

**Funktion der Ryanodin-Rezeptoren innerhalb der
Ca²⁺-Signaltransduktion in T-Lymphozyten:**

**Funktionaler Knock-down des Ryanodin-Rezeptors in
Jurkat T-Lymphozyten durch Antisense-Technologie**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biochem. Nadine Schwarzmann

geboren am 27. April 1972

in Boston (USA)

2002

Referent:	Prof. Dr. W. Müller
Korreferent:	Prof. Dr. A. H. Guse
Tag der Promotion:	11.11.2002

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	III
Abstract	IV
Danksagung	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Bedeutung der T-Lymphozyten im Immunsystem	1
1.2 Aktivierung von T-Lymphozyten	2
1.3 Calcium-Signale in T-Lymphozyten	6
1.4 Effektormechanismen	7
1.5 Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern	8
1.5.1 Calcium-Freisetzung durch IP ₃	8
1.5.2 Calcium-Freisetzung durch cADPR	10
1.6 Calcium-Einstrom	16
1.7 Ryanodin-Rezeptoren	18
1.8 Problemstellung	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Geräte, Materialien und Reagenzien	22
2.1.1 Verwendete Geräte	22
2.1.2 Verwendete Materialien und Reagenzien	23
2.1.3 Verwendete Zellen	24
2.1.4 Puffer und Lösungen	24
2.2 Methoden	26
2.2.1 Nachweis der RNA von Ryanodin-Rezeptor Subtypen und Herstellung von Ryanodin-Rezeptor antisense-Konstrukten	26
2.2.1.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Tet-On Jurkat T-Zellen und humanem Hirngewebe	26
2.2.1.2 Formaldehyd-Agarose (FA) Gelelektrophorese	26
2.2.1.3 Klonierungsstrategie	26
2.2.1.4 One Tube RT-PCR	29
2.2.1.5 Nested PCR	29
2.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung von DNA-Fragmenten	30
2.2.1.7 Klonierungstechniken	30
2.2.1.8 Erzeugung kompetenter <i>E.coli</i> und Transformation	32
2.2.1.9 Plasmidpräparation aus <i>E.coli</i>	32
2.2.1.10 Sequenzierung	33
2.2.2 Herstellung der doppelt stabil transfizierten RyR-defizienten Tet-On Jurkat T-Zelllinien	34
2.2.2.1 Passage von Tet-On Jurkat T-Zellen	35
2.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	35
2.2.2.3 Transfektion eukaryotischer Zellen	35
2.2.2.4 Selektion und Klonierung stabiler Klone	36
2.2.3 Auswahl und Charakterisierung der stabil transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen	36
2.2.3.1 Genomische PCR	36

2.2.3.2 RT-PCR	38
2.2.3.3 Präparation von P10 Membranen und Proteinbestimmung nach Bradford	39
2.2.3.4 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
2.2.3.5 Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen	40
2.2.3.6 Immunfärbung	40
2.2.3.7 Ratiometrisch-fluorimetrische Bestimmung der intrazellulären Calcium-Konzentration mit Fura-2/AM	41
2.2.3.8 Permeabilisierung von stabil transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen	41
2.2.3.9 Bestimmung der Calcium-Freisetzung durch cADPR in permeabilisierten Tet-On Jurkat T-Lymphozyten	42
3. Ergebnisse	43
3.1 Expression von Ryanodin-Rezeptor Subtypen in Tet-On Jurkat T-Zellen	43
3.2 Generierung der Ryanodin-Rezeptor defizienten Tet-On Jurkat T-Zelllinien	44
3.2.1 Tet-On-Expressionssystem	44
3.2.2 Auswahl und Klonierung der antisense-Konstrukte	45
3.2.3 Transfektion, Selektion und Isolation stabiler Klone	46
3.3 Auswahl und Charakterisierung stabiler Klone	47
3.3.1 Stabile Integration der antisense-Konstrukte in das Genom der Tet-On Jurkat T-Zellen	47
3.3.2 Expression der antisense-RNA in stabil transfizierten Klonen	51
3.3.3 Verminderte Ryanodin-Rezeptor Expression in Klon 2 und Klon 5	55
3.3.4 RyR-Expression nach Induktion mit Doxycyclin	57
3.3.5 Calcium-Signale in den intakten RyR-defizienten Klonen 2 und 5	58
3.3.6 cADPR-vermittelte Freisetzung von Calcium in permeabilisierten RyR-defizienten Klonen 2 und 5	63
4. Diskussion	66
4.1 Expression von Ryanodin-Rezeptor Subtypen in Tet-On Jurkat T-Lymphozyten	66
4.2 Generierung der RyR-defizienten Zelllinien und Auswahl der Klone	67
4.2.1 Antisense-Technologie	67
4.2.2 Induzierbarkeit in RyR-defizienten Klonen	69
4.2.3 Integration der antisense-Konstrukte und Expression der antisense-RNA	71
4.2.4 RyR Proteinexpression in RyR-defizienten Klonen	72
4.3 Verminderte Calcium-Signale in RyR-defizienten Klonen	74
4.3.1 CICR	75
4.3.2 Calcium-Freisetzung	76
4.3.3 Calcium-Einstrom	79
4.4 Ausblick	82
5. Literaturverzeichnis	83
Anhang	96

Zusammenfassung

In T-Lymphozyten führt die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration zur Proliferation und klonalen Expansion und ist damit essentiell für eine effektive Immunantwort. Die Stimulation über den T-Zell-Rezeptor resultiert in einem biphasischen Calcium-Signal mit einem initialen Peak, der zum großen Teil durch die Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern bewirkt wird, gefolgt von einer langanhaltenden Plateauphase, die vor allem durch den Calcium-Einstrom über die Plasmamembran getragen wird.

An der Calcium-Freisetzung in T-Lymphozyten sind mindestens zwei sekundäre Botenstoffe beteiligt. D-myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) entfaltet seine Wirkung in der initialen Phase, während cyclische Adenosindiphospho-Ribose (cADPR) maßgeblich am späten, langanhaltenden Calcium-Signal in T-Lymphozyten beteiligt ist. Über welche Mechanismen die Calcium-mobilisierende Wirkung von cADPR vermittelt wird, ist noch unklar. Kürzlich erhobene Daten weisen darauf hin, dass cADPR seine Wirkung über den in intrazellulären Membranen von Jurkat T-Lymphozyten exprimierten Ryanodin-Rezeptor (RyR) Typ3 entfaltet. In der vorliegenden Arbeit wurden in Jurkat T-Zellen mittels RT-PCR erstmals auch RyR-1 und RyR-2 nachgewiesen. Die Bedeutung der einzelnen RyR-Subtypen für die Calcium-Signaltransduktion in T-Lymphozyten und die Wirkung von cADPR auf RyR-3, wurden anhand zwei verschiedener, durch Antisense-Technologie generierter RyR-defizienter Jurkat T-Zelllinien untersucht.

Die RyR-3-defiziente Zelllinie und die Linie, in der die Expression aller drei RyR-Isoformen reduziert war, unterschieden sich dabei in ihrer Calcium-Signalgebung deutlich voneinander. Im Gegensatz zur RyR-3-defizienten Zelllinie zeigte die RyR-defiziente Zelllinie, in der die Expression aller Ryanodin-Rezeptor-Isoformen vermindert war, einen signifikant reduzierten initialen Peak. Daraus kann abgeleitet werden, dass RyR-1 und/oder RyR-2 am initialen, transienten Calcium-Signal in T-Lymphozyten beteiligt sind. Die unterschiedlichen Calcium-Sensitivitäten der RyR-Isoformen sprechen für eine Beteiligung über CICR-Mechanismen (calcium-induced calcium-release). Zusätzlich war in beiden RyR-defizienten Zelllinien das langanhaltende Plateau signifikant reduziert. Dieses Ergebnis zeigt die Aktivität des RyR-3 in der späten Phase des Calcium-Signals. Im Einklang damit war die Calcium-freisetzende Wirkung von cADPR in beiden Zelllinien deutlich reduziert. Diese Daten belegen eindeutig die Wirkung von cADPR auf den RyR-3. Abschließend ergibt sich für die Calcium-Signalgebung in T-Lymphozyten damit folgendes Modell: In der initialen Phase sind neben dem IP₃-Rezeptor auch RyR-1 und/oder RyR-2 involviert, die ihre Wirkung vermutlich über CICR-Mechanismen entfalten. Während des späten, langanhaltenden Signals setzt cADPR über den RyR-3 Calcium aus intrazellulären Speichern frei und aktiviert dadurch, wahrscheinlich gemäß des kapazitiven Modells, den Calcium-Einstrom über die Plasmamembran.

Schlagerworte: Calcium-Signalgebung, Ryanodin-Rezeptoren, cyclische Adenosindiphospho-Ribose

Abstract

The cytosolic calcium concentration is essentially linked with the immunoreactivity of T-lymphocytes. Activation of the T cell receptor/CD3-complex results in elevated cytosolic calcium concentrations. The biphasic calcium response in T cells consists of two different processes. In the initial phase calcium release from intracellular stores causes a rapid increase in the intracellular calcium concentration. This is followed by a lower, but prolonged elevation of intracellular calcium levels mainly generated by calcium entry via the plasma membrane. Currently, at least two calcium-mobilizing intracellular messenger molecules are known in T-lymphocytes. In the initial phase of the calcium signal D-*myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) evokes a rapid calcium release from the endoplasmic reticulum, whereas cyclic adenosine diphospho-ribose (cADPR) is essential for the long-lasting calcium-signal. The exact mechanism by which cADPR mediates its calcium-mobilizing effect remains to be clarified. Pharmacological studies led to the assumption that this effect proceeds presumably by means of the type 3 ryanodine receptor (RyR-3) which is expressed in intracellular membranes of Jurkat T-lymphocytes.

In the present study it is demonstrated for the first time, that also type 1 (RyR-1) and type 2 (RyR-2) ryanodine receptors are expressed in Jurkat T-lymphocytes as revealed by RT-PCR.

