neubauerzählkammer wurden die Wells einer 6-Well-Platte mit Zellen in verschiedenen Konzentrationen befüllt. Hierbei lagen die Zellzahlen zwischen 200.000 Z/W für an Tag 3 terminierte Versuche und 700.000 Z/W für an Tag 0 terminierte Versuche. Die Platten wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in „feuchten Kammern“ inkubiert.

3.2.8 Transfektion von HEK 293 Zellen mit siRNA

Die HEK 293 Zellen wurden mit der HiPerfect-Transfektionstechnik (Qiagen) transfiziert. Dafür wurden jeweils für die zu transfizierenden Zellen eines Wells einer 6-Well-Platte 0,6 µl siRNA (entspricht 150 ng der 20 µM Lösung) in 99,4 µl serumfreiem D-MEM Medium verdünnt. Dazu wurden 12 µl HiPerfect Reagent gegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 5-10 Minuten bei RT, in der die Formation der Transfektionskomplexe stattfand. Aus den 6-Well-Platten wurde das Medium vom Vortag entfernt und pro Well 2300 µl frisches Medium hineingegeben. Die Zugabe der 112 µl Transfektionslösung zu den Zellen erfolgte tropfenweise. Durch die behutsame Kreisbewegung der Platten wurde eine Homogenisierung der Lösung im Gesamtvolumen erzielt, die die gleichmäßige Diffusion der Transfektionskomplexe in alle Zellen vereinfachte. Anschließend wurden die Zellen unter den vorherigen Bedingungen inkubiert.

3.3 Molekularbiologische Methodik

3.3.1 Isolierung totaler RNA

Mit Hilfe des TRIzol Reagents erfolgte die Isolierung der RNA. Dafür wurden 800.000 HEK 293 Zellen und zwischen 3×10^6 und 1×10^7 CD4⁺-Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation (250xg, 10 Minuten, RT) sedimentiert und in 1 ml TRIzol Reagent lysiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (12.000xg, 10 Minuten, 4°C) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Pro 1 ml TRIzol-Probe wurden 200 µl Chloroform zugegeben, gemischt und weitere 3 Minuten bei RT inkubiert. Nach der folgenden Zentrifugation (12.000xg, 15 Minuten, 4°C) wurde die wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Zur Erhöhung der Ausbeute der RNA wurde 1 µl Glycogen hinzugegeben. Für die RNA-Präzipitation wurden 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml TRIzol-Probe zugeführt und bei RT 10 Minuten inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (12.000xg, 10 Minuten, 4°C). Das Pellet wurde durch Zugabe von 75% Ethanol (100% Ethanol mit 0,1% DEPC-H₂O verdünnt) und Zentrifugation (7.500xg, 5 Minuten, 4°C) gewaschen. Das RNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 15-20 µl DEPC-behandeltes Wasser aufgenommen. Die Qualität und Quantität der RNA wurde mittels photometrischer Messung und Gelelektrophorese überprüft. Die nicht direkt in die reverse Transkription eingesetzte RNA wurde mit DEPC-H₂O auf 200 µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von 30 µl Natriumacetatlösung (2 M, 0,15 x Vol, pH 5,2) und 500 µl Ethanol (100%, 2,5 x Vol) wurde die RNA bei -80° C aufbewahrt.

3.3.2 Reverse Transkription

In die reverse Transkription wurden 0,8 µg totale RNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt. Es folgte entsprechend des Herstellerprotokolls (Invitrogen) die Umschreibung der mRNA mit einem Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer und einer Super ScriptTMII RNaseH⁻ Reverse Transkriptase in cDNA. Aus der reversen Transkription wurden 0,5 - 2 µl der entstandenen DNA-Matrize in die PCR eingesetzt.

3.3.3 Amplifikation spezifischer DNA mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt. Für einen Ansatz wurden 200 µM dNTPs (Invitrogen) und 1 µM jeden Primers sowie 0,5 Units AmpliTaq Polymerase (Taq DNA Polymerase Kit, Qiagen) eingesetzt. Die Primer-Sequenzen wurden von Eva Schwarz, Bettina Strauß und Melodie-Jo Wolfs erstellt und von Invitrogen synthetisiert. Es wurden 0,5 - 2 µl der DNA-Matrize aus der reversen Transkription verwendet. Außerdem wurde bei jeder PCR eine Negativkontrolle (H₂O als Template) mitgeführt. Alle Pipettiervorgänge fanden auf Eis statt. Die PCR wurde mit einer Denaturierungszeit von 45 Sekunden bei 94°C, mit einer Hybridisierungszeit für die Primer von 30 Sekunden bei 58°C und mit einer Kettenverlängerungszeit von 30 Sekunden bei 72°C durchgeführt. Das Standardprofil einer gesamten PCR bestand aus 35 Zyklen, mit einer anfänglichen Denaturierungszeit von 3 Minuten bei 94°C und einer abschließenden Elongation von 10 Minuten bei 72°C. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Reaktion auf 4°C gekühlt. Die Analyse erfolgte mittels Gelelektrophorese.

3.3.4 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Der photometrischen Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen liegt zugrunde, dass 1,0 OD₂₆₀ (optische Dichte bei $\lambda = 260$ nm) 50 µg doppelsträngiger DNA / ml beziehungsweise 38 µg RNA / ml entspricht. Das Verhältnis der optischen Dichte von $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm (OD₂₆₀/OD₂₈₀) gibt einen Anhaltspunkt für die Reinheit der Nukleinsäuren. Der Quotient sollte für reine DNA- und RNA-Lösungen zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Geringere Werte weisen auf unvollständig in Lösung gegangene Nukleinsäure oder eine Kontamination mit Proteinen hin, da diese Licht bei $\lambda = 280$ nm absorbieren.

Die Proben wurden in den Verdünnungen 1:200, 1:100 und 1:50 eingesetzt. Die Verdünnungen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl unter Verwendung von DEPC-behandeltem 1 x TE-Puffer hergestellt. Die Proben wurden in UV-Küvetten (UVetten^R 220-1600 nm Eppendorf) überführt und im Photometer vermessen.

3.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese von DNA und totaler RNA wurde durchgeführt wie es 1989 bei Sambrook *et al.* in Kapitel 6 beschrieben ist [66]. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose Multi Purpose (1-2%) und 1 x TBE-Puffer sowie Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zur Anfärbung der DNA eingesetzt. 1 x TBE wurde außerdem als Laufpuffer benutzt. Gearbeitet wurde in den Gelelektrophorese-Kammern „DNA Pocket Block“ von Biozym und „Sunrise“ von Biometra. Es wurden 6 x Auftragspuffer und eine 1Kb DNA Ladder (Invitrogen) als Marker verwendet.

3.4 Proteinchemische Methodik

3.4.1 Proteinisolierung aus TRPC3-überexprimierenden HEK 293 Zellen

In die Proteinisolierung wurden zwischen $1-3 \times 10^6$ HEK 293 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden nach der Ablösung mit 0,25% Trypsin/1 mM EDTA in Medium aufgenommen und zentrifugiert (200xg, 10 Minuten, RT). Im Lysepuffer (4°C) wurde eine Proteinase-Inhibitor-Tablette in der vom Hersteller angegebenen Konzentration gelöst (1 Tablette in 10 ml Lysepuffer). Das Zellsediment wurde in 100 µl des Puffers aufgenommen und zur Aufbrechung der Zellen für 2 x 20 Sekunden mit Ultraschall beschallt (Amplitude 38%). Um ein zu starkes Erhitzen der Probe zu vermeiden, wurde nach jeder Beschallung eine Pause von 60 Sekunden gemacht. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Zelllysate bei -20°C gelagert.

3.4.2 Polyacrylamid - Gelelektrophorese (PAGE)

Die Durchführung der diskontinuierlichen, denaturierenden Elektrophorese erfolgte wie 1997 in Ausubel *et al.* beschrieben [02]. Die Proteine wurden nach ihrem Molekulargewicht in Polyacrylamid-Gelele in vertikalen Kammern (Biometra) aufgetrennt (Sammelgel: pH 6,8, 0,5 M Tris-Cl, 0,4% SDS, 8% Acrylamid/bis-Acrylamid; Trenngel: pH 8,8, 1,5 M Tris-Cl, 0,4% SDS, 8% Acrylamid/bis-Acrylamid). Als Größenstandard wurde der Marker Precision Plus Protein Dual Color Standards (Biorad, #1610374) verwendet.

3.4.3 Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen (Western-Blot)

Das Western-Blotting wurde entsprechend den Angaben von Amersham Life Science durchgeführt. Von den Polyacrylamid-Gelele wurden die Proteine auf Nitrocellulose-Membranen (Pore: 0,45 µm,

Schleicher & Schuell, #10439194) transferiert und mit Ponceau S Solution angefärbt. Die Membranen wurden mit TBS vollständig entfärbt und über Nacht in 5%iger, nicht-fetthaltiger Trockenmilch/TBST inkubiert. Die Membranen wurden mit Primäantikörper in 3%iger, nicht fetthaltiger Trockenmilch/TBS eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden sie 4 x 5 Minuten in TBST gewaschen. Mit dem Sekundäantikörper wurden die Membranen ebenso in 3%iger, nicht fetthaltiger Trockenmilch/TBS inkubiert und gewaschen. Die Peroxidase, die an den Sekundäantikörper gekoppelt ist, wurde mit ECLTM (Enhanced Chemoluminescence Western Blotting Detection Reagents, Amersham) detektiert. Das Signal wurde auf einem Röntgenfilm (Cronex 5, AGFA) festgehalten (Entwickler: Ilfoospeed, Fixierer: Paper Fixer, Ilford).

4. Ergebnisse

4.1 Entwicklung und Validierung der Methodik

4.1.1 Identifizierung und Quantifizierung der Lymphozytensubpopulationen in peripheren Blutlymphozyten (PBLs) und in aufgereinigten CD4⁺-Zellen

Nach der Aufreinigung von peripheren Blutlymphozyten (PBLs) wurden die einzelnen T-Zell-Populationen durch eine Antikörperfärbung mit α CD3-, α CD4- und α CD8-Antikörpern ermittelt. Untersucht wurden Zellen von sechs Spendern, nachdem sie über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert wurden. Die im Überstand enthaltenen PBLs setzen sich zu $74,6 \pm 3,1\%$ aus CD3⁺-Zellen zusammen. Unter die CD3-negativen Zellen in der Population fallen neben NK-Zellen B-Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und eventuell verbliebene Erythrozyten.

Nach der Isolierung von CD4⁺-Zellen wurde die Reinheit der Zellen durch eine α CD4-Färbung bestimmt. Es wurden Zellen aus 31 CD4⁺-Zell-Aufreinigungen untersucht. Im Mittel betrug der CD4⁺-Zell-Anteil 96,2% (SD: 2,3%).

Die Entscheidung, mit reinen CD4⁺-Zellen zu arbeiten, entstand aus der Beobachtung, dass PHA in PBLs eine mit den Antikörper-beschichteten Beads vergleichbare Proliferation hervorruft, in einer reinen CD4⁺-Zell-Population jedoch keinen Effekt hat (Abschnitt 4.1.3). Dies zeigt, dass in PBLs nicht ausschließlich die Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TCR) zu T-Zell-Proliferation führt. Weitere Faktoren wie Zell-Zell-Interaktionen und eventuell ausgeschüttete Zytokine spielen eine wichtige Rolle. Da eine wichtige Fragestellung der vorliegenden Dissertation darin bestand, TCR-vermittelte T-Zell-Aktivierung und -Proliferation zu analysieren, lieferte dieses Ergebnis letztendlich das entscheidende Argument zu dem Entschluss, mit reinen CD4⁺-Zellen zu arbeiten. So wurde an die PBLs-Aufreinigung jeweils eine CD4⁺-Zell-Isolierung angeschlossen, auch wenn die Experimente dadurch sowohl zeitlich als auch finanziell deutlich aufwendiger wurden.

4.1.2 Proliferation von PBLs und CD4⁺-Zellen in Abhängigkeit von der Zellzahl

Für die Proliferationsexperimente musste eine Anfangszellzahl gewählt werden, bei der sichergestellt war, dass die Proliferation der Zellen auch tatsächlich auf die Modifikation der gewählten Parameter (wie z.B. Änderung der extrazellulären Kalziumkonzentration mittels EGTA, Transfektion der Zellen mit siRNA) zurückzuführen ist. Die Zellzahl musste in einem Bereich liegen, in dem das Messsignal linear mit der zu messenden Zellzahl über den zu messenden Zeitraum steigt. Die Linearität der

Zellzahl zum gemessenen Signal stellte sicher, dass andere Parameter wie z.B. Well-Größe, Zelldichte oder Verbrauch von Medium nicht zum limitierenden Faktor für die Proliferation werden.

Es stellte sich ein linearer Anstieg des über den CellTiter Blue-Assay ermittelten Fluoreszenzsignals für die Anfangszellzahlen 12.500 bis 50.000 Zellen pro Well (Z/W) über einen Zeitraum von vier Tagen heraus (Abbildung 4.1). Bei höheren Zellzahlen wurden eine Verlangsamung und eine Sättigung der Proliferation beobachtet. Oben angegebene Faktoren wie zum Beispiel eine zu hohe Zelldichte erklären dieses Ergebnis. Es wurde die Zellzahl 50.000 Z/W gewählt, um gleichzeitig das höchstmögliche Messsignal zu erhalten. Diese Zellzahl wurde für alle weiteren Proliferationsexperimente eingesetzt.

Dieselben Experimente wurden mit aufgereinigten CD4⁺-Zellen wiederholt. Auch die Proliferation von einer reinen CD4⁺-Zell-Population mit der Anfangszellzahl von 50.000 /W verhielt sich über den Zeitraum von vier Tagen linear.

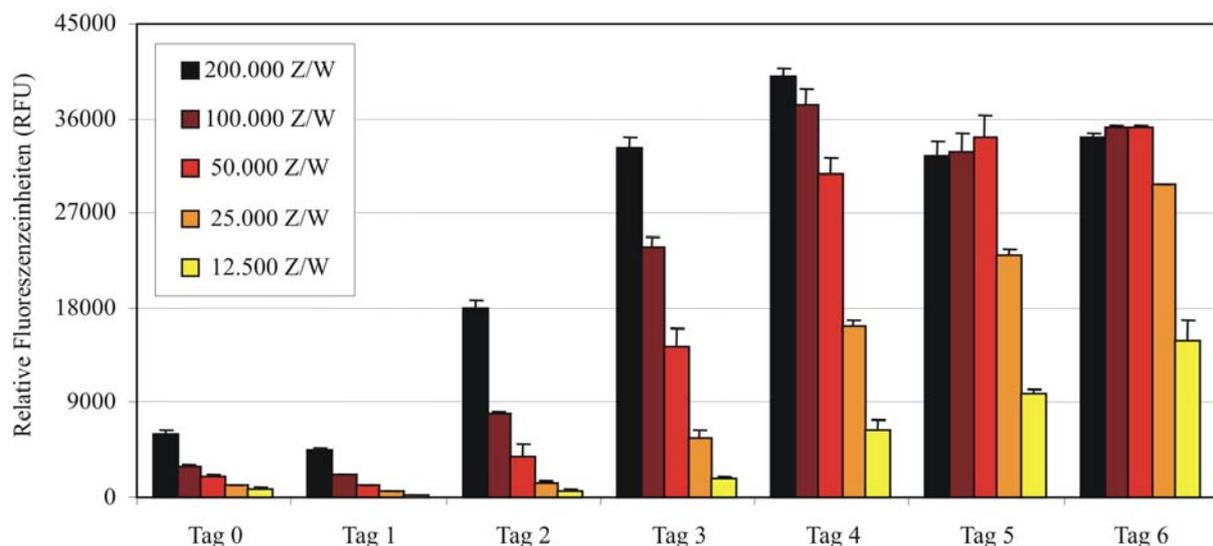


Abb. 4.1 Proliferation von PBLs eines repräsentativen Spenders über sechs Tage. Getestet wurden fünf verschiedene Anfangszellzahlen 12.500, 25.000, 50.000, 100.000 und 200.000 Zellen pro Well (Z/W). Die Zellen wurden mit α CD3-/ α CD28-beschichteten Beads im Verhältnis 1:1 stimuliert. An den jeweiligen Messzeitpunkten (Tag 0 bis Tag 6) wurde durch Zugabe von CellTiter Blue, dreistündige Inkubation und Messung im Mikroplattenmessgerät das der Zellproliferation entsprechende Fluoreszenzsignal ermittelt.

4.1.3 Proliferation von PBLs und CD4⁺-Zellen in Abhängigkeit vom Stimulus

Primäre PBLs und CD4⁺-Zellen benötigen einen Stimulus, um zu proliferieren (Abschnitt 2.2). Natürlicherweise geschieht dies über ein MHCII-gebundenes Antigen, das von einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) angeboten wird. Dies nennt man eine fokale Stimulation. Ihr folgt die Formation der immunologischen Synapse zwischen den beiden Zellen, worüber der TCR und als Folge die T-Zelle aktiviert wird. Um diese fokale Stimulation zu imitieren, wurden Beads benutzt, die mit α CD3- und α CD28-Antikörpern im Verhältnis 1:4 beschichtet worden waren.

Durch Ca^{2+} -Imaging-Versuche wurde verifiziert, dass $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$ -beschichtete Beads über die fokale Aktivierung der CD4^+ -Zellen einen Ca^{2+} -Einstrom auslösen (Abbildung 4.2). Dafür wurden CD4^+ -Zellen mit dem fluoreszierenden Kalzium-Farbstoff Fura-2 A/M geladen und in eine Messkammer eingebracht. Nach Zugabe der stimulierenden Beads zeigt sich im Infrarot-Bild die Ausbildung einer breiten Zell-Bead-Kontaktstelle. Diese wurde als immunologische Synapse interpretiert. Damit einhergehend wurde die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration als Zunahme des Fluoreszenzsignals gemessen. Diese intrazelluläre Konzentrationserhöhung entspricht der Entleerung der Ca^{2+} -Speicher und die folgende Aktivierung des Ca^{2+} -Einstroms über CRAC-Kanäle. Durch dieses Experiment wird die effiziente Stimulation der CD4^+ -Zellen durch Antikörperbeschichtete Beads demonstriert. Parallel zu den Ca^{2+} -Imaging-Experimenten wurde mittels Patch-Clamp-Technik in derartig stimulierten CD4^+ -Zellen die Aktivierung des CRAC-Stromes gemessen (Daten in [67] publiziert).

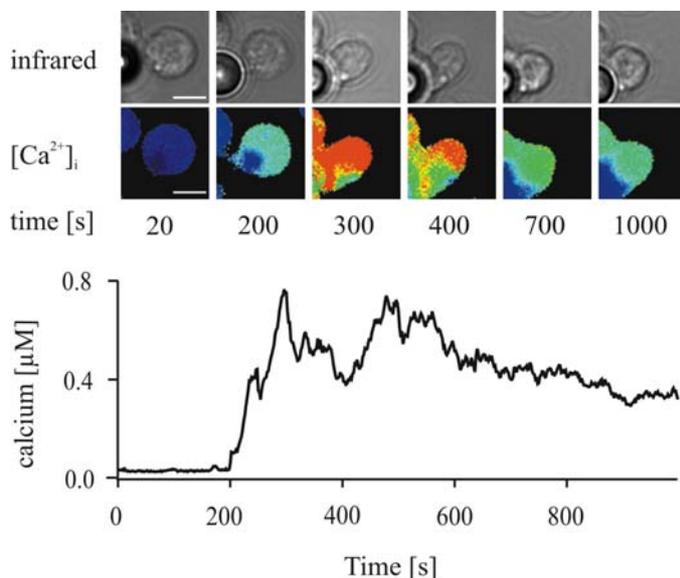


Abb. 4.2 Durch den Ca^{2+} -Farbstoff Fura-2 A/M wurde die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von CD4^+ -Zellen, die mit $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$ -beschichteten Beads stimuliert wurden, visualisiert und gemessen. Die Beads wurden den CD4^+ -Zellen zugegeben und sanken in der Messkammer auf die Zellen herab. Das Experiment lief über einen Zeitraum von 1000 Sekunden. Die Quantifizierung intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über den gemessenen Zeitraum, die in der unteren Grafik gezeigt wird, erfolgte durch das Auswertungsprogramm Igor Pro. (Die Abbildung wurde freundlicherweise von Ariel Quintana zur Verfügung gestellt.)

Die Spezifitätskontrolle für die Beads bestand in αICAM -beschichteten Beads. Durch diese wurde überprüft, dass es der Beschichtung der Beads mit αCD3 - und αCD28 -Antikörpern bedurfte, um die Zellen zu stimulieren. Die Aktivierung von ICAM (Intracellular Adhesion Molecule, das den TCR nicht stimuliert) durch anti-ICAM-Antikörper sollte keine Zellproliferation bewirken. Außerdem wurde das üblicherweise zur T-Zell-Stimulation eingesetzte PHA getestet. PHA ist ein Lectin aus *Phaseolus vulgaris*, das bei Kontakt mit der T-Zell-Membran unspezifisch Oberflächenmoleküle vernetzt. Unter anderem wird auch der TCR vernetzt und dadurch aktiviert.

Zellen von mehr als 50 Spendern wurden wie folgt untersucht: Nach der Aufreinigung wurden die Zellen über Nacht in AIM-V-Medium (ohne Stimulus) bei 37°C , 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert und erst am folgenden Tag weiterverwendet. Zu 50.000 Z/W wurden verschiedene Stimuli gegeben, dazu zählten $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$ - oder αICAM -beschichtete Beads, PHA und Antikörper in

Lösung, die direkt ins Well zu den Zellen gegeben wurden (α CD3- und α CD28-Antikörper der Well-Konzentration 5 μ g/ml). Außerdem wurden Zellen ohne Stimulus belassen.

α CD3-/ α CD28-beschichtete Beads stellen einen sehr effizienten Stimulus sowohl für PBLs als auch für reine CD4⁺-Zellen dar (Abbildung 4.3). Im Durchschnitt ließ sich eine Zunahme des mit dem CellTiter Blue Assay gemessenen Fluoreszenzsignals von 900% bei PBLs und von 1440% bei CD4⁺-Zellen von Tag 0 zu Tag 4 messen. Beads, die mit α ICAM-Antikörper beschichtet wurden, bewirkten kein Zellwachstum. PBLs proliferierten nach Stimulation mit PHA ähnlich gut wie nach Bead-Stimulation (1030% Anstieg des Fluoreszenzsignals an Tag 4, Daten nicht gezeigt). Dagegen ließen sich CD4⁺-Zellen mit PHA alleine nicht stimulieren. Auch die Antikörper, die in Lösung zu den Zellen gegeben wurden, stellten keinen Proliferationsstimulus für CD4⁺-Zellen dar.

Mit α CD3-/ α CD28-beschichteten Beads wurde damit eine hoch effiziente Stimulationsmethode für primäre CD4⁺-Zellen gefunden. Diese Ergebnisse bestätigen die Idee, Beads als fokalen Stimulus für die Zellen einzusetzen. Sie aktivieren spezifischer als PHA den TCR und die TCR-abhängigen Signalkaskaden und stellen durch die Imitierung der APC einen äußerst physiologischen Stimulus dar.

Für alle folgenden Proliferationsexperimente wurden α CD3-/ α CD28-beschichtete Beads zur Stimulation der CD4⁺-Zellen verwendet.

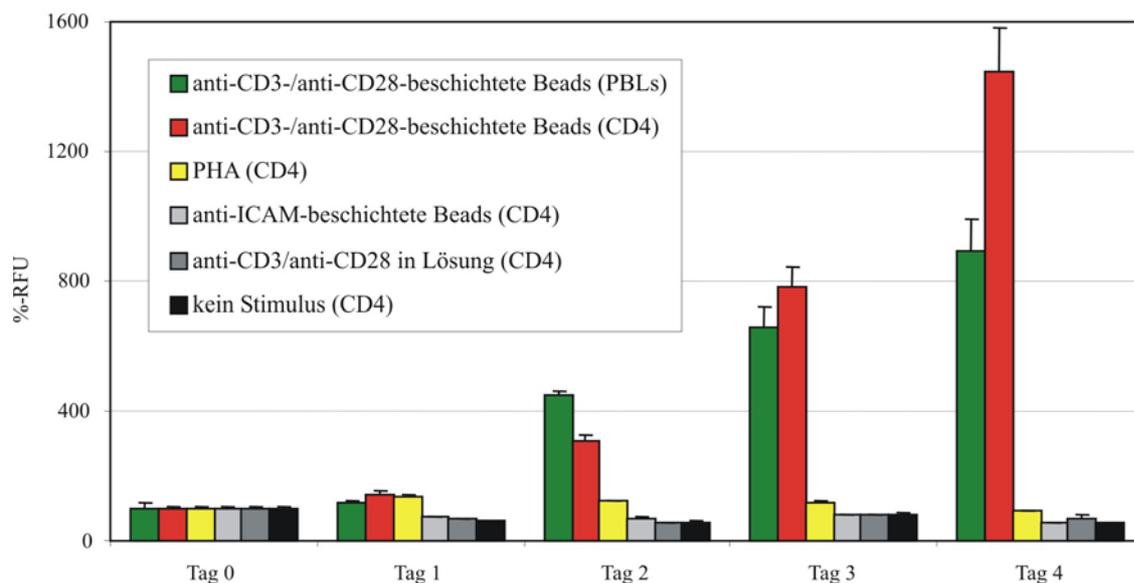


Abb. 4.3 Nebeneinander gezeigt ist die Proliferation von α CD3-/ α CD28-beschichteten Bead-stimulierten PBLs (grün) und auf verschiedene Weise stimulierten CD4⁺-Zellen über vier Tage. An Tag 0 wurden die CD4⁺-Zellen entweder mit α CD3-/ α CD28-beschichteten Beads (rot), PHA (2 μ g/ml) (gelb), α ICAM-beschichteten Beads (hellgrau) oder freien α CD3- und α CD28-Antikörpern (5 μ g/ml) (dunkelgrau) stimuliert. Als Negativkontrolle wurden Zellen nicht stimuliert (schwarz). Es wurden Messungen von 29 Spendern in der PBL-Darstellung zusammengefasst. Daten von zwei (PHA-stimuliert) bis zwölf (Bead-stimuliert) Spendern gingen in die Grafik der CD4⁺-Zellen ein. Das Fluoreszenzsignal an Tag 0 wurde auf 100% gesetzt.

