

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

**Analyse von steady-state  
Kalziumsignalen  
in humanen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten  
unter möglichst physiologischen  
Bedingungen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin  
der Medizinischen Fakultät

der **Universität des Saarlandes**

**2010**

vorgelegt von:

**Katherina Anne Neblung**

geb. am: **21.4.1981** in Landstuhl



# Inhaltsverzeichnis

|          |                                                                                                            |           |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Zusammenfassung</b>                                                                                     | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>Einleitung</b>                                                                                          | <b>5</b>  |
| 2.1      | Die T-Zell vermittelte Immunität . . . . .                                                                 | 5         |
| 2.2      | Die Immunologische Synapse . . . . .                                                                       | 6         |
| 2.3      | Kalziumabhängige Signaltransduktion in T-Zellen . . . . .                                                  | 7         |
| 2.4      | Aufbau und Aktivierung des CRAC-Kanals . . . . .                                                           | 9         |
| 2.4.1    | STIM1 . . . . .                                                                                            | 9         |
| 2.4.2    | ORAI . . . . .                                                                                             | 11        |
| 2.4.3    | TRPC3 . . . . .                                                                                            | 11        |
| 2.5      | Zielsetzung der Arbeit . . . . .                                                                           | 12        |
| <b>3</b> | <b>Material und Methoden</b>                                                                               | <b>15</b> |
| 3.1      | Substanzen . . . . .                                                                                       | 15        |
| 3.2      | Medien und Puffer . . . . .                                                                                | 16        |
| 3.3      | Antikörper . . . . .                                                                                       | 16        |
| 3.4      | Small interfering RNA's . . . . .                                                                          | 17        |
| 3.5      | Geräte und Software . . . . .                                                                              | 17        |
| 3.6      | Isolation von peripheren mononukleären Zellen aus humanem Vollblut . . . . .                               | 18        |
| 3.7      | Isolation von CD4 <sup>+</sup> -Zellen . . . . .                                                           | 19        |
| 3.8      | Anti-CD4 Färbung der isolierten T-Zellen . . . . .                                                         | 19        |
| 3.9      | Transfektion von CD4 <sup>+</sup> -Zellen . . . . .                                                        | 20        |
| 3.9.1    | siRNA-Technologie . . . . .                                                                                | 20        |
| 3.9.2    | Vorgehen bei der Transfektion . . . . .                                                                    | 21        |
| 3.10     | Stimulation der CD4 <sup>+</sup> -Zellen und Kultivierung unter kalziumlimitierenden Bedingungen . . . . . | 21        |
| 3.11     | Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration in CD4 <sup>+</sup> -Zellen . . . . .                     | 22        |
| 3.11.1   | Allgemeines zu Fura-2/AM . . . . .                                                                         | 22        |
| 3.11.2   | Messung der steady-state Kalziumkonzentration in CD4 <sup>+</sup> -Zellen . . . . .                        | 23        |
| 3.12     | Kalibration der intrazellulären Kalziumkonzentration in CD4 <sup>+</sup> -Zellen . . . . .                 | 24        |
| 3.13     | Bestimmung der freien Kalziumkonzentration in AIM-V <sup>®</sup> -Medium . . . . .                         | 25        |
| 3.14     | Immunfluoreszenz . . . . .                                                                                 | 26        |

|          |                                                                                                                                |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse</b>                                                                                                              | <b>27</b> |
| 4.1      | Bestimmung der Reinheit der CD4 <sup>+</sup> -Zellpopulation . . . . .                                                         | 27        |
| 4.2      | Kalibration der $[Ca^{2+}]_i$ in CD4 <sup>+</sup> -Zellen und der Kalziumkonzentration in AIM-V <sup>®</sup> -Medium . . . . . | 28        |
| 4.3      | Analyse der steady-state $[Ca^{2+}]_i$ in CD4 <sup>+</sup> -Zellen in Abhängigkeit von der $[Ca^{2+}]_e$ . . . . .             | 30        |
| 4.4      | Analyse der Kinetik der intrazellulären Kalziumkonzentration in CD4 <sup>+</sup> -Zellen . . . . .                             | 34        |
| 4.5      | Einfluss von TRPC3 und STIM1 auf die $[Ca^{2+}]_i$ in CD4 <sup>+</sup> -Zellen                                                 | 39        |
| 4.5.1    | Nachweis der Effizienz der Methode in primären CD4 <sup>+</sup> -Zellen mittels STIM1-siRNA . . . . .                          | 39        |
| 4.5.2    | Analyse der Rolle von STIM1 auf die steady-state Kalziumkonzentration in CD4 <sup>+</sup> -Zellen . . . . .                    | 41        |
| 4.5.3    | Analyse der Rolle von TRPC3 auf die steady-state Kalziumkonzentration in CD4 <sup>+</sup> -Zellen . . . . .                    | 45        |
| <b>5</b> | <b>Diskussion</b>                                                                                                              | <b>49</b> |
|          | <b>Literaturverzeichnis</b>                                                                                                    | <b>56</b> |

# Kapitel 1

## Zusammenfassung

In T-Lymphozyten spielt die kalziumabhängige Signaltransduktion nach der Bildung der Immunologischen Synapse für die Aktivierung und Proliferation eine entscheidende Rolle. Da gezeigt wurde, dass die Proliferation der T-Zelle von der extrazellulären Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_e$ ) abhängt, sollte geklärt werden, wie sich das intrazelluläre Kalziumsignal in stimulierten, primären  $CD4^+$ -Zellen im Steady-State in Abhängigkeit von der  $[Ca^{2+}]_e$  verhält. Um möglichst physiologische Bedingungen zu erreichen, wurden die Messungen bei  $37^\circ C$  durchgeführt und die Zellen fokal mit anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Polystyrenmikropartikeln (Beads) stimuliert. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die Abnahme der intrazellulären Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) durch eine Änderung der  $[Ca^{2+}]_e$  quantifiziert. Die Effizienz der fokalen Stimulation wurde durch die deutlich höhere  $[Ca^{2+}]_i$  in Zellen mit Beadkontakt im Vergleich zu Zellen ohne Beadkontakt bestätigt. Eines der Ziele war eine detaillierte Analyse der Kinetik der Kalziumsignale in  $CD4^+$ -Zellen. Diese zeigte transiente Erhöhungen bis hin zu Oszillationen in der  $[Ca^{2+}]_i$ . Häufigkeit und Amplitude der Transienten nahmen mit Reduktion der  $[Ca^{2+}]_e$  ab. Diese Transienten scheinen für die Proliferation der T-Zelle notwendig zu sein.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle von STIM1 und TRPC3 auf die steady-state  $[Ca^{2+}]_i$  in primären  $CD4^+$ -Zellen. Nach der Ausbildung einer Immunologischen Synapse findet ein speichergesteuerter Kalzium-einstrom (SOCE) statt. STIM1 ist ein im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiertes Transmembranprotein, das die Speicherentleerung detektiert und den SOC-Kanal in der Plasmamembran aktiviert. TRPC3 ist ein nichtselektiver Kationenkanal, dessen Expression nach Stimulation der  $CD4^+$ -Zellen hochreguliert wird. Die Aufgabe von TRPC3 in der Kalziumhomöostase in T-Lymphozyten und dessen Aktivierungsmechanismus sind jedoch noch nicht klar. Der Einfluss von STIM1 und TRPC3 auf die steady-state  $[Ca^{2+}]_i$  wurde durch Herunterregulation der Expression mittels RNAi durchgeführt. Um die Effizienz der Methode in primären Zellen nachzuweisen, wurde STIM1 als Positivkontrolle verwendet, da der Einfluss von STIM1 auf den SOCE bereits mehrfach nachgewiesen wurde. Der Nachweis erfolgte auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenz und funktionell durch den Nachweis der Reduktion des Thapsigargin vermittelten SOCE in STIM1-siRNA transfizierten Zellen. Die transfizierten

Zellen wurden ebenfalls fokal mit Beads stimuliert. Die Analyse der  $[Ca^{2+}]_i$  in STIM1- bzw. TRPC3-siRNA transfizierten Zellen zeigte jeweils eine geringere  $[Ca^{2+}]_i$  im Vergleich zur Kontrolle, was auf den Einfluss von STIM1 und TRPC3 auf die Regulation der steady-state  $[Ca^{2+}]_i$  in  $CD4^+$ -Zellen schließen lässt.

## Summary

### Analysis of steady-state calcium signaling in human $CD4^+$ T cells under conditions as physiological as possible

In T cells, calcium signaling following the formation of the immunological synapse is required for the activation and proliferation. It has been shown, that the proliferation of T cells depends on the external calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_e$ ). Therefore the first aim of the thesis was to analyze, how the intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) depends on  $[Ca^{2+}]_e$  in stimulated, primary  $CD4^+$  T cells under steady-state conditions. To mimic physiological conditions as close as possible, experiments were done at  $37^\circ\text{C}$  and T cells were focally stimulated with anti-CD3/anti-CD28-coated beads. By single-cell  $Ca^{2+}$  imaging, I demonstrated that a reduced  $[Ca^{2+}]_e$  leads to a reduction in  $[Ca^{2+}]_i$ .  $[Ca^{2+}]_i$  was higher in T cells with bead contact compared to cells without bead contact during the experiment, indicating the efficiency of bead stimulation. In the following, I analyzed the kinetics of  $[Ca^{2+}]_i$  in more detail. We found, that the number and the amplitude of calcium transients were dependent on the external calcium concentration. The lower the external calcium concentration was, the lower was also the frequency and the amplitudes of calcium transients. We postulate, that these calcium transients are crucial for the proliferation of T cells.

In the second part of the thesis, I investigated the functional role of STIM1 and TRPC3 on resting  $[Ca^{2+}]_i$  in primary human  $CD4^+$  T cells. Calcium influx through plasma membrane store-operated  $Ca^{2+}$  (SOC) channels is an important step in the signaling pathway after the formation of the immunological synapse. In this cascade, STIM1 senses the depletion of  $Ca^{2+}$  from the ER and activates SOC channels. TRPC3 is a non-selective cation channel, which is activated following receptor stimulation. It was shown in our laboratory, that the expression of TRPC3 in primary human  $CD4^+$  T cells is up-regulated following stimulation, but its exact role for  $Ca^{2+}$  entry during resting conditions in T cells as well as the molecular mechanism of TRPC3 activation is not clear at present. Using siRNA technology, STIM1 and TRPC3 were down-regulated to analyze the role of STIM1 and TRPC3 on steady-state  $[Ca^{2+}]_i$ . We used STIM1 as a positive control to prove the efficiency of RNAi in primary T cells. We could confirm the

---

down-regulation of STIM1 on protein level using immunohistochemistry and in  $\text{Ca}^{2+}$  imaging experiments, which revealed a reduction of SOCE following the depletion of stores with thapsigargin. In parallel, we confirmed the reduction of STIM1 mRNA levels by quantitative RT-PCR. We demonstrated, that the steady-state  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in  $\text{CD4}^+$  T cells, which were transfected with either STIM1 or TPRC3 siRNAs, was reduced in comparison to control cells. Therefore, we conclude that STIM1 and TRPC3 play a role in the regulation of steady-state  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in human  $\text{CD4}^+$  T cells.

## *ZUSAMMENFASSUNG*

---

# Kapitel 2

## Einleitung

### 2.1 Die T-Zell vermittelte Immunität

Das Immunsystem verteidigt den Organismus gegen Infektionen. Die angeborene Immunität sorgt für die erste Abwehr des Erregers. Sie ist unspezifisch und besteht aus humoralen Faktoren wie dem Komplementsystem und zellulären Bestandteilen, zum Beispiel Granulozyten und Makrophagen. Die adaptive Immunantwort kann Krankheitserreger spezifisch erkennen und gezielt einen Schutz gegen eine erneute Infektion entwickeln. Zum adaptiven Immunsystem gehören B- und T-Lymphozyten. Sie unterscheiden sich durch ihren Antigenrezeptor und den Ort, an dem sie ausdifferenzieren, B-Zellen im Knochenmark, T-Zellen im Thymus. Naive B- und T-Lymphozyten, die im Knochenmark bzw. Thymus gereift sind, aber noch keinen Kontakt mit einem Antigen hatten, zirkulieren zwischen Blut und peripheren lymphatischen Geweben. Findet eine Infektion statt, proliferieren die Lymphozyten, die den Erreger erkennen, und differenzieren zu Effektorzellen. Die Aktivierung der naiven T-Zelle erfolgt durch eine antigenpräsentierende Zelle (APC). Dazu gehören dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen.

T-Zellen lassen sich entsprechend ihrer membranständigen Korezeptoren in  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Zellen unterteilen. Die zytotoxischen  $CD8^+$  Zellen dienen zur Abtötung von infizierten Zellen. Zu den  $CD4^+$  Helferzellen zählen  $T_H1$ ,  $T_H2$  und  $T_H17$  Zellen.  $T_H1$  Zellen sezernieren Interleukin 2 (IL-2) und Interferon- $\gamma$  und dienen der Aktivierung von Makrophagen, während  $T_H2$  Zellen IL-4 und IL-5 sezernieren und zur Differenzierung von B-Zellen in antikörperproduzierende Plasmazellen beitragen [31].  $T_H17$  Zellen produzieren neben IL-17 weitere Zytokine wie  $TNF\alpha$ , GM-CSF, IL-6 und IL-22. Sie haben eine wesentliche Funktion in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen aus dem Formenkreis der rheumatologischen Gelenkerkrankungen [36].

T-Zellen können zu Gedächtniszellen differenzieren, die bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Erreger eine schnellere und effizientere Abwehr ermöglichen [31]. Für eine kontrollierte Immunantwort ist eine weitere T-Zellpopulation, die so genannten Regulatorischen T-Zellen ( $T_{Reg}$ ), von Bedeutung. Dazu gehören  $Foxp3^+$   $T_{Reg}$ -Zellen, die die Proliferation von autoreaktiven T-Zellen verhindern und dadurch vor Autoimmunerkrankungen schützen [86].

## 2.2 Die Immunologische Synapse

Für die Aktivierung der T-Zelle ist die Bildung einer engen Kontaktstelle zwischen T-Zelle und APC, die so genannte Immunologische Synapse (IS), erforderlich. Durch die Ausbildung der IS findet eine morphologische Veränderung sowie eine Polarisation innerhalb der T-Zelle statt, die den Kontakt zwischen T-Zelle und APC verstärkt und eine effiziente Aktivierung der T-Zelle zur Folge hat [40].

Bei der Bildung der IS kommt es zur Interaktion des T-Zellrezeptors (TCR) mit einem Komplex aus einem Antigen des Pathogens und einem daran gebundenen MHC-Molekül auf der Oberfläche der APC. MHC-Komplex steht für Haupthistokompatibilitätskomplex. Man unterscheidet zwei Klassen von MHC-Molekülen. MHCI wird auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Sie nehmen Proteine auf, die aus dem Zytosol stammen. Bei viralen Infektionen werden im Zytosol virale Proteine synthetisiert, die, an MHCI gebunden, zytotoxischen T-Zellen präsentiert werden. MHCII-Moleküle präsentieren Antigene, die aus intrazellulären Vesikeln stammen. So werden zum Beispiel nach der Phagozytose von Bakterien durch Makrophagen Antigene des Pathogens an MHCII-Moleküle gebunden und T-Helferzellen präsentiert.

Die an MHC-Moleküle gebundenen Antigene interagieren mit dem TCR auf der T-Zelle. Ein TCR besteht aus zwei Polypeptidketten, den TCR- $\alpha$  und TCR- $\beta$ -Ketten, die miteinander über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Der extrazelluläre Teil der Transmembrankette besteht aus jeweils zwei Domänen, einer konstanten und einer variablen Region.

Die variable Region des TCR wird durch eine Gruppe von Gensegmenten kodiert. Durch eine so genannte somatische Rekombination werden die einzelnen Gensegmente auf unterschiedliche Weise zusammengesetzt, sodass eine Vielzahl von verschiedenen Varianten an TCR auf den einzelnen T-Zellen exprimiert wird. Die Diversität des TCR gewährleistet eine Erkennung von möglichst vielen verschiedenen Pathogenen.

Auch MHC-Moleküle zeichnen sich durch ihren Polymorphismus aus, der für die Antigenerkennung durch T-Zellen von wesentlicher Bedeutung ist. Der MHC-Komplex, der für die MHC-Moleküle kodiert, ist polygen und es gibt für jedes Gen mehrere Allele. Eine T-Zelle erkennt nur ein bestimmtes Peptidfragment, das an eine bestimmte allelische Variante eines MHC-Moleküls gebunden ist. Dieses Verhalten der T-Zelle bezeichnet man als MHC-Restriktion.

Neben der Interaktion des an MHC gebundenen Antigens mit dem TCR sind für die Aktivierung der naiven T-Zelle kostimulatorische Moleküle wie CD86 auf der APC notwendig. Diese interagieren mit CD28, einem CD86-Rezeptor auf der T-Zelle [31].

Die Bildung der IS hat einen entscheidenden Einfluss auf die Morphologie der Zelle. Die T-Zelle bildet dabei eine große Kontaktfläche zwischen APC und T-Zelle. Auch im Zellinneren findet eine Polarisation der Zelle auf die IS statt. Mit Hilfe des Zytoskeletts werden T-Zellrezeptoren, CD28 und weitere Adhäsionsmoleküle zur IS rekrutiert und in einer bestimmten Weise auf der Zelloberfläche angeordnet (rev. [40]). In der zentralen Region der IS, dem so genannten cSMAC ("central supramolecular activation clusters"), konzentriert

sich der TCR-CD3-Komplex. Im Bereich außerhalb des cSMAC ordnen sich Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 und das Zytoskelettprotein Talin in einem peripheren Ring (pSMAC) an [54]. In einem dritten, äußersten Ring, dem dSMAC, ist vermehrt CD45 zu finden [21]. Auf die gegenüberliegende Seite der IS werden am DPC ("distal pole complex") Inhibitoren der T-Zellaktivierung transportiert [10]. Der Transport von T-Zellrezeptoren und kostimulatorischen Molekülen zur IS ist notwendig, um eine vollständige T-Zellantwort zu erhalten [30].

Insofern unterscheidet sich die physiologische Stimulation der Zelle mit APC enorm von der unphysiologischen Stimulation mit Thapsigargin (Abschnitt 3.11.2) oder Antikörpern in Lösung, wobei diese Umstrukturierungsprozesse der Zelle nicht in der zuvor beschriebenen Art und Weise ablaufen. Eine Möglichkeit der physiologischen fokalen Stimulation ist die Verwendung von anti-CD3/anti-CD28 antikörperbeschichteten Polystyrenmikropartikeln [76], die auch in dieser Arbeit verwendet wurden. Von unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass eine fokale Stimulation für eine effiziente Proliferation von CD4<sup>+</sup>-Zellen notwendig ist und dass die IL-2 Produktion der Zelle nach Beadstimulation höher ist als nach Stimulation der Zellen mit Phytohämagglutinin (PHA) [76].

## 2.3 Kalziumabhängige Signaltransduktion in T-Zellen

Nach der Bildung der IS und der Aktivierung des TCR findet in der T-Zelle eine kalziumabhängige Signaltransduktion statt, die für die Aktivierung, Zytokinausschüttung und Proliferation der Zelle entscheidend ist (Abb. 2.1). Für die Signalübertragung in das Zellinnere sorgt CD3, ein Molekülkomplex aus drei Untereinheiten ( $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ ), der nicht-kovalent mit dem TCR verbunden ist, sowie einem  $\zeta$ -Homodimer, das intrazellulär an den TCR gebunden ist [31]. Die Kinasen Fyn und Lck phosphorylieren nach der Aktivierung des TCR die ITAMS ("immunorezeptor tyrosine-based activation motifs") der  $\zeta$ -Ketten. Das mit der  $\zeta$ -Kette assoziierte Protein ZAP-70 phosphoryliert daraufhin die Adapterproteine LAT und SLP76. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ). PLC $\gamma$  spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in den second messenger Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG). IP<sub>3</sub> bindet an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor in der Membran des ER. Dadurch kommt es zur Kalziumfreisetzung aus dem ER (rev. in [40]). Die Entleerung des ER führt zur Aktivierung von STIM1, dem Kalziumsensor des ER. STIM1 wiederum aktiviert den ORAI vermittelten speichergesteuerten Kalziumkanal in der Plasmamembran der Zelle [92]. Dieser wird auch als CRAC-Kanal ("Ca<sup>2+</sup> release activated Ca<sup>2+</sup>") bezeichnet [29].

Einströmendes Kalzium führt über eine negative Rückkopplung zur Hemmung des CRAC-Kanals. Dieser Effekt wird durch die Aufnahme des Kalziums in Mitochondrien gemindert. Die Mitochondrien in der Nähe der IS puffern das Kalzium in der Umgebung des CRAC-Kanals ab und entlassen das Kalzium an anderer Stelle in der Zelle. Damit sind Mitochondrien in der Lage, die Effizienz der T-Zellaktivierung zu erhöhen (rev. in [40]).

Daneben pumpen Ca<sup>2+</sup>-ATPasen Kalzium aus dem Zytosol. Auch das Mem-

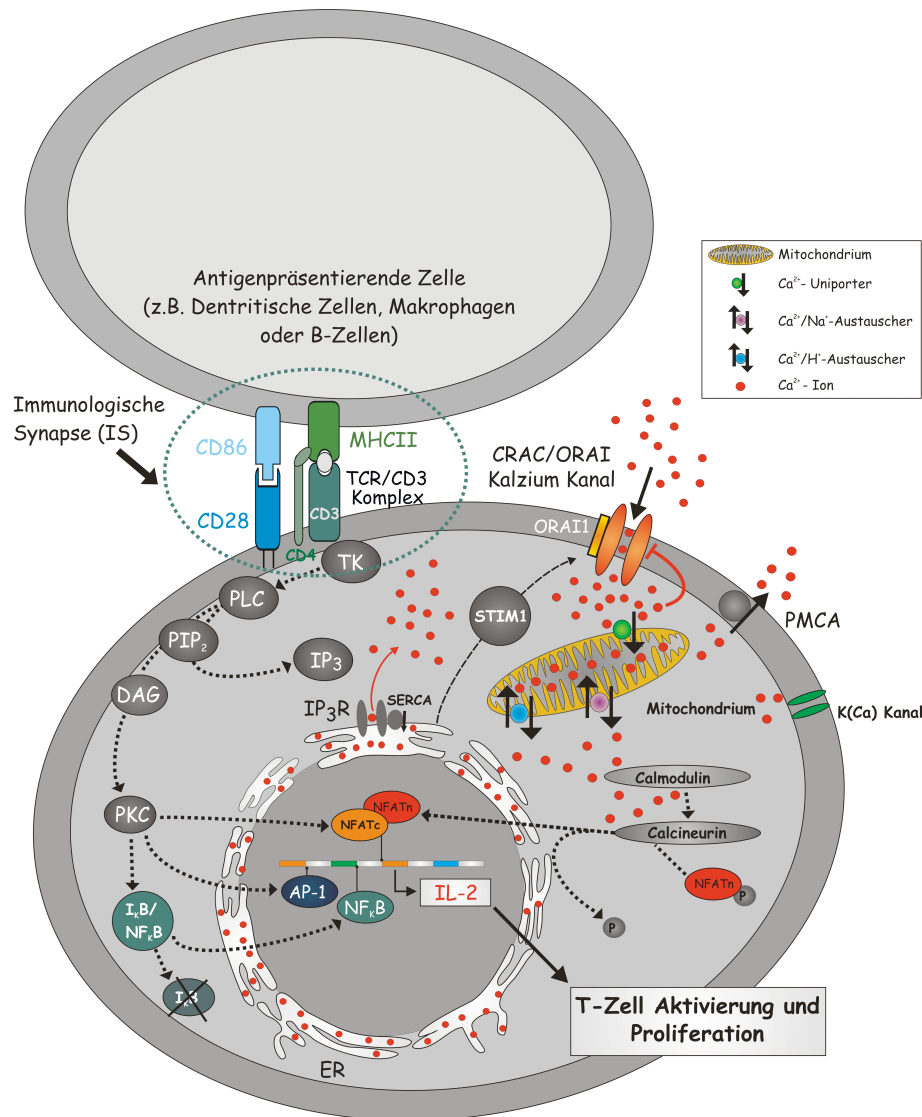


ABBILDUNG 2.1: Kalziumabhängige Signaltransduktion in T-Zellen. Die Immunologische Synapse wird zwischen der Antigenpräsentierenden Zelle und der T-Zelle gebildet. Die Interaktion des Antigen-MHCII-Komplexes mit dem TCR führt über die Aktivierung der PLC zur Freisetzung von IP<sub>3</sub> und DAG. IP<sub>3</sub> setzt Ca<sup>2+</sup> aus dem ER frei. STIM1 ist der Kalziumsensor des ER. Die Entleerung dieses Kalziumspeichers führt zur Aktivierung des CRAC-Kanals durch STIM1. Über den CRAC-Kanal einströmendes Ca<sup>2+</sup> wird von Mitochondrien aufgenommen und an anderer Stelle im Zytosol freigesetzt, um eine Inhibition des CRAC-Kanals durch Ca<sup>2+</sup> zu verhindern. Einströmendes Ca<sup>2+</sup> aktiviert Calceurin, welches NFAT dephosphoryliert. Dephosphoryliertes NFAT gelangt zusammen mit AP-1 und NFκB, die über die PKC aktiviert werden, in den Zellkern. Dadurch wird die Expression von IL-2 gesteigert, was z.B. zur Proliferation der T-Zelle führt. Bei der Aktivierung von NFκB wird IκB im Zytosol abgespalten und abgebaut.

branpotential der Zelle, das durch  $K^+$  und  $Cl^-$ -Kanäle moduliert wird, steuert den Kalziumeinstrom über den CRAC-Kanal, wobei eine Depolarisation der Zelle den Einstrom verringert und eine Hyperpolarisation den Einstrom erhöht (rev. in [40]).

Dieser Kalziumeinstrom, der Minuten bis Stunden andauern kann [40], aktiviert die kalziumabhängige Phosphatase Calcineurin über das kalziumbindende Protein Calmodulin. Calcineurin dephosphoryliert den "nuclear factor of activated T-cells" (NFAT) im Zytosol. Durch die Dephosphorylierung gelangt der NFAT in den Zellkern.

Daneben spielen auch andere kalziumabhängige Transkriptionsfaktoren wie Aktivatorprotein-1 (AP-1) und Nukleofaktor- $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) eine Rolle. Nach der Freisetzung von DAG folgt die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Die PKC spaltet I $\kappa B$  von dem Komplex aus I $\kappa B$ /NF- $\kappa B$  ab. I $\kappa B$  wird im Zytosol abgebaut und NF- $\kappa B$  wandert in den Zellkern [44]. Die Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- $\kappa B$  und NFAT führen zur Transkription von Genen wie IL-2, die für die Proliferation der T-Zelle wichtig sind.

Die Bedeutung der kalziumabhängigen Signaltransduktion zeigt sich dadurch, dass 75% der Gene, die für die Aktivierung der T-Zelle notwendig sind, von dem CRAC vermittelten Kalziumeinstrom abhängen [17] und dass bei einer Störung dieses Signalweges Krankheiten wie Allergien, Rheuma und chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis Ulcerosa oder Morbus Crohn auftreten können. Die Arbeitsgruppe von A. Fischer konnte darüber hinaus zeigen, dass ein Verlust des  $I_{CRAC}$  in T-Zellen bei dem betroffenen Patienten eine "Severe Combined Immunodeficiency" (SCID) hervorruft [42]. 2006 wurden dann von Feske et al. als Ursache für den Immundefekt eine Mutation von ORAI1 beschrieben [19].