To investigate the potential roles of RyR subtypes in calcium-signaling in T-cells and to verify the effect of cADPR on RyR-3, two different stably transfected RyR-deficient Jurkat T-cell lines were generated using antisense-technology. A RyR-3 deficient cell clone and a cell line lacking all three RyR isoforms differed significantly in their TCR-mediated calcium response. In cells lacking all three RyR subtypes the initial peak was significantly reduced, whereas in the RyR-3 deficient cell line the initial calcium signal showed no difference to control cells, demonstrating a crucial role for RyR-1 and/or RyR-2 in initial calcium-signaling events in Jurkat T-lymphocytes. The RyR-Isoforms exhibit different sensitivities to calcium and are known for their role in the mechanism of CICR (calcium-induced calcium-release) in other cell types, indicating that RyR-1 and/or RyR-2 may act through CICR mechanisms also in T-cells. Moreover in both cell lines the longlasting calcium signal was significantly lowered compared to controls, suggesting that RyR-3 is mainly involved in the late phase of the calcium signal. In accordance with these results the calcium-mobilizing effect of cADPR was inhibited in permeabilized preparations of both cell lines which points at a effect of cADPR on RyR-3.

As a conclusion from the present study the role of the ryanodine receptor family in TCR-mediated calcium-signaling in T-lymphocytes can be depicted as followed: Not only IP₃ receptors but also RyR-1 and/or RyR-2 play a crucial role in the initial calcium signal probably acting through CICR mechanisms. In contrast the RyR-3 is predominantly involved in the late, sustained calcium signal. cADPR mobilizes calcium by means of RyR-3 and thereby likely promotes the calcium entry via the plasma membrane.

Keywords: Calcium-signaling, ryanodine receptor and cyclic adenosine diphospho-ribose

Danksagung

Ein erster Dank gilt Prof. Dr. G. Mayr, der mir als Leiter des Instituts für Zelluläre Signaltransduktion die Durchführung dieser Dissertation ermöglicht hat.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. A. H. Guse für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung aller technischen und finanziellen Mittel, sowie die zahlreichen Anregungen und die motivierende, menschliche und engagierte Betreuung.

Bei Herrn Prof. Dr. W. Müller möchte ich mich für die bereitwillige Übernahme des Referats bedanken.

Bei meinen jetzigen und ehemaligen Kollegen I. Berg, A. Clausen, C. da Silva, R. Fliegert, A. Gasser, S. Kunerth, H. Schöttelndreier und K. Weber möchte ich mich überaus herzlich für das ausgezeichnete Arbeitsklima sowie die immerwährende Bereitschaft zur Hilfestellung und Diskussion über wissenschaftliche, experimentelle und andere Probleme bedanken. „Man braucht nicht nur gute Ergebnisse, sondern auch Kollegen mit Herz!“ Dies gilt natürlich auch für die Mitglieder der anderen Arbeitsgruppen am Institut für Zelluläre Signaltransduktion.

Bei Prof. Dr. Martin Hohenegger (Wien) und Dr. M. Jücker (Hamburg) bedanke ich mich für die Überlassung des aufgereinigten RyR-1 aus Skelettmuskel und des anti-IP₃R-Antikörpers.

Für exzellente technische Unterstützung gilt mein Dank Karin Weber und Sandra Frederichs.

Schließlich gilt ein ganz besonders großer Dank meinen lieben Eltern, die „Schuld“ daran sind, dass es überhaupt soweit gekommen ist.

An Thorsten, Silke, meine Familie und langjährigen Freunde: Danke!

Abkürzungsverzeichnis

[Ca ²⁺]	Konzentration zweiwertiger Calciumionen
4E-BP-1	Bindeprotein 1 des eukaryotischen Initiationsfaktors 4E
8-Br-cADPR	Cyclische 8-Bromo-Adenosindiphospho-Ribose
8-NH ₂ -cADPR	Cyclische 8-Amino-Adenosindiphospho-Ribose
ADP	Adenosindiphosphat
ADPR	Adenosindiphospho-Ribose
ADPR-Cyclase	Adenosindiphospho-Ribosyl-Cyclase
AMV-RT	Reverse-Transkriptase aus dem Avian Myeloblastosis Virus
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AP-1	Aktivator-Protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	B-Zell-Rezeptor
BSA	Rinder Serumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cADPR	Cyclische Adenosindiphospho-Ribose
CaM	Calmodulin
CaMK	Calmodulin abhängige Proteinkinase
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CICR	Calcium-induced Calcium-release
CIF	Calcium influx factor
CMV-Promotor	Cytomegalivirus-Promotor
CRAC	Calcium release-activated calcium channels
DAG	Diacylglycerol
ddNTP	Didesoxy-Nukleosidtriphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethylenglykol-(N,N,N',N')-tetraacetat
eIF-4E	Eukaryotischer Initiationsfaktor 4E
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular signal regulated kinase
FA	Formaldehyd
FBS/FCS	Fötale Rinderserum
FKBP	FK506 bindendes Protein
Fura-2/AM	Fura-2-pentakis-(acetoxymethyl)-ester
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IL-2	Interleukin 2
IL-2R	Interleukin-2-Rezeptor
IM	Ionomycin

IP ₃ /Ins(1,4,5)P ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP ₃ K	Inositol-1,4,5-trisphosphat-3-Kinase
IP ₃ R	Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor
IP ₄ /Ins(1,3,4,5)P ₄	Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat
ITAM	Intrazelluläres Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv
JNK	Jun N-terminale Kinase
LAT	Linker of activated T-cells
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
NAD ⁺	Nikotinamidadenin-Dinukleotid
NF-AT	Nuclear factor of activated T-cells
NO	Stickstoffmonoxyd
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PI-3-Kinase	Phosphoinositid-3 Kinase
PIP ₂ /PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMCA	Calcium-ATPasen der Plasmamembran
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rTetR	Reverser Tet-Repressor
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
rtTA	Reverses Transaktivatorprotein
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SERCA	Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen/endoplasmatischen Retikulums
SLP-76	SH2 domain leukocyte protein of 76kD
SOC	durch den Füllstand der Calcium-Speicher gesteuerter Calcium-Kanal der Plasmamembran (store-operated calcium channel)
SRF	Serum-response factor
TAE	Trisacetat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TRE	Tet responsives Element
TROCE	T cell Receptor-operated Calcium entry
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der T-Lymphozyten im Immunsystem

Unser Lebensraum enthält eine große Zahl von infektiösen Mikroben wie Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten, die pathologische Schädigungen hervorrufen können und im Falle einer unkontrollierten Vermehrung in der Lage sind, ihren Wirt zu töten. Als Folge davon hat sich im Laufe der Evolution in Vertebraten ein hochkomplexes Immunsystem entwickelt. Es besteht aus einem Verbundsystem von Organen wie Milz, Thymus, Darm und Lymphknoten, verschiedensten spezialisierten Zellen und von diesen sowie von anderen Körperzellen gebildeten Molekülen (Janeway & Travers 1999).

Das Immunsystem lässt sich in zwei funktionale Untereinheiten unterteilen, in das angeborene und das spezifische, adaptive Immunsystem. Das angeborene Immunsystem dient als erster Verteidigungswall gegen viele Mikroorganismen im Körper und ist essentiell für die Abwehr bakterieller Infektionen. Es besteht unter anderem aus dem Komplementsystem, einer Klasse von Blutproteinen und Granulozyten. Die Bekämpfung erfolgt schon einige Minuten nach Infektion. Dabei erkennen die Komponenten des angeborenen Immunsystems konservierte Eigenschaften pathogener Mikroorganismen. Die Immunantwort erfolgt bei jeder neuen Infektion mit der gleichen Stärke und eine dauerhafte Immunität entsteht dabei nicht. Kann das angeborene Immunsystem eine Infektion nicht vollständig bekämpfen, greift das adaptive Immunsystem ein. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem wird hierbei die Resistenz nach wiederholter Infektion verbessert. Es entsteht ein „immunologisches Gedächtnis“.

Das spezifische, adaptive Immunsystem basiert auf einer speziellen Klasse von weißen Blutzellen (Leukozyten), den Lymphozyten. Die Lymphozyten tragen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, die körperfremde Moleküle erkennen können. Während der Lymphozyten-Entwicklung werden die Gene, die für diese Oberflächenrezeptoren kodieren, innerhalb eines Prozesses, der als somatische Rekombination bezeichnet wird, aus Gen-Fragmenten kombiniert. So erhält jeder Lymphozyt seine eigene Spezifität, die festlegt, durch welches Antigen er aktiviert wird. Um zu verhindern, dass Lymphozyten gegen körpereigene Stoffe vorgehen, durchlaufen sie während ihrer Entwicklung den Prozess der klonalen Deletion. Hierbei werden im Thymus autoreaktive Lymphozyten durch Apoptose getötet, so dass die verbleibende Zellpopulation selbsttolerant ist. Die hochspezifische Immunantwort des adaptiven Immunsystems verläuft über eine klonale Selektion und Expansion der aktivierten Zellen. Ein Teil der bei der klonalen Expansion gebildeten Lymphozyten bleibt nach Beendigung der Immunantwort als Gedächtniszelle erhalten und vermittelt so die dauerhafte Immunität (Janeway & Travers 1999).

Die adaptive Immunantwort beinhaltet die humorale und die zelluläre Immunantwort. Die humorale Immunantwort wird durch B-Lymphozyten getragen, die nach ihrer Aktivierung zu Plasmazellen differenzieren und fünf bis sieben Tage nach der Infektion Antikörper produzieren, die gegen Pathogene im extrazellulären Raum gerichtet sind. T-Lymphozyten vermitteln die zelluläre Immunantwort, indem sie sich gegen intrazelluläre Krankheitserreger sowie gegen infizierte und onkogen-transformierte Zellen richten.

T-Zellen lassen sich anhand ihrer Oberflächenrezeptoren in zwei Klassen einteilen: CD8⁺-positive T-Zellen und CD4⁺-positive T-Zellen. CD8⁺-positive T-Zellen werden auch als cytotoxische T-Lymphozyten bezeichnet und sind in der Lage, infizierte und onkogen-transformierte Körperzellen abzutöten. CD4⁺-positive T-Zellen können zu zwei Arten von Effektor-T-Zellen differenzieren: Inflammatorische T-Zellen (T_H1-Zellen), die infizierte Makrophagen dazu aktivieren, ihre intrazellulären Erreger zu töten, und T-Helfer-Zellen (T_H2-Zellen), die durch Freisetzung bestimmter Cytokine B-Lymphozyten dazu veranlassen, Antikörper zu produzieren und freizusetzen (Janeway & Travers 1999, Mosman & Coffman 1989).