In den oben beschriebenen Proliferationsexperimenten wurden die Daten quantitativ als „Anstieg des Fluoreszenzsignals“ angegeben. Diese Umschreibung ergab sich aus der Beobachtung, dass der erhöhte Umsatz des CellTiter Blue, d.h. ein Anstieg des Fluoreszenzsignals, aus zweierlei Gründen geschieht:

1. Wachstum: In den ersten zwei Tagen nach Zugabe von α CD3-/ α CD28-beschichteten Beads steigt das Volumen der Zellen auf das 3fache ihres ursprünglichen Volumens an (\emptyset (unstimulierte Zellen): 8,41 μ m, n = 255 Zellen; \emptyset (stimulierte Zellen an Tag 2): 12,10 μ m, n = 51 Zellen). Aus den RNA-Isolierungen ergab sich eine um den Faktor 5,8 steigende Menge an totaler RNA (RNA(Tag 0): 1,5 pg pro Zelle; RNA(Tag 2): 8,76 pg pro Zelle, analysiert mit quantitativer PCR, Daten aus 3 Spendern). Dies spricht für eine starke Aktivierung der Zellen. Die dementsprechend gesteigerte Stoffwechselaktivität wird mit CellTiter Blue detektiert, ohne dass es in dieser Zeit zu einer tatsächlichen Erhöhung der Zellzahl kommt.

2. Proliferation: Dem Prozess des Zellwachstums folgt die Zellteilung. Die tatsächlichen Zellteilungs-raten liegen in einer Verdopplung der Zellzahl nach ungefähr zwei Tagen. Diese Zahl soll als grober Anhaltspunkt gelten und wurde aus Proliferationsversuchen mit untransfizierten CD4⁺-Zellen erhoben, welche der Proliferationsrate transfizierter Zellen nicht genau entsprechen muß. Durch die steigende Zellzahl, das heißt durch mehr aktive Zellen, erhöht sich ebenfalls die Gesamtstoffwechselaktivität, was als ein gesteigerter Umsatz des CellTiter Blue gemessen wurde.

Durch die Messung von Wachstum und Proliferation konnten sowohl der Aktivierungsstatus als auch die Zellzahlerhöhung bestimmt werden. Zellen, die in wichtigen Komponenten der Signalkaskade eingeschränkt sind, zeigen auch eine verminderte Aktivierung, die in eine verminderte Zellproliferation resultiert.

Dass die erste Zellteilung erst nach ungefähr zwei Tagen stattfindet, bot den folgenden Transfektions-experimenten einen wichtigen Vorteil: Die siRNA verbleibt einige Zeit in der Zelle, ohne durch die Aufteilung des Zytoplasmas auf zwei Zellen verdünnt zu werden. Die Zeit, in der sie in der Anfangskonzentration in der Zelle vorliegt, wird so verlängert.

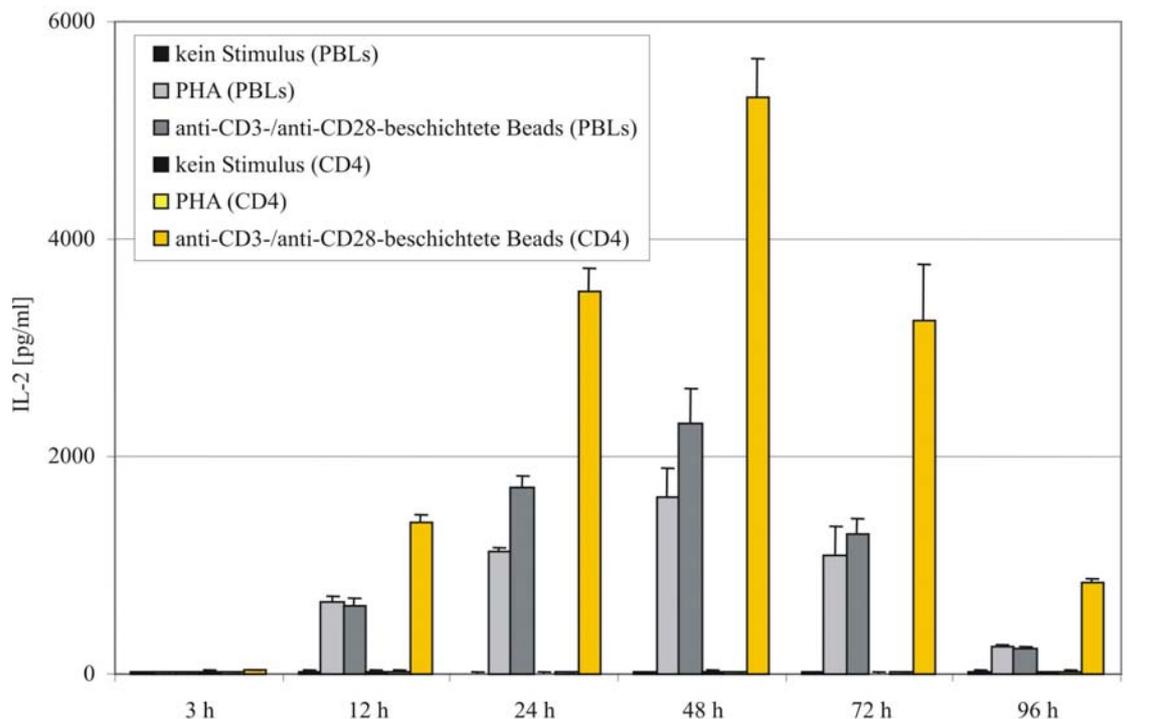
4.1.4 Interleukin-2-Sekretion von PBLs und CD4⁺-Zellen in Abhängigkeit vom Stimulus

Ein wichtiger weiterer Parameter für die Analyse der T-Zell-Aktivierung ist die Sekretion von Interleukin-2 (IL-2). IL-2 zählt zu den wichtigsten Zytokinen des Immunsystems und wird binnen Sekunden bis Minuten nach Stimulation des TCR ausgeschüttet. Es bewirkt als Wachstumsfaktor die Proliferation von CD4⁺-Zellen und die Aktivierung von CD8⁺-Zellen. Außerdem ist es ein Differenzierungsfaktor für verschiedene Zellen wie B-Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen. Durch Bestimmung des IL-2-Gehaltes im Medium von stimulierten T-Zellen wurde - wie auch durch die Messung von Proliferation - die Aktivierung der T-Zellen quantifiziert.

Die IL-2 Sekretion wurde direkt parallel zur Proliferation in Zusammenarbeit mit Eva Schwarz und Bettina Strauß ermittelt. Die 96-Well-Platten wurden im Anschluss an die Fluoreszenzsignalmessung zentrifugiert (150xg, 8 Minuten, RT). Die Überstände wurden zellfrei abpipettiert und in eine 96-Well-Platte überführt. Bis zur Bestimmung der IL-2-Konzentration mittels ELISA-Analyse wurden sie bei -20°C gelagert.

Auf die Stimulation von sowohl PBLs als auch $CD4^+$ -Zellen mit $\alpha CD3$ -/ $\alpha CD28$ -beschichteten Beads erfolgte die Produktion und Sekretion von IL-2, welche durch Erhöhung der IL-2-Konzentration gemessen wurde (Abbildung 4.4). Es zeigte sich, dass die für die Proliferationsexperimente gewählten Bedingungen (50.000 Z/W in 200 μ l Anfangsvolumen) geeignet waren, um die IL-2-Detektion im Überstand derselben Zellen durchzuführen. Schon drei Stunden nach Zugabe der Antikörperbeschichteten Beads zu $CD4^+$ -Zellen konnte eine Erhöhung der IL-2 Konzentration gemessen werden. Sie erreichte mit 5,3 ng/ml nach 48 Stunden ein Maximum. Wiederum wurde durch PHA keine Stimulation einer reinen $CD4^+$ -Zell-Population erreicht: PHA führte nicht zur Erhöhung der IL-2-Konzentration. Dagegen wurden PBLs sowohl durch Beads als auch durch PHA zur IL-2-Ausschüttung angeregt. In den Proliferationsexperimenten war die Proliferationsrate der Bead- und PHA-stimulierten PBLs etwa gleich (900% Bead-stimuliert, 1030% PHA-stimuliert, Tag 4). In der IL-2-Messung wurde nun mit Bead-Stimulation eine über die Zeit höhere IL-2-Konzentration erreicht. Es ist möglich, dass die fokale Stimulation des TCR durch die spezifischere Aktivierung zu einer erhöhten IL-2 Ausschüttung führt. Eventuell ist auch die IL-2-Bestimmung sensitiver, wodurch Unterschiede im Aktivierungsstatus der Zellen noch besser aufgeschlüsselt werden können. Insgesamt lagen die IL-2-Konzentrationen der PBLs mehr als 50 % unter denen der Bead-stimulierten $CD4^+$ -Zellen.

Abb. 4.4 Die Sekretion von IL-2 wurde über einen Zeitraum von vier Tagen gemessen. Dabei wurden die Überstände aus einem Proliferationsexperiment, in das eine Anfangszellzahl von 50.000 Z/W eingesetzt wurden, zellfrei abgenommen und die darin enthaltene IL-2-Menge ermittelt. Gezeigt werden die IL-2-Konzentrationen von PBLs und $CD4^+$ -Zellen desselben Spenders nach Stimulation mit $\alpha CD3$ -/ $\alpha CD28$ -beschichteten Beads, PHA und ohne Zugabe eines Stimulus. In der rechten Abbildung ist der 3-Stunden-Zeitpunkt vergrößert dargestellt.



Parallel zu oben gezeigten IL-2-Experimenten wurde zuvor die Proliferation derselben Zellen ermittelt. In Abbildung 4.5 sind die IL-2 Sekretion und Proliferation desselben Experiments parallel dargestellt. Daraus wird eine frühe IL-2-Antwort und eine darauf folgende, zeitlich um 36-48 Stunden versetzte Proliferation ersichtlich. Durch die IL-2-Konzentrationsbestimmung wurde es möglich, auch zu frühen Zeitpunkten wie Tag 1 oder Tag 2 den Aktivierungsstatus der Zellen zu ermitteln. Für spätere Tage eignete sich die Messung der Proliferation besser. Die Kombination der beiden Assays erlaubte die genaue und umfangreiche Analyse der Aktivierung von T-Zellen.

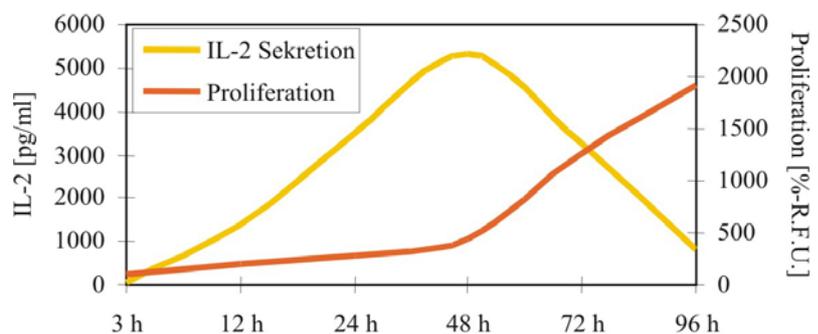


Abb. 4.5 Nebeneinander aufgetragen sind IL-2-Sekretion (gelb) und Proliferation (orange) von $CD4^+$ -Zellen eines Spenders, die mit $\alpha CD3$ -/ $\alpha CD28$ -beschichteten Beads stimuliert wurden. Der Messzeitraum erstreckte sich über vier Tage (96 Stunden).

4.2 Ca^{2+} -Abhängigkeit der Proliferation von $CD4^+$ -Zellen

Extrazellulären Ca^{2+} -Ionen sind essentielle Voraussetzung für die Aktivierung und Proliferation von $CD4^+$ -Zellen [67]. Durch die Veränderung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wird die Proliferation der Zellen entscheidend beeinflusst. Mit den folgenden Ca^{2+} -Experimenten sollte neben der optimalen Zelldichte und einem effizienten Stimulus die für dieses Proliferationssystem optimale Ca^{2+} -Konzentration bestimmt werden. Hintergrund dieser Überlegung sind die Experimente mit den Jurkat-T-Zell-Mutanten CJ1 und CJ5, die in der Dissertation von K. Wagner beschrieben sind. In CJ1- und CJ5-Zellen ist der CRAC-Strom signifikant reduziert [13]. K. Wagner untersuchte die Proliferation der Mutanten-Zellen im Vergleich zu parenteralen Jurkat-T-Zellen. In diesem Rahmen fand sie heraus, dass Unterschiede in der Proliferation trotz der erheblichen Differenzen des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstromes nur unter Ca^{2+} -limitierten Bedingungen gemessen werden können. Für die vorliegende Dissertation wurde dieses Wissen genutzt. Dafür wurde zunächst die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Proliferation von primären, humanen $CD4^+$ -Zellen untersucht.

Die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wird durch das AIM-V Medium vorgegeben. Die Modifikation der Ca^{2+} -Bedingungen des Versuchsystems erfolgte durch die Zugabe der chelatbildenden Substanz EGTA, die eine sehr hohe Affinität zu Kalzium besitzt. Neben der EGTA-Wirkung wurde getestet, ob die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration durch Kalziumchlorid ($CaCl_2$) die T-Zell-Proliferation beeinflusst. Zusätzlich wurde die Zytotoxizität von EGTA und $CaCl_2$ über die equimolare Zugabe von jeweils EGTA und $CaCl_2$ überprüft. Der Effekt von zum Beispiel 1 mM EGTA auf die Ca^{2+} -Konzen-

tration sollte durch die Zugabe von 1 mM CaCl_2 aufgehoben werden. Die so behandelten Zellen sollten also eine den Kontrollzellen entsprechende Proliferation aufweisen. Eine Toxizität von entweder EGTA oder CaCl_2 auf die Zellen würde sich durch die reduzierte Proliferation im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollzellen zeigen.

In den folgenden Experimenten wurde die Reduktion der Proliferation von $\alpha\text{CD3-}/\alpha\text{CD28}$ -beschichteten Bead-stimulierten CD4^+ -Zellen in Abhängigkeit von der EGTA-Konzentration sichtbar (Abbildung 4.6). An Tag 4 des Versuches wurde ein IC_{50} -Wert von 1,06 mM ermittelt, was bedeutet, dass die Zugabe von 1,06 mM EGTA die Proliferation von CD4^+ -Zellen um 50 % reduziert. Durch einen Wechsel der FCS-Charge während der Experimente verschob sich der IC_{50} -Wert um 0,05 mM nach links von 1,1 mM auf den angegebenen Wert 1,06 mM. Die Bestimmung des Gesamtkalziums im FCS durch die Firma InfraCerv Knapsack mittels ICP-OES (inductively coupled plasma optical emission spectroscopy) bestätigte eine Reduktion der Kalziumkonzentration von 130 mg/l im vorherigen FCS auf 110 mg/l im FCS der neuen Charge. Dies erklärt, warum in früheren Proliferationsexperimenten mit höheren EGTA-Konzentrationen gemessen wurde, welche dieselben Ergebnisse zeigten.

Die Zugabe von 0,5 mM, 1,0 mM und 1,5 mM CaCl_2 beeinflusste die Proliferation von Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle nicht. Die Zellen wurden dann equimolaren EGTA- und CaCl_2 -Konzentrationen im Bereich von 0,5 mM und 1,5 mM ausgesetzt (Abbildung 4.6, rechts). Die alleinige Behandlung mit 1,5 mM EGTA führt zu einer totalen Proliferationsinhibition. Durch Zugabe von CaCl_2 wurde diese Inhibition vollständig aufgehoben. Es wurde ein Proliferationssignal gemessen, das sich nicht von dem der unbehandelten Zellen unterschied. Deswegen kann von einem EGTA-Effekt ausgegangen werden, der nicht auf Toxizität des EGTA an sich, sondern in der Abnahme des extrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ begründet liegt.

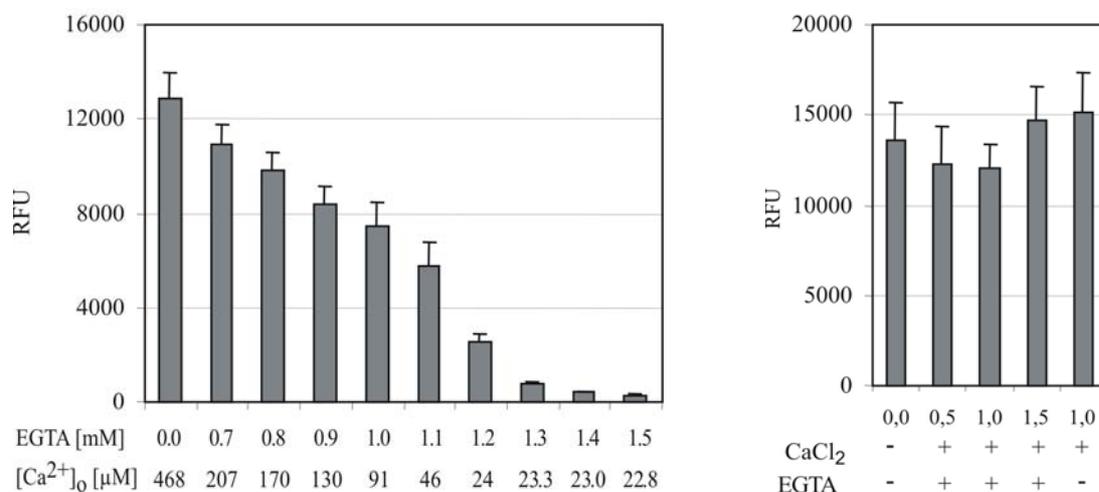


Abb. 4.6 Links wird die Abhängigkeit der CD4^+ -Zell-Proliferation zur EGTA-Konzentration gezeigt. Die Zellen wurden mit $\alpha\text{CD3-}/\alpha\text{CD28}$ -beschichteten Beads stimuliert und über vier Tage mit den aufgeführten EGTA-Konzentrationen inkubiert. Das zur entsprechenden EGTA-Konzentration zugehörige freie $[\text{Ca}^{2+}]$ in AIM-V-

Medium mit 10% FCS ist ebenfalls gezeigt ($[Ca^{2+}]_0$) (die Werte wurden in Zusammenarbeit mit Carsten Kumerow ermittelt). Die Daten von 6 Spendern wurden gemittelt. Rechts stehende Grafik zeigt die Negativkontrollen, bei denen weder die alleinige Zugabe von 1 mM $CaCl_2$ noch die equimolare Zugabe von 0,5, 1,0 und 1,5 mM $CaCl_2$ und EGTA die Proliferation beeinflusste. Daten von zwei Spendern wurden zusammengefasst.

Zur besseren Untersuchung dieser Abhängigkeit wurden die Konzentrationen des freien Ca^{2+} der entsprechenden EGTA-Lösungen bestimmt. Sie sind in Abbildung 4.6 unter den einzelnen EGTA-Konzentrationen aufgeführt. Es wurde beobachtet, dass nur sehr niedrige extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen erforderlich sind, um T-Zell-Proliferation zu ermöglichen. Der IC_{50} -Wert von 1,06 mM EGTA entspricht einer freien Ca^{2+} -Konzentration von nur noch ungefähr 70 μM . Wenn man von einer Konzentration von 1,2 mM freiem Ca^{2+} im humanen Blutplasma ausgeht, bedeutet dies eine Reduktion um mehr als das 15fache. Sogar unter diesen extremen Bedingungen proliferieren humane $CD4^+$ -Zellen noch halbmaximal.

4.3 Proliferationsexperimente unter Blockade des CRAC-Kanals

Wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, ist der CRAC-Kanal eine wesentliche Komponente in der TCR-vermittelten Aktivierung von $CD4^+$ -Zellen. BTP2 (3,5-BisTrifluoromethyl Pyrazol 2) blockiert diesen Kanal spezifisch mit einem IC_{50} -Wert von etwa 10 nM (Abschnitt 2.2.3) [94]. Wie 2004 von Zitt *et al.* gezeigt wurde, führt diese Blockade zu verminderter $CD4^+$ -Zell-Proliferation. Allerdings wurden die Experimente mit auf der Zellkulturplatte gebundenen Antikörpern als T-Zell-Stimulus durchgeführt. Deswegen wurden in der vorliegenden Dissertation die Versuchsbedingungen an die Stimulationsmethode mit $\alpha CD3$ -/ $\alpha CD28$ -beschichteten Beads angepasst.

Für die Problemstellungen der vorliegenden Dissertation lag besondere Bedeutung darin, zu beweisen, dass eine Veränderung der TCR-vermittelten Signalkaskaden grundsätzlich zu einer Reduktion der Proliferation nach fokaler (Bead-) Stimulation führt. Dies wurde mit dem Einsatz von BTP2 ermöglicht.

$CD4^+$ -Zellen wurden entweder mit BTP2 (200 nM) oder ohne BTP2 stimuliert und über vier Tage in 96-Well-Platten inkubiert. An Tag 4 wurde die Proliferation der Zellen gemessen. Der Mittelwert von sechs Spendern ergab eine mittlere Proliferationsinhibition der mit BTP2-behandelten Zellen von 45,8% (Abbildung 4.7). So wurde durch den Einsatz von BTP2 demonstriert, dass für die Proliferation von $CD4^+$ -Zellen Ca^{2+} -Einstrom notwendig ist; die Proliferation ist CRAC-Kanal-abhängig (Abschnitt 5.1). Außerdem zeigt dieses Experiment, dass es nach einer Modifikation in der Signalkaskade zu reduzierter Proliferation kommt.

Die Inhibition der Proliferation von BTP2-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle an Tag 4 erhöhte sich auf 86%, wenn zusätzlich zum BTP2 1,1 mM EGTA zu den Zellen gegeben wurde. Aus dieser Beobachtung kann geschlossen werden, dass eine Reduktion der Proliferation durch die Limi-

tierung des extrazellulären Ca^{2+} -Angebots verstärkt wird. 1,1 mM EGTA reduziert in AIM-V-Medium die Konzentration des freien Ca^{2+} um eine Zehnerpotenz von 468 μM auf 46 μM . Dadurch wird die Proliferation um etwa 50% (IC_{50} -Wert = 1,06 mM) gehemmt. Werden zusätzlich zum stark reduzierten Ca^{2+} -Angebot diejenigen Kanäle blockiert, die den Eintritt von extrazellulärem Ca^{2+} in die Zelle ermöglichen, steht der Zelle nicht mehr genug für die Proliferation benötigtes Ca^{2+} zur Verfügung. Daraus folgt die stärker reduzierte Proliferationsrate BTP2-behandelter Zellen von 86% im Vergleich zu Kontrollzellen, denen zwar EGTA, jedoch kein BTP2 zugegeben wurde.

Dies entspricht insgesamt einer Verstärkung der BTP2-Wirkung um mehr als 50% im Vergleich zu den Zellen, die mit derselben Menge BTP2 ohne EGTA inkubiert werden. Dieser Effekt wurde in den folgenden Proliferationsexperimenten ausgenutzt. Die Hauptfragestellung der vorliegenden Dissertation lag darin, ob die Herunterregulierung von TRP-Kanälen den Ablauf von TCR-induzierten Signalkaskaden und darüber die Proliferation von CD4^+ -Zellen beeinflusst. Nach demselben Prinzip der BTP2-Wirkung wurde angenommen, dass sich bei limitiertem extrazellulärem Ca^{2+} -Angebot und zusätzlicher Ausschaltung beteiligter Kanäle (durch siRNA), wiederum die Wirkungen addieren und in eine stark reduzierte Proliferation resultieren. Die Erkennung solcher potentiell wichtigen Kanäle für die T-Zell-Aktivierung würde auf diese Weise erleichtert. Eben diese Überlegung wurde schon bei den Jurkat-T-Zell-Mutanten CJ1 und CJ5 angewendet, wodurch nach Limitierung des extrazellulären Ca^{2+} -Angebotes die Reduktion der Mutanten-Zell-Proliferation im Vergleich zu parenteralen Jurkat-T-Zellen nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 4.2).

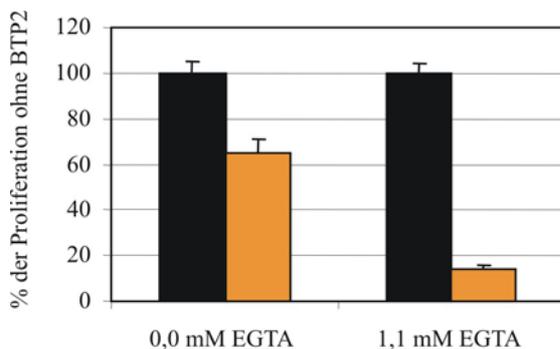


Abb. 4.7 Nach der Applikation von entweder 200 nM BTP2 (orange Balken) oder 0,0 nM BTP2 (schwarze Balken) wurden die CD4^+ -Zellen mit $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$ -beschichteten Beads stimuliert. Außerdem wurden Zellen zusätzlich mit 1,1 mM EGTA inkubiert. Nach viertägiger Inkubation wurde die Proliferation mittels CTB bestimmt. Gezeigt sind die Daten eines repräsentativen Spenders.