## 2.4 Aufbau und Aktivierung des CRAC-Kanals

Der CRAC-Kanal gehört zu den speichergesteuerten Kalziumkanälen ("store operated  $Ca^{2+}$  channels"). Speichergesteuerte Kalziumkanäle (SOC-Kanäle) werden durch ein Absinken der luminalen Kalziumkonzentration im ER aktiviert. Der CRAC-Kanal wurde 1992 als Prototyp speichergesteuerten Kalziumeinstroms (SOCE), auch kapazitiver Kalziumeinstrom genannt, von der Arbeitsgruppe R. Penner zum ersten Mal in Mastzellen beschrieben [28, 29]. Der CRAC-Kanal ist ein kalziumselektiver Kationenkanal. Der  $I_{CRAC}$  ist ein Einwärtsgleichrichter, der nicht spannungsaktiviert ist [29]. Er kommt unter anderem in T-Zellen und Mastzellen vor. Der  $I_{CRAC}$  vermittelte Kalziumeinstrom ist bisher der einzig beschriebene Kalziumeinstrom in T-Zellen, nach deren Aktivierung [18, 43, 51].

### 2.4.1 STIM1

Lange Zeit blieb der molekulare Aufbau des CRAC-Kanals ungeklärt, bis 2005 in einem "high-throughput RNA interference screen" STIM1 als eine Komponente des SOCE identifiziert wurde [46, 71]. STIM1 wurde ursprünglich als Oberflächenprotein in Stromazellen gefunden [62]. STIM Proteine sind hoch

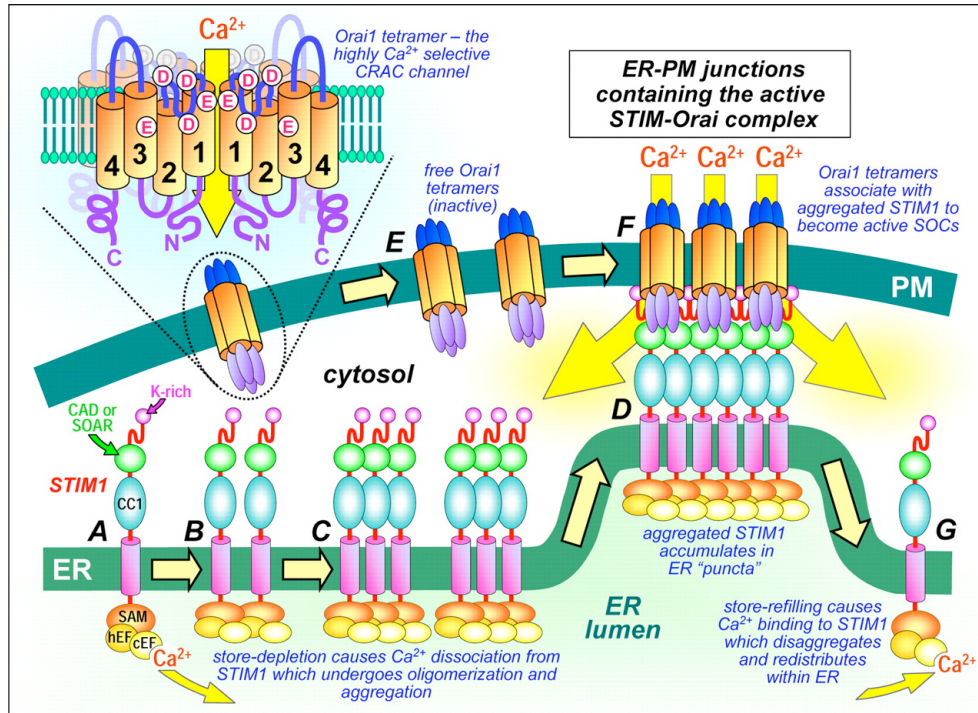


ABBILDUNG 2.2: Aktivierung des CRAC/ORAI-Kanals durch STIM1. Das Absinken der luminalen  $[\text{Ca}^{2+}]$  des ERs führt zur Dissoziation von  $\text{Ca}^{2+}$  von der N-terminalen cEF-Domäne von STIM1 (A), was eine Oligomerisierung von STIM1 über die EF-SAM-Domäne (B) und CC1/SOAR verursacht (C). Die Akkumulation von STIM1 findet in Puncta in der Nähe der Plasmamembran statt, die durch lysinreiche Abschnitte (K-rich) am N-Terminus von STIM1 stabilisiert wird (D). Tetramere ORAI1-Komplexe (E) aggregieren in der Plasmamembran und interagieren mit den CAD/SOAR-Domänen von STIM1, was zum Kalziumeinstrom über CRAC/ORAI führt (F). Steigt die  $[\text{Ca}^{2+}]$  des ERs wieder an, bindet  $\text{Ca}^{2+}$  an die cEF-Domäne und die STIM1-Komplexe lösen sich auf (G) [12].

konserviert und kommen in vielerlei Spezies von *Drosophila* [71] bis *C. elegans* [79] vor. In Vertebraten wird neben STIM1 auch STIM2 exprimiert [85]. STIM1 und STIM2 sind vom Aufbau sehr ähnlich, sie unterscheiden sich nur in der N- und C-terminalen Region. STIM hat eine Transmembrandomäne und ist vorwiegend in der Membran des ER lokalisiert (Abb. 2.2). Es ist in der Lage, das luminalen  $\text{Ca}^{2+}$  des ER mit Hilfe seiner N-terminal gelegenen EF-Hand und SAM-(„sterile alpha motif“) Domänen zu detektieren. STIM1 ist normalerweise in der Membran des ER verteilt. Sinkt jedoch die luminalen Kalziumkonzentration des ER ab, dissoziiert  $\text{Ca}^{2+}$  von STIM1 ab und bildet Oligomere, so genannte „Puncta“ innerhalb der Membran des ER in der Nähe der Plasmamembran [44, 87]. Die Oligomerisierung erfolgt an der C-terminal gelegenen coiled-coil Domäne 1 (CC1) und der CAD/SOAR Domäne (rev. in [12]). Die C-terminale Region von STIM enthält  $\alpha$ -Helices, die eine längere Distanz von bis zu 20 nm zwischen ER und Plasmamembran überbrücken können [44, 92], um den CRAC-Kanal in der Plasmamembran zu aktivieren. STIM1 ist unerlässlich

für die Aktivierung des CRAC-Kanals. STIM2 scheint eher einen hemmenden Einfluss auf den CRAC-Kanal zu haben (rev. in [12]).

### 2.4.2 ORAI

Ein weiterer Meilenstein in der Aufklärung des molekularen Aufbaus des CRAC-Kanals war die Entdeckung der Familie der ORAI Proteine als porenbildende Einheit des CRAC-Kanals. Dies gelang einerseits durch ein RNA interference screening [19, 83, 91] und zum anderen durch die Identifikation einer Mutation in ORAI1. Diese Mutation verursacht bei dem betroffenen Patienten eine "Severe Combined Immunodeficiency" (SCID), die auf den Verlust des  $I_{CRAC}$  in T-Zellen zurückzuführen ist [19]. Die Arbeitsgruppe von A. Rao konnte zeigen, dass bei der Expression des Wildtyp ORAI1-Konstruktes in T-Zellen von SCID Patienten der  $I_{CRAC}$  wieder gemessen werden konnte [19].

Bisher wurden drei ORAI Gene identifiziert (*orai1*, *orai2*, *orai3*). ORAI Proteine sind Transmembranproteine, die in vielen Geweben exprimiert werden [85, 24]. ORAI1 erfüllt alle Kriterien des speichergesteuerten Kalziumeinstroms in T-Zellen [91, 78, 65, 53, 88, 67, 83]. ORAI1, ORAI2 und ORAI3 können mit STIM1 interagieren und weisen jeweils eine CRAC-Kanalaktivität auf. Jedoch unterscheiden sie sich in der Kationenselektivität und Inhibierung durch Kalzium [11, 48]. ORAI1 lagert sich wahrscheinlich zu Tetrameren zusammen, um den CRAC-Kanal zu bilden [64, 33].

Beim Absinken der luminalen Kalziumkonzentration im ER und der Bildung der Puncta in der Membran des ER akkumulieren auch die CRAC/ORAI-Kanäle in unmittelbarer Nähe der Puncta in der Plasmamembran (Abb. 2.2) (rev. in [12]). Durch eine direkte Interaktion von STIM1 mit ORAI1 findet die Aktivierung des CRAC/ORAI-Kanals statt [88]. Dabei bindet die C-terminale CAD/SOAR Domäne von STIM1 an die C-terminale coiled-coil Region des ORAI1-Proteins an. Nachdem die Kalziumspeicher wieder aufgefüllt sind, bindet  $Ca^{2+}$  an die STIM1 EF-SAM-Domäne an. Daraufhin lösen sich die STIM1 Aggregate der Puncta wieder auf, STIM1 zerfällt in Monomere und der CRAC/ORAI-Kanal wird nicht mehr aktiviert (rev. in [12]).

### 2.4.3 TRPC3

Vor der Identifizierung von STIM1 und ORAI1 galten über zehn Jahre Mitglieder der Familie der TRP-Proteine als vielversprechende Kandidaten für den speichergesteuerten Kalziumeinstrom. TRP-Proteine wurden zum ersten Mal in Photorezeptorzellen in *Drosophila* als PLC abhängiger Kationenkanal beschrieben [25].

Der TRP Superfamilie gehören zur Zeit sieben Familien an: TRPC (Canonical), TRPV (Vanilloid), TRPM (Melastatin), TRPML (Mucolipin), TRPP (Polycystin), TRPA (Ancyryn) und TRPN ("no mechanorezeptor potential C") (rev. in [4, 77]). *Trp*-Gene kommen in vielen Spezies vor und sind auch im menschlichen Genom in vielen Geweben exprimiert [8]. Viele TRP-Proteine werden in sensorischen Neuronen exprimiert und sind beteiligt an der Detektion von Licht, Geschmack, Hitze, Schmerz (rev. in [4, 56]).

TRP-Proteine sind Transmembranproteine, die aus sechs Transmembrandomänen aufgebaut sind, wobei die 5. und 6. Transmembrandomäne die porenbildende Einheit formt. Dabei lagern sich jeweils vier TRP-Proteine zu einem Tetramer zusammen, um einen Kanal zu bilden, der für Kationen permeabel ist [63]. Endogen lagern sich wahrscheinlich verschiedene TRP-Proteine zu einem Tetramer zusammen. So bildet TRPC3 in vivo wahrscheinlich zusammen mit anderen TRP-Kanälen einen heteromeren Kationenkanal [27].

Bei der Suche nach der Identität des CRAC-Kanals waren insbesondere TRPC-Proteine im Fokus der Wissenschaft. Aufgrund von Sequenzhomologien wird die TRPC Familie in vier Untergruppen unterteilt: TRPC1; TRPC2; TRPC3, 6 und 7; und TRPC4 und 5, wobei TRPC2 im Menschen nur als Pseudogen vorliegt [77].

Die Rolle von TRPC-Kanälen an der Beteiligung des SOCE wird kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite wurde gezeigt, dass STIM1 mit verschiedenen TRPC interagiert und diese aktivieren kann (rev. in [45]). Dies führte zu der Ansicht, TRPC-Kanäle könnten als SOCE-Kanäle fungieren [90]. Die Gruppe von L. Birnbaumer konnte durch die Koexpression von ORAI1 und TRPC3 bzw. TRPC6 in HEK-Zellen eine Erhöhung des SOCE im Vergleich zu Zellen, die nur mit ORAI1 transfiziert waren, zeigen, was ebenfalls eine Beteiligung von TRPC an dem speichergesteuerten Kalziumeinstrom vermuten lassen kann [49].

Auf der anderen Seite scheint es unwahrscheinlich, dass TRPC-Kanäle den SOC-Kanal selbst bilden [45], insbesondere aufgrund der Tatsache, dass  $I_{CRAC}$  einen hochspezifischen Kalziumkanal darstellt [28] und TRPC-Proteine als unspezifische Kationenkanäle beschrieben sind, die für Natrium, Kalium und Kalzium permeabel sind [4]. So könnte TRPC3 vielmehr an dem nicht-kapazitiven Kalziumeinstrom (NCCE) beteiligt sein, der über eine rezeptorvermittelte Aktivierung von DAG stattfindet [32].

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von TRPC3 auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in stimulierten  $CD4^+$ -Zellen untersucht werden. Die Annahme, dass TRPC3 auf das Kalzium in T-Zellen einen Einfluss haben könnte, basierte auf vorangegangenen Expressionsanalysen in T-Zellen, die im Vorfeld dieser Arbeit von Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. Diese Expressionsanalysen zeigten, dass in humanen primären  $CD4^+$ -Zellen innerhalb der TRPC Familie nur TRPC1 und TRPC3 exprimiert werden. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von TRPC3 nach TCR-vermittelter Aktivierung der  $CD4^+$ -Zellen hochreguliert wird. Weiterhin wurde festgestellt, dass  $CD4^+$ -Zellen, die mit siRNA gegen TRPC3 transfiziert wurden, schlechter proliferieren und eine geringere IL-2 Produktion haben als Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden [58].

## 2.5 Zielsetzung der Arbeit

Der Kalziumeinstrom über den CRAC/ORAI-Kanal ist wichtig für die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Proliferation der Zelle von der extrazellulären Kalziumkonzentration

abhängt. Daraus ergab sich die erste Zielsetzung nachzuweisen, wie die steady-state  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in proliferierenden  $\text{CD4}^+$ -Zellen von der extrazellulären Kalziumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ) abhängt. Die Messbedingungen sollten möglichst den physiologischen Bedingungen entsprechen. Demnach sollten die Zellen fokal stimuliert und die Messungen bei  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt werden.

Kalziumsignale spielen auch bei der Veränderung der Morphologie und der Polarisation der Zelle auf molekularer Ebene, die nach Bildung der IS stattfindet, eine wichtige Rolle. Kalziumsignale sind dabei für die Koordination der Organellen und Moleküle innerhalb der Zelle wichtig [40]. Dabei ist nicht nur das absolute Kalzium entscheidend, sondern die Verteilung auf zellulärer Ebene, die Interaktion mit Kalziumbindeproteinen und die Dauer und Amplitude der Kalziumsignale. So ist beispielsweise die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und  $\text{NF}\kappa\text{B}$  in unterschiedlicher Weise von der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  abhängig.  $\text{NF}\kappa\text{B}$  wird durch kurze und hohe Amplituden im Kalziumeinstrom aktiviert, während NFAT durch einen Kalziumeinstrom aktiviert wird, der eine geringere Amplitude aufweist und länger andauernd ist [13, 43]. Daraus ergab sich das zweite Ziel dieser Arbeit, die Morphologie der Kalziumsignale in Bezug auf Amplitude und Dauer in  $\text{CD4}^+$  fokal stimulierten Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  genauer zu untersuchen.

Eine weiteres Ziel der Arbeit war es, den Einfluss von STIM1 und TRPC3 auf die intrazelluläre steady-state Kalziumkonzentration in humanen fokal stimulierten  $\text{CD4}^+$  Effektorzellen mittels siRNA zu messen. Dabei sollte zunächst anhand von STIM1 gezeigt werden, dass mittels RNAi auch in primären  $\text{CD4}^+$ -Zellen eine Herunterregulation des entsprechenden Proteins möglich ist. Insofern soll diese Arbeit zur Aufklärung der Rolle von TRPC3 auf die Kalziumhomöostase in T-Zellen beitragen.



# Kapitel 3

## Material und Methoden

### 3.1 Substanzen

Alle hier nicht aufgeführten Standardlaborchemikalien wurden von den Firmen Roche, Sigma und VWR in der Qualität "zur Analyse" bezogen.

- BSA (Serumalbumin vom Kalb); Sigma, A-7906
- DMSO (Dimethylsulfoxide); Sigma, D-8418
- Dynabeads® CD3/CD28 T-cell Expander; Invitrogen, 111.31D
- EDTA (Ethyl-Diamin-Tetraacetic Acid); Sigma, E-6758
- EGTA (Ethylenglycol-Tetraessigsäure); Sigma, E4378
- Fetales Kälberserum (FCS); Invitrogen, 10270-106
- Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS; Amersham Biosciences, 17-1440-03
- Fura-2/AM "cell permeant"; Invitrogen, F-1221
- Glycin; Roth, 3908.2
- Hepes; Sigma, H-7523
- Ionomycin; Calbiochem, 407950
- Mag-Fura-2, tetrapotassium salt, "cell impermeant"; Invitrogen, M-1290
- PFA (Paraformaldehyd); Polysciences, 18814; Sigma, F16-35
- Polyornithin; Sigma, P-3655
- Polystyrene Microparticles, Polybeads® polystyrene 6.0 micron Microspheres; Polysciences Europe, 07312
- Thapsigargin; Invitrogen, T-7458
- Triton-X 100; Eurobio, 018774
- TrypanBlue Solution 0,4%; Sigma, T-8154

### 3.2 Medien und Puffer

- AIM-V<sup>®</sup>-Medium; Invitrogen, 12055
- Boratpuffer (0,1 M Borsäure; pH 8,5)
- Einbettmedium, ProLong<sup>®</sup> Antifade Kit; Invitrogen, P-7481
- Erythrozytenlysepuffer (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM EDTA; pH 7,3)
- HBSS; PAA Laboratories GmbH, H15-009
- 0 mM Kalziumlösung (155 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 10 mM Glucose, 5 mM Hepes; pH 7,4)
- 0,25 mM Kalziumlösung (155 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 2,75 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucose, 5 mM Hepes; pH 7,4)
- 0,5 mM Kalziumlösung (155 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucose, 5 mM Hepes; pH 7,4)
- 1 mM Kalziumlösung (155 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucose, 5 mM Hepes; pH 7,4)
- 20 mM Kalziumlösung (115 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucose, 5 mM Hepes; pH 7,4)
- Nucleofector Solution; Lonza, VPA-1002
- PBS; Invitrogen, 14190-094
- Lagerpuffer (0,1 M Phosphatpuffer, 15 mM NaCl, 1% BSA, 5% Glycerol, 0,1% NaN<sub>3</sub>; pH 7,4)

### 3.3 Antikörper

- Maus anti-human CD3 Antikörper; Serotec, MCA463XZ
- Maus anti-human CD28 Antikörper; BD Pharmingen<sup>TM</sup>, 555725
- anti-GAM IgG Antikörper EM-15 nm; Aurion, 815.022
- Maus anti-human STIM1 Antikörper; BD Pharmingen<sup>TM</sup>, 610954
- anti-Maus IgG Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Antikörper; Invitrogen, A-11001
- Maus anti-human CD4-R-PE Antikörper (R-Phycoerythrin); Dako, Klon MT310, R0805

TABELLE 3.1: Sequenzen der siRNAs

| Name<br>(accession number) | Zielgen | Sense und Anti-Sense                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----------------------------|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| STIM1-siRNA<br>(NM_003156) | STIM1   | 5'GGU GGU GUC UAU CGU UAU UUU3'<br>5'AAU AAC GAU AGA CAC CAC CUU3'<br><br>5'UAC AGU GGC UGA UCA CAU AUU3'<br>5'UAU GUG AUC AGC CAC UGU AUU3'<br><br>5'CAA UUA CCA UGA CCC AAC AUU3'<br>5'UGU UGG GUC AUG GUA AUU GUU3'<br><br>5'UCU CUU GAC UCG CCA UAA UUU3'<br>5'AUU AUG GCG AGU CAA GAG AUU3' |
| TRPC3-siRNA<br>(NM_003305) | TRPC3   | 5' CGU UGU GCU CAA AUA UGA UdT dT 3'<br>5' AUC AUA UUU GAG CAC AAC GdG dA 3'                                                                                                                                                                                                                     |
| Kontroll-siRNA             | /       | 5' UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdT dT 3'<br>5' ACG UGA CAC GUU CGG AGA AdT dT 3'                                                                                                                                                                                                                     |

### 3.4 Small interfering RNA's

- STIM1-siRNA, siGenome on-TARGETplus SMARTpool duplex; Dharmacon, J-0011785
- TRPC3-siRNA, 2-For-Silencing 1; Qiagen, 2FS\_1222767\_A
- Kontroll-siRNA (non-silencing-siRNA); Qiagen, 1022076

Die Sequenzen der verwendeten siRNAs sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Die siRNA gegen STIM1 setzt sich aus einem Pool aus vier verschiedenen siRNAs zusammen, die gegen unterschiedliche Sequenzen innerhalb der STIM1-mRNA gerichtet sind. Die Kontroll-siRNA (non-silencing) hat kein Zielgen im menschlichen Genom.

### 3.5 Geräte und Software

#### Geräte:

- Elektroporator Nucleofector<sup>TM</sup>II; Lonza
- Überkopfschüttler Reax 2; Heidolph
- Zentrifugen
  - Zentrifuge 30 F; Hettich

TABELLE 3.2: Filtersysteme

| Fluorochrom                  | Filter-nummer | Anregung [nm] | Anregungs-filter | Dichroischer Spiegel | Emissions-filter |
|------------------------------|---------------|---------------|------------------|----------------------|------------------|
| R-PE                         | F41-007       | 550           | HQ 545/30        | Q 570 LP             | HQ 610/75        |
| Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 | F41-017       | 470           | HQ 470/40        | Q 495 LP             | HQ 525/50        |
| Fura-2/AM                    |               | 340, 380      | SP 410           | DLCP 410             | LP 440           |

- Universal 32 R; Hettich
- Centrifuge 5415 C; Eppendorf
- Centrifuge 5415 R; Eppendorf
- Mikroskope
  - Olympus CK 30
  - Olympus IX 70

Die für die Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Filter von der Firma AHF-Analysetechnik sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

**Software:**

- Microsoft Excel
- TILL Photonics Vision
- Wavemetrics Igor Pro

### 3.6 Isolation von peripheren mononukleären Zellen aus humanem Vollblut

Für die Isolation der peripheren mononukleären Zellen (PBMC) aus humanem Vollblut wurden Leukozyten-Depletionsfilter verwendet, die freundlicherweise von der Blutbank der Hämostasiologie und Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Homburg zur Verfügung gestellt wurden. Im ersten Schritt wurden die Filter mit jeweils 60-65 ml HBSS entgegen der ursprünglichen Laufrichtung des Blutes gespült, um auf diese Weise die Zellen von den Filtern zu lösen. Anschließend wurden die Leukozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Da diese Dichtegradientenzentrifugation nur bei Raumtemperatur funktioniert, wurden alle Schritte der Isolation der PBMCs bei Raumtemperatur durchgeführt, um die Zellen möglichst wenig zu stimulieren. Dazu wurden zunächst 50 ml Leucosep-Röhrchen (Greiner) mit 16 ml Ficoll beladen und bei 1000 g 30 s zentrifugiert, um das Ficoll unter den Filter im Leucosep-Röhrchen zu bringen. Danach wurden die Leucosep-Röhrchen mit 30-35 ml des Blutes aus den Filtern beladen und bei 450 g 30 Minuten zentrifugiert. Der Leukozytenring

wurde abgenommen, in ein 50 ml Falconröhrchen überführt, auf 50 ml mit HBSS aufgefüllt und erneut bei 250 g für zehn Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert. Nach einer Minute wurde die Zellsuspension auf 50 ml mit HBSS aufgefüllt, um die Lyse zu stoppen. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 200 g für zehn Minuten verbleibt ein Großteil der Thrombozyten im Überstand. Das Pellet wurde in 20 ml PBS/0,5% BSA aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Vitalität der Zellen wurde mit Hilfe von TrypanBlue bestimmt.

## 3.7 Isolation von CD4<sup>+</sup>-Zellen

Die Aufreinigung der CD4<sup>+</sup>-Zellen wurde nach dem Prinzip der „Negativen Isolation“ durchgeführt. Dazu wurde ein Kit der Firma Dynal (113.17D) verwendet. Der Kit beinhaltet magnetische Polystyrenmikropartikel so genannte Dynabeads®, die mit verschiedenen Antikörpern beschichtet sind. Negative Isolation bedeutet dabei, dass diese Antikörper alle Zellpopulationen der PBMCs binden, mit Ausnahme der CD4<sup>+</sup>-Zellen. So können alle nicht CD4<sup>+</sup>-Zellen mit Hilfe eines Magneten entfernt werden, ohne dass die CD4<sup>+</sup>-Zellen selbst in irgendeiner Weise stimuliert werden.

Alle folgenden Volumenangaben beziehen sich auf ein Startmaterial von  $1 \times 10^8$  PBMCs. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zunächst wurden die Beads gewaschen. Dazu wurden die Beads mit 2 ml PBS/0,5% BSA versetzt, in den Magneten gestellt, der Überstand abgenommen und die Beads erneut in 1 ml PBS/0,5% BSA aufgenommen.

$1 \times 10^8$  PBMCs wurden in 1 ml PBS/0,5% BSA aufgenommen und mit 200  $\mu$ l FCS und 200  $\mu$ l Antikörpermix 20 Minuten auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden 5 ml PBS/0,5% BSA zugegeben, resuspendiert und acht Minuten bei 4°C und 300 g zentrifugiert. Das Pellet wurde danach in 9 ml PBS/0,5% BSA aufgenommen, mit 1 ml gewaschenen Beads versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz auf zwei 15 ml Falconröhrchen verteilt und jeweils 5 ml PBS/0,5% BSA zugegeben. Nach zweiminütiger Inkubationszeit im Magneten wurde der Überstand, der die CD4<sup>+</sup>-Zellen enthält, in ein neues Falconröhrchen überführt und erneut im Magneten für zwei Minuten inkubiert, um die Beads mit den PBMCs möglichst vollständig zu entfernen.

Zum Schluss wurden die Zellen gezählt und für die Transfektion auf Eis gelagert oder in AIM-V®-Medium mit 10% FCS in einer Dichte von  $3 \times 10^6$  Zellen pro ml aufgenommen und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

## 3.8 Anti-CD4 Färbung der isolierten T-Zellen

Um die Reinheit der Isolationsmethode zu überprüfen, wurde nach der Aufreinigung der Anteil der CD4<sup>+</sup>-Zellen mit Hilfe einer Antikörperfärbung bestimmt. Als erstes wurden  $5 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup>-Zellen zehn Minuten bei 250 g zentrifugiert und das Pellet in 45  $\mu$ l PBS/0,5% BSA aufgenommen. Nach Zugabe von 5  $\mu$ l

einer 1:10 Verdünnung eines R-PE markiertem anti-CD4 Antikörpers wurde die Probe 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 20  $\mu$ l der Zellen auf ein mit Polyornithin (0,1 mg/ml) beschichtetes Deckgläschen (Durchmesser 25 mm, Stärke 1, Kindler) gegeben. Die Zellen mussten zehn Minuten auf dem Deckgläschen absitzen. Mit Hilfe des Polyornithins haften die Zellen auf dem Deckgläschen. Als nächstes wurde das Deckgläschen in eine selbstgebaute Messkammer aus Plexiglas eingebaut und die Zellen mit einem zweiten Deckglas abgedeckt. Zum Abdichten der Kammer wurde Silikonfett (Bayer) verwendet. An der Messkammer befinden sich zwei Öffnungen, an denen Schläuche für einen Zu- und Abfluss angebracht werden. Dadurch wird ein kompletter Lösungswechsel der Zellen innerhalb von weniger als einer Sekunde auch während eines Experimentes ermöglicht. Um übereinander liegende und nicht haftende Zellen zu entfernen, wurde die Kammer zunächst mit einer 1 mM Kalziumlösung (Abschnitt 3.2) durchgespült. An einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX 70) mit einem 20 $\times$  Objektiv (UplanApo/340, Numerische Apparatur (N.A.) = 0,75) wurde ein Durchlichtbild mit einer Belichtungszeit von 10 ms aufgenommen. Dann wurde von dem gleichen Bildausschnitt ein Fluoreszenzbild mit einem für den verwendeten R-PE markiertem anti-CD4 Antikörper geeigneten Filter (Tabelle 3.2) mit einer Belichtungszeit von 1000 ms und einer Anregungswellenlänge von 550 nm (Polychrom V Monochromator, Till Photonics) aufgenommen (CCD Kamera, TILL Imago). Die Analyse der Daten erfolgte mit der TILL Vision Software. Der Anteil der CD4<sup>+</sup>-Zellen konnte anhand der Anzahl der anti-CD4 Antikörper-gefärbten Zellen im Vergleich zu den nicht gefärbten Zellen, die ausschließlich in der Durchlichtaufnahme zu sehen waren, berechnet werden.