1.2 Aktivierung von T-Lymphozyten

Während der Aktivierung von T-Lymphozyten finden komplexe zeitlich und räumlich koordinierte Ereignisse statt, die letztendlich zur klonalen Expansion und Differenzierung der Zelle führen. Die Aktivierung von T-Lymphozyten findet über den auf der Oberfläche der Zellen exprimierten T-Zell-Rezeptor-Komplex (TCR-Komplex) statt. Dieser besteht aus dem T-Zell-Rezeptor und den assoziierten CD3-Molekülen (γ -, δ - und ϵ -Ketten), sowie einem ζ -Homodimer oder einem η/ζ -Heterodimer (Padlan & Marguillies 1997). Der T-Zell-Rezeptor besteht aus einer α - und β -Kette. Durch die somatische Rekombination während der T-Zell-Entwicklung entstehen die Gene für die α - und β -Kette, so dass jede T-Zelle einen TCR trägt, der eine bestimmte Spezifität aufweist. Dadurch erkennt die T-Zelle nur ein spezifisches Antigen, das ihr vom Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC) präsentiert wird. Das Antigen ist dabei als Peptidfragment, gebunden an einen MHC, auf der Oberfläche einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) lokalisiert. Man unterteilt die MHC-Moleküle in zwei Klassen. Klasse I kommt auf allen kernhaltigen Körperzellen vor, Klasse II dagegen vornehmlich auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC), den B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Durch Ligation des TCR mit dem MHC einer Antigen-präsentierenden Zelle kommt es, abhängig davon in welchem Differenzierungszustand die T-Zelle ist, entweder zur Proliferation, Apoptose oder zur Anergie (Janeway & Travers, 1999). Anergie beschreibt einen Zustand der Zelle, in dem sie inaktiviert ist und durch weitere Signale über den TCR auch nicht mehr aktiviert werden kann (Berridge 1997).

Der TCR selbst besitzt nur wenige Aminosäure-Reste im cytoplasmatischen Anteil, der weder enzymatisch aktiv ist, noch zu Protein-Protein-Interaktionen befähigt ist. Daher sind die assoziierten Ketten des CD3-Komplexes für die Signaltransduktion des TCR von großer Bedeutung. Nach der Ligation des TCR kommt es zur Tyrosin-Phosphorylierung bestimmter konservierter Motive, den ITAMs (intracellular tyrosine-based activation motifs), die sich im cytosolischen Anteil der CD3- und ζ -Ketten befinden (Bolen 1995). Die Phosphorylierung erfolgt durch die Proteinkinasen Lck und Fyn der Src-Familie (Bolen 1995). Sie sind durch eine Myristoylierung an die Plasmamembran gebunden und nicht-kovalent mit den als Co-Rezeptoren wirkenden Oberflächenantigenen CD4 und CD8 assoziiert. Bei der Ligation des TCR mit MHC und antigenem Peptid bindet der Co-Rezeptor an den invarianten Teil des MHC-Moleküls, die Src-Kinasen gelangen in die räumliche Nähe des TCR/CD3-Komplexes und phosphorylieren die ITAMs der ζ -Ketten und der CD3-Ketten (Abbas et al., 1997). Die phosphorylierten ITAMs binden an Proteine mit SH2 (src homology 2)-Domäne, die dadurch an die Membran rekrutiert werden. Die Kinase ZAP-70, ein Mitglied der Syk-Familie, bindet an die ITAMs der ζ -Kette und gelangt damit an die Membran in die Nähe der src-Kinasen. Dadurch wird die ZAP-70 Kinase selber phosphoryliert und katalytisch aktiviert (Wange & Samelson 1996).

Zu den Substraten von ZAP-70 gehören die beiden Adapterproteine LAT (linker of activation in T-cells) und SLP-76 (SH2 domain leukocyte protein of 76kD). Bei LAT handelt es sich um ein Transmembranprotein, das in seinem cytosolischen Anteil verschiedene Tyrosin-Reste besitzt, deren Phosphorylierung durch ZAP-70 den konstitutiven Komplex aus Grb2 und Sos, die p58-Untereinheit der PI3-Kinase und die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase Cy1 an die Membran rekrutiert und diese dadurch in die Nähe ihrer Substrate bringt (Rudd 1999).

Die PI-PLCy1 wird zur vollen Aktivierung phosphoryliert, wozu die Anwesenheit des zweiten Adapters SLP-76 (SH2 domain leukocyte protein of 76kD) erforderlich ist (Rudd 1999).

Als Folge dieser frühen Ereignisse nach TCR-Stimulation werden eine Vielzahl von weiteren intrazellulären Signaltransduktionswegen aktiviert. Diese Signalwege resultieren in der Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie NF-AT, NF- κ B, AP-1 und CREB. Diese Faktoren binden zusammen mit den Oktamerproteinen Oct-1 und Oct-2 an den Promotor des IL-2 Gens und aktivieren so die Expression von IL-2 (Foletta et al. 1998). Die Expression von IL-2 führt zur klonalen Expansion der T-Zellen und deren Differenzierung und ist damit essentiell für eine effektive Immunantwort.

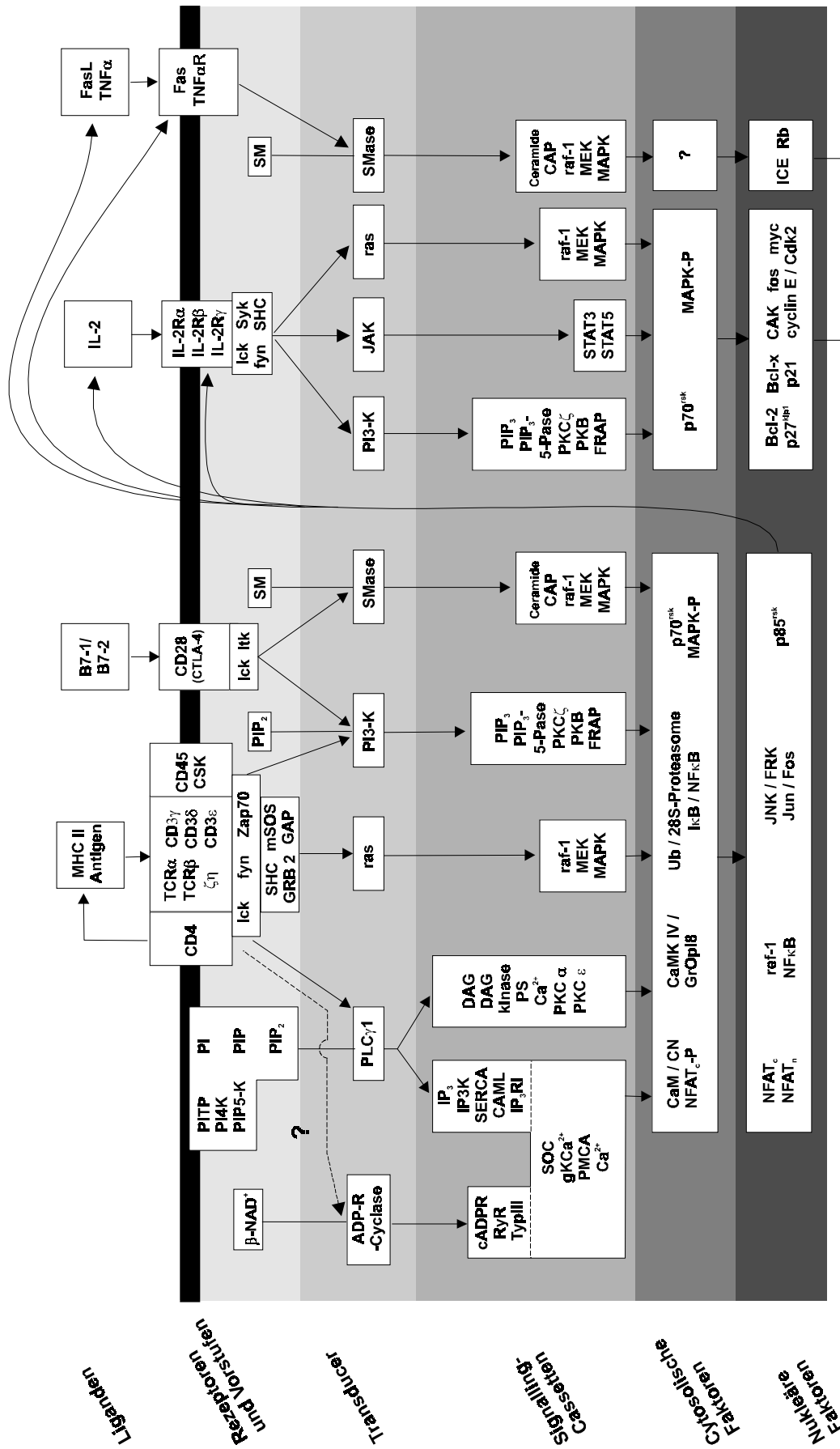
Von den nach TCR-Stimulation aktivierten intrazellulären Signalwegen ist der ras/MAPK-Weg bislang am besten charakterisiert. Durch die Rekrutierung des Grb2/SOS-Komplexes wird das an den inneren Teil der Plasmamembran gebundene GTP-bindende Protein

p21^{ras} aktiviert. Ras aktiviert in der GTP-Form die MAPK-Kaskade, die zur Aktivierung der MAPK (auch ERK, „extracellular signal regulated kinase“) und zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 führt. Dieser bildet mit dem SRF (serum-response factor) einen Komplex, der an den Promotor von c-fos bindet und dessen Expression aktiviert. Fos bildet mit Jun als dimeren Komplex den Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivator-Protein-1).

Eine weitere Kinasen-Kaskade führt zur Aktivierung der Kinase JNK (Jun N-terminale Kinase), die den Transkriptionsfaktor AP-1 an der Jun-Komponente phosphoryliert und damit deren Transaktivierungsaktivität erhöht (Foletta et al. 1998).