Interessanterweise wurde die Proliferation von CD4^+ -Zellen, die zuvor schon über drei Tage mit Beads stimuliert worden waren, durch eine Zugabe von BTP2 nicht mehr beeinflusst. Die Proliferation wurde durch BTP2 nicht mehr inhibiert. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass Zellen auch unabhängig von der TCR-vermittelten Signalkaskade proliferieren, wenn die IL-2 Produktion einmal in Gang gesetzt ist. Sobald IL-2 von stimulierten Zellen in das Medium ausgeschüttet wird, können weitere Zellen über den IL-2-Rezeptor zur Proliferation angeregt werden. Die Blockade des CRAC-Kanals berührt diesen IL-2-abhängigen Signalweg nicht, sodass BTP2 auf bereits stimulierte Zellen keine inhibierende Wirkung mehr hat.

4.4 Etablierung der siRNA-Technologie

Das Ziel der Transfektion von Zellen mit siRNA ist der selektive Abbau von mRNA, was zu der verminderten Expression des zugehörigen Proteins führt (Abschnitt 2.5). Der Nachweis der Funktionalität der siRNA sollte optimalerweise über die Bestimmung des reduzierten Proteingehaltes erfolgen. Da für TRP-Kanäle, die in der vorliegenden Dissertation untersucht wurden, keine gut funktionierenden, spezifischen Antikörper existieren, wurde der Nachweis über die Reduktion der mRNA geführt. Die mRNA-Bestimmungen wurden in Zusammenarbeit mit Eva Schwarz und Bettina Strauß mittels quantitativer PCR durchgeführt (Abschnitt 4.4.2). Da im Verlauf der vorliegenden Dissertation dem TRPC3-Protein ein besonderes Interesse galt, wurde ein Fokus auf den Nachweis der Reduktion der TRPC3-mRNA durch Transfektion mit TRPC3-siRNA gelegt.

Für diese Experimente wurde mit HEK 293 Zellen gearbeitet, die den TRPC3-Kanal stabil überexprimieren. Die Zellen wurden freundlicherweise von Mike Zhu zur Verfügung gestellt. Sie enthalten durch den starken Promoter des Plasmids eine größere TRPC3-mRNA-Menge als T-Zellen. Der TRPC3-Kanal wird deutlich stärker exprimiert. Damit kann außerdem von einer höheren Turn-over-Rate des TRPC3 ausgegangen werden. Der entscheidende Vorteil der Arbeit mit HEK 293 Zellen liegt in der starken Vereinfachung des Nachweises der siRNA-Funktion, der in unstimulierten T-Zellen an der Grenze des technisch Möglichen liegt. Ein weiterer wichtiger Vorteil ist, dass das TRPC3-Protein als Fusionsprotein vorliegt und C-terminal einen Hämagglutinin (HA-) Anhang enthält. Gegen diesen HA-Anhang gibt es spezifische Antikörper, sodass TRPC3 nachgewiesen werden kann, ohne einen TRPC3-Antikörper zu benötigen. Deswegen kann neben der mRNA-Reduktion auch eine Proteinreduktion durch die siRNA gezeigt werden. Die Proteinreduktion wurde in Zusammenarbeit mit Eva Schwarz und Bettina Strauß mittels Western Blot analysiert (Abschnitt 4.4.3).

Für die genannten Vorteile der Verwendung einer Zelllinie wurden auch Nachteile in Kauf genommen. Die hohe Turn-over-Rate des TRPC3 in HEK 293 Zellen bedingt eine hohe mRNA-Menge und damit eine gute Nachweismöglichkeit für die siRNA-Wirkung. Allerdings lässt sich die für HEK Zellen ermittelte Kinetik nicht auf T-Zellen übertragen, deswegen musste auf die Beobachtung der Kinetik von siRNAs verzichtet werden.

Dennoch lieferten die HEK 293 Zellen ein konstantes und solides System, in dem die siRNA-Effizienz ohne aufwendige Optimierungen (zum Beispiel der siRNA Mengen oder der Anzahl der transfizierten Zellen) nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der Neuheit der Technologie und der Vielfalt an Fehlermöglichkeiten ist es nicht selbstverständlich, dass eine siRNA überhaupt den erwarteten Effekt hat. So lag der Stellenwert der HEK 293 Zell-Experimente im Nachweis der grundsätzlichen methodischen Möglichkeit, TRPC3 durch die Transfektion mit TRPC3-siRNA herunterzuregulieren.

4.4.1 Bestimmung der Transfektionsrate von siRNA-transfizierten, TRPC3-überexprimierenden HEK 293 Zellen und humanen CD4⁺-Zellen

Die HEK 293 Zellen wurden durch die HiPerfect-Technik von Qiagen transfiziert, bei der die siRNA in sogenannten Transfektionskomplexen in die Zellen gebracht wird. Zunächst wurde die Transfektionsrate der auf diese Weise behandelten HEK 293 Zellen bestimmt. Dies erfolgte über die Transfektion mit unspezifischer, Fluoreszenz-gekoppelter siRNA (Negative Control siRNA Alexa Fluor 546). Sowohl vier Stunden als auch acht Stunden nach Transfektion wurde das intrazelluläre Fluoreszenzsignal gemessen. Zudem wurde eine Aufnahme im Transmissionslicht angefertigt. Zu beiden Zeitpunkten befand sich in jeder Zelle fluoreszierende siRNA. Damit ergab sich eine Transfektionsrate von 100%. Dieser Versuch wurde zur Überprüfung des Ergebnisses zweimal wiederholt.

Um die Transfektionsraten von primären CD4⁺-Zellen zu bestimmen, die durch Elektroporation transfiziert wurden, wurden die Zellen mit der oben genannten, Fluoreszenz-gekoppelten siRNA transfiziert. Zwei Stunden nach Transfektion wurde das intrazelluläre Fluoreszenzsignal ermittelt. 1720 Zellen von insgesamt 1773 Zellen enthielten fluoreszierende siRNA, sodass eine Transfektionsrate von 97% bestimmt wurde. Auch das Ergebnis dieses Versuches wurde mit unterschiedlichen Spendern überprüft.

Neben der Transfektionseffizienz wurde außerdem die Wirkung einer siRNA auf das CD4-Protein in CD4⁺-Zellen gezeigt. Die Kontrolle stellten Kontroll-siRNA-transfizierte PBLs (Abbildung 4.8). Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen wurden die Zellen mit α CD4-Antikörper gefärbt. Einzelbildaufnahmen von CD4- und Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen wurden am Fluoreszenzmikroskop angefertigt. Im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigte sich ein reduziertes Fluoreszenzsignal in den CD4-siRNA-transfizierten Zellen. Die statistische Analyse ergab eine Reduktion des α CD4-Antikörper-Fluoreszenzsignals um 58% (n = 596 Zellen, 1 Spender, mittleres Fluoreszenzsignal (CD4-siRNA-transfizierte Zellen) 175, mittleres Fluoreszenzsignal (Kontrollzellen) 412). Diese Experimente belegen, dass durch die Transfektion mit siRNA in primären CD4⁺-Zellen ein Membranprotein herunterreguliert werden kann.

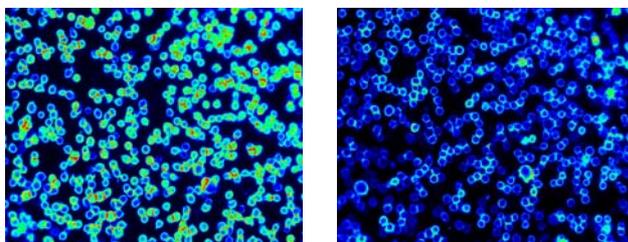


Abb. 4.8 PBLs wurden mit Kontroll-siRNA (links) und CD4-siRNA (rechts) transfiziert und über drei Tage inkubiert (37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit). Nach der Färbung mit RPE-konjugiertem α CD4-Antikörper wurde am Fluoreszenzmikroskop das Fluoreszenzsignal bestimmt (Die Abbildung wurde freundlicherweise von Melodie-Jo Wolfs zur Verfügung gestellt).

4.4.2 Quantifizierung der TRPC3-siRNA-Effizienz in transfizierten, TRPC3-überexprimierenden HEK 293 Zellen durch quantitative Real-Time PCR

Eine Methode, um die Funktionalität der siRNA nachzuweisen, liegt in der quantitativen Bestimmung der mRNA. Mit quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) wurden die TRPC3-mRNA-Mengen von TRPC3-siRNA- und Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen analysiert.

Die Transfektion von TRPC3-überexprimierenden HEK 293 Zellen erfolgte mit TRPC3-1-siRNA und einer Kontroll-siRNA (Im Anhang in Abschnitt 7.1 sind die einzelnen siRNAs aufgelistet). Über einen Zeitraum von drei Tagen wurden die Zellen jeweils nach 0, 12, 24, 48 und 72 Stunden untersucht, indem sie abgelöst und in TRIzol aufgenommen wurden. Die mRNA-Mengen wurden mittels quantitativer PCR bestimmt (Abbildung 4.9).

Schon innerhalb der ersten 24 Stunden reduzierte die TRPC3-1-siRNA die TRPC3-mRNA in den transfizierten Zellen deutlich: Der $2^{-\Delta CT}$ -Wert am 12-Stunden-Punkt beträgt 0,61 im Vergleich zu 0,15 am 24-Stunden-Punkt. Der $2^{-\Delta CT}$ -Wert ist das Verhältnis von TRPC3-mRNA zu einem Kontrollgen, das heißt, es wird die relative TRPC3-mRNA-Menge bestimmt. Dafür wurde die TRPC3-mRNA-Menge ins Verhältnis zu der mRNA-Menge des Kontrollgens HUP0 (Human Acidic Protein 0) derselben Zellen gesetzt. 48 Stunden nach Transfektion sank die relative Expression von TRPC3 der TRPC3-1-siRNA-transfizierten Zellen auf noch 17,0% der relativen Expression von TRPC3 der Kontrollzellen ($2^{-\Delta CT}$ [TRPC3-siRNA-transfiziert]: 0,08; $2^{-\Delta CT}$ [Kontroll-siRNA-transfiziert]: 0,47). Danach stieg die TRPC3-mRNA-Menge der TRPC3-1-siRNA-transfizierten Zellen wieder an.

Dieses Ergebnis belegt, dass die TRPC3-1-siRNA den erwarteten, mRNA-abbauenden Effekt in der Zelle hat. Dies war die Grundvoraussetzung für die siRNA-Experimente.

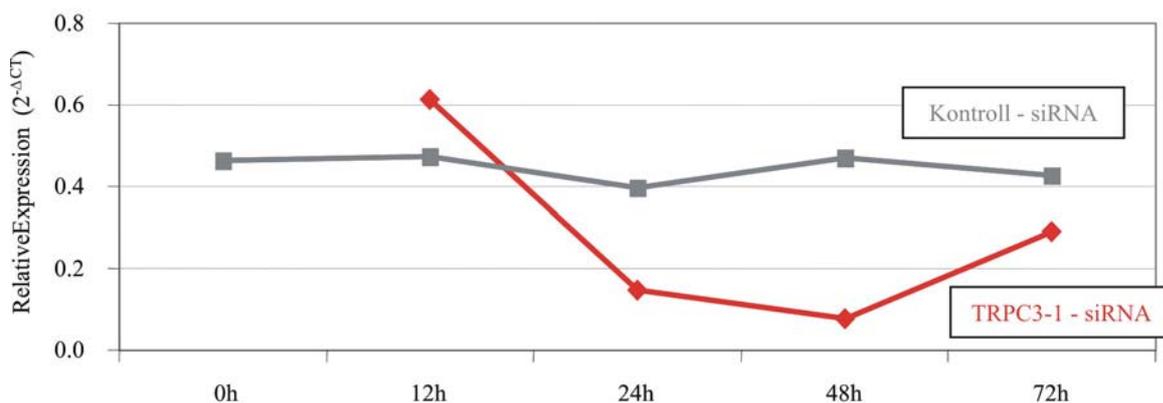


Abb. 4.9 TRPC3-1- (rot) und Kontroll-1-siRNA (grau)-transfizierte HEK 293 Zellen wurden über einen Zeitraum von drei Tagen analysiert. Nach Isolierung der totalen RNA und der reversen Transkription der RNA in cDNA wurde mittels quantitativer PCR die TRPC3-mRNA-Menge bestimmt. Die mRNA-Höhe ist als relative Expression ($2^{-\Delta CT}$) zu dem Kontrollgen HUP0 ausgedrückt. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Eva Schwarz und Bettina Strauß durchgeführt.

4.4.3 TRPC3-Protein-Bestimmung in transfizierten, TRPC3-überexprimierenden HEK 293 Zellen mittels Western Blot Analyse

Die Experimente zur Bestimmung der TRPC3-Expression auf Proteinebene wurden weitgehend parallel zu den mRNA-Ermittlungen durchgeführt. Diejenigen Zellen, die nach Entnahme der Probe für die mRNA verblieben, wurden zur Proteinanalyse eingesetzt. Die Inkubationszeiten nach Transfektion betrugen 0, 24, 48 und 72 Stunden.

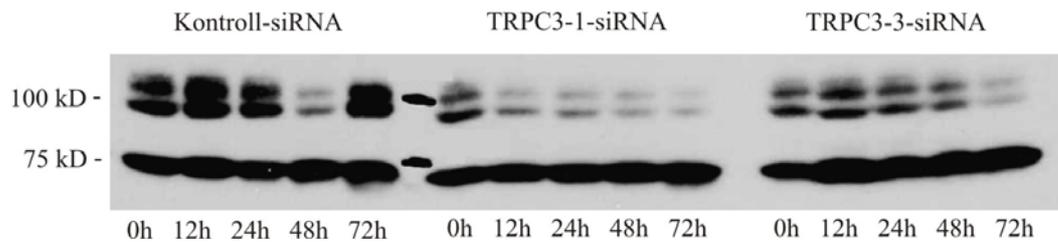


Abb. 4.10 Western Blot Analyse von HEK 293 Zellen, die mit Kontroll-siRNA, TRPC3-1- und TRPC3-3-siRNA transfiziert wurden. Zum jeweiligen Zeitpunkt (0 Stunden bis 72 Stunden) wurden die Zellen mit Lysepuffer aufgebrochen und die Proteine aus dem Zelllysate isoliert. Durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließenden Transfer der Proteine auf Nitrocellulosemembranen wurde die Expression des TRPC3-Proteins bestimmt. Die mittlere Bande entspricht dem TRPC3-Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 96 kD - die oberhalb von 96 kD gelegenen Banden entsprechen den glykosylierten TRPC3-Proteinen.

Entsprechend den mRNA-Bestimmungen wurde festgestellt, dass die TRPC3-Expression nicht stabil ist, sondern zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Stärke aufweisen kann. Dadurch wurden in den Kontrollzellen Schwankungen der TRPC3-Expression gemessen (Abbildung 4.10, Kontroll-siRNA, 48h). Wie in Abschnitt 4.4 schon beschrieben, dienten die HEK 293 Zell-Experimente jedoch dem grundsätzlichen methodischen Nachweis, dass TRPC3-siRNA TRPC3 herunterreguliert. Deswegen wurde von weiteren Optimierungen abgesehen, um sich nach erfolgreichem Nachweis der Funktionalität der siRNA wieder auf CD4⁺-Zellen zu konzentrieren.

Neben der TRPC3-1-siRNA wurde die TRPC3-3-siRNA getestet. Die Analyse sowohl der mit TRPC3-1-siRNA- als auch der mit TRPC3-3-siRNA-transfizierten HEK 293 Zellen zeigte eine Reduktion der TRPC3-Expression über den gemessenen Zeitraum. In der Kinetik unterschieden sich die beiden siRNAs. Die Transfektion mit TRPC3-1-siRNA reduzierte die TRPC3-Expression innerhalb von 24 Stunden, während die Transfektion mit TRPC3-3-siRNA erst nach 72 Stunden einen reduzierenden Effekt auf das TRPC3-Protein hatte. Wie der Nachweis der Reduktion der mRNA durch siRNA war auch die Reduktion der TRPC3-Proteinexpression durch siRNA von besonderer Wichtigkeit für die vorliegende Dissertation. Das Ergebnis bestätigte die gute Effizienz der TRPC3-siRNA mit einer zweiten Methode auf Proteinebene.

Im weiteren Verlauf der Experimente zur Quantifizierung der siRNA-Effizienz gelang es auch mit einem Fluoreszenz-gekoppeltem α HA-Antikörper (α HA-Alexa 458-Antikörper), die Herunterregulierung des TRPC3-Proteins darzustellen. Dieser Antikörper ist gegen den HA-Anhang des TRPC3-Proteins in HEK 293 Zellen gerichtet und fluoresziert bei einer Anregungswellenlänge von 458 nm. In

TRPC3-1-siRNA-transfizierten HEK 293 Zellen war innerhalb von 48 Stunden nach Transfektion das Fluoreszenzsignal im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen um mehr als 80% gesenkt (Experimente von Anne Sappok im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt). Dies entspricht den in Abbildung 4.10 gezeigten Ergebnissen der Western Blot Analyse.

4.5 Bestimmung und Etablierung optimaler Kontroll-siRNAs

4.5.1 Negativkontrollen

Innerhalb der siRNA-Experimente wurden zwei unterschiedliche Negativkontrollen eingesetzt. Die erste Kontrolle waren Kontroll-siRNAs, die von den Herstellern angeboten werden (Qiagen, Dharmacon). Die Namen „non-silencing“ oder „non-targeting“ rühren daher, dass die siRNA-Sequenzen so gewählt sind, dass sie zu keiner im gesamten menschlichen Genom vorkommenden mRNA komplementär sind. Die siRNAs wurden über computergesteuerte Sequenzanalyse von den Firmen hergestellt.

Aufgrund des Expressionsmusters der TRP-Kanäle in humanen CD4⁺-Zellen (Abschnitt 2.3) bot sich eine weitere Kontrolle an: Es wurden siRNAs gegen diejenigen TRPs, die nicht exprimiert werden, als Kontrolle eingesetzt. Darunter fallen TRPC4, -C5, -C6, -C7 und TRPM8. Jeweils 2 siRNAs gegen TRPC4 und TRPC7 wurden verwendet.

4.5.2 STIM1-siRNA-transfizierte Zellen als Positivkontrolle

Anfang 2005 wurde von Roos *et al.* [65] unter anderem gezeigt, dass der Knock-down des STIM1-Proteins durch siRNA in Jurkat-T-Zellen zu einer signifikant verminderten Aktivität des CRAC-Kanals führt (Abschnitt 2.4). Außerdem wiesen die Autoren mit Hilfe von PCR und Western Blot Analysen die Effizienz der siRNA nach (bis auf 10% reduzierte STIM1-Proteinexpression nach Transfektion mit STIM1-siRNA). Die in der Publikation gezeigten Daten wurden zunächst mit huSTIM1-1140-siRNA durchgeführt. Durch eine zweite siRNA (huSTIM1-1414) wurden die Ergebnisse bestätigt.

In den hier folgenden Experimenten wurde die STIM1-siRNA derselben Sequenz wie huSTIM1-1140-siRNA eingesetzt. Die Proliferation von CD4⁺-Zellen nach Transfektion mit STIM1- und Kontroll-siRNA wurde über fünf Tage analysiert. Die Herunterregulierung des STIM1-Protein durch siRNA führte zu reduzierter Proliferation (Proliferation an Tag 4, zwei Spender, gepaarter Student'scher t-Test, $p = 0,009$). Die Proliferation der STIM1-siRNA-transfizierten CD4⁺-Zellen im Vergleich zu

Kontrollzellen wurde an Tag 4 um 31% reduziert (Abbildung 4.11). Dies korreliert mit den Ergebnissen der Proliferationsexperimente unter Blockade des CRAC-Stroms: Die Behandlung mit BTP2 bewirkte eine Verminderung der Proliferation von stimulierten $CD4^+$ -Zellen (Abschnitt 4.3). Daraus wurde geschlossen, dass T-Zell-Proliferation CRAC-Kanal-abhängig ist. Bestärkt wird diese These nun durch die verminderte Proliferation von STIM1-siRNA-transfizierten Zellen, schließlich ist gezeigt, dass die Reduktion des STIM1-Proteins zu einer reduzierten Aktivität des CRAC-Kanals führt.

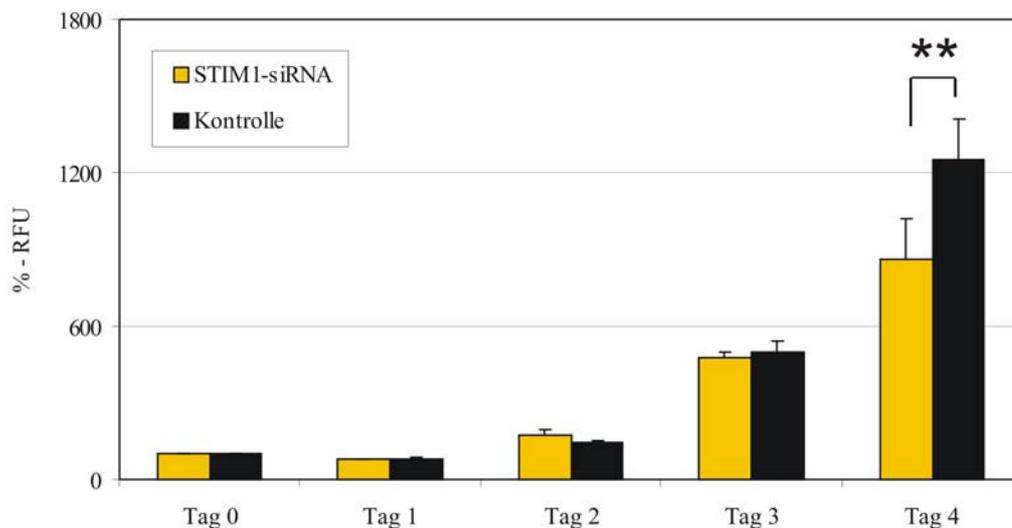


Abb. 4.11 Proliferation STIM1-siRNA-transfizierter $CD4^+$ -Zellen gemessen über vier Tage. Die Zellen wurden mit $\alpha CD3$ -/ $\alpha CD28$ -beschichteten Beads stimuliert. Die Kontrollzellen wurden mit siRNA gegen TRPC7 transfiziert (TRPC7-1, -C7-2). Die Zugabe von 1,1 mM EGTA diente der Herstellung Ca^{2+} -limitierender Bedingungen. Daten von zwei Spendern wurden gemittelt und als Prozent von Tag 0 aufgetragen. Die Reduktion der Proliferation STIM1-siRNA-transfizierter Zellen wird über den gemessenen Zeitraum an Tag 4 (gepaarter Student'scher t-Test, $p = 0,009$) sichtbar.

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Dissertation wurden die Messbedingungen für siRNA-transfizierte Zellen variiert. So wurden zum Beispiel die Proliferationsexperimente an unterschiedlichen Tagen nach Transfektion der Zellen mit siRNA (genau beschrieben in Abschnitt 4.8.1). Es wurden auch für die STIM1-siRNA-Experimente spätere Stimulationszeitpunkte gefunden, an denen die Proliferationsdifferenzen größer waren als nach Stimulation an Tag 1 nach Transfektion (Tabelle 4.1). Zum Beispiel führte der Stimulationsbeginn an Tag 8 nach Transfektion nach vier Tagen zu um 52% reduzierter Proliferation der STIM1-siRNA-transfizierten Zellen (sechs Spender, gepaarter Student'scher t-Test $p = 0,033$). In einem Experiment mit zwei Spendern wurde getestet, ob noch spätere Stimulationszeitpunkte noch stärkere Proliferationsreduktionen zeigen. Es wurde jedoch beobachtet, dass die Zeit nach Transfektion, in der die unstimulierten Zellen mit der siRNA inkubiert werden, durch das Absterben der Zellen limitiert ist. Zwölf Tage nach Transfektion ließen sich Zellen des einen Spenders zur Proliferation stimulieren, die Zellen des zweiten Spenders zeigten bis zum

Tag 4 keine Erhöhung im mit CellTiter Blue bestimmten Fluoreszenzsignal. Die Daten des ersten Spenders ergaben immer noch eine Verminderung der Proliferation STIM1-siRNA-transfizierter Zellen um 32% im Vergleich zur Kontrolle an Tag 4 des Experimentes. Das bedeutet, dass 16 Tage nach Transfektion der Zellen mit siRNA (zwölf Tage bis zur Stimulation und vier Tage Inkubationszeit) diese offensichtlich noch in ihrer Funktionalität und in ausreichender Konzentration in der Zelle vorliegt. Dieses Ergebnis der sehr langen Verweildauer der siRNA in der Zelle, ohne zerstört oder heraustransportiert zu werden, wurde weiter positiv verstärkt durch die Beobachtung, dass CD4⁺-Zellen langsam proliferieren. Durch diese Ergebnisse wird deutlich, dass sich durch siRNA auch solche Proteine herunterregulieren lassen, die eine sehr hohe Halbwertszeit und damit niedrige Turn-over-Raten haben.