### 3.9 Transfektion von CD4<sup>+</sup>-Zellen

Die zuvor aufgereinigten CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden mit TRPC3-, STIM1- und Kontroll-siRNA transfiziert. Die Transfektion wurde mittels Nukleofektion durchgeführt. Bei diesem Verfahren erzeugt ein elektrisches Feld kurzzeitig Poren in der Plasmamembran der behandelten Zellen. Dadurch kann DNA oder in diesem Fall siRNA in die Zelle aufgenommen werden.

#### 3.9.1 siRNA-Technologie

Die Arbeitsgruppe von A. Fire und C. Mello hat gezeigt, dass doppelsträngige RNA Moleküle die Expression von homologen Genen in eukaryontischen Zellen inhibieren können [20]. Dieser Mechanismus spielt in vivo sowohl eine Rolle bei der posttranskriptionellen Genregulation als auch bei der Abwehr von Viren. Auf der Basis dieses Mechanismus hat sich die Methode der Inhibition der Translation von Proteinen mittels siRNA als Standard in der Molekularbiologie etabliert. Si-RNA steht für "small interfering RNA". Eine siRNA besteht aus einer doppelsträngigen RNA aus 21 Nukleotiden, wobei der Antisensestrang komplementär zur Ziel-mRNA sein muss. Die siRNA wird mittels Transfektion in die Zelle gebracht. Im Zytosol wird die siRNA mit Hilfe des RISC-Komplexes

### 3.10. STIMULATION DER CD4<sup>+</sup>-ZELLEN UND KULTIVIERUNG UNTER KALZIUMLIMITIERENDEN BEDINGUNGEN

---

(„RNA-induced silencing complex“) an die komplementäre Ziel-mRNA gebunden. Daraufhin wird die mRNA abgebaut und damit die Translation des von der mRNA kodierten Proteins verhindert (rev. in [41]).

#### 3.9.2 Vorgehen bei der Transfektion

Die Transfektion wurde nach dem Herstellerprotokoll von Lonza durchgeführt. Pro Transfektion wurden  $5 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup>-Zellen eingesetzt. Zunächst wurden die Zellen bei 200 g zehn Minuten zentrifugiert und das Zellpellet in 100  $\mu$ l Nucleofector Solution (RT) aufgenommen. Im nächsten Schritt wurden jeweils 3  $\mu$ l (Stock 20  $\mu$ M) siRNA zugegeben. Die gesamte Probe wurde in eine Elektroporationsküvette überführt und in dem Nucleofectorgerät mit dem Programm U-14 elektroporiert. Im Anschluss wurden 500  $\mu$ l AIM-V<sup>®</sup>-Medium (37°C) zugefügt. Mit speziellen Plastikpipetten (Lonza) wurden die Zellen danach in ein Well einer 24-Wellplatte überführt, in das zuvor 1 ml vorgewärmtes AIM-V<sup>®</sup>-Medium vorgelegt wurde. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Am folgenden Tag wurden die Zellen zehn Minuten bei 100 g zentrifugiert, gezählt und in frischem AIM-V<sup>®</sup>-Medium in einer Konzentration von  $3 \times 10^6$  Zellen pro ml aufgenommen und für weitere drei Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

### 3.10 Stimulation der CD4<sup>+</sup>-Zellen und Kultivierung unter kalziumlimitierenden Bedingungen

Zur Stimulation der T-Zellen wurden zunächst Polystyrenmikropartikel (Beads) der Firma Polysciences verwendet, die mit azidfreien anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern beschichtet wurden.

Die Beschichtung der Polystyrenmikropartikel von Polysciences erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Im ersten Schritt wurde 100  $\mu$ l Beadsuspension mit 900  $\mu$ l Boratpuffer resuspendiert und bei 800 g fünf Minuten zentrifugiert. Die Beads wurden im Anschluss noch zweimal mit je 1 ml Boratpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Beads in 450  $\mu$ l Boratpuffer aufgenommen und 12,5  $\mu$ l anti-CD3 und 37,5  $\mu$ l anti-CD28 Antikörper zugefügt. Danach folgte die Inkubation der Beads über Nacht auf einem Überkopfschüttler. Am darauf folgenden Tag wurden die Beads zuerst bei 800 g zehn Minuten zentrifugiert, in 500  $\mu$ l Boratpuffer mit 10 mg/ml BSA aufgenommen und 30 Minuten auf dem Überkopfschüttler rotiert. Die Beads wurden noch weitere zweimal mit BSA/Boratpuffer gewaschen und schließlich in 500  $\mu$ l Lagerpuffer aufgenommen und bei 4°C aufbewahrt. Vor der Verwendung wurden die Beads gezählt und zweimal in AIM-V<sup>®</sup>-Medium gewaschen.

Mit dem Beginn der experimentellen Arbeiten wurde vom Hersteller Polysciences eine neue Charge der Beads angeboten, bei der die Oberfläche der Beads geändert wurde, so dass die Antikörperbeschichtung nicht mehr effizient funktionierte. Aus diesem Grund wurden nach wenigen Experimenten Beads

der Firma Invitrogen verwendet, die bereits mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichtet waren. Diese wurden vor der Verwendung nach Anleitung des Herstellers gewaschen. Dafür wurde das gewünschte Beadvolumen in 1 ml PBS/0,5% BSA aufgenommen und resuspendiert. Dann wurde der Ansatz in den Magneten gestellt, der Überstand verworfen und die Beads in 1 ml AIM-V®-Medium gewaschen. Nach erneuter Inkubation der Beads in dem Magneten wurde der Überstand entfernt und die Beads in 1 ml AIM-V®-Medium aufgenommen.

Um den Einfluss der  $[Ca^{2+}]_e$  auf die  $[Ca^{2+}]_i$  messen zu können, wurden die CD4<sup>+</sup>-Zellen in AIM-V®-Medium inkubiert, das durch den Zusatz des Kalziumchelators EGTA in verschiedenen Konzentrationen die kalziumlimitierenden Bedingungen im Medium herstellt. Untersucht wurden primäre nicht transfiizierte CD4<sup>+</sup>-Zellen und die TRPC3-, STIM1- und Kontroll-siRNA transfizierten CD4<sup>+</sup>-Zellen. Zunächst wurden 96-Wellplatten vorbereitet, in denen die CD4<sup>+</sup>-Zellen kultiviert werden sollten. Dazu wurde AIM-V®-Medium mit unterschiedlichen Konzentration von EGTA (0; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0; 2,1; 2,2; 2,4; 2,6) hergestellt und entsprechend 100 µl pro Well vorgelegt. Die Wellplatten wurden 1 Stunde bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Zellzahl der jeweiligen CD4<sup>+</sup>-Zellen bestimmt und das für eine Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml benötigte AIM-V®-Medium zugegeben. Anschließend wurden Beads im Verhältnis 1 : 1 zu den CD4<sup>+</sup>-Zellen zugegeben. Danach wurden die Zellen auf die vorinkubierten 96-Wellplatten verteilt. Pro Well wurden 50 000 Zellen mit Beads in 100 µl AIM-V®-Medium zugegeben. Auf diese Weise wurden EGTA-Endkonzentrationen von 0; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,05; 1,1; 1,2; 1,3 und eine Endkonzentration der Zellen von  $2,5 \times 10^5$ /ml hergestellt. Als Kontrolle wurden CD4<sup>+</sup>-Zellen ohne Beads in AIM-V®-Medium ohne den Zusatz von EGTA unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Alle Zellen wurden für zwei bzw. drei Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

### 3.11 Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration in CD4<sup>+</sup>-Zellen

Die  $[Ca^{2+}]_i$  wurde zwei bzw. drei Tage nach Stimulationsbeginn mit Hilfe der Kalzium-Imaging Methode mit dem Fluoreszenz-Indikatorfarbstoff Fura-2/AM gemessen.

#### 3.11.1 Allgemeines zu Fura-2/AM

Fura-2/AM ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der es ermöglicht, die freie intrazelluläre Kalziumkonzentration in lebenden Zellen zu messen. Die Eigenschaften und die Einsatzmöglichkeit des Farbstoffs wurden 1985 von der Arbeitsgruppe von R. Tsien publiziert [23]. Um die Aufnahme von Fura-2 in die Zelle zu ermöglichen, verwendet man den Azetomethylester (AM). Die Estergruppe wird im Zytosol abgespalten und verhindert so die schnelle Rückdiffusion in das Extrazellulärmedium [34].

Die Bindung von Kalzium an Fura-2 beeinflusst dessen optische Eigenschaften insofern, als das Absorptionsmaximum von Fura-2 zu kürzeren Anregungswellenlängen hin verschoben wird. Fura-2 hat ein Maximum der Emissionsintensität der kalziumfreien Fura-2 Form bei 380 nm und eines der kalziumgesättigten Form bei 340 nm. Bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm erhöht sich bei zunehmender Kalziumkonzentration die Fluoreszenzintensität, während bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm die Fluoreszenzintensität mit zunehmender Kalziumkonzentration abnimmt. Durch die Bildung des Verhältnisses aus der Emissionsintensität bei 340 nm durch die Emissionsintensität bei 380 nm werden Störgrößen, wie ungleichmäßige Verteilung und Ausbleichen des Farbstoffs, eliminiert [23].

### 3.11.2 Messung der steady-state Kalziumkonzentration in CD4<sup>+</sup>-Zellen

Für die Experimente zur Bestimmung der steady-state Kalziumkonzentration in CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden für die Beladung der CD4<sup>+</sup>-Zellen mit Fura und während des kompletten Experimentes jeweils die gleichen Medien benutzt, in denen die Zellen auch inkubiert wurden, das heißt in AIM-V®-Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen von EGTA. Die Experimente wurden bei 37°C durchgeführt und alle verwendeten Medien auf 37°C vorgewärmt. Zu Beginn wurde 500 µl AIM-V®-Medium mit 1 µl Fura-2/AM (gelöst in DMSO, Stock 1 mM) versetzt und für 20 Sekunden mit einem Vortexer gemischt. Danach wurden 1000 µl Zellen an Tag 2 und 600 µl Zellen an Tag 3 zentrifugiert und in der vorbereiteten Furalösung resuspendiert. Die Zellen wurden 20 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert, einmal in AIM-V®-Medium gewaschen und danach in 30 µl AIM-V®-Medium aufgenommen. 10 µl der Zellen wurden auf einem mit Polyornithin (0,1 mg/ml) beschichteten Deckglas (Durchmesser 25 mm, Stärke 1, Kindler) für zehn Minuten bei 37°C absitzen gelassen. Das Deckglas wurde, wie unter Punkt 3.8 beschrieben, in die Messkammer eingebaut. Nicht fixierte Zellen wurden zunächst mit AIM-V®-Medium weggespült. Als Mikroskop wurde ein Olympus IX 70 mit einem 20× Objektiv (UplanApo/340, N.A. = 0,75) in einer temperaturkontrollierten Inkubationskammer (Olympus) verwendet. Dann wurde die Messung gestartet. Alternierend wurde mit einer Wellenlänge von 340 nm und 380 nm für jeweils zehn ms belichtet (Polychrome V Monochromator, TILL Photonics). Die kalziumabhängige Emission bei 520 nm wurde mit einer CCD Kamera (TILL Imago) aufgenommen. Für die Messung des Ruhekalziums in CD4<sup>+</sup>-Zellen wurde über einen Zeitraum von zehn Minuten gemessen.

Zur Bestimmung der Kalziumkonzentration in STIM1-siRNA transfizierten Zellen nach Stimulation mit Thapsigargin wurden transfizierte CD4<sup>+</sup>-Zellen zwei Tage nach Stimulation mit antiCD3/CD28 beschichteten Beads eingesetzt. Als Kontrolle dienten die mit non-silencing-siRNA transfizierten CD4<sup>+</sup>-Zellen (Abschnitt 3.9). Vor dem Start des Experiments wurden die Zellen mit einer 0,5 mM Kalziumlösung gespült. Nach 100 s wurde ein Lösungswechsel mit einer kalziumfreien Ringerlösung durchgeführt, der 1 µM Thapsigargin zugegeben wurde. Thapsigargin blockiert die Kalzium ATPasen im Sakro- und Endoplas-

matischen Retikulum (SERCA) und führt so zum schnellen Kalziumeinstrom aus intrazellulären Speichern [73]. Nach weiteren 600 s wurde die Kammer mit einer 0,25 mM Kalziumlösung, der ebenfalls 1  $\mu$ M Thapsigargin zugesetzt war, durchgespült. Der nächste Lösungswechsel erfolgte nach weiteren 500 s mit 1  $\mu$ M Thapsigargin in kalziumfreier Ringerlösung. Die Messung dauerte insgesamt 1350 s. Die genaue Zusammensetzung der jeweiligen Kalziumlösungen ist in Abschnitt 3.2 aufgeführt.

Während der Messungen wurden jeweils alle 5 s ein Fluoreszenzbild und ein Infrarot-Bild aufgenommen. Um die Hintergrundfluoreszenz bestimmen zu können, wurde ein Bildausschnitt ohne Zellen für zehn ms mit 340 und 380 nm belichtet und jeweils ein Bild aufgenommen. Die Analyse der Daten erfolgte mit der TILL Vision und Igor Pro Software.

Die mittlere steady-state Ratio 340/380 bzw. die mittlere steady-state  $[Ca^{2+}]_i$  in Abhängigkeit von der EGTA Konzentration in AIM-V<sup>®</sup>-Medium bzw. der  $[Ca^{2+}]_e$  erfolgte nach der Hill Gleichung:

$$[Ca^{2+}]_i = [Ca^{2+}]_{i\max} + ([Ca^{2+}]_{i\min} - [Ca^{2+}]_{i\max}) \cdot \frac{1}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{[Ca^{2+}]_o}\right)^r} \quad (3.1)$$

wobei  $[Ca^{2+}]_{i\max}$  für die maximale  $[Ca^{2+}]_i$  steht, die in CD4<sup>+</sup>-Zellen gemessen wurde, die in AIM-V<sup>®</sup>-Medium ohne EGTA kultiviert wurden.  $[Ca^{2+}]_{i\min}$  steht für die minimale  $[Ca^{2+}]_i$ , die in CD4<sup>+</sup>-Zellen ermittelt wurde, die in AIM-V<sup>®</sup>-Medium mit hoher EGTA Konzentration (1,1 mM bis 1,3 mM EGTA in AIM-V<sup>®</sup>-Medium) bzw. geringer extrazellulärer Kalziumkonzentration kultiviert wurden. Der  $IC_{50}$ -Wert ist die  $[Ca^{2+}]_i$ , bei der 50% der  $[Ca^{2+}]_{i\max}$  gemessen wird. Der Hill-Koeffizient  $r$  ist ein Maß für die Steigung der Funktion. Die statistische Analyse erfolgte mit dem U-Test.

### 3.12 Kalibration der intrazellulären Kalziumkonzentration in CD4<sup>+</sup>-Zellen

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) kann mit Hilfe der Gleichung

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \cdot \beta \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) \quad (3.2)$$

[23] ermittelt werden.  $R$  steht für die Ratio 340/380.  $K_d$  ist die effektive Dissoziationskonstante von Fura-2/AM. Als  $K_d$  von Fura-2 wurde 266 nM eingesetzt [82].  $R_{\min}$  ist der minimalste Wert, den  $R$  unter kalziumfreien Messbedingungen annehmen kann und  $R_{\max}$  steht für die maximale Ratio, die bei einer intrazellulär maximalen Kalziumlösung gemessen werden kann.  $\beta$  berechnet sich aus der Fluoreszenz bei 380 nm in kalziumfreier Lösung ( $S_{f2}$ ) dividiert durch die Fluoreszenz bei 380 nm unter gesättigten Kalziumbedingungen ( $S_{b2}$ ) [23]. Die vier Kalibrationskonstanten  $K_d$ ,  $\beta$ ,  $R_{\min}$  und  $R_{\max}$  sind abhängig von den optischen Eigenschaften der Lichtquelle, des dichroischen Spiegels und dem Anregungs- und Emissionsfilter [35]. Diese Kalibrationskonstanten wurden experimentell bestimmt. Dazu wurden stimulierte und unstimulierte CD4<sup>+</sup>-Zellen verwendet und die gemessenen Werte beider Zellarten im Anschluss gemittelt.

Zur Stimulation der Zellen wurden Dynabeads® verwendet. Dies erfolgte nach oben beschriebener Anleitung (3.10). Die Zellen wurden zwei Tage nach Stimulation, die unstimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen sechs Tage nach der Isolation mittels Kalzium-Imaging (Abschnitt 3.11.2) gemessen. Zur Bestimmung von  $R_{min}$  und  $S_{f2}$  wurden die Zellen vor dem Start des Experimentes mit einer kalziumfreien Ringerlösung (0 mM Kalziumlösung) gespült. 100 s nach dem Start des Experiments wurde die Kammer mit einer kalziumfreien Ringerlösung mit 1  $\mu$ M Thapsigargin und 5  $\mu$ M Ionomycin durchgespült. Ionomycin ist ein Kalziumionophor, das sich in der Zytoplasmamembran und in Membranen von Organellen einlagert und zum Einstrom von Kalzium in das Zytoplasma führt [69]. Nach 500 s wurde die Spülung der Zellen mit kalziumfreier Ringerlösung mit 1  $\mu$ M Thapsigargin und 5  $\mu$ M Ionomycin wiederholt.  $R_{min}$  und  $S_{f2}$  wurde jeweils aus den Mittelwerten der Ratio 340/380 bzw. der Fluoreszenz bei 380 nm bestimmt, die zwischen 570 s und 700 s nach Beginn des Experiments gemessen wurden.  $R_{max}$  und  $S_{b2}$  wurden in einem weiteren Experiment mit "frischen" CD4<sup>+</sup>-Zellen gemessen. Zu Beginn des Experiments wurden die Zellen mit einer 0,5 mM Kalziumlösung gespült. Nach 25 s wurde ein Lösungswechsel mit einer 20 mM Kalziumlösung durchgeführt. Die jeweiligen Mittelwerte, die zwischen 475 s und 625 s nach Beginn des Experiments gemessen wurden, dienten der Bestimmung von  $R_{max}$  und  $S_{b2}$ . Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Kalziumlösungen ist in Abschnitt 3.2 aufgeführt.

### 3.13 Bestimmung der freien Kalziumkonzentration in AIM-V®-Medium

Die Bestimmung der Kalziumkonzentration in AIM-V®-Medium ( $[Ca^{2+}]_o$ ) wurde mit Mag-Fura-2 (gelöst in H<sub>2</sub>O, 10 mM Stock) durchgeführt. Die Fluoreszenzeigenschaften von Mag-Fura-2 stimmen im Wesentlichen mit denen von Fura-2 überein. Das verwendete Mag-Fura-2 hat aber im Gegensatz zu Fura-2 einen höheren  $K_d$ -Wert. Der  $K_d$  von Mag-Fura liegt bei 25  $\mu$ M [34], der von Fura-2 bei 266 nM [82].

Für die Kalibration wurde eine 0 mM Kalziumlösung (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,4, 5  $\mu$ M Mag-Fura-2) und eine 4 mM Kalziumlösung (4 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,4, 5  $\mu$ M Mag-Fura-2) hergestellt. Durch das Mischen entsprechender Volumina von diesen Lösungen wurden verschiedene Kalziumlösungen zwischen 0 und 4 mM hergestellt, die zur Bestimmung einer Eichkurve dienten. Die Messung der Fluoreszenzemission wurde, wie in Abschnitt 3.11.2 beschrieben, durchgeführt. Um die minimale Ratio ( $R_{min}$ ) zu bestimmen, die mit einer Lösung ohne Kalzium gemessen werden kann, wurde eine Lösung mit 1 mM EGTA (0 Ca<sup>2+</sup>), 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,4 und 5  $\mu$ M Mag-Fura-2 verwendet. Dann wurde von jeder Kalziumlösung (0 bis 4 mM) die Ratio 340/380 bestimmt. Die Daten wurden nach der Gleichung

$$[Ca^{2+}] = K_d \cdot \beta \cdot (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \quad (3.3)$$

[23] gefittet, wobei  $[Ca^{2+}]$  der Kalziumkonzentration der Eichlösung und R der Ratio 340/380 entspricht.  $K_d$  ist die effektive Dissoziationskonstante von

Mag-Fura-2 und  $R_{max}$  steht für die maximale Ratio, die bei einer gesättigten Kalziumlösung gemessen werden kann.  $\beta$  berechnet sich aus der Fluoreszenz bei 380 nm in kalziumfreier Lösung ( $S_{f2}$ ) dividiert durch die Fluoreszenz bei 380 nm in kalziumgesättigter Lösung ( $S_{b2}$ ) [23].  $K_d$  und  $R_{max}$  wurden durch den Fit berechnet. Als nächstes wurde die freie Kalziumkonzentration in AIM-V®-Medium mit den relevanten EGTA-Konzentrationen (0 mM - 1,5 mM EGTA in 0,1 mM Schritten, 1,05 mM und 2,0 mM) und jeweils 5  $\mu$ M Mag-Fura-2 bestimmt.

### 3.14 Immunfluoreszenz

Zur Quantifizierung der Effizienz der Herunterregulierung von STIM1 in STIM1-siRNA transfizierten CD4<sup>+</sup>-Zellen wurde eine Immunfluoreszenz durchgeführt. Es wurden sowohl stimulierte als auch unstimulierte CD4<sup>+</sup>-Zellen verwendet, die mit STIM1-siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Zu Beginn wurden  $4-5 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup>-Zellen in 50  $\mu$ l AIM-V®-Medium auf einem mit Polyornithin (0,1 mg/ml) beschichtetes Deckglas (Durchmesser 18 mm, Stärke 1, Kindler) für 30 Minuten bei Raumtemperatur absitzen lassen. Dann wurden die Zellen zweimal mit 1×PBS gewaschen und für 20 Minuten in PBS/3% PFA fixiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation in PBS/0,1 mM Glycin, um überschüssiges PFA zu inaktivieren. Nach einem erneuten Waschschriff mit 1×PBS wurden die Zellen mit PBS/0,1% Triton für 20 Minuten permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS/2% BSA/0,1% Triton für 20 Minuten blockiert. Um in den stimulierten Zellen die CD3 und CD28 Antikörper auf den Beads zu besetzen, wurden die Zellen anschließend mit anti-GAM-IgG Antikörper (1:10 in PBS/2% BSA/0,1% Triton) für 30 Minuten inkubiert. Nachdem die Zellen dreimal mit PBS/0,1% Triton gewaschen worden waren, erfolgte die 60 minütige Inkubation mit anti-STIM1 Antikörper (1:20 in PBS/2% BSA/0,1% Triton). Alle folgenden Schritte erfolgten im Dunkeln. Als nächstes wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS/0,1% Triton gewaschen und mit einem sekundären anti-Maus-IgG Antikörper (1:200 in PBS/2% BSA/0,1% Triton), der mit dem Fluorochrom Alexa Fluor® 488 gekoppelt ist, für 60 Minuten inkubiert. Es folgten erneut drei Waschschriffe mit PBS/0,1% Triton. Dann wurden die Deckgläschen mit den Zellen kurz in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> getaucht und anschließend auf einem Deckglas (Durchmesser 25 mm, Stärke 1, Kindler) eingebettet. Als Einbettmedium wurde ein ProLong® Antifade Kit von Molecular Probes<sup>TM</sup> verwendet. Die Analyse erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX 70) mit einem 20× Objektiv (UplanApo/340, N.A. = 0,75). Es wurde jeweils ein Durchlichtbild mit zehn ms Belichtungszeit und vom gleichen Bildausschnitt ein Fluoreszenzbild mit einem für den verwendeten Alexa Fluor® 488 gekoppelt anti-IgG Antikörper geeigneten Filter (Tabelle 3.2) mit einer Belichtungszeit von 2000 ms und einer Anregungswellenlänge von 470 nm (Polychrom V Monochromator, Till Photonics) aufgenommen (CCD Kamera, TILL Imago). Die Analyse der Daten erfolgte mit der TILL Vision Software. Die statistische Analyse erfolgte mit dem U-Test.

## Kapitel 4

# Ergebnisse

### 4.1 Bestimmung der Reinheit der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation

In der vorliegenden Arbeit sollten Kalziumsignale in primären humanen CD4<sup>+</sup>-Zellen untersucht werden, die aus Leukozytendepletionsfiltern isoliert wurden. Dazu musste nach der Isolation der CD4<sup>+</sup>-Zellen zunächst eine CD4-Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD4 durchgeführt werden, um die Reinheit der Zellpopulation zu bestimmen. Abbildung 4.1 zeigt einen repräsentativen Ausschnitt der aufgereinigten Zellpopulation in der Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme. Durch den Vergleich der Anzahl der gefärbten Zellen in der Fluoreszenzaufnahme mit den Zellen, die nur in der Durchlichtaufnahme sichtbar waren, wurde eine Reinheit der CD4<sup>+</sup>-Zellen von etwa 97% festgestellt ( $n = 840 - 1700$  Zellen aus drei verschiedenen Spendern).

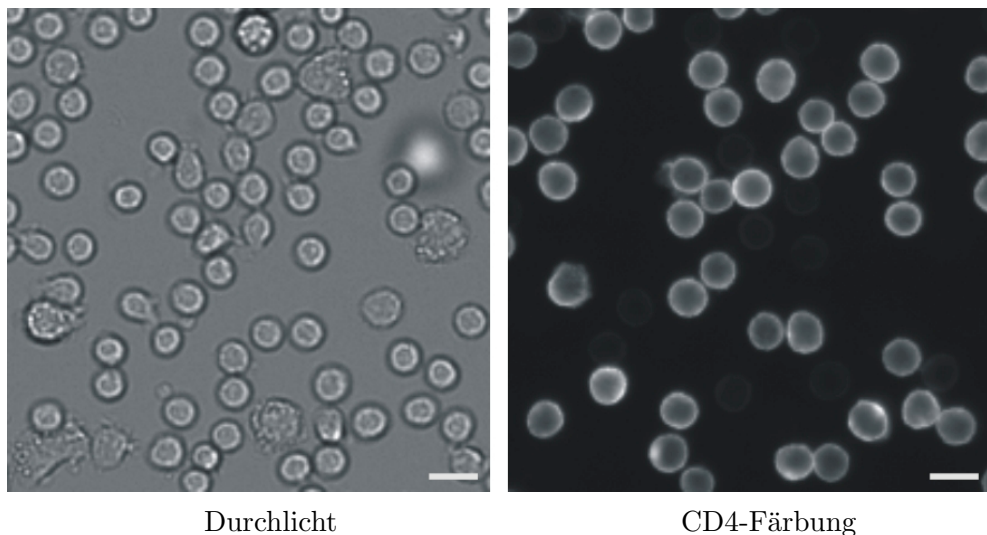


ABBILDUNG 4.1: Anti-CD4 Färbung der aus peripheren mononukleären Zellen isolierten CD4<sup>+</sup>-Zellen. Gezeigt ist ein Bildausschnitt in der Durchlichtaufnahme und den gleichen Ausschnitt in der CD4-Färbung. Für die CD4-Färbung wurden R-PE gekoppelte anti-CD4 Antikörper verwendet. Die Größenbalken repräsentieren 10  $\mu\text{m}$ .