Die Rekrutierung der PI-3-Kinase an die Membran führt dazu, dass das Membranlipid Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) zu Phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃) phosphoryliert wird. Dieses bindet Proteine mit einer Plekstrin Homologie-(PH)-Domäne, die dadurch an die Membran gelangen. Proteine mit PH-Domäne sind unter anderem die Proteinkinasen PDK-1, PDK-2 und Akt/PKB. Die Aktivierung von Akt/PKB führt als zentraler Effektormechanismus des PI-3-Kinase-Wegs unter anderem zur Aktivierung der Proteinkinase p70^{S6K} (Reif et al. 1997), die wiederum das S6-Protein der großen ribosomalen Untereinheit sowie das Bindeprotein 4E-BP1 des eukaryontischen Initiationsfaktors eIF-4E phosphoryliert und damit die Proteinbiosynthese aktiviert.

Zusätzlich zur Aktivierung des T-Zell-Rezeptors ist zur vollen Aktivierung ein co-stimulatorisches Signal vonnöten, das durch Co-Rezeptoren wie CD28, CD2, LFA-1, CD5 und diverse Interleukin-Rezeptoren vermittelt wird. Der wichtigste bekannte Co-Rezeptor auf T-Zellen ist das Oberflächenantigen CD28 (Rudd 1996). Die Liganden für CD28 sind ausschließlich auf der Oberfläche von APCs lokalisiert. Dabei handelt es sich um die Glycoproteine B7.1 und B7.2, deren Bindung an CD28 zu einer Stabilisierung von Cytokin mRNAs, einer gesteigerten Aktivität von Transkriptionsfaktoren und zur Expression von IL2 führt (Berridge 1997). So wird die Aktivität von AP-1 durch Co-Stimulation über CD28 verstärkt. T-Zellen, bei denen die Aktivierung ohne co-stimulatorisches Signal nur über den TCR erfolgt, werden anergisch (Harding et al. 1992). Die beschriebenen Signalwege werden in Abb.1.1 schematisch zusammengefasst.



Proliferation Apoptose

Abb. 1.1: Signaltransduktionskaskaden während der T-Zell-Aktivierung. Die Abfolge beginnt links oben mit der Ligation des TCR durch MHCII-gebundenes Antigen und endet viele Stunden später unten rechts mit Apoptosis oder Proliferation. Während der Aktivierung wird Information durch Signalwege weitergeleitet, die aus Rezeptoren, Vorläufern, Transducern, Signalcassetten und cytoplasmatischen und nukleären Effektoren bestehen. Um die Übersicht zu erleichtern sind funktionell zusammengehörige Komponenten zu Gruppen zusammengefasst und in Kästen dargestellt. Verändert nach Berridge (1997) und Fliegert (1999). Abkürzungen: CAML Ca²⁺-Signal modulierter Cyclophilin-Ligand, CAK Cdk-aktivierende Kinase, CAP Ceramid-aktivierte Proteinkinase, CSK C-terminaler Src-Kinase, FRAP FKBP12-Rapamycin assoziiertes Protein, FRK Fos-regulierende Kinase, GAP GTPase aktivierendes Protein, gKCa Ca²⁺-aktivierter Kaliumkanal, GRB-2 Wachstumsfaktor-gebundenes Protein 2, ICE Interleukin 1 β -converting enzyme, I κ B Inhibitor von NF κ B, IL-2R Interleukin-2 Rezeptor, JAK Janus-Kinase, JNK Jun N-terminale Kinase, MAPK Mitogen-aktivierte Proteinkinase, MEK MAPK/ERK-Kinase, mSOS Säugetierhomologes von Son of Sevenless, NF κ B Nukleärer Faktor κ B, p70^{mk} 70 kDa ribosomale S6-Kinase, p85^{ck} 85 kDa ribosomale S6-Kinase, PI3K Phosphatidylinositol 3-Kinase, PI5K Phosphatidylinositol 4-Kinase, PKB Proteinkinase B, PKC Proteinkinase C, PMCA Plasmamembran Ca²⁺-ATPase, PS Phosphatidylserin, Rb Retinoblastoma-Protein, SHC SH2-enhaltendes Protein, SHP SH2-enhaltende Proteintyrosin-Phosphatase, SIP SH2-enhaltende Inositolpolyphosphat 5-Phosphatase, SM Sphingomyelinase, STAT Signal transducer and activator of transcription, TNF Tumornekrosefaktor TNFR Tumornekrosefaktor-Rezeptor, Ub Ubiquitin.

1.3 Calcium-Signale in T-Lymphozyten

Während der Ruhephase der T-Zellen beträgt die cytosolische Calcium-Konzentration etwa 100nM (Premack & Gardner 1992). Im Gegensatz dazu ist die Calcium-Konzentration im extrazellulären Raum und in den intrazellulären Calcium-Speichern bedeutend höher (Pozzan et al. 1994). Dieser Calcium-Gradient zwischen Cytosol und extrazellulärem Raum sowie Cytosol und intrazellulären Calcium-Speichern wird durch Calcium-Pumpen generiert und aufrecht erhalten (Übersicht in Pozzan et al. 1994). Nach Stimulation über den T-Zell-Rezeptor kommt es durch die Öffnung von Calcium-Kanälen in den intrazellulären Speichern und in der Plasmamembran zu einer Erhöhung der cytosolischen Calcium-Konzentration (Übersicht in Lewis 2001).

Diese Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration in T-Lymphozyten nach Stimulation über den TCR/CD3-Komplex ist essentiell für deren Proliferation und Expansion. Erst durch die Entwicklung von membranpermeanten Fluoreszenzfarbstoffen wie Fura-2/AM (Fura-2-pentakis-(acetoxymethyl)-ester) wurde die Untersuchung von intrazellulären Calcium-Signalen an vielen Zellen möglich. Diese Farbstoffe werden in der Zelle enzymatisch hydrolysiert und setzen so den aktiven Fluoreszenzfarbstoff frei (Cellular Calcium-A practical approach, Thomas & Delaville 1991).

Stimuliert man T-Zell-Populationen mit Antikörpern gegen den T-Zell-Rezeptor, z.B. mit OKT3, der sich gegen den CD3-Komplex richtet (Chang et al. 1981), kommt es durch den Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration zu einem Calcium-Signal, das, gemittelt über eine große Zellpopulation, einen biphasischen Verlauf aufweist. In den ersten 1-2 Minuten nach Stimulation steigt die intrazelluläre Calcium-Konzentration von 100nM zu einem Peak von 500nM bis 1µM an. Diesem Peak folgt eine bis zu mehreren Stunden andauernde Plateauphase mit intrazellulären Calcium-Konzentrationen von 150-300nM (Premack & Gardner 1992), die eine essentielle Voraussetzung für die vollständige Lymphozytenaktivierung darstellt. Die Peakphase kann durch Depolarisierung der Zelle, Komplexierung extrazellulären Calciums oder pharmakologische Blockade (z.B. durch SKF 96365) der in der Plasmamembran vorkommenden Calcium-Kanäle nur teilweise blockiert werden, während die Plateauphase durch die genannten Faktoren beeinträchtigt wird (Übersicht in Guse 1998, Appelby et al. 1992). Daraus folgerte man, dass während der Peakphase die Calcium-Freisetzung hauptsächlich aus intrazellulären Speichern erfolgt, während ein großer Teil der Plateauphase durch Einstrom von extrazellulärem Calcium über die Plasmamembran getragen wird (Premack & Gardner 1992). Die Mechanismen, die den beiden Phänomenen Peak und Plateau zu Grunde liegen, werden in den Kapiteln 1.5 und 1.6 genauer beschrieben.

Messungen der intrazellulären Calcium-Konzentration an einzelnen T-Zellen haben gezeigt, dass das Verhalten einzelner Zellen deutlich von dem ganzer Zellpopulationen

abweichen kann. Einige Zellen reagieren wie für Zellpopulationen beschrieben, andere zeigen Calcium-Oszillationen oder einen einzelnen Peak mit nachfolgender leichter Erhöhung der Calcium-Konzentration und einige Zellen reagieren überhaupt nicht (Lewis & Cahalan 1989; Tregear et al. 1991; Wacholtz & Lipsky 1993; Wülfing et al. 1997; Weismann et al. 1997). Aus der Mittelung dieser Messungen an einzelnen Zellen ergibt sich wieder das biphasische, für Zellpopulationen beschriebene Signal mit transientem Peak und langanhaltendem Plateau. Die Komplexität dieser Calcium-Signale macht deutlich, dass das Calcium-Signal eine Vielzahl von Informationen enthält. Durch Studien an naiven T-Zellen, T-Zell-Klonen, T-Zell-Hybridomen und transformierten T-Zell-Linien konnte gezeigt werden, dass die Art des Calcium-Signals vom Typ und Differenzierungszustand der Zellen, von der Antigen-präsentierenden Zelle und dem Antigen selbst abhängt (Übersicht in Lewis 2001).

1.4 Effektormechanismen

Durch die Bindung des Antigens an den T-Zell-Rezeptor werden vielfältige Effektormechanismen in der Zelle eingeleitet. Einer der wichtigsten Effektoren ist das ubiquitär exprimierte Calmodulin (CaM), ein 17kDa Protein, das bei Bindung von Calcium seine Konformation ändert. Es wirkt als regulatorisches Bindungsprotein vieler Enzyme, die durch die Konformationsänderung nach Calciumbindung aktiviert werden. Für die Signalübertragung in T-Zellen ist vor allem die Calcium/Calmodulin abhängige Proteinphosphatase Calcineurin von Bedeutung. Calcineurin dephosphoryliert den in inaktiver Form vorliegenden cytosolischen Anteil des Transkriptionsfaktors NF-AT_c (nuclear factor of activated T-cells) (Shaw et al. 1995; Loh et al. 1996). Dieser transloziert in den Kern und lagert sich zusammen mit seiner nukleären Komponente (NF-AT_n) unter anderem an den Promotor des IL2-Gens (Chow et al. 1999), wodurch die Transkription des IL2-Gens aktiviert wird. Weitere wichtige Effektoren sind CaM-abhängige Proteinkinasen (CaMK). In Lymphozyten werden CaMK II und CaMK IV exprimiert (Le Gouvello et al. 1998; Park & Soderling 1995). CaMK II ist in Abwesenheit von Calcium/Calmodulin inaktiv und wird durch 0.5-1µM Calcium nur halbmaximal aktiviert (Premack & Gardner 1992). Nach Bindung von Calcium-Calmodulin ist CaMK II in der Lage, sich selbst zu phosphorylieren. Diese Autophosphorylierung versetzt das Enzym in eine Calcium/CaM unabhängige Form. Seine Kinase-Aktivität bleibt bis zur Dephosphorylierung bestehen und stellt eine Art „Gedächtnis“ für zurückliegende Calcium-Erhöhungen dar (Premack & Gardner 1992).

