

**Regulation und Funktion lymphozytärer  
Ionenkanäle – CRAC und ORCC – in  
Proliferation und Apoptose**

**D I S S E R T A T I O N**

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften**

**2002**

**vorgelegt von**

**Luzia Heil**

Tag der mündlichen Prüfung:

12.02.2002

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

PD Dr. A. Lepple-Wienhues

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. G. Drews

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn PD Dr. Albrecht Lepple-Wienhues am Physiologischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit wahrnehmen, all jenen zu danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Im Besonderen:

Herrn PD Dr. Albrecht Lepple-Wienhues danke ich sehr herzlich für die interessante und herausfordernde Aufgabenstellung, seine kompetente wissenschaftliche Betreuung und Diskussionsbereitschaft sowie für die wertvollen Ratschläge bei der Durchführung und Fertigstellung der Arbeit.

Frau Prof. Dr. Gisela Drews gilt mein besonderer Dank für die Betreuung und die Begutachtung dieser Arbeit sowie die Vertretung meiner Arbeit in der Fakultät.

Herrn Prof. Dr. Florian Lang danke ich für die freundliche und motivierende Unterstützung. Meinen Laborkollegen Johannes Berschauer, Anja Bialkowski, Georg Dangel, Angelika Enzensberger, Klaus Ferlinz, Birgit Heberle, Arvid Schäfer, Achim Seeger und Martina Welz bin ich überaus dankbar für die angenehme Arbeitsatmosphäre, ihre wissenschaftliche und moralische Unterstützung und ihren Humor auch außerhalb des Labors.

Herrn Dr. Claus Belka möchte ich für die Kooperationsbereitschaft und die wertvollen mikroskopischen Daten danken.

Frau Heidi Faltin danke ich für die Einarbeitung in biochemische Arbeitstechniken.

Bei allen Mitarbeitern/innen des Physiologischen Instituts bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung und die angenehme Zusammenarbeit.

Frau Dr. Martina Düfer danke ich fürs Korrekturlesen und ihre konstruktive Diskussionsbereitschaft.

Besonders danke ich meinen Eltern für den Rückhalt und die Förderung während meines Werdeganges und meinem Freund Anton Abler für die Aufmunterungen und die motivierende Unterstützung.

Veröffentlichungen während der Dissertationszeit:

**ORIGINALPUBLIKATIONEN:**

Lepple-Wienhues, A., Belka, C., Laun, T., Jekle, A., Walter, B., Wieland, U., Welz, M., Heil, L., Kun, J., Busch, G., Weller, M., Bamberg, M., Gulbins, E., and Lang, F. (1999). Stimulation of CD95 (Fas) blocks T lymphocyte calcium channels through sphingomyelinase and sphingolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13795-800.

Heil, L. (2000). Der Myokardinfarkt. *PZ Prisma* 4, 205-212.

Lepple-Wienhues, A., Szabo, I., Wieland, U., Heil, L., Gulbins, E., and Lang, F. (2000). Tyrosine kinases open lymphocyte chloride channels. *Cell Physiol Biochem* 10, 307-12.

Lepple-Wienhues, A., Wieland, U., Laun, T., Heil, L., Stern, M., and Lang, F. (2001). A src-like kinase activates outwardly rectifying chloride channels in CFTR-defective lymphocytes. *Faseb J* 15, 927-31.

**KONGRESSBEITRÄGE:**

Heil, L., Berschauer, J., Gulbins, E., Lang, F., and Lepple-Wienhues, A. (2000). CD95 blocks lymphocyte CRAC channels by depolarizing the mitochondrial potential. *Plügers Arch – Eur J Physiol* 439 (Suppl.), R 324, DPG Tagung Ulm

Lepple-Wienhues, A., Galic, S., Heil, L., Berschauer, J., Dangel, G., Rudner, J., Belka, C., Budach, W., und Bamberg, M. (2000). Inhibition proliferativer Calciumsignale nach Bestrahlung aufgrund mitochondrialer Depolarisation - Schutz durch Bcl-2. *Strahlentherapie und Onkologie* 176 (Sondernummer 1), 47, 6. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie 2000 in München

Heil, L., Ferlinz, K., Wagner, J., Belka, C., Rudner, J., Lang, F., and Lepple-Wienhues, A. (2001). Radiation effects on osmosensitive anion channels. *Plügers Arch – Eur J Physiol* 441 (Suppl.), R 137, DPG Tagung Berlin

Heil, L., Berschauer, J., Dangel, G., Lang, F., and Lepple-Wienhues, A. (2001). Differential role of mitochondria in death receptor- and sphingolipid-induced inhibition of lymphocyte calcium channels. *Plügers Arch – Eur J Physiol* 441 (Suppl.), R 189, DPG Tagung Berlin

Heil, L., Ferlinz, K., Wagner, J., Belka, C., Rudner, J., Lang, F., and Lepple-Wienhues, A. (2001). Einfluß ionisierender Strahlung auf osmosensitive Anionenkanäle. *Strahlentherapie und Onkologie* 177 (Sondernummer 1), 32, 7. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie 2001 in Hamburg

Heil, L., Enzensberger, A., Seeger, A., Schäfer, A., Lang, F., and Lepple-Wienhues, A. (2002). Inhibition of capacitive  $Ca^{2+}$  entry upon CD95 Stimulation in T cell subpopulations. *Plügers Arch – Eur J Physiol* 443 (Suppl. 2), S 233, DPG Tagung Tübingen

## I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abkürzungen	IV
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Rolle der Lymphozyten im Immunsystem	1
1.1.1.	Lymphozyten	1
1.1.2.	Grundlagen der T-Zellaktivierung	2
1.2.	Ionenkanäle	4
1.2.1.	Aktivierung/Inaktivierung und Eigenschaften des kapazitiven Calcium-einstromes	6
1.2.2.	Chloridkanäle	9
1.3.	Der Zelltod	10
1.3.1.	Programmierter Zelltod	10
1.3.2.	Struktur und Funktion des CD95-Rezeptors	11
1.3.3.	Der CD95-induzierte Block des kapazitiven Calciumeinstromes	13
1.3.4.	Strahleninduzierte Apoptose	14
1.4.	Das Onkoprotein Bcl-2	15
1.5.	Mitochondriale Prozesse	18
1.6.	Fragestellung der Arbeit	21
2.	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1.	Zellkultur	23
2.2.	Präparation peripherer Lymphozyten	23
2.3.	Transfektion durch Elektroporation	24
2.4.	Lösungen und Chemikalien	24
2.5.	Patch-clamp	32
2.5.1.	Das Funktionsprinzip eines Patch-clamp-Verstärkers	34
2.5.2.	Elektrische Eigenschaften der whole-cell-Ableitung	35
2.5.3.	Aufbau des Meßplatzes	36
2.5.4.	Durchführung der Patch-clamp-Experimente	37
2.6.	Mikroskopie	38
2.6.1.	Fluoreszenzmikroskopie	38
2.6.1.1.	Konzentrationsmessung mit digitaler Fluoreszenzmikroskopie	38
2.6.1.2.	Kernfragmentation	42

2.6.2. Volumenmessung mit Durchlichtmikroskopie	42
2.6.3. Konfokale Mikroskopie	43
2.6.3.1. Determination der subzellulären Lokalisation des Onkoproteins Bcl-2	44
2.7. Durchflußzytometrie	45
2.7.1. Ratiometrische Zwei-Farbstoffanalyse mit Durchflußzytometrie	46
2.7.2. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials	47
2.7.3. Bestimmung des Plasmamembranpotentials	47
2.7.4. Bestimmung des Zellvolumens	48
2.7.5. Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes	48
2.8. Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot	48
2.9. Bestrahlung	49
2.10. Statistische Auswertung	49
3. ERGEBNISSE	50
3.1. Regulation des kapazitiven Calciumeinstromes	50
3.1.1. Blockade des speichergesteuerten Calciumkanals in Lymphozyten durch Sphingolipide	50
3.1.1.1. Ceramid blockiert den kapazitiven Calciumeinstrom	50
3.1.1.2. Sphingosin blockiert den kapazitiven Calciumeinstrom	52
3.2. CD95-vermittelte Inhibition des CRAC via mitochondriale Depolarisation	53
3.2.1. Mitochondriale Hemmstoffe blockieren den kapazitiven Calciumeinstrom	54
3.2.2. CCCP blockiert den kapazitiven Calciumeinstrom via mitochondriale Depolarisation	56
3.2.3. Cyclosporin A schützt vor CD95-induziertem CRAC-Block	58
3.2.4. Das Onkoprotein Bcl-2 interferiert mit dem CD95-induzierten CRAC-Block in Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation	60
3.2.4.1. Überexpression des Onkoproteins Bcl-2	60
3.2.4.2. Subzelluläre Lokalisation des Bcl-2 Proteins	61
3.2.4.3. Auswirkung der Bcl-2 Überexpression auf die CD95-vermittelte mitochondriale Depolarisation	63
3.2.4.4. Einfluß des Onkoproteins Bcl-2 auf den CD95-induzierten Block des speichergesteuerten Calciumkanals	63
3.3. Aktivierung auswärtsrektifizierender Chloridkanäle	68
3.3.1. Die Tyrosinkinase p56 <sup>lck</sup> aktiviert osmosensitive Chloridkanäle ohne vorherige Zellschwellung	68

3.3.2.	Osmotische Zellschwellung von CF Lymphozyten aktiviert auswärts- rektifizierende Chloridkanäle	70
3.3.3.	Die Tyrosinkinase p56 <sup>lck</sup> aktiviert auswärtsrektifizierende Chloridkanäle in CF Lymphozyten	71
3.3.4.	cAMP aktiviert auswärtsrektifizierende Chloridkanäle in Lymphozyten	72
3.3.5.	cAMP führt in CF Lymphozyten zu keiner Chloridkanalaktivierung	73
3.4.	Inhibition des Chloridkanals blockiert den kapazitiven Calciumeinstrom	74
3.4.1.	Einfluß des ORCC auf das Plasmamembranpotential	74
3.4.2.	Chloridkanalinhibitoren blockieren den kapazitiven Calciumeinstrom	77
3.5.	Die Rolle von Chloridkanälen in der Apoptose	79
3.5.1.	Strahleninduzierte Zellschwellung	79
3.5.2.	Die Tyrosinkinase p56 <sup>lck</sup> ist essentiell für strahleninduzierte Zellschwellung	80
3.5.3.	p56 <sup>lck</sup> Kinase defiziente Zellen sind apoptoseresistent	81
3.5.4.	Effekte extrazellulärer Hyperosmolarität auf die strahleninduzierte Zellschwellung und Apoptose	83
3.5.5.	Einfluß extrazellulärer Hyperosmolarität auf Apoptosemarker	85
3.5.6.	Glibenclamid reduziert Zellschwellung und Apoptose nach Bestrahlung	87
4.	DISKUSSION	90
4.1.	Die CD95-induzierte Inhibition des speicheroperierten Calciumkanals	90
4.1.1.	Die Rolle von Sphingometaboliten – Sphingosin und Ceramid – beim CRAC-Block	91
4.1.2.	Die Bedeutung von Mitochondrien für die Blockade des CRAC-Kanals	92
4.2.	Regulation schwellungsinduzierter Chloridkanäle	96
4.2.1.	Regulation des osmosensitiven Chloridkanals durch Tyrosinphosphorylierung	96
4.2.2.	Alternativer Aktivierungsmechanismus auswärtsrektifizierender Chloridkanäle bei Cystischer Fibrose	97
4.3.	Proliferative Wirkung des auswärtsrektifizierenden Chloridkanals	100
4.4.	Einfluß des schwellungsaktivierten Chloridkanals auf strahleninduzierte Zellschwellung und Apoptose	102
5.	ZUSAMMENFASSUNG	104
6.	LITERATURVERZEICHNIS	106

## II. Abkürzungen

$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotential
$\Omega$	Ohm, Maßeinheit für den Widerstand
$\lambda$	Lambda, Maßeinheit für die Wellenlänge
$^{\circ}\text{C}$	Temperaturangabe in Grad Celsius
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
A	Ampere, Maßeinheit für die Stromstärke
AIF	apoptosis inducing factor
AK	Antikörper
AM	Acetoxymethylester
ANT	Adenin Nucleotid Transporter
APZ	Antigen präsentierende Zellen
ASM	saure Sphingomyelinase
ATCC	American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinder Serum Albumin
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Intrazelluläre Calciumkonzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD95	Apo-1/Fas-Rezeptor, für die Vermittlung des apoptotischen Signals verantwortlicher Rezeptor
CD95L	Ligand des CD95-Rezeptors
CF	Cystische Fibrose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CRAC	Calcium release activated Calcium channel
CsA	Cyclosporin A
CsOH	Cesiumhydroxid
DISC	death inducing signaling complex
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenz-Aktivierter-Zell-Sorter
FADD	Fas-associating protein with death domain
FCS	Fötales Kälberserum
FLICE	FADD-like ICE
Gy	Gray
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl] piperazin-N'-[2- ethansulfonsäure])
IL-2	Interleukin-2
IMM	Inner mitochondriale membrane
$K_D$	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
kHz	Kiloherz
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mV	Millivolt
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar

## II. Abkürzungen

---

OMM	outer mitochondriale membrane
ORCC	Auswärtsrektifizierender Chloridkanal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	poly(ADP-Ribose)polymerase
PKA	Proteinkinase A
PMP	Plasmamembranpotential
PTP	permeability transition pore
p56 <sup>lck</sup>	Lymphozytäre src-artige Tyrosinkinase
TZR	T-Zell-Rezeptor (CD4)
TG	Thapsigargin
TNF	tumor necrosis factor
U/ml	(Units) Einheiten pro Milliliter, Maß für die biologische Aktivität einer Substanz
V	Volt
VDAC	voltage dependent anion channel

# 1. Einleitung

## 1.1. *Rolle der Lymphozyten im Immunsystem*

### 1.1.1. Lymphozyten

Lymphozyten sind Zellen, die von pluri- bzw. unipotenten Knochenmarkstammzellen abstammen und neben Granulozyten und Monozyten eine Teilpopulation der Leukozyten darstellen. Man kann sie in B- und T-Lymphozyten unterteilen, die ihre Reifung im Rahmen der Lymphogenese im Knochenmark bzw. im Thymus erfahren und vorwiegend über die Lymphbahnen ins Blut gelangen. Diese Zellen sind Träger der erworbenen Immunität und vermitteln eine hochspezifische Reaktion zwischen einer Fremdsubstanz (Antigen) und dem körpereigenen Immunsystem. Daneben existiert noch ein weiterer Abwehrmechanismus, die angeborene Immunität, die von phagozytierenden Zellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten getragen wird. Das Funktionsprinzip beruht auf der Elimination von fremden Partikeln, Mikroorganismen und fremden Makromolekülen durch Phagozytose und dem folgenden lysosomalen Abbau mittels Enzymen. Durch die Prozessierung entstehende Peptidstücke werden auf der Zelloberfläche von sogenannten Antigen präsentierenden Zellen (APZ) in einer Form präsentiert (Antigenpräsentierung), in der sie durch weitere Zellen des Immunsystems erkannt werden können.

B-Lymphozyten besitzen einen membranständigen Antigenrezeptor mit der Struktur eines Antikörpers (IgM, IgD), welcher Antigene erkennen kann. Die Interaktion des Antigens mit diesem Membran-Antikörpermolekül initialisiert die Aktivierung der B-Lymphozyten, die dazu führt, daß löslicher Antikörper synthetisiert und sezerniert wird, um zirkulierendes Antigen zu neutralisieren und zu eliminieren. Der Antigen-Rezeptor-Komplex wird internalisiert, das Antigen prozessiert und die entstehenden Peptidfragmente werden auf der Zelloberfläche an MHC(major histocompatibility complex)-Moleküle gebunden exprimiert, um von T-Helfer-Zellen erkannt zu werden.

Die zweite Hauptklasse der Lymphozyten besteht aus den T-Lymphozyten, die weiterhin in funktionelle Subpopulationen, die T-Helfer-Zellen ( $T_H$ ) und die zytotoxischen T-Zellen ( $T_C$ ), unterteilt werden. Im Gegensatz zu den B-Lymphozyten können T-Zellen nur Peptidantigene erkennen, die auf der Oberfläche von APZ gebunden an Proteine, dem sogenannten MHC, erscheinen, aber nicht lösliche Antigene. Die antigenerkennende Struktur auf Seiten des T-Lymphozyten ist der T-Zell-Rezeptor (TZR). Nach der

Antigenstimulation produzieren und sezernieren T-Helfer-Zellen Zytokine, um dadurch die Proliferation und Differenzierung anderer Zellen anzuregen, und zytotoxische T-Zellen lysieren Zellen, die von intrazellulären Mikroorganismen befallen sind.

Das Immunsystem ist aufgrund des großen Lymphozytenreservoirs mit unterschiedlicher Struktur der Antigenrezeptoren befähigt auf eine Vielzahl von Fremdanitgenen zu reagieren. Bedenkt man, daß ein bestimmtes Antigen nur von einer sehr geringen Anzahl von spezifischen Lymphozyten erkannt werden kann, wird deutlich, wie wichtig ein proliferatives Signal für die Immunantwort ist. Durch die Konfrontation mit einem Antigen kommt es zu einer selektiven Vermehrung des spezifischen Lymphozytenklons. Dieser gezielte Einsatz des angeborenen Lymphozytenrepertoires wird als klonale Selektion bezeichnet. Die Bindung des spezifischen Antigens induziert eine Lymphozytenaktivierung und unter der proliferativen Mitwirkung von Zytokinen anderer mitaktivierter Zellen die Zellteilung, so daß Zellen entstehen, die sich unterschiedlich weiterdifferenzieren. Beispielsweise können sich B-Zellen zu einer antikörperbildenden Plasmazelle weiterentwickeln. Einige Zellen von antigenstimulierten B- und T-Lymphozyten differenzieren zu Gedächtniszellen, die funktionell bis zur Restimulation durch das entsprechende Antigen ruhend sind.

### 1.1.2. Grundlagen der T-Zellaktivierung

Im Gegensatz zu B-Zellen erkennen T-Lymphozyten nur Peptide von Antigenen, die mit MHC-Molekülen auf der Oberfläche von APZ assoziiert sind. Die Bindung von Peptidantigen-MHC-Komplexen an den TZR ist der Stimulus für die T-Zellaktivierung. Es werden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, welche die Transkription verschiedener Gene in den aktivierten Zellen modulieren und schließlich zur Aktivierung und Zellproliferation führen (Weiss and Littman, 1994; DeFranco, 1993). Der Rezeptor hat die Struktur eines Heterodimers, d.h. er besteht aus zwei verschiedenen, kovalent miteinander verbundenen variablen Proteinketten, einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, und ermöglicht die Erkennung des Peptidantigens. Die Interaktion des TZR mit dem Antigen resultiert in der Bildung des funktionellen TZR-CD3-Komplexes durch Assoziation der variablen Ketten des TZR mit den konstanten Proteinketten des CD3-Komplexes,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -Ketten und  $\eta$ -,  $\zeta$ -Ketten (Weiss, 1991). Zusätzlich assoziiert dieser Komplex mit verschiedenen Tyrosinkinasen (PTK), was in einer Tyrosinphosphorylierung von membran- und zytoplasmatischen Proteinen resultiert. In Lymphozyten werden die src-ähnlichen Tyrosinkinasen Ick und fyn exprimiert, von denen gezeigt wurde, daß sie

essentiell an der Lymphozytenaktivierung beteiligt sind (Weiss and Littman, 1994). Eine weitere PTK, die bei der TZR-Signalübermittlung beteiligt ist, ist die  $\zeta$ -assoziierte ZAP-Kinase, die einer B-Zell-PTK namens syk homolog ist (Chan et al., 1992). Die PTK phosphorylieren Tyrosinreste auf dem CD3-Komplex, was zum Andocken der Phosphatidylinositol-Phospholipase C- $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) führt, die dann durch Phosphorylierung aktiviert wird (Mustelin et al., 1990). Das aktivierte Enzym führt durch die Hydrolyse des Plasmamembranphospholipids Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zur Freisetzung des hydrophilen Inositol-1,4,5-Triphosphats (IP<sub>3</sub>) und des lipophilen Diacylglycerols (DAG) (Mustelin et al., 1990). IP<sub>3</sub> diffundiert ins Zytosol und bindet an IP<sub>3</sub>-Rezeptoren, die auf dem endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert sind und ligandengesteuerte Ca<sup>2+</sup>-Ionenkanäle darstellen, und setzt Ca<sup>2+</sup> aus den intrazellulären Speichern frei. Infolgedessen werden speichergesteuerte Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (CRAC) in der Plasmamembran aktiviert und tragen zur Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> bei. Zusätzlich wird die Proteinkinase C (PKC) durch DAG und die erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Konzentration aktiviert, die den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B induziert.

Die erhöhte [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> führt zur Ausbildung von Komplexen mit dem Ca<sup>2+</sup>-abhängigen regulatorischen Protein Calmodulin, das seinerseits Kinasen und Phosphatasen wie Calcineurin aktiviert. Calcineurin selbst ist das Zielmolekül der Immunsuppressiva Cyclosporin A (CsA) und FK506 (Liu et al., 1991). Der zytosolische Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor activated T cells) wird durch Calcineurin phosphoryliert, was dem Kernfaktor das Durchdringen der Kernmembran ermöglicht. Durch Bindung an den IL-2-Promotor fördert es zusammen mit dem durch PKC aktivierten Transkriptionsfaktor AP-1 die Gen-Transkription für das Zytokin IL-2 (Flanagan et al., 1991). Weiterhin sind an der IL-2-Gen-Transkription die Regulatorproteine fos und Jun, die zur AP1-Transkriptionsfaktorenfamilie gehören, beteiligt. Gleichzeitig werden Zytokinrezeptorgene wie das IL-2-Rezeptorgen transkribiert, welche für die Proliferation und die Reifung der Lymphozyten notwendig sind.

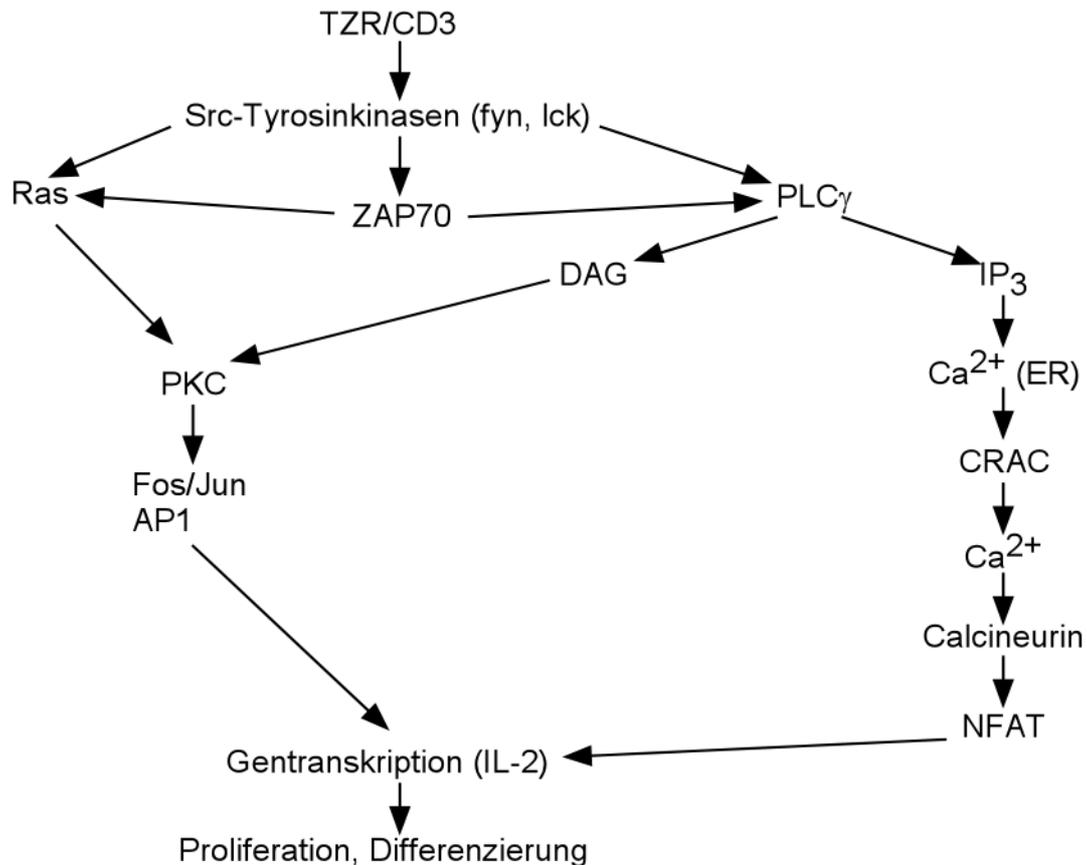


Abbildung 1: Intrazelluläre Signaltransduktion der T-Zellaktivierung (Erläuterungen im Text)

## 1.2. Ionenkanäle

Ionenkanäle regulieren eine große Zahl zellulärer Funktionen. Sie stellen hochspezialisierte Membranproteine dar, welche Ionen das Passieren durch die Zellmembran ermöglichen. Das funktionelle Kanalprotein setzt sich aus mehreren Untereinheiten mit transmembranären Regionen zusammen und ermöglicht durch Konformationsänderung die selektive Passage.

Ihre Bedeutung geht weit über die Erregungsleitung in erregbaren Geweben hinaus. Durch die Entwicklung neuer Techniken im Bereich der Molekularbiologie und Elektrophysiologie wurden zunehmend Ionenkanäle in nichterregbaren Zellen wie Lymphozyten und ihre zellulären Funktionen untersucht. Neben elementaren Prozessen, wie der Erhaltung des Membranpotentials durch die Kontrolle der Ionenverteilung, kommen Ionenkanälen auch sehr spezifische Aufgaben zu. Die Beteiligung von Ionenkanälen ist unter anderem für folgende Vorgänge nachgewiesen: Antigenaktivierung (Chandy et al., 1984), Proliferation (Chandy et al., 1984), Apoptose (Szabo et al., 1998) und Zellvolumenregulation (Cahalan and Lewis, 1988). Beispielsweise wird der

physiologische Gradient für  $\text{Ca}^{2+}$  von zellulären Signalsystemen für die Bildung und Ausschüttung von Signalstoffen und Genexpression genutzt. Durch pharmakologische Beeinflussung der Ionenkanäle, die für extrazelluläre Substanzen gut zugänglich sind, kann gezielt in immunologische Prozesse eingegriffen werden und dadurch stehen neue therapeutische Ansätze zur Verfügung (Kaczorowski and Koo, 1994).

Man kann Ionenkanäle nach ihrem „Steuerungsmechanismus“ unterscheiden. Bei den spannungsgesteuerten Ionenkanälen erfolgt die Aktivierung durch Änderung des Membranpotentials. Im Fall von ligandengesteuerten Kanälen erfolgt die Aktivierung durch Bindung eines Transmitters, beispielsweise Glutamat an den NMDA-Rezeptor (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor) im ZNS. Eine weitere Gattung wird von den speicheroperierten Kanälen dargestellt, wie der speichergesteuerte kapazitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal in Lymphozyten.

Tabelle 1: Lymphozytäre Ionenkanäle

Name	Gen	Leitfähigkeit [pS]	Aktivierung [ $K_d$ ]	Inhibitoren
<i>K<sub>v</sub></i>				
n	Kv1.3	10-18	Spannung -40mV	CTX nM MgTX nM TEA 10mM
l	Kv3.1	27	Spannung 0mV	TEA 100µM
?	Kv1.1?	?	Spannung -20mV	DTX nM TEA 1mM
<i>K<sub>Ca</sub></i>				
SK	SKCa3?	2-8	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ 400mM	Apamin pM TEA 2mM
IK	IKCa1?	11-35	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ 300nM	CTX nM TEA 40mM
<i>Ca<sup>2+</sup></i>				
CRAC	TRP?	0.01	$\text{Ca}^{2+}$ -Speicher- Entleerung	$\text{La}^{3+}$ nM< $\text{Gd}^{3+}$ nM
P2X	P2X7?	?	µM $\text{ATP}_o$	

<i>Cr</i>				
Mini	?	2-3	Schwellung ATP	DIDS $\mu\text{M}$ < NPPB $\mu\text{M}$
ORCC?				
Midi	?	40-50	Kinasen	NPPB $\mu\text{M}$ <<
ORCC?			Depolarisation	DIDS
maxi	?	400	Spannung	DIDS $\mu\text{M}$
			Patch exzision	Zn <sup>2+</sup> $\mu\text{M}$

Im Folgenden sollen die wichtigsten Eigenschaften der speicheroperierten Calciumkanäle und der Chloridkanäle dargestellt werden, da ihre Rolle in Proliferation und Zelltod im Rahmen der Fragestellung dieser Arbeit untersucht wird.

### 1.2.1. Aktivierung/Inaktivierung und Eigenschaften des kapazitiven Calcium-einstromes

CRAC-Kanäle (calcium-release-activated calcium channels), die in vielen nicht erregbaren Zellen vorhanden sind (Zweifach and Lewis, 1993), werden nach Entleerung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Speicher (Endoplasmatisches Retikulum) aktiviert (Penner et al., 1993). Der genaue Signalmechanismus zwischen intrazellulärem Speicher und Ca<sup>2+</sup>-Kanal ist unbekannt. Es werden lösliche Transmitter wie der Calcium influx factor (CIF) (Randriamampita and Tsien, 1993), die vom ER freigesetzt werden und nach Diffusion den I<sub>CRAC</sub> aktivieren, Tyrosinkinasen (Jenner et al., 1994), ein Ca<sup>2+</sup>-Sensor im ER, Proteininteraktionen und eine physikalische Kopplung zwischen dem CRAC-Kanal und der durch IP<sub>3</sub> hervorgerufenen Konformationsänderung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors diskutiert (Berridge, 1993).

In Lymphozyten wurden die speichergesteuerten Ca<sup>2+</sup>-Kanäle zuerst von Lewis und Cahalan auf der Suche nach mitogen-aktivierten Ca<sup>2+</sup>-Strömen identifiziert. Ihnen wird unter anderem eine Beteiligung an der Zellvolumenregulation (Tinel et al., 1994) und am proliferativen Signal in Lymphozyten (Lewis and Cahalan, 1995; Zweifach and Lewis, 1993) zugeordnet. Ein Kennzeichen der speicheroperierten Kanäle ist, daß neben dem physiologischen Stimulus des TZR auch artifizielle Stimulation des TZR mittels Phytohämagglutinin (PHA) (Zweifach and Lewis, 1993) und rezeptorunabhängige Stimuli, die zu einer Entleerung des ER führen, eine Aktivierung ausgelöst werden kann. Effektive Stimuli sind unter anderem Thapsigargin (TG), ein Sesquiterpenlacton, das irreversibel an die endoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-Pumpe (SERCA-ATPase) bindet, diese blockiert und dadurch

die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in das ER verhindert (Premack et al., 1994; Thastrup et al., 1989), Ionomycin, ein lipophiles  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor, intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatoren, die zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  chelatieren und die Wiederaufnahme in die intrazellulären Speicher unterbinden und  $\text{IP}_3$ , das an den endoplasmatischen  $\text{IP}_3$ -Rezeptor bindet und durch Aktivieren des  $\text{IP}_3$ -sensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals gespeichertes  $\text{Ca}^{2+}$  freisetzt (Parekh and Penner, 1997; Lewis, 1999). In dieser Arbeit wurde eine Aktivierung des CRAC-Kanals vorwiegend durch die Applikation von TG ausgelöst, da dieses Vorgehen eine maximale Aktivierung bewirkt unter Umgehung von Elementen der Signalkaskade oberhalb des  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichers ER (Thastrup et al., 1990).

In Patch-clamp-Studien konnten mehrere Typen von speicheroperierten Kanälen (SOC, store-operated channels) unterschieden werden (Lewis, 1999; Parekh and Penner, 1997). Der in T-Lymphozyten gefundene CRAC, ursprünglich in Mastzellen beschrieben (Hoth and Penner, 1992), unterscheidet sich von den anderen SOC durch seine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivität. Seine charakteristischen Merkmale werden im Folgenden beschrieben:

Der Strom, der durch TZR-Stimulation oder durch passive Speicherentleerung induziert wird, ist identisch mit dem auftretenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom im Zuge der T-Zellaktivierung hinsichtlich der Ionenselektivität, Leitfähigkeit, der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Inaktivierung und der Blockade durch Schwermetalle (Premack et al., 1994; Zweifach and Lewis, 1993). Zudem wird durch TZR-Stimuli (Lektine, Antikörper) der durch Speicherentleerung induzierte Strom nicht weiter erhöht (Premack et al., 1994; Sarkadi et al., 1991) und SKF96365 (Imidazolderivat) oder nanomolare Mengen von Lanthan blockieren sowohl CRAC als auch die T-Zellaktivierung (Aussel et al., 1996; Chung et al., 1994).

Außerdem besitzt der CRAC-Kanal übereinstimmende Eigenschaften mit spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen ( $\text{Ca}_V$ ). Hoth und Penner zeigten, daß die Selektivität dieser Kanäle für  $\text{Ca}^{2+}$  gegenüber monovalenten Kationen wie Natrium bei  $>1000:1$  liegt. Eine ähnliche Selektivität besitzen auch L-Typ  $\text{Ca}_V$ -Kanäle (Hoth, 1995; Hoth and Penner, 1993). Wie  $\text{Ca}_V$ -Kanäle benötigen CRAC-Kanäle extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$ , um diese Selektivität zu erreichen; wenn die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf mikromolare Werte erniedrigt wird, fließt ein monovalenter Strom (Hoth and Penner, 1993; Lepple-Wienhues et al., 1996). Die Porengröße des CRAC-Kanals und seine Sensitivität gegenüber innerer und äußerer Protonenkonzentration lassen darauf schließen, daß die Porenregion dieser beiden Calciumkanäle eine ähnliche Struktur aufweist (Kerschbaum and Cahalan, 1998). Im Gegensatz zu  $\text{Ca}_V$ -Kanälen öffnen CRAC-Kanäle nicht spannungsabhängig und eine Hyperpolarisation erhöht den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom.

Die Einzelkanalleitfähigkeiten mit Calcium als Ladungsträger wurden durch Rauschanalysen von Ganzzellströmen auf 20 fS geschätzt (Zweifach and Lewis, 1993).

Die Strom-Spannungscharakteristik weist eine Einwärtsrektifizierung für  $\text{Ca}^{2+}$  als Ladungsträger auf (Zweifach et al., 1993).

Die Inaktivierung erfolgt über verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Mechanismen. Erwartungsgemäß existiert ein langsamer (im Bereich von Sekunden) Inaktivierungsmechanismus, der auf dem Wiederauffüllen der intrazellulären Speicher beruht (Hofer et al., 1998; Zweifach and Lewis, 1995). Daneben gibt es auch zwei „store-independent“ Inaktivierungsmechanismen. Die schnelle Inaktivierung (im Bereich von Millisekunden) ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig. Sie resultiert aus einer lokalen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation und der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an eine Bindungsstelle (fast inactivation site) in der Porenregion direkt am Kanal oder an einem assoziierten Protein (Zweifach and Lewis, 1995). Der zweite vom Füllungsgrad der Speicher unabhängige Inaktivierungsmechanismus weist einen langsamen im Bereich von Sekunden liegenden Verlauf auf und wird vermutlich durch eine Proteinkinase C vermittelt (Parekh and Penner, 1995). Zusätzlich wird die Beteiligung von Mitochondrien an der Inaktivierung der CRAC-Kanäle diskutiert, was in dieser Arbeit näher untersucht werden soll.

Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal wird außerdem durch Kaliumkanäle beeinflusst, die über das Membranpotential den elektrochemischen Gradienten für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom erzeugen (Lewis and Cahalan, 1990). Neben spannungsabhängigen Kaliumkanälen exprimieren Lymphozyten  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierte Kaliumkanäle, die eine Kopplung des Membranpotentials an die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bewirken (Grissmer et al., 1992).

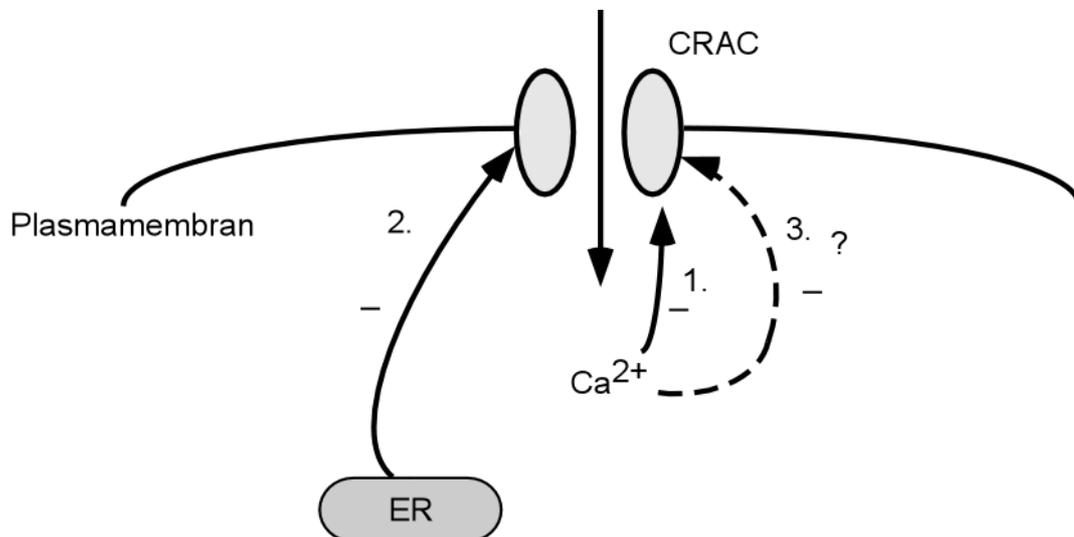


Abbildung 2:  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Regulationsmechanismen des kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes.

Die schnelle Inaktivierung (1., Millisekundenbereich) wird durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle in der Porenregion vermittelt. Bei den langsamen Inaktivierungsmechanismen (Sekundenbereich) unterscheidet man einen vom Füllungsgrad des intrazellulären Speichers abhängigen (2.) und einen „store-independent“ (3.) Mechanismus, an dem vermutlich eine Proteinkinase beteiligt ist.

### 1.2.2. Chloridkanäle

Für Chloridkanäle werden in Lymphozyten verschiedene Funktionen beschrieben. Eine sehr wichtige Rolle spielen sie bei der Regulation des Zellvolumens, das sehr genau kontrolliert wird. Zellen müssen die Fähigkeit besitzen, ihr Volumen innerhalb relativ enger Grenzen zu halten, auch wenn sich die Osmolarität der sie umgebenden Flüssigkeit ändert.

Ein gut untersuchtes Merkmal der Volumenregulation ist die regulatorische Volumenabnahme (regulatory volume decrease, RVD) in hypotoner Lösung. Die primäre Zellschwellung, ausgelöst durch Perfusion mit hypotoner Lösung, aktiviert auswärtsrektifizierende Chloridkanäle (ORCC), wobei es zur Depolarisation der Zellmembran kommt. Dies hat zur Folge, daß spannungsgesteuerte Kaliumkanäle aktiviert werden und diese durch den resultierenden  $K^+$ - $Cl^-$ -Ausstrom die zytosolische Osmolarität reduzieren und dadurch das Ausgangsvolumen wiederherstellen (Cahalan and Lewis, 1988).

Neben der beschriebenen Rolle von Chloridkanälen bei der Volumenregulation sind weitere Funktionen nachgewiesen. Chloridkanäle sind potentiell an der Aufrechterhaltung eines negativen Membranpotentials beteiligt. Inwieweit Chloridkanäle am lymphozytären Membranpotential beteiligt sind, ist noch nicht näher untersucht worden. Durch pharmakologische Chloridkanalblockade kann die Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten inhibiert werden (Phipps et al., 1996). Dies läßt auf eine Intervention von Chloridkanälen auf die Triebkraft für den  $Ca^{2+}$ -Einstrom schließen.

Volumenaktivierte Chloridkanäle mit auswärtsrektifizierenden Eigenschaften wurden in unterschiedlichen Zellen gefunden, wie beispielsweise in epi- und endothelialen Zellen, chromaffinen Zellen, Osteoklasten, Zellen des Respirationstrakts, des Herzens oder Oozyten (Ackerman et al., 1994; Lang et al., 1998). Der Mechanismus der Aktivierung dieser Kanäle ist noch nicht hinreichend geklärt. Ein Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration ist für die Kanalaktivierung nicht notwendig (Ross et al., 1994). Es konnte eine Beteiligung des Zytoskeletts (Levitan et al., 1995) und eine Abhängigkeit von der intrazellulären Adenosintriphosphat (ATP)-Konzentration gezeigt werden (Ross et al., 1994). In Herzzellen ist eine Inhibition volumensensitiver Chloridkanäle durch Tyrosinkinasehemmstoffe beschrieben, was von besonderem Interesse ist, da Tyrosinkinaseaktivität und ATP eng aneinander gekoppelt sind (Sorota, 1995).

Diese Chloridkanäle zeigen bei symmetrischer intra- und extrazellulärer Chloridkonzentration eine auswärtsrektifizierende Strom-Spannungsbeziehung. Die in der Literatur beschriebene Einzelkanalleitfähigkeit variiert stark zwischen 1 und 70 pS

(Doroshenko and Neher, 1992; Garber, 1992; Lewis et al., 1993). In vielen Geweben zeigen auswärtsrektifizierende Chloridkanäle bei unnatürlich positiven Membranspannungen eine spannungsabhängige Inaktivierung. In Lymphozyten konnte keine Spannungsabhängigkeit beobachtet werden. Die Kanäle können durch verschiedene Chloridkanalinhibitoren wie Diphenylamin-carboxylsäure (DPC) und 4,4'-diisothiocyano-stilben-2,2'-Disulfonsäure (DIDS) geblockt werden. Die Sequenz der Ionenselektivität ist  $I^- > Br^- > Cl^- > F^-$  ( $I^-$  zu  $Cl^-$  = 2:1) (Lewis et al., 1993).

### **1.3. Der Zelltod**

Zum Verständnis soll der als Apoptose bezeichnete programmierte Zelltod im Folgenden näher erläutert und auf molekulare Mechanismen der Signaltransduktion eingegangen werden, da er als Grundlage für die untersuchten Veränderung der Ionenströme im Zusammenhang mit der Fragestellung dieser Arbeit dient.

#### **1.3.1. Programmierter Zelltod**

Bei multizellulären Organismen kommt es, um die Homöostase der Organe aufrecht zu erhalten, zu einem ständigen Abbau und einer entsprechenden Erneuerung von Zellen (Nagata and Golstein, 1995). Das zelluläre Gleichgewicht und damit die Integrität der Organe wird also durch das Gleichgewicht von Zellproliferation und Zelltod gewährleistet. Diese Form des Zelltodes läuft nach einem festen biochemischen Programm ab und wird als kontrollierter, selbstregulierter Zelltod (Apoptose) bezeichnet. Der programmierte Zelltod ist ein hochkonservierter Mechanismus, der immer dann aktiviert werden kann, wenn eine einzelne Zelle überflüssig, beschädigt oder für den Organismus gefährlich ist (Vaux et al., 1994). Sie ist im Gegensatz zur Nekrose nicht von einer entzündlichen Reaktion begleitet. Apoptose spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung mehrzelliger Organismen. Von entscheidender Bedeutung ist die Apoptose auch für die Bildung und Funktion des Immunsystems. Etwa 95% der T-Zellvorläufer und 75% der B-Zellvorläufer sterben beim Prozeß der negativen Selektion durch Apoptose. Lymphozyten, die autoreaktive oder nicht funktionelle Rezeptoren entwickeln, werden ebenfalls durch programmierten Zelltod eliminiert (Surh and Sprent, 1994). Eine abnormale Apoptoseresistenz kann Mißbildungen, Autoimmunerkrankungen oder die Entstehung eines Tumors verursachen. Eine gesteigerte Apoptoserate wird in einer Reihe von akuten

(Infarkte) und chronischen Krankheitsbildern (neurodegenerative Erkrankungen, AIDS) beobachtet (Thompson, 1995).

Das Fortschreiten der Apoptose läßt sich zeitlich in drei Phasen einteilen (Martin and Green, 1995). In der Induktionsphase sind viele verschiedene Stimuli in der Lage, den programmierten Zelltod auszulösen. Dazu gehören die Stimulation von spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche, z.B. von Mitgliedern der Tumor-Nekrosis-Faktor-Rezeptoren (TNFR)-Familie wie CD95-Rezeptor, Trail (Van Parijs and Abbas, 1998), zellulärer Streß, Entzug von Wachstumsfaktoren, reaktive Sauerstoffradikale, Bakterien und Viren, ionisierende Strahlung und Erhöhung des intrazellulären freien  $Ca^{2+}$ . Auf diese stimulusspezifische Induktionsphase folgt die Effektorphase, in der die endgültige Entscheidung fällt, ob die Zelle stirbt. In der Degradationsphase kommt es dann zum programmierten Zelltod mit den typischen biochemischen und morphologischen Erscheinungen wie die Aktivierung von Proteasen und Endonucleasen, die Kondensierung des Zellkerns und die Fragmentierung der DNA, die Kondensation des Zytoplasmas und Zellschrumpfung sowie die Ausbildung apoptotischer Partikel und das Zerfallen der apoptotischen Zellen in Membranvesikel (Schulze-Osthoff et al. 1998).