	Stimulation nach Transfektion an Tag			
	1	4	8	12
Tag 0	1	1	1	1
Tag 1	0,68			
Tag 2	1,17	0,98	0,76	
Tag 3	0,96	0,78	0,47	0,60
Tag 4	0,69	0,72	0,52	0,68
Tag 5	0,69	0,71	0,56	

Tabelle 4.1 Die Mittelwerte der Proliferation von STIM1-siRNA-transfizierten Zellen wurden in der Tabelle zu den Mittelwerten der Kontrollzell-Proliferation ins Verhältnis gesetzt. Stimulation an Tag 1: n = 2 Spender, Stimulation an Tag 4: n = 3 Spender, Stimulation an Tag 8: n = 6 Spender, Stimulation an Tag 12: n = 1 Spender. Rot markiert wurden die Verhältnisse, die sich aus den Experimenten mit nach acht Tagen stimulierten Zellen zusammensetzen. Die grau unterlegten Daten zeigen die Verhältnisse der Proliferation an Tag 4.

Die messbaren Proliferationsdifferenzen der transfizierten Zellen bestätigten die Idee, siRNA-induzierte Veränderungen in der TCR-vermittelten Signalkaskade über eine Änderung der Proliferation messen zu können. Die Transfektion mit STIM1-siRNA ist die Positivkontrolle des Systems.

4.6 Screening von TRP-siRNA-transfizierten CD4⁺-Zellen auf Differenzen in der Proliferation

Nach Optimierung der Kontrollen, wurden siRNAs gegen TRP-Kanäle eingesetzt. Entsprechend des Expressionsmusters der TRP-Kanäle in CD4⁺-Zellen (Abschnitt 2.3) wurden siRNAs gegen TRPC1 und -C3, TRPM2, -M5 und -M7 sowie TRPV1, -V2, -V3, -V5 und -V6 getestet. Dabei wurde untersucht, ob die Herunterregulierung eines der genannten Kanäle durch siRNA die Proliferation der transfizierten CD4⁺-Zellen beeinflusst.

Die Versuchsbedingungen wurden zuvor optimiert und durch die oben beschriebenen Experimente festgelegt. Es wurden an Tag 0 der Experimente 50.000 CD4⁺-Zellen pro Well einer 96-Well-Platte eingesetzt und 1:1 mit α CD3-/ α CD28-beschichteten Beads stimuliert. Die Zugabe von 1,1 mM EGTA diente der Limitierung der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Für das Screening wurden die Zellen direkt im Anschluss an die Aufreinigung mit siRNA transfiziert und 15 - 20 Stunden später stimuliert. Die Proliferation wurde über fünf Tage gemessen. Die Gesamtgrafik im Anhang (Abschnitt 7.2) zeigt

eine Zusammenfassung der Experimente mit allen TRP-siRNAs an Tag 4. In den folgenden drei Absätzen wird auf die Bedingungen und die Ergebnisse der drei TRP-Proteinfamilien TRPC, TRPM und TRPV eingegangen. Als erster Anhaltspunkt wurde hierbei eine Grenze bei einer Proliferationsabweichung von mehr als 10 % gesetzt und als „Differenz“ gewertet.

TRPC-Kanäle:

In humanen CD4⁺-Zellen werden TRPC1 und TRPC3 exprimiert. Fünf verschiedene siRNAs gegen TRPC1 und acht gegen TRPC3 wurden untersucht, außerdem eine siRNA gegen das „TRP-motif“ (C1-C3-siRNA), das jeweils mit einer unterschiedlichen Base sowohl zu TRPC1 als auch zu TRPC3 homolog ist. Es wurden bei allen TRPC1-siRNAs die Daten von drei Spendern zusammengefasst. Während die erste TRPC3-siRNA (TRPC3-1) an elf Spendern getestet wurde, wurden die zweite, dritte, vierte, siebte und achte TRPC3-siRNA (TRPC3-2, -3, -4, -7, -8) jeweils dreimal eingesetzt. Daten von zwei Spendern gingen in die Ergebnisse der fünften und sechsten (TRPC3-5, -6) TRPC3-siRNA ein. Der häufige Einsatz der ersten TRPC3-siRNA erklärt sich durch das erste Proliferationsexperiment, in dem transfizierte CD4⁺-Zellen untersucht wurden. Dort wurde eine drastische Reduktion der Proliferation an Tag 4 der mit TRPC3-1-siRNA-transfizierten Zellen eines Spenders auf 42,5% der Proliferation der Kontrollzellen beobachtet. Somit wurde diese siRNA in den folgenden Experimenten neben den anderen zu testenden siRNAs wiederholt eingesetzt.

siRNA (TRP-)	C1-1	C1-2	C1-3	C1-4	C1-5	C1-C3	C3-1	C3-2	C3-3	C3-4	C3-5	C3-6	C3-7	C3-8
%-Proliferation der Kontrollzellen	69	68	113	75	88	86	80	92	81	87	71	63	104	103

Tabelle 4.2 Verhältnis der Proliferation von mit verschiedenen TRPC-siRNAs transfizierten CD4⁺-Zellen zur Proliferation der Kontrollzellen. Gezeigt ist die Proliferation an Tag 4, die Proliferation der Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt.

Die Experimente der TRPC1-siRNAs zeigten bei vier von fünf siRNAs eine reduzierte Proliferation an Tag 4 (Tabelle 4.2). Die Reduktion lag zwischen 12% und 32%. Bei Zellen, die mit der dritten TRPC1-siRNA transfiziert wurden, wurde eine Erhöhung der Proliferation um 13% beobachtet.

Auch bei Transfektion mit siRNA gegen den TRPC3-Kanal wurde eine Reduktion der CD4⁺-Zell-Proliferation beobachtet. Zwar proliferierten diejenigen Zellen, die mit TRPC3-2-, TRPC3-7- und TRPC3-8-siRNA transfiziert wurden, in gleichem Maße wie die Kontrollzellen (92%, 104% und 103%), jedoch zeigten die mit den fünf weiteren TRPC3-siRNAs transfizierten Zellen reduzierte Proliferation. Die Reduktion lag im Bereich von 63% bis 87% Proliferation der Kontrolle.

TRPM-Kanäle:

Es wurden die drei Kanäle TRPM2, -M5 und -M7 auf ihre Funktion für T-Zell-Proliferation untersucht. Alle siRNAs wurden an zwei Spendern getestet, wobei jeweils zwei siRNAs gegen denselben Kanal eingesetzt wurden.

siRNA (TRP-)	M2-1	M2-2	M5-1	M5-2	M7-1	M7-2
%-Proliferation der Kontrollzellen	84	94	100	88	110	106

Tabelle 4.3 Verhältnis der Proliferation von mit verschiedenen TRPM-siRNAs transfizierten CD4⁺-Zellen zur Proliferation der Kontrollzellen. Gezeigt ist die Proliferation an Tag 4, die Proliferation der Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt.

M7-siRNA-transfizierte Zellen zeigten nach vier Tagen den Kontrollzellen entsprechende Proliferation (Tabelle 4.3). Während die Transfektion mit einer siRNA gegen TRPM2 und TRPM5 (TRPM2-2 und TRPM5-1) die Zellproliferation nicht beeinflusste, wurden bei TRPM2-1- und TRPM5-2-siRNA-transfizierten Zellen eine Reduktion um 16% bzw. 12% der Proliferation der Kontrollzellen beobachtet.

TRPV-Kanäle:

Gegen alle TRPV-Kanäle, die in humanen CD4⁺-Zellen exprimiert sind, wurden siRNAs eingesetzt. Dazu gehörten TRPV1, -V2, -V3, -V5 und -V6, für die jeweils zwei siRNAs benutzt wurden. Während die Daten lediglich eines Spenders von V3-siRNA- (TRPV3-1 und -2) und V1-siRNA (TRPV1-2)-transfizierten Zellen eingingen, wurden für die übrigen siRNAs Daten zweier Spender zusammengefasst. Die erste TRPV1-siRNA (TRPV1-1) wurde in drei Spendern getestet.

siRNA (TRP-)	V1-1	V1-2	V2-1	V2-2	V3-1	V3-2	V5-1	V5-2	V6-1	V6-2
%-Proliferation der Kontrollzellen	99	187	75	113	108	167	135	91	97	98

Tabelle 4.4 Verhältnis der Proliferation von mit verschiedenen TRPV-siRNAs transfizierten CD4⁺-Zellen zur Proliferation der Kontrollzellen. Gezeigt ist die Proliferation an Tag 4, die Proliferation der Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt.

Die Ergebnisse der TRPV-Experimente zeigten zwei Auffälligkeiten (Tabelle 4.4). Die Zellen, die mit siRNAs gegen V1, V3 und V5 transfiziert worden waren, wiesen in je einer siRNA (TRPV1-2, TRPV3-2, TRPV5-1) eine erhöhte Proliferationsrate bis zu 187% der Proliferation der Kontrollzellen auf. Die Transfektion mit der zweiten siRNA (TRPV1-1, TRPV3-1, TRPV5-2) beeinflusste die Proliferation wiederum nicht. Ebenso wenig wurde die Proliferation von TRPV6-siRNA-transfizierten Zellen verändert. Eine auf 75% reduzierte Zellproliferation wurde nach Transfektion mit der ersten siRNA gegen TRPV2 (TRPV2-1) beobachtet. Die zweite siRNA hingegen (TRPV2-2) bewirkte die 113%ige Proliferation der Kontrollzellen. Bei der Bewertung der Ergebnisse darf man nicht aus den

Augen verlieren, dass die siRNAs TRPV1-1, TRPV3-1 und TRPV3-2 an lediglich einem Spender getestet wurden.

Durch diese Experimente wurden mehrere Aspekte aufgedeckt, von denen in der vorliegenden Dissertation nicht alle differenziert behandelt werden konnten:

1. Die Transfektion mit der Mehrzahl der siRNAs gegen sowohl TRPC1 als auch TRPC3 reduzierte die CD4⁺-Zell-Proliferation an Tag 4.
2. Auch in TRPM2-, -M5- und -V2-siRNA-transfizierten Zellen wurden nach Transfektion mit je einer siRNA reduzierte Proliferationsraten ermittelt.
3. Im Gegensatz dazu wurde in TRPV1, -V3 und -V5-siRNA-transfizierten Zellen (mit je einer siRNA) ein Anstieg der Proliferation beobachtet.

Der Anstieg der Proliferation, der im letzten Punkt erwähnt ist, wurde in der vorliegenden Dissertation nicht weiter verfolgt. Er stellt jedoch einen interessanten Untersuchungsgegenstand dar, der eventuell zur Klärung der Funktion von TRPV1, -V3 und -V5-Kanälen in CD4⁺-Zellen beitragen könnte.

Die Reduktion der Proliferation wurde bei Herunterregulierung der folgenden TRP-Kanäle (d.h. bei Transfektion mit der entsprechenden siRNA) ermittelt: **TRPC1**, **TRPC3**, **TRPM2**, **TRPM5** und **TRPV2**. Diese fünf Kanäle wurden in den folgenden Experimenten weiter auf ihre Funktion für die T-Zell-Aktivierung untersucht.

4.7 Expression einzelner TRP-Kanäle in stimulierten CD4⁺-Zellen

Um die Funktionen der TRP-Kanäle genauer zu analysieren, wurden deren Expressionsmuster in stimulierten CD4⁺-Zellen quantitativ über einen Zeitraum von 13 Tagen erfasst. Das Hauptinteresse galt hierbei der Regulation von TRP-Kanälen als Reaktion auf die Bildung einer immunologischen Synapse. Dazu wurden CD4⁺-Zellen von drei Spendern im Anschluss an die Aufreinigung mit α CD3-/ α CD28-beschichteten Beads stimuliert. An insgesamt zwölf Zeitpunkten wurden RNA-Proben abgenommen und die TRP-mRNA in Zusammenarbeit mit Eva Schwarz und Bettina Strauß mittels qRT-PCR analysiert.

Die mRNA-Mengen der einzelnen TRP-Kanäle wurden nach Aktivierung der Zellen unterschiedlich beeinflusst: TRPC3-mRNA wurde in stimulierten CD4⁺-Zellen stark hochreguliert (Abbildung 4.12, 4.13 und 4.14). Ab 24 Stunden nach Stimulation stieg die mRNA-Menge bis zu einem Maximum bei 96 (Spender 3) und 120 Stunden (Spender 1 und Spender 2). Dort betrug die mRNA das Sechs-, Acht- und 14fache der Anfangsmenge (im ersten Spender wurde der fehlende 0h-Wert durch den 7h-Wert ersetzt). Über die weiteren Zeitpunkte bis 288 Stunden hielt sich die TRPC3-mRNA aller Spender auf einem etwa vier- bis fünfmal höheren Niveau. Danach sank sie, fiel jedoch im gemessenen Zeitraum nicht mehr auf das Ausgangsniveau zurück.

Neben TRPC3 wurde TRPM2 hochreguliert (Abbildung 4.12). Um 48 Stunden versetzt zu TRPC3 stieg die TRPM2-mRNA-Menge ab 72 Stunden nach Stimulation auf eine relative Expression von 4,6. Das Maximum wurde ebenfalls nach 120 Stunden erreicht. Schneller als die TRPC3-mRNA-Menge sank die TRPM2-mRNA und erreichte sogar das Ausgangsniveau. Die mRNA-Mengen der TRP-Kanäle TRPC1, -V1 und -V2 verhielten sich über den gemessenen Zeitraum nahezu konstant. Im Gegensatz dazu wurde TRPM5 eindeutig herunterreguliert. Innerhalb der ersten sieben Stunden nach Zugabe der Beads sank die TRPM5-mRNA-Menge um das 20fache im Vergleich zu dem Kontrollgen TBP (Relative Expression = 0,04)

Dass die Zellen die TRPC3- und TRPM2-mRNA-Mengen nach Stimulation des TCRs hochregulieren, deutet auf eine wichtige Rolle der beiden Kanäle für die T-Zell-Aktivierung hin. TRPM2 ist ein Kalziumkanal, der durch ADP/NAD aktiviert wird und die Zelle vor oxidativem Stress schützt. Die direkte Involvierung von TRPM2 in die Aktivierungskaskade von CD4⁺-Zellen ist somit eher unwahrscheinlich. TRPC3 dagegen ist ein Kationenkanal, der auf viele verschiedene Mechanismen aktiviert werden kann und viele unterschiedliche Funktionen hat (Abschnitt 2.3). Deswegen wurde nach diesen Experimenten ein Schwerpunkt auf die Untersuchung des TRPC3-Kanals gelegt. Die übrigen TRP-Kanäle, die in den Proliferationsexperimenten aufgefallen waren (TRPC1, TRPM2, TRPM5, TRPV1 und TRPV2) wurden in ihrer Analyse hinter TRPC3 gestellt. Die Hochregulation des TRPC3 lieferte dafür ein sehr starkes Argument. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich unter den übrigen TRP-Kanälen interessante Kandidaten mit Funktionen für die T-Zell-Aktivierung und -Proliferation befinden.

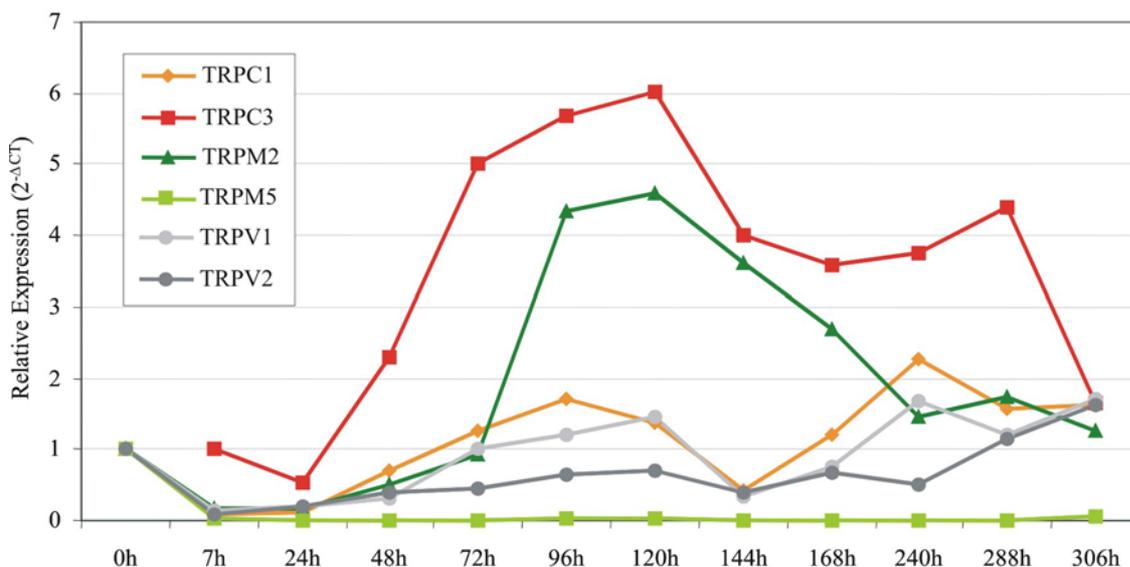


Abb. 4.12 Quantitative Analyse der mRNA-Expression von TRPC1, -C3, -M2, -M5, -V1 und -V2 eines Spenders. Unmittelbar vor Punkt 0h wurden CD4⁺-Zellen mit α CD3-/ α CD28-beschichteten Beads stimuliert. Die mRNA wurde mittels quantitativer RT-PCR analysiert, die TRP-mRNA wurde zur mRNA des Kontrollgens TBP (TATA box binding protein) normalisiert. Die Daten des Nullstundenwerts wurden auf Eins gesetzt. Der Nullstunden-Wert, der bei der TRPC3-mRNA fehlt, wurde durch den Siebenstunden-Wert ersetzt und auf Eins gesetzt.

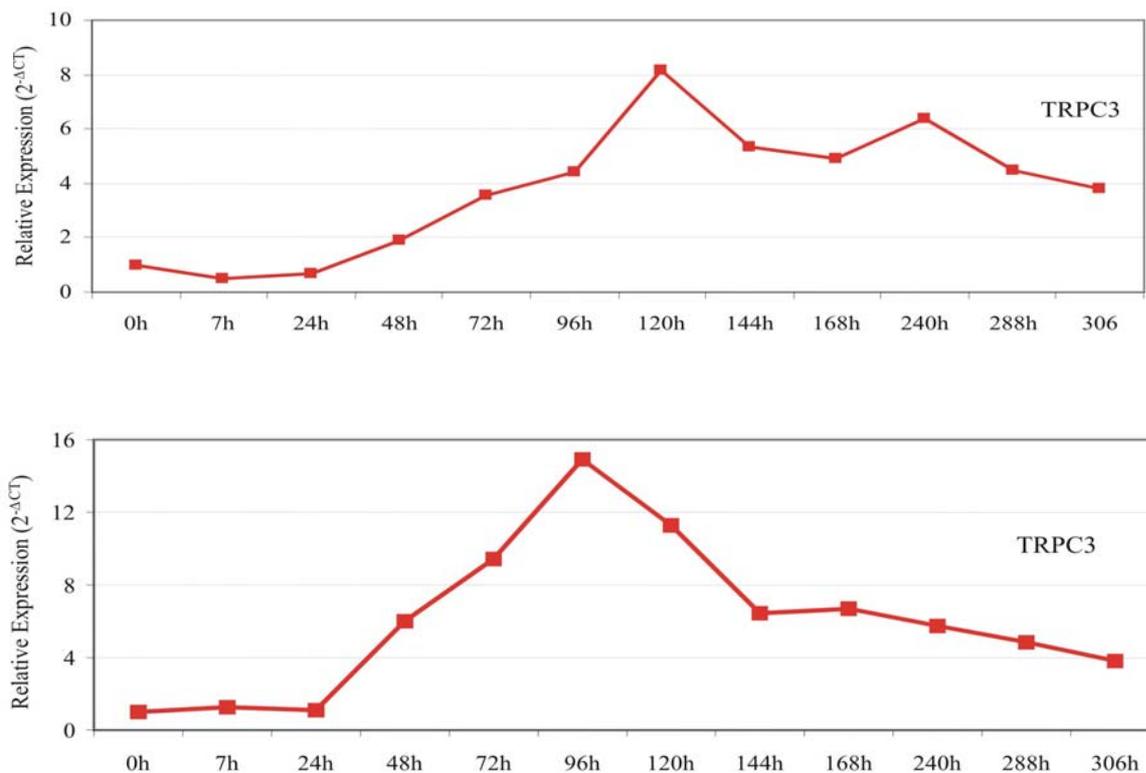


Abb. 4.13 und 4.14 Quantitative Analyse der TRPC3-mRNA-Expression von zwei weiteren Spendern. CD4⁺-Zellen wurden mit Beads stimuliert, die Analyse erfolgte mittels qRT-PCR. Die TRPC3-mRNA wurde zu TBP normalisiert und die relative Expression des Nullstundenwertes auf Eins gesetzt.

4.8 Experimente zum TRPC3-Kanal

4.8.1 Proliferation TRPC3-siRNA-transfizierter CD4⁺-Zellen unter variierenden Bedingungen

Die Schwierigkeiten, die sich im Rahmen der vorliegenden Dissertation ergaben, bestanden auf zwei Tatsachen. Zum einen erfolgten fast alle Experimente in primären Zellen. Dies erhöhte die Komplexität der Versuchsabläufe und erschwerte die Vorhersehbarkeit und auch die Reproduzierbarkeit der einzelnen Ergebnisse (Abschnitt 5.3). Die zweite Ebene bezieht sich auf den TRPC3-Kanal. Im Zusammenhang mit T-Zellen ist über diesen Kanal wenig bekannt. Für primäre CD4⁺-Zellen sind in der Literatur keine Daten zu finden. Die besonders für die siRNA-Experimente entscheidende Turn-over-Rate des TRPC3-Proteins ist gänzlich unbekannt. Hätte man einen Anhaltspunkt über die ungefähre Zeit, ließe sich abschätzen, ab wann ein Effekt der siRNA zu erwarten ist, also wann die Proliferation durch die siRNA-Wirkung beeinflusst wird. Es lässt sich nur spekulieren, dass die „Lebensdauer“ der TRPC3-Proteine im Bereich von Tagen liegt. Erst dann würde der Effekt der (durch die siRNA) zerstörten mRNA sichtbar, weil die Zelle das Protein nicht

mehr translatieren kann. Das Problem der fehlenden spezifischen Antikörper gegen TRPC3 wurde in Abschnitt 4.4 bereits erwähnt. Die Expression des TRPC3-Proteins nach Transfektion mit TRPC3-siRNA konnte nicht mittels Antikörperfärbung verfolgt werden. Also wurden weitere Möglichkeiten gesucht, den Zeitraum der maximalen Effektivität der siRNA zu bestimmen.

Dazu wurde insbesondere der Zeitpunkt der Stimulation, das heißt der Zugabe von α CD3-/ α CD28-beschichteten Beads, variiert. Der Versuchsaufbau der Proliferationsexperimente, die im Rahmen des TRP-siRNA - Screenings durchgeführt wurden, war wie folgt: Am Tag der Aufreinigung wurden PBLs und CD4⁺-Zellen aus Spendern isoliert. Es erfolgte die Transfektion. Diese fand am selben Tag im Anschluss an die Aufreinigung statt. Der Stimulationszeitpunkt lag mindestens 15 Stunden am ersten Tag nach Transfektion. Mit der Stimulation wurde das Proliferationsexperiment gestartet.

Wie sich gezeigt hat, war die Änderung des Stimulationszeitpunktes nach Transfektion eine wichtige Variation des Versuchsablaufes. Falls TRPC3-Kanäle über einen langen Zeitraum stabil in der Zellmembran liegen sollten, wurde mit der Stimulation der Zellen zu einem späteren Zeitpunkt ermöglicht, die Ausschaltung des Proteins trotzdem zu detektieren. Für den Fall, dass das betroffene Protein tatsächlich eine Funktion für T-Zell-Proliferation hat, ist es sicherlich einfacher, einen Effekt auf die Proliferation nachzuweisen, wenn zum Zeitpunkt der Stimulation schon eine Reduktion des Proteins stattgefunden hat. Nach der Bead-Zugabe beginnt die IL-2-Produktion, wodurch die Zellen auch unabhängig der TCR-vermittelten Signalkaskaden proliferieren. Differenzen in der Proliferation, die durch einen Fehler in der TCR-Signalkaskade hervorgerufen sind, werden dadurch schwerer aufzuschlüsseln.

Natürlich ist der Zeitraum, in dem man die transfizierten CD4⁺-Zellen unstimuliert in Kultur halten kann, durch das Absterben der Zellen begrenzt. Außerdem lassen sich Zellen, die sehr lange kultiviert wurden (im Bereich von zehn Tagen), nur noch bedingt stimulieren. Dies ergab einen maximalen praktisch möglichen Zeitraum zwischen Transfektion und Stimulation von ca. zwölf Tagen. Die Ergebnisse der Proliferationsexperimente zu den variierten Stimulationszeitpunkten sind im Folgenden beschrieben. Es wurde ausschließlich die erste TRPC3-siRNA (TRPC3-1-siRNA) für die TRPC3-Herunterregulierung benutzt, für die in vorherigen Experimenten eine gute Effizienz nachgewiesen wurde (Abschnitt 4.4.2 und 4.4.3). Als Stimulationszeitpunkte wurden Tag 1 (15 - 20 Stunden), Tag 4, Tag 8 und Tag 12 nach Transfektion gewählt.