CaMK IV wird durch die Erhöhung intrazellulärer Calcium-Konzentrationen aktiviert und ist in der Lage, unabhängig von p21^{ras} den Transkriptionsfaktor AP-1 zu aktivieren. Dieser stimuliert zusammen mit NF-AT die IL-2-Expression (Ho et al. 1996).

PKC ist ein weiterer Effektor, der durch Phosphorylierung Transkriptionsfaktoren aktiviert. Die in humanen T-Zellen exprimierten Isoformen α - und β 2 werden durch DAG, Calcium und Phosphatidylserin aktiviert und phosphorylieren die inhibitorische Untereinheit I κ B (Berridge 1997) des Transkriptionsfaktors NF κ B, wodurch es letztendlich zur Transkriptionsaktivierung des IL-2-Gens kommt.

Neben der indirekten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren sind Calcium/Calmodulin-abhängige Proteine auch an der Reorganisation des Cytoskeletts von Lymphozyten beteiligt. Die Dynamik des Aktin-Cytoskeletts ist Voraussetzung für einen effektiven Kontakt zwischen TCR und MHC-Antigen-Komplex der APC. Es konnte gezeigt werden, dass *in vivo* eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration dazu führt, dass eine T-Zelle an einer APC stoppt und weitere Signale von ihr empfängt (Donnadieu et al. 1994; Acuto & Cantrell 2000). Dieser erste Kontakt führt zur Ausbildung einer „immunologischen Synapse“ (Shaw & Dustin 1997).

1.5 Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern

Wie schon in Kapitel 1.3 erwähnt, erhält das biphasische Calcium-Signal in T-Lymphozyten seinen Charakter durch Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern und Calcium-Einstrom über die Plasmamembran. Zur Zeit sind mindestens zwei Calcium-mobilisierende intrazelluläre Liganden bekannt, die an der Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern beteiligt sind. Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) wurde 1983 von Schulz und Berridge entdeckt (Streb et al. 1983), während cyclische Adenosindiphospho-Ribose (cADPR) zum ersten Mal 1987 von Lee und Mitarbeitern beschrieben wurde (Clapper et al. 1987; Lee et al. 1989).

1.5.1 Calcium-Freisetzung durch IP₃

Der sekundäre Botenstoff IP₃ (Ins(1,4,5)P₃) wurde bisher als Calcium-mobilisierendes Agens am besten charakterisiert. Er ist in vielen Zelltypen an der Calcium-Freisetzung durch verschiedene Rezeptorsysteme beteiligt (Übersicht in Guse 1998). In ruhenden T-Zellen ist die IP₃-Konzentration sehr niedrig, steigt aber nach Stimulation über den TCR sehr schnell an. Nach Stimulation über den T-Zell-Rezeptor bewirkt die Aktivierung von PLC γ 1 die Spaltung des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃). Beide Substanzen wirken als sekundäre Botenstoffe. DAG ist membranständig und aktiviert zusammen mit Phosphatidylserin und Calcium die Proteinkinase C (PKC) und ras-abhängige Effektor-mechanismen (siehe Kapitel 1.4). Das lösliche IP₃ diffundiert zu seinem Rezeptor (IP₃R) in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und aktiviert durch seine Bindung an den Rezeptor die Calcium-Freisetzung aus dem ER. Dieser Mechanismus ist

inzwischen in unterschiedlichsten Zellsystemen, darunter auch in T-Lymphozyten beschrieben worden (Guse et al. 1993). Die Calcium-Freisetzung aus dem ER ist ein hochkomplexer Vorgang. Durch die Bindung mehrerer IP_3 -Moleküle am tetrameren Rezeptor kommt es zu einer erhöhten intrazellulären Calcium-Konzentration in der Zelle, die wiederum zur weiteren Aktivierung der Calcium-Freisetzung durch IP_3 aus dem ER führt. Dieser selbstverstärkende Vorgang wird auch als „Calcium induced Calcium release“ (CICR) bezeichnet.

Lymphozyten exprimieren multiple Isoformen des IP_3R . Jurkat T-Zellen und DT40 B-Zellen exprimieren alle drei Isoformen, während Thymozyten und Milzzellen nur Typ 2 und 3 exprimieren (Sugiyama et al. 1994; Harnick et al. 1995). Die drei IP_3R -Isoformen unterscheiden sich in ihrer Regulation durch Calcium und ihrer Sensitivität gegenüber IP_3 . In Anwesenheit von IP_3 wird IP_3R -1 schnell aktiviert und langsam durch Calcium inaktiviert (Bezprozvanny et al. 1991; Finch et al. 1991). Im Gegensatz dazu wird IP_3R -2 effektiver durch IP_3 und Calcium aktiviert (Miyakawa et al. 1999) und weder IP_3R -2 noch IP_3R -3 werden durch Calcium inaktiviert (Hagar et al. 1998). Die Bedeutung der IP_3R für die Calcium-Freisetzung in T-Lymphozyten wurde in einer „loss-of-function“-Analyse untersucht. In Jurkat-T-Lymphozyten, die mit einer antisense IP_3R -1 cDNA stabil transfiziert worden waren, wurde die durch TCR-Stimulation vermittelte Calcium-Freisetzung komplett unterdrückt, was darauf hinweist, dass IP_3R für die Freisetzung essentiell ist (Jayaraman et al. 1995). Allerdings konnte die spezifische Rolle des IP_3R -1 nur schwer bestimmt werden, da sich in einer späteren Arbeit herausstellte, dass das antisense Fragment ausreichend homolog war, um partiell die Expression der beiden anderen Isoformen zu blockieren (Jayaraman & Marks 1997). Dagegen konnte in IP_3R defizienten DT40 B-Zellen eindeutig demonstriert werden, dass die Deletion einer Isoform alleine keinen detektierbaren Effekt auf die BCR-stimulierte Calcium-Freisetzung hatte, sondern die Deletion aller drei IP_3R -Isoformen notwendig war, um die Calcium-Freisetzung in B-Lymphozyten zu verhindern (Sugawara et al. 1997). Diese Ergebnisse konnten durch Hirota und Mitarbeiter für das T-Zell-System bestätigt werden, indem sie zeigten, dass sowohl die Entwicklung von T-Lymphozyten in IP_3R -1^{-/-} Knock-out Mäusen als auch die Calcium-Signale nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation nicht beeinträchtigt waren (Hirota et al. 1998).

In T-Lymphozyten wird während der frühen Phase der Aktivierung die Aktivität der IP_3R wahrscheinlich durch ihre Phosphorylierung durch fyn erhöht. In fyn^{-/-} Knock-out Mäusen kommt es zu verminderter IP_3R -Phosphorylierung (Jayaraman et al. 1996) und zu um etwa 30% verminderter Calcium-Freisetzung (Appelby et al. 1992).

Die schnelle Metabolisierung des sekundären Botenstoffs IP_3 geschieht durch IP_3 -3-Kinase (IP_3K) und IP_3 -5-Phosphatase. Die IP_3K wird in T-Zellen stark durch

Calcium/Calmodulin aktiviert und somit nimmt die IP_3 -Konzentration, die nach TCR-Stimulation innerhalb von Sekunden bis Minuten ein Maximum erreicht, innerhalb weniger Minuten bis nahezu auf den Basalwert ab. Die Konzentration des Metaboliten IP_4 bleibt nach Stimulation jedoch für mindestens 60 Minuten erhöht (Guse et al. 1991). Eine Beteiligung dieses Moleküls am Calcium-Signal in T-Zellen wie auch in anderen Zelltypen bleibt jedoch umstritten (da Silva et al. 1994; Übersicht in Guse 1998).

1.5.2 Calcium-Freisetzung durch cADPR

Neben IP_3 wurde eine zweite Calcium-mobilisierende Komponente erstmals 1987 von Lee und Mitarbeitern in Seeigelei-Homogenaten beschrieben. Dabei handelte es sich um cyclische Adenosindiphospho-Ribose (cADPR, dargestellt in Abb.1.2), einem cyclischen Derivat von β -Nicotinamidadenindinukleotid (β -NAD⁺). Seitdem ist die Calcium-freisetzende Wirkung von cADPR in einer Vielzahl von Zellsystemen bestätigt worden, die außer Invertebraten auch Pflanzenzellen, Säugerzellen und humane Zelllinien umfassen (aufgelistet in Lee 1997).

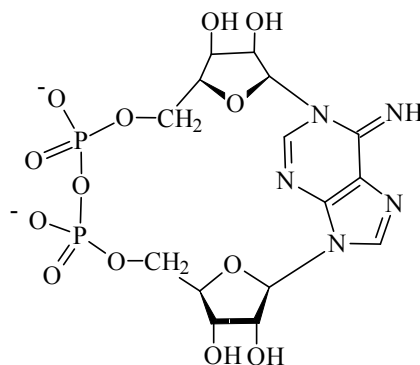


Abb.1.2: Struktur der Calcium-mobilisierenden Substanz cADPR

Wie mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse gezeigt werden konnte, ist das N1-Atom des Adenins mit dem C1'-Atom der terminalen Ribose, an die zuvor der Nicotinamidring gebunden war, verknüpft (Lee et al. 1994).

cADPR ist mittlerweile als sekundärer Botenstoff anerkannt. Für die Definition eines sekundären Botenstoffs gelten hauptsächlich zwei Kriterien: 1. durch einen Rezeptor ausgelöste Bildung und anschließende Metabolisierung und 2. intrazelluläre Aktivität, die der Erzeugung und Weiterleitung eines Signals dient.