Die aktivierungsinduzierte Apoptose (AICD, activation-induced cell death) ist eine Sonderform, die eine wichtige Rolle zur Begrenzung der Immunantwort spielt. Sie dient der Erhaltung des immunologischen Gleichgewichts im Organismus, indem gewährleistet wird, daß sich die T-Zellen während der Immunantwort vermehren und nach Erfüllen ihrer Funktion wieder auf Normalwerte abfallen (Brunner et al., 1995).

Wichtig für die Regulation der peripheren Immunantwort ist unter anderem das Fas-Rezeptor-Liganden-System, das im Folgenden weiter charakterisiert werden soll.

### 1.3.2. Struktur und Funktion des CD95-Rezeptors

Der CD95-Rezeptor (auch als Fas oder APO-1 bezeichnet) ist ein 48 kDa schweres Glycoprotein mit einer membran-durchspannenden Domäne (Nagata and Golstein, 1995). Die extrazelluläre Region des CD95-Rezeptors zeigt hohe Homologie zu anderen Mitgliedern der TNFR-Familie, wie dem TNF-Rezeptor 1 und 2 (p55 und p75), dem Nerve Growth Factor (NGF), dem CD40-, OX40-, CD27- und dem CD30-Rezeptor (Nagata and Golstein, 1995; Itoh and Nagata, 1993; Cosman, 1994). Diese Moleküle gehören zu der sogenannten NGF-Rezeptor-Familie. Der intrazelluläre Teil besitzt einen in Todesrezeptoren konservierten Bereich namens „death domain“, der für die Induktion der

Apoptose essentiell ist (Itoh and Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993). Eine Reihe von Adaptorproteinen, die C-terminal ebenfalls eine „death domain“ besitzen, können durch Wechselwirkungen mit der „death domain“ des CD95 Rezeptors an diesen binden (Kischkel et al., 1995). Dazu gehören TRADD (TNF-R1 associated death domain protein) (Hsu et al., 1995), FADD (Fas associating protein with death domain) oder MORT1 (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995). FADD besitzt N-terminal eine death effector domain (DED), mit der es Caspase-8, auch FLICE (Fas Linked Interleukin Converting Enzyme) (Boldin et al., 1996) genannt, das erste Protein in der Signaltransduktionskette mit einer meßbaren enzymatischen Aktivität, rekrutiert. Caspase-8 gehört zu einer Gruppe von Proteasen, die für die Apoptose charakteristisch sind. Es handelt sich um Cystein-Proteasen, die zelluläre Substrate an bestimmten Aspartatresten spalten und normalerweise enzymatisch inaktiv als Proenzyme vorliegen (Yuan et al., 1993). Der Komplex aus CD95-Rezeptor, CD95-Ligand, FADD und Caspase-8 wird als DISC (death inducing signaling complex) bezeichnet. Das Ausmaß der DISC-Bildung hängt vom Zelltyp ab. In Typ-I-Zellen ist innerhalb kurzer Zeit eine große Anzahl von DISC nachweisbar, was in einer starken und effizienten Caspasenaktivierung resultiert. Dagegen ist in Typ-II-Zellen die DISC-Bildung sehr gering, so daß ein zweiter Signaltransduktionsweg als Signalverstärker, eine sogenannte „amplification loop“, aktiviert wird (Scaffidi et al., 1998). Hierbei katalysiert Caspase-8 die Spaltung von BID, einem im Zytosol lokalisierten proapoptotischen Protein der Bcl-2 Familie, welches in die mitochondriale Membran transloziert und dort über den mitochondrialen Verstärkungsweg mit Cytochrom C-Freisetzung und Depolarisation der mitochondrialen Membran weitere Caspasen aktiviert (Li et al., 1998; Luo et al., 1998).

Die Aktivierung des CD95-Rezeptors induziert durch das Enzym Saure Sphingomyelinase (ASM), das ein pH-Optimum bei 5.5 besitzt, die Spaltung des Membranbestandteils Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin (Gulbins et al., 1995). Der genaue Mechanismus der ASM-Aktivierung ist noch weitgehend unbekannt. Durch das gebildete Ceramid werden Proteine wie die Ceramid aktivierte Protein-Phosphatase (CAPP) (Dobrowsky et al., 1993), die Proteinkinase C  $\zeta$  (PKC $\zeta$ ) (Muller et al., 1995), die Raf-1 Kinase (Huwiler et al., 1996), Jun-N-terminale Kinase (JNK) (Verheij et al., 1996) und der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (Ponton et al., 1996) aktiviert. Zudem stimuliert die Aktivierung des CD95-Rezeptors Tyrosinkinasen wie die bei der T-Zellaktivierung wichtige src-Kinase Ick und somit die zelluläre Tyrosinphosphorylierung (Eischen et al., 1994). Verschiedene Targetproteine werden tyrosinphosphoryliert, darunter auch Ionenkanäle, beispielsweise der Kaliumkanal Kv1.3 (Szabo et al., 1996). Es existieren auch eine Reihe von Proteinen,

welche die Apoptose hemmen. Die Bcl-Proteinfamilie spielt hierbei eine herausragende Rolle, die in Kapitel 1.4 näher erläutert wird.

Neben der bekannten Rolle des Fas-Systems bei der Apoptose interferiert es auch mit der Lymphozytenaktivierung. Diese weitere Funktion wird anschließend weiter charakterisiert.

### 1.3.3. Der CD95-induzierte Block des kapazitiven Calciumeinstromes

Der CD95-Rezeptor fungiert nicht nur als reiner Apoptoseinduktor. Stimulation des CD95-Rezeptors induziert neben Apoptose auch eine Blockade des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes via CRAC (Kovacs and Tsokos, 1995). Wie im Kapitel über die Grundlagen der T-Zellaktivierung bereits beschrieben, ist eine erhöhte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , die durch Aktivierung speichergesteuerter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx vermittelt wird, essentiell für die T-Zellaktivierung. Durch Inhibition der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signale mit Ionenkanalblockern oder Cyclosporin kann die T-Zellaktivierung, Proliferation und Zytokinfreisetzung unterbunden werden (Lewis and Cahalan, 1995). CD95-Stimulation blockiert den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und inhibiert dadurch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalwege, NFAT-Translokation, Zytokinproduktion und Proliferation. Ionomycin kann die IL-2-Synthese wiederherstellen, indem die blockierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale durch CRAC-unabhängige Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aktiviert werden (Lepple-Wienhues et al., 1999). Der Todesrezeptor CD95 stellt somit in Lymphozyten einen Rezeptor dar, der speichergesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle negativ reguliert und die Lymphozytenfunktion unabhängig von der Apoptose beeinflussen kann. Weiterhin kann durch diese Funktion die immunsuppressive Wirkung CD95-Ligand-exprimierender Tumore erklärt werden, beispielsweise die in Gliompatienten gefundene T-Zellanergie. T-Zellen von Glioblastompatienten zeigen ein reduziertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nach TZR-Stimulation, verbunden mit einer Hemmung der Lymphozytenaktivierung, die durch Ionomycinapplikation überwunden werden kann (Schwartz et al., 1996). Zusätzlich zur Immunevasion von Tumoren kann die CD95-induzierte Blockade des kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Immunfunktionen beeinflussen.

#### 1.3.4. Strahleninduzierte Apoptose

Wie bereits erwähnt gibt es zahlreiche Stimuli, die zur Induktion von Apoptose führen können. Dazu zählt auch ionisierende  $\gamma$ -Strahlung, wie sie zur Therapie von malignen Erkrankungen beispielsweise bei der Lymphomtherapie eingesetzt wird. Die Strahlentherapie ist neben Chemotherapie eine der wichtigsten Therapiemethoden bösartiger Erkrankungen und kommt in Abhängigkeit von Typ und Stadium des Lymphoms ausschließlich oder in Kombination mit anderen Methoden zum Einsatz.

Im Anschluß wird die strahleninduzierte Apoptose näher betrachtet, da in dieser Arbeit die Beteiligung lymphozytärer Ionenkanäle am strahlenvermittelten Zelltod untersucht werden soll.

Während über die rezeptorinduzierte Caspasen-Aktivierung detailliertes Wissen vorliegt, ist über die Signalwege, die zur strahleninduzierten Apoptose führen, relativ wenig bekannt. Die Aktivierung von p53-kontrollierten Signalen ist ein akzeptierter Signalweg für die Induktion von Apoptose infolge eines DNA-Schadens (Lowe et al., 1993). p53 gilt als zentrale Komponente eines sehr komplexen Signalnetzwerkes. An der Aktivierung von p53 sind verschiedene Prozesse beteiligt, darunter Phosphorylierung, Glycosylierung, Bindung regulatorischer Proteine und Acetylierung.

Ein Schlüsselereignis der p53-vermittelten Apoptose scheint die transkriptionelle Aktivierung von Genen wie beispielsweise Bax (Miyashita and Reed, 1995) zu sein. Bax vermittelt durch Bindung an den PTP-Komplex (permeability transition pore complex) und die dadurch induzierte Porenöffnung den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und die Freisetzung von Cytochrom C (Rosse et al., 1998; Pastorino et al., 1998; Marzo et al., 1998). Cytochrom C führt zusammen mit Apaf-1 zu einer Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub>-kontrollierten Aktivierung von Caspase-9 (Rosse et al., 1998; Kuida et al., 1998). Caspase-9 aktiviert im nächsten Schritt Caspase-3, welche die Apoptose auslöst.

Ebensowenig wie die initialen Schritte der strahlungsinduzierten Apoptose ist bekannt, inwieweit Initiator- und Effektorcaspasen involviert sind und in welcher Reihenfolge sie agieren. Experimente mit Caspase-9 Knock-out Mäusen deuten darauf hin, daß die Aktivatorcaspase Caspase-9 an der strahleninduzierten Caspase-3-Aktivierung und Apoptose beteiligt ist (Kuida et al., 1998; Hakem et al., 1998). Weitere Beobachtungen weisen darauf hin, daß die initiale Phase der durch ionisierende Strahlung induzierten Apoptose unabhängig von der Caspasen-Maschinerie ablaufen kann und die Caspasen erst für die terminale Vollstreckung der Apoptose benötigt werden (Belka et al., 2000).

#### **1.4. Das Onkoprotein Bcl-2**

Nachdem im Kapitel über den Zelltod die Existenz antiapoptotischer Proteine bereits erwähnt wurde, sollen in diesem Abschnitt das Bcl-2 Protein und seine protektive Wirkung, die im apoptotischen Geschehen vorwiegend via Mitochondrien ausgeübt wird, näher beschrieben werden, auch in Hinsicht auf die Bcl-2-Mutanten, die zur Beantwortung der Fragestellung, welche Rolle Mitochondrien bei der CD95-induzierten CRAC-Blockade spielen, eingesetzt werden.

Bcl-2 gehört einer großen Familie von Proteinen an, die auf vielfältige Weise an der Beeinflussung der Apoptose bei Vertebraten beteiligt sind. Durch genetische Studien von Zelltodvorgängen in der Embryonalentwicklung des Nematoden *Caenorhabditis elegans* und über die Analyse von Mutanten mit Defekten der Apoptoseregulation konnten verschiedene Gene, genannt CED (cell death defective), identifiziert werden (Ellis et al., 1991). Das Gen CED-9, schützt die Zelle davor, einen programmierten Zelltod einzugehen. Funktionsdefiziente Mutanten von CED-9 haben zur Folge, daß Zellen, die normalerweise leben, Apoptose ausführen (Hengartner et al., 1992). Dafür ist die Aktivität von CED-3 und CED-4 nötig, was darauf hindeutet, daß CED-9 agiert, indem es CED-3 und CED-4 davon abhält den Zelltod einzuleiten. CED-9 ist das strukturelle und funktionelle Homolog von Bcl-2. Die Suche nach Homologen von CED-3 und CED-4 bei Säugetieren zeigte, daß CED-4 eng verwandt ist mit einem Regulator der Apoptose, der als Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) bezeichnet wird (Zou et al., 1997), und daß es sich bei CED-3 um eine Cystein-Protease handelt. Das Gegenstück von CED-3 bei Säugetieren ist das sogenannte Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE). Die Bcl-2 Familie umfaßt mindestens 15 Mitglieder und setzt sich aus proapoptotisch und antiapoptotisch wirkenden Proteinen zusammen, die als potentielle Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene fungieren. Das Genom verschiedener pathogener Viren codiert ebenfalls für ein antiapoptotisches Bcl-2-Analog, wie beispielsweise das Epstein-Barr Virus.

In Sequenzanalysen konnte gezeigt werden, daß vier Bcl-2 Homologie-Domänen existieren. Die meisten antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie besitzen zwei dieser Domänen, BH1 und BH2, zum Teil auch alle vier Domänen wie Bcl-2. Die proapoptotischen Proteine kann man aufgrund ihres Bauplanes in zwei Subfamilien unterteilen. Die Bax-Untergruppe gleicht im Aufbau der für das Überleben verantwortlichen Bcl-2-Subfamilie, während die BH3-Gruppe nur diese Domäne besitzt (Adams and Cory, 1998; Zamzami et al., 1998) (Abb. 3).

Über BH1, BH2 und BH3 Domänen können die anti- und proapoptischen Familienmitglieder Hetero- und Homodimere bilden, was für ihre Regulation des Zelltods wichtig ist. Das Verhältnis von pro- und antiapoptischen Mitgliedern scheint ebenfalls mit dem Fortschreiten des Zelltodes zu interferieren (Boise et al., 1993; Oltvai et al., 1993). Es gibt verschiedene Modelle, um die antiapoptische Wirkung von Bcl-2 Protein, welche vermutlich zwischen Initiator- und Effektorcaspasen anzusiedeln ist, zu erklären (Schulze-Osthoff et al., 1998). Bcl-2 kann Apoptose inhibieren, indem es die Aktivierung von Procaspasen oder die Freisetzung von Cytochrom C verhindert oder Ionenkanäle in die Membran einbaut und über einen Protonenausstrom im Zusammenspiel mit der Elektronentransportkette agiert (Kowaltowski et al., 2000). In *C. elegans* konnte gezeigt werden, daß CED-9 und cyt-1, welches für eine Komponente der Atmungskette kodiert, von der gleichen mRNA transkribiert werden, was auf einen funktionellen Zusammenhang schließen läßt (Hengartner and Horvitz, 1994). Der genaue molekulare Mechanismus der Regulation wird kontrovers diskutiert.

Bcl-2 ist normalerweise auf der zytoplasmatischen Seite der äußeren mitochondrialen Membran, des endoplasmatischen Retikulums (ER) und der Kernhülle lokalisiert und scheint Schädigungen dieser Organelle zu registrieren und deren Verhalten zu beeinflussen, indem es den Strom kleiner Moleküle und Proteine modifiziert (Green and Reed, 1998).

Am C-terminalen Ende der Bcl-2 Familienmitglieder befindet sich eine hydrophobe Aminosäuresequenz, die auch „insertion sequence“ genannt wird, und für die Verankerung in den intrazellulären Membranen verantwortlich ist (Zhu et al., 1996). Die membranäre Verankerung ist von funktioneller Signifikanz, da Bcl-2 Moleküle ohne die hydrophobe Domäne im Zytosol lokalisiert sind und dadurch nur eine geringe protektive Wirkung auf die Apoptose haben (Oltvai et al., 1993). Entfernt man die transmembranären Domänen von Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2 oder Bax, geht durch Verlust der membranären Lokalisation ihre regulatorische Wirkung auf die Apoptose verloren (Zamzami et al., 1998).

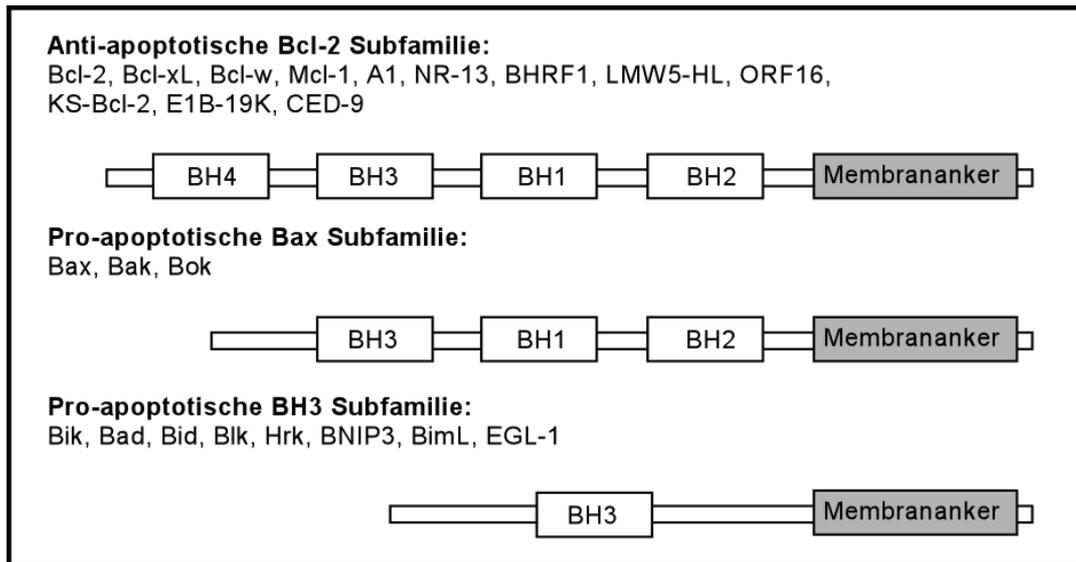


Abbildung 3: Einteilung der Bcl-2 Proteinfamilie.

Man unterscheidet drei Untergruppen innerhalb der Bcl-2 Familie, die sich in ihrem Aufbau aus Bcl-2-Homologie-Domänen, von denen vier existieren, unterscheiden. Es ist jeweils der Aufbau eines für die Subfamilie typischen Vertreters skizziert. Die genaue Struktur der einzelnen Mitglieder kann von diesen Bauplänen abweichen, beispielsweise besitzen nicht alle Mitglieder der Bcl-2- und BH3-Untergruppe einen Membrananker.

Während der Apoptose kommt es in den Mitochondrien zu mehreren Veränderungen. Es kommt zur verstärkten Produktion von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten (ROI), Freisetzung von proapoptotisch wirkenden Proteinen wie Cytochrom C, Procaspase-9 und AIF (apoptosis inducing factor) und zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ). Cytochrom C formiert zusammen mit Apaf-1 und Procaspase-9 das sogenannte Apoptosom, was in einer Aktivierung von Caspase-9 resultiert, welche dann weitere Caspasen aktiviert (Green and Reed, 1998).

Die Kristallstruktur von Bcl-x<sub>L</sub> weist starke Ähnlichkeit mit bakteriellen, porenbildenden Toxinen auf (Muchmore et al., 1996), was zur Hypothese führt, daß Familienmitglieder, welche die BH1 und BH2 Domäne besitzen, befähigt sind, in den verschiedenen Organellen wie Mitochondrien Poren zu bilden. Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2 und Bax besitzen Kanaleigenschaften in künstlichen Lipidbilayers mit unterschiedlicher Ionenselektivität und Leitfähigkeit (Minn et al., 1997; Schendel et al., 1997). Die Bcl-2 Familienmitglieder beeinflussen die Apoptose im Wesentlichen dadurch, daß sie die mitochondrialen Vorgänge verhindern, die Permeabilität der äußeren mitochondrialen Membran regulieren und mit Apaf-1 und Caspase-9 interagieren können (Schulze-Osthoff et al., 1998). Die anti-apoptotische Wirkung von Bcl-2 ist vor allem in Typ II Zellen, in denen die Aktivierung

der Effektorcaspasen von Cytochrom C und Apaf-1 induziert wird, von Bedeutung (Scaffidi et al., 1998).

Bcl-2 entfaltet seine Wirkung über die Mitochondrien. Weiterhin wird über eine Beteiligung von Mitochondrien am proliferativen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal diskutiert. Da Mitochondrien vermutlich am CD95-induzierten Block des kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes beteiligt sind, werden im Anschluß mitochondriale Vorgänge näher betrachtet.

### **1.5. Mitochondriale Prozesse**

Mitochondrien zählen zu den wichtigsten Organellen einer Zelle. Ihr Innenraum ist vom Zytosol durch zwei Membranen abgetrennt. Sie sind für die Synthese von energiereichen Phosphaten, wie Adenosintriphosphat (ATP) verantwortlich. Außerdem enthalten sie die Enzyme für den Zitratzyklus, die Atmungskette und die Fettsäureoxidation. In Mitochondrien wird durch einen Protonentransport Energie gewonnen. Die Atmungskette pumpt Protonen aus dem Innenraum der Mitochondrien heraus und erzeugt dadurch einen steilen elektrochemischen Gradienten für Protonen und ein negatives Potential über die innere Mitochondrienmembran (bis zu  $-180\text{mV}$ ). Dieser aufgebaute Gradient wird durch eine rückwärtslaufende Protonen-ATPase, die  $\text{F}_0\text{F}_1$  ATPase, zur Synthese von ATP genutzt (Nicolls and Ferguson, 1992). Neben dieser Funktion als Energielieferanten der Zelle partizipieren Mitochondrien am Ablauf der Apoptose und in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalkaskade. Abhängig vom Apoptose-Stimulus und der Zellart kommt es zu mitochondrialen Veränderungen mit unterschiedlichem Ausmaß und zeitlicher Abfolge, wie dem Zusammenbruch des  $\Delta\Psi_m$ , was zur Entkopplung der Atmungskette führt und dadurch die Energieversorgung der Zelle zum Erliegen bringt (s. Erläuterungen 1.4). In Gegenwart von mitochondrialem Bcl-2 wird die Apoptose-induzierte Cytochrom C-Freisetzung, Apoptosombildung und dadurch die Rekrutierung weiterer Effektorcaspasen inhibiert (Yang et al., 1997). Außerdem agieren Mitochondrien als potente  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer, indem sie zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  aufsaugen und umverteilen (Hoth et al., 1997). Getrieben durch das negative  $\Delta\Psi_m$  und die niedrige mitochondriale Ruhecalciumkonzentration wird  $\text{Ca}^{2+}$  durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter, dessen Öffnungswahrscheinlichkeit sich durch Erhöhung der lokalen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erhöht (Rizzuto et al., 2000), in das Mitochondrium aufgenommen und über verschiedene Mechanismen wieder freigesetzt. Ebenfalls an der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme beteiligt ist RaM (rapid uptake mode), der bei pulsierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zum Tragen kommt und über einen spezifischen Transportmechanismus vermittelt wird (Gunter et al., 1998). Für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Austransport existieren ein „ $\text{Na}^+$

dependent pathway for calcium efflux“ (NCE) und ein „Na<sup>+</sup> independent pathway for calcium efflux“ (NICE). NCE ist ein Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher mit einer Stöchiometrie von 3 Na<sup>+</sup>:1 Ca<sup>2+</sup>, der durch das Zusammenspiel mit dem Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher (NHE) eine wichtige Rolle im physiologischen Ca<sup>2+</sup>-Zyklus spielt (Crompton and Heid, 1978). NICE, vermutlich ein H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Antiporter mit einer Stöchiometrie von H<sup>+</sup>:Ca<sup>2+</sup>, stellt einen sehr langsamen Ca<sup>2+</sup>-Transportmechanismus dar und benötigt wie die anderen Transporter ein transmembranäres Potential als Triebkraft (Bernardi, 1999) (Abb. 4).

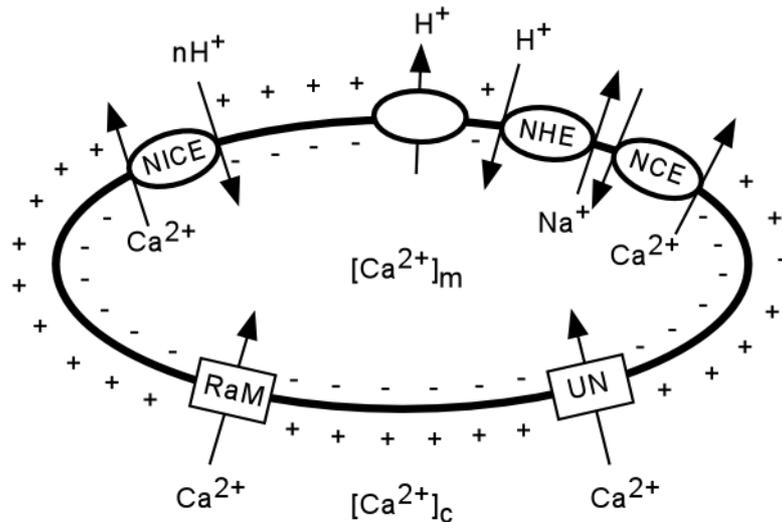


Abbildung 4: Ca<sup>2+</sup>-Transportmechanismen in Mitochondrien.

Die mitochondriale Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme erfolgt zum einen durch den Ca<sup>2+</sup>-Uniporter (UN) und zum anderen durch den rapid uptake mode (RaM). Als Triebkraft liegt das durch die Protonenpumpe (P) erzeugte negative mitochondriale Membranpotential zugrunde. Das aufgenommene Ca<sup>2+</sup> wird über den Na<sup>+</sup>-unabhängigen (NICE) und den Na<sup>+</sup>-abhängigen (NCE) Transportmechanismus, der im Zusammenspiel mit dem Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher (NHE) agiert, ins Zytosol transportiert.

Desweiteren kann Ca<sup>2+</sup> durch Öffnen der PTP (permeability transition pore oder mitochondrial megachannel) freigesetzt werden. Die PTP, ein Multiproteinkomplex, welcher mit den mitochondrialen Veränderungen während der Apoptose verbunden ist, reicht von der inneren mitochondrialen Membran über den intermembranären Spalt bis in die äußere Membran (Crompton, 2000). Sie besteht aus dem ANT (adenine nucleotide translocator), einem Protein in der inneren Membran, an den auf der Matrixseite Cyclophilin D gebunden ist, und einem in der äußeren Membran lokalisierten Porin VDAC (voltage dependent anion channel), an welches eine zytosolische Hexokinase gebunden ist (Bernardi, 1999; Green and Reed, 1998). VDAC wirkt an der Kontaktstelle von äußerer und innerer Membran und verursacht einen Kanal, den Moleküle bis zu 1.5 kD passieren

können (Petit et al., 1996). Es können noch weitere Proteine mit der PTP assoziieren, Benzodiazepinrezeptoren auf der Außenseite, die Creatinkinase im intermembranären Spalt, Bax, Bak und Bcl-2 (Abb. 5) (Crompton, 1999; Shimizu et al., 1999). In Rekonstitutionsversuchen konnte gezeigt werden, daß VDAC, dessen Aktivität durch Bax, Bak und Bcl-2 reguliert wird, den zentralen Kern der PTP darstellt (Marzo et al., 1998; Narita et al., 1998; Shimizu et al., 1999). Bax und Bak können in isolierten Mitochondrien und in VDAC-haltigen Liposomen Cytochrom C-Freisetzung induzieren, die durch Bcl-x<sub>L</sub> inhibierbar ist (Jurgensmeier et al., 1998; Narita et al., 1998; Shimizu et al., 1999). Das Öffnen des nicht-selektiven Kanals ermöglicht das Einstellen eines Ionengleichgewichts zwischen der mitochondrialen Matrix und dem intermembranären Spalt. Dies führt zum Zusammenbruch des Protonengradienten entlang der inneren Mitochondrienmembran und zur Entkopplung der Atmungskette. Weiterhin resultiert die Öffnung der PTP in einer Volumendysregulation. Die Hyperosmolalität der Matrix induziert eine starke Volumenexpansion, welche von der inneren faltenreichen Membran mit den Cristae ermöglicht wird, und dadurch zur Ruptur der äußeren Membran und zur Freisetzung von Caspase-aktivierenden Proteinen führt, die im intermembranären Spalt lokalisiert sind (Green and Reed, 1998).

Inhibitoren der PTP, wie Cyclosporin (CsA), das an Cyclophilin D bindet, und Bongkreat, das auch den ANT inhibiert, können in manchen Systemen Apoptose verhindern, während Bax und ANT-Aktivatoren Apoptose und PT (permeability transition) induzieren können. Dies zeigt, daß die PTP eine wichtige Funktion für die mitochondrialen Vorgänge während der Apoptose hat.

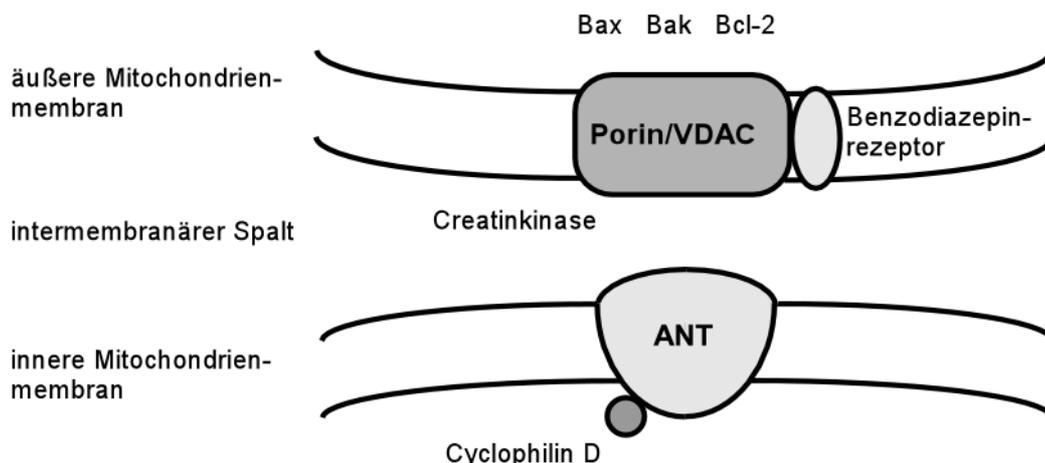


Abbildung 5: Der Aufbau und die Topologie der PTP.

Die PTP besteht aus den zentralen Komponenten VDAC (voltage dependent anion channel), ANT (adenosin nucleotid translocator) und Cyclophilin D, um die weitere Proteine wie Benzodiazepinrezeptor und Creatinkinase angeordnet sind.

## **1.6. Fragestellung der Arbeit**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Lymphozyten die Rolle von speicheroperierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und Chloridkanälen bei der Lymphozytenaktivierung und beim Zelltod mit unterschiedlichen Techniken untersucht.

Wie bereits beschrieben stellt die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ein Schlüsselereignis der T-Zellaktivierung dar. CD95-Stimulation führt zur Blockade des kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes und dadurch zur Hemmung der Lymphozytenaktivierung. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte der zugrundeliegende Mechanismus der CD95-vermittelten CRAC-Blockade näher charakterisiert werden. Da die Stimulation des CD95-Rezeptors unter anderem auch die Bildung der Sphingomyelinmetaboliten Ceramid und Sphingosin induziert, sollten zunächst die Effekte dieser Metabolite auf den speichergesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom untersucht werden.

Weiterhin von Interesse ist, daß Mitochondrien mit intaktem Energiestatus als  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher agieren und an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase der Zelle mitwirken. Durch den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials wird die Triebkraft der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme zerstört und über negative Rückkopplungsmechanismen der kapazitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom geblockt. Hieraus ergibt sich die Frage, ob der CD95-induzierte Block des speicheroperierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals via mitochondriale Depolarisation vermittelt wird und ob es Möglichkeiten gibt die Mitochondrien zu schützen. Dieser Fragestellung wurde anhand von Experimenten zur Messung des mitochondrialen Membranpotentials und des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals nach CD95-Stimulation nachgegangen.

Ein weiterer Effekt, der sich auf den kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom auswirkt, ist das Membranpotential, das vorwiegend vom lymphozytären Kv1.3 getragen wird, wobei vermutet wird, daß auch Chloridkanäle das Membranpotential beeinflussen. Es gibt Hinweise, daß Chloridkanäle an der Lymphozytenaktivierung beteiligt sind und durch Chloridkanalinhibitoren diese gehemmt werden kann. Dies deutet auf eine aktive Rolle des Chloridkanals hin, der durch Stabilisieren des Membranpotentials den kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom fördert und die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signale der Lymphozytenaktivierung unterstützt. Ob diese Hypothese zutrifft, soll in dieser Arbeit beantwortet werden.

Darüber hinaus soll der Mechanismus der Aktivierung des Chloridkanals, der eine wichtige Funktion bei der Zellvolumenregulation besitzt, näher untersucht werden. Als Ansatzpunkt dafür bieten sich Enzyme wie Tyrosinkinasen an, deren regulatorische

Wirkung auf andere Ionenkanäle bereits gezeigt wurde (Szabo et al., 1996). Zusätzlich soll im Rahmen dieser Arbeit auf den bereits beschriebenen Defekt der Anionenleitfähigkeit bei Cystischer Fibrose eingegangen werden (Welsh et al., 1989), auch hinsichtlich neuer Therapiemöglichkeiten.

Es konnte bereits gezeigt werden, daß Chloridkanäle und ihre Aktivierung an der CD95-induzierten Apoptose beteiligt sind. Da ionisierende Strahlung in der Lymphomtherapie eine große Bedeutung besitzen, sollte die Rolle von Ionenkanälen, vor allem von volumensensitiven Chloridkanälen, bei der strahleninduzierten Apoptose näher untersucht werden. Im Zusammenhang mit der Fragestellung sollte festgestellt werden, inwieweit ionisierende Strahlung zur Veränderung der Ionenhomöostase und des Zellvolumens führt, welche Ionenkanäle beteiligt sind und welcher kausaler Zusammenhang zwischen der strahleninduzierten Zellschwellung und der Apoptose besteht.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Zellkultur**

Jurkat und p56<sup>lck</sup>-defiziente JCaM 1.6-Zellen aus der Jurkatzellreihe wurden von American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) bezogen. Die lck rekonstituierten JCaM1.6/lck+-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. A. Weiss zur Verfügung gestellt. T-Lymphozyten stammten von gesunden Spendern. CF Lymphozyten stammten von Spendern mit Mutation auf dem dF 508 Gen, der in Mitteleuropa häufigsten zu dem Krankheitsbild der Mukoviszidose führenden Mutation. Hierfür lag eine Genehmigung der Ethikkommission vor. Die nativen T-Zellen wurden nach dem beschriebenen Protokoll präpariert.

Alle lymphoiden Zellen wurden in RPMI-1640 Medium unter Zusatz von bei 56 °C inaktiviertem 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 10 mM HEPES (pH 7.4), 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 mM nicht essentielle Aminosäuren, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 50 µM β-Mercaptoethanol (alle Substanzen Life Technologies, Eggstein) kultiviert. Gehalten wurden die Zellen in einem Brutschrank (Heraeus) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Passage der Zelllinien erfolgte zwei- bis dreimal pro Woche.

### **2.2. Präparation peripherer Lymphozyten**

Die gesamte Präparation fand unter sterilen Bedingungen statt. Die humanen, peripheren T-Lymphozyten wurden aus venösem, mit EDTA zur Gerinnungshemmung versetzten Blut gewonnen. Durch Ficoll-Gradientenzentrifugation wurden die mononukleären Blutzellen isoliert. Dazu wurde das Blut in einem 50 ml-Röhrchen (Falcon Tube) vorsichtig über die gleiche Menge Ficoll paque (Dichte 1,077; Biochrom, Berlin) geschichtet und 20 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Die Bande der mononukleären Zellen wurde abgenommen und nach dreimaligem Waschen mit RPMI (10 % FCS) über Nylon-Säulen (Biotest Diagnostics, Dreieich), die zuvor mit RPMI äquilibriert wurden, aufgereinigt. Nach 45-minütiger Adhärenzzeit im Brutschrank wurden die Lymphozyten mit vorgewärmten RPMI eluiert. Das Eluat enthielt mehr als 90 % der T-Zellen, was durchflußzytometrisch überprüft wurde.

### 2.3 *Transfektion durch Elektroporation*

Zur Transfektion wurden 20 Millionen Zellen einmal in Medium gewaschen, in 400 µl Medium resuspendiert und in Elektroporationsküvetten überführt. Anschließend wurden 40 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA (Zhu et al., 1996; Tabelle 2), die freundlicherweise von Dr. B. Leber zur Verfügung gestellt wurde, zugegeben und die Zellen 15 Minuten auf Eis inkubiert und durch 5 Pulse à 500 V, 99 µsec elektroporiert. Nach erneuter Inkubation für 15 Minuten auf Eis wurden die Zellen in normales Medium aufgenommen und in Kultur genommen. 24 h nach der Transfektion wurden tote Zellen durch eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (20 Minuten, 2000 rpm) abgetrennt. Zusammen mit der Ziel-DNA wurde das Resistenzgen Geneticin (G418) kotransfiziert, daher wurde weitere 24 h später zur Selektion 1 mg/ml G418 zugegeben. 48 h vor Verwendung der Zellen wurde das Antibiotikum abgesetzt.

Tabelle 2: Expressionsvektoren

Name	Vektor
Vektor Kontrolle (VC)	pRc/CMV
Wildtyp (WT)	pRc/CMV-Bcl-2
Cb5	pRc/CMV-Bcl-cb5
ActA	pRc/CMV-Bcl-ActA
ΔTM	pRc/CMV-Bcl-ΔTM

### 2.4 *Lösungen und Chemikalien*

Folgende Lösungen wurden für die Perfusion während der Video-Imaging Experimente, die Aufbewahrung und Messung der Zellen zur FACS-Analyse und die verschiedenen Waschschriffe verwendet. Die Lösungen wurden alle mit demineralisiertem Wasser hergestellt.

#### Ringer, pH 7.4:

NaCl	145mM
HEPES	10mM
Glucose	10mM
KCl	5mM
CaCl <sub>2</sub>	2mM
MgCl <sub>2</sub>	1mM

Nominell Ca<sup>2+</sup>-freier Ringer, pH 7.4:

NaCl	145mM
HEPES	10mM
Glucose	10mM
KCl	5mM
MgCl <sub>2</sub>	3mM

Ca<sup>2+</sup>-freier Ringer mit 2 mM EGTA, pH 7.4:

NaCl	145 mM
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM
KCl	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
EGTA	2 mM

Kalium-Ringer für die Kalibrierung der pH<sub>i</sub>-Messungen:

NaCl	45 mM
HEPES	20 mM
KCl	105 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM

Die Lösungen wurden vor der Kalibrierung mit KOH bzw. HCl auf die pH-Werte 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 und 8.5 eingestellt.

Komplettmedium mit unterschiedlichen Kalium-Konzentrationen:

	Standard 5.4 mM K <sup>+</sup>	25 mM K <sup>+</sup>	50 mM K <sup>+</sup>	75 mM K <sup>+</sup>	102.7 mM K <sup>+</sup>
NaCl	102.7 mM	83.1 mM	58.1 mM	33.1 mM	5.4 mM
KCl	5.4 mM	25 mM	50 mM	75 mM	102.7 mM
NaHCO <sub>3</sub>	238 mM	238 mM	238 mM	238 mM	238 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	56.3 mM	56.3 mM	56.3 mM	56.3 mM	56.3 mM
Glucose	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
Glutathion	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
Aminosäuren	1x	1x	1x	1x	1x
Vitamine	1x	1x	1x	1x	1x

## 2. Material und Methoden

FCS	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %
Glutamin	0.1 mg/ml				
Penicillin	100 U/ml				
Streptomycin	100 µg/ml				
MgSO <sub>4</sub>	0.4 mM				
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.42 mM				
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml				

### *Aminosäuren (Sigma-Stammlösung 50x):*

L-Lysin-HCl	40 mg/ml
L-Methionin	15 mg/ml
L-Phenylalanin	15 mg/ml
L-Prolin	20 mg/ml
L-Serin	30 mg/ml
L-Threonin	20 mg/ml
L-Tryptophan	5 mg/ml
L-Tyrosin	20 mg/ml
L-Valin	20 mg/ml

### *Vitamine (Stammlösung 100x):*

Nikotinamid	1 mg/ml
Para-Aminobenzoessäure	1 mg/ml
Pyridoxal-HCl	1 mg/ml
Riboflavin	0.2 mg/ml
Thiamin-HCl	1 mg/ml

### PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4):

NaCl	136.9 mM
KCl	2.68 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.14 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.4 mM

Im Versuchsverlauf der Patch-clamp-Experimente wurden die Zellen mit modifizierter Ringerlösung als Extrazellulärlösung perfundiert. Die Intrazellulärlösung war in ihrer Zusammensetzung spezifisch auf die jeweilige Untersuchung abgestimmt.

Extrazellulärlösung zur Untersuchung des CRAC, pH 7.4:

NaCl	145 mM
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM
KCl	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
BSA	0.1 %

Intrazellulärlösung zur Untersuchung des CRAC, pH 7.2:

Cs-Glutamat	128 mM
HEPES	10 mM
BAPTA	12 mM
CaCl <sub>2</sub>	1.33 mM
MgCl <sub>2</sub>	2.41 mM
IP <sub>3</sub>	10 µM

Extrazellulärlösung zur Untersuchung des ORCC, pH 7.4:

NaCl	145 mM
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM
KCl	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM

Intrazellulärlösung I zur Untersuchung des ORCC, pH 7.2:

Cs-Glutamat	160mM
HEPES	10mM
EGTA	1.1mM
Na <sub>2</sub> ATP	2mM
CaCl <sub>2</sub>	0.1mM
MgCl <sub>2</sub>	2mM

### Intrazellulärlösung II zur Untersuchung des ORCC, pH 7.2:

CsCl	160mM
HEPES	10mM
EGTA	1.1mM
Na <sub>2</sub> ATP	2mM
CaCl <sub>2</sub>	0.1mM
MgCl <sub>2</sub>	2mM

Für Versuche mit hypotoner Intrazellulärlösung wurde die Stammlösung wie im Ergebnisteil angegeben mit Aqua bidest verdünnt. Für hypertone intrazelluläre Bedingungen wurde 50 mM Sucrose zugegeben. Zum Ausschluß von Verunreinigungen wurden die Lösungen sterilfiltriert (0.2 µM, FP 30/3, Schleicher und Schuell).

Für die Auftrennung von Proteinen mit dem SDS-PAGE-Verfahren und dem anschließenden Blotten wurden folgende Lösungen verwendet:

### Lysepuffer, pH 7.5:

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

### SDS-Ladepuffer, pH 6.8:

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

Lösung zur Herstellung des Sammelgels, pH 6.8:

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

Lösung zur Herstellung des Trenngels, pH 8.8:

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

Transferpuffer, pH 8.3:

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 %

Inkubationslösung für die Blott-Membranen, pH 8.0:

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

Waschlösungen I, II und III:

Waschlösung	I	II	II
Tris	10 mM	10 mM	100 mM
NaCl	150 mM	150 mM	100 mM
Tween-20	0.05 %		
Triton X-100		0.02 %	
pH	8.0	8.0	9.5

Die verwendeten Chemikalien wurden bei der Firma Sigma, Deisenhofen, die Fluoreszenzfarbstoffe Fura-2-AM, Fura-Red-AM, Fluo-3-AM, DiOC<sub>6</sub>, DiBAC<sub>4</sub>, die DNA-Farbstoffe Hoe-33342 und Syto-16 und der Lösungsvermittler Pluronic F-127 bei Molecular Probes, Eugene, USA bezogen. Sphingosin und die Ceramidanaloga C<sub>2</sub>- und Dihydro-C<sub>2</sub>-Ceramid wurden von Biomol, Hamburg gekauft. Der zur Stimulation des CD95-Rezeptors verwendete Antikörper (Clone-11, CH11) wurde von Biozol, München bezogen. Aufgereinigte Tyrosinkinase p56<sup>lck</sup> wurde von Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA) bezogen.

**Tabelle 2:** Liste der verwendeten Substanzen und deren Bezeichnungen

BAPTA	1,2,-bis(2-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
C <sub>2</sub> -Ceramid	N-Acetyl-D-erythro-sphingosin
C <sub>2</sub> -Dihydroceramid	Dihydro-N-Acetyl-D-erythro-sphingamin
DiBAC <sub>4</sub>	1,3-dibutyl-5-(3-(1,3-dibutyl- 1,2,3,4-tetrahydro-6-hydroxy- 2,4-dioxo-5-pyrimidinyl)-2- propenylidene)- 2,4,6(1H,3H,5H)-Pyrimidinetrione
DiOC <sub>6</sub>	3-hexyl-2-(3-(3-hexyl-2(3H) -benzoxazolylidene)-1-propenyl) – Benzoxazolium-iodide
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-Aminoethylether)-N,N,N',N' Tetraessigsäure
Fluo-3-AM	N-[4-[6-[(acetyloxy)methoxy]-2,7-dichloro-3-oxo-3H-xanthen-9-yl]-2-[2-[2-[bis[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxyethyl]-amino]-5-methylphenoxy]-ethoxy]-phenyl]-N-[2-[(acetyloxy)-methoxy]-2-oxyethyl]-, (acetyloxy)methylester
Fura-2-AM	1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-amino-benzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure pentaacetoxy-methylester
Fura-Red-AM	N-[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl]-N-[5-[2-[2-[bis[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl]amino]-5-methylphenoxy]-ethoxy]-2-[(5-oxo-2-thioxo-4-imidazolidinyliden)methyl]-6-benzofuranyl]-, (acetyloxy)methylester
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl] piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure])
Hoe 33342	Ethyl, 4-[5-(4-methyl-1-piperazinyl) [2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-phenyl]-ether
SDS	Natriumlaurylsulfat
Sphingosin	<i>trans</i> -D-erythro-2-Amino-4-octadecene-1,3-diol

Thapsigargin	8-Oktansäure-6-(acetyloxy)-2,3,3a,4,5,6,6a,7,8,9b-decahydro-3,3a-dihydroxy- 3,6,9-trimethyl-8-[(2-methyl- 1-oxo-2-butenyl)oxy]-2-oxo- 4-(1-oxobutoxy)azuleno[4,5- b]furan-7-yl ester
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxyethyl)aminoethan
Triton	t-Octylphenoxypolyetoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat

## 2.5. *Patch-clamp*

Mit Hilfe der Patch-clamp-Technik (Membranfleck-Klemme) lassen sich elektrische Eigenschaften von einzelnen Zellen oder von bestimmten Zellarealen bestimmen. Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelten ausgehend von der Spannungsklemme (voltage clamp), bei welcher der Zellmembran ein bestimmtes Potential aufgezwungen wird und die daraus resultierenden Ströme gemessen werden, diese Technik (Sakmann and Neher, 1984), für die sie 1991 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie erhielten.