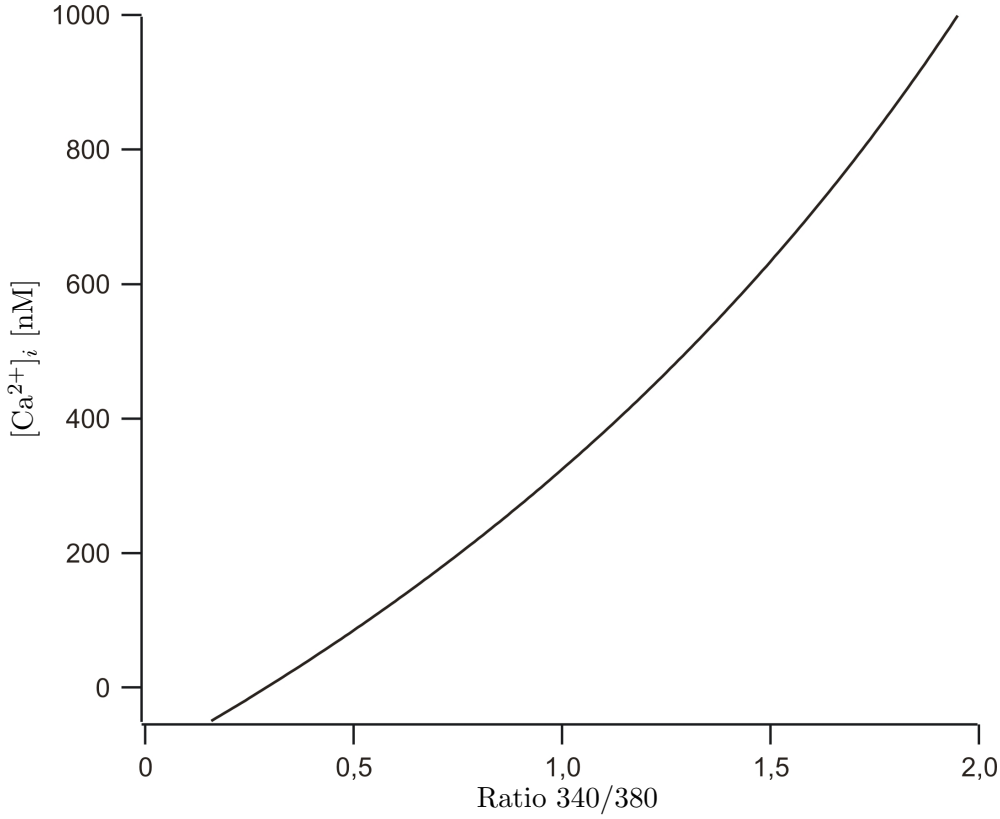


ABBILDUNG 4.2: Kalibration der intrazellulären Kalziumkonzentration in CD4<sup>+</sup>-Zellen. Aufgetragen ist die Gleichung  $[Ca^{2+}]_i = K_d \cdot \beta \cdot (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$  mit  $K_d = 266$  nM,  $\beta = 6,77$ ,  $R_{min} = 0,291$  und  $R_{max} = 4,93$  anhand der die Umrechnung der Ratio 340/380 in die  $[Ca^{2+}]_i$  erfolgte.

## 4.2 Kalibration der $[Ca^{2+}]_i$ in CD4<sup>+</sup>-Zellen und der Kalziumkonzentration in AIM-V<sup>®</sup>-Medium

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in CD4<sup>+</sup>-Zellen wurde mit Hilfe des Kalziumindikatorfarbstoffs Fura-2 mittels Fluoreszenzmikroskopie gemessen (Abschnitt 3.11.1). Die Umrechnung der Ratio 340/380 in die entsprechenden intrazellulären Kalziumkonzentrationen erfolgte nach Gleichung 3.2 (Abschnitt 3.12).  $R_{min}$ ,  $R_{max}$  und  $\beta$  wurde in stimulierten und unstimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen bestimmt und die Werte jeweils gemittelt. Die Zellen wurden fokale mittels anti-CD3/anti-CD28 gekoppelter Beads stimuliert. Der Wert von  $R_{min}$ , der in CD4<sup>+</sup>-Zellen in kalziumfreier Ringerlösung gemessen wurde, war höher als die mittlere Ratio 340/380 in CD4<sup>+</sup>-Zellen, die in AIM-V<sup>®</sup>-Medium mit 1,2 mM bzw. 1,3 mM des Kalziumchelators EGTA zwei bzw. drei Tage inkubiert wurden (Abschnitt 4.3). Deshalb wurde die kleinste mittlere Ratio, die in allen Experimenten gemessen wurde, als  $R_{min}$  definiert. Diese wurde in stimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen ohne Beadkontakt in AIM-V<sup>®</sup>-Medium mit 1,3 mM EGTA an Tag 3 gemessen. In der Abbildung 4.2 ist die Gleichung 3.2 mit den entsprechenden Werten für  $R_{min}$ ,  $R_{max}$  und  $\beta$  dargestellt.

Die Bestimmung der freien Kalziumkonzentration in AIM-V<sup>®</sup>-Medium ( $[Ca^{2+}]_e$ )

#### 4.2. KALIBRATION DER $[Ca^{2+}]_I$ IN $CD4^+$ -ZELLEN UND DER KALZIUMKONZENTRATION IN AIM-V<sup>®</sup>-MEDIUM

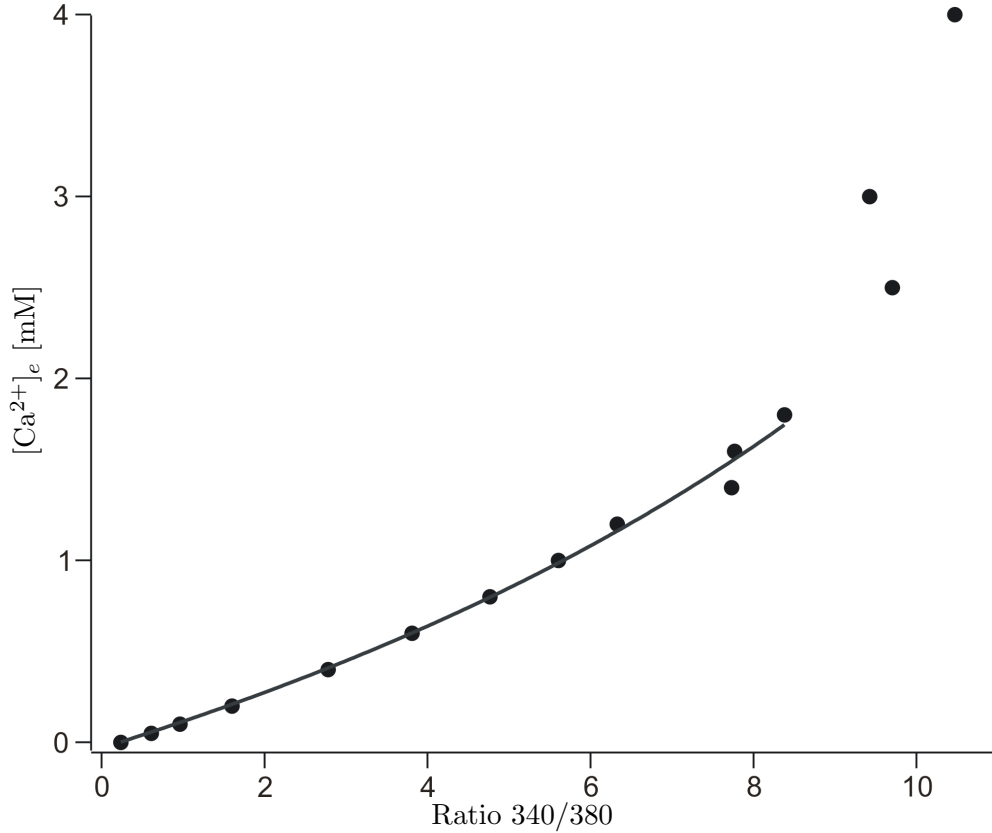


ABBILDUNG 4.3: Eichkurve zur Kalibration der Kalziumkonzentration in AIM-V<sup>®</sup>-Medium mit Mag-Fura-2. Die Ratio 340/380 wurde in AIM-V<sup>®</sup>-Medium mit bekannter, steigender Kalziumkonzentration bestimmt und nach der Gleichung  $[Ca^{2+}]_i = K_d \cdot \beta \cdot (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$  mit  $\beta = 141,6$ , und  $R_{min} = 0,225$  gefittet.  $K_d = 24,9 \cdot 10^{-6}$  M, und  $R_{max} = 4,93$  wurden durch den Fit bestimmt.

erfolgte anhand einer Kalibration mit Mag-Fura-2. Da die  $[Ca^{2+}]_i$  in  $CD4^+$ -Zellen unter kalziumlimitierenden Bedingungen untersucht werden sollte, die durch den Zusatz von EGTA in das AIM-V<sup>®</sup>-Medium erfolgte, wurde zunächst eine Eichkurve mit steigender Konzentration von Kalzium in AIM-V<sup>®</sup>-Medium ermittelt (Abb. 4.3). Zur Bestimmung der Eichkurve wurden die Ratio-Werte, die in AIM-V<sup>®</sup>-Medium mit einer Kalziumkonzentration von über 2 mM gemessen wurden, nicht in die Ermittlung des Fits mit einbezogen, da die Ratio-Werte, die für diese Arbeit relevant sind, unterhalb von 2 mM lagen und dementsprechend nur der Bereich zwischen 0 mM und 2 mM gefittet wurde. Mit Hilfe der Eichkurve konnte dann im Anschluss die freie Kalziumkonzentration in AIM-V<sup>®</sup>-Medium mit den relevanten EGTA-Konzentrationen berechnet werden (Tabelle 4.1). Da die Proliferationsexperimente aus Abbildung 4.4 mit AIM-V<sup>®</sup>-Medium durchgeführt wurden, das mit einer anderen Charge FCS versetzt war (Charge 2) als bei den Experimenten, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden (Charge 1), unterscheiden sich die Kalziumkonzentrationen der beiden Chargen geringfügig.

TABELLE 4.1: Freie Kalziumkonzentration in AIM-V®-Medium mit verschiedenen EGTA-Konzentrationen.

| EGTA [mM] | [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>e</sub> [μM]<br>Charge 1 | [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>e</sub> [μM]<br>Charge 2 |
|-----------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 0,0       | 485                                               | 468                                               |
| 0,7       | 207                                               | 207                                               |
| 0,8       | 163                                               | 170                                               |
| 0,9       | 120                                               | 130                                               |
| 1,0       | 82                                                | 91                                                |
| 1,05      | 56                                                | /                                                 |
| 1,1       | 36                                                | 46                                                |
| 1,2       | 3                                                 | 24                                                |
| 1,3       | 2                                                 | 23,3                                              |

### 4.3 Analyse der steady-state [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in CD4<sup>+</sup>-Zellen in Abhängigkeit von der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub>

Die extrazelluläre Kalziumkonzentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub>) spielt eine entscheidende Rolle in der Proliferation von T-Zellen [22, 43]. Von unserer Arbeitsgruppe wurde die Proliferation von humanen, fokal stimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen in Abhängigkeit von der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> untersucht. Abbildung 4.4 zeigt die Reduktion der Proliferation von humanen CD4<sup>+</sup>-Zellen unter kalziumlimitierenden Bedingungen. Die Zellen wurden zwei Tage mit anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Beads in AIM-V®-Medium mit den entsprechenden Konzentrationen von EGTA kultiviert. Die Proliferation wurde in relativen Fluoreszenzeinheiten gemessen, die auf einer Umwandlung eines Fluoreszenzfarbstoffs infolge metabolischer Aktivität der Zellen beruht [76]. Bis zu einer [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> von 130 μM wurde eine nahezu maximale Proliferation der Zellen gemessen. Bei niedrigeren [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> nahm die Proliferation ab.

Um zu überprüfen, wie die Proliferation der CD4<sup>+</sup>-Zellen mit der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> korreliert, wurden Kalzium-Imaging Experimente bei 37°C mit Fura-2 durchgeführt. Dabei wurden die CD4<sup>+</sup>-Zellen unter den gleichen Bedingungen wie in den Proliferationsexperimenten behandelt und die steady-state [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> zwei bzw. drei Tage nach Stimulationsbeginn gemessen. Abbildung 4.5 zeigt die Reduktion der Ratio 340/380 als Maß für die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> unter kalziumlimitierenden Bedingungen. Dargestellt ist die jeweilige mittlere Ratio von CD4<sup>+</sup>-Zellen, die während des gesamten Experiments über zehn Minuten einen Beadkontakt hatten, im Vergleich zu den Zellen, die zu keinem Zeitpunkt des Experimentes einen Beadkontakt hatten. Für die Vorbereitung und Beladung der Zellen mit Fura-2 wurden die Zellen resuspendiert. Dadurch haben einige Zellen ihren Beadkontakt verloren. Bei einem Vergleich der Größe der Zellen, die stimuliert wurden, aber nach der Vorbereitung und Beladung der Zellen mit Fura keinen Beadkontakt mehr hatten, mit Zellen, die noch einen Beadkontakt hatten, stellte man fest, dass die Zellen überwiegend gleich groß waren, und zwar größer als

#### 4.3. ANALYSE DER STEADY-STATE $[Ca^{2+}]_I$ IN $CD4^+$ -ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER $[Ca^{2+}]_E$

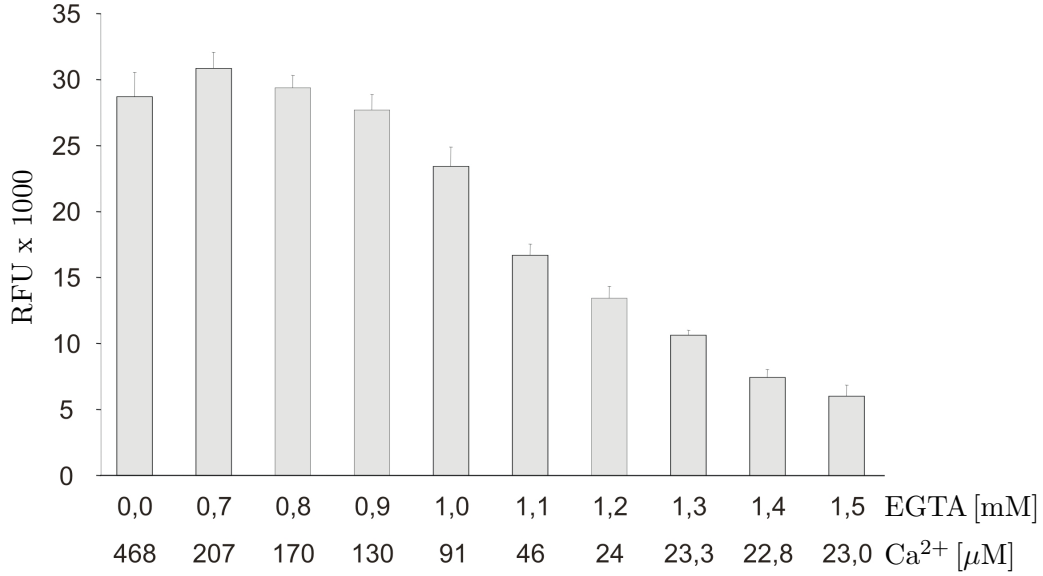


ABBILDUNG 4.4: Messung der Proliferation von  $CD4^+$ -Zellen unter kalziumlimitierenden Bedingungen.  $CD4^+$ -Zellen wurden mit anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Beads stimuliert und nach zwei Tagen die Relative Fluoreszenz (RFU) gemessen. Die extrazelluläre Kalziumkonzentration wurde durch die Zugabe von EGTA in das AIM-V®-Medium verringert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von 6 verschiedenen Spendern [76].

die unstimulierten Zellen. Dies lässt darauf schließen, dass nahezu alle Zellen, die mit Beads stimuliert wurden, einen Beadkontakt hatten. Trotzdem lag in Zellen mit Beadkontakt die mittlere Ratio 340/380 um 25% (Tag 2) bzw. 32% (Tag 3) höher im Vergleich zu Zellen ohne Beadkontakt. Wahrscheinlich waren die Zellen, die ihren Beadkontakt bei der Vorbereitung der Zellen für das Experiment verloren haben, nicht mehr länger voll stimuliert und hatten deshalb ein niedrigeres intrazelluläres Kalzium, das im Bereich der  $[Ca^{2+}]_i$  der unstimulierten Zellen lag. Unstimulierte Zellen bedeutet, dass diese nicht mit anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Beads inkubiert wurden.

Die Ratio bzw.  $[Ca^{2+}]_i$  ist abhängig von der  $[Ca^{2+}]_e$ . Eine Reduktion der  $[Ca^{2+}]_e$  wurde durch Zugabe von EGTA in AIM-V®-Medium erreicht. Im Bereich zwischen 0 mM EGTA und 1,0 mM EGTA blieb die mittlere Ratio 340/380 im Wesentlichen konstant. Bei einer Konzentration von größer als 1,0 mM EGTA nahm die Ratio mit zunehmender EGTA Konzentration ab.

In Abbildung 4.6 sind die Ergebnisse aus Abbildung 4.5 mit den entsprechenden Werten von  $[Ca^{2+}]_i$  und  $[Ca^{2+}]_e$  dargestellt. In Zellen mit Beadkontakt lag die  $[Ca^{2+}]_i$  an Tag 2 und 3 bei durchschnittlich 238 nM bei einer  $[Ca^{2+}]_e$  zwischen 82  $\mu$ M und 485  $\mu$ M. 485  $\mu$ M entspricht AIM-V®-Medium ohne Zusatz von EGTA. Bei Reduktion der  $[Ca^{2+}]_e$  nahm die  $[Ca^{2+}]_i$  bis auf 17 nM ab. In Zellen ohne Beadkontakt war die  $[Ca^{2+}]_i$  bei 485  $\mu$ M im Bereich von 154 nM. In unstimulierten  $CD4^+$ -Zellen wurde eine  $[Ca^{2+}]_i$  von durchschnittlich 94 nM gemessen. In der Literatur wird das Ruhekalzium in unstimulierten humanen  $CD4^+$ -Zellen mit 61 nM angegeben [14]. Dieser Wert wurde allerdings bei Raumtemperatur bestimmt und ist wahrscheinlich deshalb niedriger.

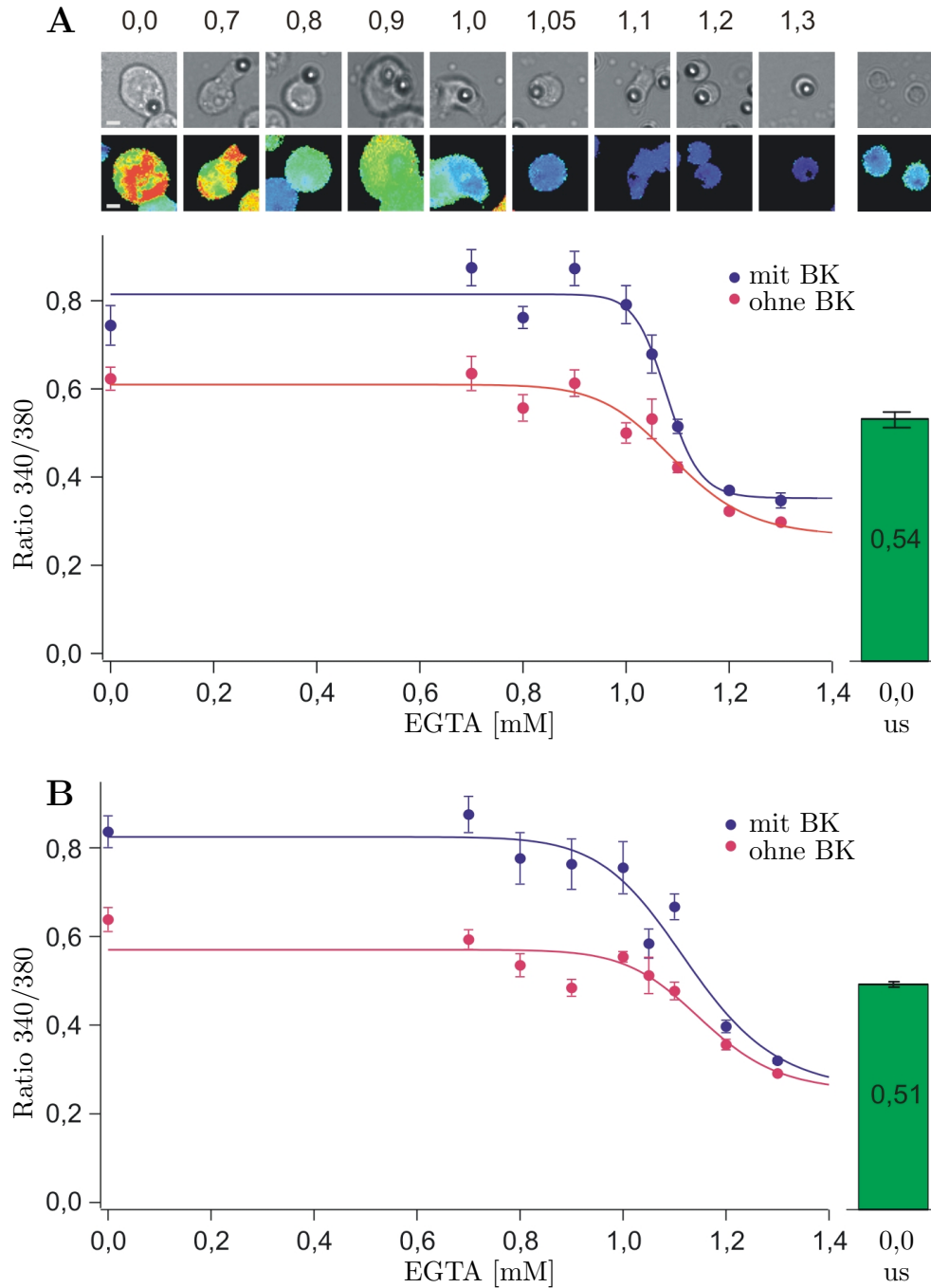


ABBILDUNG 4.5: Verlauf der Ratio 340/380 als Maß für die  $[Ca^{2+}]_i$  in  $CD4^+$ -Zellen unter kalziumlimitierenden Bedingungen. Die Zellen wurden mit anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Beads stimuliert und in AIM-V®-Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen von EGTA inkubiert. (A) Infrarot und Kalzium-Imaging-Aufnahmen von stimulierten bzw. unstimulierten (us)  $CD4^+$ -Zellen und entsprechend die mittlere Ratio zwei bzw. drei Tage (B) nach Stimulationsbeginn. Die Größenbalken entsprechen  $5\mu m$ . Die Zahlen in den Balken entsprechen der mittleren Ratio. Die blaue Kurve stellt die Zellen mit Beadkontakt (mit BK), die rote Kurve die Zellen ohne Beadkontakt (ohne BK) dar. Die unstimulierten Zellen wurden ohne den Zusatz von EGTA inkubiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 8 – 250 Zellen pro Punkt von drei verschiedenen Spendern. Die Werte wurden jeweils nach der Hill Gleichung gefittet.

#### 4.3. ANALYSE DER STEADY-STATE $[Ca^{2+}]_i$ IN $CD4^+$ -ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER $[Ca^{2+}]_e$

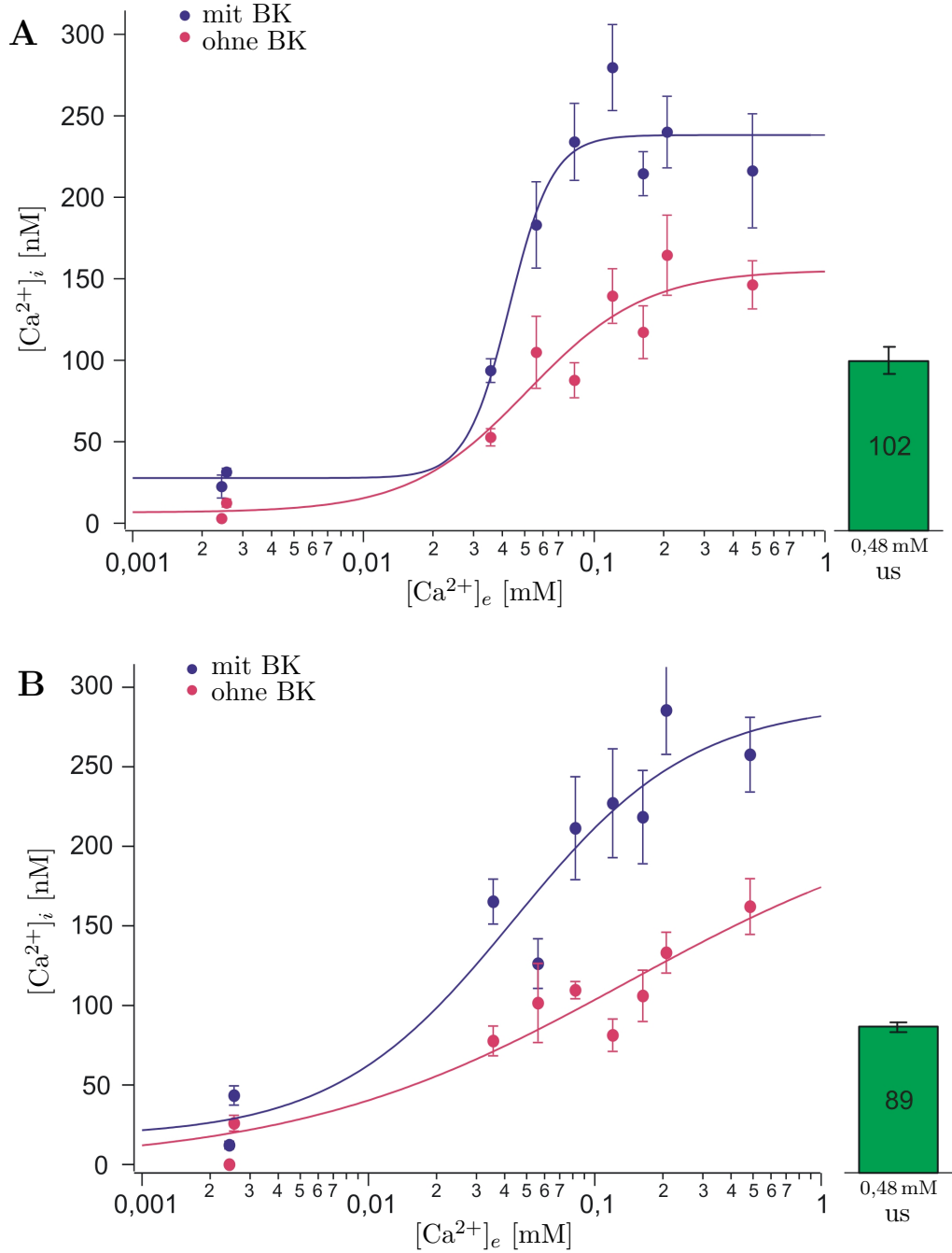


ABBILDUNG 4.6: Reduktion der  $[Ca^{2+}]_i$  in  $CD4^+$ -Zellen unter kalziumlimitierenden Bedingungen. Die Zellen wurden mit anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Beads stimuliert und in AIM-V<sup>®</sup>-Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen von EGTA inkubiert. (A)  $[Ca^{2+}]_i$  in stimulierten bzw. unstimulierten (us)  $CD4^+$ -Zellen zwei bzw. drei Tage (B) nach Stimulationsbeginn. Die Zahlen in den Balken entsprechen der mittleren  $[Ca^{2+}]_i$ . Die blaue Kurve stellt die Zellen mit Beadkontakt (mit BK), die rote Kurve die Zellen ohne Beadkontakt (ohne BK) dar. Die unstimulierten Zellen wurden bei einer  $[Ca^{2+}]_e$  von 0,48 mM gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 8 – 250 Zellen pro Punkt von drei verschiedenen Spendern. Die Werte wurden jeweils nach der Hill Gleichung gefittet.