1. Stimulation an Tag 1 (15 - 20 Stunden) nach Transfektion

Diese Experimente fanden im Rahmen des Screening der TRP-siRNAs statt. Die TRPC3-1-siRNA wurde an elf Spendern getestet. Über einen Zeitraum von fünf Tagen wurde die Proliferation von TRPC3-siRNA-transfizierten CD4⁺-Zellen gemessen (Abbildung 4.15). An Tag 4 wurde die signifikant reduzierte Proliferation auf 83% der Proliferation der Kontrollzellen ermittelt (gepaarter Student'scher t-Test $p = 0,039$).

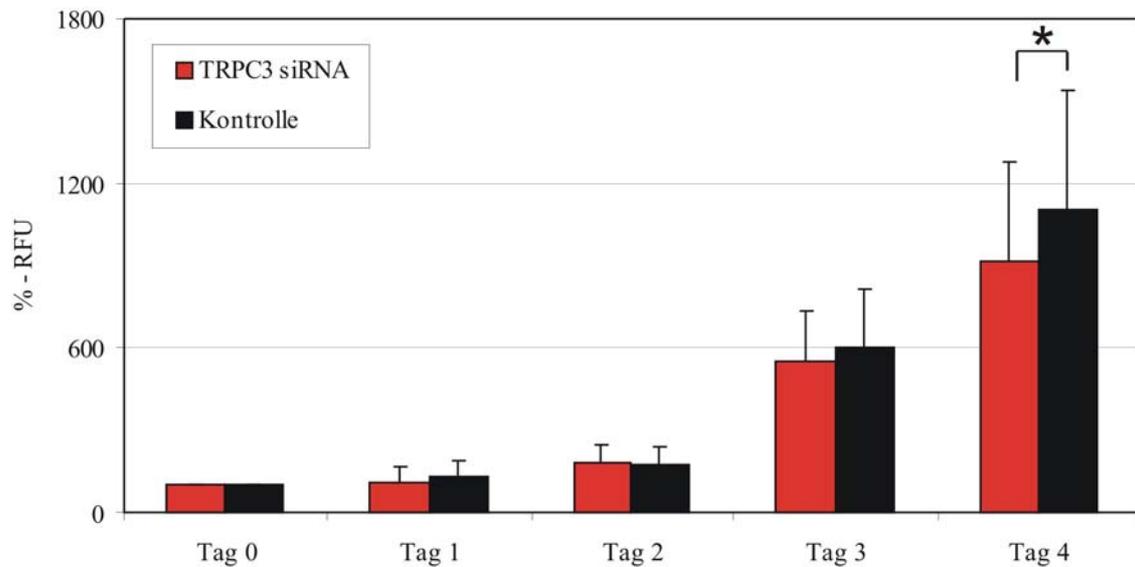


Abb. 4.15 Proliferation TRPC3- (rot) und Kontroll-siRNA (schwarz)-transfizierter, Bead-stimulierter CD4⁺-Zellen über fünf Tage. Die Zellen wurden 15 - 20 Stunden nach Transfektion mit α CD3-/ α CD28-beschichteten Beads stimuliert. Die Limitierung der Ca²⁺-Konzentration wurde durch die Zugabe von 1,1 mM EGTA erreicht. Die Differenz der Proliferation von TRPC3- und Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen an Tag 4 ist mit $p = 0,039$ signifikant.

2. Stimulation an Tag 4 nach Transfektion

An drei Spendern wurde getestet, ob die Erhöhung der Inkubationszeit der siRNA auf vier Tage eine größere Proliferationsdifferenz der TRPC3- und Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen zeigt. In der Tat wurde nach vier Tagen eine Proliferation der TRPC3-siRNA-transfizierten Zellen gemessen, die nur 74% der Proliferation der Kontrollzellen entsprach (Abbildung 4.16). Von den drei Spendern war dieser Unterschied bei zweien besonders deutlich, während die Proliferation der verschiedenen transfizierten Zellen des dritten Spenders keine Unterschiede zeigte. Diese Proliferationsreduktion war höher als die der Experimente, die am Tag nach Transfektion gestartet wurden (Abbildung 4.18). Die größten Differenzen wurden auch an den Tagen 3 und 5 beobachtet.

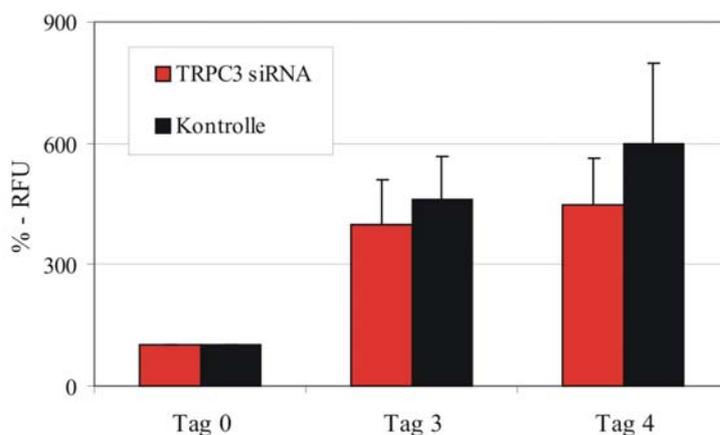


Abb. 4.16 Proliferation TRPC3- (rot) und Kontroll-siRNA (schwarz)-transfizierter, Bead-stimulierter CD4⁺-Zellen über fünf Tage. Die Zellen wurden vier Tage nach Transfektion mit α CD3-/ α CD28-beschichteten Beads stimuliert. Die Limitierung der Ca²⁺-Konzentration wurde durch die Zugabe von 1,05 mM EGTA erreicht (Durch eine neue FCS-Charge wurde der IC₅₀-Wert verschoben, Abschnitt 4.2).

3. Stimulation an Tag 8 nach Transfektion

Für diese Experimente wurden die Daten von sechs Spendern zusammengefasst. Es wird deutlich, dass sich die Zellen, die 8 Tage unstimuliert in Kultur gehalten wurden, nicht mehr in gleicher Weise aktivieren lassen (Abbildung 4.17). Das Proliferationssignal beginnt später zu steigen. An Tag 3 wurde ein etwa 280%iger Anstieg des durch Cell-Titer Blue ermittelten Fluoreszenzsignals von Tag 0 gemessen. Zellen, die direkt an Tag 1 nach Transfektion stimuliert wurden, wiesen nach drei Tagen eine ungefähr 580%ige Erhöhung des Signals auf. Dieselbe Beobachtung wurde an Tag 4 gemacht. Dennoch zeigt die Kurve durch die Erhöhung des Fluoreszenzsignals, dass die Zellen grundsätzlich aktiviert werden und proliferieren, obwohl sie acht Tage unstimuliert in Kultur gehalten wurden.

Die Experimente zeigen wiederum die reduzierte Proliferation von TRPC3-siRNA-transfizierten CD4⁺-Zellen. Das Verhältnis zu der Proliferation der Kontrollzellen ist jedoch höher als bei früher stimulierten Zellen, das heißt die TRPC3-siRNA-transfizierten Zellen proliferieren besser als zu einem früheren Stimulationszeitpunkt. Ein um 11% reduziertes Fluoreszenzsignal wurde an Tag 4 des Experimentes ermittelt.

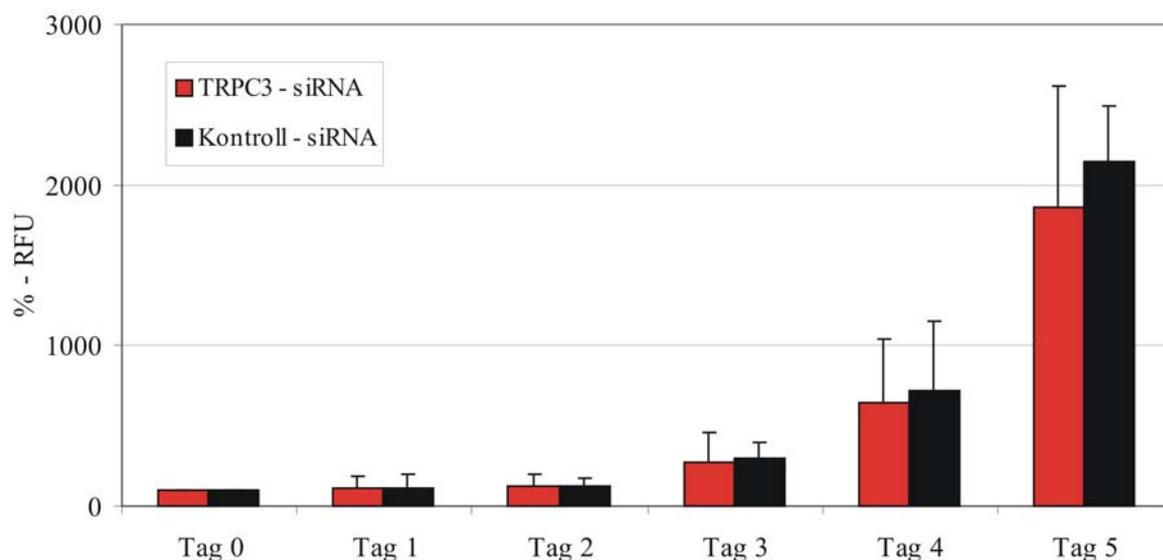


Abb. 4.17 Proliferation TRPC3- (rot) und Kontroll-siRNA (schwarz)-transfizierter, Bead-stimulierter CD4⁺-Zellen über fünf Tage. Die Zellen wurden acht Tage nach Transfektion mit α CD3-/ α CD28-beschichteten Beads stimuliert. Die Limitierung der Ca²⁺-Konzentration wurde durch die Zugabe von 1,05 mM EGTA erreicht (Durch eine neue FCS-Charge wurde der IC₅₀-Wert verschoben, Abschnitt 4.2).

4. Stimulation an Tag 12 nach Transfektion

An einem Spender wurde getestet, ob eine zwölf-tägige Inkubation der Zellen mit siRNA eine Vergrößerung der Differenzen der Proliferation und somit eine Verbesserung des Versuchsablaufs mit sich zieht. Die Proliferation der TRPC3-siRNA-transfizierten Zellen war im Vergleich zu den Kontrollzellen an Tag 4 um 19% reduziert.

Zur exakten Analyse der Ergebnisse wurde das Verhältnis der Proliferation der unterschiedlich transfizierten Zellen zur Hilfe genommen. Das Verhältnis der Proliferation TRPC3-siRNA-transfizierter Zellen zur Proliferation der Kontrollzellen entspricht der Reduktion der Proliferation TRPC3-siRNA-transfizierte Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt. Es stellte sich heraus, dass die günstigsten Verhältnisse der Proliferation (mit der größten Reduktion) gemessen werden konnten, wenn an Tag 4 nach Transfektion stimuliert wurde (Abbildung 4.18). Auf den Zeitpunkt Tag 4 des Proliferationsexperimentes, das heißt auf den Zeitpunkt, an dem die Zellen vier Tage lang stimuliert waren, wurde während der gesamten Arbeit ein Fokus gesetzt, weil sich das Messsignal des CellTiter Blues dort in einem optimalen Bereich befindet (grau unterlegt). Es wurde deswegen der Stimulationszeitpunkt nach Transfektion gesucht, an dem die Reduktion der Proliferation der TRPC3-siRNA-transfizierten Zellen des Zeitpunktes Tag 4 am höchsten war. Mit der Reduktion auf 74 % wurde durch Stimulation am vierten Tag nach Transfektion die größte detektierbare Differenz der Proliferation gemessen (rot markierte Spalte).

	Stimulation nach Transfektion an Tag			
	1	4	8	12
Tag 0	1	1	1	1
Tag 1	0,87		1,1	
Tag 2	1,05	0,85	1	
Tag 3	0,91	0,86	0,92	
Tag 4	0,83	0,74	0,89	0,81
Tag 5	0,85	0,67	0,87	

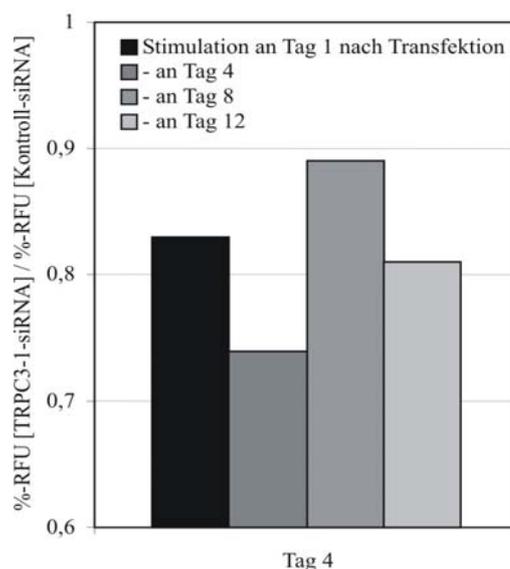


Abb. 4.18 Die Mittelwerte der Proliferation von TRPC3-siRNA-transfizierten Zellen wurden in der Tabelle zu den Mittelwerten der Proliferation der Kontrollzellen ins Verhältnis gesetzt. Die Versuche, bei denen die Zellen einen Tag nach Transfektion stimuliert wurden, setzen sich aus Daten von elf Spendern zusammen. An Tag 4 nach Transfektion gestartete Experimente wurden mit drei Spendern durchgeführt, an Tag 8 nach Transfektion gestartete Experimente mit sechs. Für das Experiment mit Beginn an Tag 12 nach Transfektion wurden die Zellen von nur einem Spender verwendet. Rot markiert wurden die Verhältnisse, die sich aus den Experimenten mit nach vier Tagen stimulierten Zellen zusammensetzen. Die grau unterlegten Daten (Verhältnisse der Proliferation an Tag 4 nach Stimulation) sind in der rechten Grafik gesondert abgebildet.

TRPC3-siRNA-transfizierte Zellen proliferierten nach Stimulation mit α CD3-/ α CD28-beschichteten Beads schlechter als Kontrollzellen. Diese Beobachtung wurde für die Proliferation an den Tagen 3, 4 und 5 gemacht. In Abhängigkeit des Stimulationszeitpunktes variierte die Reduktion im Bereich von 8% an Tag 3 (Stimulation acht Tage nach Transfektion) und 33% an Tag 5 (Stimulation vier Tage nach Transfektion).

4.8.2 IL-2-Sekretion TRPC3-siRNA-transfizierter CD4⁺-Zellen

Wie in Abschnitt 4.1.4 beschrieben, wurden parallel zu den Proliferationsmessungen die IL-2-Sekretion von CD4⁺-Zellen nach Beadstimulation analysiert. Aufgrund des erhöhten zeitlichen und finanziellen Aufwandes wurde diese Methode nicht standardisiert neben den Proliferationsexperimenten eingesetzt.

Abbildung 4.19 zeigt beispielhaft eine parallele Messung der IL-2-Sekretion (Tag 3) und der Proliferation (Tag 0, 3, 5) transfizierter CD4⁺-Zellen. Die Zellen wurden mit TRPC3-1-siRNA oder einer Kontroll-siRNA transfiziert und mit α CD3-/ α CD28-beschichteten Beads stimuliert. Über den Zeitraum von fünf Tagen proliferierten TRPC3-1-siRNA-transfizierte Zellen schlechter als die Kontrollzellen (genaue Analyse in Abschnitt 4.8.1 beschrieben). Dieselben TRPC3-1-siRNA-transfizierten Zellen schütteten eine im Vergleich zur Kontrolle eine deutlich verminderte IL-2-Menge aus.

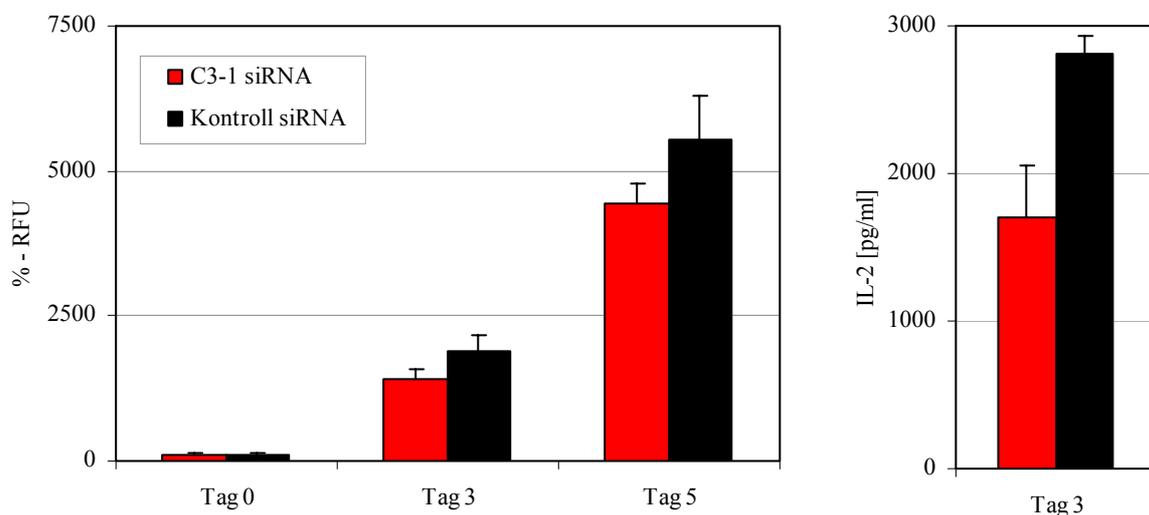


Abb. 4.19 Die Proliferation siRNA-transfizierter, Bead-stimulierter CD4⁺-Zellen wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen gemessen. Nach Bestimmung der Proliferation wurden die Überstände aus dem Proliferationsexperiment zellfrei abgenommen und die darin enthaltene IL-2-Menge durch ELISA-Analyse ermittelt. Beispielhaft ist hier die IL-2-Sekretion des Tages 3 dargestellt. Für die Auswertung der Proliferation wurden die Werte von Tag 0 auf Eins gesetzt.

Das Zytokin IL-2 stimuliert als Wachstumsfaktor direkt die Proliferation der CD4⁺-Zellen. Es ist abhängig von der intrazellulären Kalziumkonzentration, und seine Ausschüttung wird über den Ca²⁺-Einstrom während der Aktivierung der Zelle reguliert [67]. Dies legt den Zusammenhang nahe, dass die reduzierte Proliferation erstens aus der reduzierten IL-2-Sekretion resultiert und zweitens Folge eines reduzierten Ca²⁺-Einstroms in die Zelle ist. Die parallele Messung von IL-2-Sekretion und Proliferation stellt einen vielversprechenden Ausgangspunkt für weitere Experimente zur Quantifizierung der Immunantwort von stimulierten CD4⁺-Zellen dar.

5. Diskussion

5.1 Proliferation nach Inhibition des CRAC-Kanals

Die Aktivierung von CD4⁺-Zellen ist ein essentieller Bestandteil der erworbenen Immunantwort. Durch Stimulation des TCRs werden mehrere Signalkaskaden in Gang gesetzt, welche letztendlich zur Produktion von IL-2 und anderen Zytokinen und zur klonalen T-Zell-Proliferation führen. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass die Öffnung von CRAC-Kanälen und der darauf folgende Ca²⁺-Einstrom einen zentralen Punkt der Zell-Aktivierung darstellen. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass die Mutation des Proteins Orai1, das einen Teil der CRAC-Kanal-Pore bildet, eine schwere Immundefizienz erzeugen kann [59]. Außerdem führte die Inhibition der CRAC-Kanäle durch BTP2 zu einer reduzierten CD4⁺-Zell-Proliferation [67, 94]. Ebenso gesenkt wurde die Proliferation durch die Reduktion des extrazellulären Ca²⁺. Die chelatbildende Substanz EGTA reduzierte die Proliferation von CD4⁺-Zellen mit einem IC₅₀-Wert von 1,06 mM, was einer extrazellulären Ca²⁺-Konzentration von 50 µM entspricht [67].

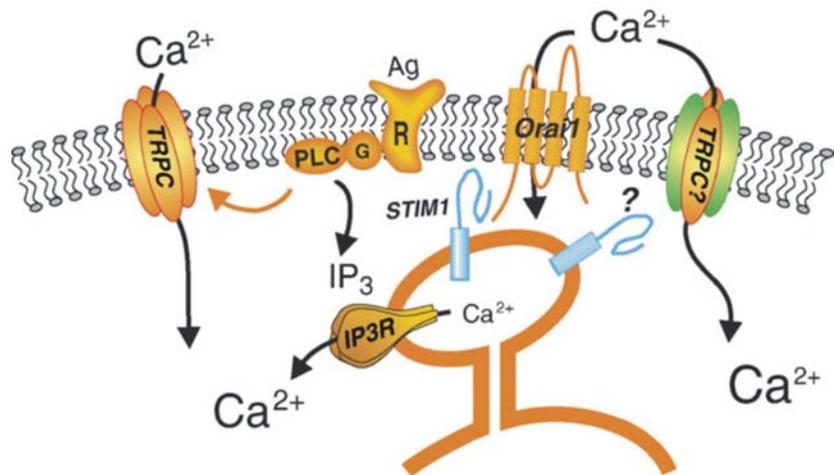
Auf die bislang bekannten Einzelheiten der Aktivierungsmechanismen von CD4⁺-Zellen wurde in den Abschnitten 2.2 und 2.4 eingegangen. Über die letztendliche Aktivierung und Regulierung des speichergesteuerten Ca²⁺-Einstroms herrscht Unklarheit. In Abbildung 5.1 ist ein von Smyth *et al.* entwickeltes Modell gezeigt, welches die molekularen Komponenten STIM1 und Orai1 in einer Kaskade verknüpft [71]. Die Produktion von IP₃, die im gezeigten Fall durch Agonist-Rezeptor-Interaktion aktiviert wurde, führt zur Ca²⁺-Speicherentleerung des ERs. Diese wird von den Ca²⁺-Sensoren der STIM1-Proteine erfasst. Dadurch kommt es zur Translokation von STIM1 zur Plasmamembran. Das Protein bleibt in der ER-Membran verankert, kann aber nun durch die räumliche Nähe zur Plasmamembran mit Orai1-Proteinen interagieren. Dadurch kommt es zur Aktivierung der speichergesteuerten Kanäle (SOCs = store-operated channels) und zum Ca²⁺-Einstrom. Orai1 spielt dabei eine wichtige Rolle in der Bildung der Porenregion der Kanäle. Die in der Kaskade aufgeführten TRPC-Kanäle werden einerseits direkt durch PLC aktiviert und führen auf diesem Wege zum Ca²⁺-Einstrom. Andererseits sind TRPC-Kanäle bekannt, die durch Speicherentleerung aktiviert werden. Die Schritte von der Speicherentleerung zur Aktivierung der TRPC-Kanäle könnten ebenfalls durch STIM1, aber auch durch andere, bislang unbekannte Proteine vermittelt werden. Die Arbeitsgruppe um P.F. Worley fand in diesem Zusammenhang heraus, dass TRPC1-Kanäle über STIM1 reguliert werden. Neben der räumlichen, durch Koimmunopräzipitation gezeigten Interaktion der beiden Proteine, konnte in Jurkat-T-Zellen eine Regulation der TRPC1-Kanal-Öffnung durch STIM1 gezeigt werden [30]. Weiterführende Ergebnisse wurden von Yuang *et al.* 2007 veröffentlicht, in der noch andere TRPC-Kanäle auf ihre Interaktion mit STIM1 untersucht wurden [90]. Hier wird gezeigt, dass auch TRPC4 und TRPC5 als SOCs agieren können, die durch STIM1 reguliert werden. Ebenso erfolgt die Untersuchung von

TRPC3 und TRPC6, wobei STIM1 die Multimerisierung von TRPC3 mit TRPC1 und TRPC6 mit TRPC4 zu beeinflussen scheint. In einer Zusammenfassung ihrer Arbeiten postulieren P.F. Worley *et al.* eine Bindung von STIM1 an TRPC1, TRPC2, TRPC4 und TRPC5, nicht aber an TRPC3, TRPC6 und TRPC7 [85]. Erneut weisen sie die direkte Regulation von TRPC1 und die indirekte Regulation von TRPC3 und TRPC6 durch STIM1 nach. Die neue Definition von speichergesteuerten Kanälen als „Kanäle, die durch STIM1 reguliert werden“ wurde bislang von der Literatur nicht kommentiert.

TRPC3 und TRPC6 wurden kurz zuvor schon von Liao *et al.* mit speichergesteuertem Ca^{2+} -Einstrom in Verbindung gebracht [39]. Außerdem wurde von der Arbeitsgruppe um L. Birnbaumer erstmalig die Interaktion von Orai1 und TRPC-Kanälen beschrieben.

Mit diesem Modell als Grundlage werden im Folgenden die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation betrachtet, um einen Beitrag zur Aufklärung der Aktivierungsmechanismen von human, primären CD4^+ -Zellen zu leisten.

Abb. 5.1 Modell für die Aktivierung von speichergesteuertem Ca^{2+} -Einstrom: Die Rezeptor-Stimulation (R) durch ein Antigen (Ag) generiert die Aktivierung von Phospholipase C (PLC). PLC aktiviert einerseits direkt TRPC-Kanäle und führt andererseits zur IP_3 -Produktion. IP_3 bindet an in der ER-Membran verankerte IP_3 -Rezeptoren (IP_3R), was zur Entleerung der Ca^{2+} -Speicher des ERs führt. Es kommt zur Aktivierung von STIM1, das zur Plasmamembran transloziert und dort mit Orai1 interagiert. Diese Interaktion führt zur Öffnung des CRAC-Kanals, dessen Pore von Orai1 gebildet wird. Es muss noch endgültig geklärt werden, ob und auf welche Weise STIM1 weitere speichergesteuerte Kanäle wie TRPC-Kanäle reguliert. (Abbildung entnommen aus J.T. Smyth: Emerging perspectives in store-operated Ca^{2+} entry: Roles of Orai, Stim and TRP. *Biochim Biophys Acta* 1763 (2006) rev.)



Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Untersuchung der CD4^+ -Zell-Proliferation nach Aktivierung der Zellen über den T-Zell-Rezeptor (TCR). Die Experimente unter Einsatz von EGTA belegen die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Proliferation. Auch mit Hilfe von BTP2, einem spezifischen CRAC-Kanal-Blocker (Abschnitt 2.2.3), wurde gezeigt, dass die Aktivierung des CRAC-Kanals und der folgende Ca^{2+} -Einstrom für T-Zell-Proliferation notwendig ist (Abschnitt 4.3). Die mit BTP2-behandelten Zellen proliferierten schlechter als die Kontrollzellen. Benutzten Zitt *et al.* auf der Zellkulturplatte gebundene Antikörper als Stimulus (gebundener αCD3 -Antikörper [3 $\mu\text{g}/\text{well}$] und freier αCD28 -Antikörper [3 $\mu\text{g}/\text{ml}$]) für die primären CD4^+ -Zellen, so gelang im Rahmen der vorliegenden Dissertation der Nachweis mit stimulatorischen $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$ -beschichteten Beads, die zur fokalen Stimulation der CD4^+ -Zellen führen.

Damit einhergehend wurde in der Dissertation von K. Wagner (2007) gezeigt, dass die Jurkat-T-Zell-Mutanten CJ1 und CJ5, die keinen oder sehr geringen CRAC-Strom besitzen, eine signifikante Reduktion der Proliferation im Vergleich zu Kontrollzellen aufweisen [13]. Die Quantifizierung dieser Reduktion wurde durch die Durchführung der Experimente in Ca^{2+} -limitierenden Bedingungen ermöglicht. Dieses Ergebnis, dass die T-Zell-Proliferation durch fehlende Funktion des CRAC-Kanals durch Mutation oder durch Blockade des CRAC-Kanals gesenkt wird, läßt auf gravierende Folgen in der Immunantwort für den betroffenen Organismus schließen. Schließlich sind CD4^+ -Zellen als Signalverstärker, Immunregulator und Stimulus weiterer Zellen für eine effiziente Immunantwort unabdinglich. Eben diese Folgen des fehlenden CRAC-Stroms sind von Feske *et al.* ausführlich untersucht worden [14, 15]. Die Mutation des Orai1-Proteins verursacht eine schwere Immundefizienz, die sowohl die Lebenserwartung als auch die Lebensqualität der betroffenen Patienten erheblich einschränkt.

Im Rahmen der BTP2-Experimente fiel auf, dass trotz der erwarteten Reduktion der CD4^+ -Zell-Proliferation eine hohe Rest-Proliferation der BTP2-behandelten Zellen gemessen wurde. Diese betrug in den Experimenten, in denen kein EGTA zur Limitierung der extrazellulären Ca-Konzentration, im Durchschnitt 54,2% ($n = 6$ Spender). Die eingesetzte Menge an BTP2 betrug 200 nM. Der für die Ca^{2+} -Imaging-Experimente ermittelte IC_{50} -Wert von BTP2 betrug 10 nM [94]. Für Proliferationsmessungen ist dieser Wert aufgrund der unterschiedlichen experimentellen Bedingungen zwar nicht direkt übertragbar, dennoch kann bei dem Einsatz von 200 nM BTP2 von einer starken Inhibition der CRAC-Kanäle ausgegangen werden. Auch bei Zitt *et al.* konnte erst durch die Zugabe von über 1 mM BTP2 eine totale Proliferationsblockade von humanen CD4^+ -Zellen erreicht werden. Eine mögliche Ursache dafür könnte darin liegen, dass die Aktivierung der CD4^+ -Zell-Proliferation nicht ausschließlich über die Öffnung von CRAC-Kanälen geschieht. Weitere Kanäle könnten den für die Proliferation so wichtigen Ca^{2+} -Einstrom generieren. Es ist möglich, dass TRP-Kanäle zusätzliche Wege darstellen, die Aktivierung der Zelle weiterzuleiten, wenn die CRAC-Kanäle blockiert sind.

Nicht außer Betracht zu lassen ist natürlich eine unvollständige Kanal-Inhibition durch BTP2. Primäre CD4^+ -Zellen benötigen nur eine sehr geringe Anzahl an offenen CRAC-Kanälen, um zu proliferieren [67], sodass wenige aktive CRAC-Kanäle zumindest einen Teil der Rest-Proliferation erklären könnten. Diese und weitere mögliche Fehlerquellen werden in Abschnitt 5.3 analysiert.

5.2 Die Rolle des TRPC3-Kanals

Schon in Abschnitt 2.3 wird auf die besondere Stellung des TRPC3-Kanals innerhalb der TRP-Kanal-Familie eingegangen. TRPC3 wird aus vielen verschiedenen Perspektiven mit T-Zellen und mit speichergesteuertem Ca^{2+} -Einstrom in Verbindung gebracht [39, 57, 80, 81, 90].

Aufgrund der viel versprechenden Ergebnisse erster Experimente der vorliegenden Dissertation wurde TRPC3 tiefergehend auf seine Funktion für humane CD4^+ -Zellen untersucht. Unter diese wegweisenden Ergebnisse fiel der Nachweis der Hochregulation von TRPC3-mRNA nach Stimulation mit

α CD3-/ α CD28-beschichteten Beads (Abschnitt 4.7). Die Ausbildung einer immunologischen Synapse führte in Zellen aller untersuchten Spender ($n=3$ Spender) zu einer Erhöhung der TRPC3-mRNA-Menge um den Faktor 6-14. Daraus lässt sich folgern, dass TRPC3 während und nach der Aktivierung einer CD4⁺-Zelle vermehrt benötigt wird, wobei die vermutete, damit verbundene Hochregulation des TRPC3-Proteins aufgrund der fehlenden Antikörper bislang noch nicht nachgewiesen werden konnte. Mit der Aktivierung des TRPC3-vermittelten Ca²⁺-Einstroms und seiner Rolle für die Zelle beschäftigten sich zuletzt Liao *et al.* und Yuan *et al.* Ihre Arbeiten lieferten entscheidende Hinweise zur Aufklärung der zellulären Mechanismen des speichergesteuerten Ca²⁺-Einstroms. In der Arbeit von Liao *et al.* wird die Verbindung von TRP-Kanälen zum Orai1-Protein aufgezeigt [39]. Die Ergebnisse werden in folgendem Modell (Abbildung 5.2) zusammengefasst.

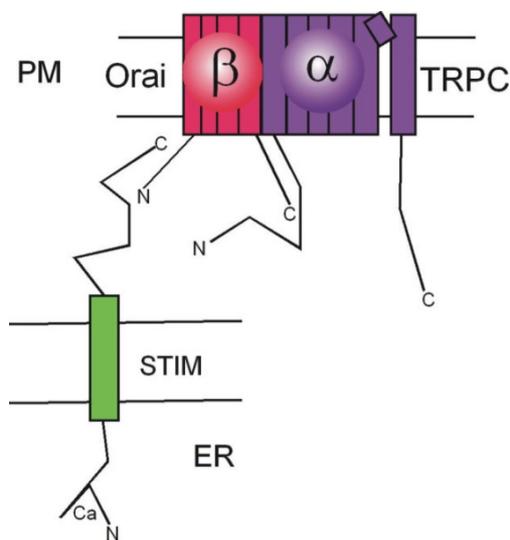


Abb. 5.2 Ein mögliches Modell für die molekulare Zusammensetzung des CRAC-Kanals, der von STIM1 aktiviert wird: Der im endoplasmatischen Retikulum (ER) gelegene Ca²⁺-Sensor des STIM1-Proteins registriert die Ca²⁺-Speicherentleerung des ERs. Orai1, das in der Plasmamembran (PM) als regulatorische Untereinheit eines TRPC-Kanals fungiert, dient hierbei der Übersetzung des STIM1-Signals in die Aktivierung des TRPC-Kanals. Diese führt zum Ca²⁺-Einstrom durch die Pore des TRPC-Kanals. (Abbildung entnommen aus Y. Liao: Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. Proc Natl Acad Sci USA 104 (2007) 4682-4687.)

Yuan *et al.* wählen einen anderen Ansatz. Im Gegensatz zu Liao differenzieren sie zwischen zwei verschiedenen Formen von speichergesteuertem Ca²⁺-Einstrom, einem Ca²⁺-selektiven Strom, der von Proteinen der Orai-Familie reguliert wird, und einem Ca²⁺-unselektiven Strom durch TRPC-Kanäle. Der zweite Typ - ausgenommen TRPC7 - wird über STIM1 reguliert, wobei explizit erwähnt wird, dass STIM1 zwar obligat für die Aktivierung der TRPC-Kanäle über Rezeptorstimulation, nicht jedoch für die Kanal-Funktion ist. Dies erklärt, warum TRPC3- und TRPC6-Ströme in Überexpressionssystemen auch STIM1-unabhängig gemessen werden können. Es wird ausgeschlossen, dass STIM1 einen Teil eines TRP-Kanals darstellt. Wie schon von Wu *et al.* wird eine heteromere Multimerisierung des TRPC3-Kanals, das heißt eine Zusammenlagerung von vier TRP-Proteinen zu einem Kanal, die nicht ausschließlich aus TRPC3-Untereinheiten bestehen, postuliert [88]. Dabei wird TRPC1 als Interaktionspartner genannt, wobei die Regulation dieser Verbindung wiederum STIM1-vermittelt ist.

In beiden Arbeiten werden dem TRPC3-Protein in Interaktion mit anderen Proteinen wichtige Rollen in speichergesteuertem Ca²⁺-Einstrom zugesprochen. Weiterhin wurde in früheren Publikationen die Bedeutung des TRPC3-Kanals für T-Zellen aufgezeigt [57, 81]. Die Ergebnisse der Experimente zu TRPC3 der vorliegenden Dissertation belegen diese beiden Aspekte. Es wurde nachgewiesen, dass im

Rahmen der Aktivierung von primären, humanen CD4⁺-Zellen die Ausschaltung des TRPC3-Proteins zu einer Reduktion der IL-2-Produktion und der Proliferation führt (Abschnitt 4.8). Im Detail wurde nach Stimulation mit α CD3-/ α CD28-beschichteten Beads eine signifikant verminderte Proliferation von TRPC3-siRNA-transfizierten CD4⁺-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen gezeigt. Dies spricht - wie auch die Hochregulation der TRPC3-mRNA - für eine Bedeutung des TRPC3-Proteins für die CD4⁺-Zell-Aktivierung. Fehlt das TRPC3-Protein (dazu Abschnitt 5.3), ist die Immunantwort, die sich in IL-2-Sekretion und Proliferation widerspiegelt, beeinträchtigt. Allerdings lässt dieser Schluss keine Aussagen über den Mechanismus und die Lokalisation des TRPC3 in der Zelle zu.

Die Proliferation wird in CD4⁺-Zellen über die in Abbildung 2.1 gezeigte Signalkaskade vermittelt. Die BTP2-Experimente belegen hierbei, dass die Proliferation - zumindest zu 54% - durch CRAC-Kanal-abhängigen Ca²⁺-Einstrom reguliert ist. Die absolute Abhängigkeit der Proliferation von Ca²⁺-Einstrom, unabhängig auf welchem Wege die Ca²⁺-Ionen in die Zelle gelangen, wird durch die Versuche sowohl mit dem Ca²⁺-Chelatbildner EGTA wie auch mit der Kombination von EGTA und BTP2 nachgewiesen (Abschnitt 4.2, 4.3 und [67]). Die Proliferation von CD4⁺-Zellen kann durch die Senkung der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration auf 22,8 μ M (entspricht der Zugabe von 1,5 mM EGTA) gänzlich inhibiert werden.

Wie in Abschnitt 5.1 schon erwähnt, kann in Erwägung gezogen werden, dass es einen Ca²⁺-Einstrom in den Zellen gibt, der nicht über den CRAC-Kanal reguliert wird. Dies würde erklären, warum die Zellen nach Inhibition des CRAC-Kanals durch BTP2 noch zur Proliferation fähig sind. Es könnte einen parallelen Weg zur bislang bekannten Aktivierungskaskade zu geben.

Es stellt sich die Frage, auf welchem Wege TRPC3 seine Funktion ausübt, innerhalb (1) oder eventuell sogar außerhalb (2) des speichergesteuerten Ca²⁺-Einstroms.

1. Einhergehend mit der Arbeit von Liao *et al.* könnten von Orai1 regulierte TRPC3-Proteine tatsächlich eine Untereinheit des CRAC-Kanals bilden. Damit wäre TRPC3 Teil der speichergesteuerten Signalkaskade. Auf einem ähnlichen Weg könnte TRPC3 auch direkt mit STIM1 interagieren, wie es von Yuan *et al.* vorgeschlagen wurde. TRPC3 könnte mit TRPC1-Untereinheiten einen speichergesteuerten Kanal bilden. Diese These würde auch durch die Ergebnisse der Experimente mit TRPC1-siRNA-transfizierten Zellen unterstützt. Die Zellen, die mit TRC1-siRNA transfiziert wurden, wiesen eine reduzierte Proliferation im Vergleich zu Kontrollzellen auf. Zeitlich gesehen könnte der TRPC3-Kanal (oder zusammengesetzte TRPC3- und TRPC1-Untereinheiten) entweder gleichzeitig oder versetzt zu dem CRAC-Strom aktivieren, wobei es eher unwahrscheinlich ist, dass die Ströme dieselben Aktivierungskinetiken haben. Zudem wurde der CRAC-Strom als einziger Ca²⁺-Einstrom als direkte Reaktion auf die Entleerung der Ca²⁺-Speicher detektiert [27]. Eine vielleicht sogar um Stunden versetzte Öffnung der TRPC3-Kanäle ist möglich. Schließlich ist unklar, ob die Kanäle bereits in der Membran vorliegen, oder ob die Proteine erst translatiert und dorthin transportiert werden müssen. Während sich die TRPC1-Expression nach Aktivierung der Zellen durch Stimulation des TCRs praktisch konstant

verhielt, stieg die Menge der TRPC3mRNA in allen untersuchten Spendern erheblich an (Faktor 6, 8 und 14).

2. Die zweite Möglichkeit besteht in einer von der Speicherentleerung unabhängigen TRPC3-Aktion in der Zelle. Seit langem ist bekannt, dass TRPC3 sowohl über PLC direkt als auch über ihr Produkt DAG aktiviert werden kann [25, 48]. Damit einhergehend könnte nach der Aktivierung der Zellen an der Stelle der PLC- oder DAG-Synthese eine parallele Kaskade beginnen, welche ebenfalls zur IL-2-Produktion und zur Proliferation führt. In diesem Modell könnte TRPC3 sowohl mit TRPC1 als auch mit bislang unbekanntem Proteinen interagieren. Der C-Terminus des TRPC3-Proteins kann mit der CIRB (calmodulin inositol-triphosphate-receptor binding)-Region an den IP₃-Rezeptor und an Calmodulin binden. Über den IP₃-Rezeptor werden unter anderem die Ca²⁺-Speicherentleerung aus dem ER aktiviert. Calmodulin leitet durch Interaktion mit aktiviertem Calcineurin die Überleitung der Aktivierung der Zelle vom Zytoplasma in den Kern.

Die Proliferation der Zellen wird durch die Herunterregulierung von TRPC3 zu maximal 33% reduziert (Abschnitt 4.8.1). Der speichergesteuerte Ca²⁺-Einstrom über den CRAC-Kanal funktioniert also möglicherweise trotz der TRPC3-Herunterregulation noch, wodurch die Rest-Proliferation zu erklären wäre.

Beide Modelle berücksichtigen, dass in primären Zellen keine homomeren TRPC3-Kanäle nachgewiesen werden konnten. Außerdem ist jeweils eine zusätzliche Regulation über die TCR-abhängige Kinase Src nicht ausgeschlossen. Für die Kinetik der oben aufgezählten Wege ist zu beachten, dass die IL-2-Sekretion in stimulierten CD4⁺-Zellen innerhalb drei Stunden gemessen werden konnte (Abschnitt 4.1.4). Vielleicht besteht die Möglichkeit, durch Experimente, in denen die IL-2-Sekretion von BTP2-behandelten Zellen ermittelt wird, die Kinetiken der verschiedenen Kanäle aufzuschlüsseln. Sollte ein zum CRAC-Strom paralleler Ca²⁺-Einstrom existieren, für den die molekularen Bestandteile erst zusammengefügt werden müssen, würde die IL-2-Sekretion eventuell später als in nicht-behandelten Zellen erfolgen.

Eine dritte, von den ersten beiden Modellen unabhängige und eventuell zusätzliche Erklärungsmöglichkeit der Proliferations-Reduktion von TRPC3-siRNA-transfizierten Zellen könnte in der IL-2-Kaskade liegen. Unabhängig davon, dass die TRPC3-Herunterregulierung die IL-2-Sekretion gehemmt hat, könnte TRPC3 in der IL-2-Kaskade eine Rolle spielen, bzw. in ihre Regulation involviert sein. IL-2 aktiviert über den IL-2-Rezeptor über eine nicht gänzlich bekannte Kaskade die Proliferation der Zelle. Der IL-2-Rezeptor, der aus einer α (CD25)-, einer β (CD122)- und einer γ C (CD132)-Untereinheit besteht, lagert sich nach Kontakt mit IL-2 fest zusammen und wird von einer Janus Kinase (JAK3) phosphoryliert [51, 69]. Dadurch entsteht eine Bindungsstelle für die Proteinfamilie zytoplasmatischer Transkriptionsfaktoren STAT (signal transducer and activator of transcription). Durch den Kontakt mit dem Rezeptor werden die STAT-Proteine durch Phosphorylierung aktiviert und translo-

zieren in den Zellkern. Dort induzieren sie die Gentranskription. Sowohl JAK3 als auch STAT-Proteine werden durch eine Vielzahl an Mechanismen reguliert. Übernahme TRPC3 wichtige Kontrollfunktionen dieser Proteine, könnte dies ebenfalls die reduzierte Proliferation der TRPC3-siRNA-transfizierten Zellen erklären.

Eine Möglichkeit, um die beiden oben genannten Hypothesen zu prüfen, liegt zum Beispiel in der BTP2-Zugabe zu TRPC3-siRNA-transfizierten Zellen. Durch die Bestimmung der Proliferation der Zellen, in denen gleichzeitig der CRAC-Kanal blockiert und das TRPC3-Protein herunterreguliert ist, ließe sich erkennen, ob sich die reduzierende Wirkung auf die Proliferation addiert oder bei 46% (entspricht dem Block durch BTP2-Zugabe) bestehen bleibt. Eine Erhöhung der Reduktion der Proliferation spräche für das parallele Fungieren des CRAC- und des TRPC3-Kanals, was nicht ausschließt, dass sich die Kanäle untereinander beeinflussen. Blicke die Reduktion der Proliferation konstant, könnte man darauf schließen, dass TRPC3 Teil des CRAC-Kanal-Komplexes ist oder aber die Aktivierung des CRAC-Kanals und die Aktivierung des TRPC3-Kanals hintereinander geschaltet sind.

Die Ausschaltung von STIM1 durch siRNA führte zu einer um maximal 53%igen Reduktion der Proliferation (Abschnitt 4.5.2). Für die verwendete siRNA wurde von Roos *et al.* [65] ihre gute Effizienz mittels PCR und Western Blot Analyse nachgewiesen. Das Fehlen von STIM1 führt zu einer Inhibition des CRAC-Kanals. Somit führt auch diese indirekte Inhibition durch STIM1-siRNA des CRAC-Stroms zu einer Reduktion der T-Zell-Proliferation um 50%.

Eine weitere große Rolle könnte TRPM4 in den Kaskaden spielen. Der Nachweis der konsistenten Expression von TRPM4 konnte in unstimulierten CD4-Zellen nicht erbracht werden, fokal stimulierte Zellen hingegen exprimieren TRPM4. Aus diesem zeitlichen Verlauf heraus wurde die Auswirkung der Herunterregulierung von TRPM4 auf die CD4-Zell-Aktivierung noch nicht untersucht. Die Integration des unselektiven, durch Ca^{2+} -Ionen aktivierten Kationen-Kanals in das Modell könnte weitere Unklarheiten in der Signalkaskade beseitigen. Die TRPM4-Aktivierung führt durch den Einstrom von Kationen in die Zelle zur Depolarisation der Zellmembran [35]. Durch die lokal sinkenden Konzentrationsgradienten über die Zellmembran, nimmt die treibende Kraft für Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen in die Zelle langsam ab. Dadurch wird die Triebkraft für diese Kanäle gesenkt. Launey *et al.* postulierten im Jahre 2004, dass die durch TRPM4-induzierte Membrandepolarisation zu einer Verlängerung des Ca^{2+} -Signals und damit zu einer Erhöhung der IL-2-Sekretion in Jurkat-T-Zellen führt [34]. Die Verlängerung des Ca^{2+} -Signals wird durch eine Unterbindung des negativen Feed-back-Mechanismus des CRAC-Kanals erklärt, weil die starke Aktivierung des Kanals, die eine negative Rückkopplung auslösen könnte, durch die Depolarisation der Zellmembran abgefangen wird.

Durch denselben Mechanismus kann TRPM4 auch TRPC3 hemmen. Da der TRPC3-Kanal ein unselektiver Kanal ist, wird seine Aktivität sogar noch stärker inhibiert als die des hoch Ca^{2+} -selektiven CRAC-Kanals, da der Konzentrationsgradient von Ca^{2+} sehr viel höher als der von Na^+ über die Membran ist. Die Rolle des TRPM4-Kanals für die Aktivität des TRPC3-Kanals und für die Interaktion des

TRPC3- und des CRAC-Kanals ist noch nicht endgültig geklärt. Es existieren jedoch Anhaltspunkte dafür, dass die Aktivierung von TRPM4-Kanälen sowohl CRAC-Kanäle als auch weitere Kationenkanäle in ihrer Funktion beeinflussen und somit für die T-Zell-Aktivierung eine wichtige Funktion übernehmen kann.

5.3 Schwierigkeiten und offene Fragen

Auf die Schwierigkeiten, auf die im Rahmen der vorliegenden Dissertation gestoßen wurde, ist zum Teil in Abschnitt 4.8.1 eingegangen worden. Es erfolgten fast alle Experimente in primären Zellen. Primäre Zellen bieten neben vielen Nachteilen im praktischen Umgang wie zum Beispiel das Absterben der Zellen in Kultur und äußerst geringe RNA- und Proteinnengen erheblich weniger Erfahrungswerte im Bereich von Standardversuchen. Die Stimulation einer reinen CD4⁺-Zell-Population musste erst etabliert werden, wohingegen die Jurkat-T-Zellen ohne Stimulus proliferieren. Die Proliferationsbedingungen und die Messung der Proliferation bedurften wie viele andere Parameter der Optimierung. Die Komplexität der Versuchsabläufe wurde erhöht und erschwerte die Vorhersehbarkeit und auch die Reproduzierbarkeit der einzelnen Ergebnisse. Zudem musste eine gewisse Variabilität unter den einzelnen Spendern berücksichtigt werden, auf die kein Einfluss genommen werden konnte. Dennoch sollte festgehalten werden, dass sich durch die Durchführung der Experimente mit primären Zellen die Aussagekraft der Ergebnisse für den menschlichen Organismus enorm erhöht. Die üblicherweise eingesetzten Jurkat-T-Zellen entstammen einer Leukämie-Zell-Linie. Diese Zellen sind immortalisiert, das heißt, sie proliferieren ohne Stimulus. Nebst diesem äußerst unphysiologischem Charakteristikum weisen sie eine Vielfalt an Unterschieden in ihrer Proteinexpression auf. Zum Beispiel exprimieren Jurkat-T-Zellen TRPC6, wohingegen dieser Kanal in primären CD4⁺-Zellen nicht nachgewiesen wurde. Ergebnisse aus Jurkat-T-Zellen zu TRP-Kanälen sind somit schlecht auf den menschlichen Organismus übertragbar. Diese Argumentation rechtfertigte den finanziellen und zeitlichen Mehraufwand der vorliegenden Dissertation, in der ausschließlich mit primären CD4⁺-Zellen gearbeitet wurde.

Die Hauptschwierigkeit der vorliegenden Dissertation liegt in der komplexen Kombination der unterschiedlichen Themen und Methoden. Die Methode zur Herunterregulierung von Proteinen durch siRNA ist neu und bietet vor allem im Bereich der primären Zellen keine Langzeiterfahrungen und kaum Literatur. Die Herunterregulierung von Membranproteinen stellt eine besondere Problematik dar, wenn für diese Proteine keine Antikörper existieren, über die man den Effekt der siRNA nachweisen und quantifizieren kann. Dies trifft für TRP-Kanäle, die sich untereinander jeweils nur in wenigen Aminosäuren voneinander unterscheiden, bedauerlicherweise zu. Die existierenden Antikörper bieten keine zuverlässige Spezifität und sind somit unbrauchbar für den detailgenauen Einsatz in primären Zellen. Auf eine Beobachtung der Kinetik der siRNA auf Proteinebene musste daher verzichtet werden. Aufgrund des mangelnden Wissens über die Turn-over-Raten des TRPC3-Proteins, wurden mit den Proliferationsexperimenten ein Zeitraum zwischen 0 und 12 Tagen abgedeckt. Der maximale Ef-

fekt der siRNA trat an Tag 4 nach Transfektion. Deswegen könnte vermutet werden, dass die Turn-over-Rate des TRPC3-Proteins im Bereich von 1-4 Tagen liegt (Abschnitt 4.8.1).