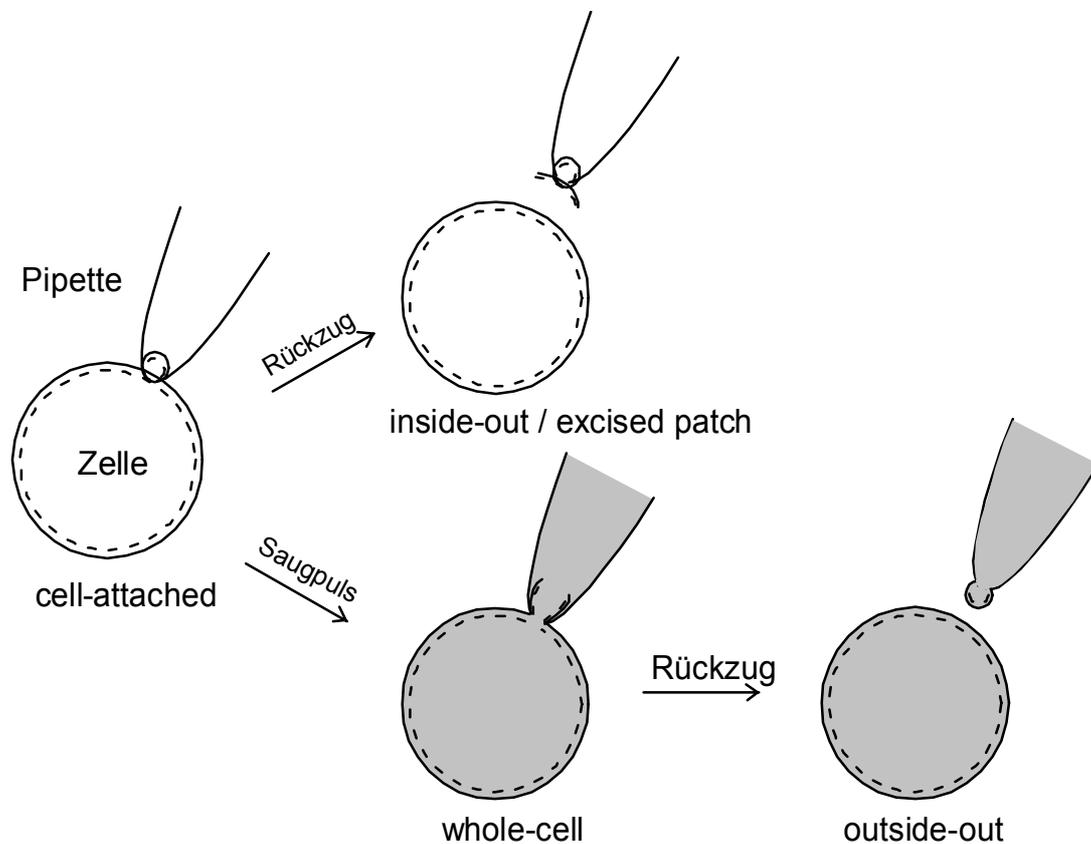
Das Grundprinzip der Messung besteht darin, durch dichtes Aufsetzen der Spitze einer sehr dünn ausgezogenen Glaspipette ein definiertes Membranareal von der übrigen Membran und der Umgebung elektrisch zu isolieren. Der dabei auftretende Widerstand zwischen Glaspipette und Zellmembran, welcher die Auflösung der durch Ionenkanäle fließenden Ströme limitiert, wurde durch einen Zufall optimiert. Die beiden Wissenschaftler Erwin Neher und Bert Sakmann stellten fest, daß im Moment des Aufsetzens auf die Zelle ein geringer Unterdruck in der Pipette den Abdichtungswiderstand um mehrere Zehnerpotenzen in den Gigaohm-Bereich ( $10^9 \Omega$ ; Gigaseal) verschiebt. Durch das reduzierte Grundrauschen und die hohe Auflösung wird die Darstellung einzelner Ionenkanäle ermöglicht. Nach dem Aufsetzen der Pipette lassen sich durch gezielte Manipulationen die Meßkonfigurationen variieren.

Die Ausgangssituation nach Etablieren eines Gigaseals bezeichnet man als on-cell oder cell-attached Konfiguration. In dieser Konfiguration werden die Ionenkanäle, welche sich in dem Zellmembranareal unterhalb der Pipettenöffnung befinden, erfaßt. Durch Zugabe von Polyenantibiotika, Nystatin oder Amphotericin B, in die Pipettenlösung lassen sich perforated Patches herstellen mit einer selektiven Permeabilität der Zellmembran unter der Pipettenöffnung für Moleküle bis zu einer Molmasse von 300 (monovalente Ionen wie  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$ ). Der Vorteil liegt darin, daß die intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Konzentration beeinflusst werden kann ohne das Zytosol mit den Enzymen und second messenger auszuspülen.

Zieht man im cell-attached Modus die Pipette von der Zelle weg, reißt die Membran unter Erhaltung des Abdichtungswiderstands ein, und ein kleines Membranareal bleibt an der Pipettenspitze hängen. In dieser als excised-patch oder inside-out Konfiguration lassen sich Ionenkanäle unterhalb der Pipettenöffnung unter definierten Bedingungen untersuchen, da beide Seiten der Membran für einen Lösungsaustausch zugänglich sind. Für Ionenkanäle, die durch intrazelluläre Botenstoffe reguliert werden, ist diese Konfiguration geeignet, da der leichte Zugang der nach außen liegenden zytosolischen Membranseite ein Studium der intrazellulären Angriffspunkte erleichtert.

Der cell-attached Modus stellt die Ausgangssituation der whole-cell Konfiguration dar. Werden in diesem Modus durch die Pipette ein oder mehrere kurze Saug- oder Spannungspulse appliziert, bricht man ein Loch in die Zellmembran unterhalb der Pipettenöffnung. Durch diese Ganzzellkonfiguration werden die Ionenkanäle der gesamten Zellmembran für die Messung zugänglich gemacht.

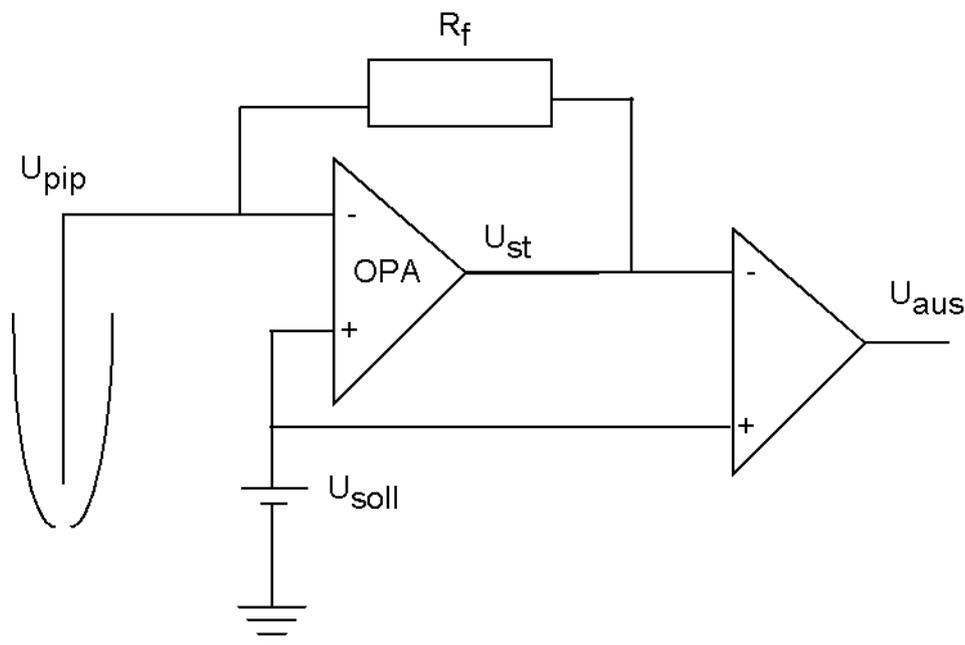
Durch Rückzug der Pipette in dieser Konfiguration wird ein Zellmembranfleck abgerissen, dessen Membranränder sich mit der Zellaußenseite nach außen wieder verschließen. In der entstandenen outside-out Konfiguration werden die Ionenkanäle in der Blasenmembran erfaßt und es lassen sich wie beim whole-cell Modus Intra- und Extrazellulärlösung bestimmen.



**Abbildung 6:** Meßkonfigurationen in der Patch-clamp-Technik

## 2.5.1. Das Funktionsprinzip eines Patch-clamp-Verstärkers

Die Patch-clamp-Technik stellt ein spezielles Spannungsklemme-Verfahren dar. Dabei wird das Membranpotential auf einen bestimmten Wert  $U_{\text{soll}}$  geklemmt und eine Änderung des Membranpotentials  $U_{\text{pip}}$  durch sich entwickelnde Ströme (Leckströme, Ionenkanäle) verhindert. Durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus, bei dem das gemessene Membranpotential mit der Sollspannung verglichen wird, wird ein Kompensationsstrom, der dem durch die Membran fließenden Strom mit entgegengesetzter Polarität entspricht, in die Zelle injiziert. Für die Kontrolle und die Regulation des Membranpotentials ist ein Operationsverstärker verantwortlich. Er besitzt einen hohen Eingangswiderstand, um beim Messen der anliegenden Spannungen den „eigenen“ Stromfluß zu minimieren. An den beiden Eingängen liegen die vorgegebende Sollspannung  $U_{\text{soll}}$  und die gemessene Pipettenspannung  $U_{\text{pip}}$ . Bei einer Spannungsdifferenz  $U_{\text{pip}} - U_{\text{soll}}$  entsteht am Ausgang des Operationsverstärkers eine um ein Vielfaches verstärkte proportionale Spannung (Steuerspannung)  $U_{\text{st}}$ . Durch den Rückkopplungswiderstand  $R_f$  ist diese Spannung proportional dem Strom, der in die Pipette fließt. Die Ausgangsspannung  $U_{\text{aus}}$  kann als Meßgröße für den geflossenen Membranstrom verwendet werden.

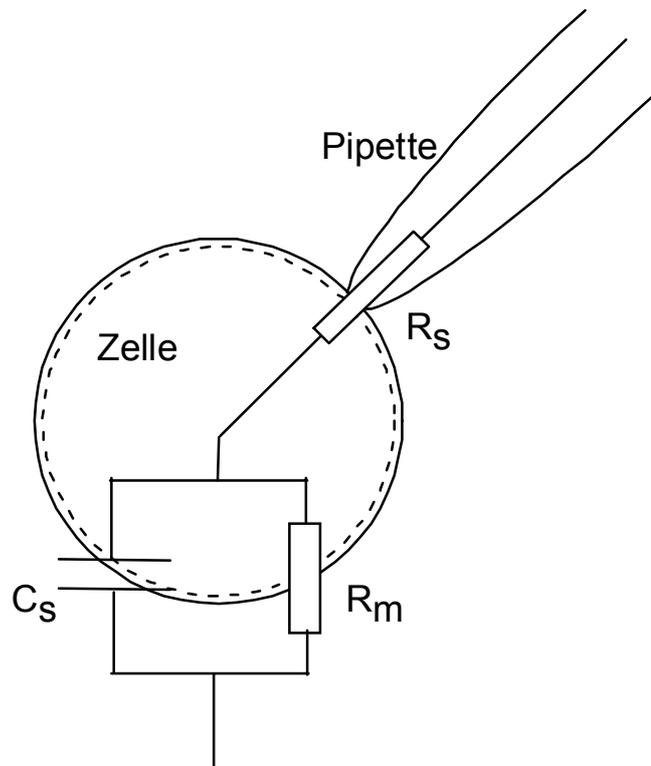


**Abbildung 7:** Vereinfachtes Schaubild eines Patch-clamp-Verstärkers:

OPA: Operationsverstärker,  $R_f$ : Rückkopplungswiderstand,  $U_{\text{soll}}$ : Kommandospannung,  $U_{\text{pip}}$ : Pipettenpotential,  $U_{\text{aus}}$ : Ausgangsspannung.

## 2.5.2. Elektrische Eigenschaften der whole-cell-Ableitung

Die Zellmembran einer Zelle kann man elektrisch durch ihren Widerstand  $R_m$  und ihre Membrankapazität  $C_m$  darstellen. Bei jeder Spannungsänderung muß der Kondensator  $C_m$  (Fläche der Zellmembran) vollständig umgeladen werden; die benötigte Ladungsmenge hängt dabei von  $C_m$  ab. Außerdem wird durch den Widerstand  $R_s$  der Pipettenöffnung die Geschwindigkeit begrenzt, mit welcher der Strom appliziert wird, und dadurch auch die Zeit zum Umladen des Kondensators beeinflusst. Abbildung 8 gibt einen Überblick über den Schaltkreis der Ganzzelleableitung.



**Abbildung 8:** Schaltkreis einer whole-cell Konfiguration:

$R_s$ : Serienwiderstand,  $R_m$ : Membranwiderstand,  $C_m$ : Membrankapazität

Bei jeder Änderung der Kommandospannung kommt es aufgrund des Umladeprozesses der Pipetten- und Zellmembrankapazität zu einer Verzerrung des zu beobachtenden Stroms. Um diese kapazitiven Ströme zu minimieren, wird eine sogenannte Kapazitätskompensation eingesetzt, wodurch der transiente Umladestrom automatisch kompensiert wird. Zur Durchführung einer Messung in der whole-cell Konfiguration wird dabei im cell-attached Modus das kapazitive Artefakt der Pipette und des Pipettenhalters

( $C_f$ ) kompensiert und nach Einbrechen in die Zelle die Gesamtzellkapazität  $C_m$  kompensiert.

Außerdem können die Membrankapazität und die kapazitiven Aufladungstransienten dazu verwendet werden die Membranoberfläche und damit die Zellgröße und Oberflächenveränderungen in der Zellmembran wie z. B. eine Kapazitätzunahme während der Exozytose zu berechnen. Die spezifischen Kapazitäten für biologische Membranen betragen  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  (Bödding, 1996).

### 2.5.3. Aufbau des Meßplatzes

Die Zellen, T-Zellen und Jurkat Zellen, wurden in einer Zellkammer, die durch ein mit Poly-L-Lysin beschichtetes Deckglas ( $\varnothing = 35 \text{ mm}$ ) verschlossen war, auf dem Objektisch eines Zeiss Axiovert 135 Invertmikroskops (Zeiss, Oberkochen) untersucht, das sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Druckluft) zur Abschirmung von mechanischen Schwingungen und Erschütterungen befand.

Das Perfusionssystem, durch stufenlos regulierbaren Luftdruck getrieben, bestand aus fünf parallel angeordneten Perfusionsröhrchen mit einem Innendurchmesser von  $100 \mu\text{m}$ . Das raumtemperierte ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) Perfusat konnte durch Parallelverschiebung der Röhrchen in die Umgebung der zu untersuchenden Zelle gebracht werden und so ein Mediumwechsel innerhalb von  $100 \text{ ms}$  erreicht werden.

Die Meßpipette war über einen Pipettenhalter am Vorverstärker befestigt, der über einen Drei-Wege-Mikromanipulator am Objektisch fixiert war. Zur Regulation des Druckes in der Meßpipette war diese mit einem flüssigkeitsgefüllten U-Rohr zur Einstellung eines konstanten Druckes oder einem offenen Schlauch zur Applikation der Saugpulse verbunden.

Zur Abschirmung störender elektrischer Felder wurde die Meßvorrichtung von einem Faraday-Käfig umgeben und alle Bestandteile geerdet.

Als Patch-clamp-Verstärker diente ein EPC7 (List-Medical, Darmstadt), an den ein Oszilloskop (HM 205-3 20 MHz Storage Scope, Hameg, Frankfurt a.M.) angeschlossen war. Zur Aufzeichnung und Auswertung der Daten wurden diese digitalisiert und mit der Software Pulse + Pulsefit 8.11 (Heka, Lambrecht) ausgewertet.

### 2.5.4. Durchführung der Patch-clamp-Experimente

Die Zellen wurden etwa 15 min vor Beginn der Messung in die Meßkammer gegeben, ein Anheften der Zellen an das Poly-L-Lysin beschichtete Deckglas ermöglicht und danach perfundiert um nicht anhaftende Zellen zu eliminieren. Die Zellen wurden spätestens nach 1 h ausgetauscht. Die Meßpipetten wurden aus Glaskapillaren (GC150TF-15, Clark Electromedical Instruments, Pangbourne Reading, GB) aus Borosilikatglas unter Erhitzung mit einem Horizontalpuller (DMZ Universal, Zeitz-Instrumente, Augsburg) gezogen. Zur Reduktion der elektrischen Pipettenkapazität wurden die Pipettenspitzen bis unmittelbar vor die vordere Pipettenöffnung mit einer isolierenden Paraffinschicht überzogen. Der Pipettenwiderstand der verwendeten Pipetten lag im Bereich von 3 und 5 M $\Omega$ . Die Glaskapillare wurde über einen Sterilfilter mit Intrazellulärlösung befüllt und dann über die Ag/AgCl-Meßelektrode geschoben, fixiert und unter Anlegen von Überdruck ins Bad eingetaucht. Die Referenzelektrode bestand wie die Meßelektrode aus einem in einer 1 M KCl-Lösung elektrolytisch chlorierten Silberdraht und wurde an der Meßkammer fixiert auf Grund gelegt. Mit Hilfe des Mikromanipulators wurde die Pipettenspitze unter optischer Kontrolle in Zellnähe plaziert und der Offset abgeglichen. Bei erkennbarer Abnahme der gemessenen Stromantwort über einen applizierten Testpuls (-5 mV für 5 ms, -10 mV für 10 ms) wurde der Überdruck an der Pipette abgelassen und durch Saugpulse ein Gigaseal gebildet. In dieser cell-attached Konfiguration wurde die Pipettenkapazität über den Verstärker kompensiert und durch weitere Saugpulse ein Loch in die Zellmembran gerissen (whole-cell Modus). Nach Kompensation der kapazitiven Transienten, Gesamtzellkapazität und Membranwiderstand, wurde mit der Messung begonnen.

Zur Aufzeichnung der kapazitiven Calciumströme (CRAC) von Lymphozyten wurden im Abstand von einer Sekunde Spannungsrampen von -120 mV nach +40 mV und 200 ms Dauer appliziert. Die Ströme wurden mittels BAPTA induziert, das die  $[Ca^{2+}]_i$  erniedrigt und dadurch über die Entleerung intrazellulärer Speicher über ein unbekanntes Signal den  $I_{CRAC}$  aktivierte.

Zur Messung der Stromantwort in Lymphozyten, die durch ORCC getragen wurden, wurden lineare Spannungsrampen von -100 mV bis +100 mV bei einer Länge von 200 ms verwendet. Zur Kontrolle wurden bei Bedarf zusätzlich Spannungspulse in 20 mV Schritten von -80 mV bis +80 mV gegeben (Dauer je 200 ms). Die ermittelten Stromantworten stimmten gut überein.

Die ermittelten Stromantworten wurden mit einer Grenzfrequenz von 0.5 kHz tiefpaßgefiltert und mit einer Frequenz von 5 kHz digitalisiert.

## **2.6. Mikroskopie**

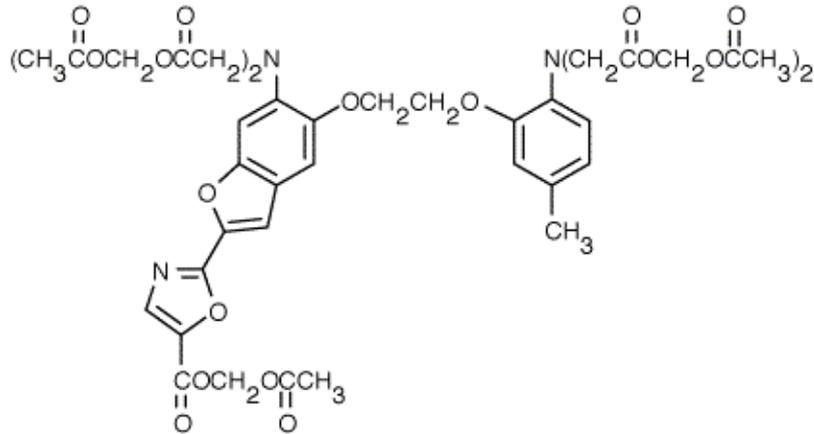
### 2.6.1. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie bedient sich der Eigenschaft bestimmter Stoffe, sogenannter Fluorochrome, bei Bestrahlung Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren (Absorptionsspektrum) und Licht einer längeren Wellenlänge abzustrahlen (Emissionsspektrum). Diese Erscheinung kommt dadurch zustande, daß durch die zugeführte Lichtenergie Elektronen in höhere Energiezustände angehoben werden und beim Rücksprung, der in Stufen erfolgt, energieärmeres Licht emittieren (Gesetz nach Stoke). Das resultierende Emissionsspektrum kann sowohl qualitativ als auch quantitativ ausgewertet werden.

In dieser Arbeit wurde die Fluoreszenzmikroskopie zur Messung der  $[Ca^{2+}]_i$ , Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes und Detektion von apoptotischen Veränderungen verwendet. Dabei wurde eine fluoreszierende membrangängige Verbindung in die Zelle eingebracht.

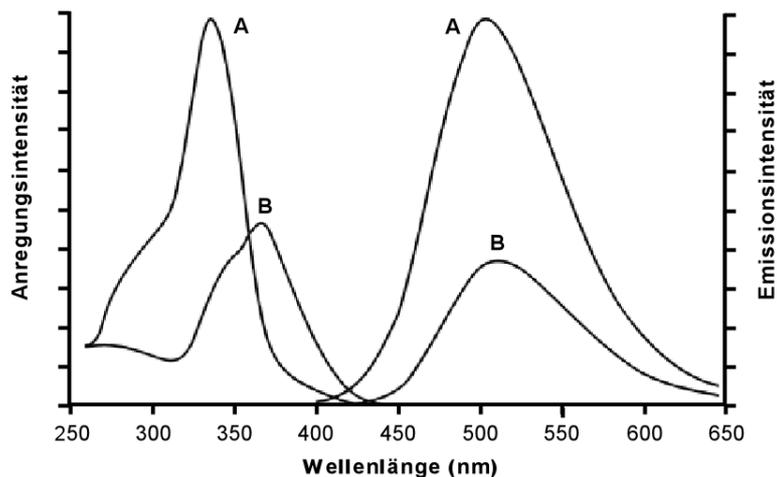
#### *2.6.1.1. Konzentrationsmessung mit digitaler Fluoreszenzmikroskopie*

Zur Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  wurde der fluoreszierende zellmembrangängige Farbstoff Fura-2-AM (Molecular Probes, Eugene, USA; AM = Acetoxymethylester) verwendet, der eine einfache und quantitative Bestimmung der freien  $[Ca^{2+}]_i$  in intakten Zellen ermöglicht (Grynkiewicz et al., 1985). Die Zellen werden mit der lipophilen Form des Farbstoffs Fura-2-AM, dem Acetoxymethylester, der eine Diffusion ins Zellinnere ermöglicht, beladen. Nach Anreicherung der Esterform im Zytosol wird der Ester durch zytosolische unspezifische Esterasen hydrolysiert, und dadurch eine Rückdiffusion verhindert. Die entstehende freie Säure bindet  $Ca^{2+}$  mit vier Carboxylgruppen; Fura-2 ist ein  $Ca^{2+}$ -Chelator. Die Stilbengruppe ist das Chromophor des Moleküls. Diese Substanz ist sehr selektiv für  $Ca^{2+}$  und nahezu unempfindlich für pH-Schwankungen im physiologischen Bereich. Die  $Ca^{2+}$ -Affinität ist sehr günstig für physiologische Messungen, da die Dissoziationskonstante etwa bei  $0,14 \mu M$  liegt, also in dem Bereich zellulärer  $Ca^{2+}$ -Signale ( $0,1 - 1 \mu M$ ).



**Abbildung 9:** Strukturformel von Fura-2-AM

Die Anregung von Fura-2 erfolgt mit zwei verschiedenen Wellenlängen, da die Absorption (Wellenlänge des Anregungslichts) in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier und in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Lösung differiert. In  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung wird das Absorptionsmaximum des  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Fura-2-Moleküls bei 365 nm gemessen. Bei hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verschiebt sich das Maximum auf 340 nm. Nur am isosbestischen Punkt, der bei 360 nm liegt, ist die Fluoreszenz unabhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Bei Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  zu einer Fura-2-Lösung ergeben sich eine Zunahme der Fluoreszenzintensität bei 340 nm und eine Abnahme bei 380 nm. Bei beiden verwendeten Anregungswellenlängen ( $\lambda = 340$  nm und  $\lambda = 380$  nm) wird Licht der Wellenlänge 510 nm emittiert. Daraus ergibt sich die besondere Eignung von Fura-2 für Messungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .



**Abbildung 10:** Anregungs- und Emissionsspektrum von Fura-2-AM in  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigter (A) und  $\text{Ca}^{2+}$ -freier (B) Lösung bei pH 7.2. Bei Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  ergeben sich eine Zunahme der Fluoreszenzintensität bei 340 nm und ein Abnahme bei 380 nm.

Bei Beleuchtung der Fura-2 beladenen Zellen mit der Wellenlänge 340 nm fluoresziert der Farbstoff bei 510 nm mit der Intensität  $F_{340}$ . Die Fluoreszenzintensität wird bestimmt durch die Konzentration des Farbstoffs (c), die Dicke der Zelle (d), einer Konstanten (K), welche die optischen Eigenschaften der Messapparatur zusammenfaßt, und der  $[Ca^{2+}]_i$ . Die Parameter c, d, K sind aber unbekannt. Führt man nun zwei Fluoreszenzmessungen in kurzer zeitlicher Folge mit einer Anregungswellenlänge bei 340 nm und 380 nm durch, erhält man durch Bildung des Quotienten (Ratio R) der beiden Fluoreszenzintensitäten  $F_{340}$  und  $F_{380}$  und unter der Annahme, daß sich die unbekannt Parameter der beiden Messungen nicht unterscheiden, eine experimentell bestimmbare Messgröße, die nur von der  $[Ca^{2+}]_i$  abhängt. Farbstoffkonzentration, Hintergrundfluoreszenz und andere Störfaktoren sind weitgehend eliminiert.

Um aus den gemessenen Ratio-Werten annäherungsweise die entsprechenden  $[Ca^{2+}]_i$  zu berechnen, wird die Gleichung nach Grynkiewicz verwendet.

$$[Ca^{2+}]_i = K_D * Q * \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \quad (1)$$

R = gemessene Ratio im Experiment

$R_{max}$  = Ratio gemessen in Ringer mit 2 mmol/l  $Ca^{2+}$

$R_{min}$  = Ratio gemessen in  $Ca^{2+}$ -freien Ringer mit 2 mmol/l EGTA

$K_D$  = Dissoziationskonstante für Fura-2 (140 nmol/l)

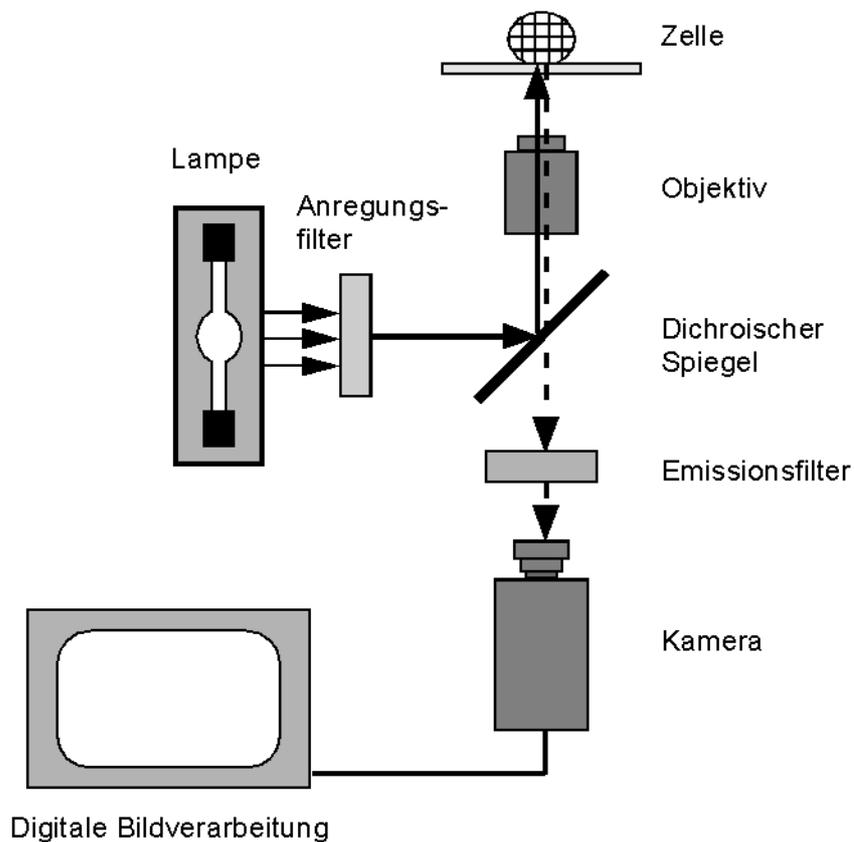
Q = Quotient der beiden Fluoreszenzintensitäten  $F_{min}$  und  $F_{max}$  bei  $\lambda = 380$  nm

$[Ca^{2+}]_i$  =  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Zytosol der gemessenen Zellen

Für die Kalibrierung ist es notwendig das Emissionsmaximum ( $R_{max}$ ) und –minimum ( $R_{min}$ ) bei gesättigtem  $Ca^{2+}$  bzw. bei  $Ca^{2+} = 0$  zu bestimmen. Dazu wurden Zellen mit dem  $Ca^{2+}$ -Ionophor Ionomycin (10  $\mu$ M) permeabel gemacht und die Fluoreszenzintensitäten bzw. die Ratiowerte unter  $Ca^{2+}$ -freien Bedingungen (0 mM  $Ca^{2+}$  / 2 mM EGTA) und  $Ca^{2+}$ -Sättigung (2 mM  $Ca^{2+}$ ) gemessen.

Die Bestimmung der  $[Ca^{2+}]_i$  erfolgte mit einem Invertfluoreszenzmikroskop (Axiovert 135, Zeiss, Oberkochen) (Abbildung 11). Aus dem Licht der Xenonlampe werden durch Anregungsfilter, die in einer Filterradeinheit (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) zusammengefaßt sind, die Wellenlängen 340 nm und 380 nm herausgefiltert und von einem dichroischen Spiegel mit einer kritischen Wellenlänge zwischen Anregungs- und

Emissionsmaximum durch das verwendete Ölimmersionsobjektiv (Vergrößerung 40x) zu den Zellen gelenkt. Die Zellen wurden mit 1  $\mu\text{M}$  Fura-2-AM beladen und 250  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension in Plexiglaskammern gegeben, die auf der Unterseite mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern ( $\text{Ø} = 30 \text{ mm}$ ) verschlossen waren, und 1 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Das vom Farbstoff emittierte Licht durchdringt den Spiegel und wird durch den Emissionsfilter auf ein enges Wellenlängenband eingeschränkt. Das Emissionslicht fällt in eine CCD-Videokamera (Proxitronic, Bensheim), die ein Bild der fluoreszierenden Zelle aufnimmt, digitalisiert und an den Rechner übermittelt. Zur Aufzeichnung wurde die Software Axon Imaging Workbench (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) verwendet. Mit einem selbst hergestellten Perfusion- und Wärmesystem konnten die verschiedenen Lösungen (Ringer mit dem Zusatz unterschiedlicher Substanzen) appliziert werden und die Temperatur bei den Experimenten variiert werden.

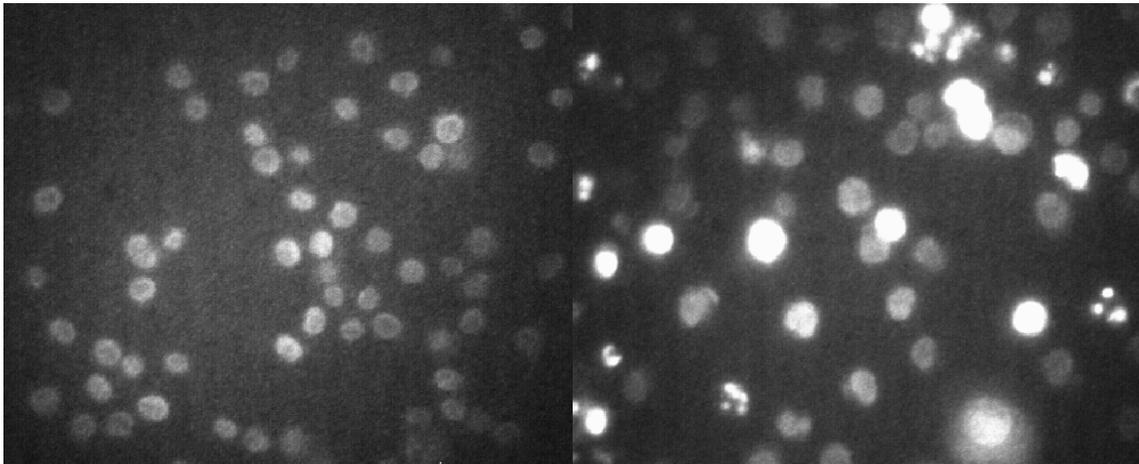


**Abbildung 11:** Schematischer Aufbau eines Invertfluoreszenzmikroskops:

Das Licht einer Xenonlampe wird in das Mikroskop eingekoppelt und mit einem Anregungsfilter eine bestimmte Wellenlänge herausgefiltert (bei Fura-2 340 nm und 380 nm). Ein dichroischer Spiegel reflektiert das Anregungslicht durch das Objektiv zur Zelle. Das von der Zelle emittierte Fluoreszenzlicht (hier 510 nm) kann den dichroischen Spiegel durchdringen und wird durch den Emissionsfilter gebündelt. Das Emissionslicht fällt in eine Kamera, die das Bild zur digitalen Verarbeitung weiterleitet.

### 2.6.1.2. Kernfragmentation

Die Farbstoffe Hoe 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) und Syto-16 eignen sich zur Identifizierung apoptotischer Zellen. Beim apoptotischen Zelltod kommt es zu Veränderungen des Zellkerns und zu einer spezifischen Degradierung der DNA. Die Zellen werden mit den DNA-bindenden Farbstoffen Hoe 33342 oder Syto-16 gefärbt. Nach Anregung des Farbstoffs bei 340 nm wird die Emission bei 510 nm aufgenommen und anschließend fluoreszenzmikroskopisch ausgezählt bzw. die im Meßkanal FL-1 (530 nm) durchflußzytometrisch bestimmte Fluoreszenzintensität zur Auswertung herangezogen.



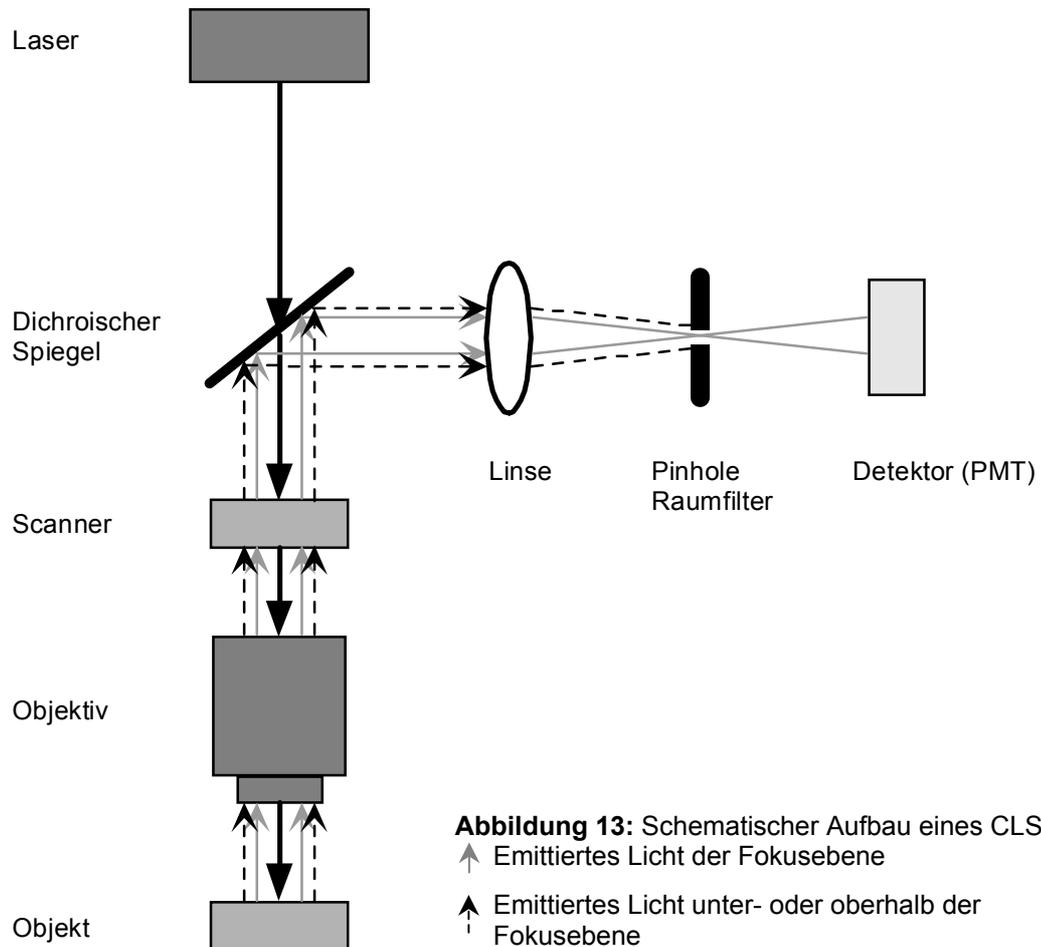
**Abbildung 12:** Hoe 33342 gefärbte Kerne von apoptotischen (leuchtend hell gefärbt) und vitalen (diffus blaß gefärbt) Jurkat Zellen. Links Kontrolle, rechts 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy.

### 2.6.2. Volumenmessung mit Durchlichtmikroskopie

Bei adhärennten Zellen ist die Bestimmung des Zellvolumens erschwert, da Veränderungen des Zellvolumens sich hauptsächlich in der vertikalen (z-Achse) Dimension abspielen. Eine optische Volumenmessung erfordert ein dreidimensionales Verfahren wie Laserscanningmikroskopie. Zur Volumenmessung bei sphärischen Zellen wie Lymphozyten kann die Annäherung verwendet werden, daß sich Volumenänderungen in alle drei Raumachsen gleich auswirken. Es genügt hier eine Flächenmessung, die auf das Volumen hochgerechnet werden kann. Bei Durchlicht wurden Videobilder aufgenommen und digitalisiert. Die Fläche bzw. der Durchmesser dieser Partikel wurde empirisch bestimmt und als Maß für eine Volumenänderung benutzt.

### 2.6.3. Konfokale Mikroskopie

Beim CLSM (confocal laser scanning microscope) handelt es sich um ein Lichtmikroskop, an das eine LSM-Unit gekoppelt ist. Unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen können in Präparaten auf subzellulärer und zellulärer Ebene Untersuchungen gemacht werden. Grundsätzlich funktioniert ein LSM wie ein gewöhnliches Mikroskop. Das vom Laser generierte Licht definierter Wellenlänge wird aufgeweitet und passiert als paralleles Strahlenbündel einen Strahlteiler, welcher Fluoreszenzemission wellenlängenspezifisch diskriminiert. Über die darauffolgende Strahlablenkung wird der Strahl durch das Objektiv sequentiell auf das Präparat fokussiert. Aus der Fokusebene emittiertes Licht gelangt über den Scanner zu den Strahlteilern, wo die Fluoreszenz auf die Photomultiplier verteilt wird. Bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie trägt auch das emittierte Licht unter- und oberhalb der Fokusebene zur Bildentstehung bei. Beim CLSM ermöglicht eine variable Lochblende (pinhole, Raumfilter) die ausschließliche Detektion von Licht aus der fokalen Ebene (grauer Pfeil). Das emittierte Licht einer anderen Ebene wird ausgeblendet (schwarz-unterbrochener Pfeil) und dadurch wird eine hochauflösende Abbildung der Probe ermöglicht.



**Abbildung 13:** Schematischer Aufbau eines CLSM

↑ Emittiertes Licht der Fokusebene

↑ Emittiertes Licht unter- oder oberhalb der Fokusebene

### *2.6.3.1. Determination der subzellulären Lokalisation des Onkoproteins Bcl-2*

Für die Determination der subzellulären Lokalisation des Onkoproteins Bcl-2 wurde das CLSM Zeiss LSM 410 (Carl Zeiss, Oberkochen) verwendet, das mit einem Argon-Laser (488 nm), einem HeNe-Laser (534 nm), einem HeNe-Laser (633 nm) und drei konfokalen Auflichtkanälen mit je einem Fluoreszenzdetektor ausgestattet ist.

Zur Immunanfärbung des Bcl-2 Proteins wurden Zellen immobilisiert, indem die Zellsuspension in die Öffnungen einer 24-well-Platte pipettiert wurde, auf deren Boden mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser waren, und im Brutschrank maximal 20 min inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 1 % Paraformaldehyd 15 bis 60 min fixiert. Nach dem Entfernen des Paraformaldehyds wurden die Zellen mit 0.5 % Tween 20 mit 5 minütiger Inkubation gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 0.05 % Triton X-100/PBS 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach dem erneuten Waschen wurden der Primärantikörper (1:100 in PBS, 5 % FCS) zugegeben und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Zellen mehrmals 10 min gewaschen und der an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper (1:200 in PBS, 5 % FCS) aufgebracht. Danach folgten drei 10 minütige Waschschrte. Für die LSM wurden die Deckgläser umgedreht auf einen Tropfen Einbettungsflüssigkeit (Moviol, Sigma, Deisenhofen) gelegt, der auf einem Objektträger aufgebracht worden war, außen mit Nagellack überzogen, und bis zur Messung bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

Zur Färbung des Bcl-2 Onkoproteins wurde ein polyklonaler Ziege-anti-human Bcl-2-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) verwendet. Das Markieren der endoplasmatischen SERCA-ATPase erfolgte mit einem Maus-anti-SERCA Antikörper (UBI Biomol, Hamburg). Die Mitochondrien wurden mit dem spezifischen mitochondrialen Farbstoff MitoTracker™ Orange FM (Molecular Probes, Mobitec, Göttingen) angefärbt. Als Sekundärantikörper wurde ein Cy™ 5-konjugierter Kaninchen-anti-Ziege Antikörper (Dianova, Hamburg) und ein Alexa Fluor™ –konjugierter anti-Maus Antikörper (Molecular Probes, Mobitech, Göttingen) eingesetzt. Es wurden die Anregungswellenlänge von 543nm für MitoTracker™ und Alexa-behandelte Zellen und von 633 nm für Cy™ 5-behandelte Zellen verwendet.