Vergleicht man die Proliferation mit der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in  $\text{CD4}^+$ -Zellen, stellt man im Bereich der  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  zwischen  $450\text{ }\mu\text{M}$  und  $50\text{ }\mu\text{M}$  eine stärkere Abnahme der Proliferation im Vergleich zur  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  fest. In diesem Bereich nahm die Proliferation um nahezu 100% ab, die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  an Tag 2 lediglich um ca. 25%. Möglicherweise ist also nicht nur der Mittelwert der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , der jeweils in einem Experiment über die Dauer von zehn Minuten ermittelt wurde, entscheidend für die Proliferation der Zellen.

#### 4.4 Analyse der Kinetik der intrazellulären Kalziumkonzentration in $\text{CD4}^+$ -Zellen

Da die stärkere Abnahme der Proliferation nicht nur durch die Betrachtung der mittleren  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu erklären ist und in der Literatur Hinweise zu finden sind, dass die Aktivierung von T-Zellen von transienten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhungen abhängt [59], wurde eine genauere Analyse der Kinetik der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durchgeführt. Abbildung 4.7 zeigt den Verlauf der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  über den Zeitraum eines Experimentes (600 s) in einzelnen Zellen, an Tag 2 nach Stimulationsbeginn bei den verschiedenen EGTA Konzentrationen gemessen, und entsprechend repräsentative Infrarot- und Fluoreszenzbilder. Dargestellt sind ausschließlich Zellen, die während des gesamten Experimentes einen Beadkontakt hatten.

Während ein Teil der Zellen über das gesamte Experiment eine konstante  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aufwiesen (graue Kurve), zeigte ein Teil der Zellen transiente Anstiege in ihrer  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (schwarze Kurve). Diese transienten Erhöhungen in der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  reichten von einzelnen Anstiegen bis hin zu Oszillationen in der Kalziumkonzentration. Durch die Reduktion der  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  nahm sowohl die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Zellen mit konstanter  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  als auch die Häufigkeit und Amplitude der transienten Erhöhungen in der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ab.

In Abbildung 4.8 ist die Häufigkeit, mit der die einzelnen Ratiowerte im Verlauf eines Experimentes in den Zellen gemessen wurden, als Histogramm dargestellt. Aufgetragen ist die Häufigkeit der verschiedenen Ratiowerte zwischen 0 und 2,5 als relative Frequenz bei den unterschiedlichen EGTA-Konzentrationen.

Ausgewertet wurden nur Zellen, die über das komplette Experiment einen Beadkontakt aufwiesen, da der Fokus nur auf effizient stimulierte Zellen gelegt werden sollte. Dargestellt sind die Ratiowerte, die an Tag 2 nach Beginn der Stimulation gemessen wurden. Für jede EGTA Konzentration wurde jeweils ein Histogramm angefertigt. Die Histogramme konnten mit drei Gauß-Funktionen gefittet werden.

$$F_{340/380} = A^{x-x_0/w} \quad (4.1)$$

F steht für die Frequenz der Ratio 340/380, A entspricht der Amplitude der Gauß-Kurve,  $x_0$  der Ratio 340/380, bei der die größte Amplitude vorliegt, und w ist die Halbwertsbreite der Gauß-Kurve. Die drei Gauß-Funktionen sind den Histogrammen überlagert (blaue, grüne und rote Kurve). Die schwarze Kurve steht für die Summe der einzelnen Gauß-Kurven. Die blaue Kurve (1. Gauß-Fit) repräsentiert die basale  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Sie schließt im Vergleich zu den beiden anderen Gauß-Kurven die größte Fläche ein, das heißt, die Zellen hatten während der Messung am häufigsten diese  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Mit steigender EGTA-Konzentration im AIM-V®-Medium (Abnahme der  $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ) verschiebt sich die blaue Kurve in

#### 4.4. ANALYSE DER KINETIK DER INTRAZELLULÄREN KALZIUMKONZENTRATION IN CD4<sup>+</sup>-ZELLEN

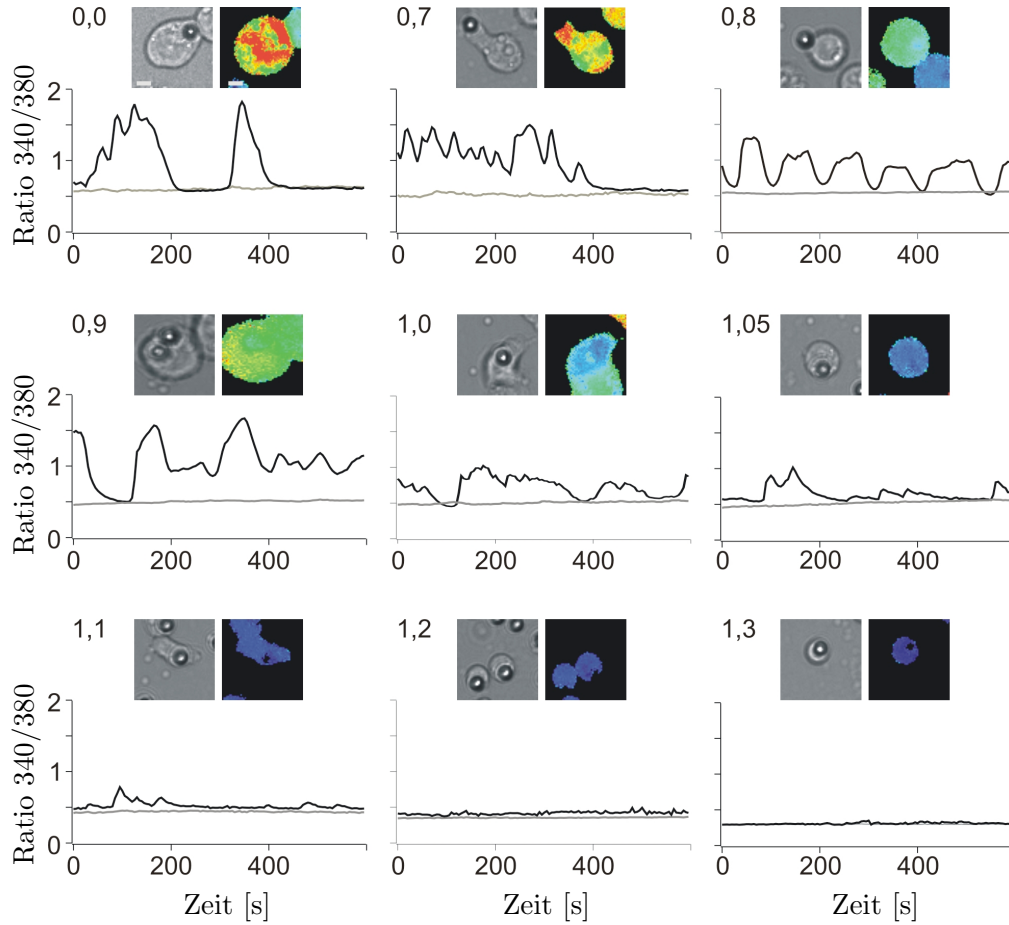


ABBILDUNG 4.7: Kinetik der  $[Ca^{2+}]_i$  in CD4<sup>+</sup>-Zellen in Abhängigkeit von der  $[Ca^{2+}]_e$ . Eine Reduktion der  $[Ca^{2+}]_e$  wurde durch unterschiedliche Konzentrationen von EGTA in AIM-V<sup>®</sup>-Medium erreicht (Angabe der EGTA Konzentration in mM). CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden mit anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Beads stimuliert. Infrarot und Kalzium-Imaging Aufnahmen von beadstimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen und entsprechend die Kinetik der Ratio 340/380 von zwei verschiedenen repräsentativen Zellen über den Zeitraum des Experimentes, zwei Tage nach Stimulationsbeginn. Die Größenbalken entsprechen 5  $\mu$ m. Dargestellt sind Zellen, die während des gesamten Experimentes einen Beadkontakt hatten.

Richtung niedrigerer Ratiowerte, was durch den geringeren Kalziumeinstrom bei geringerer extrazellulärer Kalziumkonzentration zu erklären ist.

Die grüne und rote Kurve (2. und 3. Gauß-Fit) stehen für die transienten Anstiege in der  $[Ca^{2+}]_i$  (vgl. Abb. 4.7). Die Amplitude der grünen und roten Gauß-Kurve nimmt mit Reduktion der  $[Ca^{2+}]_e$  ab und die Kurven verschieben sich ebenfalls in Richtung geringerer  $[Ca^{2+}]_i$ . Das bedeutet, die Amplitude und Häufigkeit der transienten Anstiege und Oszillationen in der  $[Ca^{2+}]_i$  nehmen bei einer Reduktion der  $[Ca^{2+}]_e$  ab.

In Abbildung 4.9 ist die mittlere Amplitude der jeweiligen Gauß-Kurve in Abhängigkeit von der extrazellulären EGTA Konzentration bzw. der  $[Ca^{2+}]_e$  zwei (A) und drei (B) Tage nach Stimulationsbeginn dargestellt. Mit steigender EGTA Konzentration im Medium (Abnahme der  $[Ca^{2+}]_e$ ) nahm die Häufigkeit

der hohen Ratiowerte am stärksten ab (rote Kurve). Hohe Ratio- bzw.  $[Ca^{2+}]_i$ -Werte stehen für die transiente Erhöhungen in der  $[Ca^{2+}]_i$ , was auf transiente Kalziueinströme zurückzuführen ist. Bei einer  $[Ca^{2+}]_e$  von  $36\ \mu\text{M}$  ( $1,1\ \text{mM}$  EGTA) wurden transiente Kalziueinströme von durchschnittlich  $209\ \text{nM}$  (entspricht einer Ratio von  $0,77$ ) gemessen. Ab einer  $[Ca^{2+}]_e$  an Tag 2 von kleiner als  $36\ \mu\text{M}$  fand kein transienter Kalziueinstrom mehr statt. Tag 2 und Tag 3 unterscheiden sich nicht im Wesentlichen, außer dass an Tag 3 bis zu einer EGTA Konzentration von  $1,2\ \text{mM}$  noch ein transienter Kalziueinstrom gemessen werden konnte. Die basale  $[Ca^{2+}]_i$  (blaue Kurve) bzw. die mittlere  $[Ca^{2+}]_i$  des 2. Gauß-Fit (grüne Kurve), die für transiente Kalziueinströme geringerer Amplitude steht, nahmen ab einer EGTA Konzentration von  $1,1\ \text{mM}$  EGTA nur um  $20\text{-}30\%$  ab.

Da die  $[Ca^{2+}]_i$  in den einzelnen Zellen keine konstante Größe darstellt, sondern bereits während einer Messung von zehn Minuten einzelne transiente Anstiege bis hin zu Oszillationen in der  $[Ca^{2+}]_i$  gemessen werden konnten, scheint auch die Häufigkeit und Amplitude der Transienten für die Proliferation der Zellen eine Rolle zu spielen. Die Häufigkeit und Amplitude der Transienten verringerte sich bei Abnahme der  $[Ca^{2+}]_e$ . Transienten mit mittlerer  $[Ca^{2+}]_i$  von  $209\ \text{nM}$  (3. Gauß-Fit) wurden nur bis zu einer  $[Ca^{2+}]_e$  von größer als  $36\ \mu\text{M}$  erreicht. Das bedeutet, dass Transienten mit hoher  $[Ca^{2+}]_i$  (3. Gauß-Fit) wahrscheinlich für die Proliferation der  $CD4^+$ -Zellen notwendig sind. Bleiben diese Transienten aus, sinkt die Proliferationsrate der Zellen. Dies erklärt wahrscheinlich die wesentlich stärkere Abnahme der Proliferation im Bereich der  $[Ca^{2+}]_e$  zwischen  $450\ \mu\text{M}$  und  $50\ \mu\text{M}$  im Vergleich zur Abnahme der mittleren  $[Ca^{2+}]_i$ .

#### 4.4. ANALYSE DER KINETIK DER INTRAZELLULÄREN KALZIUMKONZENTRATION IN CD4<sup>+</sup>-ZELLEN

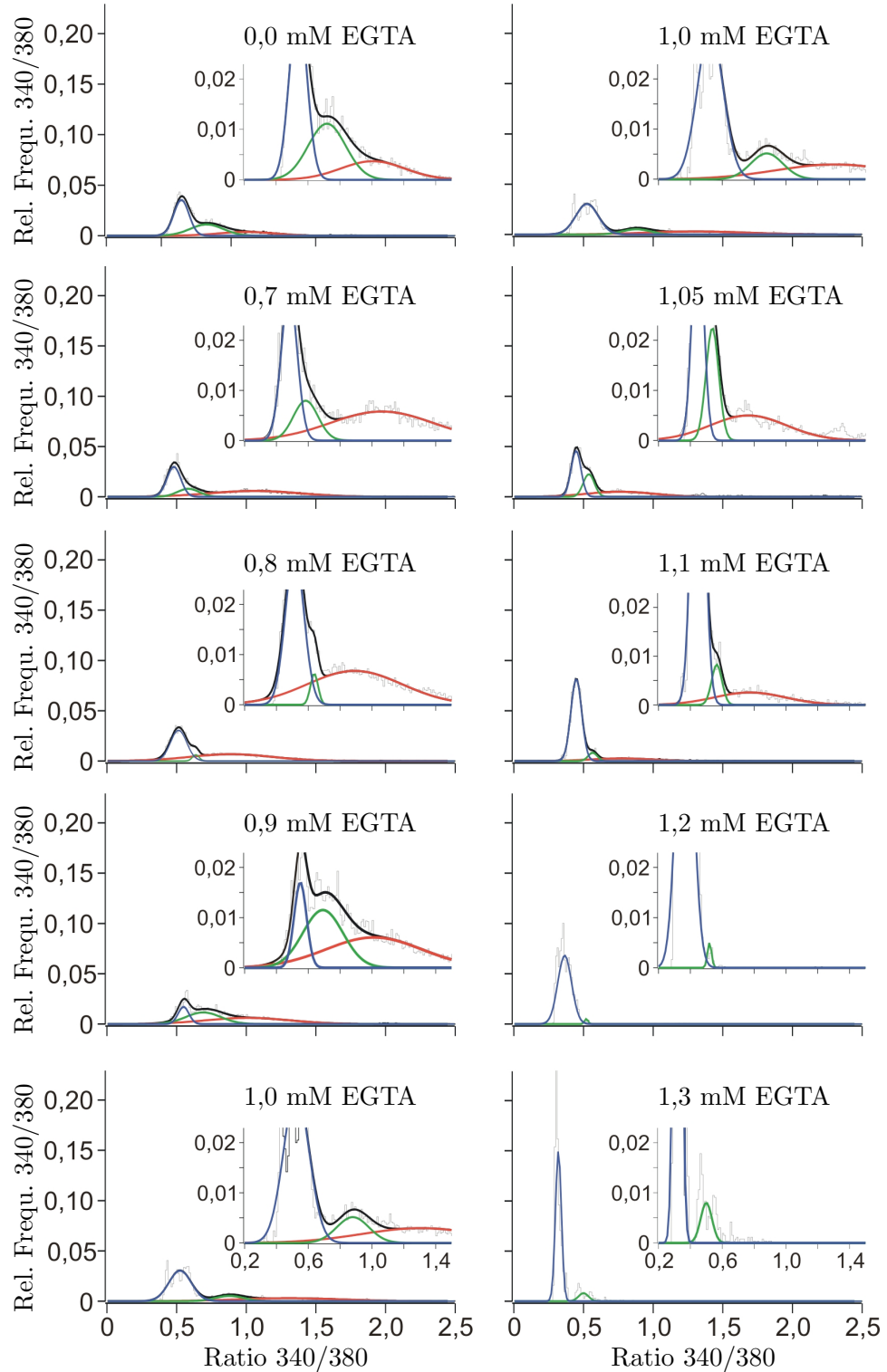


ABBILDUNG 4.8: Statistische Analyse der Häufigkeit der unterschiedlichen Ratiowerte in beadstimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen in Abhängigkeit von der extrazellulären EGTA Konzentration ( $[Ca^{2+}]_e$ ). Ausgewertet wurden nur Zellen mit Beadkontakt über die gesamte Messung von zehn Minuten, zwei Tage nach Stimulationsbeginn (n=19-157 pro EGTA Konzentration). Die graue Kurve stellt die Rohdaten der Ratio 340/380 als Histogramm dar. Diese wurden mit drei verschiedenen Gauß-Gleichungen gefittet (blaue, grüne und rote Kurve). Die schwarze Kurve repräsentiert die Summe der drei Gauß-Kurven.

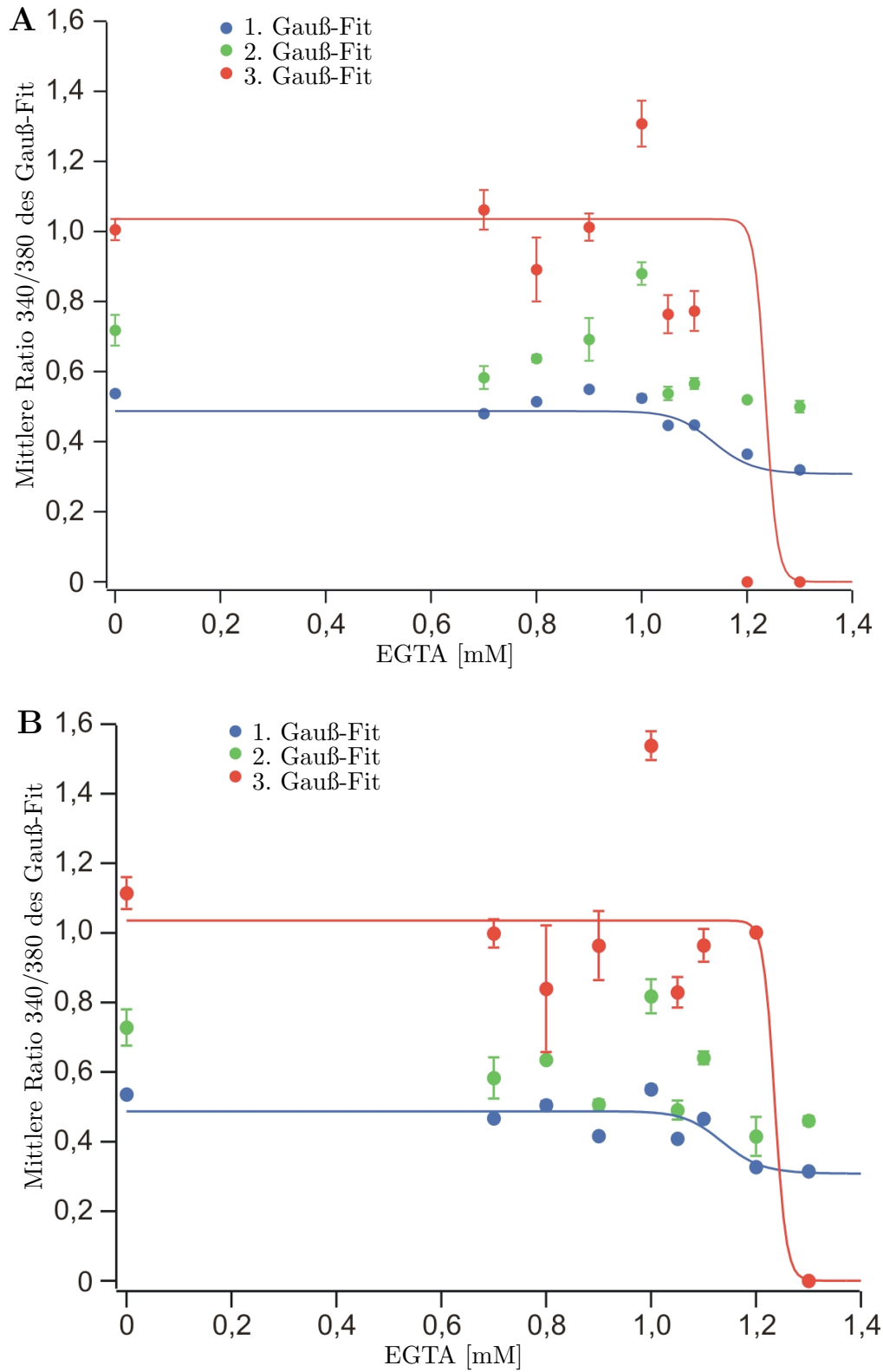


ABBILDUNG 4.9: Die mittlere Ratio der drei verschiedenen Gauß-Funktionen aus Abbildung 4.8 in Abhängigkeit von der extrazellulären EGTA Konzentration an Tag 2 (A) und Tag 3 (B) nach Stimulationsbeginn. Die Werte wurden jeweils nach der Hill Gleichung gefittet.

## 4.5 Einfluss von TRPC3 und STIM1 auf die $[Ca^{2+}]_i$ in CD4<sup>+</sup>-Zellen

In der Literatur wird die Rolle von TRPC3 auf den speichergesteuerten Kalziumeinstrom kontrovers diskutiert [77]. Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass in primären fokal stimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen, die Expression von TRPC3 hochreguliert wird und dass in primären CD4<sup>+</sup>-Zellen die Proliferation in TRPC3-siRNA transfizierten Zellen reduziert ist. Dies deutet auf eine wichtige Funktion des TRPC3 im Rahmen der Aktivierung der T-Zellen hin.

### 4.5.1 Nachweis der Effizienz der Methode in primären CD4<sup>+</sup>-Zellen mittels STIM1-siRNA

Um die Rolle von TRPC3 auf die Kalziumhomöostase zu untersuchen, wurde im zweiten Teil der Arbeit die  $[Ca^{2+}]_i$  in CD4<sup>+</sup>-Zellen mittels siRNA-Technologie analysiert. Dazu wurde zunächst die Effizienz der Herunterregulierung überprüft. Im Vorfeld hatte Anne Sappok (AG Hoth) bereits nachgewiesen, dass die auch in dieser Arbeit verwendete siRNA in TRPC3 überexprimierenden HEK293-Zellen die TRPC3 mRNA herunterreguliert. Demzufolge bestand eine Aufgabe darin, die Effizienz der siRNA auch in primären CD4<sup>+</sup>-Zellen funktionell nachzuweisen. STIM1-siRNA wurde dafür als Positivkontrolle verwendet, da der Einfluss von STIM1 auf den ORAI vermittelten Kalziumeinstrom in T-Zellen vielfach nachgewiesen wurde [45, 60].

Die Herunterregulation von STIM1 mittels siRNA wurde von unserer Arbeitsgruppe auf mRNA Ebene mittels quantitativer RT-PCR nachgewiesen. Abbildung 4.10 zeigt, dass die mRNA an Tag 1 nach Stimulationsbeginn um ca. 50% herunterreguliert ist. Bereits an Tag 2 nach Stimulationsbeginn ist die Expression der STIM1 mRNA in STIM1- und Kontroll-siRNA gleich.

Um den zeitlichen Verlauf der STIM Expression auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurde eine Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen STIM1 durchgeführt (Abb. 4.11). Es wurden stimulierte und unstimulierte transfizierte CD4<sup>+</sup>-Zellen untersucht. Im Verlauf der Antikörperfärbung wurden zunächst Antikörper eingesetzt, um die Bindungsstellen der CD3 und CD28 Antikörper auf den Beads zu besetzen, damit die sekundären anti-Maus-IgG Antikörper nicht an diese binden, sondern nur an die anti-STIM1 Antikörper. Trotz des Einsatzes der Antikörper fluoreszierten die Beads sehr stark, so dass nur die Zellen ohne Beadkontakt ausgewertet werden konnten.

Mit zunehmender Stimulationsdauer nahm die Expression sowohl in STIM1-siRNA transfizierten Zellen als auch in Kontrollzellen zu. An Tag 1 und 2 nach Stimulationsbeginn war die Expression in STIM1-siRNA transfizierten Zellen bis zu 30% reduziert im Vergleich zur Kontrolle. An Tag 3 wurde in STIM1-siRNA transfizierten Zellen ein höherer STIM1 m-RNA-Gehalt gemessen als in der Kontrolle. In unstimulierten Zellen blieb die Expression in Kontrollzellen im Verlauf der Inkubation der Zellen relativ gleich und war insgesamt niedriger als in stimulierten Zellen. Die STIM1 vermittelte Fluoreszenz war in unstimulierten STIM1-siRNA transfizierten Zellen um bis zu 50% reduziert (Tag 1). Damit konnten die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR auf Proteinebene bestätigt werden.

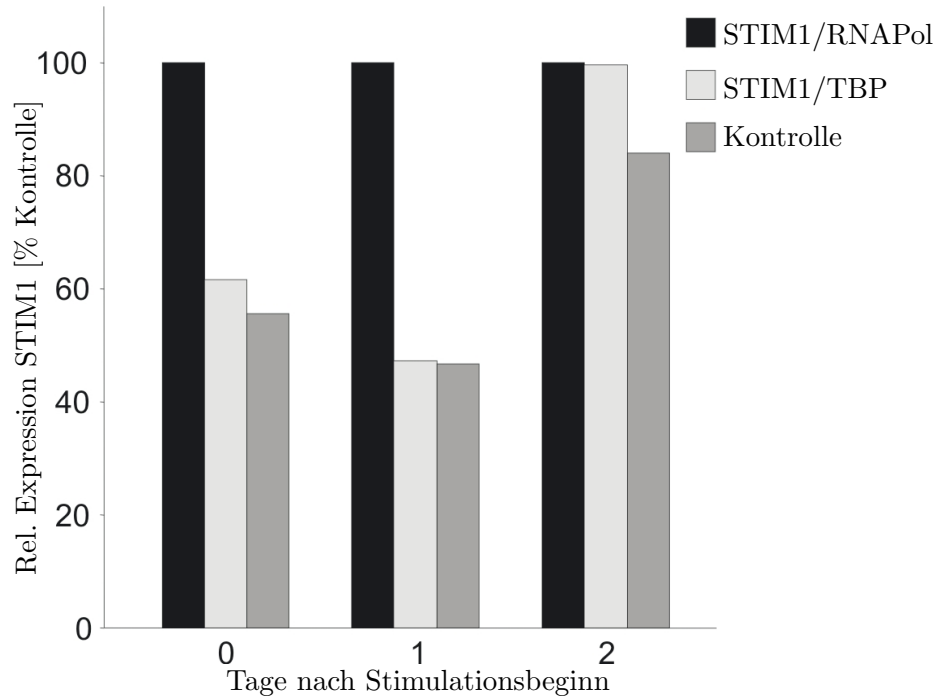


ABBILDUNG 4.10: Reduktion der Expression von STIM1 in STIM1-siRNA transfizierten Zellen. Die Zellen wurden vier Tage nach der Transfektion mit anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Beads stimuliert (Tag 0). Die STIM1 Expression ist in Relation zur Expression der house-keeping Gene Tata box-binding protein (TBP) und RNA Polymerase II (RNAPol) angegeben. Als Kontrolle diente die relative Expression von STIM1/TBP und STIM1/RNAPol in Kontroll-siRNA transfizierten CD4<sup>+</sup>-Zellen. Die relative Expression in Kontrollzellen wurde jeweils auf 100% gesetzt [58].