Zudem wurde bei TRP-Kanälen im Jahre 2002 von Hofmann *et al.* ein besonderes Phänomen beschrieben: Die TRP-Kanäle scheinen sich untereinander ersetzen zu können. In Versuchen mit TRPC6-knock-out Mäusen übernahm TRPC3 einen Teil der ursprünglichen TRPC6-Funktion. Auch für TRPC7, dessen Proteinsequenz dem TRPC3 mit 83% Übereinstimmung am ähnlichsten ist, wurden derartige Vermutungen geäußert [26, 79]. Diese Beispiele stellen keine konkrete Problematik für die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation dar, weil TRPC6 und TRPC7 in humanen, primären CD4⁺-Zellen nicht exprimiert werden. Allerdings muss diese grundsätzliche Fähigkeit der TRP-Kanäle mit in die möglichen Fehlerquellen miteinbezogen werden. Eine spekulative Überlegung wäre, dass sich zwei TRPC3- und zwei TRPC1-Proteine zu einem Tetramer zusammenlagern und einen speichergesteuerten Kanal in der Signalkaskade der T-Zellen bilden. Nach Herunterregulierung der TRPC3-Proteine durch siRNA um 50%, bestünde das Tetramer neben anderen möglichen Zusammensetzungen zum Beispiel noch aus einem TRPC3-Protein und zwei TRPC1-Proteinen. Könnte nun ein TRPC1-Protein die Funktion des einen fehlenden TRPC3-Proteins ersetzen, hätte die Herunterregulierung von TRPC3 keinen oder geringen Effekt auf die Zelle. Dies erschwerte den Nachweis der Funktion von TRPC3 für die Zelle erheblich. Bislang wurden keine sich gegenseitig ersetzenden TRPC1- und TRPC3-Untereinheiten beschrieben. Die grundsätzliche Möglichkeit dieses Phänomens sollte jedoch bei der kritischen Interpretation der Ergebnisse bestehen bleiben.

Eine weitere Problematik birgt der CRAC-Kanal-Blocker BTP2. In der vorliegenden Dissertation wurde sich an die gängigen Thesen gehalten, dass BTP2 den CRAC-Kanal auf direktem (Zitt *et al.* [94]) oder indirektem (Takezawa *et al.* [76]) Wege inhibiert. Allerdings ist nicht genau bekannt, ob die verwendete Konzentration von 200 nM die CRAC-Aktivität tatsächlich zu 100% senkt. Für die effiziente Aktivierung einer CD4⁺-Zelle sind nur sehr wenige Kanäle nötig [67]. Deswegen muss in Betracht gezogen werden, dass ein Teil der Rest-Proliferation, wie sie in Abschnitt 5.1 und 5.2 beschrieben ist, durch ein Leck in der Inhibition entstanden ist. Dies erklärt jedoch sicherlich nicht die gesamte, verbliebene Proliferation von 54%.

Trotz der vielen Hindernisse und Fehlerquellen, die die Versuchsumstände mit sich brachten, war es möglich, ein stabiles Versuchssystem zu etablieren, in dem die Reproduzierbarkeit letztendlich gewährleistet war. Die Proliferationsexperimente wurden der statistischen Analyse unterzogen und boten für viele der Fragestellungen signifikante Resultate.

5.4 Ausblick

TRP-Kanäle stehen im Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Ihre vielfältigen Funktions- und Interaktionsmöglichkeiten sind faszinierend und bieten Stoff für zahlreiche weitere Untersuchungen. Während der TRPC3-Kanal in der vorliegenden Dissertation intensiv auf seine Funktion für primäre CD4⁺-

Zellen untersucht wurde, wird die Rolle der übrigen Mitglieder der TRP-Familie „nur“ im Rahmen des Screenings behandelt. Es steht noch aus, ob sich die Ergebnisse zum TRPC1-Kanal (Reduktion der Proliferation TRPC1-siRNA-transfizierter Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen um 32% an Tag 4) reproduzieren lassen. Dies gilt ebenfalls für TRPM2, TRPM5 und TRPV2. Die Entwicklung und Verbesserung von spezifischen TRP-Kanal-Antikörpern wird sicherlich zur detailgenaueren Arbeit mit TRP-Kanälen beitragen.

Einen viel versprechenden Ansatz für die ausstehende Untersuchung bietet der 96-well-Nucleofactor von Amaxa. Durch den weiterentwickelten Elektroporator, in dem 96 Transfektionen fast zeitgleich stattfinden können, sind besonders die Aufrechterhaltung konstanter Bedingungen und damit die Vergleichbarkeit der siRNAs untereinander gewährleistet. Ein erstes Test-Proliferationsexperiment mit der weiterentwickelten Technik zeigte die deutliche Reduktion der Proliferation von sowohl TRPC3- als auch STIM1-siRNA-transfizierter $CD4^+$ -Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (Abbildung 5.3). Ebenfalls reduziert war die Proliferation TRPC1-siRNA-transfizierter Zellen. Mittels der 96-well-Elektroporation wird die Erhebung großer, valider Datenmengen möglich.

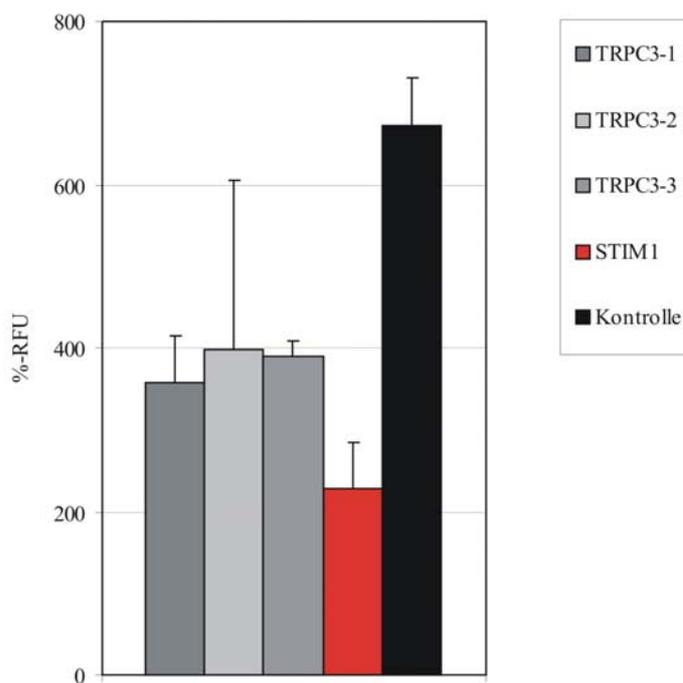


Abbildung 5.3 Proliferation von primären $CD4^+$ -Zellen, die mit dem 96-well-Nucleofactor (Amaxa) mit siRNA transfiziert wurden. Die Zellen wurden vier Tage nach Transfektion mit $\alpha CD3$ -/ $\alpha CD28$ -beschichteten Beads stimuliert. Gezeigt wird die Proliferation der Zellen an Tag 8 nach Stimulation (bedingt durch verlangsamte Reaktion der transfizierten Zellen, die am ehesten durch fehlerhaft hergestellte $\alpha CD3$ -/ $\alpha CD28$ -beschichtete Beads verursacht wurde). Die Limitierung der Ca^{2+} -Konzentration wurde durch die Zugabe von 1,05 mM EGTA erreicht. Gezeigt sind die Daten eines repräsentativen Spenders. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Christian Bickel (Amaxa) durchgeführt.

Zeitlich gesehen stellt die in Abbildung 5.3 demonstrierte Proliferationsmessung das letzte Experiment der vorliegenden Dissertation dar. Es bietet einen guten und positiven Ausblick auf zukünftige technische Möglichkeiten zur Untersuchung der TRP-Kanäle.

6. Literaturverzeichnis

- [01] **J.M. Alderton, S.A. Ahmed, L.A. Smith, R.A. Steinhardt;** Evidence for a vesicle-mediated maintenance of store-operated calcium channels in a human embryonic kidney cell line. *Cell Calcium* 28 (2000) 161-169
- [02] **L.J. Ausubel, J.I. Krieger, D.A. Haffner;** Changes in Cytokine Secretion Induced by Altered Peptide Ligands of Myelin Basic Protein Peptide 85-99. *J Immunol* 159 (1997) 2502-2512
- [03] **E. Bernstein, A.A. Caudy, S.M. Hammond, G.J. Hannon;** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409 (2001) 363-366
- [04] **M.J. Berridge;** Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* 361 (1993) 315-325
- [05] **M.J. Berridge;** Capacitative calcium entry. *Biochem J* 312 (1995) 491-500
- [06] **M.J. Berridge, M.D. Bootmann, H.L. Roderick;** Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Rev Mol Cel Biol* 4 (2003) 517-529
- [07] **D.E. Clapham;** TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426 (2003) rev. 517-524
- [08] **G.R. Crabtree, E.N. Olson;** NFAT signalling choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 (2002) 67-79
- [09] **P. Csutora, Z. Su, H.Y. Kim, A. Bugrim, K.W. Cunningham, R. Nuccitelli, J.E. Keizer, M.R. Hanley, J.E. Blalock, R.B. Marchase;** Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 121-126
- [10] **M.E. Dudley;** To Bead or Not to Bead. *J Immunotherapy* 26 (2003) 187-189
- [11] **M.L. Dustin;** The immunological synapse. *Arthritis Res* 4 (2002) S119-S125
- [12] **S.M. Elbashir, W. Lehdeckel, T. Tuschl;** RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15 (2001) 188-200

-
- [13] **C.M. Fanger, M. Hoth, G.R. Crabtree, R.S. Lewis;** Characterization of T cell mutants with defects in capacitative calcium entry: genetic evidence for the physiological roles of CRAC channels. *J Cell Biol* 131 (1995) 655-667
- [14] **S. Feske, M. Prakriya, A. Rao, R.S. Lewis;** A severe defect in CRAC Ca^{2+} channel activation and altered K^+ channel gating in T cells from immunodeficient patients. *J Exp Med* 202 (2005) 651-662
- [15] **S.Feske, Y. Gwack, M. Prakriya, S. Srikanth, S.H. Puppel, B. Tanasa, P.G. Hogan, R.S. Lewis, M. Daly, A. Rao;** A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441 (2006) 179-185
- [16] **A. Fire, S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello;** Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391 (1998) 806-811
- [17] **A. Grakoui, S.K. Bromley, C. Sumen, M.M. Davis, A.S. Shaw, P.M Allen, M.L. Dustin;** The immunological synapse: A molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285 (1999) 221-227
- [18] **T.E. Gunter, D.R. Pfeiffer;** Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* 258 (1990) 755-786
- [19] **Y. Gwack, S. Srikanth, S. Feske, F. Cruz-Guilloty, M. Oh-hora, D.S. Neems, P.G. Hogan, A. Rao;** Biochemical and functional characterization of Orai family proteins. *J Biol Chem* 282 (2007) 16232-16242
- [20] **S.M. Hammond, E. Bernstein, D. Beach, G.J. Hannon;** An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404 (2000) 293-296
- [21] **R.C. Hardie;** TRP channels and lipids: from *Drosophila* to mammalian physiology. *J Physiol* 578 (2007) 9-24
- [22] **R.C. Hardie, B. Minke;** Novel Ca^{2+} channels underlying transduction in *Drosophila* photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca^{2+} mobilization. *Trends Neurosci* 16 (1993) 371-376

-
- [23] **C.T. Hauser, R.Y. Tsien;** A hexahistidine-Zn²⁺-dye label reveals STIM1 surface exposure. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (2007) 3693-3697
- [24] **L. He, T. Hewavitharana, J. Soboloff, M.A. Spassova, D.L. Gill;** A Functional Link between Store-operated and TRPC Channels Revealed by the 3,5-Bis(trifluoromethyl)pyrazole Derivative, BTP2. *J Biol Chem* 280 (2005) 10997-11006
- [25] **T. Hofmann, A.G. Obukhov, M. Schaefer, C. Harteneck, G. T. Gudermann, G. Schultz;** Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397 (1999) 259-263
- [26] **T. Hofmann, M. Schaefer, G. Schultz, T. Gudermann;** Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2002) 7461-7466
- [27] **M. Hoth, R. Penner;** Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355 (1992) 353-356
- [28] **M. Hoth, C.M. Fanger, R.S. Lewis;** Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol* 137 (1997) 633-648
- [29] **M. Hoth, D.C. Button, R.S. Lewis;** Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (2000) 10607-10612
- [30] **G.N. Huang, W. Zeng, J.Y. Kim, J.P Yuang, L. Han, S. Muallem, P.F. Worley;** STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol* 13 (2006) 1003-1010
- [31] **K. Huppi, S.E. Martin, N.J. Caplen;** Defining and Assaying RNAi in mammalian Cells. *Molecular Cell* 17 (2005) 1-10
- [32] **R.F. Irvine;** "Quantal" Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry by inositol phosphatases - A possible. *FEBS Lett.* 263 (1990) 5-9

- [33] **D. Kalamasz, S.A. Long, R. Taniguchi, J.H. Buckner, R.J. Berenson, M. Bonyhadi;** Optimization of Human T-Cell Expansion Ex Viva Using Magnetic Beads Conjugated with Anti-CD3 and Anti-CD28 Antibodies. *J Immunother* 27 (2004) 405-418
- [34] **P. Launay, H. Cheng, S. Srivatsan, R. Penner, A. Fleig, J-P. Kinet;** TRPM4 Regulates Calcium Oscillations After T Cell Activation. *Science* 306 (2004) Reports 1374-1377
- [35] **P. Launay, A. Fleig, A-L. Perraud, A.M. Scharenberg, R. Penner, J-P. Kinet;** TRPM4 Is a Ca^{2+} -Activated Nonselective Cation Channel Mediating Cell Membrane Depolarization. *Cell* 109 (2002) 397-407
- [36] **J.E. van Leeuwen, L.E. Samelson;** T cell antigen receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol* 11 (1999) 242-248
- [37] **R.S. Lewis;** Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 19 (2001) 497-521
- [38] **Q. Li, I.M. Verma;** NK- κB regulation in the immune system. *Nature Rev Immunol* 2 (2002) 725-734
- [39] **Y. Liao, C. Erxleben, E. Yildirim, J. Abramowitz, D.L. Armstrong, L. Birnbaumer;** Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (2007) 4682-4687
- [40] **J. Liou, M.L. Kim, W.D. Heo, J.T. Jones, J.W. Myers Jr., J.E. Ferrell Jr., T. Meyer;** STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} -influx. *Curr Biol* 15 (2005) 1235-1241
- [41] **X. Liu, B.C. Bandyopadhyay, B.B Singh, K. Groschner, I.S. Ambudkar;** Molecular analysis of a store-operated and OAG sensitive non-selective cation channel: heteromeric assembly of TRPC1-TRPC3. *J Biol Chem* 280 (2005) 21600-21606
- [42] **X. Liu, B.B. Singh, I.S. Ambudkar;** TRPC1 is required for functional store-operated Ca^{2+} channels. Role of acidic amino acid residues in the S5-S6 region. *J Biol Chem* 278 (2003) 11337-11343

-
- [43] **J.J. Lopez, G.M. Salido, J.A. Pariente, J.A. Rosado;** Interaction of STIM1 with Endogenously Expressed Human Canonical TRP1 upon Depletion of Intracellular Ca²⁺ Stores. *J Biol Chem* 281 (2006) 28254-28264
- [44] **S.S. Manji, N.J. Parker, R.T. Williams, S.L. Van, R.B. Pearson, M. Dziadek, P.J. Smith;** STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface. *Biochem Biophys Acta* 1481 (2000) 147-155
- [45] **J.C. Mercer, W.I. DeHaven, J.T. Smyth, B. Wedel, R.R. Boyles, G.S. Bird, J.W. Putney Jr;** Large store-operated calcium selected currents due to co-expression of orai1 or orai2 with the intracellular calcium sensor, stim1. *J Biol Chem* 281 (2006) 24979-24990
- [46] **T. Mizuno, M.Y. Chou, M. Inouye;** A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc Natl Acad Sci USA* 81 (1984) 1966-1970
- [47] **C. Montell;** The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 272 (2005) re3
- [48] **C. Montell;** Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Science STKE* 90 (2001) re1
- [49] **C. Montell, L. Birnbaumer, V. Flockerzi;** The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108 (2002) 595-598
- [50] **C. Montell, L. Birnbaumer, V. Flockerzi, R.J. Bindels, E.A. Bruford, M.J. Caterina, D.E. Clapham, C. Harteneck, S. Heller, D. Julius, I. Kojima, Y. Mori, R. Penner, D. Prawitt, A.M. Scharenberg, G. Schultz, N. Shimizu, M.X. Zhu;** A Unified Nomenclature for the Superfamily of TRP Cation Channels. *Molecular Cell* 9/2 (2002) 229-231
- [51] **B.H. Nelson;** IL-2, Regulatory T Cells, and Tolerance. *J Immunol* 172 (2004) 3983-3988
- [52] **A.G. Obukhov, M.C. Nowycky;** TRPC5 activation kinetics are modulated by the scaffolding protein ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein-50 (EBP50). *J Cell Physiol* 201 (2004) 227-235
- [53] **G. Owsianik, K. Talavera, T. Voets, B. Nilius;** Permeation and selectivity of trp channels. *Annu Rev Physiol* 68 (2006) 685-717

-
- [54] **A.B. Parekh**; On the activation mechanism of store-operated channels. *Pflugers Arch* 453 (2006) 303-311
- [55] **R.L. Patterson, D.B. van Rossum, D.L. Gill**; Store-operated Ca²⁺ entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell* 98 (1999) 487-499
- [56] **C. Peinelt, M. Vig, D.L. Koomoa, A. Beck, M.J. Nadler, M. Koblan-Huberson, A. Lis, A. Fleig, R. Penner, J.P. Kinet**; Amplification of the CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol* 8 (2006) 771-773
- [57] **S. Phillipp, B. Strauss, D. Hirnet, U. Wissenbach, L. Méry, V. Flockerzi, M. Hoth**; TRPC3 Mediates T-cell Receptor-dependent Calcium Entry in Human T-lymphocytes. *J Biol Chem* 278 (2003) 26629-26638
- [58] **M. Poteser, A. Graziani, C. Rosker, P. Eder, I. Derler, H. Kahr, M.X. Zhu, C. Romanin, K. Groschner**; Trpc3 and trpc4 associate to form a redox-sensitive cation channel-evidence for expression of native trpc3/trpc4 heteromeric channels in endothelial cells. *J Biol Chem* 281 (2006) 13588-13595
- [59] **M. Prakriya, S. Feske, Y. Gwack, S. Srikanth, A. Rao, P.G. Hogan**; Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 443 (2006) 230-233
- [60] **J.W. Putney Jr.**; The enigmatic TRPCs: multifunctional cation channels. *Trends Cell Biol.* 14 (2004) 282-286
- [61] **J.W. Putney Jr.**; Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. *J Biol Chem* 169 (2005) Comment 381-382
- [62] **D. Qian, A. Weiss**; T cell antigen receptor signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 9 (1997) 205-212
- [63] **A. Quintana, C. Schwindling, A.S. Wenning, U. Becherer, J. Rettig, E.C. Schwarz, M. Hoth**; T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (36) (2007) 14418-14423
- [64] **C. Randriamampita, R.Y. Tsien**; Emptying of intracellular Ca²⁺-stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺-influx. *Nature* 364 (1993) 809-814

- [65] **J. Roos, P.J. DiGregorio, A.V. Yeromin, K. Ohlsen, M. Liudyno, S. Zhang, O. Safrina, J.A. Kozak, S.L. Wagner, M.D. Cahalan, G. Velicelebi, K.A. Stauderman;** STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} -channel function. *J Cell Biol* 169 (2005) 435-445
- [66] **J. Sambrook, M.J. Gething ;** Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342 (1989) 224-225
- [67] **E.C. Schwarz, C. Kummerow, A.S. Wennig, K. Wagner, A. Sappok, K. Wagershauser, D. Griesemer, B. Strauß, M.J. Wolfs, A. Quintana, M. Hoth;** Calcium dependence of T-cell proliferation following focal stimulation. *Eur J Immunol* 37 (2007) 2723-2733
- [68] **C.C. Scott, W. Furuya, W.S. Trimble, S. Grinstein;** Activation of store-operated Calcium Channels: ASSESSMENT OF THE ROLE OF SNARE-MEDIATED VESICULAR TRANSPORT. *J Biol Chem* 278 (2003) 30534-30539
- [69] **K. Shuai, B. Lui;** Regulation of JAK-STAT Signalling in the Immunsystem. *Nat Rev Immunol* 3 (2003) 900-911
- [70] **T. Smani, S.I. Zakharov, E. Leno, P. Csutora, E.S. Trepakova, V.M Bolotina;** Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 is a novel determinant of store-operated Ca^{2+} entry. *J Biol Chem* 278 (2003) 11909-11915
- [71] **J.T. Smyth, W.I. DeHaven, B.F. Jones, J.C. Mercer, M. Trebak, G. Vazquez, J.W. Putney Jr.;** Emerging perspectives in store-operated Ca^{2+} entry: Roles of Orai, Stim and TRP. *Biochim Biophys Acta* 1763 (2006) rev 1147-1160
- [72] **J. Soboloff, M.A. Spassanova, X.D. Tang, T. Hewavitharana, W. Xu, D.L. Gill;** Orai1 and STIM1 reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem* 281 (2006) 20661-20665
- [73] **M.A. Spassova, J. Soboloff, L.P. He, W. Xu, M.A. Dziadek, D.L. Gill;** STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca^{2+} channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (2006) 4040-4045

- [74] **Z. Su, P. Csutora, R.L. Hunton, R.B. Shoemaker, R.B. Marchase, J.E. Blalock;** A store-operated non-selective cation channel in lymphocytes is activated directly by Ca^{2+} influx factor and diacylglycerol. *Am J Physiol Cell Physiol* 280 (2001) C1284-C1292
- [75] **H. Sugawara, M. Kurosaki, M. Takata, T. Kurosaki;** Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-triphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *EMBO J* 16 (1997) 3078-3088
- [76] **R. Takezawa, H. Cheng, A. Beck, J. Ishikawa, P. Launay, H. Kubota, J-P. Kinet, A. Fleig, T. Yamada, R. Penner;** A Pyrazole Derivative Potently Inhibits Lymphocyte Ca^{2+} Influx and Cytokine Production by Facilitating Transient Receptor Potential Melastatin 4 Channel Activity. *Mol Pharmacol* 69 (2006) 1413-1420
- [77] **L.A. Timmerman, N.A. Clipstone, S.N. Ho, J.P. Northrop, G.R. Crabtree;** Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca^{2+} signals and immunosuppression. *Nature* 383 (1996) 837-840
- [78] **C. Tirupathi, M. Freichel, S.M. Vogel, B.C. Paria, D. Mehta, V. Flockerzi, A.B. Malik;** Impairment of store-operated Ca^{2+} entry in TRPC4(-/-) mice interferes with increase in lung microvascular permeability. *Circ Res* 91 (2002) 70-76
- [79] **M. Trebak, G. Vazquez, G.St.J. Bird, J.W. Putney Jr.;** The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Cell Calcium* 33 (2003) 451-461
- [80] **G. Vasquez, J.P. Lievreumont, J.B.G. St, J.W. Putney Jr;** Human Trpc3 forms both inositol triphosphat receptor-dependent and receptor-independent store-operated cation channels in DT 40 avian B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001) 11777-11782
- [81] **G. Vasquez, B.J. Wedel, B.T. Kawasaki, G.S. Bird, J.W. Putney Jr;** Obligatory role of Src kinase in the signaling mechanism for TRPC3 cation channels. *J Biol Chem* 279 (2004) 40521-40528
- [82] **M. Vig, C. Peinelt, A. Beck, D.L. Koomoa, D. Rabah, M. Koblan-Hubertson, S. Kraft, H. Turner, A. Fleig, R. Penner, J.P. Kinet;** CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca^{2+} entry. *Science* 312 (2006) 1220-1223

- [83] **R.T. Williams, S.S. Manji, N.J. Parker, M.S. Hancock, L. van Stekelenburg, J.P. Eid, P.V. Senior, J.S. Kazenwadel, T. Shandala, R. Saint, P.J. Smith, M.A. Dziadek;** Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochem J* 357 (2001) 673-685
- [84] **R.T. Williams, P.V. Senior, S.L. Van, J.E. Layton, P.J. Smith, M.A. Dziadek;** Stromal interaction molecule 1 (STIM1), a transmembrane protein with growth suppressor activity, contains an extracellular SAM domain modified by N-linked glycosylation. *Biochem Biophys Acta* 1596 (2002) 131-137
- [85] **P.F. Worley, W. Zeng, G.N. Huang, J.P. Yuan, J.Y. Kim, M.G. Lee, S. Muallem;** TRPC channels as STIM1-regulated store-operated channels. *Cell Calcium* 42 (2007) 205-211
- [86] **M.M. Wu, J.A. Buchanan, R.M. Luik, R.S. Lewis;** Ca^{2+} store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol* 174 (2006) 803-813
- [87] **X. Wu, G. Babnigg, M.L. Villereal;** Functional significance of human trp1 and trp3 in store-operated Ca^{2+} entry in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 278 (2000) 526-536
- [88] **X. Wu, T.K. Zagranichnaya, G.T. Gurda, E.M Eves, M.L. Villereal,** A TRPC1/TRPC3-mediated increase in store-operated calcium entry is required for differentiation of H19-7 hippocampal neuronal cells. *J Biol Chem* 279 (2004) 43392-43402
- [89] **E. Yildirim, B.T Kawasaki, L. Birnbaumer;** Molecular cloning of TRPC3a, an N-terminally extended, store-operated variant of the human C3 transient receptor potential channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (2005) 3307-33011
- [90] **J.P. Yuan, W. Zeng, G.N. Huang, P.F. Worley, S. Muallem;** STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol* 7 (2007) 636-645
- [91] **S.L. Zhang, A.V. Yeromin, X.H. Zhang, Y. Yu, O. Safrina, A. Penna, J. Roos, K.A. Stauderman, M.D. Cahalan;** Genome-wide siRNA screen of Ca^{2+} influx identifies genes that regulate Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (2006) 9357-9362