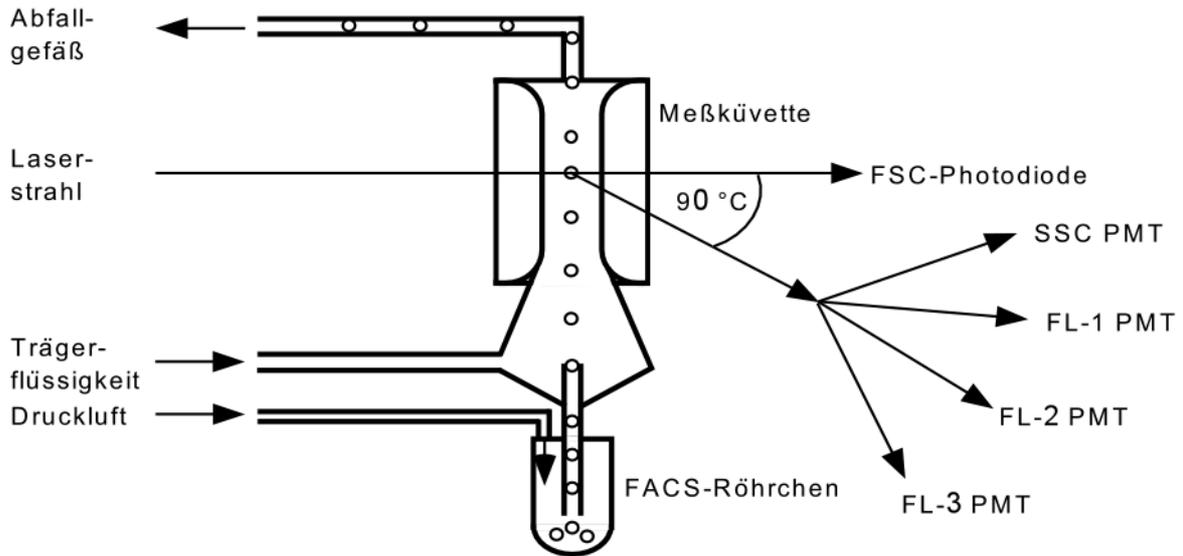
### **2.7. Durchflußzytometrie**

Das Prinzip der Durchflußzytometrie ist die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften einzelner Zellen. Das Durchflußzytometer erlaubt die gleichzeitige Messung von Fluoreszenz- und Streulichtsignalen an einzelnen Zellen. Relative Zellgröße, Granularität, sowie drei verschiedene Fluoreszenzintensitäten (FL-1 = 530 nm; FL-2 = 585 nm; FL-3 = 650 nm) können für mehrere tausend Zellen in kurzer Zeit ermittelt werden.

Zur Analyse wird die in einem FACS-Röhrchen vorgegebene Zellsuspension über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die aus Quarzglas bestehende Meßküvette eingeführt. Die Zellen passieren von einem Hüllstrom umgeben, der den Probestrom stabilisiert, einzeln den Analysenpunkt. Dieses Prinzip bezeichnet man als hydrodynamische Fokussierung. Der Analysenpunkt ist definiert als Punkt, an welchem der Argon-Laserstrahl den Flüssigkeitstrahl kreuzt bzw. auf die passierenden Zellen trifft. Der einfallende Lichtstrahl interagiert mit der Zelle und wird gestreut (Streulicht). Der als Vorwärtstreulicht (FSC; forward light scatter) bezeichnete Anteil ist ein Maß für die Zellgröße und wird mittels eines Photodetektors aufgefangen. Das Rechtwinkelstreulicht (SSC; side scatter), das über einen Photodetektor (PMT; photomultiplier tube) mit signalverstärkender Wirkung bestimmt wird, wird im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreut und ist ein Maß für die Zelldichte und die Granularität. Über drei weitere Meßkanäle kann gleichzeitig Licht verschiedener Wellenlängen aufgezeichnet werden. Neben der Detektion von Zellgröße und Granularität können dadurch auch Fluoreszenzfarbstoffe mit einer Anregungswellenlänge bei 488 nm verwendet werden, deren Emission mit den zur Verfügung stehenden Detektoren gemessen werden kann. Es ist möglich durch den Einsatz von Fluorochromen mit einem überlappenden Absorptionsspektrum, jedoch verschiedenen Emissionsspektren, beide Farbstoffe gleichzeitig anzuregen und somit zwei Emissionssignale zu erhalten.

Mit diesem Verfahren können unter anderem Oberflächenproteine mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper und DNA-Strangbrüche detektiert werden, intrazelluläre pH-Bestimmungen, Membranpotential- und intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen durchgeführt werden.

Soweit nicht anders angegeben, wurden während der Messung mit Hilfe der Durchflußzytometrie 10.000 Zellen analysiert; die Versuche wurden am FACS (Fluoreszenz-Aktivierter-Zell-Sorter; FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, USA) bei Raumtemperatur (20 °C) durchgeführt.



**Abbildung 14:** Aufbau eines Durchflußzytometers:

Durch Überdruck und von einem Hüllstrom umgeben gelangen die farbstoffbeladenen Zellen in die Meßküvette. Das von einem Argon-Laser ausgestrahlte Licht trifft auf eine Zelle, wodurch diese zur Fluoreszenz angeregt wird. Mit Hilfe von Photodioden und PMT wird der FSC, der SSC und die Fluoreszenzen FL-1, FL-2 und FL-3 gemessen.

### 2.7.1. Ratiometrische Zwei-Farbstoffanalyse mit Durchflußzytometrie

Die Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration erfolgte mittels ratiometrischer Zwei-Farbstoffanalyse im Durchflußzytometer. Dazu wurden die membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffe Fura-Red-AM und Fluo-3-AM (Molecular Probes, Eugene, USA) verwendet, die mittels eines Argon-Lasers bei 488 nm angeregt werden und in Abhängigkeit von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration emittieren. Die Acetoxymethylestergruppe ermöglicht den  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Farbstoffen auf Grund ihrer Lipophilie ein Permeieren der Zellmembran. Durch intrazelluläre Esterasen wird diese Estergruppe abgespalten und somit das Zurückdiffundieren in den Extrazellulärraum verhindert.

Die T-Lymphozyten wurden 30 min mit 1  $\mu\text{M}$  Fura-Red-AM und 1  $\mu\text{M}$  Fluo-3-AM unter Verwendung des Lösungsvermittlers Pluronic F-127 (Molecular Probes, 15 % ige Lösung in DMSO 1:1000 verdünnt im Medium) im Brutschrank bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach der Beladung wurden die Zellen im Dunkeln für 30 min in Ringer bei Raumtemperatur gelagert. Für die Kalibrierung wurden die Zellen 5 min vor der Messung in der gewünschten Kalibrierlösung resuspendiert und mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor Ionomycin (10  $\mu\text{M}$ ) versetzt. Zur Kalibrierung wurden Lösungen mit 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  und 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$  / 2 mM EGTA verwendet und das Fluoreszenzmaximum und –minimum bestimmt.

Die Intensität des Farbstoffs Fura-Red zeigt eine indirekt Proportionalität zur  $[Ca^{2+}]_i$ , d.h. mit sinkender  $[Ca^{2+}]_i$  nimmt die Intensität des emittierten Lichtes zu. Das Emissionsmaximum liegt bei  $630 \pm 26$  nm und kann daher im Meßkanal FL-3 ( $\lambda = 650$  nm) detektiert werden. Der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 weist eine direkte Proportionalität zwischen  $[Ca^{2+}]_i$  und Emissionsintensität auf, d.h. mit zunehmender  $[Ca^{2+}]_i$  wird auch eine Intensitätszunahme verzeichnet; die Emission (Maximum bei  $530 \pm 30$  nm) wird im Kanal FL-1 ( $\lambda = 530$  nm) gemessen. Die Meßdaten wurden mit der Software Cellquest (Becton Dickinson, Heidelberg) aufgearbeitet und im nächsten Schritt wurde die Ratio (Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten Fura-Red/Fluo-3) mit dem selbsterstellten Makro im Programm Igor Pro (Wavemetrics, OR, USA) berechnet und graphisch dargestellt. Die berechneten Ratiowerte, die sich aus einer Zwei-Farbstoffmessung ergeben, wurden analog dem Kapitel ratiometrische Fluoreszenzmikroskopie unter zu Hilfenahme der Gleichung nach Grynkiewicz et al. (1985) annäherungsweise in  $[Ca^{2+}]_i$  umgerechnet (Novak and Rabinovitch, 1994).

### 2.7.2. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials

Zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials wurden Zellen mit 200  $\mu$ M des lipophilen, kationischen Farbstoffs DiOC<sub>6</sub>(3) für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert und ohne vorheriges Waschen direkt der FACS-Analyse (FL-1;  $\lambda = 530$  nm) unterworfen. Um das mitochondriale Membranpotential komplett zu depolarisieren wurde 1  $\mu$ M des Entkopplers CCCP zugegeben. Eine Depolarisierung der mitochondrialen Membran wird durch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität wiedergegeben.

### 2.7.3. Bestimmung des Plasmamembranpotentials

Das Plasmamembranpotential wurde mittels des lipophilen, anionischen Farbstoffs DiBAC<sub>4</sub>(3) gemessen. Die Zellen wurden mit 150 nM des spezifischen Farbstoffs DiBAC<sub>4</sub>(3) für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert und das Membranpotential durchflußzytometrisch unter Verwendung von FL-1 quantifiziert. Zur vollständigen Depolarisation des Membranpotentials wurden die Zellen in Kompletmedium mit hoher Kaliumkonzentration (102.7 mM) inkubiert. Durch Zunahme der Fluoreszenzintensität wird eine Depolarisation der Plasmamembran aufgezeigt.

#### 2.7.4. Bestimmung des Zellvolumens

Die Veränderung des Zellvolumens in Lymphozyten nach Bestrahlung oder nach Zugabe von Osmolyten wurde mit dem Durchflußzytometer bestimmt. Die behandelten Zellen wurden in Medium gemessen und der FSC als Kriterium für die Volumenzunahme quantifiziert. Die erhaltenen FSC-Werte wurden mit der Software Cellquest ausgewertet und der Mittelwert und der Standard Error of the Mean (SEM) zur Datenauswertung verwendet.

#### 2.7.5. Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes ( $\text{pH}_i$ )

Der Fluoreszenzfarbstoff Carboxy-SNARF<sup>®</sup>-1-AM erlaubt die durchflußzytometrische Bestimmung des  $\text{pH}_i$ . Das Emissionsspektrum von Carboxy-SNARF<sup>®</sup>-1-AM weist eine pH-Abhängigkeit mit einem Shift in den längerwelligen Bereich mit steigendem  $\text{pH}_i$ . Außerdem kann durch eine ratiometrische Messung der Fluoreszenzintensitäten bei den Wellenlängen 580 nm und 640 nm eine akkurate Determination des  $\text{pH}_i$  erzielt werden. Die Zellen wurden mit 5  $\mu\text{M}$  SNARF-1-AM für 30 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen lichtgeschützt für 30 min im Wasserbad bei 37 °C gelagert und nach dem Abzentrifugieren für die pH-Wert-Messung in frischem Ringer resuspendiert.

Vor jeder Versuchsreihe wurde eine Kalibrierung durchgeführt. Farbstoffbeladene Zellen wurden in Kalium-Ringer mit unterschiedlichen pH-Werten (6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5) aufgenommen und zur Äquilibration des  $\text{pH}_i$  mit dem extrazellulären Medium mit dem Ionophor Nigericin (10  $\mu\text{M}$ ) versetzt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden bestimmt und mit einem selbsterstellten Makro im Programm Igor Pro (Wavemetrics, OR, USA) in Ratio-Werte umgerechnet. Mit den erhaltenen  $\text{pH}_i/\text{R}$ -Wertepaaren wurde eine Regressionsgerade erstellt, anhand welcher der  $\text{pH}_i$  in den Zellen berechnet wurde.

### 2.8. ***Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot***

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden  $10^6$  Zellen in Lysepuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren von Zelltrümmern wurden 20  $\mu\text{l}$  Lysat mit 5  $\mu\text{l}$  SDS-Ladepuffer und 2  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt, 2 min auf 98 °C erhitzt und anschließend in einem SDS-Gel (Sammelgel, Trenngel, Laufpuffer: SDS-PAGE-Puffer,

Roth, 1:10 verdünnt) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Gelelektrophorese wurden die separierten Proteine in einem Tankblot (Biorad, München) elektrophoretisch auf Hybond Nitrozellulose-Membran (Amersham, Braunschweig), die zuvor in Transferpuffer eingelegt wurde, transferiert. Nach dem Blotten wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in einer FSC-haltigen Lösung inkubiert. Dadurch wurden die proteinfreien Stellen auf der Membran abgeblockt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (polyklonaler Ziege-anti-human-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) oder polyklonaler Kaninchen-anti-human-Poly-(ADP-ribose)-Polymerase (New England Biolabs, USA)) erfolgte durch Zugabe in geeigneter Verdünnung über 4 h bei 4 °C bzw. 45 min bei Raumtemperatur. Die Membran wurde mehrmals gewaschen (Waschlösung I) und mit dem enzymgekoppelten zweiten Antikörper (anti-Ziege- oder Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Alkalische Phosphatase (1:20.000; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)) in TBS/Tween bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem erneuten Waschen (Waschlösung II und III) der Blots wurden die Membranen 5 min in CSPD®-Substratlösung (Tropix Biosystems, MA, USA) inkubiert und mit dem Chemolumineszenzsystem von Amersham entwickelt.

### **2.9 Bestrahlung**

Die Zellen wurden mit 6 MV Photonen von einem Linearbeschleuniger (LINAC SL25 Philips) mit einer Dosisrate von 4 Gy / min bei Raumtemperatur bestrahlt. Die Bestrahlung wurde in Zellkulturmedium bei einer Dichte von  $10^6$  Zellen / ml in Zellkulturflaschen durchgeführt

### **2.10. Statistische Auswertung**

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

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. *Regulation des kapazitiven Calciumeinstromes*

##### 3.1.1. Blockade des speichergesteuerten Calciumkanals in Lymphozyten durch Sphingolipide

Nach CD95-Rezeptorstimulation wird das Enzym Saure Sphingomyelinase (ASM) aktiviert (Cifone et al., 1994; Gulbins et al., 1995). Diese Aktivierung führt zu einer Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramid durch die ASM, die in intrazellulären Vesikeln lokalisiert ist und auf die Außenseite der Zellmembran transloziert. Das gebildete Ceramid kann durch Ceramidasen weiter zu Sphingosin degradiert werden (Kolesnick and Kronke, 1998).

In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, daß die Stimulation des CD95-Rezeptors neben dem Auslösen von Apoptose zur Blockade der speichergesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle führt. Die ASM, die unter gewissen Bedingungen für die CD95-induzierte Apoptose nicht essentiell ist (Boesen-de Cock et al., 1999), ist für die CD95-vermittelten Blockade des kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes notwendig.

##### 3.1.1.1. *Ceramid blockiert den kapazitiven Calciumeinstrom*

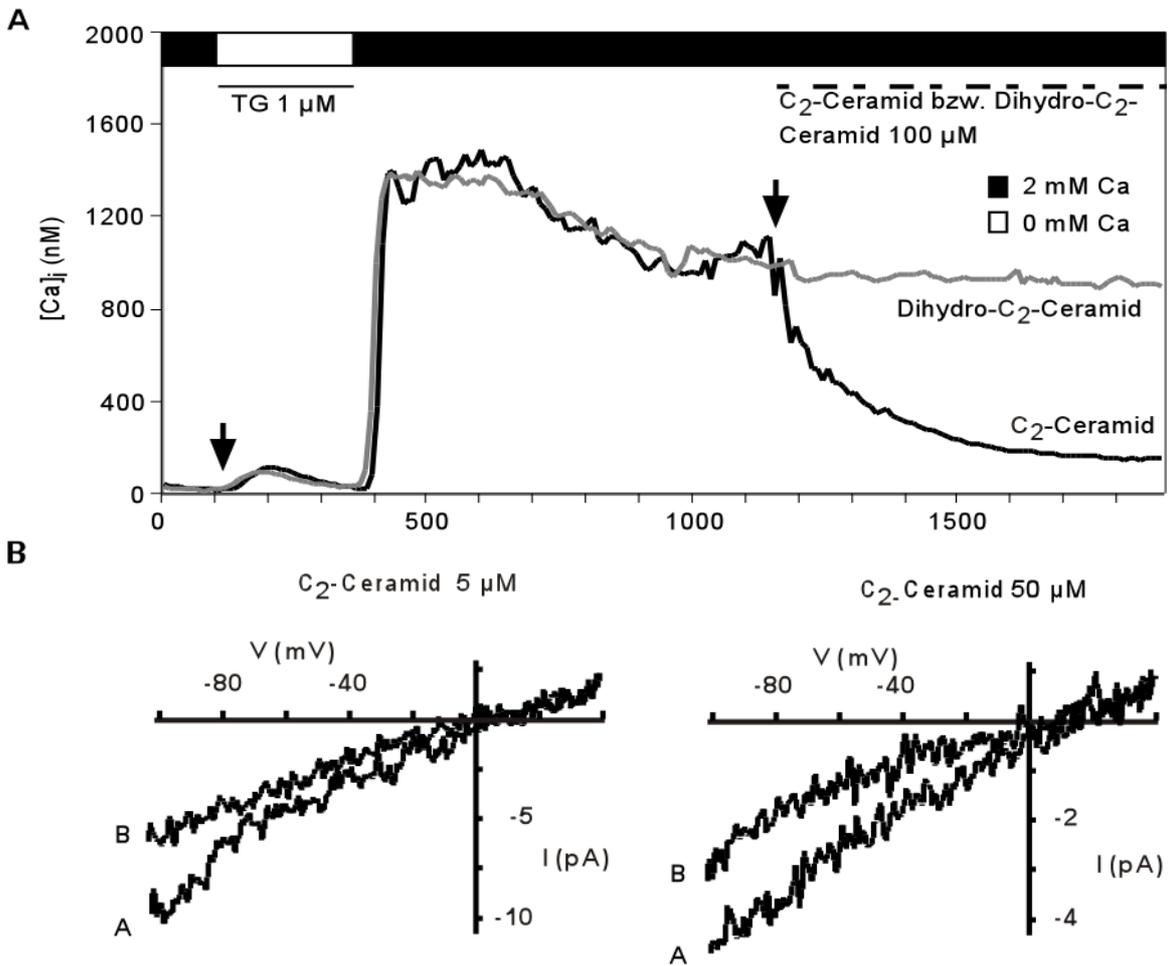
Im nächsten Schritt wurde die Beteiligung des Lipidmessengers Ceramid am CD95-Rezeptor vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Block untersucht. Es wurden Jurkat-T-Lymphozyten verwendet und der Einfluß des  $\text{C}_2$ -Analogons des natürlichen Ceramid und des biologisch inaktiven Dihydro- $\text{C}_2$ -Ceramid auf den speichergesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom mit der Video-Imaging- und der Patch-clamp-Technik untersucht.

Der Thapsigargin(TG)-aktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch CRAC-Kanäle wurde durch die akute Gabe von  $\text{C}_2$ -Ceramid blockiert (Abb. 14A). Die Gabe von inaktivem Dihydro- $\text{C}_2$ -Ceramid hatte keinen Effekt auf das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal (Abb. 14A).

Das gleiche Verhalten konnte in Patch-clamp-Experimenten verifiziert werden. Nach Etablieren der whole-cell Konfiguration wurde ein einwärtsrektifizierender  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom aufgezeichnet, der sich aufgrund des Absinkens der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA in der Pipettenlösung, dem damit verbundenen Leerlaufen der intrazellulären Speicher und dem Öffnen der CRAC-Kanäle entwickelte. Durch die Applikation von  $\text{C}_2$ -Ceramid konnte ebenfalls eine Blockade des kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes ausgelöst

werden (Abb. 14B). Der durch Ceramid verursachte Block war reversibel, dosisabhängig und konnte mehrmals hintereinander hervorgerufen werden.

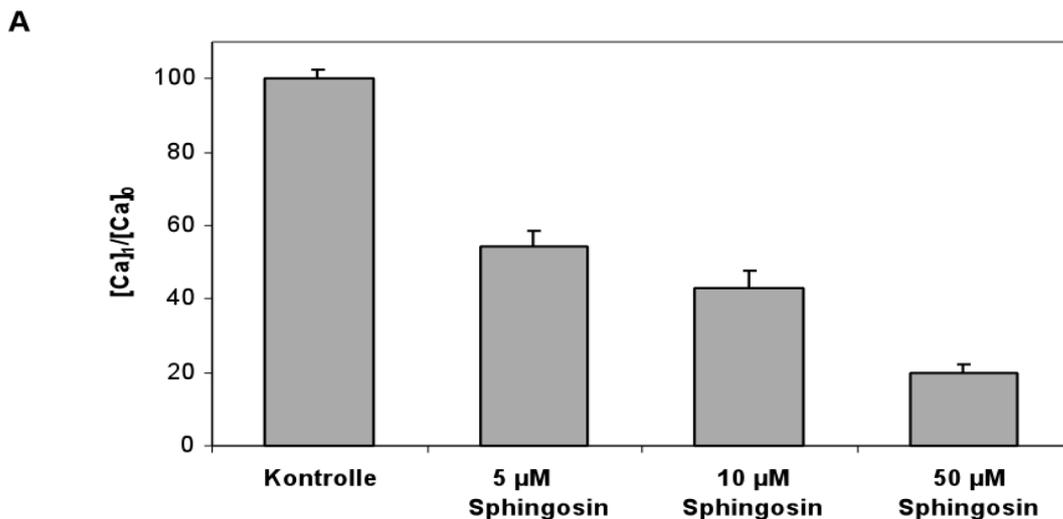
**Abbildung 14:** Ceramid blockiert speichergesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle:



- A. Dargestellt ist der Zeitverlauf der durchschnittlichen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach Aktivierung des CRAC-Kanals in Jurkat-T-Lymphozyten. Durch Zugabe von Thapsigargin ( $1 \mu\text{M}$ ) in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung kommt es zur Entleerung der intrazellulären Speicher (ER) und dadurch zur Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals. Nach Erhöhung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kommt es zu einem Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  auf Werte von  $1 \mu\text{M}$ .  $\text{C}_2$ -Ceramid ( $100 \mu\text{M}$ ), jedoch nicht das inaktive Dihydro- $\text{C}_2$ -Ceramid, zeigt eine deutliche Inhibition des TG-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs mit einem Absinken der Werte auf  $200 \text{ nM}$  ( $n = 3; 68, 74, 70$  Zellen).
- B. Dosisabhängige Inaktivierung eines einwärtsrektifizierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Stromes durch Gabe von Ceramid. Die Strom-Spannungskurven wurden nach Etablieren der whole-cell Konfiguration durch Anlegen von Spannungsrampen von  $200 \text{ ms}$  Dauer aufgezeichnet. Die Stromkurve A zeigt den einwärtsrektifizierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom durch CRAC-Kanäle und Stromkurve B wurde nach Zugabe von  $\text{C}_2$ -Ceramid ( $5$  bzw.  $50 \mu\text{M}$ ) /  $0.1 \%$  BSA aufgezeichnet ( $n = 3$ ). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel. Es wurde keine Korrektur des Leckstromes durchgeführt.

### 3.1.1.2. Sphingosin blockiert den kapazitiven Calciumeinstrom

Um den blockierenden Effekt von Sphingosin auf den kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nachzuweisen, wurde die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Abhängigkeit der Sphingosinapplikation untersucht. Dazu wurden die speichergesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle durch Entleeren der endoplasmatischen Speicher mit Thapsigargin, einem Blocker der endoplasmatischen SERCA-ATPase, maximal aktiviert (Thastrup et al., 1990) und ein Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  gemessen. Die Applikation von Sphingosin nach Erreichen eines Plateaus der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $100\% \pm 2.54$ ;  $n = 53$ ) bewirkte eine dosisabhängige Inhibierung von CRAC;  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurde durch  $5\ \mu\text{M}$  Sphingosin auf  $54.19\% \pm 4.42$  der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  der Kontrollzellen gesenkt, durch  $10\ \mu\text{M}$  Sphingosin auf  $42.96\% \pm 4.90$  und durch  $50\ \mu\text{M}$  auf  $19.83\% \pm 2.48$  reduziert (Abb. 15A). Bestätigt wurden diese fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse durch Patch-clamp-Experimente (Abb. 15B). Die Strom-Spannungskurven lassen erkennen, daß ein durch BAPTA induzierter einwärtsrektifizierender  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom durch den CRAC-Kanal nach der Gabe von Sphingosin reversibel in Abhängigkeit von der applizierten Dosis gehemmt wird.

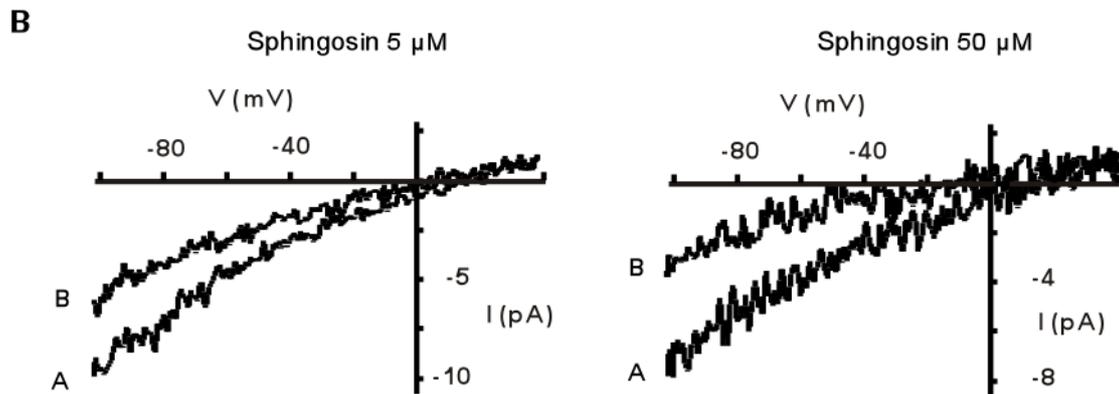


**Abbildung 15:**  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme durch CRAC-Kanäle werden durch Sphingosin blockiert.

A. Das Histogramm zeigt die relative  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Jurkat Zellen nach Aktivierung der CRAC-Kanäle mittels TG ( $1\ \mu\text{M}$ ) in Ringer ( $2\ \text{mM}\ \text{Ca}^{2+}$ ). Applikation von Sphingosin bewirkt dosisabhängig eine Blockade des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes durch die CRAC-Kanäle und einen Abfall der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (Kontrolle  $n = 53$ ; Sphingosin  $5\ \mu\text{M}$   $n = 63$ ;  $10\ \mu\text{M}$   $n = 83$ ,  $50\ \mu\text{M}$   $n = 83$ ).

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ : intrazelluläre Calciumkonzentration nach Sphingosinapplikation in der Plateauphase

$[\text{Ca}^{2+}]_o$ : intrazelluläre Calciumkonzentration der Kontrollzellen nach dem TG-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg.



B. Repräsentative whole-cell Patch-clamp-Aufzeichnungen. Durch die Gabe von Sphingosin (5  $\mu\text{M}$  bzw. 50  $\mu\text{M}$ )/0.1 % BSA ( $n = 6$ ) wurden die CRAC-Kanäle und dadurch der typische einwärtsrektifizierende  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom (A) dosisabhängig und reversibel blockiert (B).

### 3.2. ***CD95-vermittelte Inhibition des CRAC via mitochondriale Depolarisation***

Der in Lymphozyten beschriebene speicheroperierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, der nach Aktivierung die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erhöht und in Folge die T-Zellproliferation einschließlich Transkriptionsfaktoren wie NFAT und die Synthese von IL-2 stimuliert, wird nach CD95-Stimulation blockiert. Weiterhin verursacht CD95 eine Blockade der Transkription von IL-2, indem die Bindung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Transkriptionsfaktoren, der NFAT-Proteine, an den IL-2 Promoter inhibiert wird.

Der CD95-Rezeptor fungiert außerdem als Apoptose-Stimulus. Im Rahmen der CD95-vermittelten Apoptose kommt es unter anderem zu einer Änderung des mitochondrialen Membranpotentials. Außerdem ist bekannt, daß Mitochondrien zusätzlich zu ihrer fundamentalen Rolle als Energielieferanten der Zelle als potente  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer agieren, die getrieben durch das negative Membranpotential  $\text{Ca}^{2+}$  aufnehmen und verteilen (Gunter et al., 1994). Es stellte sich die Frage inwieweit Mitochondrien und ihr Energiezustand am CD95-induzierten Block des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes durch CRAC beteiligt sind.

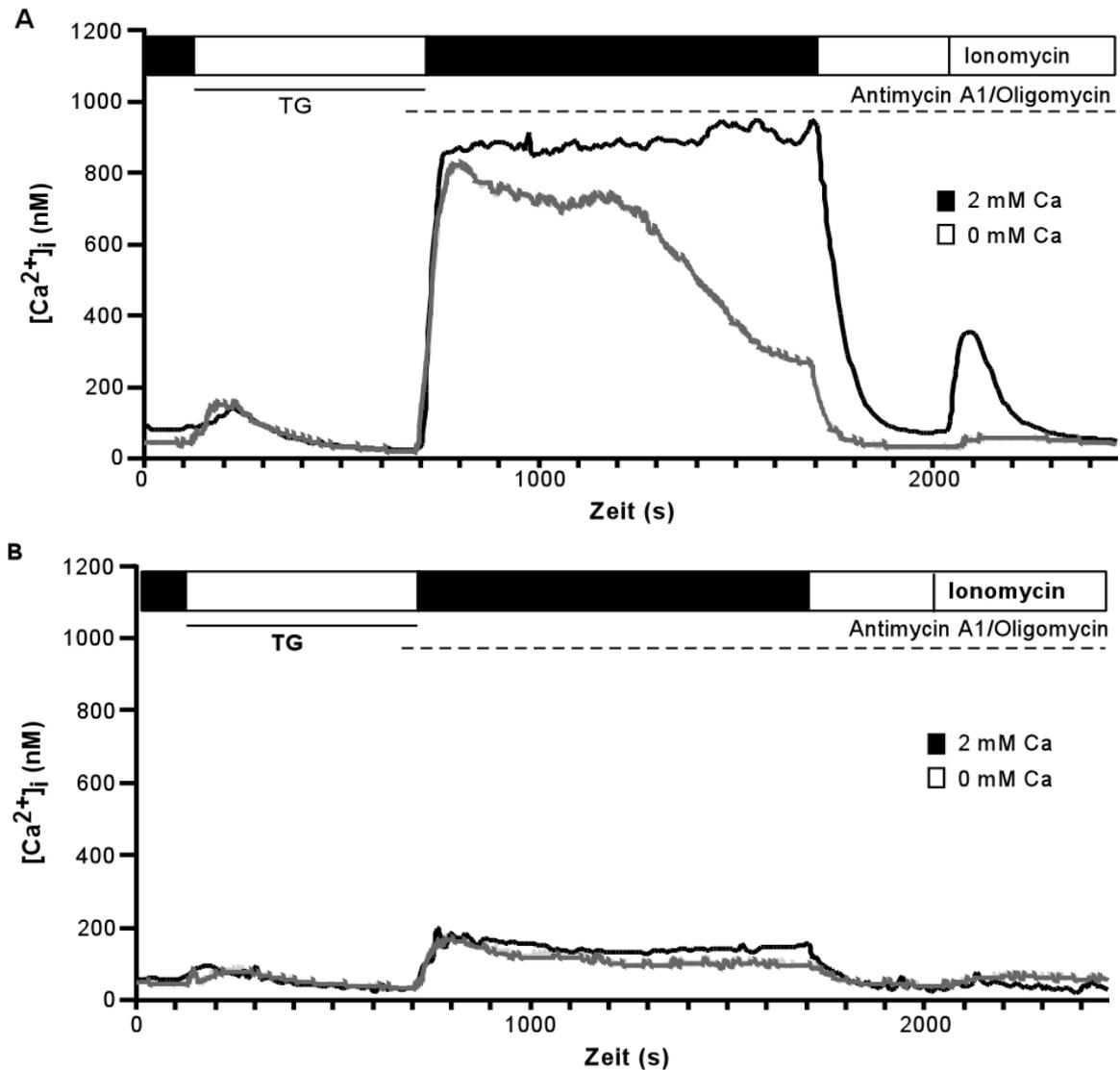
### 3.2.1. Mitochondriale Hemmstoffe blockieren den kapazitiven Calciumeinstrom

Zur Klärung der Frage, welche Rolle Mitochondrien beim CD95-vermittelten Block des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes durch CRAC einnehmen, wurden mitochondriale Entkoppler zur Depolarisation der mitochondrialen Membran eingesetzt und die Effekte auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  untersucht.

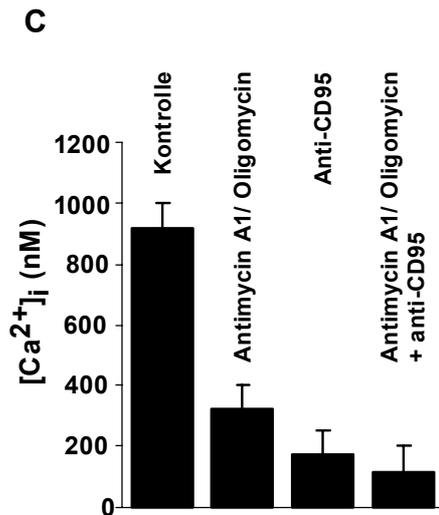
Antimycin A1 hemmt Komplex III des Elektronentransports, die Ubihydrochinon-Cytochrom-c-Reduktase, in der Atmungskette. Die Applikation des mitochondrialen Inhibitors resultiert in einer moderaten Erniedrigung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Hoth et al., 1997). Die Inhibition des Elektronentransports ist nicht ausreichend, um Mitochondrien vollständig zu depolarisieren. Solange durch Glykolyse die ATP-Versorgung gewährleistet ist, können Mitochondrien ihr Membranpotential aufrechterhalten, indem sie die ATP-Synthetase rückwärts betreiben, d. h. durch Hydrolyse von ATP Protonen aus der Mitochondrienmatrix pumpen (Budd and Nicholls, 1996). Oligomycin, ein Inhibitor der mitochondrialen ATP-Synthetase, verhindert dies und ermöglicht so eine vollständige Depolarisation. Die simultane Gabe von Antimycin A1 und Oligomycin führt zeitlich verzögert (etwa 2 min) zur Applikation zu einer signifikanten Erniedrigung des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in der Plateauphase und verhindert die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme (Abb. 16A). Der verzögerte Wirkeintritt lässt sich dadurch erklären, daß die Hemmstoffe zuerst die Zell- und Mitochondrienmembranen durchdringen müssen, um an ihren Wirkort zu gelangen und dort ihre inhibitorische Wirkung entfalten können. 2 h nach CD95-Stimulation erfolgte die Zugabe der mitochondrialen Hemmstoffe zu einem Zeitpunkt, an dem der TG-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch CRAC bereits geblockt war, ohne einen additiven Effekt auf den Abfall des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu bewirken (Abb. 16B). Die durch Ionomycin verursachte  $\text{Ca}^{2+}$ -Entleerung stand im Einklang mit den erhaltenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Werten. CD95-behandelte Zellen und Zellen, die mit der Kombination CD95 / Antimycin A1 / Oligomycin inkubiert wurden, zeigten eine geringe mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (Abb. 16B).

**Abbildung 16:** Mitochondriale Hemmstoffe, Antimycin A1 und Oligomycin, blockieren den kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und besitzen keinen additiven Effekt auf den CD95-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Block.

In Fura-2-AM beladenen Zellen wurde in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung mittels TG (1  $\mu\text{M}$ ) die Entleerung der intrazellulären Speicher und somit die Aktivierung des CRAC-Kanals ausgelöst. Nach Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  (Ringer) kommt es zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. An den indizierten Punkten wurde durch die Applikation von Ionomycin (10  $\mu\text{M}$ ) in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung das mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$  freigesetzt. Die abgebildeten Kurven zeigen mittlere  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .



- A. Nach Zugabe von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  steigt die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in unbehandelten Zellen auf Werte über 600 nM (schwarze Linie;  $n = 73$ ). In Zellen, die mit den mitochondrialen Entkopplern Antimycin A1 (2  $\mu\text{M}$ ) und Oligomycin (5  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert wurden, kommt es zu einer signifikanten Reduktion des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (graue Linie;  $n = 84$ ). In Korrelation mit der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , die vor dem Lösungswechsel auf  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Ringer vorherrschte, setzte Ionomycin in Gegenwart von Antimycin A1 und Oligomycin eine geringe Menge an mitochondrialem  $\text{Ca}^{2+}$  frei (graue Linie).
- B. Nach CD95-Stimulation für 2 h mit 100 ng/ml CH11 Antikörper ist der TG-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom blockiert (schwarze Linie;  $n = 84$ ). Die Addition von Antimycin A1 und Oligomycin am indizierten Punkt hatte keinen additiven hemmenden Effekt auf die Werte des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (graue Linie;  $n = 79$ ). Durch Ionomycin konnte unter beiden Bedingungen (mit und ohne Antimycin A1 / Oligomycin) keine weitere Entleerung des mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichers induziert werden.

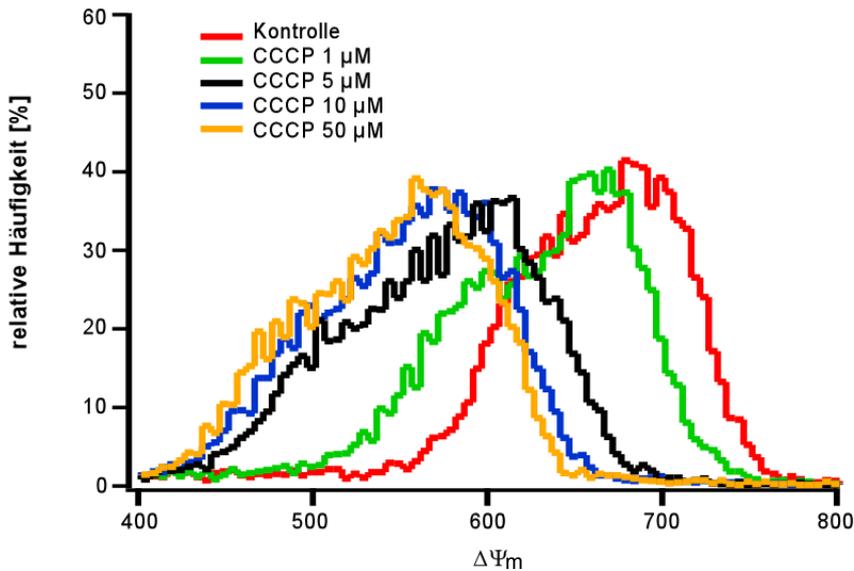


C. Das Balkendiagramm zeigt einen Vergleich der mittleren  $[Ca^{2+}]_i$  nach Gabe von Antimycin A1 und Oligomycin, 2h nach CD95-Stimulation, nach Gabe der mitochondrialen Hemmstoffe und 2h anti-CD95-AK und Kontrolle ( $n = 84; 84; 79$  und  $73$ ), gemessen in T-Lymphozyten. Zur Bestimmung des  $Ca^{2+}$ -Einstromes wurde der Datenpunkt 1690s nach TG-Gabe herangezogen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 3.2.2. CCCP blockiert den kapazitiven Calciumeinstrom via mitochondriale Depolarisation

Um das funktionelle Zusammenspiel zwischen Mitochondrien und der  $[Ca^{2+}]_i$  weiter zu charakterisieren, wurde CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon), ein membrangängiges Protonophor, welches die oxidative Phosphorylierung entkoppelt, verwendet. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen CCCP-Konzentrationen inkubiert und das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) und die  $[Ca^{2+}]_i$  durchflußzytometrisch bestimmt. Um den Zusammenbruch des  $\Delta\Psi_m$  darzustellen wurde der kationische Fluoreszenzfarbstoff DiOC<sub>6</sub>(3) verwendet. Der lipophile Carbocyanid-Farbstoff färbt in niedrigen Konzentrationen, in denen sein toxisches Potential minimiert ist, selektiv die Mitochondrien. Die Akkumulation von DiOC<sub>6</sub>(3) in Mitochondrien ist durch das negative  $\Delta\Psi_m$  getrieben. Die Verteilung des Farbstoffes zwischen dem Zytosol und der Mitochondrienmatrix bzw. dem Zytosol und dem Medium, das die Zellen umgibt, wird durch das Mitochondrien- und das Plasmamembranpotential bestimmt. Um die Sensitivität unserer Methode zu überprüfen, wurden die Potentialänderungen der inneren Mitochondrienmembran gemessen, indem die Zellen mit variierenden Konzentrationen des Protonophors CCCP, das einen Zusammenbruch des Protonen-Gradienten verursacht, inkubiert. Bei niedrigen CCCP-Konzentrationen kollabiert nur das  $\Delta\Psi_m$ . Als Negativkontrolle wurden die Zellen in hoch  $K^+$ -Ringer inkubiert, was zur Depolarisation des Plasmamembranpotentials führt. Der Farbstoff ermöglicht mit Hilfe der Nernst'schen Gleichung eine quantitative Membranpotentialmessung. Dies erfordert eine transmembranäre Verteilung des Farbstoffes, die nur vom Membranpotential abhängt,

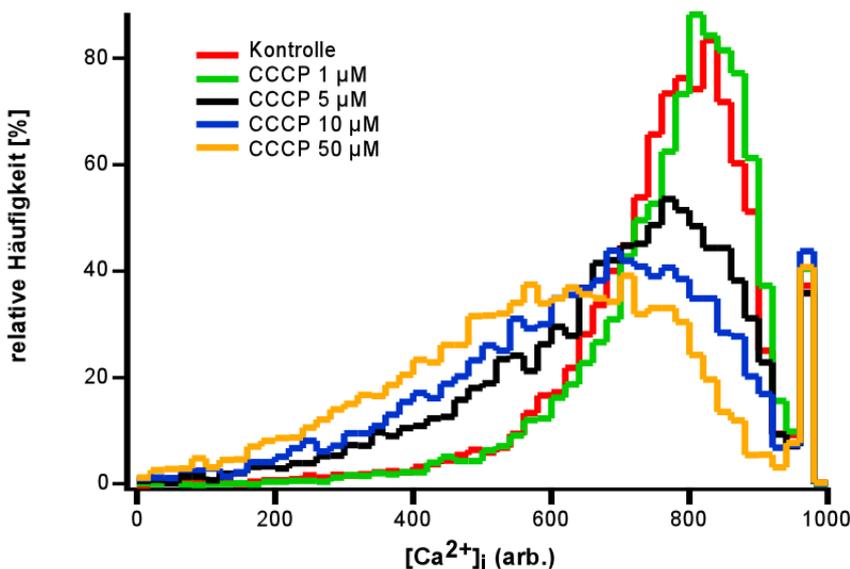
wobei andere Prozesse wie Farbstoffaggregation und vom Potential unabhängige Wechselwirkungen mit intrazellulären Komponenten vernachlässigbar gering sind. Im vorliegenden Experiment wurde DiOC<sub>6</sub>(3) nur für den qualitativen Nachweis verwendet. Nach der Depolarisation der Mitochondrienmembran akkumuliert der Farbstoff nicht mehr im Mitochondrium und diffundiert rasch aus der Zelle, wodurch die Intensität der Fluoreszenz in der Zelle abnimmt. Die dosisabhängige Depolarisation des  $\Delta\Psi_m$  korrelierte mit den gemessenen  $[Ca^{2+}]_i$ -Werten bzw. dem Block des  $Ca^{2+}$ -Einstromes.



**Abbildung 17:** CCCP depolarisiert das  $\Delta\Psi_m$  und blockiert den kapazitiven  $Ca^{2+}$ -Einstrom.

A. Die Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen CCCP-Konzentrationen (1, 5, 10 und 50  $\mu M$ ) führt zu Veränderungen des  $\Delta\Psi_m$ . 20 min nach Stimulation mit CCCP wurde das  $\Delta\Psi_m$  durch Färbung mit

200 pM DiOC<sub>6</sub>(3) und FACS-Analyse gemessen. Es zeigte sich eine dosisabhängige Depolarisation (Abnahme der Fluoreszenzintensitäten). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Versuchen mit je 10.000 Zellen.



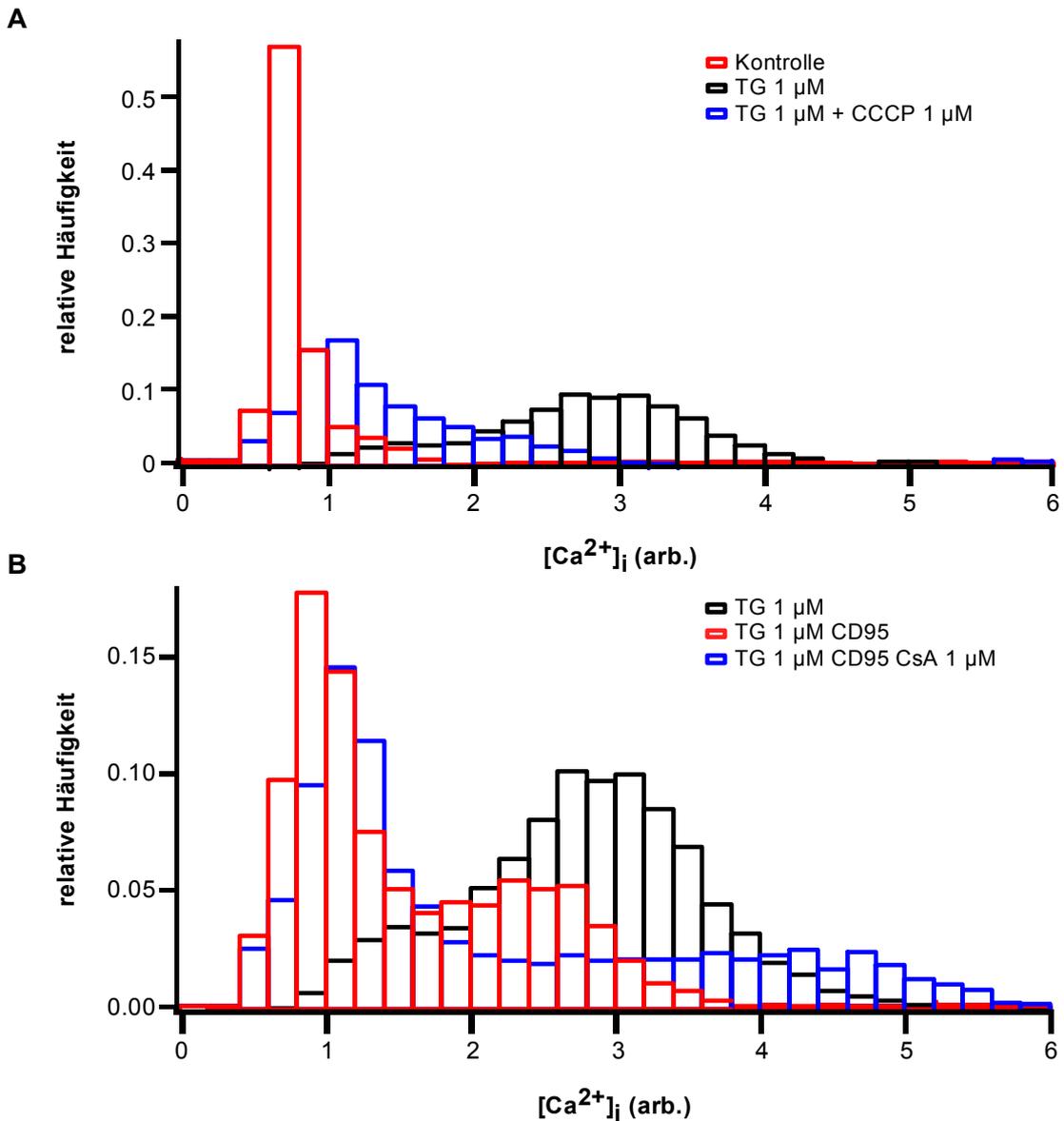
B. Jurkat Zellen wurde mit dem  $Ca^{2+}$ -Farbstoff Fura-Red gefärbt und anschließend mit 1, 5, 10 bzw. 50  $\mu M$  CCCP inkubiert. Die  $[Ca^{2+}]_i$  wurde durch FACS-Analyse bestimmt. Mit zunehmender CCCP-Konzentration wurde eine Absinken der  $[Ca^{2+}]_i$  verzeichnet. Diese Abbildung ist repräsentativ

für drei unabhängige Experimente mit je 10.000 Zellen.