Metabolisierung von cADPR

Die Cyclisierung von β -NAD⁺ zu cADPR unter Freisetzung von Nicotinamid erfolgt durch ADP-Ribosyl-Cyclasen. Noch ist wenig bekannt über ADP-Ribosyl-Cyclasen und den Mechanismus ihrer Rezeptor-vermittelten Aktivierung. ADP-Ribosyl-Cyclasen können löslich vorliegen oder membrangebunden sein. Die erste lösliche Cyclase mit reiner ADP-

Ribosyl-Cyclase-Aktivität und relativ geringer Substrat-Spezifität wurde aus Ovotestis des Seehasen *Aplysia californica* isoliert (Hellmich & Strumwasser 1991). Dieses 29kDa große Enzym ist in der Lage, verschiedene β -NAD⁺-Derivate zu cyclisieren. Darüber hinaus konnten Cyclase-Aktivitäten in cytosolischen Präparationen aus Seeigeleiern (Graeff et al. 1998) und subzellulären sowie löslichen Fraktionen aus T-Zellen nachgewiesen werden (Guse et al. 1999). Durch Verwendung eines Tyrosin-Phosphatase-Inhibitors wurde gezeigt, dass während der Aktivierung der in der löslichen Fraktion von Jurkat T-Zellen gefundenen ADP-Ribosyl-Cyclase Tyrosin-Phosphorylierung involviert ist (Guse et al. 1999). Bisher konnte diese lösliche Cyclase aus T-Zellen jedoch weder aufgereinigt noch kloniert werden, so dass die Identität dieses Enzyms in T-Zellen vorerst unbekannt bleibt. Auf Grund von Sequenzhomologien zur *Aplysia*-Cyclase konnte in höheren Eukaryonten eine zweite Klasse von ADP-Ribosyl-Cyclasen identifiziert werden (States et al. 1992). Diese sind membrangebunden und weisen neben der Cyclase-Aktivität eine cADPR-Hydrolase-Aktivität auf. Im wesentlichen katalysieren sie allerdings die Hydrolyse von β -NAD⁺ zu ADP-Ribose, so dass die cADPR-Synthese nur in einer Nebenreaktion erfolgt. Das Oberflächenantigen CD38, das hauptsächlich auf T- und B-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen und Erythrozyten exprimiert wird, weist eine 31% Sequenzhomologie zur *Aplysia*-Cyclase auf (States et al. 1992). Bei der Betrachtung von CD38 als ADP-Ribosyl-Cyclase in T-Lymphozyten ergeben sich jedoch drei Probleme:

1. CD38 produziert nur in einer Nebenreaktion cADPR, 2. das aktive Zentrum des Enzyms ist extrazellulär lokalisiert und 3. das Substrat NAD⁺ liegt extrazellulär in nur sehr geringer Konzentration vor. Da cADPR nicht membranpermeant ist, ist unklar, wie cADPR seine intrazellulären Zielproteine erreicht. Zudem führte die Inkubation von CD38-positiven intakten Jurkat-Zellen mit NAD⁺ nicht zu einer erhöhten intrazellulären cADPR-Konzentration und nur zu sehr geringen Anstiegen der intrazellulären Calcium-Konzentration (da Silva et al. 1998b).

Kürzlich durchgeführte Studien zeigten neben der ektozellulären auch die intrazelluläre Lokalisation von CD38 auf Kernmembranen (Adebanjo et al. 1999; Khoo et al. 2000) und eine ADPR-Cyclase/NADase mit ähnlichen Eigenschaften wie CD38 in Mitochondrien der Rinderleber (Ziegler et al. 1997). Aus diesem Grund ist die Bildung von cADPR durch intrazelluläre CD38-Varianten nicht auszuschließen. Der genaue Mechanismus der cADPR-Synthese in T-Lymphozyten bleibt jedoch bisher ungeklärt.

Rezeptor-vermittelte Bildung von cADPR

Der Rezeptor-vermittelte Anstieg von cADPR oder die Erhöhung von Cyclase-Aktivitäten wurde in verschiedenen Zellsystemen gezeigt. In Pankreas Azinus-Zellen führte die Stimulation mit dem Hormon Cholecystinin zu einer Zunahme der intrazellulären ADP-Ribosyl-Cyclase-Aktivität (Cancela 2001). Ähnliche Aktivierungen der Cyclase konnten in

mit Carbachol inkubierten NG108-15 Neuroblastoma X Glioma Zellhybriden (Higashida et al. 1997) und in adrenergen chromaffinen Zellen nach Stimulation mit Acetylcholin gefunden werden (Morita et al. 1997). Eine Erhöhung der cADPR-Konzentration wurde in PC12-Zellen durch Stimulation mit NO (Clementi et al. 1996), in β -Pankreas-Zellen der Ratte durch Stimulation mit Glucose (Takasawa et al. 1998) und in Jurkat T-Lymphozyten durch Stimulation mit anti-CD3-Antikörper (Guse et al. 1999) nachgewiesen.

Intrazelluläre Aktivität von cADPR

Die Calcium-Freisetzung durch cADPR ist in zahlreichen Zellsystemen, wie z.B. neuronalen Zellen (Hua et al. 1994) und Pankreas Azinus-Zellen (Thorn et al. 1994) beschrieben worden (aufgelistet in Lee 1997). cADPR setzt Calcium außerdem aus microsomalen Membranfraktionen aus Herz (Meszaros et al. 1993), Gehirn (White et al. 1993) und Pankreas β -Zellen (Thorn et al. 1994) frei. In vielen Zellsystemen wirkt cADPR im nanomolaren Bereich, während andere Systeme beschrieben sind, in denen cADPR im mikromolaren Bereich wirksam ist. Die Bedeutung von cADPR-vermittelter Calcium-Freisetzung für spätere Prozesse in der Zelle wurde zum ersten Mal im Seeigelei-System gezeigt. Zur Reifung von Seeigeleiern werden transiente Calcium-Erhöhungen benötigt. Weder die spezifische Inhibition der IP_3 -vermittelten Calcium-Freisetzung noch die spezifische Inhibition der cADPR-vermittelten Freisetzung alleine verhinderten die Reifung der Eier. Wohingegen die kombinierte Inhibition beider Calcium-Freisetzung-Mechanismen effektiv die corticale Reaktion antagonisierte (Galione et al. 1993; Lee et al. 1993). Somit ist die cADPR-vermittelte Calcium-Freisetzung essentiell für die Seeigelei-Reifung.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in Seeigeleiern durch NO eine lösliche Guanylat-Cyclase aktiviert wird, welche die Bildung von cGMP aus GTP katalysiert. cGMP wiederum aktiviert über Protein Kinase G die ADP-Ribosyl-Cyclase (Willmott et al. 1996).

cADPR in T-Lymphozyten

Erste Hinweise auf die Rolle von cADPR in T-Lymphozyten erhielten Guse und Mitarbeiter bei der pharmakologischen Charakterisierung von intrazellulären Calcium-Speichern in Jurkat T-Zellen. Dabei zeigte sich, dass sich mindestens vier Calcium-Pools unterscheiden ließen. Speicher I war sensitiv gegenüber IP_3 . Speicher I und II konnten durch Thapsigargin entleert werden und wurden auf Grund dessen als Bestandteile des ERs diskutiert. Ein dritter Speicher war durch Coffein entleerbar, verhielt sich gegenüber Thapsigargin allerdings insensitive (Guse et al. 1993). Untersuchungen anderer Gruppen bestätigten die Existenz Coffein- und Ryanodin-sensitiver Calcium-Speicher in T-Lymphozyten (Ricard et al. 1997).

Guse und Mitarbeiter konnten zeigen, dass cADPR konzentrationsabhängig Calcium aus Coffein-sensitiven Pools in permeabilisierten Jurkat T-Lymphozyten freisetzte (Guse et al.

1995). Die vorherige Inkubation der Zellen mit IP_3 oder Thapsigargin beeinflusste diese cADPR-vermittelte Freisetzung nicht, was bestätigt, dass der cADPR-sensitive Speicher nicht Bestandteil des ERs ist. Die Spezifität dieser Wirkung konnte durch die Antagonisten 8-NH₂-cADPR und 8-Br-cADPR untermauert werden. Diese Verbindungen blockierten die cADPR-vermittelte Calcium-Freisetzung, hatten aber keinen Einfluss auf die IP_3 -induzierte Calcium-Freisetzung (Guse et al. 1995). Damit konnte gezeigt werden, dass IP_3 und cADPR durch voneinander unabhängige Prozesse Calcium aus intrazellulären Speichern von T-Lymphozyten freisetzen. Die Tatsache, dass die Wirkung von cADPR durch Antagonisten spezifisch inhibiert werden kann, deutet darauf hin, dass es einen spezifischen Rezeptor gibt, der als Zielprotein für cADPR fungiert.

Durch HPLC-Analytik (da Silva et al. 1998) konnte gezeigt werden, dass durch die Stimulation über den TCR/CD3-Komplex die intrazelluläre cADPR-Konzentration in T-Lymphozyten zunimmt (Guse et al. 1999). Im Gegensatz zum schnellen Anstieg von IP_3 nahm die Konzentration an cADPR nach Stimulation über den T-Zell-Rezeptor nur sehr langsam innerhalb der ersten 10 Minuten von ca. 0.5 μ M auf ca. 2 μ M zu, blieb dann allerdings für mindestens 50 Minuten konstant (Guse et al. 1999). Die gemessenen basalen cADPR-Mengen stimmten gut mit Daten für andere T-Zelllinien überein (Takahasi et al. 1995). Die Erhöhung der cADPR-Konzentration in der Zelle konnte nicht durch intrazelluläre Calcium-Freisetzung durch Thapsigargin oder Inomycin aktiviert werden (Guse et al. 1999). Die in der cytosolischen Fraktion von Jurkat-Zellen detektierte ADP-Ribosyl-Cyclase-Aktivität nahm nach Stimulation über den TCR ebenfalls zu (Guse et al. 1999).