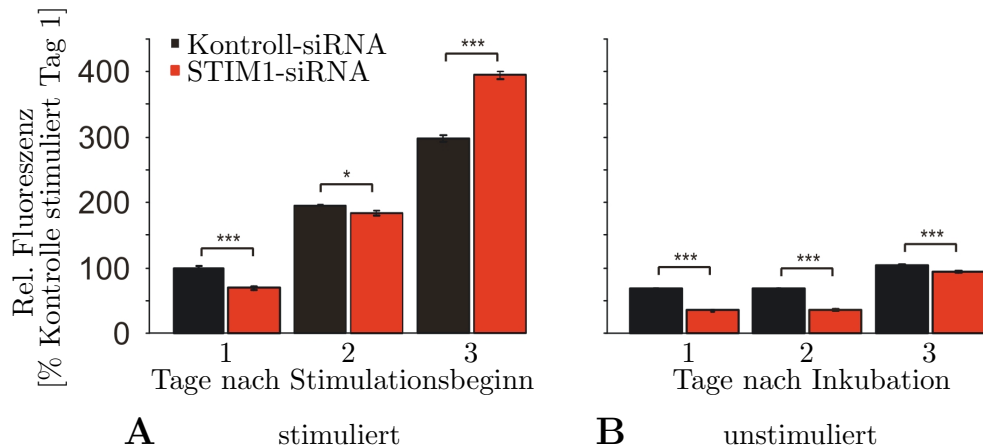


ABBILDUNG 4.11: Nachweis der Reduktion der STIM1 Expression mittels Immunfluoreszenz. Die Zellen wurden vier Tage nach der Transfektion mit STIM1- bzw. Kontroll-siRNA mit anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Beads stimuliert, fixiert und mit einem anti-STIM1 Antikörper gefärbt. Die relative Fluoreszenz in stimulierten Kontrollzellen wurde jeweils auf 100% gesetzt. Die relative Fluoreszenz ist dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM aus zwei verschiedenen Spendern (n=134-594 pro Bedingung).

Da STIM1 den CRAC vermittelten Kalziumeinstrom in  $CD4^+$ -Zellen aktiviert, wurde im nächsten Schritt der Kalziumeinstrom nach Speicherentleerung in STIM1-siRNA transfizierten Zellen gemessen. Zur Speicherentleerung wurde Thapsigargin verwendet, das die Kalzium ATPasen im ER inhibiert und dadurch zur transienten Kalziumfreisetzung führt. Der Thapsigargin vermittelte Kalziumeinstrom wurde ebenfalls an Tag 1, 2 und 3 nach Stimulationsbeginn gemessen (Abb. 4.12). Die Zellen, die während des gesamten Experimentes einen Beadkontakt bildeten (Abb. 4.12 a), hatten schon beim Start des Experimentes eine um ca. 38% höhere  $[Ca^{2+}]_i$  im Vergleich zu Zellen ohne Beadkontakt (Abb. 4.12 b). Dies ist auf die volle Stimulation der Zellen mit Beadkontakt zurückzuführen. Nach der Speicherentleerung erfolgte ein Lösungswechsel der Zellen mit einer 0,25 mM Kalziumlösung. Im Vergleich zu den Standardprotokollen zur Speicherentleerung, bei denen üblicherweise Kalziumlösungen höherer Konzentrationen von 1 mM bis 2 mM verwendet werden, wurde hier eine geringere Kalziumkonzentration von 0,25 mM gewählt, da bei geringeren Kalziumkonzentrationen die Wahrscheinlichkeit größer ist, einen etwaigen Effekt der Herunterregulation von STIM1 und damit verbunden eine Reduktion des CRAC/ORAI vermittelten Kalziumeinstroms messen zu können. Der nach diesem Lösungswechsel resultierende speichergesteuerte Kalziumeinstrom war in STIM1-siRNA transfizierten Zellen an Tag 1 und 2 nach Stimulationsbeginn deutlich geringer im Vergleich zur Kontrolle. An Tag 3 wurde in STIM1-siRNA transfizierten Zellen ein größerer Kalziumeinstrom gemessen als in den  $CD4^+$ -Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Insofern sind die Ergebnisse des speichergesteuerten Kalziumeinstroms konsistent mit dem Verlauf des STIM1-mRNA- und Proteingehalts der Zellen.

In Abbildung 4.13 sind die jeweiligen Werte von Steigung und Plateau des speichergesteuerten Kalziumeinstroms aus Abbildung 4.12 aufgeführt. Sowohl die Steigung als auch das Plateau des Kalziumeinstroms nahmen mit zunehmender Stimulationsdauer zu. In den Zellen mit Beadkontakt war die Steigung in STIM1-siRNA transfizierten Zellen an Tag 2 um bis zu 75%, das Plateau um bis zu 70% reduziert. An Tag 3 wurde in STIM si-RNA transfizierten Zellen ohne Beadkontakt eine signifikant höhere Steigung des Kalziumeinstroms im Vergleich zur Kontrolle gemessen.

Damit konnte die Effizienz der siRNA-Technologie mittels STIM1-siRNA in humanen  $CD4^+$ -Zellen sowohl auf mRNA, auf Proteinebene als auch funktionell nachgewiesen werden.

#### 4.5.2 Analyse der Rolle von STIM1 auf die steady-state Kalziumkonzentration in $CD4^+$ -Zellen

Es ist ohne Zweifel so, dass STIM1 in  $CD4^+$ -Zellen den CRAC/ORAI-Kanal nach der Entleerung des ER aktiviert. Allerdings ist der Einfluss von STIM1 auf das steady-state Kalzium in primären stimulierten  $CD4^+$ -Zellen noch nicht klar. Daher wurde im nächsten Schritt untersucht, ob sich die steady-state Kalziumkonzentration in STIM1-siRNA transfizierten  $CD4^+$ -Zellen gegenüber den Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, verändert. Die Experimente wurden ebenfalls unter kalziumlimitierenden Bedingungen bei 37°C durchgeführt.

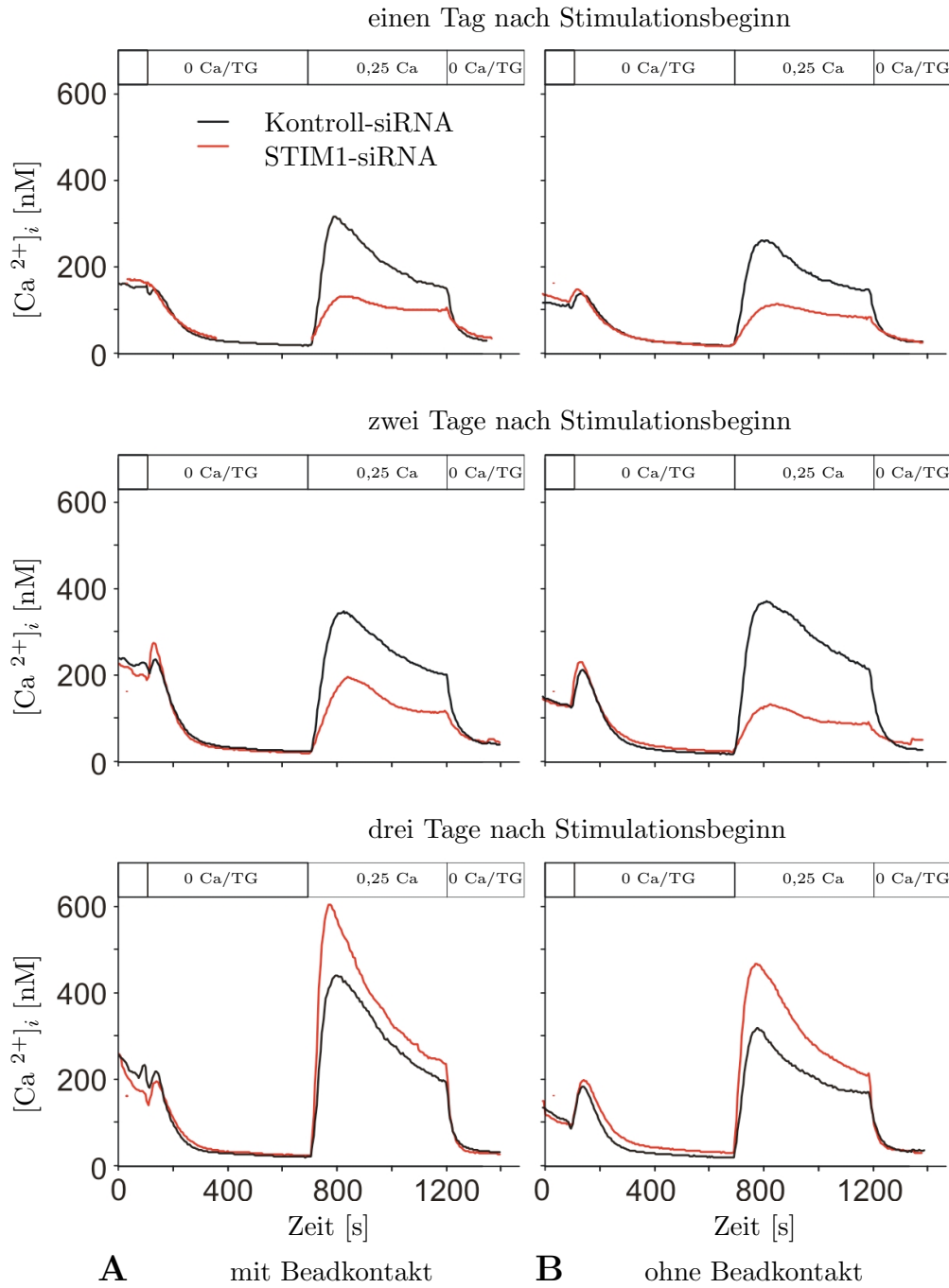


ABBILDUNG 4.12: Reduktion des CRAC vermittelten Kalziumeinstroms in STIM1-siRNA transfizierten Zellen.  $CD4^+$ -Zellen wurden mit siRNA transfiziert und mit anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Beads stimuliert. Zur Kontrolle wurde Kontroll-siRNA eingesetzt. Die Zellen wurden vor dem Experiment mit einer 0,5 mM Kalziumlösung gespült. Nach 100 s erfolgte der Lösungswechsel mit Thapsigargin in kalziumfreier Ringerlösung. Der Speicharentleerung mit Thapsigargin folgte der transiente Kalziumeinstrom. Aus dem Lösungswechsel der Zellen mit einer 0,25 mM Kalziumlösung resultierte der CRAC vermittelte Kalziumeinstrom. Dargestellt ist die mittlere  $[Ca^{2+}]_i$  von 18-183 Zellen von zwei verschiedenen Spendern.

#### 4.5. EINFLUSS VON TRPC3 UND STIM1 AUF DIE $[Ca^{2+}]_i$ IN $CD4^+$ -ZELLEN

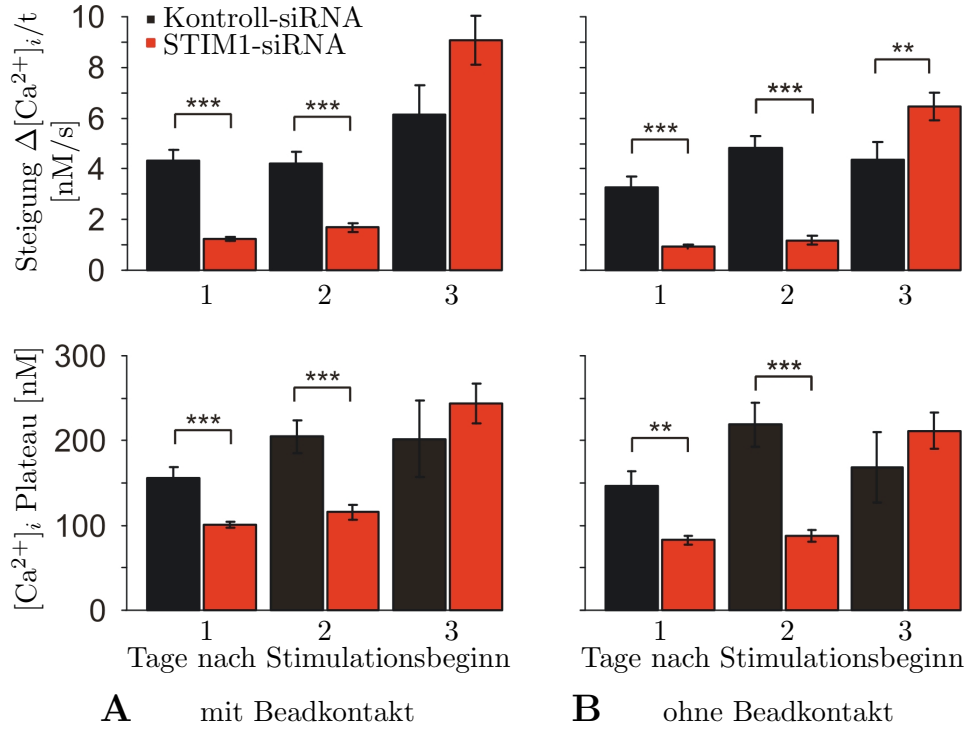


ABBILDUNG 4.13: Steigung und Plateau des CRAC/ORAI vermittelten Kalziumeinstroms in STIM1-siRNA transfizierten Zellen.  $CD4^+$ -Zellen wurden mit siRNA transfiziert und mit anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Beads stimuliert. Als Kontrolle wurden  $CD4^+$ -Zellen mit Kontroll-siRNA transfiziert. Der Kalziumeinstrom wurde infolge einer Speicherentleerung mit Thapsigargin in kalziumfreier Lösung und anschließendem Lösungswechsel mit einer 0,25 mM Kalziumlösung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Steigung und des Plateaus des Kalziumeinstroms von 18-183 Zellen pro Punkt aus zwei verschiedenen Spendern.

Die Überlegung, dass eine Supprimierung des speicherabhängigen Kalziumeinstroms in  $CD4^+$ -Zellen unter kalziumlimitierenden Bedingungen besser dektierbar ist, stammt aus der Dissertation von Kerstin Wagner (AG Hoth). Sie untersuchte die Proliferation in zwei mutanten Zelllinien CJ1 und CJ5, in denen eine Reduktion des CRAC-Stroms nachgewiesen wurde [16]. Sie zeigte, dass ein Unterschied der Proliferation der CRAC-Mutanten nur unter kalziumlimitierenden Bedingungen messbar ist. Darüber hinaus wurde auch ein Unterschied der  $[Ca^{2+}]_i$  in der Mutante CJ1 gegenüber der Kontrolle nur unter kalziumlimitierenden Bedingungen festgestellt.

Die  $[Ca^{2+}]_i$  in den transfizierten Zellen wurde an Tag 1, Tag 2 und Tag 3 nach Stimulationsbeginn gemessen (Abb. 4.14). Dargestellt ist jeweils die mittlere  $[Ca^{2+}]_i$  der Zellen, die mit STIM1-siRNA transfiziert wurden, im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. An Tag 1 nach Stimulationsbeginn war die  $[Ca^{2+}]_i$  in STIM1-siRNA transfizierten stimulierten Zellen ab einer  $[Ca^{2+}]_e$  von  $56 \mu M$  signifikant reduziert im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,001$ ). An Tag 2 war die  $[Ca^{2+}]_i$  in STIM1-siRNA transfizierten Zellen und Kontrollzellen bei einer  $[Ca^{2+}]_e$  von  $485 \mu M$  gleich. Erst unter kalziumlimitierenden Bedingungen, unterhalb einer  $[Ca^{2+}]_e$  von  $82 \mu M$ , wurde in STIM1

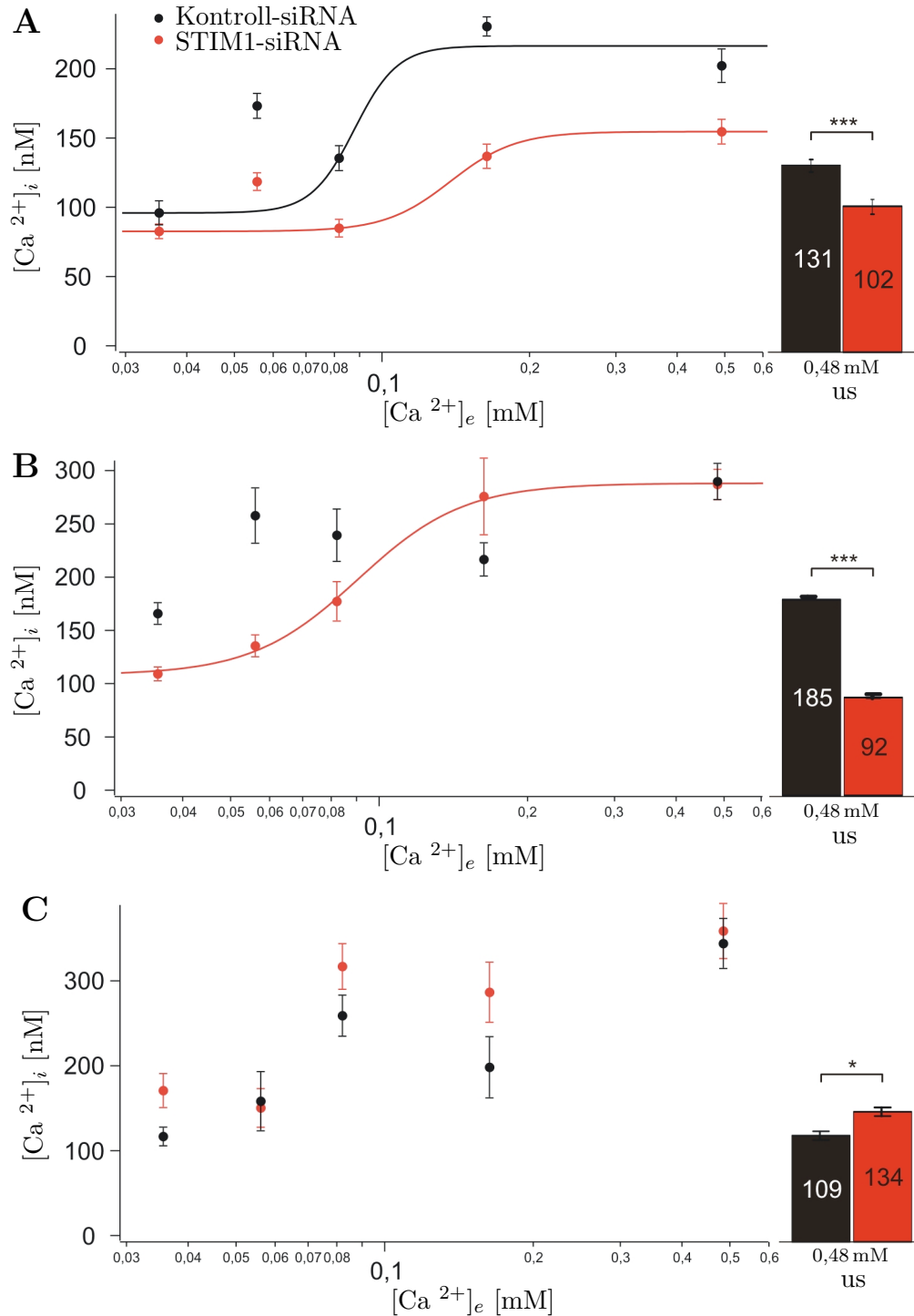


ABBILDUNG 4.14: Analyse der  $[Ca^{2+}]_i$  in STIM1-siRNA transfizierten Zellen an Tag 1 (A), Tag 2 (B) und Tag 3 (C) nach Stimulationsbeginn. Die Zellen wurden mit siRNA gegen STIM1 (rot) bzw. mit Kontroll-siRNA (schwarz) transfiziert, mit anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Beads stimuliert und in AIM-V®-Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen von EGTA inkubiert. Dargestellt sind nur die Zellen, die während des Experimentes über zehn Minuten einen Beadkontakt hatten. Im Vergleich die  $[Ca^{2+}]_i$  von unstimulierten (us) Zellen, gemessen bei einer  $[Ca^{2+}]_e$  von 0,48 mM. Die Zahlen in den Balken entsprechen der mittleren  $[Ca^{2+}]_i$  in nM. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 7 – 358 Zellen pro Punkt von 2 Spendern. Die  $[Ca^{2+}]_i$  wurde nach der Hill Gleichung gefittet.

#### 4.5. EINFLUSS VON TRPC3 UND STIM1 AUF DIE $[Ca^{2+}]_i$ IN $CD4^+$ -ZELLEN

---

transfizierten Zellen eine um bis zu 47% reduzierte  $[Ca^{2+}]_i$  ermittelt. An Tag 3 nach Stimulationsbeginn konnte eine geringe Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in STIM1-siRNA transfizierten Zellen gemessen werden. Allerdings war der Unterschied nur bei einer  $[Ca^{2+}]_e$  von  $36 \mu M$  signifikant ( $p < 0,05$ ).

Die  $[Ca^{2+}]_i$  der unstimulierten Zellen wurde bei einer  $[Ca^{2+}]_e$  von  $485 \mu M$  gemessen, das bedeutet in AIM-V®-Medium ohne den Zusatz des Kalziumchelators EGTA. Die unstimulierten STIM1-siRNA transfizierten Zellen hatten an Tag 1 und 2 eine geringere  $[Ca^{2+}]_i$  im Vergleich zur Kontrolle. An Tag 3 wurde in STIM1-siRNA transfizierten Zellen eine höhere  $[Ca^{2+}]_i$  als in der Kontrolle gemessen. Allerdings war die  $[Ca^{2+}]_i$  in Kontroll-siRNA transfizierten Zellen an Tag 1, 2 und 3, nicht wie erwartet, konstant geblieben.

Damit konnte gezeigt werden, dass STIM1 auch einen Einfluss auf die steady-state  $[Ca^{2+}]_i$  in  $CD4^+$ -Zellen hat. Die funktionellen Daten an den verschiedenen Tagen nach Stimulationsbeginn spiegeln den Verlauf der Expression von STIM1 wider. Den größten Effekt auf die steady-state  $[Ca^{2+}]_i$  wurde an Tag 1 gemessen, an dem auch die Reduktion der Expression von STIM1 im Vergleich zur Kontrolle am stärksten war (Abb. 4.11). An Tag 3 nach Stimulationsbeginn, an dem die STIM1 Expression in STIM1-siRNA transfizierten Zellen die der Kontrolle überschritten hatte, konnte sowohl ein höherer Thapsigargin vermittelter Kalziumeinstrom (Abb. 4.12) als auch eine höhere steady-state  $[Ca^{2+}]_i$  in STIM1-siRNA transfizierten Zellen festgestellt werden.

##### 4.5.3 Analyse der Rolle von TRPC3 auf die steady-state Kalziumkonzentration in $CD4^+$ -Zellen

Nachdem anhand von STIM1 gezeigt werden konnte, dass mit Hilfe von siRNA auch in primären Zellen eine Herunterregulation der Expression eines entsprechenden Gens möglich ist, wurde der Einfluss von TRPC3 auf die steady-state Kalziumkonzentration in  $CD4^+$ -Zellen mittels RNAi untersucht.

Zur Analyse der  $[Ca^{2+}]_i$  in TRPC3-siRNA transfizierten Zellen wurden die Zellen ebenfalls mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern beschichteten Beads vier Tage nach Transfektion stimuliert. Als Kontrolle wurden erneut  $CD4^+$ -Zellen mit Kontroll-siRNA transfiziert. Der Tag 4 nach Transfektion wurde deshalb als Startpunkt für die Stimulation ausgewählt, da Anna Wenning im Vorfeld gezeigt hat, dass in  $CD4^+$ -Zellen, die erst vier Tage nach Transfektion mit siRNA gegen TRPC3 stimuliert wurden, an Tag 3 und 4 nach Stimulation die stärkste Reduktion der Proliferation zu messen ist. Da der Proliferation der T-Zellen ein Anstieg der IL-2 Sekretion vorausgeht und die IL-2 Sekretion über eine kalziumabhängige Signalkaskade gesteuert wird, war ein Effekt der Herunterregulierung von TRPC3 auf das steady-state Kalzium bereits vor der Proliferation der Zellen zu erwarten. Insofern wurde die  $[Ca^{2+}]_i$  in transfizierten  $CD4^+$ -Zellen neben Tag 3 auch an Tag 2 nach Stimulationsbeginn gemessen. Außerdem wurde zuvor der Einfluss von STIM1 auf den speichergesteuerten Kalziumeinstrom und die steady-state  $[Ca^{2+}]_i$  an diesen Tagen gezeigt. Der zeitliche Ablauf der TRPC3 Experimente ist in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Abbildung 4.15 zeigt den Effekt der Herunterregulation der TRPC3-siRNA in  $CD4^+$ -Zellen zwei und drei Tage nach Stimulationsbeginn. An Tag 2 war die

TABELLE 4.2: Zeitlicher Ablauf der TRPC3 Experimente.

| Tag -4       | Tag 0       | Tag 2 und Tag 3           |
|--------------|-------------|---------------------------|
| Transfektion | Stimulation | Messung der $[Ca^{2+}]_i$ |

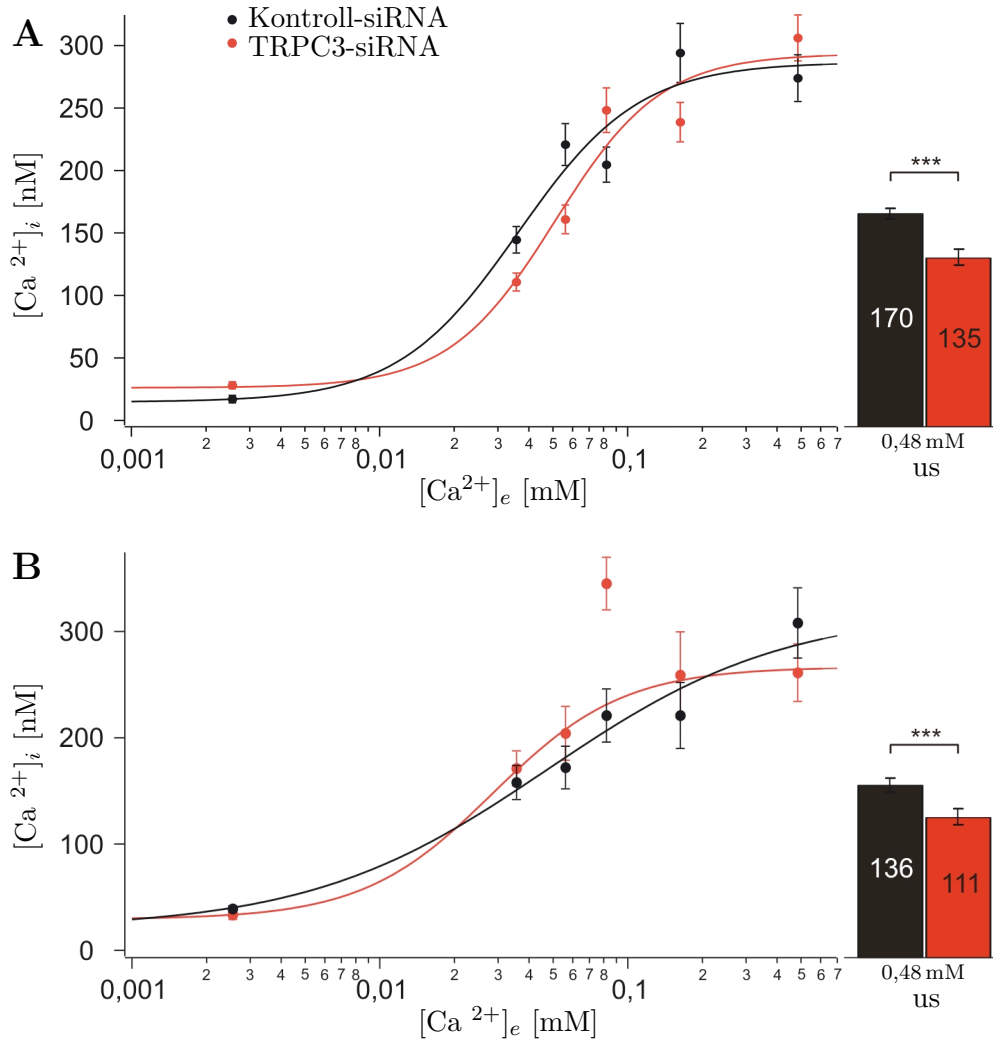


ABBILDUNG 4.15: Einfluss der  $[Ca^{2+}]_i$  in TRPC3-siRNA transfizierten Zellen zwei (A) und drei (B) Tage nach Stimulationsbeginn. Die Zellen wurden mit siRNA gegen TRPC3 (rot) bzw. mit Kontroll-siRNA (schwarz) transfiziert, mit anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Beads stimuliert und in AIM-V®-Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen von EGTA inkubiert. Dargestellt sind nur die Zellen, die während des Experimentes über zehn Minuten einen Beadkontakt hatten. Im Vergleich die  $[Ca^{2+}]_i$  von unstimulierten (us) Zellen, gemessen bei einer  $[Ca^{2+}]_e$  von 0,48 mM. Die Zahlen in den Balken entsprechen der mittleren  $[Ca^{2+}]_i$  in nM. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 11 – 247 Zellen pro Punkt von zwei verschiedenen Spendern. Die  $[Ca^{2+}]_i$  wurden jeweils nach der Hill Gleichung gefittet.