### 3.2.3. Cyclosporin A schützt vor CD95-induziertem CRAC-Block

Im nächsten Schritt wurde ausgehend von den mit CCCP gewonnenen Daten die  $[Ca^{2+}]_i$  in Jurkat Zellen nach CD95-Rezeptor-Stimulation mit und ohne CsA-Vorbehandlung verglichen.

CsA, ein hydrophobes zyklisches Polypeptid, ist ein Immunsuppressivum, das von dem Pilz *Tolypocladium inflatum* gebildet wird. Nachdem CsA in die T-Zelle gelangt ist, bindet es mit hoher Affinität an Cyclophilin. Durch diesen Komplex wird die  $Ca^{2+}$ -abhängige Phosphatase-Aktivität des Calcineurin/Calmodulin-Komplexes gehemmt, der durch die Abspaltung von Phosphatgruppen die Translokation von NFAT in den Zellkern und somit die IL-2-Synthese bewirkt. Neben der immunsuppressiven Wirkung durch Hemmung der IL-2-Synthese stabilisiert CsA durch Interferieren mit der PTP das Mitochondrienmembranpotential. CsA bindet an Cyclophilin D, das mit der mitochondrialen Pore assoziiert ist, und inhibiert dadurch die Aktivität der in der Matrix lokalisierten Peptidyl-prolyl-cis,trans-isomerase (Bernardi, 1999). Um den Effekt von CsA auf die PTP und in Folge auf das  $Ca^{2+}$ -Signal zu untersuchen, wurde die  $[Ca^{2+}]_i$  bestimmt. Die Zellen wurden für 15 min mit CsA vorinkubiert und anschließend 2 h mit 100 ng/ml stimulierendem CD95-Antikörper CH11 inkubiert. Nachfolgend wurde der speichergesteuerte  $Ca^{2+}$ -Kanal mit TG aktiviert und der intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Gehalt durchflußzytometrisch bestimmt. In Kontrollzellen nahm die  $[Ca^{2+}]_i$  nach TG-Stimulation zu, was durch die Inkubation mit CCCP verhindert wurde (Abb. 18A). Durch Vorbehandlung mit CsA konnte der durch CD95-induzierte  $Ca^{2+}$ -Block zum Teil überwunden werden (Abb. 18B). Das TG-vermittelte  $Ca^{2+}$ -Signal war im Vergleich zu den Kontrollzellen leicht erhöht (Abb. 18B). Die teilweise Wiederherstellung des  $Ca^{2+}$ -Einstromes nach CD95-Stimulation durch CsA weist auf die Beteiligung der Mitochondrien hin.



**Abbildung 18:** CD95-induzierter CRAC-Block wird teilweise durch CsA geschützt.

Jurkat Zellen wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fura-Red und Fluo-3 beladen und die  $[Ca^{2+}]_i$  am FACS ratiometrisch gemessen. In dem repräsentativ gezeigten Experiment ( $n = 3$ ) wurden 10.000 Zellen untersucht.

- A. Diese Grafik zeigt die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Intensitäten (Ratio), die direkt proportional mit den  $[Ca^{2+}]_i$  sind. In den Kontrollzellen ist eine deutliche Zunahme der  $[Ca^{2+}]_i$  durch TG-Applikation zu verzeichnen, die durch CCCP-Inkubation inhibiert wird.
- B. Dargestellt ist hier die Häufigkeitsverteilung des durch TG-induzierten  $Ca^{2+}$ -Einstromes. Die mit CsA vorinkubierten Zellen weisen einen schützenden Effekt hinsichtlich des CD95-vermittelten CRAC-Blocks auf. Der  $Ca^{2+}$ -Influx ist teilweise wiederhergestellt. Zusätzlich zeigen die CsA behandelten Zellen ein erhöhtes  $Ca^{2+}$ -Signal verglichen mit den Kontrollzellen.

### 3.2.4. Das Onkoprotein Bcl-2 interferiert mit dem CD95-induzierten CRAC-Block in Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation

Um die molekularen Mechanismen der CD95-induzierten Blockade speicheroperierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle näher zu charakterisieren, wurde das antiapoptotische Onkoprotein Bcl-2 verwendet. Wenn die Hypothese zutreffen würde, daß der nach CD95-Stimulation erhaltene  $\text{Ca}^{2+}$ -Block in Folge der mitochondrialen Depolarisation und der sich daraus ergebenden gestörten Funktion der Mitochondrien, als  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer zu agieren und die lokale Konzentration zu senken, resultiert, könnte durch eine gezielte Überexpression des Bcl-2-Proteins sowohl der CD95-induzierte Zusammenbruch des  $\Delta\Psi_m$  als auch der Block des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes verhindert werden. Bcl-2 gehört zu einer Familie von pro- und antiapoptotisch wirkenden Proteinen. Es verhindert die Öffnung der mitochondrialen Pore, dem sogenannten „Megachannel“ oder „permeability transient pore“, und dadurch die Depolarisation des Membranpotentials der inneren Mitochondrienmembran (Zamzami et al., 1996).

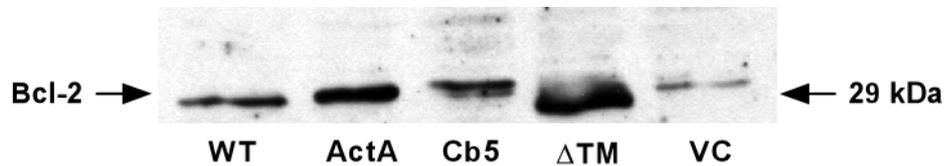
#### 3.2.4.1. Überexpression des Onkoproteins Bcl-2

Zur Beantwortung dieser Frage wurden in Jurkat Zellen Bcl-2-Mutanten mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation des Proteins transfiziert. Die Expressionsvektoren, die freundlicherweise von Brian Leber, Canada, zur Verfügung gestellt wurden, kodieren für Bcl-2-Proteine, die am C-terminalen Ende unterschiedliche transmembranäre Anker besitzen.

Bei den Bcl-2 ActA Zellen wurde durch Ersetzen des carboxyl-terminalen, hydrophoben Endstückes durch eine für ActA kodierende Sequenz eine mitochondriale Lokalisation erreicht; ursprünglich ist ActA ein an der Listeriose beteiligtes Protein, welches an der Nukleation des Aktinzytoskeletts bei Parasiten involviert ist; durch den Austausch der Insertionsdomäne durch eine Sequenz, die für die ER-spezifische Isoform des Cytochrom b5 codiert, wurde das Protein Bcl-2 in der endoplasmatischen Membran zum Zytosol gerichtet verankert (Bcl-2 Cb5); die Transmembrandomäne war bei den Bcl-2 Wildtyp Zellen (WT) gegen die endoplasmatische und mitochondriale Membran gerichtet; in den Bcl-2  $\Delta\text{TM}$  Jurkat Zellen wurde ein Protein ohne Membrantarget transkribiert, welches im Zytosol lokalisiert war.

Zum Nachweis der Transfektion der Bcl-2-Mutanten wurden Immunoblot-Analysen (Western-Blot) mit einem gegen das Bcl-2-Protein gerichteten Antikörper durchgeführt.

Die Zellen ergaben ein Signal, das mit etwa 29 kDa der Größe des Bcl-2-Proteins entspricht (Abb. 19). Das Protein zeigt in den Mutanten einen erhöhten zellulären Gehalt im Vergleich zu den Vektorkontrollzellen (VC) auf (Abb.19). Es kann also von einer Überexpression dieses Proteins ausgegangen werden.



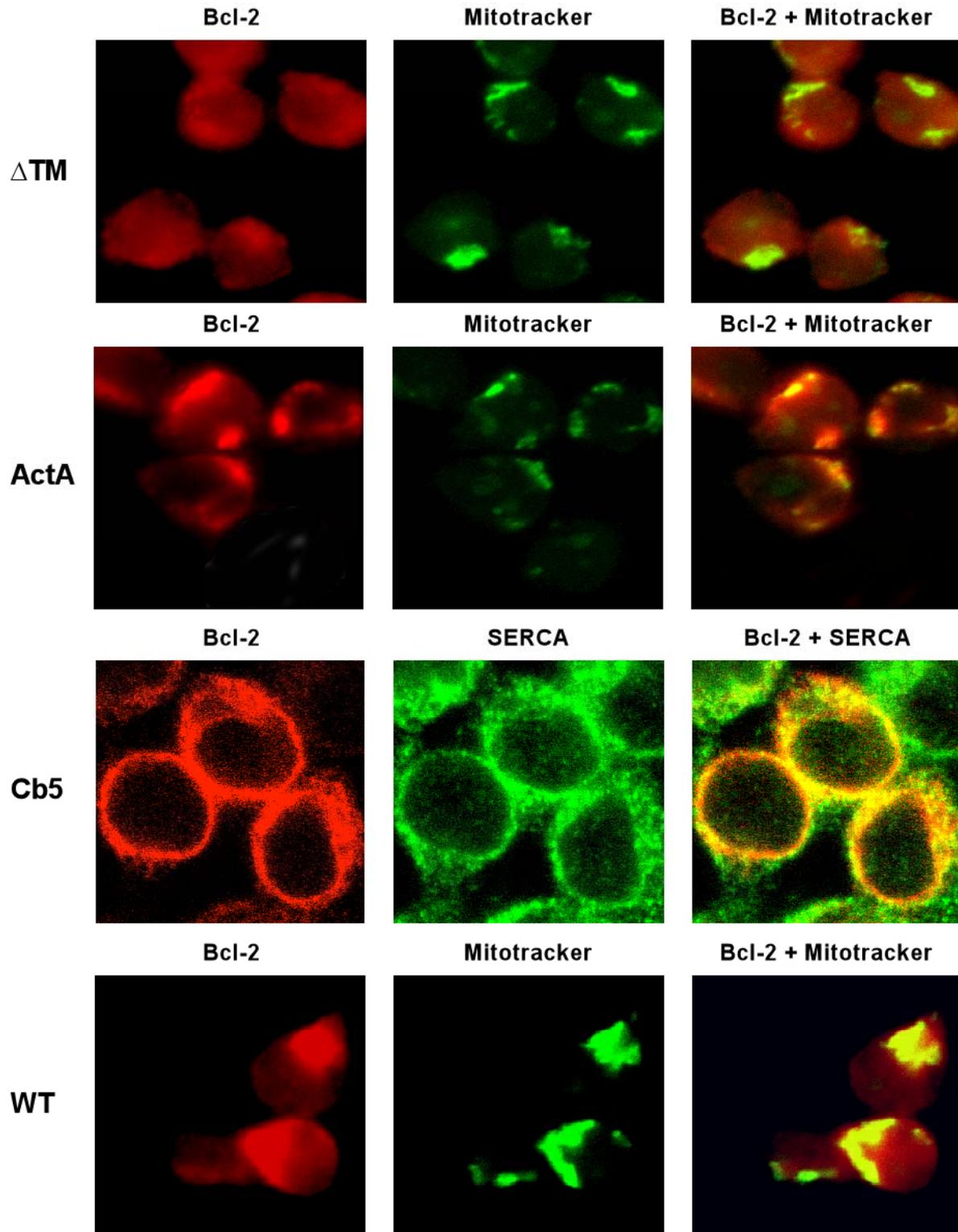
**Abbildung 19:**

Western-Blot Analysen zeigen, daß in Bcl-2 WT, Bcl-2 ActA, Bcl-2 Cb5, Bcl-2  $\Delta$ TM und Bcl-2 VC Zellen das Bcl-2 Protein mit einer Größe von etwa 29 kDa exprimiert wird. Im Vergleich zu den VC-Jurkat Zellen ist die Expression in den Klonen WT, ActA, Cb5 und  $\Delta$ TM erhöht. Pro Probe wurden etwa 500000 Zellen lysiert, der Proteingehalt bestimmt, gleiche Proteinmengen im SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit dem anti-Bcl-2 Antikörper detektiert (n = 2).

#### 3.2.4.2. Subzelluläre Lokalisation des Bcl-2 Proteins

Zur Verifizierung der subzellulären Lokalisation des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins wurden Zellen immobilisiert und nach dem Permeabilisieren eine Immunanfärbung durchgeführt. Die Lokalisation des Bcl-2 Proteins wurde durch Inkubation mit einem Ziege-anti-Bcl-2 Antikörper und anschließender Färbung mit einem Cy<sup>TM</sup> 5-konjugierten Kaninchen-anti-Ziege Antikörper durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen (Abb. 20). Für Bcl-2 WT, Bcl-2 ActA und Bcl-2 Cb5 konnte eine Expression von Bcl-2 in den Membrankompartimenten ER und / oder Mitochondrien gezeigt werden. In den  $\Delta$ TM Bcl-2 Zellen war eine diffuse Fluoreszenz sichtbar, was eine zytosolische Lokalisation bestätigt. Weiterhin konnte durch Costaining der Mitochondrien mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker<sup>TM</sup> Orange eine Kolo­kalisation des Bcl-2 Proteins mit den Mitochondrien in Bcl-2 WT und Bcl-2 ActA gezeigt werden. Außerdem wurde die Kolo­kalisation der endoplasmatischen SERCA-ATPase und Bcl-2 Cb5 überprüft. Die fluoreszenzoptischen Messungen zur Überprüfung dieser Kolo­kalisation, SERCA ATPase und Bcl-2 Cb5, wurden von Justine Rudner im Labor von Dr. Claus Belka durchgeführt. In diesem Fall wurde die zu erwartende Kolo­kalisation detektiert.

Nach Bestätigung der verschiedenen subzellulären Lokalisation des Bcl-2 Proteins wurden die Zellen für weitere Untersuchungen verwendet.



**Abbildung 20:**

Immunofärbung und konfokale Fluoreszenzmikroskopie determinieren die subzelluläre Lokalisation des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins. Die Bcl-2 Mutanten wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern immobilisiert, mit 1% PFA/PBS fixiert und mit Triton X-100/PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Primärantikörper, Ziege-anti-Bcl-2-Antikörper, inkubiert

und mit einem Cy5-konjugierten Sekundärantikörper (anti-Ziege-IgG) gefärbt (rot dargestellt, links). Die Organellen wurden entweder mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker™ Orange, der die Mitochondrien anfärbt, oder dem murinen Antikörper gegen die SERCA-ATPase zur Kennzeichnung des ER in Kombination mit einem Alexa-gekoppelten anti-Maus-Antikörper markiert (grün dargestellt, Mitte). Durch Überlagern der verschiedenen Bilder wird die spezifische Kolo-kalisation sichtbar (gelb, rechts); in Bcl-2 ActA Zellen kolo-kalisiert Bcl-2 mit dem Farbstoff MitoTracker™ Orange, in Bcl-2 Cb5 Zellen mit der SERCA-ATPase und in WT Zellen mit beiden Markern.

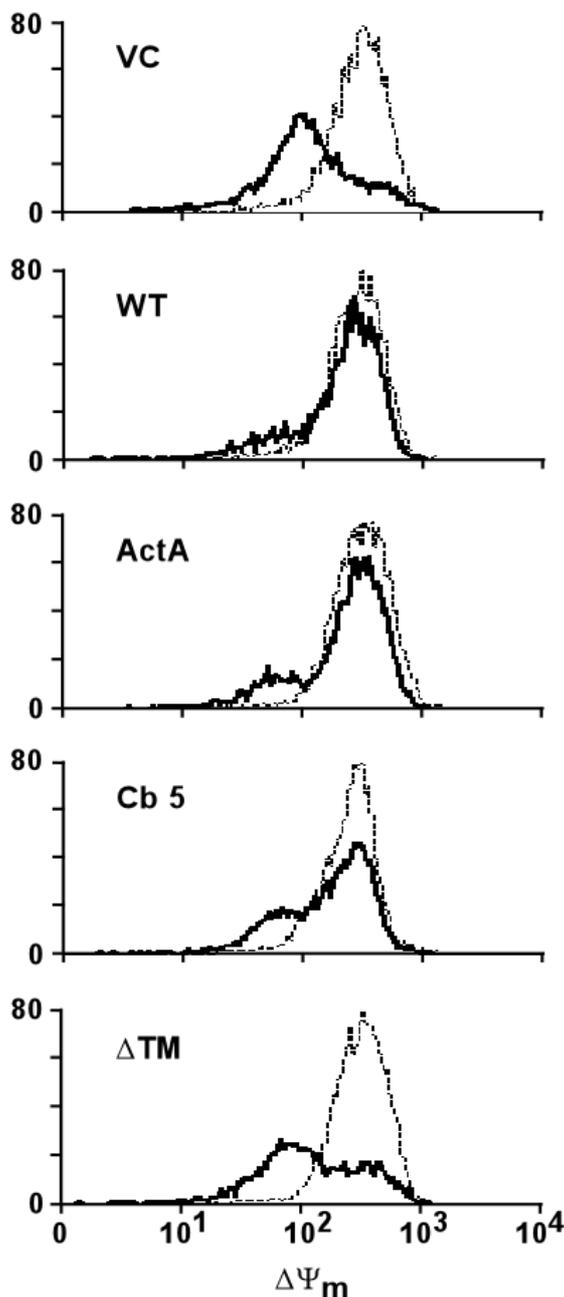
#### *3.2.4.3. Auswirkung der Bcl-2 Überexpression auf die CD95-vermittelte mitochondriale Depolarisation*

Stimulation des CD95-Rezeptors führt zur Depolarisation des  $\Delta\Psi_m$ . Es liegt nahe, daß dies durch Überexpression des mitochondrialen Bcl-2-Onkoproteins verhindert oder zumindest minimiert werden kann. Um dies zu beweisen, wurden Bcl-2 Mutanten mit CH11-Antikörper inkubiert und die Veränderung des  $\Delta\Psi_m$  durch Färbung mit dem Farbstoff DiOC<sub>6</sub>(3) und anschließender FACS-Analyse verfolgt (Abb. 21). Unbehandelte Zellen zeigten ein intaktes  $\Delta\Psi_m$ . Nach 2 h CD95-Stimulation ergab sich eine zweigipflige Verteilung des gemessenen  $\Delta\Psi_m$ ; bei einem Teil der lebenden Population waren die Mitochondrien depolarisiert. Eine Überexpression des mitochondrialen Bcl-2 reduzierte massiv die CD95-induzierte Depolarisation (Bcl-2 ActA und Bcl-2 WT Zellen). Während endoplasmatisches Bcl-2 die Depolarisation in geringem Maße verhinderte, konnte im Zytosol lokalisiertes Bcl-2 den Zusammenbruch des  $\Delta\Psi_m$  nicht beeinflussen.

#### *3.2.4.4. Einfluß des Onkoproteins Bcl-2 auf den CD95-induzierten Block des speichergesteuerten Calciumkanals*

Eine Stimulierung von Lymphozyten über den CD95-Rezeptor führt zur Blockade des speicheroperierten Ca<sup>2+</sup>-Einstromes durch CRAC-Kanäle. Die Messung des kapazitiven Ca<sup>2+</sup>-Einstromes nach CD95-Stimulation in den Bcl-2-Mutanten sollte zeigen, ob durch Überexpression von Bcl-2 diese Inhibition verhindert werden kann. Zu diesem Zweck wurden die Bcl-2 Mutanten mit 100 ng/ml anti-CD95-AK CH11 stimuliert und die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> nach Aktivierung des CRAC-Kanals mit TG durchflußzytometrisch bestimmt. Die basale [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> der Zellen wurde durch die Transfektion/Überexpression nicht verändert. 2 h nach

CD95-Stimulation konnte in 70 % der VC Zellen ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Block beobachtet werden. Im Gegensatz dazu inhibierte die CD95-Stimulation den TG-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Bcl-2 WT und ActA Zellen nicht, dieser war wiederhergestellt (Abb. 22). Die Umkehrung des CD95-Effekts weist darauf hin, daß mitochondriales Bcl-2 die Hemmung der CRAC-Kanäle maskiert. Bcl-2 Cb5 Zellen zeigten einen deutlich geringeren Effekt, 50 % der Zellen wurden geblockt. Die Inhibition des TG-aktivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes in  $\Delta\text{TM}$  Zellen war vergleichbar mit der Vektorkontrolle. Ähnliche Ergebnisse wurden beim Messen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mittels Video-Imaging-Technik erhalten. Die erhaltenen Daten korrelieren mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.2.4.3. und untermauern die Schlüsselrolle der Mitochondrien bzw. des  $\Delta\Psi_m$  beim CD95-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom.



**Abbildung 21:**

Stimulation des CD95-Rezeptors führt zu Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials in Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation von Bcl-2. 2 h nach der Stimulation mit 100 ng/ml CH11 wurde das  $\Delta\Psi_m$  durch Färbung mit 200 pM DiOC<sub>6</sub>(3) am FACS gemessen. Kontrollzellen zeigten ein intaktes  $\Delta\Psi_m$  (gestrichelte Linie). Die CD95-induzierte Depolarisation läßt sich durch Überexpression des mitochondrialen Bcl-2 unterdrücken (WT und ActA). Endoplasmatisches Bcl-2 exhibiert einen moderaten Einfluß auf den Zusammenbruch des  $\Delta\Psi_m$ , während Bcl-2  $\Delta\text{TM}$  keinen Effekt aufweist. Das Ergebnis ist repräsentativ für fünf verschiedene Experimente mit je 10.000 Zellen.

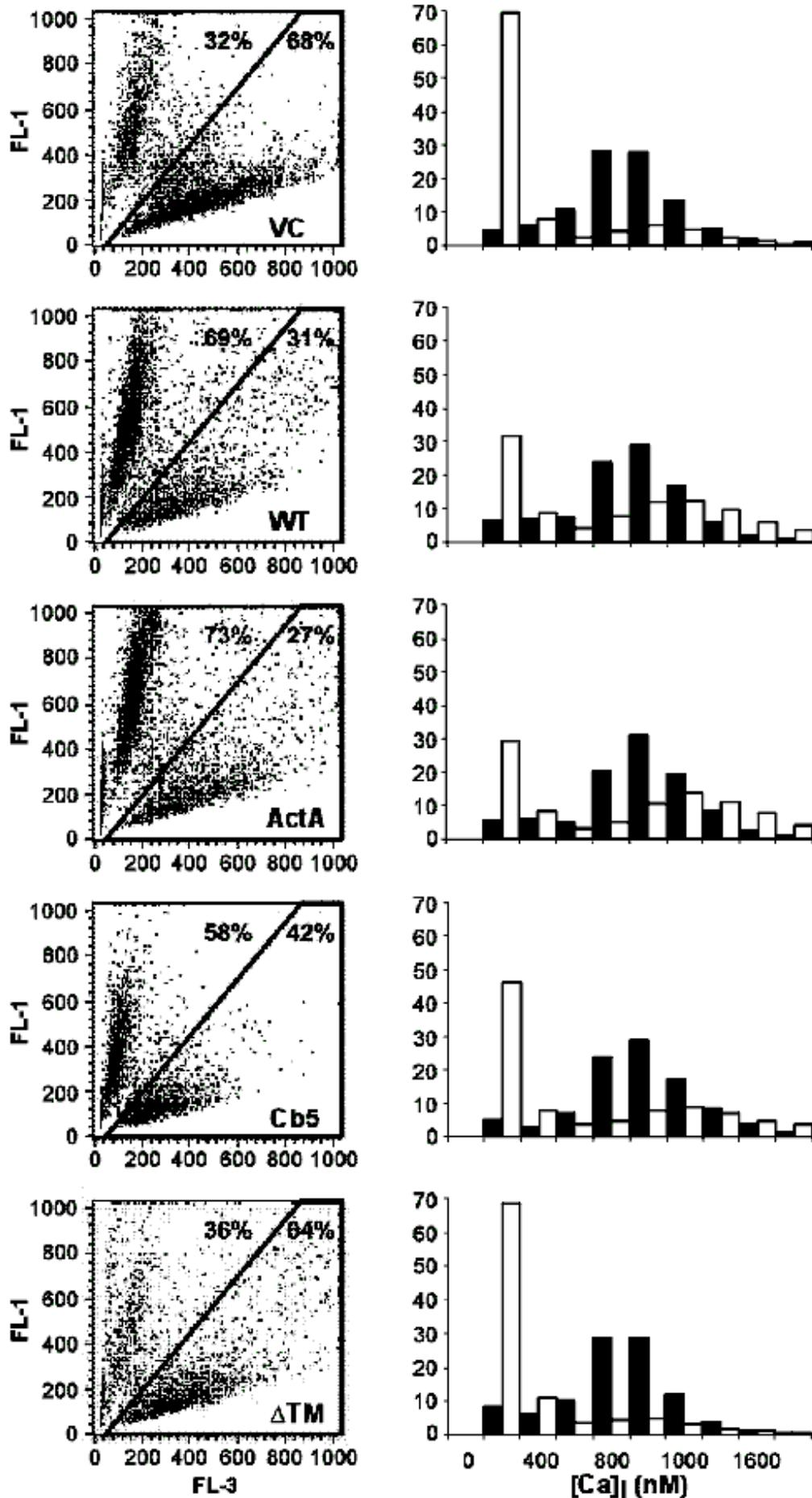


Abbildung 22:

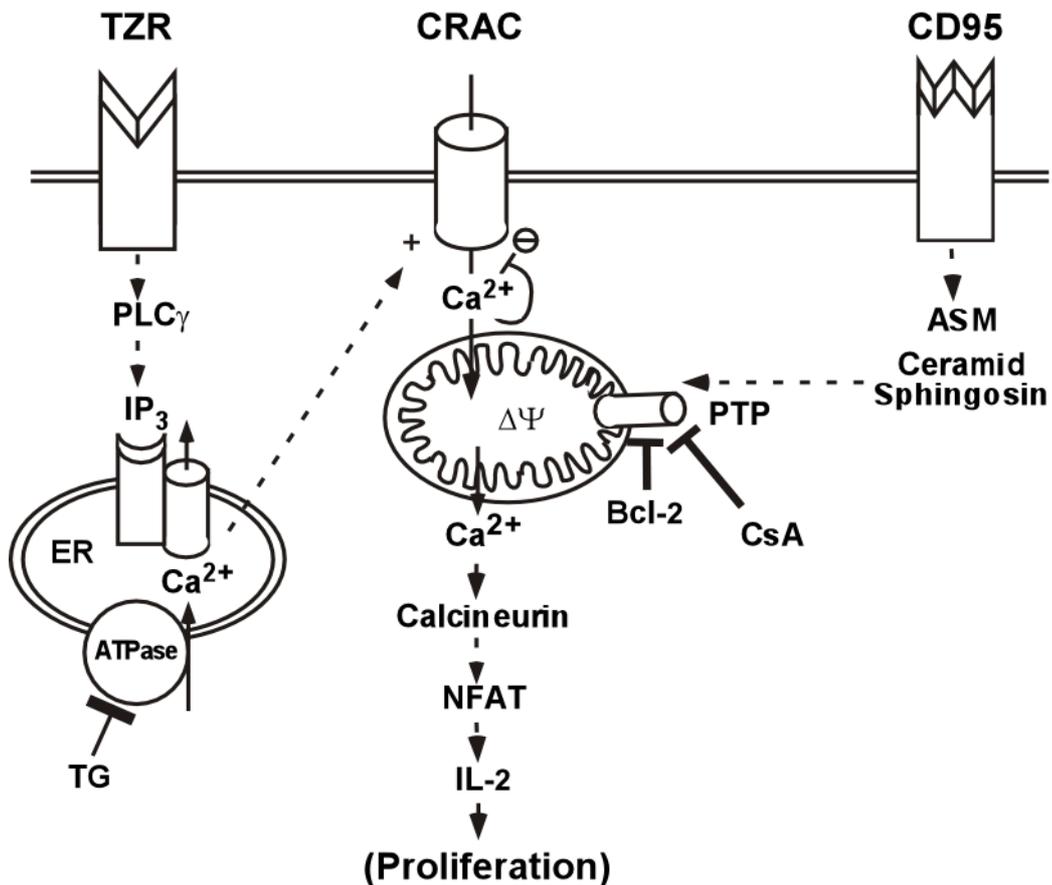
**Abbildung 22:** Einfluß des Onkoproteins Bcl-2 auf den CD95-induzierten Block des kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom.

Lebende Zellen wurden anhand der FSC / SSC-Charakteristik gegatet und für die FACS-Analyse verwendet. Die Mutanten wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fura-Red und Fluo-3 inkubiert und der mittels TG aktivierte speichergesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom anhand der Veränderungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durchflußzytometrisch bestimmt, hier dargestellt als Quotient der FL-1/FL-3-Intensitäten (linke Spalte). Die Diagramme zeigen die FL-1/FL-3-Fluoreszenzratio als Maß der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Eine Fluoreszenzabnahme in FL-3 bzw. eine –zunahme in FL-1 zeigen einen Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Die in die Abbildung eingezeichnete Linie zeigt näherungsweise eine  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von 200 nM an. Die Ratiowerte wurden anschließend annäherungsweise mit der Formel nach Grynkiewicz et al. 1989 in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  umgerechnet. Die Balkenhistogramme zeigen für die jeweilige Bcl-2-Mutante den durch TG-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in unbehandelten Zellen (schwarze Balken) und 2 h nach CD95-Stimulation (weiße Balken). In den Kontrollzellen steigt die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  auf bis zu 1000 nM. Ein Vergleich der mittleren  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach CD95-Rezeptor-Stimulation der Mutanten zeigt, daß in 68 % der VC Zellen das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal geblockt war ( $\text{Ca}^{2+} \leq 200$  nM). In WT und ActA Zellen wurde ein protektiver Effekt ersichtlich, nur 31 % bzw. 27 % der Zellen waren inhibiert. Das am ER lokalisierte Bcl-2 weist einen partiellen Effekt auf, 40 % der Population unterschreiten die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von 200 nM. Zytosolisches Bcl-2 hat keinen signifikanten Effekt auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; die Verteilung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von  $\Delta\text{TM}$  Zellen ist nahezu identisch mit der Vektorkontrolle, 70 % der Zellen liegen unter 200 nM. In diesem repräsentativen Experiment wurden 10.000 Zellen untersucht.

Zusammenfassend unterstützen diese Daten folgendes Modell:

Während der Stimulation des CD95-Rezeptors werden die Sphingolipide Ceramid und Sphingosin freigesetzt, die den speichergesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch CRAC-Kanäle inhibieren.

Der durch CD95-induzierte Block wird durch die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials verursacht. Mitochondrien sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer, die einströmendes  $\text{Ca}^{2+}$  aufnehmen und umverteilen. Die treibende Kraft für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme resultiert aus dem negativen  $\Delta\Psi_m$ . Als Folge des Zusammenbruches des  $\Delta\Psi_m$  kommt es zum Verlust dieser Triebkraft und dadurch zur Erhöhung der lokalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Nähe des CRAC-Kanals sowie zur Blockade des Kanals aufgrund des  $\text{Ca}^{2+}$ -Rückkopplungsmechanismus.



### 3.3. Aktivierung auswärtsrektifizierender Chloridkanäle

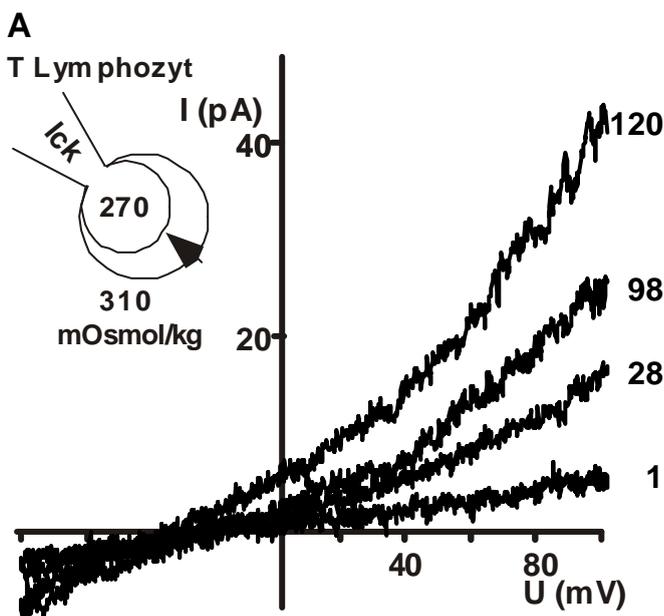
Neben den speichergesteuerten Calciumkanälen exprimieren Lymphozyten auch Kalium- und Chloridkanäle, die im Zusammenspiel die Proliferation kontrollieren.

Im folgenden wird der Aktivierungsmechanismus und die Funktion lymphozytärer Chloridkanäle untersucht.

#### 3.3.1. Die Tyrosinkinase p56<sup>lck</sup> aktiviert osmosensitive Chloridkanäle ohne vorherige Zellschwellung

Das Einwaschen einer hypertonen Lösung in das Zytosol von Lymphozyten induziert innerhalb von 10-20 s einen auswärtsrektifizierenden Cl<sup>-</sup>-Strom, der unter anderem durch Diisothiocyanato-2-2-stilbensulfonsäure (DIDS) blockiert werden kann (Lewis et al., 1993). In p56<sup>lck</sup> defizienten JCaM 1.6 Zellen ist der Strom verkleinert und kann durch Retransfektion der Tyrosinkinase wiederhergestellt werden. Außerdem kann dieser osmotisch aktivierbare Strom durch Tyrosinkinaseinhibitoren blockiert werden (Lepple-Wienhues et al., 1998).

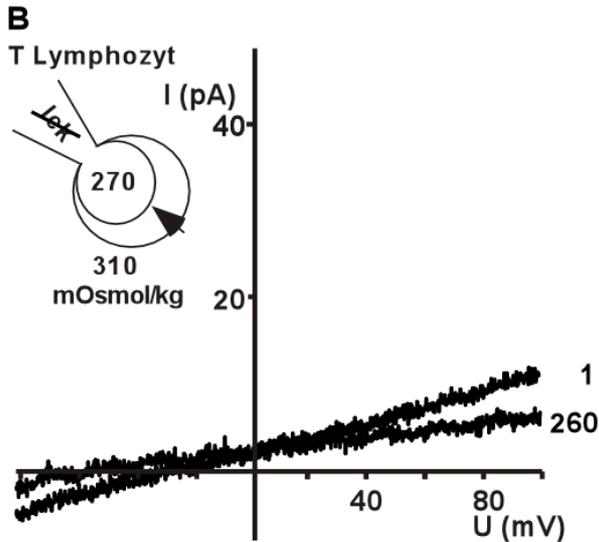
Um die Rolle der Tyrosinkinase in der Aktivierung von osmosensitiven Chloridkanälen näher zu charakterisieren, wurde versucht, den Chloridstrom ohne Zellschwellung zu aktivieren. Dazu wurden die Zellen durch Verwendung einer hypotonen Pipettenlösung (260 mOsm/kg) nach Etablierung der whole-cell Konfiguration geschrumpft und gereinigte p56<sup>lck</sup> zur Intrazellulärlösung zugesetzt und in das Zytosol von nativen Zellen eingewaschen (Abb. 23A, C). Zur Kontrolle wurde in derselben Versuchsanordnung hitzeinaktivierte p56<sup>lck</sup> (100 °C, 5 min) verwendet (Abb. 23B, C).



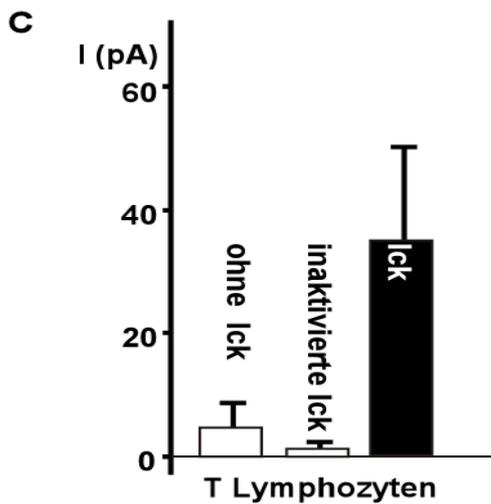
**Abbildung 23:**

A. Ein auswärtsrektifizierender Chloridstrom wird durch die Tyrosinkinase p56<sup>lck</sup> in osmotisch schrumpfenden T-Zellen aktiviert:

Der Pipettenlösung wurde 10 U/ml gereinigte p56<sup>lck</sup> zugesetzt. Die Aufzeichnung der Strom-Spannungskurven erfolgte mit Spannungsrampen von 200 ms Dauer 1, 28, 98, 120 s nach Einbrechen in die Zelle. Es wurde keine Korrektur des Leckstromes durchgeführt.



A. Bei Zugabe von hitzeinaktiverer  $p56^{lck}$  zur Pipettenlösung zeigte sich keine Aktivierung des auswärtsrektifizierenden Stromes. Die gezeigten Spannungsrampen wurden 1 und 260 s nach Erreichen der whole-cell Konfiguration aufgezeichnet.



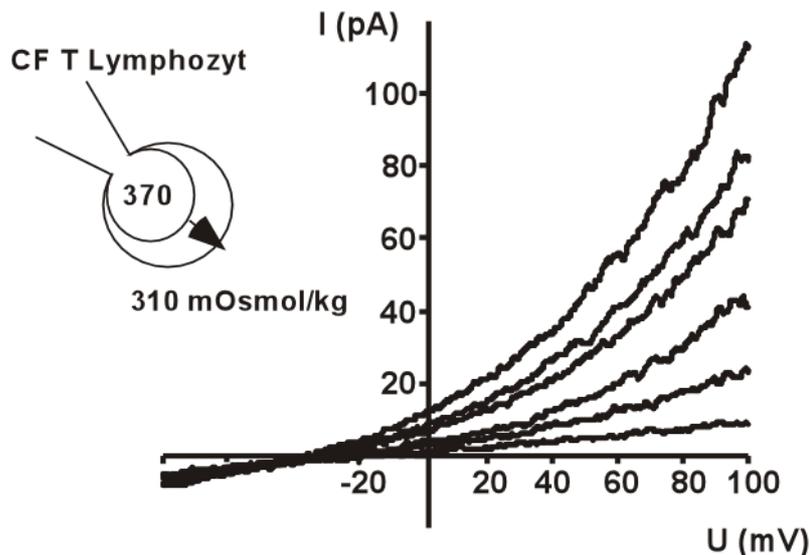
B. Das Balkendiagramm zeigt den maximalen Außwärtsstrom in T-Zellen in Abwesenheit und in Gegenwart von 10 U/ml  $p56^{lck}$  in der Pipette ( $n = 7$ ) bzw. mit hitzeinaktiverer  $p56^{lck}$  ( $n = 4$ ). Es wurde die Patch-clamp-Technik in der whole-cell Konfiguration verwendet und die Ströme bei einer Spannung von 35 mV ausgewertet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte.

Der Strom wies dieselben Eigenschaften wie der osmotisch aktivierte Chloridstrom auf: starke Auswärtsrektifizierung, fehlende Inaktivierung, Inhibition durch 500  $\mu$ M DIDS. Folglich kann ein Chloridstrom, dessen Eigenschaften von der osmotisch aktivierten Chloridleitfähigkeit nicht unterscheidbar sind, durch die aufgereinigte Tyrosinkinase  $p56^{lck}$  aktiviert werden.

### 3.3.2. Osmotische Zellschwellung von CF Lymphozyten aktiviert auswärtsrektifizierende Chloridkanäle

Die Cystische Fibrose, die auch als Mukoviszidose bezeichnet wird, ist eine Erkrankung, bei der es sich um einen Defekt des CFTR-Proteins handelt. CFTR, cystic fibrosis transmembrane regulator, ist in der apikalen Basalmembran von Epithelzellen lokalisiert und fungiert als Chloridkanal. Aufgrund der verminderten Chloridsekretion und der damit verbundenen vermehrten Natriumresorption nimmt unter anderem die Viskosität des Bronchialsekrets zu. Der Regulationsdefekt von Chloridkanälen mit auswärtsrektifizierenden Eigenschaften bei Cystischer Fibrose besteht auch in T- und B-Lymphozyten. Gabriel et al. zeigten 1993 in CFTR knock-out Mäusen, daß es sich bei CFTR und den auswärtsrektifizierenden Chloridkanälen um unterschiedliche Proteine handelt.

Osmotische Zellschwellung von CF Lymphozyten (T-Lymphozyten von an Cystischer Fibrose erkrankten Patienten, Mutation  $\Delta F 508$ ) aktiviert auswärtsrektifizierende Chloridkanäle (Abb. 24). Dieser Strom zeigt die gleiche Charakteristik wie der in T-Lymphozyten beobachtete Strom: keine Inaktivierung über den Zeitraum der Aufzeichnung, Blockade durch 500  $\mu\text{M}$  DIDS.



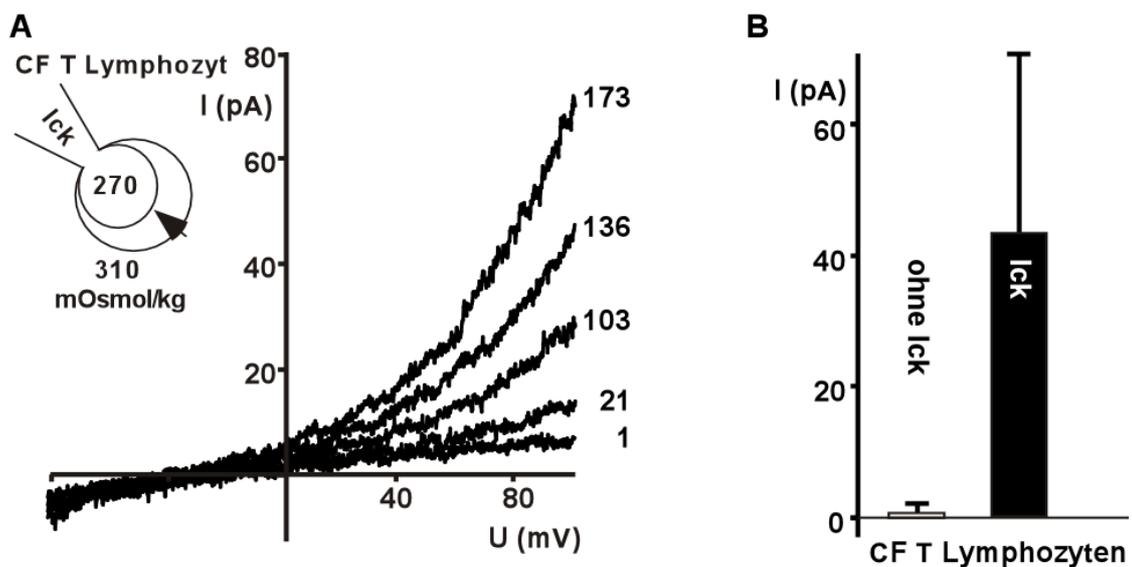
**Abbildung 24:**

Osmotische Aktivierung einer auswärtsrektifizierenden Anionenleitfähigkeit in CF Lymphozyten. Osmotische Zellschwellung (370 mOsm/kg in der Pipettenlösung) aktiviert einen auswärtsrektifizierenden Strom ( $n = 12$ ). Die gezeigten repräsentativen Stromkurven wurden 28, 52, 80, 116, 162 und 266 s nach Einbrechen in die Zelle durch Anlegen von Spannungsrampen von je 200 ms Dauer aufgezeichnet. Es wurde keine Korrektur des Leckstromes durchgeführt.