Durch welchen Mechanismus die Calcium-mobilisierende Wirkung von cADPR vermittelt wird, ist zur Zeit noch nicht völlig klar. Pharmakologische Untersuchungen deuten auf eine Beteiligung von Ryanodinrezeptoren hin, da die cADPR-vermittelte Freisetzung von Calcium durch RyR-Antagonisten wie Ruthenium Rot, Procain und Ryanodin (Galione et al. 1991), sowie Mg^{2+} in hohen Konzentrationen (>5mM) (Graeff et al. 1995) inhibiert wird. Calcium, Coffein und Sr^{2+} potenzieren dagegen die Wirkung von cADPR (Lee et al. 1994). Diese Befunde sind zum großen Teil im Seeigelei-System erhoben worden. Eine direkte Bindung von cADPR an Ryanodinrezeptoren konnte bisher nicht gezeigt werden. Daher bleibt ungeklärt, ob cADPR direkt oder über ein cADPR-bindendes Protein auf den RyR wirkt. Mit [³²P]-8-Azido-cADPR als Photoaffinitäts-Analogen konnten in Seeigelei-Homogenaten zwei cADPR-bindende Proteine mit Molekulargewichten von 100 und 140 kDa identifiziert werden. Hierbei bleibt ungeklärt, ob es sich um cADPR-Bindeproteine oder proteolytische Fragmente des RyR handelt (Walseth et al. 1993). In T-Lymphozyten konnte bislang kein solches Protein identifiziert werden (Guse et al. 1999).

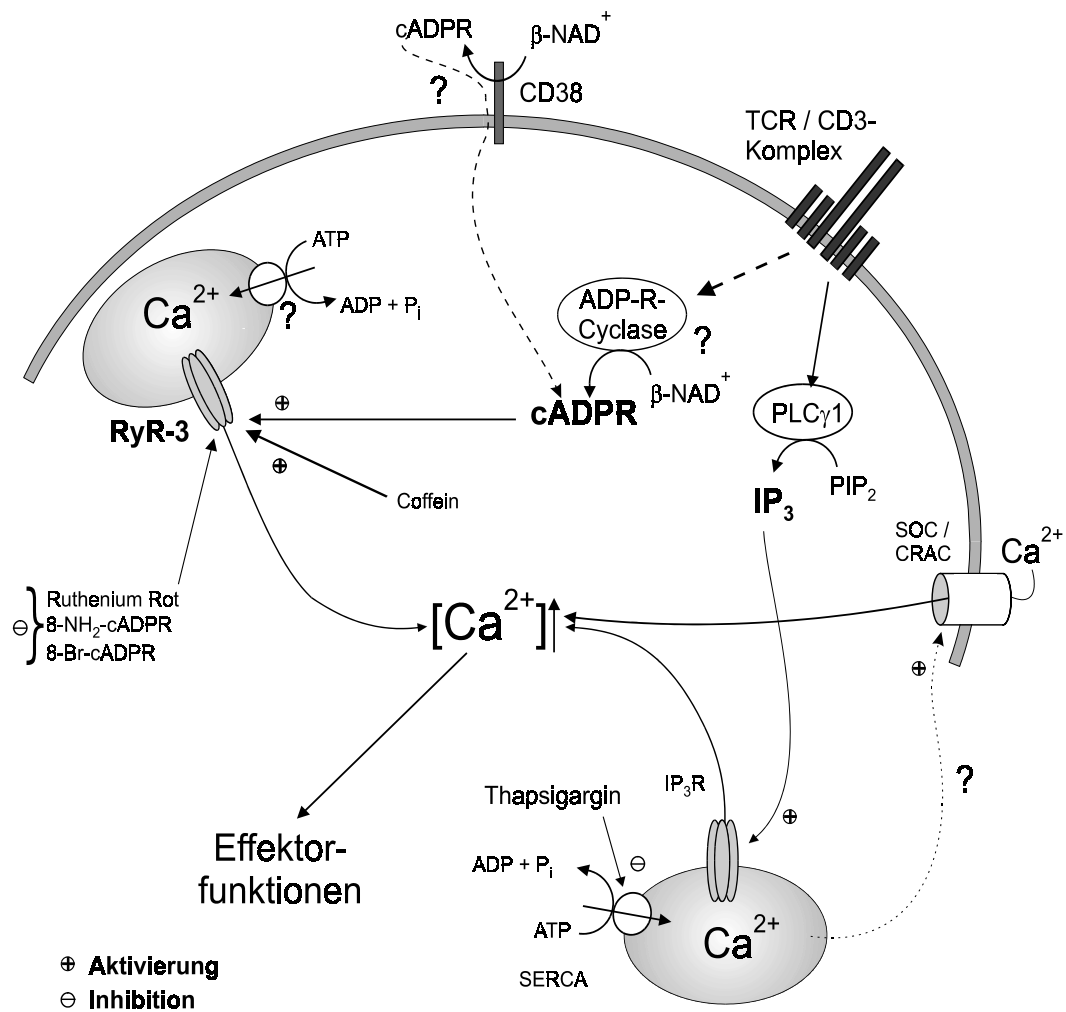


Abb.1.3: cADPR in T-Lymphozyten

Die Stimulation des TCR/CD3-Komplexes führt zur Bildung von IP₃ und cADPR und damit zur Freisetzung von Calcium aus pharmakologisch unterscheidbaren intrazellulären Speichern. Abkürzungen: IP₃ Inositol-1,4,5-trisphosphat, ADP-R-Cyclase Adenosindiphospho-ribosyl-Cyclase, RyR-3 Ryanodin-Rezeptor Typ3, SERCA Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen oder endoplasmatischen Retikulums, cADPR cyclische Adenosindiphosphoribose, SOC/CRAC durch den Füllstand der Calcium-Speicher gesteuerter Calcium-Kanal der Plasmamembran (store-operated calcium channel /calcium-release activated channel).

cADPR und RYR

Die Hypothese, dass das Zielprotein für cADPR in T-Lymphozyten der Ryanodinrezeptor ist, konnte in den letzten Jahren gefestigt werden. Bindungsstudien von Bourguignon und Mitarbeitern lieferten 1995 neben den pharmakologischen Befunden erste Hinweise auf die Expression von Ryanodinrezeptoren in T-Lymphozyten. Es konnte eine Bindung von [³H]-Ryanodin an ein ca. 500 kDa großes Protein in einer Fraktion leichter Membranvesikel in T-Lymphozyten der Maus gezeigt werden. Durch Immunfärbung mit einem monoklonalen anti-Ryanodin-Rezeptor-Antikörper wurde das Protein eindeutig als Ryanodin-Rezeptor identifiziert (Bourguignon et al. 1995). Die Sequenzierung einer durch

RT-PCR erhaltenen cDNA aus Jurkat T-Zellen zeigte, dass der Ryanodin-Rezeptor Typ3 auf mRNA-Ebene in Jurkat T-Zellen exprimiert wird (Hakamata et al. 1994). Diese Ergebnisse wurden von Guse und Mitarbeitern auf Protein- und RNA-Ebene bestätigt. Immunpräzipitation mit einem anti-RyR_{common}-Antikörper und Bindungsstudien mit [³H]-Ryanodin zeigten die Expression eines Ryanodinrezeptors in Jurkat T-Lymphozyten. Eine RT-PCR mit anschließender Sequenzanalyse der erhaltenen Fragmente offenbarte, dass es sich dabei um den Typ3 Ryanodin-Rezeptor handelt (Guse et al. 1999).

Weitere Hinweise auf die Expression von RyR in T-Zellen waren durch Mikroinjektion mit dem RyR-Agonisten Suramin aktivierte Calcium-Signale (Hohenegger 1999). Zusätzlich wurde die cADPR-vermittelte Calcium-Freisetzung in Jurkat T-Lymphozyten durch den Ryanodinrezeptor-Antagonisten Ruthenium Rot (Guse et al. 1995) und hohe Magnesium-Konzentrationen inhibiert (Guse et al. 1996).

Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass cADPR als Calcium-mobilisierender Botenstoff seine Wirkung über den in T-Lymphozyten exprimierten Ryanodin-Rezeptor Typ3 entfaltet. In T-Zellen sind also offensichtlich mindestens zwei sekundäre Botenstoffe am Signaltransduktionsprozess nach T-Zell-Rezeptor Stimulation beteiligt. In einem entscheidenden Experiment mit dem membranpermeanten cADPR-Antagonist 7-Deaza-8-Bromo-cADPR konnte gezeigt werden, dass dieser hauptsächlich die späte Phase des T-Zell-Rezeptor-stimulierten biphasischen Calcium-Signals in Jurkat T-Zellen inhibiert (Guse et al. 1999). Zusätzlich wurde die Expression von Aktivierungsmarkern, wie CD25 und HLA-DR, und die Proliferation von humanen peripheren T-Lymphozyten durch 7-Deaza-8-Bromo-cADPR effektiv inhibiert (Guse et al. 1999). Diese Studien zeigen, dass IP₃ eher in der initialen Phase des Signals agiert, während cADPR zusammen mit erhöhten Calcium-Konzentrationen in der zweiten, langanhaltenden Phase seine Wirkung entfaltet. Diese Hypothese wird durch die Kinetik beider Botenstoffe gestützt: Die IP₃-Konzentration steigt während der ersten Minuten stark an (Ng et al. 1990), wohingegen die cADPR-Konzentration in den ersten Minuten nach Stimulation nur langsam zunimmt, aber dann bis zu einer Stunde stabil bleibt (Guse et al. 1999). Da das Calcium-Signal in T-Lymphozyten nicht nur Calcium-Freisetzung umfasst, sondern auch Calcium-Einstrom über die Plasmamembran, ist anzunehmen, dass der intrazelluläre Anstieg an Calcium durch IP₃ und cADPR den Calcium-Influx über die Plasmamembran durch den kapazitiven Mechanismus (s.u.) steuert.

1.6 Calcium-Einstrom

In T-Zellen ist der Anteil der Calcium-Freisetzung am Gesamt-Signal im Vergleich zum Calcium-Einstrom relativ gering (Lewis & Cahalan 1989; Donnadieu et al. 1994; Dolmetsch & Lewis 1994). Daher scheint die Hauptaufgabe der Calcium-Freisetzung zu sein, den Influx zu modulieren. Auf welche Weise dieser Einstrom in T-Lymphozyten gesteuert wird, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es existieren 3 Modellvorstellungen, die den Einstrom von Calcium in T-Zellen beschreiben.