#### 4.5. EINFLUSS VON TRPC3 UND STIM1 AUF DIE $[Ca^{2+}]_I$ IN $CD4^+$ -ZELLEN

---

$[Ca^{2+}]_i$  bei einer  $[Ca^{2+}]_e$  von 485 nM in TRPC3-siRNA transfizierten und Kontrollzellen relativ gleich. Vergleichbar mit den Ergebnissen von STIM1 (Abb. 4.14 B) konnte unter kalziumlimitierenden Bedingungen, bei einer extrazellulären Kalziumkonzentration zwischen 36 nM und 56 nM, eine kleine aber signifikante Reduktion der  $[Ca^{2+}]_i$  in TRPC3-siRNA transfizierten Zellen gemessen werden ( $p < 0,05$ ). An Tag 3 nach Stimulationsbeginn wurde wie in STIM1-siRNA transfizierten Zellen eine höhere steady-state  $[Ca^{2+}]_i$  auch in TRPC3-siRNA transfizierten Zellen gemessen. In unstimulierten  $CD4^+$ -Zellen konnte an Tag 2 und 3 eine um bis zu 23% reduzierte  $[Ca^{2+}]_i$  in TRPC3-siRNA transfizierten Zellen nachgewiesen werden.

In Übereinstimmung mit der Arbeit von Brechard et. al. [6], die zeigte, dass TRPC3 keinen Einfluss auf den speichergesteuerten Kalziumeinstrom hat, konnte auch von unserer Arbeitsgruppe im Kalziumeinstrom nach Speicherentleerung mit Thapsigargin kein Unterschied zwischen Kontroll- und TRPC3-siRNA transfizierten  $CD4^+$ -Zellen gemessen werden. Jedoch weisen diese Experimente auf einen Einfluss von TRPC3 auf die steady-state Kalziumkonzentration in T-Zellen hin.

## *ERGEBNISSE*

---

## Kapitel 5

# Diskussion

Kalzium spielt eine Schlüsselrolle für die Aktivierung und Proliferation der T-Zelle [76]. Der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  über die Plasmamembran ist ein entscheidender Prozess, wobei das extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  die wichtigste Kalziumressource darstellt. Der Einstrom von Kalzium findet über speichergesteuerte kalziumselektive CRAC-Kanäle statt (rev. in [40]). Da das extrazelluläre Kalzium entscheidend für die Proliferation der T-Zelle ist [76], wurde im ersten Teil dieser Arbeit die intrazelluläre Kalziumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) im Steady-State in primären stimulierten  $\text{CD4}^+$ -Zellen in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalziumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ) untersucht. Um möglichst physiologische Bedingungen zu gewährleisten, wurden alle Messungen bei  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt und die  $\text{CD4}^+$ -Zellen wurden fokale mit anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Polystyrenmikropartikeln (Beads) stimuliert. Die fokale Stimulation ist der Stimulation mit löslichen Antikörpern oder mit Thapsigargin, dem Inhibitor der SERCA-Pumpen, überlegen, da Prozesse erhalten bleiben, die durch die Polarisierung der Zelle infolge der Ausbildung einer Immunologischen Synapse stattfinden. Zudem zeigt der Kalziumeinstrom über die Plasmamembran nach Zugabe von Thapsigargin eine andere Kinetik als nach Stimulation mit Beads [68] und ist nach Beadstimulation der  $\text{CD4}^+$ -Zellen höher als bei der Zugabe löslicher Antikörper [68].

Eine Abnahme der  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  in primären beadstimulierten  $\text{CD4}^+$ -Zellen führte zu einer Reduktion der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Dies belegt die Bedeutung des extrazellulären Kalziums für den intrazellulären Kalziumspiegel. Für die Konstanthaltung des Ruhekalziums spielt wahrscheinlich die spontane Aktivierung der CRAC-Kanäle eine Rolle. Die Arbeitsgruppe von I. Schulz zeigte, dass in RBL-1 Zellen bei einer geringen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zwischen 30 nM und 50 nM der  $I_{\text{CRAC}}$  unabhängig von der Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher aktiviert wird. Diese spontane Aktivierung des  $I_{\text{CRAC}}$  bei niedriger  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  fungiert als Feedback-Mechanismus zur Konstanthaltung des Ruhekalziums [39].

Eine genauere Analyse der Kinetik der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zeigte, dass auch die Morphologie der Kalziumsignale von der  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  abhängt. Das heißt, die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in den einzelnen Zellen ist keine konstante Größe, sondern ändert sich bereits über einen Zeitraum von zehn Minuten in Form von einzelnen transienten Anstiegen bis hin zu Oszillationen, wobei die Häufigkeit und Amplitude der Transienten

bei einer Reduktion der  $[Ca^{2+}]_e$  abnimmt. Die Transienten mit einer mittleren  $[Ca^{2+}]_i$  von 209 nM wurden nur bis zu einer  $[Ca^{2+}]_e$  von größer als 36  $\mu$ M gemessen. Da bei Reduktion der  $[Ca^{2+}]_e$  die Proliferation stärker abnahm als die mittlere  $[Ca^{2+}]_i$ , könnte das Fehlen dieser Transienten eine Ursache für die Diskrepanz zwischen Proliferation und mittlerer  $[Ca^{2+}]_i$  sein.

Für eine maximale Proliferation von primären CD4<sup>+</sup>-Zellen ist eine  $[Ca^{2+}]_e$  von 130  $\mu$ M ausreichend. In diesem Bereich ist die  $[Ca^{2+}]_i$  in CD4<sup>+</sup>-Zellen konstant geblieben. Der Kalziumeinstrom durch den CRAC-Kanal wird allerdings bei einer  $[Ca^{2+}]_e$  von 130  $\mu$ M um den Faktor zehn reduziert [29]. Es lässt sich vermuten, dass insofern 10% der CRAC-Aktivität für eine Konstanzhaltung der  $[Ca^{2+}]_i$  ausreicht. Das würde bedeuten, eine geringe extrazelluläre Kalziumkonzentration reicht aus, um die intrazelluläre Kalziumkonzentration und damit die Aktivierung und Proliferation der Zelle aufrecht zu erhalten. In vivo könnte die Kalziumkonzentration in Lymphknoten während einer Inflammation ein limitierender Faktor sein. Die freie Kalziumkonzentration in Lymphknoten ist zwar nicht bekannt, dennoch kann anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen vermutet werden, da 99% des Lymphknotens aus Zellen bestehen und nur ca. 1% aus Extrazellularraum, dass das freie Kalzium limitierend sein könnte.

Von unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass bei einer Unterschreitung einer  $[Ca^{2+}]_e$  von 50  $\mu$ M die Zellen apoptotisch werden. Bei einer  $[Ca^{2+}]_e$  größer als 50  $\mu$ M dominiert die Proliferation. In beadstimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen betrug die  $[Ca^{2+}]_i$  bei einer  $[Ca^{2+}]_e$  von 50  $\mu$ M 170 nM. In diesem Bereich haben kleine Änderungen in der  $[Ca^{2+}]_e$  große Änderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  zur Folge. Dass die  $[Ca^{2+}]_e$  die  $[Ca^{2+}]_i$  in entscheidendem Maße beeinflusst, lässt darauf schließen, wie über die  $[Ca^{2+}]_i$  die Balance zwischen Apoptose und Proliferation kontrolliert wird. Geringe Änderungen in der  $[Ca^{2+}]_i$  haben insofern großen Einfluss auf die T-Zell vermittelte Immunantwort. Dass ein geringer Kalziumeinstrom über die CRAC-Kanäle ausreicht, um eine Aktivierung und Proliferation der T-Zellen zu gewährleisten, ist mit der Tatsache übereinstimmend, dass heterozygote SCID Patienten kein Anzeichen für eine Immundefizienz zeigen. Allerdings ist ein Defekt im kapazitiven Kalziumeinstrom in T-Zellen mit einer Mutation in ORAI1 unter kalziumlimitierenden Bedingungen beschrieben [19]. Wenn also Apoptose und Proliferation so entscheidend über die  $[Ca^{2+}]_i$  in CD4<sup>+</sup>-Zellen reguliert werden, kann man sich vorstellen, welchen Einfluss eine medikamentöse Beeinflussung des Kalziumeinstroms durch einen CRAC-Kanalblocker in der Therapie von Erkrankungen mit überschießender Immunantwort wie beispielsweise Asthma bronchiale oder Morbus Chron haben kann. Dass das intrazelluläre Kalzium bei Apoptose in T-Zellen eine Rolle spielt, hat auch die Arbeit von Contini et al. gezeigt. Sie postulieren, dass die Apoptose von zytotoxischen T-Zellen sowohl über einen kalziumabhängigen Kalzium-Calmodulin-Signalweg, als auch über einen kalziumunabhängigen Proteinkinase C-Signalweg eingeleitet werden kann [9].

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von STIM1 und TRPC3 auf die steady-state  $[Ca^{2+}]_i$  in CD4<sup>+</sup>-Zellen mittels RNAi untersucht. Expressionsanalysen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass TRPC3 nach Stimulation hochreguliert wird. Insofern liegt es nahe, dass TRPC3 nach der Aktivierung

---

von primären CD4<sup>+</sup>-Zellen eine Rolle spielt [58]. Deshalb wurde untersucht, welchen Einfluss TRPC3 auf die Kalziumhomöostase in CD4<sup>+</sup>-Zellen hat. Zunächst wurde die Effizienz der Herunterregulation mittels RNAi in primären CD4<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen. Da der Nachweis des Effektes der verwendeten TRPC3-siRNA in primären CD4<sup>+</sup>-Zellen auf mRNA-Ebene bisher leider noch nicht möglich war und ein Nachweis mittels Immunfluoreszenz wegen fehlender spezifischer TRPC3-Antikörper bisher auch nicht durchzuführen war, wurde STIM1 als Positivkontrolle für den Nachweis der Effizienz der RNAi verwendet. Mittels Immunfluoreszenz wurde eine Herunterregulation von STIM1 in STIM1-siRNA transfizierten Zellen an Tag 1 und 2 nach Stimulationsbeginn nachgewiesen. Es wurde außerdem festgestellt, dass an Tag 3 nach Stimulationsbeginn der STIM1-Gehalt in STIM1-siRNA transfizierten Zellen höher war als in den Kontrollzellen. Auch der Kalziumeinstrom nach Speicherentleerung war an Tag 3 in STIM1-siRNA transfizierten Zellen höher als in Kontrollzellen. Dies lässt vermuten, dass die siRNA zu diesem Zeitpunkt in den Zellen bereits abgebaut war und die Zellen STIM1 hochregulierten, um eine Aktivierung und Proliferation der Zellen sicherzustellen und den bisherigen Defekt im Kalziumhaushalt auszugleichen. Im Gegensatz zu den stimulierten Zellen änderte sich der STIM1-Gehalt mit zunehmender Inkubationsdauer nur geringfügig. Dies weist darauf hin, dass in stimulierten Zellen der STIM1-Gehalt für die Aktivierung und Proliferation der Zellen hochreguliert wird. Da in der Immunfluoreszenz nur Zellen ohne Beadkontakt ausgewertet werden konnten (Abschnitt 4.5.1), ist zu vermuten, dass der STIM1-Gehalt in voll stimulierten Zellen mit Beadkontakt insgesamt noch höher liegt als in Abbildung 4.11 angegeben.

Welchen Einfluss STIM1 auf die steady-state  $[Ca^{2+}]_i$  in primären CD4<sup>+</sup>-Zellen hat, war zu dem Zeitpunkt der Experimentplanung und Durchführung noch nicht klar. Daher wurde in STIM1-siRNA und Kontroll-siRNA transfizierten Zellen die  $[Ca^{2+}]_i$  in beadstimulierten und unstimulierten Zellen unter kalziumlimitierenden Bedingungen gemessen. An Tag 1 und 2 nach Stimulationsbeginn war die  $[Ca^{2+}]_i$  in STIM1-siRNA transfizierten Zellen gegenüber der Kontrolle reduziert und an Tag 3 wurde in STIM1-siRNA transfizierten Zellen eine geringe Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  gemessen. Dies bestätigt ebenfalls die Hochregulation der Expression von STIM1 in STIM1-siRNA transfizierten Zellen an Tag 3 nach Stimulationsbeginn. Anhand der Resultate konnte ein Einfluss von STIM1 auf die steady-state  $[Ca^{2+}]_i$  in primären CD4<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe von T. Meyer veröffentlichte nach dem Abschluss der Experimente dieser Arbeit, dass im Wesentlichen STIM2 für die Regulation des Ruhekalziums in CD4<sup>+</sup>-Zellen verantwortlich ist [5]. Die zytosolische Kalziumkonzentration ist das Resultat aus dem Zusammenspiel des Ca<sup>2+</sup> Ein- und Ausstrom über die Plasmamembran und dem Ein- und Ausstrom aus dem ER. Sie konnten zeigen, dass eine Herunterregulation von STIM2 die basale Kalziumkonzentration sowohl im Zytosol als auch im ER reduziert und eine Überexpression von STIM2 diese erhöht. STIM2 kann wie STIM1 den SOCE über die Regulation von ORAI1-Kanälen aktivieren. STIM2 ist im Gegensatz zu STIM1 bei einer basalen  $[Ca^{2+}]$  des ER bereits aktiviert. Geringe Änderungen in der  $[Ca^{2+}]$  im ER werden von STIM2 registriert und führen entsprechend bei einer geringen Reduktion der  $[Ca^{2+}]$  im ER zu einer stärkeren Aktivierung

des SOCE. Im Gegenzug dazu ist für die Aktivierung von STIM1 ein stärkerer Abfall in der  $[Ca^{2+}]$  des ER notwendig. Insofern postulieren sie, dass STIM2 das hauptverantwortliche Protein zur Stabilisierung des Ruhekalziums darstellt [5]. Allerdings wurden diese Untersuchungen in Zelllinien und nicht in primären Zellen durchgeführt. Das heißt, dass eine Beteiligung von STIM1 an der Regulation des steady-state  $[Ca^{2+}]_i$  in humanen T-Zellen, so wie es in dieser Arbeit gezeigt wurde, möglich ist. Um diese Frage abschließend zu klären, müsste auch der Einfluss einer STIM2 Herunterregulation auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in primären Zellen untersucht werden.

Nachdem anhand von STIM1 die Effizienz der Herunterregulation mittels RNAi in primären CD4<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde im nächsten Schritt die  $[Ca^{2+}]_i$  in TRPC3-siRNA transfizierten CD4<sup>+</sup>-Zellen untersucht. An Tag 2 nach Stimulationsbeginn mit anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Beads konnte wie bei STIM1 eine geringe aber signifikante Reduktion der  $[Ca^{2+}]_i$  in TRPC3-siRNA transfizierten CD4<sup>+</sup>-Zellen unter kalziumlimitierenden Bedingungen gemessen werden. Ebenso konnte eine geringere  $[Ca^{2+}]_i$  in TRPC3-siRNA transfizierten, unstimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen 5 bzw. 6 Tage nach Transfektion gezeigt werden. Dies lässt auf eine Beteiligung von TRPC3 bei der Regulation des steady-state  $[Ca^{2+}]_i$  in CD4<sup>+</sup>-Zellen schließen.

Ein Problem ist, dass die Unterschiede zwischen Kontroll- und STIM1- bzw. TRPC3-siRNA transfizierten Zellen sehr klein sind. Eine Ursache dafür könnte in der Stabilität der verwendeten siRNA liegen. Die Halbwertszeit der siRNA hängt in entscheidendem Maße von der Aktivität der intrazellulären Nukleasen ab. 2008 wurden siRNA mit längerer Halbwertszeit in primären T-Lymphozyten veröffentlicht, was durch eine chemische Modifikation der Sequenzen erreicht worden war. Damit konnte eine Stabilität der siRNA von bis zu zwei Wochen in nicht teilenden Zellen erreicht werden [52]. Ein weiteres Problem stellt die Turn-over-Rate der untersuchten Membranproteine dar. Insbesondere für TRPC3 konnte auf Proteinebene wegen fehlender spezifischer Antikörper kein Verlauf der Expression von TRPC3 nach Transfektion durchgeführt werden, um den größtmöglichen Effekt der siRNA zeitlich zu bestimmen. Die Proliferationsexperimente in TRPC3-siRNA transfizierten Zellen dienten zur Abschätzung der Tage an denen die Messungen zur Bestimmung der  $[Ca^{2+}]_i$  in TRPC3-siRNA transfizierten Zellen durchgeführt wurde. Als Schwierigkeit kommt hinzu, dass TRPC3 mit TRPC1 heteromere Komplexe bilden kann [75]. Liegt ein solches Heteromer in vivo vor, könnte bei einer Herunterregulation von TRPC3 die Funktion von einem etwaig mit TRPC3 heteromultimerisierten TRP-Kanal übernommen werden und dadurch einen sichtbaren Effekt der siRNA abschwächen. Dass insbesondere in stimulierten Zellen die Effekte tendenziell nicht so stark ausgeprägt sind wie in unstimulierten Zellen, könnte daran liegen, dass die jeweilige Messung über zehn Minuten nur eine Momentaufnahme liefert. Da ein großer Unterschied in der  $[Ca^{2+}]_i$  zwischen Zellen mit und ohne Beadkontakt liegt, die Zellen zwar getrennt analysiert worden sind, kann trotzdem nicht beurteilt werden, ob und wie lange die Zellen vor dem Experiment einen Beadkontakt hatten. Die nächste Schwierigkeit lag in der Verwendung von primären Zellen. Das heißt, dass eine gewisse Variabilität unter den einzelnen Spendern zu berücksichtigen ist.

---

Über die physiologische Funktion von TRPC3 in vivo sind in den letzten Jahren einige Erkenntnisse gewonnen worden. TRPC3 scheint eine Rolle in der Funktion des zentralen Nervensystems (ZNS) zu haben. Es ist hauptsächlich in Herz und ZNS exprimiert, insbesondere im Zerebellum. In neonatalen Ratten führt der Knockout von TRPC3 zu der Apoptose von Granulazellen des Kleinhirns (rev. in [81]). Becker et al. identifizierten eine heterozygote *trpc3* Punktmutation, die in den betroffenen Mäusen zu einer Störung der Entwicklung der Purkinjezellen im Kleinhirn führt und eine zerebellare Ataxie verursacht [2]. Rodriguez-Santiago et al. haben in TRPC3 Knockoutmäusen eine rezessiv vererbte Motoneuronenerkrankung beschrieben [70]. Daneben wurde gezeigt, dass eine Deletion von TRPC3 in Mäusen den SOCE in Azinuszellen des Pankreas um 50% reduziert, was ein Hinweis dafür liefert, dass TRPC3 in vivo als SOCE fungiert. Der reduzierte Kalziumeinstrom in den aus TRPC3 Knockoutmäusen isolierten Azinuszellen führt zu geringeren Kalziumoszillationen und schützt die Mäuse vor einer akuten Pankreatitis [38]. In Mastzellen scheint TRPC3 an einem ROCE beteiligt zu sein, der für eine volle Degranulation der Mastzellen notwendig ist [74]. In Meerschwein und Maus trägt TRPC3 zur Kalziumhomöostase in den Haarzellen der Cochlea bei [80]. In Patienten mit Idiopathischer Pulmonaler Hypertonie wurde eine erhöhte Expression von TRPC3 in den glatten Muskelzellen der pulmonalen Arterien gefunden, die zu einer Hypertrophie der glatten Muskelzellen führt [89].

Welche Rolle TRPC3 im Kalziumeinstrom in T-Zellen hat, ist noch nicht geklärt. Es scheint unwahrscheinlich, dass TRPC3 auf den speichergesteuerten Kalziumeinstrom direkt einen Einfluss hat. Im Kalziumeinstrom nach Speicherentleerung mit Thapsigargin konnte bisher kein Unterschied zwischen Kontroll- und TRPC3-siRNA transfizierten CD4<sup>+</sup>-Zellen festgestellt werden [6, 66].

Die meisten Studien postulieren für TRPC3 einen SOCE unabhängigen Aktivierungsmechanismus (rev. in [6]), einen so genannten „receptor-operated Ca<sup>2+</sup> entry“ (ROCE). In diesem Fall führt die Bindung eines Agonisten an einen G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptor zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die Phosphoinositol-4,5-bisphosphat in DAG und IP<sub>3</sub> spaltet. Es wurde gezeigt, dass TRPC3 sowohl von DAG [26] als auch über die PLC direkt [55] aktiviert werden kann. Der Rezeptor vermittelte Kalziumeinstrom kann dann sowohl über nicht-selektive Kalziumkanäle wie z. B. TRPC3 oder über den CRAC-Kanal infolge der Speicherentleerung nach IP<sub>3</sub>-Rezeptoraktivierung stattfinden (rev. in [4]).

Auf die Frage, welchen Einfluss TRPC3 auf den Kalziumeinstrom in T-Zellen hat, lassen sich verschiedene Antwortmöglichkeiten in Betracht ziehen. TRPC3 könnte einen eigenen Kanal bilden. Da TRPC3 einen unselektiven Kationenkanal darstellt, würde neben Kalzium auch Natrium in die Zelle einströmen und demzufolge die Zelle depolarisieren, was im Gegenzug zu einer Reduktion des SOCE infolge der Inhibition des CRAC-Kanals führen würde [40].

Des Weiteren ist denkbar, dass eine Interaktion von TRPC3 mit dem Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher besteht, wie sie bereits in HEK-293 beschrieben wurde [72]. Durch TRPC3 einströmendes Na<sup>+</sup> könnte einen Kalziumeinstrom in die Zelle zur Folge haben, wenn der Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher in einem Umkehrmechanismus Na<sup>+</sup> im Gegenzug zu Ca<sup>2+</sup> aus der Zelle herauspumpt. Allerdings gibt es bisher kei-

nen Hinweis für die Existenz eines  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers in T-Zellen [15].

Letztlich ist auch eine Mitwirkung von TRPC3 am kapazitiven Kalziumeinstrom in T-Zellen nicht auszuschließen. Mehrere Publikationen sprechen dafür. Dazu gehört die Interaktion von TRPC1 und TRPC3 mit STIM1. TRPC1 kann direkt durch STIM1 aktiviert werden, während TRPC3 indirekt über die Heteromultimerisierung von TRPC3 mit TRPC1 aktiviert wird [90]. Kim et al. zeigten, dass in HEK-Zellen die Interaktion von TRPC1 mit STIM1 für die Aktivierung von ORAI1 notwendig ist, während in Jurkat-T-Zellen ORAI1 und STIM1 unabhängig von TRPC-Kanälen interagieren. Sie postulieren, SOCE-Kanäle könnten je nach Zelltyp aus verschiedenen Proteinkomplexen zusammengesetzt sein. Denkbar sind Komplexe aus ORAI1-STIM1, TRPC-STIM1 oder ORAI1-STIM1-TRPC [37]. Auch die Arbeitsgruppe von L. Birnbaumer postuliert, dass ein heteromerer Komplex aus ORAI1 und TRPC-Kanälen für den SOCE verantwortlich ist. Sie zeigten eine Interaktion von TRPC3 und TRPC6 mit ORAI1. Die Beteiligung von TRPC-Kanälen am SOCE belegen sie mit Studien in HEK-Zellen, in denen heterolog exprimiertes ORAI1 den Thapsigargin vermittelten Kalziumeinstrom in Zellen erhöht, die mit TRPC3 oder TRPC6 koexprimiert wurden [50]. Ihre Hypothese ist, dass der TRPC/ORAI Komplexes als SOCE oder ROCE fungieren kann. Dies ist abhängig von der Lokalisation des Komplexes in der Plasmamembran (Abb. 5.1). Der TRPC/ORAI-Komplex kann entweder innerhalb oder außerhalb von so genannten „Lipid Rafts“ liegen. Darunter versteht man bestimmte Membrankompartimente, die reich an Cholesterin und Sphingomyelin sind. Liegt der Komplex aus TRPC/ORAI außerhalb der Lipid Raft, kann durch die Bindung eines Agonisten an einen  $G_q$ -gekoppelten Rezeptor der ROCE aktiviert werden. Findet infolge einer Speicherentleerung die Aktivierung von STIM1 statt, wird der TRPC/ORAI-Komplex in die Lipid Raft rekrutiert und eine SOCE findet statt [47]. Der C-Terminus von STIM1 kann dabei an das C-terminale Ende von ORAI1 anbinden [57] und mit dem C-Terminus von TRPC1 interagieren [93].

Diese Arbeit konnte den Einfluss von TRPC3 und STIM1 auf die steady-state  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in primären  $\text{CD4}^+$ -Zellen untermauern. Nichtsdestotrotz wird die Rolle von TRPC3 auf die Regulation der Kalziumhomöostase in T-Lymphozyten nach wie vor kontrovers diskutiert [77]. Weitere Studien werden notwendig sein, um die molekulare Identität und die genauen Aktivierungsmechanismen des SOCE und ROCE in T-Zellen zu identifizieren.