### 3.3.3. Die Tyrosinkinase $p56^{\text{lck}}$ aktiviert auswärtsrektifizierende Chloridkanäle in CF Lymphozyten

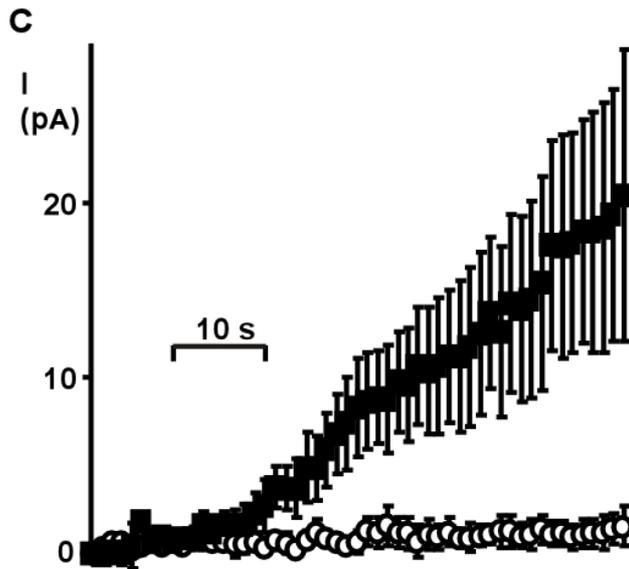
Wenn die Aktivierung des auswärtsrektifizierenden Stroms durch Tyrosinphosphorylierung unabhängig von CFTR ist, dann müßte Einwaschen von  $p56^{\text{lck}}$  in das Zytosol von CF Lymphozyten den Chloridstrom aktivieren. Gibt man in die Pipettenlösung 10 U/ml gereinigte Ick, so führt dies trotz Zellschrumpfung aufgrund intrazellulär hypotonen Bedingungen (270 mOsm/kg) zur Aktivierung des auswärtsrektifizierenden Chloridstromes (Abb. 25A, B). Ohne Zugabe von  $p56^{\text{lck}}$  kommt es unter denselben Konditionen zu keiner Chloridkanalaktivierung.

Die Gabe von Lavendustin (10  $\mu\text{M}$ ), einem potenten Tyrosinkinasehemmstoff, über die Pipettenlösung blockiert den schwellungsaktivierten Chloridstrom (Abb. 25C). Nach Aktivierung des Stromes kann dieser durch die extrazelluläre Applikation von Lavendustin nicht mehr gehemmt werden.



**Abbildung 25:** Die Aktivierung einer auswärtsrektifizierenden Chloridleitfähigkeit in Lymphozyten von an CF erkrankten Patienten (Mutation dF 508) durch  $p56^{\text{lck}}$  in der Pipettenlösung:

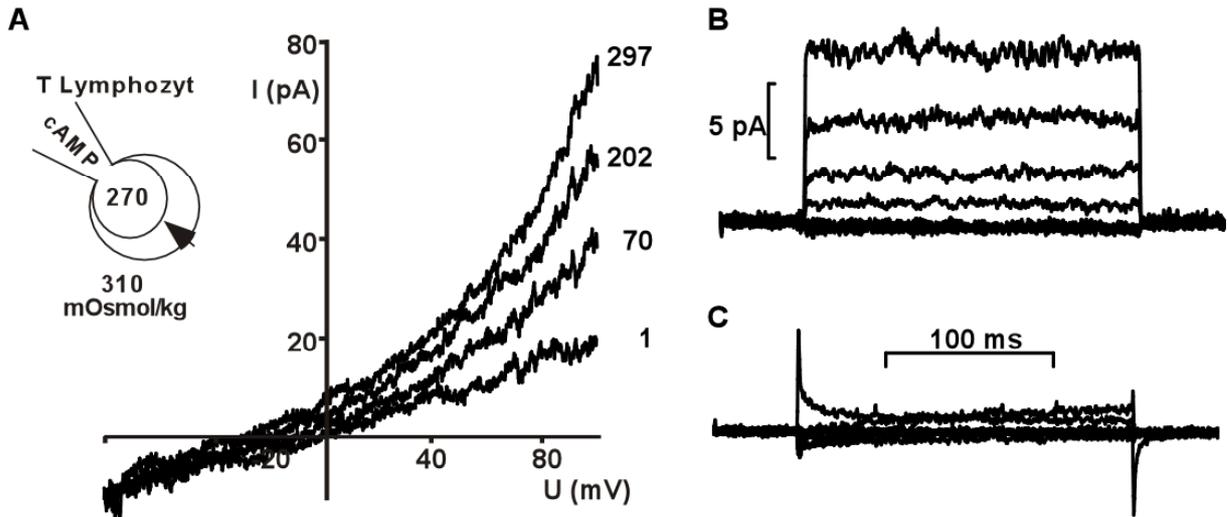
- A. Bei Zugabe von 10 U/ml aufgereinigter  $p56^{\text{lck}}$  in die Pipette kommt es trotz intrazellulär hypotonen Bedingungen zur Aktivierung eines Chloridstromes ( $n = 7$ ). Die gezeigten repräsentativen Stromkurven wurden 1, 21, 103, 136 und 173 s nach Einbrechen in die Zelle durch Anlegen von Spannungsrampen (je 200 ms Dauer) aufgezeichnet. Es wurde keine Leckstromkorrektur vorgenommen.
- B. In diesem Balkendiagramm ist der lecksubstrahierte Auswärtstrom bei +35 mV in CF Lymphozyten mit und ohne  $p56^{\text{lck}}$  in der Pipettenlösung dargestellt.



C. In CF Lymphozyten blockiert der Tyrosinkinasehemmstoff Lavendustin (10  $\mu\text{M}$ ) die auswärtsrektifizierende Anionenleitfähigkeit trotz osmotischer Zellschwellung (370 mOsm/kg in der Pipette). Die Abbildung zeigt den Zeitverlauf des Mittelwerts des lecksubstrahierten Auswärtsstromes, aufgezeichnet in der whole-cell Konfiguration, bei +35 mV in CF Lymphozyten mit (■, n=7) und ohne (○, n=9) Lavendustin.

#### 3.3.4. cAMP aktiviert auswärtsrektifizierende Chloridkanäle in Lymphozyten

Intrazelluläres cAMP, über die Pipettenlösung appliziert, aktiviert eine auswärtsrektifizierende Anionenleitfähigkeit in T-Lymphozyten gesunder Spender trotz Zellschrumpfung, die durch Verwendung einer hypotonen Pipettenlösung hervorgerufen wurde (Abb. 26A). Bei symmetrischer Chloridkonzentration zeigt der durch cAMP aktivierte Strom eine charakteristische Auswärtsrektifizierung, keine Inaktivierung bei Anlegen von Spannungspulsen von 200 ms Dauer und ist durch 500  $\mu\text{M}$  DIDS hemmbar (Abb. 26B, C).

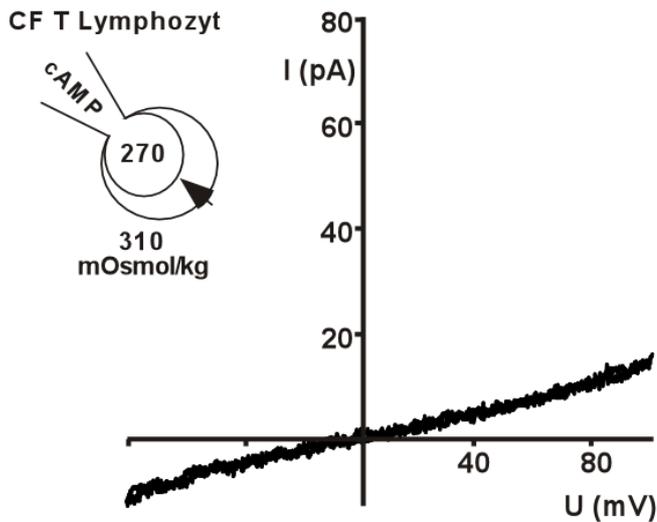


**Abbildung 26:** Cyclisches AMP aktiviert einen auswärtsrektifizierenden Chloridstrom in T-Zellen gesunder Spender.

- A. In T Lymphozyten kommt es bei Zugabe von cAMP (200  $\mu$ M) in die Pipettenlösung trotz Zellschrumpfung (hypotone Pipettenlösung) zur Aktivierung eines auswärtsrektifizierenden Chloridstromes. Die gezeigten repräsentativen Stromkurven wurden 1, 70, 202 und 297 s nach Einbrechen in die Zelle aufgezeichnet. Es wurde keine Korrektur des Leckstromes durchgeführt.
- B. Bei symmetrischer Chloridionenkonzentration zeigt sich die auswärtsrektifizierende Eigenschaft des durch cAMP (200  $\mu$ M) aktivierten lecksabtrahierten Chloridstromes. Eine Inaktivierung fand nicht statt. Die Spannungspulse von 200 ms Dauer von  $-60$  bis  $+80$  mV in 20 mV-Schritten wurden im Abstand von 5 s appliziert.
- C. Nach Gabe von DIDS (500  $\mu$ M) wurde die bei Anlage von Spannungspulsen von 200 ms Dauer von  $-60$  bis  $+80$  mV sichtbare auswärtsrektifizierende Stromkomponente vollständig geblockt.

### 3.3.5. cAMP führt in CF Lymphozyten zu keiner Chloridkanalaktivierung

Gibt man in die Pipettenlösung cAMP (200  $\mu$ M), so kommt es in Übereinstimmung mit früheren Studien, die eine defekte cAMP-regulierte Chloridkanalaktivierung in Lymphozyten von CF Patienten beschrieben (McDonald et al., 1992), zu keiner Aktivierung von Chloridkanälen in CF Lymphozyten (Mutation dF 508) (Abb. 27).



**Abbildung 27:** In CF Lymphozyten kommt es trotz Zugabe von cAMP (200  $\mu$ M) in die Pipette zu keiner Aktivierung einer auswärts-rectifizierenden Anionenleitfähigkeit. Die gezeigten repräsentativen Strom-Spannungskurven wurden 1 und 100 s nach Einbrechen in die Zelle aufgezeichnet.

### 3.4. Inhibition des Chloridkanals blockiert den kapazitiven Calciumeinstrom

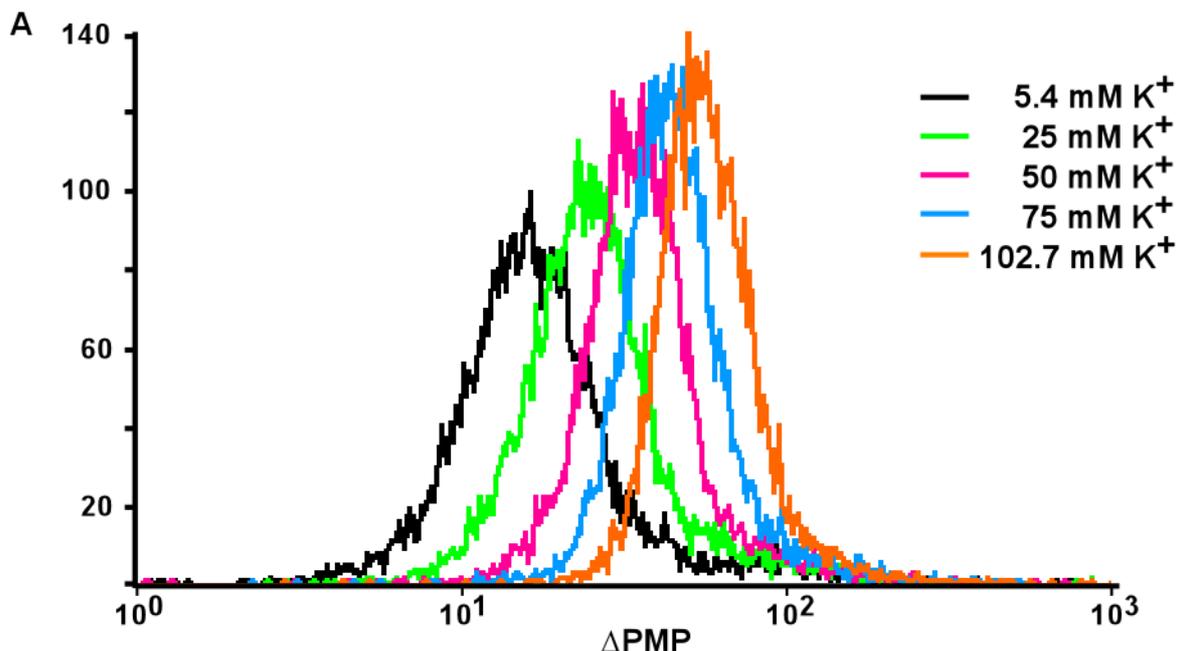
Um die funktionelle Beteiligung des ORCC am kapazitiven Calciumeinstrom zu zeigen bzw. den Einfluß auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch den CRAC-Kanal zu charakterisieren, wurden die Lymphozyten mit unterschiedlichen Chloridkanalinhibitoren, NPPB (5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino)benzoesäure) und Glibenclamid, inkubiert und die resultierenden Effekte auf das Plasmamembranpotential und das Calciumsignal untersucht. NPPB ist ein potenter Chloridkanalinhibitor und Glibenclamid blockiert neben den Chloridkanälen selektiv ATP-abhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle, die jedoch in Lymphozyten nicht exprimiert werden (Rabe et al., 1995).

#### 3.4.1. Einfluß des ORCC auf das Plasmamembranpotential (PMP)

Das Membranpotential von Lymphozyten, das vorwiegend von  $\text{Kv}1.3$ -Kanälen getragen wird, beeinflusst indirekt den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach CRAC-Aktivierung. Aufgrund des Kationeneinstromes kommt es kurzzeitig zur Depolarisation der Plasmamembran, was den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einfluß inhibieren würde. Durch Aktivierung von spannungsgesteuerten und  $\text{Ca}^{2+}$ -gesteuerten Kaliumkanälen wird das Ausgangsmembranpotential wiederhergestellt und dadurch die elektrische Triebkraft erhalten. Weiterhin wird die Beteiligung von Chloridkanälen am negativen Membranpotential in Lymphozyten diskutiert. Zur

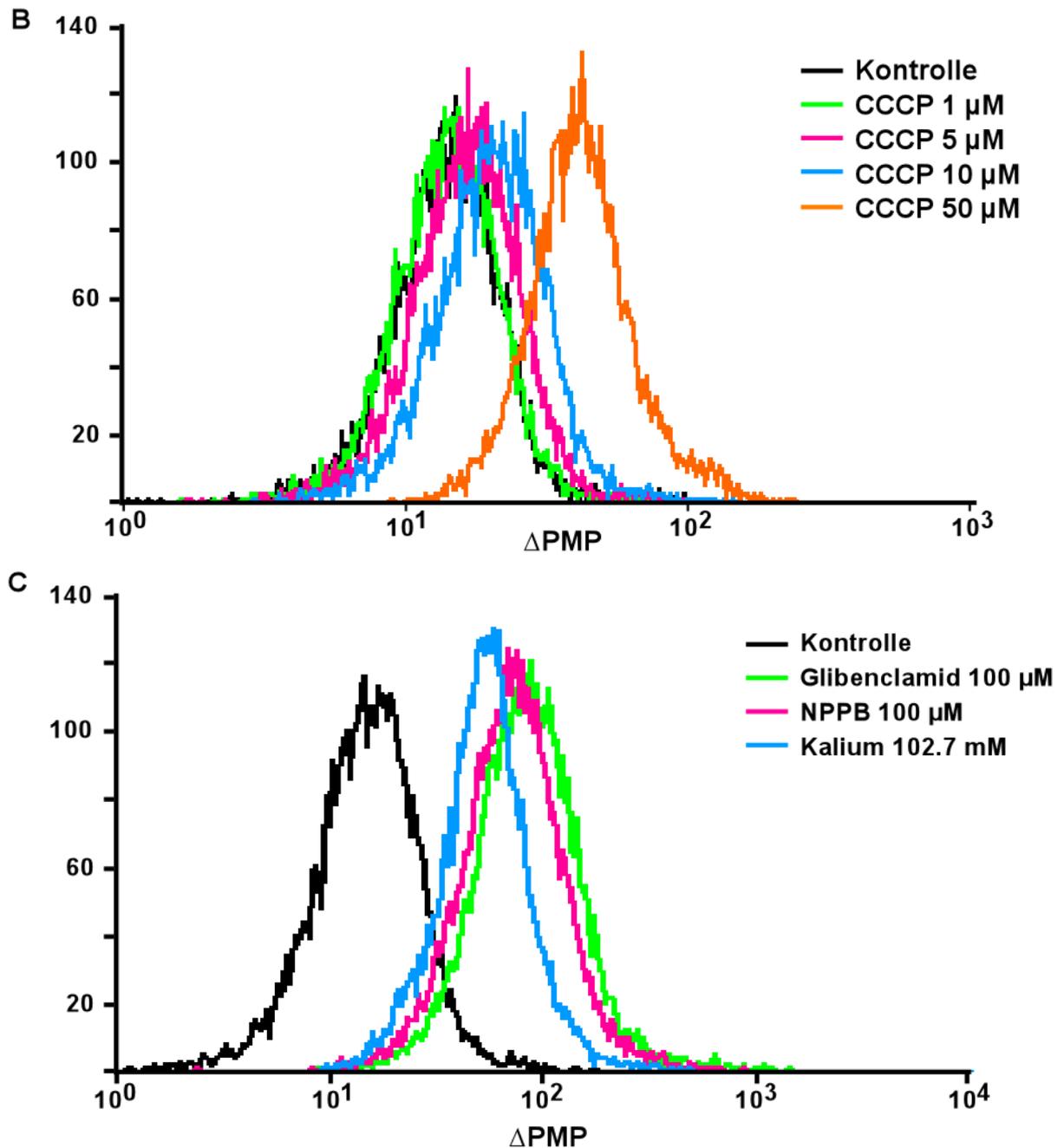
durchflußzytometrischen Messung des PMP wurden die Zellen mit dem anionischen Fluoreszenzfarbstoff DiBAC<sub>4</sub> angefärbt und anschließend der FACS-Analyse unterworfen. Die Sensitivität der Methode wurde überprüft, indem die Zellen in isoosmotischem Medium mit unterschiedlicher Kaliumkonzentration, 25 mM, 50 mM, 75 mM und 102.7 mM, inkubiert und das PMP gemessen wurde (Abb. 28A). Um auszuschließen, daß das mitochondriale Membranpotential bestimmt wird, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Protonophors CCCP versetzt (Abb. 28B). In geringer Konzentration (1 µM) depolarisiert CCCP selektiv das  $\Delta\Psi_m$ , in höheren Konzentrationen die Plasmamembran.

Im nächsten Schritt konnte gezeigt werden, daß durch Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren NPPB und Glibenclamid die Plasmamembran depolarisiert wurde. Die Depolarisation war annäherungsweise vergleichbar mit der Depolarisation, die durch Erhöhen der extrazellulären Kaliumkonzentration erreicht wurde (Abb. 28C).



**Abbildung 28:** Überprüfung der Sensitivität der PMP-Messmethode.

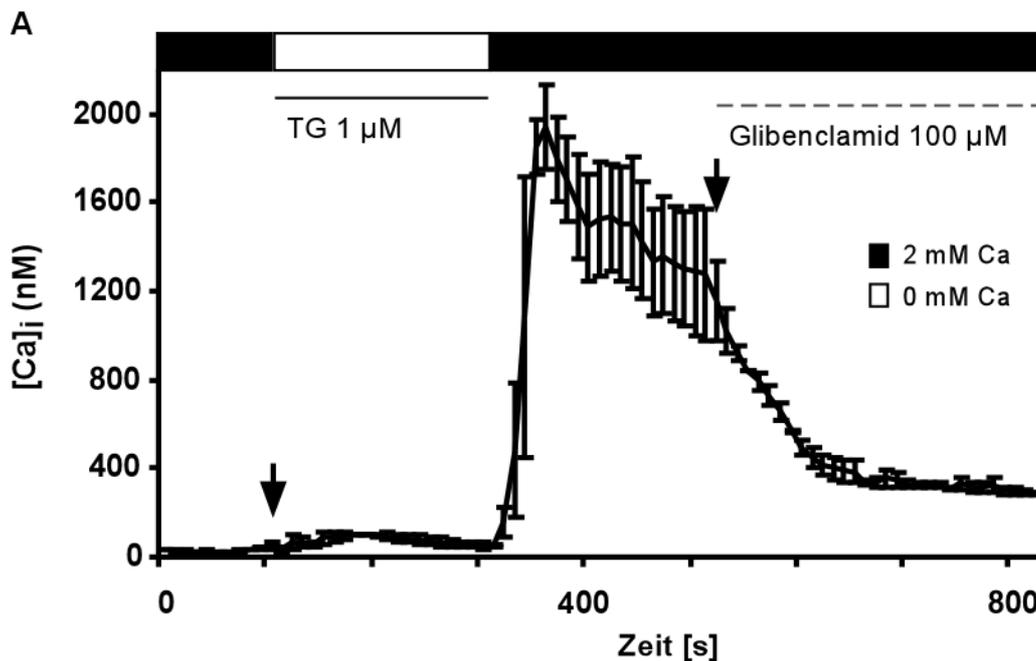
A. Die Zellen wurden in Medium mit unterschiedlicher Kaliumkonzentration, 25, 50, 75 und 102.7 mM, mit 150 nM des anionischen Farbstoffes DiBAC<sub>4</sub> für 15 min im Brutschrank inkubiert und direkt der FACS-Analyse unterworfen. Durch Zunahme der extrazellulären Kaliumkonzentration kommt es zur konzentrationsabhängigen Depolarisation der Plasmamembran, was in einer Fluoreszenzzunahme deutlich wird. Dargestellt ist ein repräsentatives Histogramm (n = 5 mit je 10.000 Zellen).



- A. Die Zellen wurden mit variierenden Konzentrationen des Protonophors CCCP, 1, 5, 10 und 50  $\mu\text{M}$ , inkubiert und das PMP nach Anfärben der Zellen mit 150 nM DiBAC<sub>4</sub> am Durchflußzytometer bestimmt. Niedrige Konzentrationen von CCCP depolarisieren vorwiegend das  $\Delta\Psi_m$ , so daß hier kaum eine Fluoreszenzverschiebung sichtbar wird. 50  $\mu\text{M}$  CCCP führt zum Zusammenbruch des PMP und dadurch zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität (n = 2).
- C. Die Inhibitoren NPPB (n = 3) und Glibenclamid (n = 4) depolarisieren die PMP vergleichbar mit 102.7 mM Kalium.

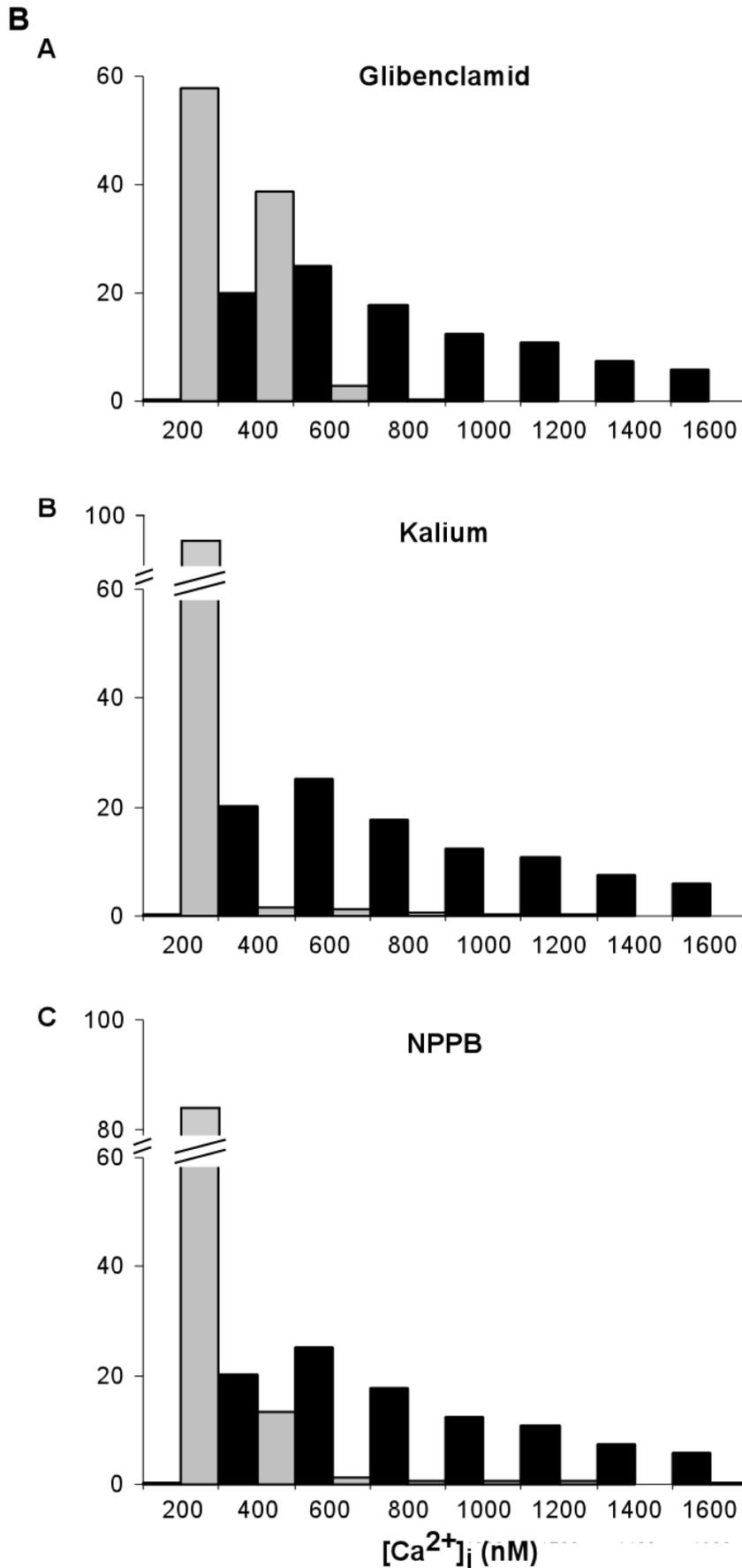
## 3.4.2. Chloridkanalinhibitoren blockieren den kapazitiven Calciumeinstrom

Die bisherigen Daten zeigen, daß Chloridkanäle das PMP beeinflussen. Außerdem wurde über eine hemmende Wirkung auf die T-Zellproliferation von Chloridkanalinhibitoren berichtet (Phipps et al., 1996). Es liegt deshalb nahe, daß der kapazitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch Inhibition des Chloridkanals blockiert wird. Um dies zu beweisen, wurden Zellen mit NPPB und Glibenclamid behandelt. Die speichergesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle wurden durch Entleerung des endoplasmatischen Speichers mit TG, einem Blocker der endoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, maximal aktiviert und ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom verzeichnet. Nach Zugabe von Glibenclamid (100  $\mu\text{M}$ ) in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Plateauphase, wurde der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom blockiert, die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sanken auf Werte unter 400 nM (Abb. 29A). Die gleichen Ergebnisse wurden erzielt, indem die Zellen mit den Inhibitoren NPPB oder Glibenclamid inkubiert wurden und man die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durchflußzytometrisch bestimmte (Abb. 29B). In den behandelten Zellen war die Blockade des kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes vergleichbar mit der Inhibition durch 102.7mM  $\text{K}^+$  (Abb. 29B); Kontrollzellen zeigten ein deutliches Signal, so daß von einer Beteiligung von  $\text{Cl}^-$ -Kanälen am  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ausgegangen werden kann.



**Abbildung 29:** NPPB und Glibenclamid induzieren einen Block des kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom.

A. Dargestellt ist der Zeitverlauf der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach Applikation von 100  $\mu\text{M}$  Glibenclamid gemessen mittels Video-Imaging-Technik. Nach Zugabe des Inhibitors wird der TG-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom blockiert, die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sinkt auf Werte unter 400 nM. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 2; 42 und 34 Zellen).



B. Diese repräsentative Abbildung (n = 3; je 10.000 Zellen) demonstriert den blockierenden Effekt der Inhibitoren, NPPB und Glibenclamid. Gezeigt ist eine Häufigkeitsverteilung der mit dem FACS-gemessenen [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> nach Inkubation mit NPPB 100 μM, Glibenclamid 100 μM in Kompletmedium mit 5.4 mM K<sup>+</sup> und in Medium mit 102.7 mM K<sup>+</sup> ohne Inhibitoren. Nach Aktivierung zeigen Kontrollzellen, bei denen in 80 % der Zellen die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> über 400 nM liegt (schwarze Balken), eine Reduktion des Ca<sup>2+</sup>-Einstrom nach Inkubation mit NPPB (C, graue Balken) oder Glibenclamid (A, graue Balken), vergleichbar mit der Veränderung des Ca<sup>2+</sup>-Einstromes in Medium mit 102.7 mM K<sup>+</sup> (B).

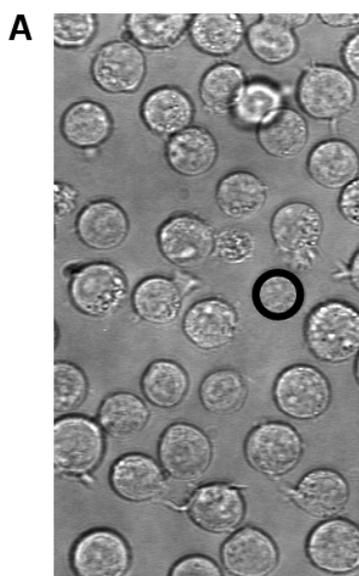
### 3.5. Die Rolle von Chloridkanälen in der Apoptose

Zellvolumen und Regulationsmechanismen des Zellvolumens spielen sowohl bei proliferativen als auch bei apoptotischen Zellvorgängen eine wichtige Rolle. Bei der Zellvolumenregulation können Zellen durch Elektrolytaufnahme schwellen sowie durch Elektrolytverlust schrumpfen. Außerdem können sie durch Aufnahme oder Bildung von organischen Osmolyten ihre Osmolarität und damit das Volumen steigern oder durch Osmolytabgabe ihre Osmolarität senken (Lang et al., 1998).

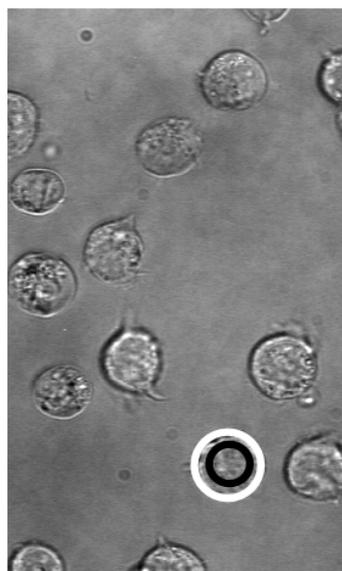
Für die rezeptorvermittelte Apoptose wurde eine Veränderung von zellvolumenregulierenden Transportprozessen beschrieben. Die Stimulation des CD95-Rezeptors führt zur Aktivierung von osmosensitiven Chloridkanälen (Szabo et al., 1998). Veränderte Ionentransportfunktionen nach Bestrahlung sind bislang nicht näher charakterisiert. Der Einfluß ionisierender Strahlung auf die Funktion des zellvolumenregulierten Anionenkanals ORCC sollte untersucht werden.

#### 3.5.1. Strahleninduzierte Zellschwellung

Ionisierende Strahlung führt zur ausgeprägten Zellschwellung von Jurkat T-Zellen. Die Zellen wurden mit dem Linearbeschleuniger LINAC H (Dosisrate 4 Gy/min) mit 10 Gy bestrahlt und die Volumenänderung mittels Auflichtbildern (Abb. 30A) bzw. durchflußzytometrisch (Abb. 30B) bestimmt. Die Volumenzunahme beginnt etwa 7 h nach Bestrahlung und erreicht ein Maximum von 15-20 % nach circa 30 h.



**Kontrolle**

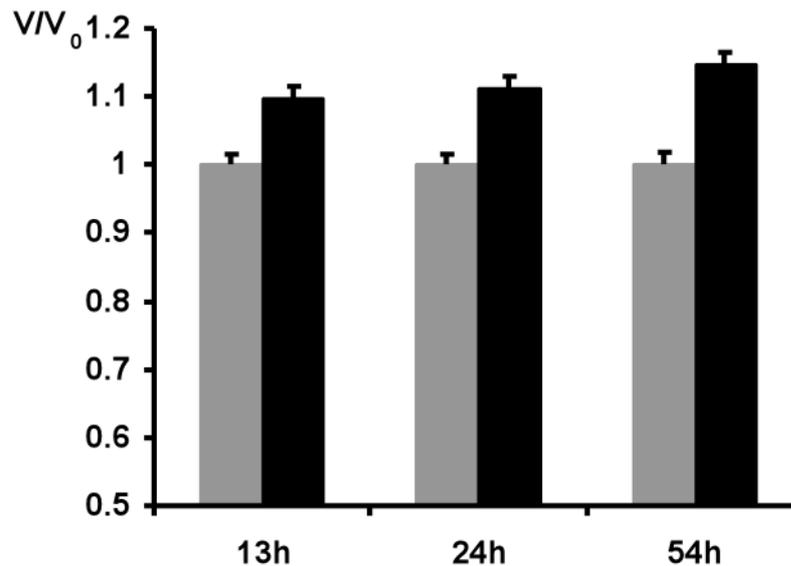


**bestrahlte Zellen**

**Abbildung 30:** Strahleninduzierte Zellschwellung.

Die Jurkat Zellen wurden am Linearbeschleuniger mit einer Dosisrate von 4 Gy/min mit 10 Gy bestrahlt und die Volumenzunahme gemessen.

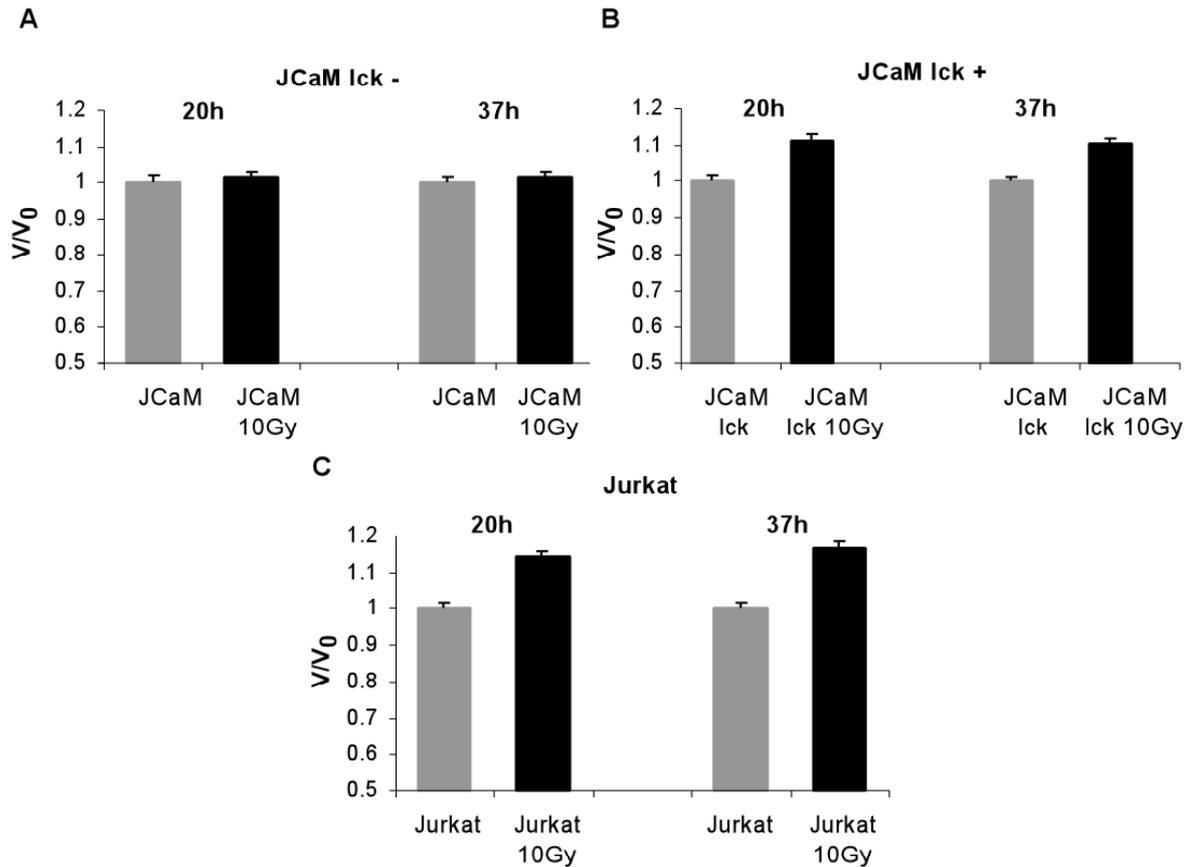
A. 24 h nach Bestrahlung wurde die Zellschwellung mikroskopisch mittels Auflichtbildern bestimmt. Das linke Bild zeigt Kontrollzellen (schwarzer Kreis), das rechte Bild bestrahlte Zellen (weißer Kreis).



- B. In diesem Balkendiagramm ist das relative Volumen ( $V = \text{Volumen der bestrahlten Zellen zum Zeitpunkt } t, V_0 = \text{Volumen der Kontrollzellen zum Zeitpunkt } t$ ) der Kontrollzellen (graue Balken) und der bestrahlten Jurkat Zellen (schwarze Balken) 13, 24 und 54 h nach Bestrahlung dargestellt. FSC wurde als Charakteristikum für die Volumenänderung verwendet. Eine deutliche Volumenzunahme um etwa 11 % ist bereits nach 13 h zu verzeichnen.

### 3.5.2. Die Tyrosinkinase $p56^{\text{lck}}$ ist essentiell für strahleninduzierte Zellschwellung

Die  $p56^{\text{lck}}$  Kinase ist die in Lymphozyten am stärksten exprimierte Tyrosinkinase der src-Familie. Sie phosphoryliert Proteine an Tyrosinen, die innerhalb einer bestimmten Konsensussequenz liegen (Songyang et al. 1995). Die Ergebnisse von Lepple-Wienhues et al. (1998) haben gezeigt, daß die Expression dieser src-ähnlichen Kinase  $p56^{\text{lck}}$  für die Aktivierung des auswärtsrektifizierenden Chloridkanals wichtig ist. Es stellt sich daher die Frage, ob die Expression der  $p56^{\text{lck}}$  auch für die strahleninduzierte Zellschwellung benötigt wird. Zu diesem Zweck wurden  $p56^{\text{lck}}$  defiziente JCaM1.6 Zellen bzw.  $p56^{\text{lck}}$  retransfizierte JCaM1.6 lck+ Zellen bzw. native Jurkat Zellen mit 10 Gy bestrahlt und das Zellvolumen durchflußzytometrisch bestimmt. Die Bestrahlung führte in den JCaM1.6 lck- Zellen zu keiner Volumenänderung (Abb. 31A); im Vergleich dazu induzierten Gamma-Strahlen in den retransfizierten JcaM1.6 lck+ Zellen eine deutliche Zellschwellung (Abb. 31B), in der gleichen Größenordnung wie bei den nativen Lymphozyten (Abb. 31C). Dies weist darauf hin, daß die Expression der  $p56^{\text{lck}}$  Kinase auch für die strahleninduzierte Zellschwellung wichtig ist.



**Abbildung 31:** Zellschwellung nach Bestrahlung in Abhängigkeit der  $p56^{lck}$  Expression.

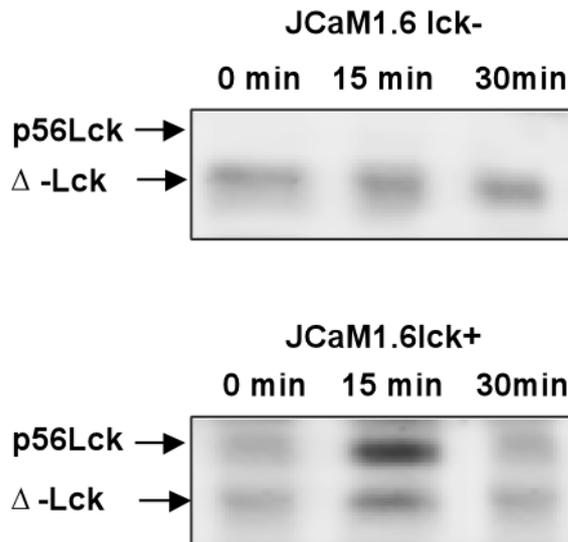
Die strahleninduzierte Zellschwellung ist abhängig von der Expression der  $p56^{lck}$  Tyrosinkinase. JCaM1.6 bzw. JCaM1.6 lck+ bzw. native Jurkat Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und die Volumenänderung 20 bzw. 37 h später durchflußzytometrisch bestimmt. In den lck defizienten JCaM1.6 Zellen verursachen Gamma-Strahlen keine Volumenzunahme (A). Durch Retransfektion der  $p56^{lck}$  Kinase wird die Zellschwellung nach Bestrahlung wiederhergestellt (B), vergleichbar mit dem Verhalten nativer Jurkat Zellen (C). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 3.5.3. $p56^{lck}$ Kinase defiziente Zellen sind apoptoseresistent

Eine Stimulation von Jurkat T-Lymphozyten über den CD95-Rezeptor oder mit Ceramid führt innerhalb von wenigen Minuten zu einer Aktivierung der  $p56^{lck}$  Tyrosinkinase (Gulbins et al., 1997; Lepple-Wienhues et al., 1998; Szabo et al., 1996).

Um die Induzierbarkeit der Kinaseaktivität von  $p56^{lck}$  durch Bestrahlung, sowie die Defizienz der Kinasenaktivität in JCaM1.6 Zellen zu überprüfen wurde ein in-vitro Autophosphorylierungsassay mit immunpräzipitierter lck durchgeführt. Für die Stimulation wurden die Zellen mit 10 Gy bestrahlt. In JCaM1.6 lck+ Zellen wurde die  $p56^{lck}$  Kinase 15

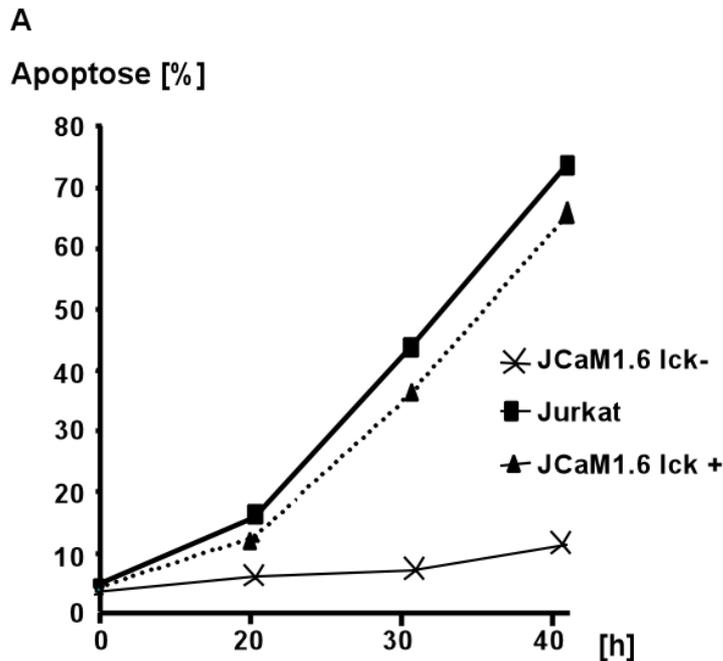
min nach Bestrahlung aktiviert, in den JCaM lck- Zellen wurde keine Aktivierung beobachtet (Abb. 32). Der Autophosphorylierungsassay wurde von Justine Rudner im Labor von Dr. Claus Belka durchgeführt.



**Abbildung 32:** Strahleninduzierte Kinasenaktivität

JCaM 1.6 lck- und JCaM 1.6 lck+ Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt. 0 min, 15 min und 30 min nach Bestrahlung wurde die p56<sup>lck</sup> Kinase immunpräzipitiert und mittels Autophosphorylierungsassay die Aktivität bestimmt. In JCaM1.6 lck+ Zellen ist 15 min nach Bestrahlung ein Aktivitätsmaximum zu verzeichnen, in den lck defizienten JCaM1.6 Zellen ist keine Aktivierung von lck bzw. Δ-lck zu beobachten.

Diese Daten zeigen, daß durch Bestrahlung die Tyrosinkinase lck aktiviert wird. Im nächsten Schritt wurde die Rolle der p56lck Kinase für die strahleninduzierte Apoptose untersucht. Zu diesem Zweck wurden Jurkat Zellen, lck defiziente JCaM1.6 und JCaM1.6 lck+ Zellen mit 10 Gy bestrahlt und 24, 36 und 48 h nach Bestrahlung die Apoptoserate bestimmt (Abb. 33). Im Gegensatz zu den nativen Jurkat Zellen waren die lck defizienten JCaM1.6 Zellen nahezu apoptoseresistent. Durch Retransfektion der lck konnte die Sensitivität der Zellen gegenüber ionisierender Strahlung wiederhergestellt werden. Die Apoptoserate der JCaM1.6 Zellen war vergleichbar mit der Apoptoseinduktion in Jurkat Zellen. Dies deutet darauf hin, daß die Tyrosinkinase p56<sup>lck</sup> für die strahleninduzierte Apoptose essentiell ist.