-
- [92] **S.L. Zhang, Y. Yu, J. Roos, J.A. Kozak, T.J. Deerinck, M.H. Ellisman, K.A. Stauderman, M.D. Cahalan;** STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane. *Nature* 437 (2005) 902-905
- [93] **C. Zitt, A.G. Obukhov, C. Strubing, A. Zobel, F. Kalkbrenner, A. Luckhoff, G. Schultz;** Expression of TRPC3 in Chinese hamster ovary cells result in calcium-activated cation currents not related to store depletion. *J Cell Biol* 138 (1997) 1333-1341
- [94] **C. Zitt, B. Strauss, E.C. Schwarz, N. Spaeth, G. Rast, A. Hatzelmann, M. Hoth;** Potent Inhibition of Ca^{2+} Release-activated Ca^{2+} Channels and T-Lymphocyte Activation by the Pyrazole Derivative BTP2. *J Biol Chem* 279 (2004) 12427-12437
- [95] **X. Zhu, M. Jiang, M. Peyton, G. Boulay, R. Hurst, E. Stefani, L. Birnbaumer;** trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} -entry. *Cell* 85 (1996) 661-671
- [96] **A. Zweifach, R.S. Lewis;** Mitogen-regulated Ca^{2+} current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993) 6295-6299

7. Anhang

7.1 Übersichtstabelle über die verwendeten siRNAs

siRNA	Benennung	Firma	DNA-Ziel-Sequenz
Alexa Fluor 546	Alexa Fluor 546	Qiagen	
Control non-silencing	Kontroll-1	Qiagen	
Control non-targeting 1	Kontroll-2	Dharmacon	
Control non-targeting 2	Kontroll-3	Dharmacon	
huSTIM1-1140	STIM1	Qiagen	5' AAG GCT CTG GAT ACA GTG CTC 3'
TRPC1-1	TRPC1-1	Qiagen	5' AAG GAT TGG GAT GCA TTC CAT 3'
TRPC1-2	TRPC1-2	Qiagen	5' AAG TGA TGT GCT GCC TAG TGC 3'
TRPC1-A	TRPC1-3	Qiagen	5' AA GCC CGG AAT TCT CGT GAA T 3'
TRPC1-B	TRPC1-4	Qiagen	5' AA GCC CAC CTG TAA GAA GAT A 3'
TRPC1-b1	TRPC1-5	Dharmacon	5' GAGGTGAAGGAGGAGAATA 3'
TRPC1-TRPC3-motif	TRPC1-C3-motif	Qiagen	5' AA TGG AAG TTT GCT CGT GCA A 3'
TRPC3 2-For-Silencing 1	TRPC3-1	Qiagen	5' TCC GTT GTG CTC AAA TAT GAT 3'
TRPC3 2-For-Silencing 2	TRPC3-2	Qiagen	5' AAC GGT ATC GCT AGC AAC TGA 3'
TRPC3 2-For-Silencing 3	TRPC3-3	Qiagen	5' CACGTTATCAGCAGATAATGA 3'
TRPC3 2-For-Silencing 4	TRPC3-4	Qiagen	5' AAGGACTGTAAAGGACATATT 3'
TRPC3-2	TRPC3-5	Qiagen	5' AAG TGT CTC GTT GTG CTG GTC 3'
TRPC3-3	TRPC3-6	Qiagen	5' AAG TGA CTT CCG TTG TGC TCA 3'
TRPC3-b1	TRPC3-7	Dharmacon	5' ATGATGAAGTTAATGAAGG 3'
TRPC3-b2	TRPC3-8	Dharmacon	5' AAGGATATAGAAAATGGGAA 3'
TRPC4-1	TRPC4-1	Qiagen	5' AA GGC CTG ACC GAA GAG AAC T 3'
TRPC4-2	TRPC4-2	Qiagen	5' AA GTT CCA GAG AAC TGG AAA T 3'
TRPC7-1	TRPC7-1	Qiagen	5' AA GGC CAA AAG CTG TGA AAA T 3'
TRPC7-2	TRPC7-2	Qiagen	5' AA GGC GAG CTG AAG GAA ATC A 3'
TRPM2-A	TRPM2-1	Qiagen	5' AA GAG GAG GTG TGG CCA TCA A 3'
TRPM2-B	TRPM2-2	Qiagen	5' AA GCC GCG GCT GAA GAG CAT T 3'
TRPM5-A	TRPM5-1	Qiagen	5' AA CCG CCC ACA GAG TGG ACT T 3'
TRPM5-B	TRPM5-2	Qiagen	5' AA GGT GGC CGA GAA GCA GTT T 3'
TRPM7-A	TRPM7-1	Qiagen	5' AA TCG GAG GTC TGG CCG AAA T 3'
TRPM7-B	TRPM7-2	Qiagen	5' AA GCC AGC TAT GGA TAC AAA T 3'
TRPV1-b1	TRPV1-1	Dharmacon	5' ATTGAAGACGGGAAGAATG 3'
TRPV1-B	TRPV1-2	Qiagen	5' AA GGG CGG CCT GGA TTC TAC T 3'
TRPV2-A	TRPV2-1	Qiagen	5' AA GGG CCA AGG GAC TTG CTT T 3'
TRPV2-B	TRPV2-2	Qiagen	5' AA GCC TCC TTG GAG CTC TTC A 3'
TRPV3-A	TRPV3-1	Qiagen	5' AA GGG CAG ACG GCG CTG AAC A 3'
TRPV3-B	TRPV3-2	Qiagen	5' AA GAG CAG AGG AGG AAA AAG A 3'
TRPV5-A	TRPV5-1	Qiagen	5' AA ACG AGA GGC TCG CCA AAT T 3'
TRPV5-B	TRPV5-2	Qiagen	5' AA TGC GTT TCT GCT GGC TGA T 3'

TRPV6-A	TRPV6-1	Qiagen	5' AA GGG CTA ATT CTC TGC CTA T 3'
TRPV6-B	TRPV6-2	Qiagen	5' AA GCA CAC CCA GTG GAC GTA T 3'

Benennung	SiRNA Sequenz (Sense, 5'-3')	SiRNA Sequenz (Anti-Sense, 5'-3')
Alexa-Fluor 546	UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT	ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT
Kontroll-1	UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT	ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT
Kontroll-2	UAGCGACUAAACACAUCAA UU	UUGAUGUGUUUAGUCGCUA
Kontroll-3	UAAGGCUAUGAAGAGAUAC UU	GUAUCUCUUCAUAGCCUUA
STIM-1	GGCUCUGGAUACAGUGCUCdTdT	GAGCACUGUAUCCAGAGCCdTdT
TRPC1-1	GGAUUGGGAUGCAUCCAAdTdT	AUGGAAUGCAUCCCAAUCCdTdT
TRPC1-2	GUGAUGUGCUGCCUAGUGCdTdT	GCACUAGGCAGCACAUCAdTdT
TRPC1-3	GCCCCGAAUUCUCGUGAAUdTdT	AUUCACGAGAAUUCGGGGdTdT
TRPC1-4	GCCCACCUGUAAGAAGAUAdTdT	UAUCUUCUUCACAGGUGGGdTdT
TRPC1-5	GAGGUGAAGGAGGAGAAUAdTdT	UAUUCUCCUCCUUCACCUCdCdC
TRPC1-C3-motif	UGGAAGUUUGCUCGUGCAAdTdT	UUGCACGAGCAAACUCCAdTdT
TRPC3-1	CGUUGUGCUCAAAUAUGAUdTdT	AUCAUAUUUGAGCACAACGdGdA
TRPC3-2	CGGUAUCGCUAGCAACUGAdTdT	UCAGUUGCUAGCGAUACCGdTdT
TRPC3-3	CGUUAUCAGCAGAUAAUGAdTdT	UCAUUAUCUGCUGAUAAACGdTdT
TRPC3-4	GGACUGUAAAGGACAUAUdTdT	AAUAUGUCCUUUACAGUCCdTdT
TRPC3-5	GUGUCUCGUUGUGCUGGUCdTdT	GCACAGCACAACGAGACAdTdT
TRPC3-6	GUGAUCUCCGUUGUGCUCAdTdT	UGAGCACAACGGAAGUCAdTdT
TRPC3-7	AUGAUGAAGUUAUGAAGGdTdT	CCUUCAUUAACUUCAUUAUUdTdT
TRPC3-8	AAGGAUAUAGAAAUGGAAAdTdT	UUCCCAUUUCUAUAUCCUUCUdTdT
TRPC4-1	GGCCUGACCGAAGAGAACUdTdT	AGUUCUCUUCGGUCAGGCCdTdT
TRPC4-2	GUUCCAGAGAACUGGAAAAdTdT	AUUUCCAGUUCUCUGGAAAdTdT
TRPC7-1	GGCCAAAAGCUGUGAAAAUdTdT	AUUUUCACAGCUUUUGGCCdTdT
TRPC7-2	GGCGAGCUGAAGGAAAUCAdTdT	UGAUUUCUUCAGCUCGCCdTdT
TRPM2-1	GAGGAGGUGUGCCAUCAAdTdT	UUGAUGGCCACACCUCUCdTdT
TRPM2-2	GCCGCGGCUGAAGAGCAUdTdT	AAUGCUCUUCAGCCGCGGdTdT
TRPM5-1	CCGCCACAGAGUGGACUdTdT	AAGUCCACUCUGUGGGCGGdTdT
TRPM5-2	GGUGGCCGAGAAGCAGUUdTdT	AAACUGCUUCUCGGCCACCdTdT
TRPM7-1	UGCGAGGUCUGCCGAAAAdTdT	AUUUCGGCCAGACCUCGAdTdT
TRPM7-2	GCCAGCUAUGGAUACAAAAdTdT	AUUUGUAUCCAUAAGCUGGdTdT
TRPV1-1	AUUGAAGACGGGAAGAAUGdTdT	CAUUCUCCCGUCUCAAUdCdA
TRPV1-2	GGGCGGCCUGGAUUCUACUdTdT	AGUAGAAUCCAGGCCGCCdTdT
TRPV2-1	GGGCAAGGGACUUGCUUUdTdT	AAAGCAAGUCCUUGGCCdTdT
TRPV2-2	GCCUCCUUGGAGCUCUAdTdT	UGAAGAGCUCCAAGGAGGdTdT
TRPV3-1	GGGACAGCGGCUGAACAdTdT	UGUUCAGCGCCGUCUGCCdTdT
TRPV3-2	GAGCAGAGGAGGAAAAAGAdTdT	UCUUUUUCCUCCUCUGCUCdTdT
TRPV5-1	ACGAGAGGCUCGCCAAAAdTdT	AAUUUGGCGAGCCUCUGUdTdT
TRPV5-2	UGCGUUUCUGCUGGCUGAUdTdT	AUCAGCCAGCAGAAACGAdTdT
TRPV6-1	GGGCUAAUUCUCUGCCUAUdTdT	AUAGGCAGAGAAUAGCCdTdT
TRPV6-2	GCACACCCAGUGGACGUAUdTdT	AUACGUCCACUGGGUGUGdTdT

7.2 Übersichtsgrafik über das Screening der TRP-siRNA-transfizierten CD4⁺-Zellen

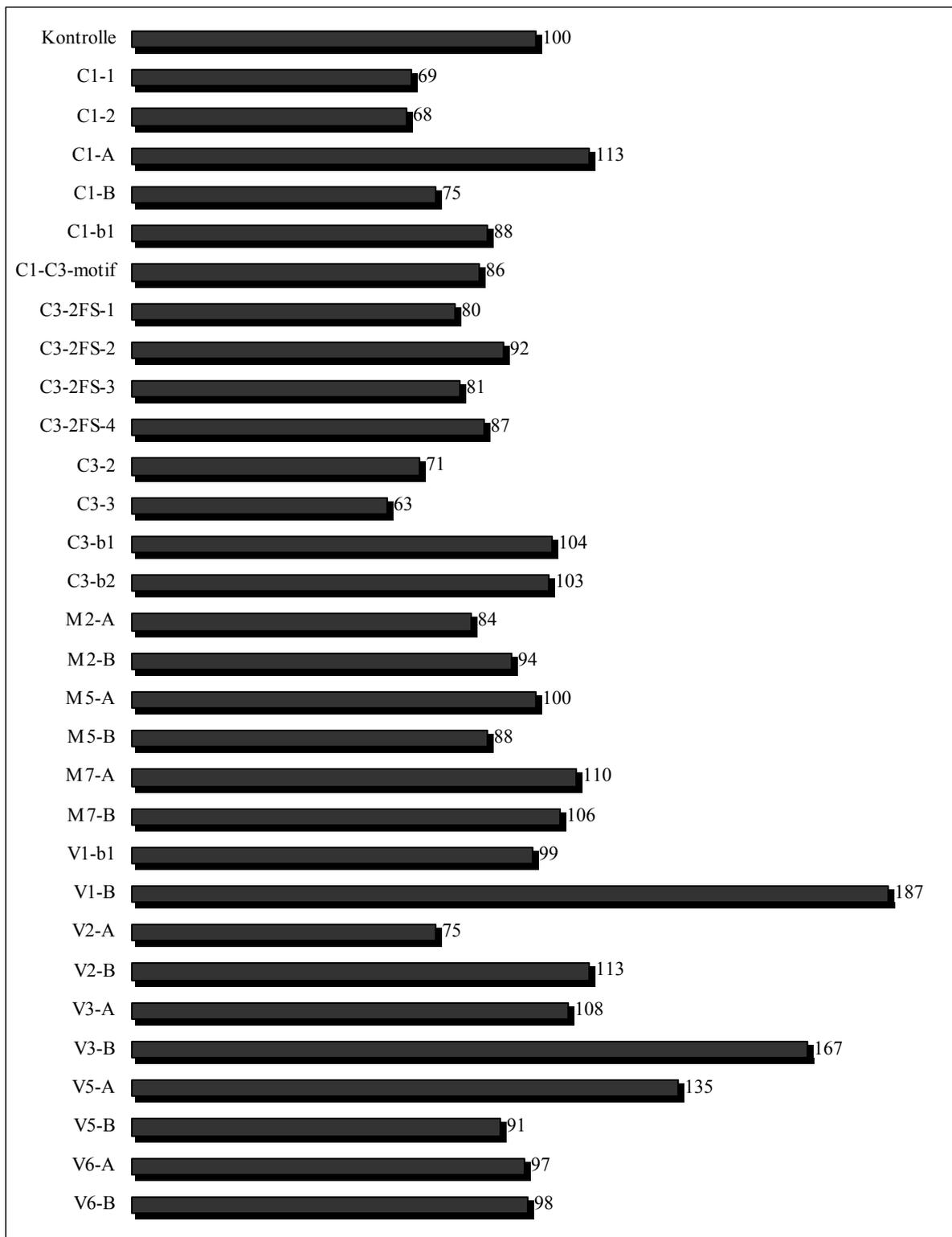


Abb. 7.1 Gezeigt wird die Proliferation α CD3-/ α CD28-Bead-stimulierter CD4⁺-Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen alle, von CD4⁺-Zellen konsistent exprimierten TRP-Kanäle. An Tag 4 wurde die Proliferation mittels CellTiter Blue bestimmt. Zur Analyse der Daten, die in insgesamt sechs Experimenten mit 13 Depletionsfiltern entstanden, wurden die Messwerte jeweils gemittelt und als Prozent der Proliferation der zugehörigen Kontrolle gezeigt. Dafür wurde die Proliferation der Kontrollzellen an Tag 4 auf 100% gesetzt. Es wurden pro Experiment mindestens zwei Kontroll-siRNAs mitgeführt. Zu den verwendeten Kontroll-siRNAs gehörten: Control non-silencing-siRNA, TRPC4-1-, TRPC7-1- und TRPC7-2-siRNA (Nomenklatur siehe Abschnitt 7.1).

7.3 Unbedenklichkeitserklärung der Ethikkommission

In dieser Arbeit wurden Leukozyten-Reduktions-Filter von Vollblutspendern zur Aufreinigung der T-Zellen weiterverwendet. Dieses Vorgehen wurde von der Ethikkommission begutachtet und gestattet (Unbedenklichkeitserklärung vom 05. 04. 2005, Kenn-Nummer: Prof. Schie/Gn, Projektfinanzierung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 530, Projekt A3)).

7.4 Publikationen, Abstracts

7.4.1 Publikationen

E.C. Schwarz, M.J. Wolfs, S. Tonner, A.S. Wenning, A. Quintana, D. Griesemer, M. Hoth; TRP Channels in Lymphocytes. Handbook of Experimental Pharmacology 179: 445 (2007)

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

A. Quintana, C. Schwindling, A.S. Wenning, U. Becherer, J. Rettig, E.C. Schwarz, M. Hoth; T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. Proc Natl Acad Sci USA 104 (2007) 14418-14423

M. Thiel, M.-J. Wolfs, S. Bauer, A.S. Wenning, A. Wadle, E.C. Schwarz, A.M. Scott, C. Renner, M. Hoth; B7-2 co stimulation increases T-cell activation and Ca^{2+} entry more efficiently than B7-1 co stimulation. (In Vorbereitung)

7.4.2 Abstracts

A. Quintana, K. Wagner, B. Strauß, A.S. Wenning, E.C. Schwarz, M. Hoth; Formation of the immunological synapse induces a closer coupling between mitochondria and CRAC channels and enhances calcium influx in T-lymphocytes. European Journal of Physiology 449: S34, Suppl. 1 (2005)

A.S. Wenning, K. Wagner, M.J. Wolfs, B. Strauß, A. Quintana, M. Hoth, E.C. Schwarz; Calcium-dependence of proliferation in native human peripheral blood lymphocytes and Jurkat T-cells. European Journal of Physiology 449: S133, Suppl. 1 (2005)

A. Quintana, K. Wagner, A. Wenning, L. Kaestner, P. Lipp, E.C. Schwarz, M. Hoth; The immunological synapse induces efficient T cell activation due to mitochondrial re-distribution. *Immunobiology* 210, 6-8: 450 (2005)

E.C. Schwarz, M.J. Wolfs, A.S. Wenning, K. Wagner, B. Strauß, A. Quintana, M. Hoth; Transient receptor potential cation channels are involved in Ca^{2+} -signalling in human primary T-lymphocytes. *Immunology* 116: 86, Suppl. 1 (2005)

A. Quintana, E.C. Schwarz, A.S. Wenning, C. Schwindling, K. Wagner, P. Lipp, L. Kaestner, M. Hoth; Efficient T-cell activation requires kinesin/dynein-dependent mitochondrial translocation to the plasma membrane. *Acta Physiologica* 186: 196, Suppl. 1 (2006)

A.S. Wenning, M.J. Wolfs, A. Quintana, B. Strauß, M. Hoth, E.C. Schwarz; Analysis of TRP cation channel function for activation and proliferation of primary human T-cells using siRNA technology. *Acta Physiologica* 186: 270, Suppl. 1 (2006)

C. Schwindling, A. Quintana, A.S. Wenning, U. Becherer, J. Rettig, E.C. Schwarz, M. Hoth; T-cell activation requires mitochondrial translocation towards the immunological synapse. *J. Immunol.* 178:87.32 (2007)

7.5 Danksagung

Meinem Doktorvater Markus Hoth möchte ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Entstehung dieser Arbeit, für die Ermöglichung der Forschungsfamulatur am Universitätsspital Zürich und der Mitreise auf Kongresse, für die vielen wertvollen Diskussionen und für das mir entgegen gebrachte Vertrauen danken.

Eva Schwarz danke ich herzlich für die hervorragende Betreuung während der gesamten Zeit (selbst zu Mutterschutzzeiten!), für die sehr gute fachliche wie auch tatenkräftige Unterstützung, für ihre Kreativität und Diskussionsbereitschaft und für die schönen auch außerfachlichen Abende.

Markus und Eva ist mir sowohl als Wissenschaftler als auch als Freunde wichtig geworden.

Melodie-Jo Wolfs danke ich für die gute Zusammenarbeit, für viele fruchtbare Diskussionen und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bettina Strauß danke ich für ihre sorgsame Hilfe in der Zellkultur, für die Durchführung der ELISA- und PCR-Experimente, für so manchen guten, fachlichen Ratschlag und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Carsten Kummerow danke ich vor allem als Freund für den regen Gedankenaustausch und für die vielen schönen Stunden im Labor.

Kerstin Wagner danke ich für die Bereitstellung vieler Ergebnisse und für die stetige offene Auskunftsbereitschaft.

Ariel Quintana danke ich für die gute Zusammenarbeit, für viele gute Ratschläge und für die Bereitstellung der Ca^{2+} -Imaging-Experimente.

Ute Legler danke ich herzlich für die Unterstützung in finanziellen und organisatorischen Fragen, aber auch für die vielen anregenden Unterhaltungen.

Christian Bickel und der Firma Amaxa danke ich für die Bereitstellung der 96-Well-Nucleofactors und für die sehr gute Zusammenarbeit.

Dem Sonderforschungsbereich 530 danke ich für die Finanzierung einer Hilfskraftstelle.

Der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. F. Graesser danke ich für die Bereitstellung und Mitbenutzung des Nucleofactors und des FACS-Gerätes.

Dem Blutspendedienst des Universitätsklinikums Homburg danke ich für die Bereitstellung bzw. die Aufbewahrung der Leukozyten-Reduktions-Filter, ohne die die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Désirée Griesemer, Christian Schwindling, Anja Ludes, Ivan Bogeski und Katharina Wagershauser danke ich für so manchen guten Ratschlag und einige spannende - fachliche wie private - Diskussionen.

Meinen Eltern danke ich herzlich für die Ermöglichung meines Studiums und der Durchführung dieser aufwendigen Arbeit, für die finanzielle und mentale Unterstützung und für das Vertrauen, das mir geschenkt wurde. Besonders meinem Vater danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Es war eine wunderbare und sehr wertvolle Zeit für mich. Dafür danke ich allen Labormitgliedern.

8. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Wenning
 Vorname: Anna Silvia
 Geburtsdatum/-ort: 09.04.1982 in Münster
 Heimanschrift: Kunkelsberg 49
 D-45239 Essen
 Familienstand: Ledig
 Nationalität: Deutsch

Schulbildung

1988-1992 Bodelschwinghgrundschule, Münster
 Grundschule an der Jacobsallee, Essen
 1992-2001 musikisches Gymnasium Essen-Werden, Essen
 Marien-Gymnasium, Essen
 10/1995- 11/1995 Lady Margaret School, London, Großbritannien
 07/1997- 08/1997 Lycée Pierre de Coubertin, Meaux Cedex, France
 Leistungskurse: Chemie, Französisch
 2001 Abschluss: Abitur, Note 1.3

Kenntnisse

Sprachen: Englisch, Französisch
 Grundkenntnisse Niederländisch und Spanisch
 EDV: Microsoft Office, Windows 2000 und XP,
 Powerpoint-Präsentationen

Studium

Seit 10/2001 Medizinstudium an der Universität des Saarlandes
 03/2004 Physikum, Note: 2.0
 12/2004 bis 02/2007 Arbeit als wissenschaftliche Hilfskraft in der Physiologie
 02-06/2007 Unterassistentärztin Spital Thun (Chirurgie)
 06-10/2007 Unterassistentärztin Spital Wolhusen (Innere Medizin)
 10/2007-02/2008 Praktisches Jahr Uniklinikum Homburg (Radiologie)
 04-06/2008 Staatsexamen

Dissertation

Experimentelle Grundlagenforschung bei Prof. Dr. Markus Hoth,
Abteilung der Physiologie, Universitätsklinik Homburg
"Analyse der Rolle von TRP Proteinen für die Aktivierung humaner CD4⁺-Zellen
mittels siRNA-Technologie"

Publikationen

E. C. Schwarz, M. -J. Wolfs, S. Tonner, A. S. Wenning, A. Quintana, D. Griesemer, M. Hoth; TRP Channels in Lymphocytes. Handbook of Experimental Pharmacology 179: 445 (2007)

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

A. Quintana, C. Schwindling, A.S. Wenning, U. Becherer, J. Rettig, E.C. Schwarz, M. Hoth; T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. Proc Natl Acad Sci USA 104 (2007) 14418-14423

M. Thiel, M.-J. Wolfs, S. Bauer, A.S. Wenning, A. Wadle, E.C. Schwarz, A.M. Scott, C. Renner, M. Hoth; B7-2 co stimulation increases T-cell activation and Ca²⁺ entry more efficiently than B7-1 co stimulation. (In Vorbereitung)

Aktivitäten

Sport (Volleyball, Fußball, Wandern)
Chor der Universität, Klavier spielen