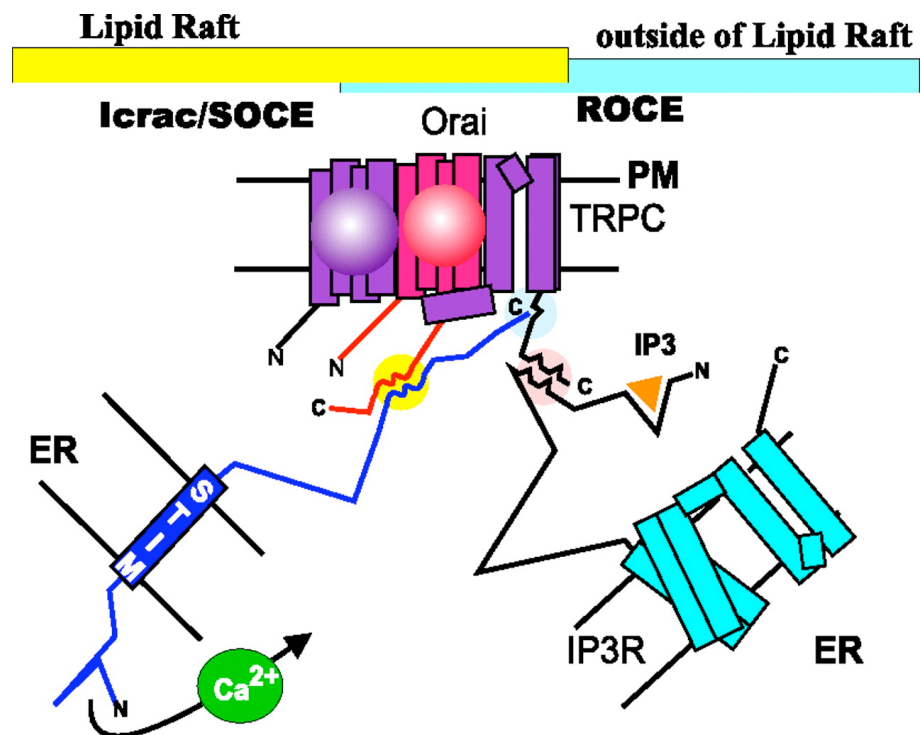


ABBILDUNG 5.1: Der Komplex aus TRPC (lila) und ORAI (rot) fungiert außerhalb der Lipid Raft als ROCE und innerhalb der Lipid Raft als SOCE. Die Aktivierung des SOCE verbunden mit der Rekrutierung in die Lipid Raft findet durch STIM1 statt. STIM1 kann sowohl an das C-terminale Ende von ORAI (gelb) anbinden, als auch mit dem C-Terminus von TRPC (hellblau) interagieren. Der IP3-Rezeptor (cyan) ist in seiner aktivierten Form gezeigt, in der er an TRPC binden kann (rosa) und so den ROCE aktiviert [47].



# Literaturverzeichnis

- [1] ABRAMOWITZ, J., YILDIRIM, E. & BIRNBAUMER, L. (2006). The TRPC family of ion channels: Relation to the TRPC superfamily and role in Receptor and Store-Operated Calcium Entry, in TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades, ed Liedke W **CRC Press, Boca Raton, FL** 1-30.
- [2] BECKER, E. B., OLIVER, P. L., GLITSCH, M. D., BANKS, G. T., ACHILLI, F., HARDY, A., NOLAN, P. M., FISHER, E. M. & DAVIES, K. E. (2009). A point mutation in TRPC3 causes abnormal Purkinje cell development and cerebellar ataxia in moonwalker mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 106, 6706-6711.
- [3] BAUTISTA, D. M. & LEWIS, R. (2004). Modulation of plasma membrane calcium-ATPase activity by local calcium microdomains near CRAC channels in human T cells. **Journal of Physiology**. 556, 805-817.
- [4] BIRNBAUMER, L. (2009) The TRPC Class of Ion Channels: A Critical Review of Their Roles in Slow, Sustained Increases in Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  Concentrations\* **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. 49, 395-426.
- [5] BRANDMAN, O., LIOU, J., PARK, W. S. & MEYER, T. (2007). STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  levels. **Cell**. 131, 1327-1339.
- [6] BRECHARD, S., MELCHIOR, C., PLANCON, S., SCHENTEN, V. & TSCHIRHART, E. J. (2008). Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels formed by TRPC1, TRPC6 and ORAI1 and non-store-operated channels formed by TRPC3 are involved in the regulation of NADPH oxidase in HL-60 granulocytes. **Cell Calcium**. 44, 492-506.
- [7] CAHALAN, M. D. (2009). STIMulating store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. **Nature Cell Biology**. 11, 669-677.
- [8] CLAPHAM, D. E. (2007). SnapShot: mammalian TRP channels. **Cell**. 129, 220.
- [9] CONTINI, P., GHIO, M., MERLO, A., POGGI, A., INDIVERI, F. & PUPPO, F. (2005). Apoptosis of antigen-specific T lymphocytes upon the engagement of CD8 by soluble HLA class I molecules is Fas Ligand/Fas mediated:

- evidence for the involvement of p56lck, calcium calmodulin kinase II, and calcium-independent protein kinase C signaling pathways and for NF- $\kappa$ B and NF-AT Nuclear translocation. **J. Immunol.** 175, 7244-7254.
- [10] CULLINAN, P., SPERLING, A. I. & BURKHARDT J. K. (2002). The distal pole complex: a novel membrane domain distal to the immunological synapse. **Immunological Review.** 189, 111-122
- [11] DEHAVEN, W. I., SMYTH, J. T., BOYLES, R. R. & PUTNEY, J. W., JR. (2007). Calcium inhibition and calcium potentiation of ORAI1, ORAI2, and ORAI3 calcium release-activated calcium channels. **Journal of Biological Chemistry.** 282, 17548-17556.
- [12] DENG, X., WANG, Y., ZHOU, Y., SOBOLOFF, J. & GILL, D. L. (2009). STIM and ORAI: Dynamic intermembrane coupling to control cellular calcium signals. **Journal of Biological Chemistry.** 284, 22501-22505.
- [13] DOLMETSCH, R. E., LEWIS, R. S., GOODNOW, C. C. & HEALY, J. I. Differential activation of transcription factors induced by  $\text{Ca}^{2+}$  response amplitude and duration. **Nature.** 386, 855-858.
- [14] DOLMETSCH, R. E. & LEWIS, R. (1994). Signaling between intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores and depletion-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels generates  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations in T lymphocytes. **J. Gen. Physiology.** 103, 365-388.
- [15] DONNADIEU, E. & TRAUTMANN, A. (1993). **Pflugers Arch.** 424, 448-455.
- [16] FANGER, C., HOTH, M., CRABTREE, G. R. & LEWIS, R. S. (1995). Characterization of t cell mutants with defects in capacitive calcium entry: genetic evidence for physiological roles of CRAC channels. **Journal of Cell Biology.** 131, 655-667.
- [17] FESKE, S., GILTNER, J., DOLMETSCH, R., STAUDT, L. M. & RAO, A. (2001). Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. **Nature Immunology.** 2, 316-324.
- [18] FESKE, S. M., PRAKRIYA, M., RAO, A. & LEWIS, R. S. (2005). A severe defect in CRAC  $\text{Ca}^{2+}$  channel activation and altered  $\text{K}^{+}$  channel gating in T cells from immunodeficient patients. **J Exp Med.** 202, 651-662.
- [19] FESKE, S., GWACK, Y., PRAKRIYA, S., SRIKANTH, S., PUPPEL, S. H., TANASA, B., HOGAN, P. G., LEWIS, R. S., DALY, M. & RAO, A. (2006). A mutation in ORAI1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. **Nature.**
- [20] FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature.** 391, 806-811.

- [21] FREIBERG, B. A., KUPFER, H., MASLANIK, W., DELLI, J., KAPPLER, J., ZALLER, D. M. & KUPFER, A (2002). Staging and resetting T cell activation in SMACs. **Nature Immunology**. 3, 911-917.
- [22] GALLO, E., CANTRE-BARRETT, K. & CABTREE, G. R. (2006). Lymphocyte calcium signaling from membrane to nucleus. **Nature Immunology**. 7, 25-32.
- [23] GRYNKIEWIECZ, G., POENIE, M. & TSIEN, R. Y. (1985). A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. **Journal of Biological Chemistry**. 260, 3440-3450.
- [24] GWACK, Y., SRIKANTH, S., FESKE, S., CRUZ-GUILLOT, F., OH-HORA, M., NEEMS, D. S., HOGAN, P. G. & RAO, A. (2007). Signalling to transcription: store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry and NFAT activation in lymphocytes. **Journal of Biological Chemistry**. 282, 16232-16243.
- [25] HARDI, R.C. & MINKE, B. (1993). Novel  $\text{Ca}^{2+}$  channels underlying transduction in Drosophila photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization. **Trends Neurosci**. 16, 371-376.
- [26] HOFMANN, T., OBUKHOF, A. G., SCHÄFER, M., HARTENECK, C., GUDERMANN, G. T. & SCHULTZ, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. **Nature** 397, 259-263.
- [27] HOFMANN, T., SCHAEFER, M., SCHULTZ, G. & GUDERMANN, T. (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. **Proc Natl Acad Sci USA**. 99, 7461-7466.
- [28] HOTH, M. & PENNER, R. (1992). Depletion of intracellular calcium store activates a calcium current in mast cells. **Nature**. 355, 353-356.
- [29] HOTH, M. & PENNER, R. (1993). Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. **Journal of Physiology**. 465, 359-386.
- [30] HUPPA, J. B., GLEIMER, M., SUMEN, C. & DAVIS, M. M. (2003). Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. **Nature Immunology**. 4, 749-755.
- [31] JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M. & SHLOMCHIK, M. (2002). Immunologie. Spektrum Verlag, 5. Auflage
- [32] JARDIN, I., GOMEZ, L. J., SALIDO, G. M., ROSADO, J. A. (2009) Dynamic interaction of hTRPC6 with the ORAI1-STIM1 complex or hTRPC3 mediates its role in capacitative or non-capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry pathways. **Biochem J**. 420, 267-76.
- [33] JI, W., XU, P., LI, Z., LU, J., LIU, L., ZHANG, Y., CHEN, Y., HILLE, B., XU, T. & CHEN, L. (2008). Functional stoichiometry of the unitary calcium-release-activated calcium channel. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 105, 13668-13673.

- [34] INVITROGEN. Fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  indicators excited with uv light. **Manuals & Documents**. [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com).
- [35] IONOPTIX. Tools for cardiovascular research, ion optic, contractility and ratiometric fluorescence systems.  
[www.ionoptix.com/resources/technical\\_notes/fluorescence\\_calibration](http://www.ionoptix.com/resources/technical_notes/fluorescence_calibration).
- [36] KAMRADT, T. (2007).  $\text{T}_H17$  Zellen. **Zeitschrift für Rheumatologie**. 66, 54-55
- [37] KIM, M. S., ZENG, W., YUAN, J. P., SHIN, D. M., WORLEY, P. F. & MUALLEM, S. (2009). Native store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  influx requires the channel function of ORAI1 and TRPC1. **Journal of Biological chemistry**. 284, 9733-9741.
- [38] KIM, M. S., HONG, J. H., LI, Q., SHIN, D. M., ABRAMOWITZ, J., BIRNBAUMER, L. & MUALLEM, S. (2009). Depletion of TRPC3 in mice reduced store operated  $\text{Ca}^{2+}$  influx and the severity of acute pancreatitis. **Gastroenterology**. 137, 1509-1517.
- [39] KRAUSE, E., SCHMID, A., GONZALEZ, A. & SCHULZ, I. (1999). Low cytoplasmatic  $[\text{Ca}^{2+}]$  activates  $\text{I}_{\text{CRAC}}$  independently of global  $[\text{Ca}^{2+}]$  store depletion in RBL-1 cells. **Journal of Biological chemistry**. 274, 36957-36962.
- [40] KUMMEROW, C., JUNKER, C., KRUSE, K., RIEGER, H., QUINTANA, A. & HOTH, M. (2009). The immunological synapse controls local and global calcium in T lymphocytes. **Immunol. Rev.** 231, 132-147.
- [41] KURRECK, J. (2009). RNA Interference: from basic research to therapeutic applications. **Angewandte Chemie International Edition**. 48, 1378-1398.
- [42] LE DEIST, F., HIVROZ, C., PARTISETI, M., THAMAS, C., BUC, H. A., OLEASTRO, M., BELOHRADSKY, B., CHOQUET, D. & FISCHER, A. (1995). A primary T-cell immunodeficiency associated with defective transmembrane calcium influx. **Blood**. 85, 1053-1062.
- [43] LEWIS, R. S. (2001). Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. **Annual Review Immunology**. 19, 497-521.
- [44] LI, Q. & VERMA, I. M. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. **Nat. Review Immunology**. 2, 725-734.
- [45] LIOUDYNO, M. I., KOZAK, A., PENNA, A., SAFRINA, O., ZHANG, S. L., SEN, D., ROOS, J., STAUDERAN, K. A. & CAHALAN, M.D (2008). ORAI1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation. **PNAS**. 105, 2011-2016.
- [46] LIOU, J., KIM, M. L., HEO, W. D., JONES, J. T., MYERS, J. W., FERRELL, J. E., JR & MEYER, T. (2005). STIM is a  $\text{Ca}^{2+}$  sensor essential for  $\text{Ca}^{2+}$ -store-depletion-triggered  $\text{Ca}^{2+}$  influx. **Curr. Biology**. 15, 1235-1241.

- [47] LIA, Y., PLUMMER, N. W., GEORGE, M. D., ABRAMOWITZ, J., ZHU, M. X. & BIRNBAUMER, L. (2009). A role for ORAI in TRPC-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  entry suggests that a TRPC:ORAI complex may mediate store and receptor operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 106, 3202-6.
- [48] LIS, A., PEINELT, C., BECK, A., PARVEZ, S., MONTEILH-ZOLLER, M., FLEIG, A. & PENNER, R. (2007). CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels with distinct functional properties. **Curr. Biol.** 17, 794-800.
- [49] LIAO, Y., ERXLEBEN, C., YILDIRIM, E., ABRAMOWITZ, J., ARMSTRONG, D. L. & BIRNBAUMER, L. (2007). ORAI proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 104, 4682-7.
- [50] LIAO, Y., ERXLEBEN, C., ABRAMOWITZ, J., FLOCKERZI, V., ZHU, M. X., ARMSTRONG, D. L. & BIRNBAUMER, L. (2008) Functional interactions among ORAI1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric ORAI/TRPC model for SOCE/Icrac channels. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 105, 2895-900.
- [51] LUIK, R. M. & LEWIS, R. S. (2007). **Trends Mol Med.** 13, 103-107.
- [52] MANTEL, A., RUTZ, S., JANKE, M., KIRCHHOFF, D., JUNG, U., PATZEL, V., VOGEL, U., RUDEL, T., ANREOU, I., WEBER, M. & SCHEFFOLD, A. (2008). siRNA stabilisation prolongs gene knockdown in primary T lymphocytes. **Eur. Journal of immunology.** 38, 2616-2625.
- [53] MERCER, J. C., DEHAVEN, W. I., SMYTH, J. T., WEDEL, B., BOYLES, R. R., BIRD, G. S. & PUTNEY, J. W., JR. (2006). Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of ORAI1 or ORAI2 with the intracellular calcium sensor, STIM1. **Journal of Biological Chemistry.** 281, 24979-24990.
- [54] MONKS, C. R., FREIBERG, KUPFER, H. SCIACKY, N. & KUPFER, A (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T-cells. **Nature.** 395: 82-86.
- [55] MONTELL, C. (2001). Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. **Science.** 90, re1.
- [56] MONTELL, C., BIRNBAUMER, L. & FLOCKERZI, V. (2002). The TRP channels, a remarkably functional family. **Cell.** 108, 595-8.
- [57] MUIK, M., FRISCHAUF, I., DERLER, I., FAHRNER, M., BERGMANN, J., EDER, P. SCHINDL, R., HESCH, C., POLZINGER, B., FRITSCH, R., KAHR, H., MADL, I., GRUBER, H., GROSCHNER, K. & ROMANIN, C. (2008). Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. **Journal of Biological Chemistry.** 283, 8014-8022.

- [58] NEBLUNG, K.\*, WENNING, A. S.\*, STRAUSS, B., WOLFS, M.-J., SAPPOK, A., HOTH, M. & SCHWARZ, E. C. (2010). TRP expression pattern and the functional importance of TRPC3 in primary human T-cells. Artikel eingereicht.  
\*Autoren haben in gleichem Maße zu dieser Arbeit beigetragen.
- [59] NEGULESCU, P. A., SHASTRI, N. & CAHALAN, M. D. (1994). Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 91, 2873-2877.
- [60] OH-HORA, M., YAMASHITA, M., HOGAN, P. G., SHARMA, S., LAMPERTI, E., CHUNG, W., PRAKRIYA, M., FESKE, S. & RAO, A. (2008). Dual funktion for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation. **Nature Immunology.** 9, 432-442.
- [61] ONG, H. L., CHENG, K. T., LIU, X., BANDYOPADHHYAY, B. C., PARRIA, B. C., SOBOLOFF, J., PANI, B., GWACK, Y., SRIKANTH, S., SINGH, B. B., GILL, D. L. & AMBUDKAR, I.S. (2007) Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-ORAI1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components. **Biol Chem.** 282, 9105-16.
- [62] ORITANI, K. & KINCADE, P. W. (1996). Identification of stromal cell products that interact with pre-B cells. **Journal of Cell Biology.** 134, 771-782.
- [63] OWSIANIK, G., TALAVERA, K., VOETS, T. & NILIUS, B. (2006). Permeation and selectivity of trp channels. **Annu Rev Physiol.** 68, 685-717.
- [64] PARK, C. Y., HOOVER, P. J., MULLINS, F. M., BACHHAWAT, P., COVINGTON, E. D., RAUNSER, S., WALZ, T., GARCIA, K. C., DOLMETSCH, R. E. & LEWIS, R. S. (2009). STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to ORAI1. **Cell.** 136, 876-890.
- [65] PEINELT, C., VIG, M., KOOMOA, D. L., BECK, A., NADLER, M. J., KOBLAN-HUBERSON, M., LIS, A., FLEIG, A., PENNER, R. & KINET, J. P. (2006). Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (ORAI1). **Nat. Cell Biology.** 8, 771-773.
- [66] PHILIPP, B., STRAUSS, B., HIRNET, D., WISSENBAACH, U., MERY, L., FLOCKERZI, V. & HOTH, M. (2003). TRPC3 mediates T-cell receptor-dependent calcium entry in human T lymphocytes. **Journal of Biological Chemistry.** 278, 26629-38.
- [67] PRAKRIYA, M., FESLE, D., GWACK, Y., SRIKANTH, S., RAO, A. & HOGAN, P. G. (2006). ORAI1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. **Nature.** 443, 230-233.

- [68] QUINTANA, A., SCHWINDLING, C., WENNING, A. S., BECHERER, U., RETTIG, J., SCHWARZ, E. C. & HOTH, M. (2007). T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 104, 14418-23.
- [69] RICARDO, E., DOLMETSCH & LEWIS, R., S. (1994). Signaling between intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores and depletion-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels generates  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations in T lymphocytes. **Journal of General Physiology**. 103, 365-388.
- [70] RODRIGUEZ-SANTIAGO, M., MENDOZA-TORRES, M., JIMENEZ-BREMONT, J. F. & LOPEZ-REVILLA, R. (2007). Knockout of the *trpc3* gene causes a recessive neuromotor disease in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 340, 874-879.
- [71] ROOS, J., DI GREGORIO, P. J., YEROMIN, A. V., OHLSEN, K., LIOUDYNO, M., ZHANG, S., SAFRINA, O., KOZAK, J., A.WAGNER, S. L., CAHALAN, M. D., VELICELEBI, G. & STAUDERMAN, K. A. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channel function. **Journal of Cell Biology**. 169, 435-445.
- [72] ROSKER, C., GRAZIANI, A., LUKAS, M., EDER, P., ZHU, M. X., ROMANIN, C., & GROSCHNER, K. (2004). **Journal of Biological Chemistry**. 279, 13696-13704.
- [73] SAGARA, Y. & INESI, G. (1991). Inhibition of the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentration. **Journal of Biological Chemistry**. 266, 13503-6.
- [74] SANCHEZ-MIRANDA, E., IBARRA-SANCHEZ, A. & GONZALEZ-ESPINOSA, C. (2010). Fyn kinase controls FcεRI receptor-operated calcium entry necessary for full degranulation in mast cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 391, 1714-1720.
- [75] SCHAEFER, M. (2005). Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits. **Pflugers Arch**. 451, 35-42.
- [76] SCHWARZ, E. C., KUMMEROW, C., WENNING, A. S., WAGNER, K., SAPPOK, A., WAGGERSHAUSER, K. (NEBLUNG, K.), GRIESEMER, D., STRAUSS, B., WOLFS, M.-J., QUINTANA, A. & HOTH, M. (2007). Calcium dependence of T cell proliferation following focal stimulation. **European Journal of Immunology**. 37, 2723-2733.
- [77] SMYTH, J. T., DEHAVEN, W. I., JONES, B. F., MERCER, J. C., TREBAK, M., VASQUEZ, G. & PUTNEY, J. W. (2006). Emerging perspectives in store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry: Roles of ORAI, Stim and TRP. **Biochimica et Biophysica Acta**.
- [78] SOBOLOFF, J., SPASSOVA, M. A., TANG, X. D., HEWAVITHARANA, T., XU, W. & GILL, D. L. (2006). ORAI1 and STIM reconstitute store-

- operated calcium channel function. **Journal of Biological Chemistry**. 281, 20661-20665.
- [79] STRANGE, K., YAN, X., LORIN-NEBEL, C. & XING, J. (2007). Physiological roles of STIM1 and ORAI1 homologs and CRAC channels in the genetic model organism *Caenorhabditis elegans*. **Cell Calcium**. 42, 193-203.
- [80] TADROS, S. F., KIM, Y., PHAN, P. A. B., BIRNBAUMER, L. & HOUSLEY, G. D. (2010). TRPC3 ion channel subunit immunolocalisation in the cochlea. **Histochem. Cell Biology**. 133, 137-147.
- [81] TREBAK, M. (2010). The puzzling role of TRPC3 channels in motor coordination. **Pflugers Arch.-European Journal of Physiology**. 459, 369-375.
- [82] UTO, A., ARAI, H. & OGAWA, Y. (1991). Reassessment of fura-2 and the ratio method for determination of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. **Cell Calcium**. 12, 29-37.
- [83] VIG, M., PEINELT, C., BECK, A., KOOMOA, D. L., RABAH, D., KOBLAN-HUBERSON, M., KRAFT, S., TURNER, H., FLEIG, A., PENNER, R. & KINET, J. P. (2006). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. **Science**. 312, 1220-1223.
- [84] VIG, M., BECK, A., BILLINGSLEY, J. M., LIS, A., PARVEZ, S., PEINELT, C., KOOMOA, D. L., SOBOLOFF, J., GILL, D. L., FLEIG, A., KINET, J. P. & PENNER, R. (2006). CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. **Curr. Biol.** 16, 2073-2079.
- [85] WILLIAMS, R. T., MANJI, S. S., PARKER, N. J., HANCOCK, M. S., VAN STEKELENBURG, L., EID, J. P., SENIOR, P. V., KAZENWADEL, J. S., SHANDALA, T., SAINT, R., SMITH, P. J. & DZIADEK, M. A. (2001). Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. **Biochem. Journal**. 357, 673-685.
- [86] WOHLFERT, E. & BELKAID, Y. (2008). Role of Endogenous and Induced Regulatory T Cells. **J Clin Immunol**. 28, 707-715.
- [87] WU, M. M., BUCHANAN, J., LUIK, R. M. & LEWIS, R. S. (2006).  $\text{Ca}^{2+}$  store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. **Journal of Cell Biology**. 174, 803-813.
- [88] YEROMIN, A. V., ZHANG, S. L., JIANG, W., YU, Y., SAFRINA, O. & CAHALAN, M. D. (2006). Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of ORAI. **Nature**. 443, 226-229.
- [89] YU, Y., FANTOZZI, I., REMILLARD, C. V., LANDSBERG, J. W., KUNICHIKA, N., PLATOSHYN, O., TIGNO, D. D., THISLETHWAITE, P. A., RUBIN, L. J. & YUAN, J. X. (2004). Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**. 101, 13861-13866.

- [90] YUAN, Y. P., ZENG, W., HUANG, G. N., WORLEY, P. F. & MUALLEM, S. (2007). STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. **Nat Cell Biol.** 9, 636-45.
- [91] ZHANG, S., YEROMIN, A. V., ZHANG, X. H., YU, Y., SAFRINA, O., PENNA, A., ROOS, J. STAUDERMAN, K. A. & CAHALAN, M. D (2006). Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 103, 9357-9362.
- [92] ZHANG, S. L., YU, Y., ROOS, J., KOZAK, J. A., DEERINCK, T. J., ELLISMAN, M. H., STAUDERMAN, K. A. & CAHALAN, M. D. (2005). STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. **Nature.** 437, 902-905.
- [93] ZENG, W., YUAN, J. P., KIM, M. S., CHOI, Y. J., HUANG, G. N., WORLEY, P. F. & MUALLEM, S. (2008). STIM1 gates TRPC channels, but not ORAI1, by electrostatic interaction. **Mol Cell.** 32, 439-448.

# 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)).

# Publikationen

- SCHWARZ, E. C., KUMMEROW, C., WENNING, A. S., WAGNER, K., SAPPOK, A., WAGGERSHAUSER, K. (NEBLUNG, K.), GRIESEMER, D., STRAUSS, B., WOLFS, M.-J., QUINTANA, A. & HOTH, M. (2007). Calcium dependence of T cell proliferation following focal stimulation. **European Journal of Immunology**. 37, 2723-2733.
- NEBLUNG, K.\*, WENNING, A. S.\*, STRAUSS, B., WOLFS, M.-J., SAPPOK, A., HOTH, M. & SCHWARZ, E. C. (2010). TRP expression pattern and the functional importance of TRPC3 in primary human T-cells. Artikel eingereicht.

\*Autoren haben in gleichem Maße zu dieser Arbeit beigetragen.

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Insbesondere versichere ich, dass ich alle wörtlichen und sinngemäßen Übernahmen aus anderen Werken als solche kenntlich gemacht habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Wilgartswiesen, den

---

(Unterschrift)

# Danksagung

Bei Prof. Markus Hoth bedanke ich mich ganz herzlich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Schaffung von sehr guten Arbeitsbedingungen, für die Möglichkeit der Teilnahme an einem Kongress und für die Vermittlung der vielen Hiwijobs. Ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Eva Schwarz. Ich habe mich fachlich immer gut beraten und menschlich sehr gut aufgehoben gefühlt. Vielen Dank an Dr. Carsten Kummerow für die hilfreiche Unterstützung bei der Auswertung meiner Daten und Dr. Ariel Quintana für die Hilfe bei der Kalibration. Vielen Dank an Bettina Strauß für die Unterstützung bei der Immunfluoreszenz. Für die Aufreinigung der Zellen vielen Dank an Dr. Melodie-Jo Wolfs und an Claudia Kilter. Herzlichen Dank an Rosa Maria Neblung für die Durchsicht meiner Arbeit. Vielen lieben Dank an meinen Bruder Axel Wagershauser, der mir beigebracht hat, wie man ein vernünftiges Layout macht. Zuletzt gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Hoth, die immer für ein sehr gutes Arbeitsklima gesorgt haben.