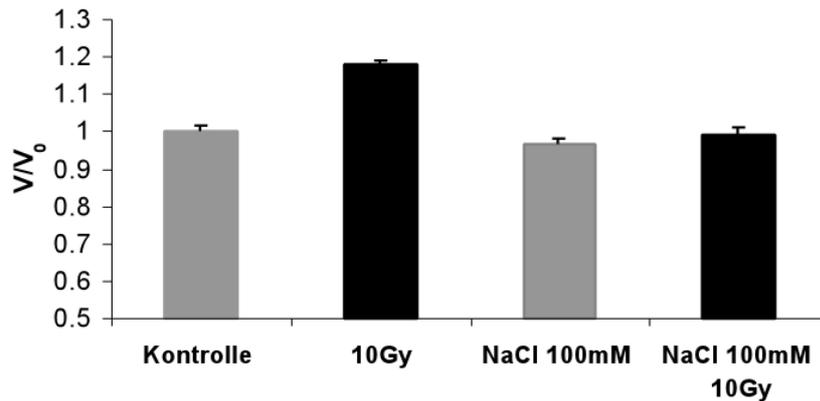


**Abbildung 33:** Abhängigkeit der Apoptoserate von der Expression der Tyrosinkinase p56<sup>Ick</sup>.

Jurkat, Ick defiziente JCaM1.6 und JCaM1.6 Ick+ Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und die Apoptoserate 24, 36 und 48h nach Bestrahlung durch FACS-Analyse bestimmt. In Ick defizienten JCaM1.6 Zellen wurde durch ionisierende Strahlung nahezu keine Apoptose ausgelöst; in Ick exprimierenden JCaM1.6 Zellen wurde durch Bestrahlung eine Apoptoseantwort ähnlich der von Jurkat Zellen erzielt.

#### 3.5.4. Effekte extrazellulärer Hyperosmolarität auf strahleninduzierte Zellschwellung und Apoptose

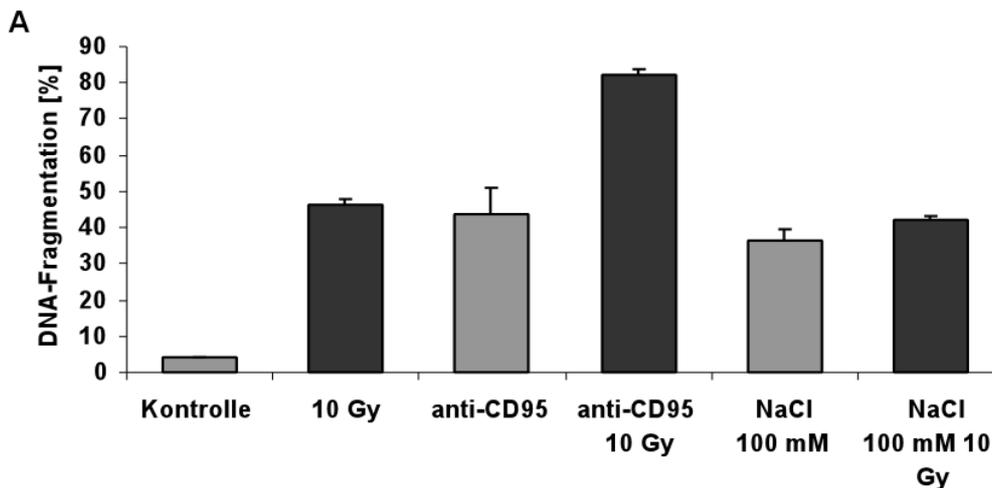
Die Tyrosinkinase p56<sup>Ick</sup> ist essentiell für die strahleninduzierte Zellschwellung und die strahlenvermittelte Apoptose. Es stellt sich die Frage, ob die Volumenzunahme nach Bestrahlung ursächlich für die durch ionisierende Strahlung ausgelöste Apoptose ist. Zur Überprüfung dieser Fragestellung, wurde die extrazelluläre Osmolarität erhöht, um die strahlenvermittelte Zellschwellung durch moderates Schrumpfen vor Bestrahlung zu verhindern, und der Effekt auf die Apoptoserate untersucht. Durch Zugabe von 100 mM NaCl 15 min vor Bestrahlung wurde die Osmolarität des Mediums erhöht und die Zellen dadurch leicht geschrumpft. Die Zellen gegenregulierten relativ schnell und stellten innerhalb von Minuten ihr Ausgangsvolumen wieder her. Wie Abbildung 34 zeigt, konnte durch dieses osmotische Manöver die strahleninduzierte Zellschwellung unterbunden werden.



**Abbildung 34:** Hyperosmolarität verhindert strahleninduzierte Zellschwellung.

Das abgebildete Balkendiagramm zeigt das relative Volumen ( $V =$  Volumen der Zellen,  $V_0 =$  Volumen der unbehandelten Kontrollzellen) unbehandelter und behandelter lebender Zellen. 24 h nach Bestrahlung konnte eine Volumenzunahme um etwa 17% beobachtet werden. Die mit 100 mM NaCl vorbehandelten Zellen zeigten nahezu das gleiche Zellvolumen wie die Kontrollzellen und es wurde keine signifikante Zellschwellung durch ionisierende Strahlung induziert.

Zur Klärung der Frage, welche Effekte die Hyperosmolarität auf die strahleninduzierte Apoptose besitzt, wurden die Zellen mit 100 mM NaCl vorbehandelt und die Anzahl der apoptotischen Zellen untersucht (Abb. 35). Zur Bestimmung der Apoptose wurde die DNA-Fragmentation nach Anfärben mit dem DNA-bindenden Farbstoff Syto-16 am Zytometer gemessen. 26 h nach Bestrahlung mit 10 Gy war in circa 50 % der Zellen DNA-Fragmentation induziert, während in Kontrollzellen keine signifikante DNA-Fragmentation festgestellt werden konnte. NaCl-Vorbehandlung induzierte in etwa 47 % der Zellen Apoptose, die durch ionisierende Strahlung nicht gesteigert wurde. Dagegen kann in den mit 1.56 ng/ml anti-CD95-Antikörper CH11 vorinkubierten Zellen ein strahlungsvermittelter additiver Effekt auf die Apoptose detektiert werden.



**Abbildung 35:** Einfluß von Hyperosmolarität auf die Apoptoserate.

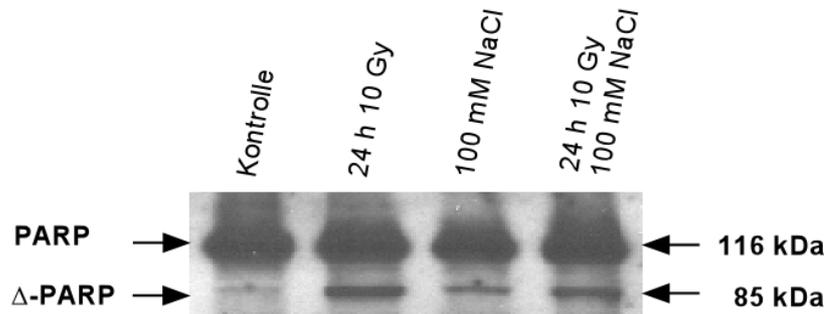
Jurkat Zellen wurden 15 min vor Bestrahlung mit 10 Gy mit 100 mM NaCl bzw. 1.56 ng/ml CH11 inkubiert und die DNA-Fragmentation durch Färbung mit Syto-16 und anschließender FACS-Analyse 26 h später bestimmt. Ionisierende Strahlung verursacht in 46 % der Kontrollzellen DNA-Fragmentation. Die nach 100 mM NaCl-Vorbehandlung beobachtete DNA-Fragmentation liegt bei 37 % und kann durch Bestrahlung nicht gesteigert werden, während die Vorbehandlung mit anti-CD95-AK CH11 und Bestrahlung einen deutlich additiven apoptotischen Effekt aufweist. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 3).

### 3.5.5. Einfluß extrazellulärer Hyperosmolarität auf Apoptosemarker

Die Vorbehandlung mit 100 mM NaCl löst bereits DNA-Fragmentation aus, die durch ionisierende Strahlung nicht gesteigert wird. Um zu klären, ob durch die NaCl-Zugabe ein maximaler Apoptosestimulus gegeben wurde oder ob durch die Hyperosmolarität ein schützender Effekt ausgeübt wird, wurden der Apoptosemarker poly-(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) und der intrazelluläre pH-Wert untersucht.

Während der Apoptose kommt es zur Inaktivierung von PARP durch Spaltung mittels Caspase-3. Um die Inaktivierung zu demonstrieren, wurde ein Western Blot zur Detektion der Spaltprodukte durchgeführt. Das aktive ungespaltene PARP-Protein erscheint im Western Blot als Bande bei 116 kDa, das größte Fragment nach der Spaltung bei 85 kDa. Im Experiment wurden Jurkat Zellen mit 100 mM NaCl vorbehandelt und mit 10 Gy bestrahlt. Nach 24 h wurden Zelllysate mittels 10 %-SDS-PAGE aufgetrennt und ein Western Blot angefertigt (Abb. 36). Zum Vergleich wurden unbehandelte Kontrollzellen mitanalysiert. Bei Jurkat und den osmotisch vorbehandelten Jurkat Zellen tauchte nach 24 h eine 85 kDa Bande auf, welche in den Kontrollen nicht zu sehen war. Die osmotisch

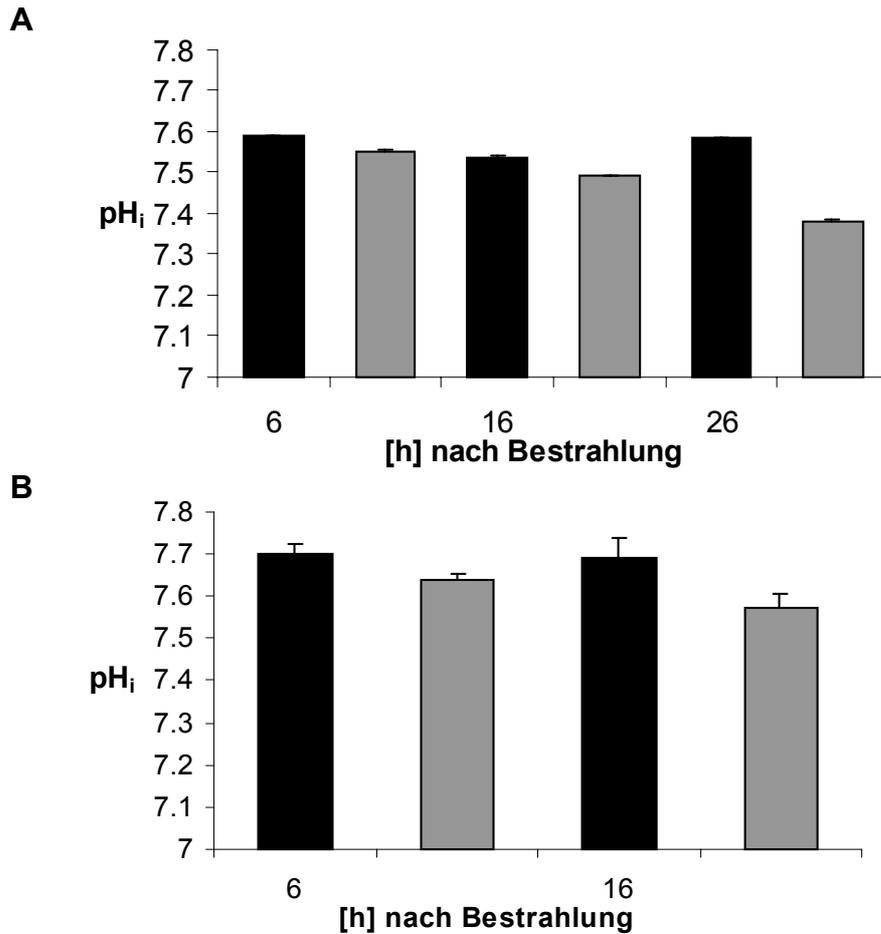
verhinderte strahleninduzierte Zellschwellung hat keinen Effekt auf die Spaltung von PARP.



**Abbildung 36:** Spaltprodukte von PARP im Western Blot.

In den mit 100 mM NaCl vorbehandelten Zellen kommt es wie in den Jurkat Zellen 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy zu einer proteolytischen Spaltung von PARP (85 kDa) (n = 3).

Ein Stimulierung von Lymphozyten über den CD95-Rezeptor führt zur intrazellulären Azidifizierung (Lang et al., 2000). Es wurde deshalb untersucht, ob ionisierende Strahlung den pH<sub>i</sub> verändert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach Bestrahlung mit dem Fluoreszenzfarbstoff SNARF<sup>®</sup> gefärbt und anschließend der FACS-Analyse zur Überprüfung des zytosolischen pH unterworfen. Die bestrahlten Zellen zeigten eine deutliche intrazelluläre Ansäuerung (Abb. 37A, graue Balken), die durch osmotische Schrumpfung (Vorbehandlung mit 100 mM NaCl) nicht verhindert werden konnte (Abb. 37B). Es kann also davon ausgegangen werden, daß die beobachtete osmotische Resistenz gegenüber der strahleninduzierten Zellschwellung keinen Einfluß auf die strahlenvermittelte Apoptose besitzt.



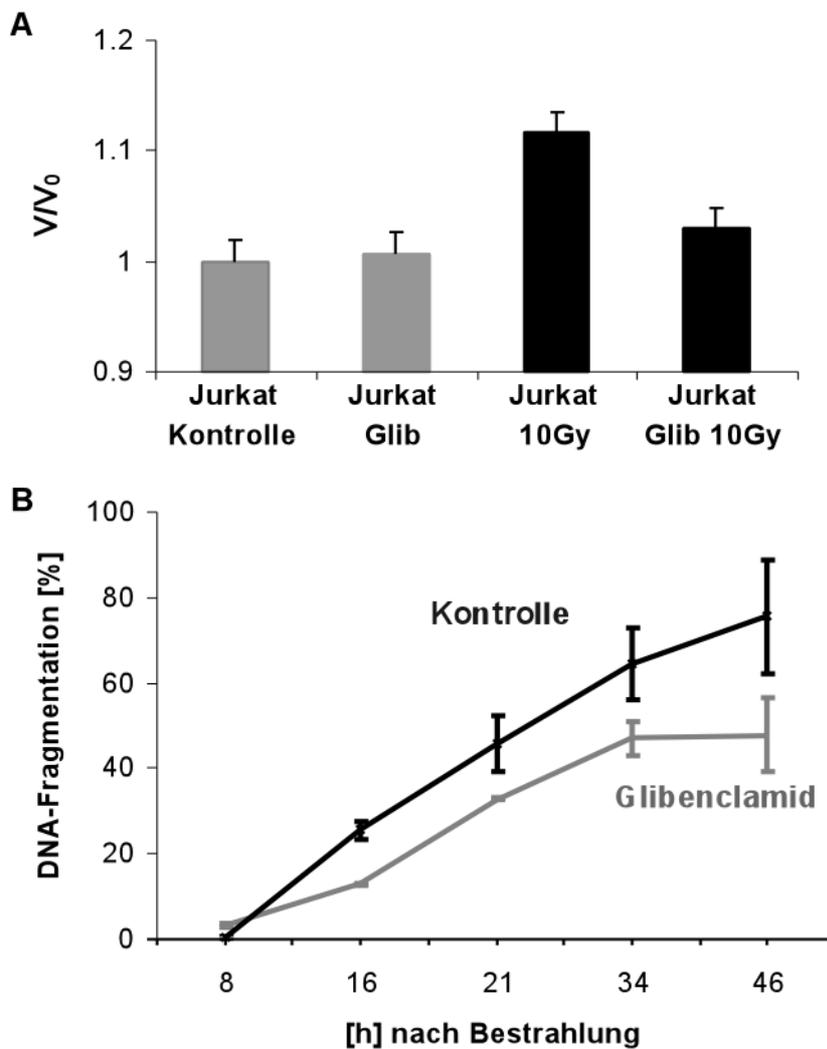
**Abbildung 37:** Veränderung des zytosolischen pH nach Bestrahlung.

Zur Bestimmung des pH<sub>i</sub> wurden die Zellen mit 5 µM SNARF-1-AM für 30 min im Brutschrank inkubiert. Nach Kalibrierung wurde der pH<sub>i</sub> ratiometrisch am Durchflußzytometer gemessen und die Ratio anhand der erstellten Regressionsgerade in pH-Werte umgerechnet. Sowohl die Kontrollzellen (A; n = 3) als auch die osmotisch vorbehandelten Zellen (B; n = 2) zeigen nach Bestrahlung eine deutlich Azidifizierung. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

### 3.5.6. Glibenclamid reduziert Zellschwellung und Apoptose nach Bestrahlung

Um die Bedeutung des auswärtsrektifizierenden Chloridkanals für die strahleninduzierte Zellschwellung und Apoptose zu studieren, wurde der Kanal inhibiert und der Einfluß auf das Zellvolumen und die Apoptoserate untersucht. Da das ORCC-Gen nicht kloniert ist, können nur pharmakologische Blocker angewendet werden. In diesen Experimenten wurde Glibenclamid in einer Konzentration von 100 µM verwendet, welche keinen Einfluß auf die Zellvitalität hat. Die Hemmung von ORCC reduzierte die strahlenvermittelte Zellschwellung um 80 %, während Glibenclamid allein das Zellvolumen nicht beeinflusste.

Die Volumenveränderung wurde durch FACS-Analyse des FSC gemessen (Abb. 37). Der Einfluß von Glibenclamid auf die Apoptose, ausgelöst durch ionisierende Strahlung, wurde durch Bestimmung der DNA-Fragmentation mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoe 33342 gemessen. Durch den Chloridkanalblocker war die strahlungsinduzierte Apoptose gehemmt (Abb. 37); Glibenclamid bewirkte eine Reduktion der Apoptoserate 32 h nach Bestrahlung auf 51 %, die bei Kontrollzellen bei 71 % lag. Die mittels der Video-Imaging-Technik erhobenen Ergebnisse stimmten mit den FSC/SSC-Resultaten überein. Andere Chloridkanalinhibitoren konnten in ihren wirksamen Konzentrationen nicht eingesetzt werden, da die Vitalität der Kontrollzellen beeinflusst wurde und diese deshalb für Apoptosetests nicht verwendet werden konnten.



**Abbildung 38:** Glibenclamid reduziert strahlenvermittelte Zellschwellung und DNA-Fragmentation.

- A. Das Balkendiagramm zeigt die Zellvolumina nach Bestrahlung, durchflußzytometrisch bestimmt unter Verwendung der FSC-Charakteristik. 15 minütige Vorinkubation mit 100  $\mu$ M Glibenclamid bewirkt keine Volumenänderung (Glib). Bestrahlung mit 10 Gy ruft eine deutliche Zellvolumenzunahme her, die durch die Vorbehandlung mit 100  $\mu$ M Glibenclamid um 80 % verringert wurde. Repräsentativ dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 10.000$ ) eines von vier unabhängigen Experimenten.
- B. Gemessen anhand der DNA-Fragmentation führt ionisierende Strahlung in Kontrollzellen (schwarze Linie) zu Apoptose, die durch Glibenclamid minimiert wird (graue Linie). Die Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt, mit Hoe 33342 gefärbt und der zeitliche Verlauf der Apoptoserate mit der Video-Imaging-Methode bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ).

Ausgehend von diesen Daten wird die Beteiligung des osmosensitiven Chloridkanals ORCC an der strahleninduzierten Zellschwellung propagiert. Bestrahlung führte zur Aktivierung der Tyrosinkinase p56<sup>lck</sup>, die alleine ORCC aktivieren kann. Es ist außerdem bekannt, daß diese Kinase den Kv1.3-Kanal, der hauptsächlich für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials verantwortlich ist, durch Phosphorylierung hemmt. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Kinase essentiell für die strahleninduzierte Zellschwellung ist, die durch Kanalinhhibitoren verhindert werden kann. Durch osmotische Vorbehandlung konnte die strahleninduzierte Zellschwellung verhindert werden, auf die strahlenvermittelte Apoptoseinduktion konnte kein hemmender Effekt hervorgerufen werden. Ionisierende Strahlung verursacht eine Veränderung der Ionenhomöostase. Ob dieses Verhalten ursächlich für die strahlenvermittelte Apoptose ist oder welcher genaue kausale Zusammenhang besteht, bedarf noch weiterer Untersuchungen.

## 4. Diskussion

### 4.1. *Die CD95-induzierte Inhibition des speicheroperierten Calciumkanals*

Die Erhöhung der intrazellulären freien Calciumkonzentration ist ein Schlüsselsignal der durch Antigenkontakt oder Crosslinking des T-Zellrezeptors induzierten T-Zellaktivierung (Lewis and Cahalan, 1995). Nach Stimulation des TZR-Komplexes werden eine Reihe von Tyrosinkinase aktiviert, was zu einer Aktivierung von Phospholipase C führt. PLC spaltet in der Plasmamembran lokalisiertes PIP<sub>2</sub> und bildet somit Diacylglycerol, welches den Ras-pathway aktiviert, und Inositoltriphosphat, das über den IP<sub>3</sub>-Rezeptor Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern (ER) freisetzt (Berridge, 1993). Durch die Speicherentleerung, die auch durch rezeptorunabhängige Stimuli wie TG und BAPTA hervorgerufen werden kann, werden CRAC-Kanäle geöffnet. Der genaue molekulare Mechanismus der Kanalaktivierung ist noch unbekannt (Putney, 1990). Der anhaltende Ca<sup>2+</sup>-Einstrom ist notwendig für die Aktivierung von Calmodulin/Calcineurin, die Translokation von NFAT in den Nucleus (Rao et al., 1997) und letztlich für die IL-2 Genexpression und Proliferation der T-Lymphozyten (Negulescu et al., 1994).

Eine angepaßte Regulation der Immunantwort erfordert eine kontrollierte Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten. Die CD95-vermittelte Apoptose spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle und Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz (Van Parijs and Abbas, 1998), Limitierung der peripheren Lymphozytenpopulation (Watanabe-Fukunaga et al., 1992) und der T-Zellzytotoxizität (Ju et al., 1994). Eine Störung dieser Kontrollmechanismen, beispielsweise des CD95L(Ligand)-CD95-Systems, führt zu Defekten des Immunsystems, unter anderem zu lymphoproliferativen Krankheiten, Autoimmunerkrankungen und Immundefizienzen.

Unabhängig von der Apoptoseinduktion beeinflusst CD95 die Lymphozytenfunktion durch Blockade des speichergesteuerten Ca<sup>2+</sup>-Einstromes durch CRAC-Kanäle, ohne den Füllungszustand intrazellulärer Speicher zu beeinflussen. Es werden Ca<sup>2+</sup>-abhängige Signale der Lymphozytenaktivierung unterdrückt. Dies stellt einen Mechanismus dar, der es CD95L<sup>+</sup>-Tumoren, beispielsweise dem Glioblastom, ermöglicht, die zelluläre Immunantwort auszuschalten.

Das Membranpotential sowie Inhibitoren des CRAC-Kanals besitzen potente Effekte auf den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in T-Zellen und dadurch wichtige Konsequenzen für die T-Zellantwort, da das Ca<sup>2+</sup>-Signal in Immunzellen essentiell für deren Proliferation und Aktivierung ist. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Modulation des Ca<sup>2+</sup>-Einstromes via CRAC-Kanäle untersucht. Die Experimente waren auf die modulatorische Rolle von Sphingolipiden, Sphingosin und

Ceramid fokussiert, die durch die Aktivierung des Enzyms ASM mittels CD95-Stimulation und Hydrolyse von Membransphingomyelin generiert werden. Weiterhin wurde die Funktion von Mitochondrien im Zusammenhang mit dem CD95-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Block und die Beteiligung von osmosensitiven Anionenkanälen am Plasmamembranpotential und somit am  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal untersucht.

#### 4.1.1. Die Rolle von Sphingomyelinmetaboliten – Sphingolipide und Ceramid – beim CRAC-Block

Bereits kurze Zeit nach der Stimulation des CD95-Rezeptors kommt es zur Ausbildung von CD95-Rezeptoraggregaten (Grassme et al., 2001) und zur Aktivierung und Translokation der ASM von intrazellulären Kompartimenten auf die Außenseite der Zelle über einen nicht genau bekannten Mechanismus. In den sphingolipidreichen Rafts sorgt sie für die lokale Freisetzung von Ceramid und seines Metaboliten Sphingosin.

Ein durch Sphingomyelinmetabolite induzierter Block des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes wurde bereits in T-Zellen, Mastzellen und Schilddrüsenzellen beschrieben (Breitmayer et al., 1994; Mathes et al., 1998; Tornquist et al., 1999). Mathes et al. (1998) untersuchten die Effekte verschiedener Sphingolipide auf Mastzellen. Der durch Sphingolipide vermittelte Block des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes war mit einer Zunahme der Ganzzellkapazität verbunden. Dies läßt den Rückschluß zu, daß die Lipidmoleküle in der Plasmamembran akkumulieren und direkt den CRAC-Kanal hemmen. Desweiteren konnte von dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß der Ceramidmetabolit Sphingosin den CRAC-Kanal in einem stärkeren Ausmaß hemmt als  $\text{C}_2$ -Ceramid. In einer Schilddrüsenzelllinie konnte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom via CRAC sowohl durch  $\text{C}_2$ - und  $\text{C}_6$ -Ceramid als auch durch Sphingomyelinase blockiert werden (Tornquist et al., 1999).

In Übereinstimmung mit den von Mathes et al. in Mastzellen gefundenen Daten konnte ich in dieser Arbeit in Lymphozyten zeigen, daß Sphingosin, das durch die Spaltung von Ceramid mittels einer Ceramidase generiert wird, einen potenteren hemmenden Effekt auf den CRAC-Kanal ausübt als  $\text{C}_2$ -Ceramid. Wie die Sphingomyelinmetaboliten den Block des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals induzieren, ist noch nicht geklärt. Eine wichtige Voraussetzung zur Identifikation des molekularen Angriffspunktes von Sphingosin und Ceramid ist die Klonierung und Expression des Kanalgens sowie eine genetische Manipulation der Ceramidase.

Bemerkenswert ist, daß in B-Zellen von Patienten mit Niemann-Pick-Krankheit der genetische ASM-Defekt die Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes nach CD95-Stimulation verhindert. Die ASM und die Bildung von Ceramid und seines Metaboliten Sphingosin sind an der CD95-vermittelten CRAC-Blockade beteiligt.

#### 4.1.2. Die Bedeutung der Mitochondrien für die Blockade des CRAC-Kanals

Zur Klärung der Frage, ob Mitochondrien ein entscheidendes Schlüsselement für die Regulation der CD95-induzierte Blockade des CRAC-Kanals sind, wurde neben pharmakologischer Beeinflussung der Mitochondrien ein genetisches Modell erstellt. Bcl-2-überexprimierende Zellen mit unterschiedlicher subzellulären Lokalisation des Proteins erlauben, die CD95-vermittelte Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes in den Mutanten zu vergleichen. Die im Rahmen dieser Arbeit mit mitochondrialen Hemmstoffen und Bcl-2 Mutanten durchgeführten Experimente sollten Aufschluß darüber geben, inwieweit eine Beeinflussung des  $\Delta\Psi_m$  in die CD95-vermittelte CRAC-Blockade eingreift.

Wie schon früher beschrieben wurde, nehmen Mitochondrien eine wichtige Rolle bei der Regulation des speichergesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals ein, indem sie einströmendes  $\text{Ca}^{2+}$  abpuffern und redistributieren, um anhaltend eine erhöhte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  für die Induktion der IL-2-Synthese aufrechtzuerhalten (Hoth et al., 1997). Mitochondrien, die in räumlicher Nähe des CRAC-Kanals lokalisiert sind, verhindern durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme dessen Akkumulation in der Porenregion des Kanals und dadurch die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Inaktivierung (Hoth et al., 2000). Wird die Triebkraft für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme, das negative  $\Delta\Psi_m$ , durch Depolarisation der Mitochondrienmembran aufgehoben, kann dies über einen negativen Feedback-Mechanismus zur Selbstinaktivierung des CRAC-Kanals führen. In whole-cell Experimenten konnte die durch den Zusammenbruch des  $\Delta\Psi_m$  hervorgerufene Kanalinaktivierung durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator EGTA in der Intrazellulärlösung verhindert werden. Eine erniedrigte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , hervorgerufen durch den blockierten Einstrom oder die gehemmte mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, ist unter anderem assoziiert mit einer verringerten Translokation des Kernfaktors NFAT in den Nucleus (Hoth et al., 2000). Für ligandengesteuerte (Budd and Nicholls, 1996a) und spannungsgesteuerte (Budd and Nicholls, 1996b)  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in kardialen Zellen wurde bereits eine Verhinderung der Kanalinaktivierung aufgrund einer mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme gezeigt.

Durch den Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  werden innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereichs mitochondriale Enzyme wie Dehydrogenasen hochreguliert und aktiviert (Maechler and

Wollheim, 2000; Rutter et al., 1996), die Produktion der Reduktionsäquivalente NADH oder NADPH wird erhöht (Rizzuto et al., 1994) und somit die ATP-Produktion an die gesteigerten Bedürfnisse der T-Zellaktivierung angepaßt. Di Lisa et al. (1993) konnten in Hamstern mit nachgewiesener Kardiomyopathie demonstrieren, daß die Reduktion der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme mit einer graduellen Verschlechterung des Energiestatus einhergeht.

Diese Beobachtungen sprechen für die signifikante Rolle der Mitochondrien u. a. bei der T-Zellaktivierung.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß die Depolarisation der Mitochondrienmembran 1 h nach Stimulation des CD95-Rezeptors beginnt und der CD95-induzierte Block des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes im zeitlichen Einklang mit dem Zusammenbruch des  $\Delta\Psi_m$  beobachtet werden kann. Mitochondriale Hemmstoffe, Antimycin A1 und Oligomycin, welche die Mitochondrienmembran depolarisieren, hemmten den TG-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. In mit CD95-AK vorbehandelten Jurkat Zellen konnte durch Antimycin A1 und Oligomycin keine additiver Effekt auf den blockierten CRAC-Kanal ausgeübt werden. Diese Ergebnisse bestätigen die dieser Arbeit zugrundeliegende These, daß die CD95-induzierte Blockade des kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes über den Zusammenbruch des  $\Delta\Psi_m$  vermittelt wird. Desweiteren wurde diese Arbeitsthese durch die mit Cyclosporin A erhaltenen Daten bekräftigt. CsA konnte den CD95-hervorgerufenen Block des CRAC-Kanals unterdrücken. Die Tatsache, daß der protektive Effekt nur in einer Teilpopulation ausgeübt werden konnte, liegt vermutlich daran, daß das Öffnen der Pore durch die Vorbehandlung mit CsA aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität nicht in allen Zellen verhindert werden konnte. Seine Wirkung entfaltet CsA durch Bindung an das mitochondriale Cyclophilin D, welches mit ANT einen CsA-sensitiven Ionenkanal bildet und an der Regulation der PTP beteiligt ist (Susin et al., 1998; Beutner et al., 1998).

Mitochondriale Depolarisation stellt auch einen wichtigen Schritt bei der CD95-induzierten Apoptose dar. In Typ II Zellen, zu denen die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Jurkat Zellen zählen, ist nach CD95-Rezeptor-Stimulation nur eine geringe Menge Caspase-8 aktiviert. Über die mitochondriale Verstärkerschleife werden nach dem Zusammenbruch des  $\Delta\Psi_m$  verschiedene Caspasen aktiviert, darunter auch Caspase-8 (Scaffidi et al., 1998) und der apoptotische Effekt amplifiziert. Durch Überexpression des Onkoproteins Bcl-2, von welchem bekannt ist, daß es das Öffnen der PTP (Shimizu et al., 1996) und die Freisetzung von Cytochrom C (Kluck et al., 1997) verhindert, kann in Typ II Zellen die CD95-induzierte Apoptose unterdrückt werden. Es wird vermutet, daß Bcl-2 die PTP-Öffnung verhindert indem es mit dem proapoptotischen Protein Bax interagiert, der genaue Mechanismus ist jedoch unklar (Antonsson et al., 1997).

Zur Bestätigung der bisherigen Arbeitshypothese, daß Depolarisation der Mitochondrienmembran für die CD95-vermittelte Blockade des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes verantwortlich ist, wurden fünf Bcl-2-Mutanten mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation (VC, WT, ActA, Cb5 und  $\Delta\text{TM}$ ) verwendet.

Die Überexpression des Bcl-2-Proteins wurde durch Western Blotting und die Lokalisation des Proteins durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Die Mitochondrien wurden dabei mit einem mitochondrialen Farbstoff Mitotracker Orange sichtbar gemacht, das Bcl-2-Protein und die SERCA-ATPase mit Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern gefärbt. Die mitochondriale Depolarisation wurde durch FACS-Analyse und die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mittels FACS-Analyse und Fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die Bcl-2-Mutanten WT und ActA den CD95-induzierten Zusammenbruch des  $\Delta\Psi_m$  und die Blockade des CRAC-Kanals verhindern konnten und dadurch vor einer Unterdrückung der Lymphozytenaktivierung schützen können. In den Bcl-2 Cb5 Mutanten konnte nur ein geringer Effekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kaskade beobachtet werden, während im Zytosol lokalisiertes Bcl-2 keine Auswirkung auf das  $\Delta\Psi_m$  und den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom hatte. Die dargestellten Ergebnisse erlauben folgende Schlüsse. Bcl-2 WT und Bcl-2 Acta erniedrigen durch die Aufrechterhaltung der Triebkraft für die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme lokal die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in der Porenregion des CRAC-Kanals und verhindern die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Inaktivierung. Außerdem interferieren Mitochondrien mit dem am ER lokalisierten  $\text{Ca}^{2+}$ -release Kanal, der ähnlich wie der speichergesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal einen von der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -abhängigen Regulationsmechanismus besitzt und über diesen reguliert wird. Mitochondrien entfernen  $\text{Ca}^{2+}$  in der Nähe des  $\text{IP}_3$ -regulierten endoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals und lösen dadurch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomäne an der Kanalmündung auf (Jouaville et al., 1995). In Abwesenheit der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme steigt die lokale  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  am  $\text{IP}_3$ -sensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal. Bei erhöhter  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nimmt die Empfindlichkeit des Kanals gegenüber  $\text{IP}_3$  ab (Broad et al., 1999). Die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals wird verringert und kann über den speicherabhängigen Rückkopplungsmechanismus zur Blockade des CRAC-Kanals führen. Zimmermann et al. (2000) zeigte, daß in permeabilisierten Zellen eine  $\text{IP}_3$ -vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER nur in Gegenwart von intakten energiereichen Mitochondrien hervorgerufen werden konnte.

Mitochondrien und die SERCA-ATPasen des ER stellen zwei wichtige Mechanismen zur Entfernung des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  dar, die sich funktionell antagonisieren können. Aus dem ER freigesetztes  $\text{Ca}^{2+}$  wird durch SERCA-ATPasen sequestriert, um somit zu verhindern, daß die endoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration einen Wert unterschreitet, der eine suffiziente CRAC-Kanalaktivierung auslöst. Wird nun ein Teil des freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$  von den Mitochondrien aufgenommen, wird dieses von den endoplasmatischen Pumpen und der ER-

Wiederauffüllung entfernt, das ER entleert und eine suffiziente CRAC-Kanalaktivierung hervorgerufen (Gilibert and Parekh, 2000). Dieses wird durch die Beobachtung von Csordas und Hajnoczky (2001) bestätigt, daß in Mastzellen nahezu jedes Mitochondrium einen Bereich besitzt, der sich in der Nähe von endoplasmatischen SERCA-Pumpen befindet. Außerdem konnte nachgewiesen werden, daß die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme die Empfindlichkeit des endoplasmatischen  $\text{IP}_3$ -Rezeptors für  $\text{IP}_3$  verringert, d. h. mit Energie angereicherte Mitochondrien erniedrigen die  $\text{IP}_3$ -Schwellenkonzentration, die benötigt wird um CRAC-Kanäle zu öffnen (Gilibert et al., 2001). Dies sind weitere Indizien für die enge Verknüpfung von Mitochondrien und  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalkaskade.

Der in Bcl-2 Cb5 beobachtete Effekt läßt sich durch die von He et al. (1997) beschriebene Regulation der endoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme über einen durch Bcl-2 gebildeten Kationenkanal erklären. Diese Theorie wird durch die Beobachtungen unterstützt, daß Bcl-x<sub>L</sub> Ähnlichkeiten mit einem porenformenden bakteriellen Toxin besitzt (Muchmore et al., 1996) und in künstlichen Lipiddoppelmembranen Ionenkanäle mit geringer Selektivität formt (Minn et al., 1997). Bcl-2 Cb5 kann ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck verursachen und über die verringerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im ER mit dem speicherabhängigen Inaktivierungsmechanismus des kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes interferieren (Pinton et al., 2000).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Stimulation des CD95-Rezeptors den TG-induzierten speichergesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom blockiert, indem es die Mitochondrienmembran depolarisiert, die Triebkraft für die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme zerstört und über verschiedene negative Rückkopplungsmechanismen den CRAC-Kanal inhibiert. Dadurch werden wichtige  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalwege wie die Proliferation unterdrückt.

## **4.2. Regulation schwellungsinduzierter Chloridkanäle**

Chloridkanäle sind an der Regulation des Zellvolumens und der Zellteilung, an der Steuerung der Apoptose und an der epithelialen Flüssigkeitssekretion beteiligt. Eine wichtige pathophysiologische Rolle spielen sie bei der Cystischen Fibrose. In dieser Arbeit konnte erstmals ein alternativer Aktivierungsmechanismus zur Aktivierung des ORCC durch Tyrosinphosphorylierung gezeigt werden, der auch in Lymphozyten mit CF-Defekt intakt ist.

### **4.2.1. Regulation des osmosensitiven Chloridkanals durch Tyrosinphosphorylierung**

Für die Beteiligung von Phosphorylierungsreaktionen an der Aktivierung von Chloridkanälen nach osmotischer Stimulation sprechen mehrere Beobachtungen: Mittels der Patch-clamp-Technik durchgeführte pharmakologische Untersuchungen mit Tyrosinkinasehemmstoffen bestätigten eine Involvierung von Tyrosinkinasen an der Chloridkanalaktivierung. Tilly et al. (1993) zeigten, daß die Inhibition der Tyrosinphosphorylierung den durch Zellschwellung ausgelösten  $^{125}\text{I}$ -Efflux in humanen intestinalen Zellen verhindert und Zellschwellung Tyrosinphosphorylierung induziert. Weiterhin wurde gezeigt, daß in Lymphozyten die Tyrosinkinase p56<sup>lck</sup> durch hypoosmotische Volumenzunahme transient aktiviert wird (Lepple-Wienhues et al., 1998). Eine Hemmung des schwellungsaktivierten Chloridkanals durch Hemmstoffe der Tyrosinkinase wie Genistein und Herbimycin A wurde bereits für Herzmuskelzellen (Sorota, 1995) und bovine Endothelzellen (Voets et al., 1998) gezeigt. In humanen Lymphozyten wurden unter Verwendung der Inhibitoren für Tyrosinkinasen der src-Familie und einer genetisch p56<sup>lck</sup> defizienten Jurkatzelllinie ein vergleichbares Verhalten nachgewiesen und auf die Involvierung einer bestimmten Tyrosinkinase hingewiesen (Lepple-Wienhues et al., 1998). Szabò et al. (1998) zeigte bereits eine Chloridkanalaktivierung durch Zugabe von p56<sup>lck</sup> auf der Zellsinnenseite in der excised-patch Konfiguration.

Intrazelluläres ATP ist notwendig um eine anhaltende und wiederholte Aktivierung des Chloridkanals zu gewährleisten (Lewis et al., 1993; Ross and Cahalan, 1995). Eine entsprechende ATP-Abhängigkeit wurde für eine Reihe anderer endothelialer und epithelialer Zellen beschrieben (Jackson et al., 1996; Meyer and Korbmayer, 1996; Oiki et al., 1994). Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung enzymatischer Vorgänge bei der Regulation des volumensensitiven Anionenkanals ist die beschriebene Temperaturabhängigkeit (Schwiebert et al., 1994).

Da zwischen der schwellungsinduzierten Zelloberflächenzunahme und der Aktivierung der Chloridleitfähigkeit eine zeitliche Verzögerung von etwa 60 Sekunden zu beobachten ist (Lewis et al., 1993), ist eine direkte mechanische Kanalaktivierung unwahrscheinlich. Die von Levitan et al. (1995) durchgeführten Untersuchungen, daß F-Aktin den Chloridkanal modulieren, jedoch nicht aktivieren kann, bekräftigen diese Interpretation.

Garber et al. (1992) beschreiben in Lymphozyten einen auswärtsrektifizierenden DIDS-sensitiven Chloridkanal mit einer Einzelkanalleitfähigkeit von 40 – 50 pS, der durch Membranexzision aktiviert werden kann. Die Leitfähigkeit, die mittels stationärer Rauschanalyse ermittelt wurde, liegt bei etwa 1 pS (Doroshenko and Neher, 1992; Lewis et al., 1993). Diese Diskrepanz läßt sich durch die langen Offenzustände mit minimalem Kanal gating volumenaktivierter Chloridkanäle in Epithelzellen erklären (Meyer and Korbmacher, 1996).

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten ließ sich die Aktivierung eines auswärtsrektifizierenden Chloridkanals mit einer Einzelkanalleitfähigkeit von 25 und 28 pS durch  $p56^{lck}$  selbst bei einer deutlich hypotonen Intrazellulärlösung nachweisen. Dieser unterscheidet sich nicht von dem schwellungsaktivierten Chloridkanal. Die aufgezeichneten Ströme zeigen keine spannungsabhängige Inaktivierung, eine klare Auswärtsrektifizierung, eine Hemmbarkeit durch DIDS (500  $\mu$ M) und eine deutliche Selektivität für Chlorid. Zur Bestimmung des exakten Zielproteins der Tyrosinphosphorylierung muß der Kanal identifiziert und kloniert werden.

Aufgrund des defekten Regulationsmechanismus von auswärtsrektifizierenden Chloridkanälen bei Cystischer Fibrose (Gabriel et al., 1993) lag es nahe, die Involvierung von CFTR in diesem  $p56^{lck}$ -vermittelten Aktivierungsmechanismus zu untersuchen.

#### 4.2.2. Alternativer Aktivierungsmechanismus auswärtsrektifizierender Chloridkanäle bei Cystischer Fibrose

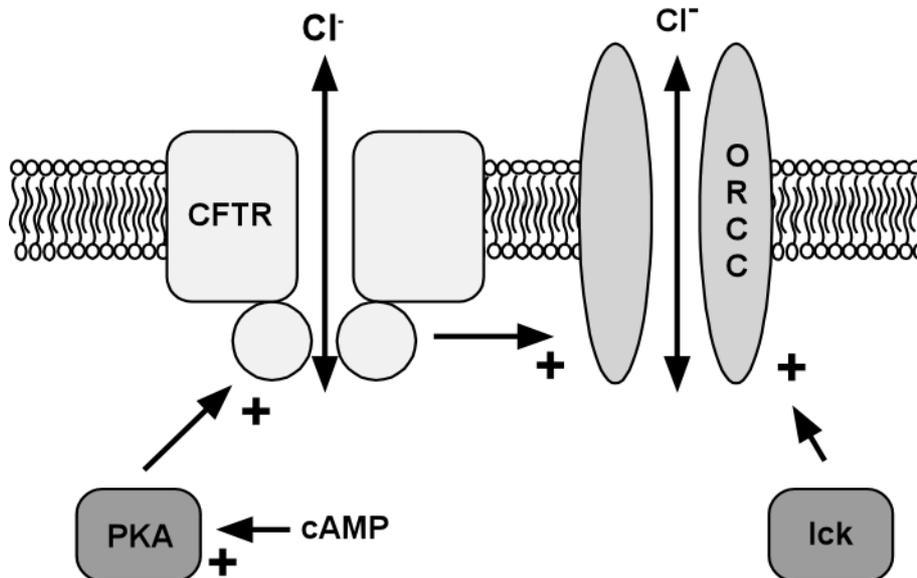
Bei der Cystischen Fibrose ist die Regulation von vorhandenen Chloridkanälen defekt. In Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung wiesen Bear et al. (1992) nach, daß CFTR ein Chloridkanal ist, der zur Klasse der ATPase bindenden Cassettentransportern, den sogenannten ABC-Transportern, gehört (Anderson and Welsh, 1992). Das Protein besitzt eine regulatorische Domäne, die Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase A (PKA) und die Proteinkinase C (PKC), und eine ATP hydrolisierende Bindungsstelle (Hwang et al.,

1994; Jia et al., 1997). Die Tatsache, daß es sich bei CFTR und ORCC um zwei unterschiedliche Kanäle handelt, einen durch cAMP aktivierbaren und einen durch Depolarisierung aktivierbaren Kanal, wurde von Cliff and Frizzell (1990) in Epithelien nachgewiesen. Daß es sich bei CFTR und den osmosensitiven Chloridkanälen um unterschiedliche Proteine handelt, wurde durch den Nachweis von Gabriel et al. (1993) erbracht. Es konnte gezeigt werden, daß CFTR knock-out Mäuse intakte, nicht durch cAMP stimulierbare, auswärtsrektifizierende Chloridkanäle besitzen. Untersuchungen an CFTR exprimierenden epithelialen Zellen zeigten, daß das Protein andere Kanäle reguliert. Dazu zählen der auswärtsrektifizierende Chloridkanal (ORCC), der amiloridsensitive Natriumkanal (ENaC) und ein einwärtsrektifizierender Kaliumkanal (ROMK) (Hryciw and Guggino, 2000). Für den Aktivierungsmechanismus von ORCC durch CFTR postulierten Schwiebert et al. (1995) folgendes Modell. Nach Stimulation durch cAMP und damit über PKA-Aktivierung entwickelt CFTR eine ATP-Leitfähigkeit. Der ATP-Efflux aktiviert purinerge P2-Rezeptoren derselben Zelle, was entweder durch einen direkten Kopplungsmechanismus oder durch einen G-Protein-gekoppelten Prozeß zur Aktivierung von auswärtsrektifizierenden Chloridkanälen führt. Dadurch kann die Chloridsekretion gesteigert werden. ORCC könnte somit eine tragende Funktion zukommen, da sie in Zellen mit CF-Defekten exprimiert werden und nur der Regulationsmechanismus gestört ist (Welsh et al., 1989).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diese Modellvorstellungen (Abb. 39) und zeigen erstmals einen alternativen Aktivierungsmechanismus in CF-Lymphozyten auf. In den Lymphozyten gesunder Spender konnten durch cAMP auswärtsrektifizierende Chloridströme aktiviert werden, welche in Lymphozyten von CF Patienten unter denselben Bedingungen nicht stimuliert werden konnten. Nach osmotischer Zellschwellung entwickelte sich in CF-Lymphozyten ein Chloridstrom, der in seinen Eigenschaften von dem in Kontrollzellen beobachteten Strom nicht zu unterscheiden war. Intaktes CFTR ist also keine obligate Voraussetzung für die ORCC-Aktivierung. Dies legt die Vermutung nahe, daß ein alternativer Chloridkanalaktivierungsweg existiert. In den hier gezeigten Versuchen wurden auswärtsrektifizierende Chloridkanäle mittels  $p56^{lck}$  in CF-Lymphozyten stimuliert, die sich in den Strömen von Lymphozyten gesunder Spender nicht unterscheiden. Somit kann der defekte Aktivierungsmechanismus über cAMP, PKA und CFTR umgangen werden.

Dieser CFTR unabhängige Mechanismus zur Aktivierung von auswärtsrektifizierenden Chloridkanälen bietet potentiell einen neuen therapeutischen Ansatz bei Cystischer Fibrose, die Chloridsekretion über einen intakten alternativen Mechanismus zu aktivieren. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist, daß bei CFTR knock-out Mäusen keine Erkrankung der Atemwege zu beobachten ist. Li et al. (1998a) haben bereits gezeigt, daß

auswärtsrektifizierende Chloridkanäle und src-Tyrosinkinasen in Epithelzellen exprimiert werden, so daß die Stimulation der  $p56^{\text{lck}}$  eine Möglichkeit darstellt, auswärtsrektifizierende Chloridkanäle und somit die Chloridsekretion zu stimulieren.



**Abbildung 39:**

Modellvorstellung des alternativen von CFTR unabhängigen Aktivierungsmechanismus auswärtsrektifizierender Chloridkanäle durch  $p56^{\text{lck}}$ .

### **4.3. Proliferative Wirkung des auswärtsrektifizierenden Chloridkanals**

Die Untersuchung des Wirkspektrums des auswärtsrektifizierenden Chloridkanals in Lymphozyten zeigte, daß dieser Kanal neben seiner Funktion als Volumenregulator bei der regulatorischen Volumenabnahme auch am proliferativen Signal in Lymphozyten beteiligt sein kann.

Eine wichtige Voraussetzung für die Lymphozytenproliferation mit IL-2-Synthese ist der speichergesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch CRAC-Kanäle. Durch Hemmung dieses Einstromes können  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signale wie die Lymphozytenaktivierung unterdrückt werden.

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch den CRAC-Kanal hängt vom Membranpotential ab. Das Membranpotential und somit der elektrische Gradient für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom wird in Lymphozyten vorwiegend von spannungsabhängigen Kaliumkanälen und damit von der Kaliumleitfähigkeit erzeugt. Durch die Expression  $\text{Ca}^{2+}$ -gesteuerter Kaliumkanäle wird das Membranpotential an die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  gekoppelt. Depolarisation reduziert die Triebkraft für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und daraus folgernd verhindern Kaliumkanalblocker oder eine hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige T-Zellaktivierung (Leonard et al., 1992). In Tierversuchen wurde der Kv1.3-Blocker Margatoxin bereits erfolgreich als Immunsuppressivum getestet (Koo et al., 1997). Neben Kaliumkanälen wird über die Beteiligung von Chloridkanälen am lymphozytären Membranpotential diskutiert. Da extrazellulär ein höhere Chloridkonzentration vorliegt, sind sie potentiell in die Aufrechterhaltung eines negativen Membranpotentials involviert. In Mitogenassays wurde gezeigt, daß Chloridkanalblocker (DIDS, NPPB, Flufenaminsäure und IAA) die T-Zellaktivierung inhibieren (Schumacher et al., 1995). Sowohl frühe Ereignisse der T-Zellaktivierung als auch spätere Ereignisse der Proliferation scheinen von der Funktionsfähigkeit der Chloridkanäle abhängig zu sein (Phipps et al., 1996).

Die Experimente hinsichtlich des Einflusses des auswärtsrektifizierenden Chloridkanals auf das Plasmamembranpotential und den speichergesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom im Rahmen dieser Dissertation zeigten deutlich, daß die Blockade der  $\text{Cl}^-$ -Kanäle zu einer Depolarisation des PMP und zur Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes führt. Die durch Chloridkanalblocker induzierte Depolarisation und  $\text{Ca}^{2+}$ -Blockade ist vergleichbar mit den durch hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration hervorgerufenen Effekten. Diese Beobachtungen lassen die Schlußfolgerung zu, daß Chloridkanäle über die Beteiligung am Membranpotential mit dem speichergesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und den  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalen in T-Zellen interferieren.

Ein weiterer Mechanismus, wie Chloridkanalblocker die Lymphozytenproliferation verhindern können, liegt in ihrer Permeabilität für Hydrogencarbonat. Chloridkanalblocker können eine zytosolische Ansäuerung induzieren, da metabolisch generierte Protonen nicht durch einströmendes Hydrogencarbonat abgepuffert werden können, und dadurch Phosphorylierungsreaktionen und Tyrosinkinaseaktivierung pH-abhängig verhindern (Phipps et al., 1996).

#### **4.4. Einfluß des schwellungsaktivierten Chloridkanals auf strahleninduzierte Zellschwellung und Apoptose**

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes, die mit Zellvolumenabnahme assoziiert wird. Ichiki et al. (1994) konnten zeigen, daß in Abhängigkeit des Zelltyps Bestrahlung zu unterschiedlichen Veränderungen des Zellvolumens und des Membranpotentials führt. In B-Lymphozyten konnte nach dem Kontakt mit ionisierender Strahlung eine Zellschwellung beobachtet werden (Ashwell et al., 1986). Es existiert ein Repertoire an Plasmamembrantransportern und Ionenkanälen, die für die Volumenregulation in Säugetierzellen verantwortlich sind (Gomez-Angelats et al., 2000). Dies beinhaltet einen  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter, einen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter, der an einen  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher gekoppelt ist und einen  $\text{Na}^+$ -abhängigen Osmolyttransporter. Neben diesen durch RVI (regulatory volume increase) aktivierbaren gibt es durch hypotonen Stress auslösbare Mechanismen. Dazu gehört der  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Verlust, der durch einen  $\text{K}^+/\text{H}^+$ -Austauscher, der an einen  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher gekoppelt ist, einen  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter und über Kalium- und Chloridkanäle (ORCC) getriggert wird (Gomez-Angelats et al., 2000).

Diese Arbeit zeigt, daß ionisierende Strahlung zur ausgeprägten Zellschwellung führt. Die Tyrosinkinase  $\text{p56}^{\text{lck}}$ , die durch Bestrahlung aktiviert wird, besitzt sowohl bei der CD95-vermittelten als auch bei der strahlungsinduzierten Apoptose eine regulatorische Rolle und wird für die Volumenzunahme benötigt. Der auswärtsrektifizierende Chloridkanal, der durch Tyrosinphosphorylierung stimuliert werden kann, scheint an der Zellschwellung beteiligt zu sein. Bei der ORCC-Hemmung durch Glibenclamid (Rabe et al., 1995), das auch die in Lymphozyten nichtexprimierten ATP-sensitiven Kaliumkanäle hemmt, ist eine Reduktion der strahleninduzierten Zellschwellung und der Apoptoserate zu beobachten.

Ionisierende Strahlung führte in Lymphozyten zur Aktivierung der Tyrosinkinase  $\text{p56}^{\text{lck}}$ . Diese Kinase kann den spannungsgesteuerten Kaliumkanal (Kv1.3), der in Lymphozyten für die Erhaltung des Plasmamembranpotentials verantwortlich ist, durch Phosphorylierung des Kanalproteins inhibieren. Diese Kanalblockade kann eine Depolarisation der Plasmamembran auslösen und somit die Triebkraft für einen Anioneneinstrom durch den ebenfalls durch die Tyrosinkinase aktivierten ORCC bereitstellen. Der Chlorideinstrom und der begleitende Wasserinflux kann zur Schwellung führen.

Bei der durch hypotonen Streß ausgelösten Volumenzunahme erfolgt die Gegenregulation durch einen  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Efflux, wobei dem Kaliumausstrom eine wichtige Rolle zukommt. Da in Lymphozyten im wesentlichen der Kv1.3 für die Kaliumleitfähigkeit verantwortlich ist (Grinstein et al., 1984) und dieser durch Phosphorylierung gehemmt werden kann, könnte

dadurch nach Zellschwellung eine gegenregulatorische Volumenabnahme mittels Kaliumausstrom entlang des elektrochemischen Gradienten verhindert werden.

CD95-induzierte Apoptose ist mit zellulärer Ansäuerung assoziiert (Gottlieb et al., 1996), die durch Glibenclamid wie durch pharmakologische Hemmung der src-Tyrosinkinasen mit Herbimycin A verhindert werden kann (Szabo et al., 1998). Nach Bestrahlung war auch eine mittels Durchflußzytometrie gemessene intrazelluläre Ansäuerung zu beobachten. ORCC könnte teilweise an diesem Prozeß durch Bicarbonatefflux beteiligt sein (Szabo et al., 1998). Die daraus resultierende intrazelluläre Azidifizierung kann Endonukleasen aktivieren, die für den Chromatinabbau während der Apoptose verantwortlich sind und das durch ionisierende Strahlung aktivierte Apoptoseszenario amplifizieren. Liu et al. (2000) zeigten, daß der mitochondrialen Cytochrom C-Freisetzung eine intrazelluläre Ansäuerung vorangehen muß. Cytochrom C ist an der Apoptosombildung und an der Aktivierung von Caspase-3, welche abbauende Enzyme aktiviert, beteiligt. Segal and Beem (2001) untersuchten den Einfluß des intrazellulären pH auf die Cytochrom C-vermittelte Caspase-3-Aktivität. Alkalische Bedingungen verhindern die Aktivierung von Caspase-3, haben jedoch kaum einen Effekt auf bereits vorherrschende Caspase-3-Aktivität. Vermutlich wirkt sich der pH auf vorangehende Aktivierungsschritte des Enzyms wie die Bildung des Apoptosoms oder der Aktivierung von Caspase-9 aus. Der intrazelluläre pH scheint über die Modulation der Caspasenaktivierung mit der Apoptose zu interferieren.

## 5. Zusammenfassung

Ionenkanäle in Lymphozyten regulieren eine Reihe von fundamentalen Zellfunktionen. Veränderungen der intrazellulären Ionenkonzentration und damit Aktivitätsänderungen von Ionenkanälen spielen eine wichtige Rolle und sind kennzeichnend für zelluläre Prozesse wie Apoptose und Proliferation.

Die hier vorgelegte Arbeit hatte zum Ziel, mit Hilfe verschiedener Techniken den Mechanismus zu untersuchen, der dem CD95-induziertem CRAC-Block zugrundeliegt. Als Zellmodell dienten dabei Bcl-2 überexprimierende Jurkat Zellen. Es konnte gezeigt werden, daß die Blockade des kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes über CRAC-Kanäle via Depolarisation der Mitochondrienmembran vermittelt wird. Die Triebkraft der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme wird durch den Zusammenbruch des  $\Delta\Psi_m$  zerstört und durch lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation über negative Rückkopplungsmechanismen der CRAC-Kanal inaktiviert. Diese Ergebnisse unterstreichen die immunmodulatorische Rolle des CD95-Rezeptors neben seiner Rolle bei der Apoptose.

Beispielsweise zeigen lpr-Mäuse, mit einem Defekt im CD95-Rezeptor eine erhöhte Abstoßungsreaktion nach Transplantation von  $\text{CD95L}^+$ -Melanomzellen verglichen mit gld-Mäusen, die einen defekten Liganden exprimieren (Hahne et al., 1996). Transplantiertes Hodengewebe von gld-Mutanten wird schneller abgestoßen als von Wildtypmäusen mit einem intakten CD95L (Bellgrau et al., 1995). Diese Beobachtungen veranschaulichen die Rolle von CD95 für die Immuntoleranz.

In T-Lymphozyten von Glioblastompatienten, einem CD95L-exprimierenden malignen Tumor, wurde die Hemmung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Signale beobachtet (Morford et al., 1997). Die Beobachtungen der CD95-induzierten CRAC-Blockade bieten eine Erklärung für diese Befunde.

Die CD95-induzierte Suppression der T-Zellaktivierung stellt einen wichtigen Ansatzpunkt dar für die therapeutischen Möglichkeiten zur Unterdrückung der Immunevasion von Tumoren, zur Steigerung der Effizienz von Impfungen gegen Tumorantigene und für die gezielte Immunsuppression bei Organtransplantationen.

Der zweite Teil der Arbeit befaßte sich mit auswärtsrektifizierenden Chloridkanälen, die eine wesentliche Funktion bei der Zellvolumenregulation besitzen. Ein wichtiges Element in der Aktivierung auswärtsrektifizierender Chloridkanäle stellt die Tyrosinkinase  $\text{p56}^{\text{lck}}$  dar, durch die diese Kanäle aktiviert werden können. Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen auswärtsrektifizierenden Chloridkanälen und dem CFTR-Protein zeigte sich, daß

die Aktivierung der auswärtsrektifizierenden Chloridkanäle in Lymphozyten von CF Patienten durch die p56<sup>lck</sup> intakt war. Dies stellt in Zellen mit einem CF Defekt einen alternativen von intaktem CFTR Protein unabhängigen Aktivierungsweg auswärtsrektifizierender Chloridkanäle zu dem bei Cystischer Fibrose gestörten Regulationsmechanismus via cAMP dar. Der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Aktivierungsweg trägt zum Verständnis des noch nicht geklärten Gesamtmechanismus der Regulation auswärtsrektifizierender Chloridkanäle bei. In Bezug auf einen neuen therapeutischen Ansatz zur Erhöhung der Chloridleitfähigkeit bei Cystischer Fibrose ist die Umgehung des defekten Aktivierungsmechanismus von großer Bedeutung.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß auswärtsrektifizierende Chloridkanäle den lymphozytären Ca<sup>2+</sup>-Einstrom durch CRAC-Kanäle mitsteuern, indem sie das Membranpotential, die elektrische Triebkraft, beeinflussen, und somit mit Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Signalen wie T-Zellaktivierung interferieren können. Daneben sind auswärtsrektifizierende Chloridkanäle auch an der strahleninduzierten Zellschwellung und Apoptose beteiligt. Es kann angenommen werden, daß durch Chloridkanalaktivierung via p56<sup>lck</sup> Chloridionen- und Wasserinflux zur Volumenzunahme führen. Zusätzlich sind sie an der Regulation des pH beteiligt. Der kausale Zusammenhang zwischen strahlenvermittelter Zellschwellung und Apoptose ist noch unklar. Zu dieser Fragestellung bedarf es noch weiteren Untersuchungen.

## 6. Literaturverzeichnis

Ackerman, M. J., Wickman, K. D., and Clapham, D. E. (1994). Hypotonicity activates a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 103, 153-79.

Adams, J. M., and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.

Anderson, M. P., and Welsh, M. J. (1992). Regulation by ATP and ADP of CFTR chloride channels that contain mutant nucleotide-binding domains. *Science* 257, 1701-4.

Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J. J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R., and Martinou, J. C. (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277, 370-376.

Ashwell, J. D., Schwartz, R. H., Mitchell, J. B., and Russo, A. (1986). Effect of gamma radiation on resting B lymphocytes. I. Oxygen-dependent damage to the plasma membrane results in increased permeability and cell enlargement. *J Immunol* 136, 3649-56.

Aussel, C., Marhaba, R., Pelassy, C., and Breitmayer, J. P. (1996). Submicromolar La<sup>3+</sup> concentrations block the calcium release-activated channel, and impair CD69 and CD25 expression in CD3- or thapsigargin-activated Jurkat cells. *Biochem J* 313, 909-13.

Bear, C. E., Li, C. H., Kartner, N., Bridges, R. J., Jensen, T. J., Ramjeeasingh, M., and Riordan, J. R. (1992). Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* 68, 809-18.

Belka, C., Rudner, J., Wesselborg, S., Stepczynska, A., Marini, P., Lepple-Wienhues, A., Faltin, H., Bamberg, M., Budach, W., and Schulze-Osthoff, K. (2000). Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis. *Oncogene* 19, 1181-90.

Bellgrau, D., Gold, D., Selawry, H., Moore, J., Franzusoff, A., and Duke, R. C. (1995). A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377, 630-2.

Bernardi, P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79, 1127-55.

Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315-25.

Beutner, G., Ruck, A., Riede, B., and Brdiczka, D. (1998). Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta* 1368, 7-18.

Bödding, M. (1996). Die Patch-clamp-Technik und angrenzende Meßverfahren. *Pharmazeutische Zeitung* 48, 11-28.

Boesen-de Cock, J. G., Tepper, A. D., de Vries, E., van Blitterswijk, W. J., and Borst, J. (1999). Common regulation of apoptosis signaling induced by CD95 and the DNA-damaging stimuli etoposide and gamma-radiation downstream from caspase-8 activation. *J Biol Chem* 274, 14255-61.

Boise, L. H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nunez, G., and Thompson, C. B. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608.

Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.

Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., and Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* 270, 7795-7798.

Breitmayer, J. P., Bernard, A., and Aussel, C. (1994). Regulation by sphingomyelinase and sphingosine of Ca<sup>2+</sup> signals elicited by CD3 monoclonal antibody, thapsigargin, or ionomycin in the Jurkat T cell line. *J Biol Chem* 269, 5054-8.

Broad, L. M., Armstrong, D. L., and Putney, J. W., Jr. (1999). Role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in Ca(2+) feedback inhibition of calcium release-activated calcium current (I<sub>crac</sub>). *J Biol Chem* 274, 32881-8.

Brunner, T., Mogil, R. J., LaFace, D., Yoo, N. J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S. J., Force, W. R., Lynch, D. H., Ware, C. F., and et al. (1995). Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 373, 441-4.

Budd, S. L., and Nicholls, D. G. (1996a). Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 67, 2282-2291.

Budd, S. L., and Nicholls, D. G. (1996b). A reevaluation of the role of mitochondria in neuronal Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *J Neurochem* 66, 403-411.

Cahalan, M. D., and Lewis, R. S. (1988). Role of potassium and chloride channels in volume regulation by T lymphocytes. *Soc Gen Physiol Ser* 43, 281-301.

Chan, A. C., Iwashima, M., Turck, C. W., and A., W. (1992). ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 71, 649-662.

Chandy, K. G., DeCoursey, T. E., Cahalan, M. D., McLaughlin, C., and Gupta, S. (1984). Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. *J Exp Med* 160, 369-85.

Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512.

Chung, S. C., McDonald, T. V., and Gardner, P. (1994). Inhibition by SK&F 96365 of Ca<sup>2+</sup> current, IL-2 production and activation in T lymphocytes. *Br J Pharmacol* 113, 861-8.

Cifone, M. G., De Maria, R., Roncaioli, P., Rippo, M. R., Azuma, M., Lanier, L. L., Santoni, A., and Testi, R. (1994). Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. *J Exp Med* 180, 1547-52.

- Cliff, W. H., and Frizzell, R. A. (1990). Separate Cl<sup>-</sup> conductances activated by cAMP and Ca<sup>2+</sup> in Cl<sup>-</sup>-secreting epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4956-60.
- Cosman, D. (1994). A family of ligands for the TNF receptor superfamily. *Stem Cells* 12, 440-55.
- Crompton, M. (2000). Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J Physiol* 529 Pt 1, 11-21.
- Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341, 233-49.
- Crompton, M., and Heid, I. (1978). The cycling of calcium, sodium, and protons across the inner membrane of cardiac mitochondria. *Eur J Biochem* 91, 599-608.
- Csordas, G., and Hajnoczky, G. (2001). Sorting of calcium signals at the junctions of endoplasmic reticulum and mitochondria. *Cell Calcium* 29, 249-62.
- DeFranco, A. L. (1993). Signaling pathways activated by tyrosine phosphorylation in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 364-371.
- Dobrowsky, R. T., Kamibayashi, C., Mumby, M. C., and Hannun, Y. A. (1993). Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* 268, 15523-15530.
- Doroshenko, P., and Neher, E. (1992). Volume-sensitive chloride conductance in bovine chromaffin cell membrane. *J Physiol* 449, 197-218.
- Eischen, C. M., Dick, C. J., and Leibson, P. J. (1994). Tyrosine kinase activation provides an early and requisite signal for Fas-induced apoptosis. *J. Immunol.* 153, 1947-54.
- Ellis, R. E., Yuan, J. Y., and Horvitz, H. R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 663-698.
- Flanagan, W. M., Corthesy, B., Bram, R. J., and Crabtree, G. R. (1991). Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 352, 803-807.

Gabriel, S. E., Clarke, L. L., Boucher, R. C., and Stutts, M. J. (1993). CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature* 363, 263-8.

Garber, S. S. (1992). Outwardly rectifying chloride channels in lymphocytes. *J Membr Biol* 127, 49-56.

Gilibert, J. A., Bakowski, D., and Parekh, A. B. (2001). Energized mitochondria increase the dynamic range over which inositol 1,4,5-trisphosphate activates store-operated calcium influx. *Embo J* 20, 2672-9.

Gilibert, J. A., and Parekh, A. B. (2000). Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  current  $I(\text{CRAC})$ . *Embo J* 19, 6401-7.

Gomez-Angelats, M., Bortner, C. D., and Cidlowski, J. A. (2000). Cell volume regulation in immune cell apoptosis. *Cell Tissue Res* 301, 33-42.

Gottlieb, R. A., Nordberg, J., Skowronski, E., and Babior, B. M. (1996). Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 654-8.

Grassme, H., Jekle, A., Riehle, A., Schwarz, H., Berger, J., Sandhoff, K., Kolesnick, R., and Gulbins, E. (2001). CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 276, 20589-96.

Green, D. R., and Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.

Grinstein, S., Rothstein, A., Sarkadi, B., and Gelfand, E. W. (1984). Responses of lymphocytes to anisotonic media: volume-regulating behavior. *Am J Physiol* 246, C204-15.

Grissmer, S., Lewis, R. S., and Cahalan, M. D. (1992).  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels in human leukemic T cells. *J Gen Physiol* 99, 63-84.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440-50.

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

Gulbins, E., Szabo, I., Baltzer, K., and Lang, F. (1997). Ceramide-induced inhibition of T lymphocyte voltage-gated potassium channel is mediated by tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7661-6.

Gunter, T. E., Buntinas, L., Sparagna, G. C., and Gunter, K. K. (1998). The Ca<sup>2+</sup> transport mechanisms of mitochondria and Ca<sup>2+</sup> uptake from physiological-type Ca<sup>2+</sup> transients. *Biochim Biophys Acta* 1366, 5-15.

Gunter, T. E., Gunter, K. K., Sheu, S. S., and Gavin, C. E. (1994). Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am J Physiol* 267, C313-39.

Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L. E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J., and Tschopp, J. (1996). Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274, 1363-6.

Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G. S., Henderson, J. T., Woo, M., Soengas, M. S., Elia, A., de la Pompa, J. L., Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S. A., Lowe, S. W., Penninger, J. M., and Mak, T. W. (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94, 339-52.

He, I., Lam, M., McCormick, T. S., and Distelhorst, C. W. (1997). Maintenance of Calcium Homeostasis in the Endoplasmic Reticulum by Bcl-2. *J. Cell Biol.* 1997, 6.

Hengartner, M. O., Ellis, R. E., and Horvitz, H. R. (1992). *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356, 494-499.

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

Hofer, A. M., Fasolato, C., and Pozzan, T. (1998). Capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  Entry Is Closely Linked to the Filling State of Internal  $\text{Ca}^{2+}$  Stores: A Study Using Simultaneous Measurements of  $I_{\text{CRAC}}$  and Intraluminal  $[\text{Ca}^{2+}]$ . *J. cell bio.* 140, 325-334.

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

Hoth, M. (1995). Calcium and barium permeation through calcium release-activated calcium (CRAC) channels. *Pflugers Arch* 430, 315-22.

Hoth, M., Fanger, C. M., and Lewis, R. S. (1997). Mitochondrial Regulation of Store-operated Calcium Signaling in T Lymphocytes. *J cell biol.* 137, 633-648.

Hoth, M., and Penner, R. (1993). Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol* 465, 359-86.

Hoth, M., and Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355, 353-6.

Hryciw, D. H., and Guggino, W. B. (2000). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and the outwardly rectifying chloride channel: a relationship between two chloride channels expressed in epithelial cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27, 892-5.

Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D. V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81, 495-504.

Huwiler, A., Brunner, J., Hummel, R., Vervoordeldonk, M., Stabel, S., van den Bosch, H., and J., P. (1996). Ceramide-binding and activation defines protein kinase c-Raf as a ceramide-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 6959-6963.

Hwang, T. C., Nagel, G., Nairn, A. C., and Gadsby, D. C. (1994). Regulation of the gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator C1 channels by phosphorylation and ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4698-702.

Ichiki, H., Sakurada, H., Kamo, N., Takahashi, T. A., and Sekiguchi, S. (1994). Generation of active oxygens, cell deformation and membrane potential changes upon UV-B irradiation in human blood cells. *Biol Pharm Bull* 17, 1065-9.

Itoh, N., and Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.* 268, 10932-10937.

Jackson, P. S., Churchwell, K., Ballatori, N., Boyer, J. L., and Strange, K. (1996). Swelling-activated anion conductance in skate hepatocytes: regulation by cell Cl<sup>-</sup> and ATP. *Am J Physiol* 270, C57-66.

Jenner, S., Farndale, R. W., and Sage, S. O. (1994). The effect of calcium-store depletion and refilling with various bivalent cations on tyrosine phosphorylation and Mn<sup>2+</sup> entry in fura-2-loaded human platelets. *Biochem J* 303, 337-9.

Jia, Y., Mathews, C. J., and Hanrahan, J. W. (1997). Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A. *J Biol Chem* 272, 4978-84.

Jouaville, L. S., Ichas, F., Holmuhamedov, E. L., Camacho, P., and Lechleiter, J. D. (1995). Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* 377, 438-41.

Ju, S. T., Cui, H., Panka, D. J., Ettinger, R., and Marshak-Rothstein, A. (1994). Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4<sup>+</sup> Th1 and CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4185-9.

Jurgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., and Reed, J. C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4997-5002.

Kaczorowski, G. J., and Koo, G. C. (1994). Lymphocyte ion channels as a target for immunosuppression. *Persp. Drug Discovery Design* 2, 233-48.

Kerschbaum, H. H., and Cahalan, M. D. (1998). Monovalent permeability, rectification, and ionic block of store-operated calcium channels in Jurkat T lymphocytes. *J Gen Physiol* 111, 521-37.

Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *J. EMBO* 14, 5579-5588.

Kluck, R. M., Bossy-Wetzell, E., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1121-1136.

Kolesnick, R. N., and Kronke, M. (1998). Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 60, 643-65.

Koo, G. C., Blake, J. T., Talento, A., Nguyen, M., Lin, S., Sirotna, A., Shah, K., Mulvany, K., Hora, D., Jr., Cunningham, P., Wunderler, D. L., McManus, O. B., Slaughter, R., Bugianesi, R., Felix, J., Garcia, M., Williamson, J., Kaczorowski, G., Sigal, N. H., Springer, M. S., and Feeney, W. (1997). Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J Immunol* 158, 5120-8.

Kovacs, B., and Tsokos, G. C. (1995). Cross-linking of the Fas/APO-1 antigen suppresses the CD3-mediated signal transduction events in human T lymphocytes. *J Immunol* 155, 5543-9.

Kowaltowski, A. J., Smaili, S. S., Russell, J. T., and Fiskum, G. (2000). Elevation of resting mitochondrial membrane potential of neural cells by cyclosporin A, BAPTA-AM, and bcl-2. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C852-9.

Kuida, K., Haydar, T. F., Kuan, C. Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M. S., Rakic, P., and Flavell, R. A. (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94, 325-37.

Lang, F., Busch, G. L., Ritter, M., Volkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E., and Haussinger, D. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 78, 247-306.

Lang, F., Madlung, J., Bock, J., Lukewille, U., Kaltenbach, S., Lang, K. S., Belka, C., Wagner, C. A., Lang, H. J., Gulbins, E., and Lepple-Wienhues, A. (2000). Inhibition of Jurkat-T-lymphocyte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger by CD95(Fas/Apo-1)-receptor stimulation. *Pflugers Arch* 440, 902-7.

Leonard, R. J., Garcia, M. L., Slaughter, R. S., and Reuben, J. P. (1992). Selective blockers of voltage-gated K<sup>+</sup> channels depolarize human T lymphocytes: mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10094-8.

Lepple-Wienhues, A., and Cahalan, M. D. (1996). Conductance and permeation of monovalent cations through depletion-activated Ca<sup>2+</sup> channels (ICRAC) in Jurkat T cells. *Biophys J* 71, 787-94.

Lepple-Wienhues, A., Szabo, I., Laun, T., Kaba, N. K., Gulbins, E., and Lang, F. (1998). The tyrosine kinase p56lck mediates activation of swelling-induced chloride channels in lymphocytes. *J Cell Biol* 141, 281-6.

Levitan, I., Almonte, C., Mollard, P., and Garber, S. S. (1995). Modulation of a volume-regulated chloride current by F-actin. *J Membr Biol* 147, 283-94.

Lewis, R. S. (1999). Store-operated calcium channels. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 33, 279-307.

Lewis, R. S., and Cahalan, M. D. (1990). Ion channels and signal transduction in lymphocytes. *Annu Rev Physiol* 52, 415-30.

Lewis, R. S., and Cahalan, M. D. (1995). Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol* 13, 623-653.

Lewis, R. S., Ross, P. E., and Cahalan, M. D. (1993). Chloride channels activated by osmotic stress in T lymphocytes. *J Gen Physiol* 101, 801-26.

Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J. (1998a). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.

Liu, J., Farmer, J. D. J., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S. L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807-815.

Liu, D., Martino, G., Thangaraju, M., Sharma, M., Halwani, F., Shen, S. H., Patel, Y. C., and Srikant, C. B. (2000). Caspase-8-mediated intracellular acidification precedes mitochondrial dysfunction in somatostatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 275, 9244-50.

Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., Osborne, B. A., and Jacks, T. (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362, 847-9.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 484-490.

Maechler, P., and Wolheim, C. B. (2000). Mitochondrial signals in glucose-stimulated insulin secretion in the beta cell. *J. Physiology* 529, 49-56.

Mahajan, N. P., Linder, K., Berry, G., Gordon, G. W., Heim, R., and Herman, B. (1998). Bcl-2 and Bax interactions in mitochondria probed with green fluorescent protein and fluorescence resonance energy transfer. *Nat Biotechnol* 16, 547-52.

Martin, S. J., and Green, D. R. (1995). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82, 349-352.

Marzo, I., Brenner, C., and Kroemer, G. (1998). The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes. *Biomed Pharmacother* 52, 248-51.

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J. M., Susin, S. A., Vieira, H. L., Prevost, M. C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J. C., and Kroemer, G. (1998). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281, 2027-31.

Mathes, C., Fleig, A., and Penner, R. (1998). Calcium release-activated calcium current (ICRAC) is a direct target for sphingosine. *J Biol Chem* 273, 25020-30.

McDonald, T. V., Nghiem, P. T., Gardner, P., and Martens, C. L. (1992). Human lymphocytes transcribe the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene and exhibit CF-defective cAMP-regulated chloride current. *J Biol Chem* 267, 3242-8.

Meyer, K., and Korbmayer, C. (1996). Cell swelling activates ATP-dependent voltage-gated chloride channels in M-1 mouse cortical collecting duct cells. *J Gen Physiol* 108, 177-93.

Minn, A. J., Velez, P., Schendel, S. L., Liang, H., Muchmore, S. W., Fesik, S. W., Fill, M., and Thompson, C. B. (1997). Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385, 353-357.

Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-9.

Morford, L. A., Elliott, L. H., Carlson, S. L., Brooks, W. H., and Roszman, T. L. (1997). T cell receptor-mediated signaling is defective in T cells obtained from patients with primary intracranial tumors. *J Immunol* 159, 4415-25.

Muchmore, S. W., Sattler, M., Linag, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S.-C., and Fesik, S. W. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-XL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335-341.

Muller, G., Ayoub, M., Storz, P., Rennecke, J., Fabbro, D., and Pfizenmaier, K. (1995). PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *J. EMBO* 14, 1961-1969.

Mustelin, T., Coggeshall, K. M., Isakov, N., and Altman, A. (1990). T cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C requires tyrosine phosphorylation. *Science* 247, 1584-7.

Nagata, S., and Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* 267, 1449-1456.

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

Negulescu, P. A., Shastri, N., and M.D., C. (1994). Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 2873-2877.

Nicolls, D. G., and Ferguson, S. J. (1992). *Bioenergetics 2*. Academic Press, London, 255pp.

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

Oiki, S., Kubo, M., and Okada, Y. (1994). Mg<sup>2+</sup> and ATP-dependence of volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channels in human epithelial cells. *Jpn J Physiol* 44, S77-9.

Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., and Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.

Parekh, A. B., and Penner, R. (1995). Depletion-activated calcium current is inhibited by protein kinase in RBL-2H3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7907-11.

Parekh, A. B., and Penner, R. (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 77, 901-30.

Pastorino, J. G., Chen, S. T., Tafani, M., Snyder, J. W., and Farber, J. L. (1998). The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 273, 7770-5.

Penner, R., Fasolato, C., and Hoth, M. (1993). Calcium influx and its control by calcium release. *Curr Opin Neurobiol* 3, 368-74.

Petit, P. X., Susin, S. A., Zamzami, N., Mignotte, B., and Kroemer, G. (1996). Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett* 396, 7-13.

Phipps, D. J., Branch, D. R., and Schlichter, L. C. (1996). Chloride-channel block inhibits T lymphocyte activation and signalling. *Cell Signal* 8, 141-9.

Pinton, P., Ferrari, D., Magalhães, P., Schulze-Osthoff, K., Di Virgilio, F., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (2000). Reduced loading of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores and downregulation of  $\text{Ca}^{2+}$  influx in Bcl-2 overexpressing cells. *J. Cell Biol.* 148, 857-862.

Ponton, A., Clement, M. V., and Stamenkovic, I. (1996). The CD95 (APO-1/Fas) receptor activates NF-kappaB independently of its cytotoxic function. *J. Biol. Chem.* 271, 8991-8995.

Premack, B. A., McDonald, T. V., and Gardner, P. (1994). Activation of  $\text{Ca}^{2+}$  current in Jurkat T cells following the depletion of  $\text{Ca}^{2+}$  stores by microsomal  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibitors. *J Immunol* 152, 5226-40.

Putney, J. W. J. (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11, 611-24.

Rabe, A., Disser, J., and Fromter, E. (1995). Cl<sup>-</sup> channel inhibition by glibenclamide is not specific for the CFTR-type Cl<sup>-</sup> channel. *Pflugers Arch* 429, 659-62.

Randriamampita, C., and Tsien, R. Y. (1993). Emptying of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores releases a novel small messenger that stimulates  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *Nature* 364, 809-14.

Rao, A., Luo, C., and Hogan, P. G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15, 707-47.

Rizzuto, R., Bastianutto, C., Brini, M., Murgia, M., and Pozzan, T. (1994). Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in intact cells. *J. Cell Biol.* 126, 1183-1194.

Ross, P. E., and Cahalan, M. D. (1995).  $\text{Ca}^{2+}$  influx pathways mediated by swelling or stores depletion in mouse thymocytes. *J Gen Physiol* 106, 415-44.

Ross, P. E., Garber, S. S., and Cahalan, M. D. (1994). Membrane chloride conductance and capacitance in Jurkat T lymphocytes during osmotic swelling. *Biophys J* 66, 169-78.

Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., and Borner, C. (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* **391**, 496-9.

Rutter, G. A., Burnett, P., Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., Pozzan, T., Tavaré, J. M., and Denton, R. M. (1996). Subcellular imaging of intramitochondrial Ca<sup>2+</sup> with recombinant targeted aequorin: significance for the regulation of pyruvate dehydrogenase activity. *Proc Natl. Acad. Sci.* **93**, 5489-5494.

Sakmann, B., and Neher, E. (1984). Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol* **46**, 455-72.

Sarkadi, B., Tordai, A., Homolya, L., Scharff, O., and Gardos, G. (1991). Calcium influx and intracellular calcium release in anti-CD3 antibody-stimulated and thapsigargin-treated human T lymphoblasts. *J Membr Biol* **123**, 9-21.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO Journal* **17**, 1675-1687.

Schendel, S. L., Xie, Z., Montal, M. O., Matsuyama, S., Montal, M., and Reed, J. C. (1997). Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5113-8.

Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., and Peter, M. E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* **254**, 439-59.

Schumacher, P. A., Sakellaropoulos, G., Phipps, D. J., and Schlichter, L. C. (1995). Small-conductance chloride channels in human peripheral T lymphocytes. *J Membr Biol* **145**, 217-32.

Schiebert, E. M., Egan, M. E., Hwang, T. H., Fulmer, S. B., Allen, S. S., Cutting, G. R., and Guggino, W. B. (1995). CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* **81**, 1063-73.

Schwiebert, E. M., Flotte, T., Cutting, G. R., and Guggino, W. B. (1994). Both CFTR and outwardly rectifying chloride channels contribute to cAMP-stimulated whole cell chloride currents. *Am J Physiol* 266, C1464-77.

Segal, M. S., and Beem, E. (2001). Effect of pH, ionic charge, and osmolality on cytochrome c-mediated caspase-3 activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C1196-204.

Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Waguri, S., Uchiyama, Y., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1996). Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene* 13, 21-29.

Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483-7.

Songyang, Z., Gish, G., Mbamalu, G., Pawson, T., and Cantley, L. C. (1995). A single point mutation switches the specificity of group III Src homology (SH) 2 domains to that of group I SH2 domains. *J Biol Chem* 270, 26029-32.

Sorota, S. (1995). Tyrosine protein kinase inhibitors prevent activation of cardiac swelling-induced chloride current. *Pflugers Arch* 431, 178-85.

Susin, S. A., Zamzami, N., and Kroemer, G. (1998). Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochimica et Biophysica Acta* 1366, 151-165.

Surh, C. D., and Sprent, J. (1994). T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372, 100-103.

Szabo, I., Gulbins, E., Apfel, H., Zhang, X., Barth, P., Busch, A. E., Schlottmann, K., Pongs, O., and Lang, F. (1996). Tyrosine phosphorylation-dependent suppression of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel in T lymphocytes upon Fas stimulation. *J. Biol. Chem.* 271, 20465-20469.

Szabo, I., Lepple-Wienhues, A., Kaba, K. N., Zoratti, M., Gulbins, E., and Lang, F. (1998). Tyrosine kinase-dependent activation of a chloride channel in CD95-induced apoptosis in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6169-74.

Tartaglia, L. A., Rothe, M., Hu, Y. F., and Goeddel, D. V. (1993). Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 73, 213-216.

Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R., and Dawson, A. P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2466-70.

Thastrup, O., Dawson, A. P., Scharff, O., Foder, B., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Bjerrum, P. J., Christensen, S. B., and Hanley, M. R. (1989). Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions* 27, 17-23.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.

Tilly, B. C., van den Berghe, N., Tertoolen, L. G., Edixhoven, M. J., and de Jonge, H. R. (1993). Protein tyrosine phosphorylation is involved in osmoregulation of ionic conductances. *J Biol Chem* 268, 19919-22.

Tinel, H., Wehner, F., and Sauer, H. (1994). Intracellular Ca<sup>2+</sup> release and Ca<sup>2+</sup> influx during regulatory volume decrease in IMCD cells. *Am J Physiol* 267, F130-8.

Tornquist, K., Malm, A. M., Pasternack, M., Kronqvist, R., Bjorklund, S., Tuominen, R., and Slotte, J. P. (1999). Tumor necrosis factor-alpha, sphingomyelinase, and ceramide inhibit store-operated calcium entry in thyroid FRTL-5 cells. *J Biol Chem* 274, 9370-7.

Van Parijs, L., and Abbas, A. K. (1998). Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280, 243-247.

Vaux, D. L., Haecker, G., and Strasser, A. (1994). An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76, 777-779.

Verheij, M., Bose, R., Lin, X. H., Yao, B., Jarvis, W. D., Grant, S., Birrer, M. J., Szabo, E., Zon, L. I., Kyriakis, J. M., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., and Kolesnick, R. N. (1996). Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380, 75-79.

Voets, T., Buyse, G., Droogmans, G., Eggermont, J., and Nilius, B. (1998). The GXGXXG motif in the pI(Cln) protein is not important for the nucleotide sensitivity of the pI(Cln)-induced Cl<sup>-</sup> current in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* 426, 171-3.

Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Nagata, S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314-7.

Weiss, A. (1991). Molecular and genetic insights into T cell antigen receptor structure and function. *Annu. Rev. Genet.* 25, 487.

Weiss, A., and Littman, D. R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptor. *Cell* 76, 263-274.

Welsh, M. J., Li, M., and McCann, J. D. (1989). Activation of normal and cystic fibrosis Cl<sup>-</sup> channels by voltage, temperature, and trypsin. *J Clin Invest* 84, 2002-7.

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P., and Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-32.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-625.

Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S. A., and Kroemer, G. (1998). Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2 like oncoproteins. *Oncogene* 16, 2265-2282.

Zamzami, N., Susin, S. A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M., and Kroemer, G. (1996). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* *183*, 1533-44.

Zhu, W., Cowie, A., Wasfy, G. W., Penn, L. Z., Leber, B., and Andrews, D. (1996). Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *The EMBO Journal* *15*, 4130-4141.

Zimmermann, B. (2000). Control of InsP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations in permeabilized blowfly salivary gland cells: contribution of mitochondria. *J Physiol* *525 Pt 3*, 707-19.

Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* *90*, 405-413.

Zweifach, A., and Lewis, R. S. (1993). Mitogen-regulated Ca<sup>2+</sup> current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 6295-9.

Zweifach, A., and Lewis, R. S. (1995). Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (I<sub>crac</sub>) due to local calcium feedback. *J. Gen. Physiol* *105*, 209- 226.

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. G. Bringmann

Prof. Dr. F. C. Czygan

Prof. Dr. G. Drews

Prof. Dr. S. Ebel

Prof. Dr. C. Herdeis

Prof. Dr. H. Karch

Prof. Dr. F. Lang

PD Dr. A. Lepple-Wienhues

Prof. Dr. M. J. Lohse

Prof. Dr. P. Proksch

Prof. Dr. H. Rüdiger

Prof. Dr. R. F. Schmidt

Prof. Dr. P. Surmann

AD Dr. H. Walz

Prof. Dr. I. Zimmermann

# CURRICULUM VITAE

## *Persönliche Angaben*

Name: Luzia Andrea Heil  
Geburtsdatum: 24. Juni 1974  
Geburtsort: Illertissen

## *Schulbildung*

1980 – 1984                      Grundschule Oberroth  
1984 – 1993                      Kolleg der Schulbrüder, Illertissen  
1993                                allgemeine Hochschulreife

## *Akademische Ausbildung*

11/1993 – 10/1997              Studium der Pharmazie an der Julius-Maximilians-  
Universität Würzburg  
10/1997                              2. Staatsexamen  
11/1997 – 04/1998              Pharmaziepraktikantin in der Apotheke in der Kaiserpassage  
in Reutlingen  
05/1998 – 10/1998              Pharmaziepraktikantin im Pharmacy Department des  
John Radcliffe Hospital in Oxford, GB  
12/1998                              3. Staatsexamen und Approbation  
  
03/1999 – 02/2002              Anfertigung der Doktorarbeit mit dem Titel „Regulation und  
Funktion lymphozytärer Ionenkanäle – CRAC und ORCC –  
in Proliferation und Apoptose“ unter der Anleitung von  
Herrn PD Dr. Albrecht Lepple-Wienhues und Frau Prof. Dr.  
Gisela Drews am Physiologischen Institut der Eberhard-  
Karls-Universität Tübingen