1. Irvine postulierte die Anwesenheit eines IP_3 - oder IP_4 - sensitiven Calcium-Kanals in der Plasmamembran von T-Lymphozyten (Irvine et al. 1990). Es gibt Hinweise darauf, dass IP_3R in Jurkat T-Lymphozyten auch plasmamembranständig sind und mit dem TCR koppeln können (Khan et al. 1992).
2. Ein anderes Modell diskutiert einen in der Plasmamembran lokalisierten Calcium-Kanal, der auf unbekannte Weise über den TCR/CD3-Komplex aktiviert wird. Dieser Prozess wird als TROCE bezeichnet (T-cell receptor-operated calcium entry) (Guse et al. 1998).
3. Das am weitesten etablierte Modell ist das Modell des „kapazitiven Calcium-Einstroms“ (Putney 1986). Putney zeigte als erster, dass in exokrinen Zellen der Einstrom von extrazellulärem Calcium über die Entleerung intrazellulärer Speicher reguliert wurde, und nicht über IP_3 direkt, da der Einstrom noch erfolgen konnte lange nachdem die IP_3 -Konzentrationen wieder basale Werte erreicht hatten (Putney 1990). Diese Ergebnisse führten zu dem Modell des kapazitiven Einstroms. Demnach führt die Entleerung der intrazellulären Speicher zur Öffnung sogenannter SOC-Kanäle („store-operated channels“) in der Plasmamembran (Lewis & Cahalan 1989; Zweifach & Lewis 1993; Premack et al. 1994). Ein Merkmal der SOC-Kanäle ist, dass ihre Aktivierung unabhängig von der Rezeptor-Stimulation durch Substanzen ausgelöst werden kann, welche die Speicher des ERs leeren. Dazu gehören Thapsigargin, ein SERCA-Inhibitor, das lipophile Ionophor Ionomycin, das Calcium aus dem ER transportiert sowie Calcium-Chelatoren, die die Calcium-Aufnahme in die Speicher blockieren (Lewis 2001). Elektrophysiologische Studien in verschiedenen Zelltypen offenbarten den unterschiedlichen Charakter der SOCs (Parekh & Penner 1997; Lewis 1999). Die Klasse der SOC-Kanäle, die in T-Zellen exprimiert werden, wird als CRAC („calcium release-activated calcium-channels“) bezeichnet. Sie zeichnen sich durch eine extrem hohe Selektivität für Calcium aus (Übersicht in Lewis 2001).

Die Identität der CRAC-Kanäle in T-Lymphozyten ist bislang noch nicht aufgeklärt worden. Mögliche Kandidaten für SOC-Gene in Säugern sind homolog zu *Drosophila trp*-Genen.

Bisher konnten mehrere dieser Gene kloniert und in einer Vielzahl von Säugerzellen überexprimiert werden. Hinweise auf funktionale Ähnlichkeiten zwischen TRP und CRAC Kanälen zeigten Philip und Mitarbeiter (Philipp et al. 2000). In bovinen Zellen der Nebennierenrinde, die in hohem Maße TRP4 exprimierten, konnten hoch-selektive, CRAC-ähnliche Calcium-Ströme gemessen werden (Philipp et al. 2000). Allerdings exprimieren Jurkat T-Zellen TRP4 in geringem Maße und andere Studien widerlegten die Funktionalität des TRP4 als CRAC-Kanal (Übersicht in Lewis 2001). Gegenwärtig ist der beste Kandidat für den CRAC-Kanal in T-Lymphozyten der CaT1-Kanal, ein Mitglied der TrpV-Familie, der aus Jurkat T-Zellen kloniert werden konnte (Yue et al. 2001). Yue und Mitarbeiter zeigten in mit CaT1 transfizierten CHO-K1-Zellen CRAC-ähnliche Calcium-Ströme.

Generell wird postuliert, dass IP_3 CRAC-Kanäle indirekt durch Speicher-Entleerung aktiviert, anstatt direkt auf diese Kanäle zu wirken. Zusätzlich konnte eine Beteiligung von Speichern an der Aktivierung gezeigt werden, die sehr nahe an der Plasmamembran lokalisiert sind (Übersicht in Lewis 2001). Trotzdem bleibt der genaue molekulare Mechanismus, über den diese Kanäle aktiviert werden, bislang ungeklärt. Diskutiert werden verschiedene Ansätze. Ein möglicher Mechanismus wäre, dass die Speicher-Entleerung zur Bildung eines Moleküls führt, das zur Plasmamembran diffundiert und dort CRAC-Kanäle aktiviert. Aus dem Cytosol von Jurkat-Zellen konnte ein „calcium influx factor“ (CIF) mit einem Molekulargewicht von $< 500Da$ isoliert werden, der zwischen Speicher-Entleerung und Calcium-Einstrom als Vermittler agieren könnte (Randriamampita & Tsien 1993).

Eine andere Alternative ist die direkte Kopplung von IP_3 -Rezeptoren mit den Kanälen in der Plasmamembran („conformational coupling“, Berridge 1995). Dieses Modell wird durch Co-Immunpräzipitations-Experimente gestärkt, die Bindungsdomänen in TRP3-Kanälen und IP_3R demonstrierten (Boulay et al. 1999). Eine neuere Arbeit zeigte, dass auch RyR in der Lage sind, an humanen TRP3-Kanälen zu koppeln und somit zur Steuerung dieser Kanäle beizutragen (Kiselyov et al. 2000).

Ausgehend vom kapazitativen Modell als Mechanismus für den Calcium-Einstrom in T-Lymphozyten, ergibt sich die Möglichkeit, dass ebenfalls die Depletion IP_3 -insensitiver Speicher zum Influx führen kann. In Azinus-Zellen (Fukushi et al. 1996), in glatten Muskelzellen der Maus (Wayman et al. 1998) und in PC12 Zellen (Bennett et al. 1998) konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Coffein-sensitiven Speichern, die wahrscheinlich mit cADPR-sensitiven Speichern identisch sind, zum nachfolgenden Calcium-Einstrom über die Plasmamembran führte. Einen direkten Effekt von cADPR auf den Calcium-Einstrom in T-Lymphozyten zeigten Guse und Mitarbeiter durch Mikroinjektion von cADPR (Guse et al. 1997). Diese resultierte dabei in einem langanhaltenden Calcium-

Signal, das fast vollständig von der Anwesenheit extrazellulären Calciums abhängig war (Guse et al. 1997). Das cADPR-aktivierte Signal wurde spezifisch durch den cADPR-Antagonisten NH₂-cADPR und durch Zn²⁺ und SK-F 96365 blockiert. Zusätzlich konnten das langanhaltende, TCR/CD3-Komplex-vermittelte Calcium-Signal und die nachfolgende T-Zell-Aktivierung sowie die Proliferation durch den membranpermeanten cADPR-Antagonisten 7-Deaza-8-Bromo-cADPR deutlich inhibiert werden (Guse et al. 1999). Diese Befunde implizieren für cADPR neben seiner primären Wirkung auf die Calcium-Freisetzung ebenfalls eine Bedeutung für den Calcium-Einstrom.

1.7 Ryanodin-Rezeptoren

Ryanodin-Rezeptoren sind hochmolekulare Homotetramere. Jedes Ryanodin-Rezeptor-Monomer besteht aus etwa 5.000 Aminosäuren und besitzt ein ungefähres Molekulargewicht von 560kDa. Bisher wurden aus Vertebraten drei Isoformen kloniert, sequenziert und als RyR-1 (Takehima et al. 1989; Zorzato et al. 1990), RyR-2 (Otsu et al. 1990; Tunwell et al. 1996) und RyR-3 (Giannini et al. 1992; Hakamata et al. 1992; Sonnleitner et al. 1998) bezeichnet. Jede Isoform wird separat durch ein eigenes Gen kodiert (*ryr1*, *ryr2* bzw. *ryr3*) (Shoshan-Barmatz & Ashley 1998). RyR-1 wird vorwiegend im Skelettmuskel exprimiert, wurde aber ebenfalls in Purkinje Zellen des Kleinhirns und in geringerem Maße in anderen Geweben nachgewiesen (Giannini et al. 1995; Ogawa et al. 1999). RyR-2 ist die dominante Form im Herzmuskel, wird aber auch im Gehirn exprimiert (Nakai et al. 1990; Otsu et al. 1990). RyR-3, der zuerst im Lungenepithel entdeckt wurde, wird in einer Vielzahl von Geweben und Zellen exprimiert, wie z.B. im Gehirn, Skelettmuskel, der glatten Muskulatur und T-Lymphozyten (Giannini et al. 1992; Hakamata et al. 1992; Sorrentino & Volpe, 1993; Giannini et al. 1995). Die Aminosäure-Sequenzen der unterschiedlichen Isoformen weisen einen hohen Prozentsatz an Identität auf. Zwischen den drei Subtypen aus Kaninchen liegt die Identität bei 65-68% (Huang & Miller, 1991). Bereiche mit hoher Homologie erstrecken sich vor allem im C-terminalen Bereich der Proteine. Dennoch existieren auch stark divergente Regionen. Putative Transmembran-Regionen der RyR sind C-terminal in den letzten 1.000 Aminosäuren lokalisiert. Innerhalb dieser Region zeigten Hydrophobizitäts-Analysen hydrophobe Segmente, die zwischen den verschiedenen Isoformen konserviert sind. Da sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus im Cytoplasma lokalisiert sind, müssen Ryanodin-Rezeptoren eine gerade Anzahl an Transmembranregionen aufweisen (Grunwald & Meissner, 1995). Die genaue Anzahl der Transmembrandomänen ist bisher nicht geklärt. Es wurden 3 Transmembran-Modelle vorgeschlagen: ein 4 Transmembran- (Takehima et al. 1998), ein 12 Transmembran- (Zorzato et al. 1990) und ein 6 Transmembran-Modell (Tunwell et al. 1996). Die Verwendung verschiedener, mit gleicher Affinität

bindender anti-RyR-Antikörper, die entweder nur in intakten oder permeabilisierten Zellen ihr Epitop banden, ermöglichte die Zuweisung von luminalen und cytosolischen Bereichen innerhalb des RyR (Grunwald & Meissner 1995). Die Ergebnisse dieser Studien stimmten absolut mit dem 4 Transmembran-Modell überein.

Putative Bindungsstellen für Calcium konnten entlang der gesamten Sequenz identifiziert werden (Chen et al. 1993). Ebenso existieren putative Calmodulin-Bindungsstellen (Chen & MacLennan, 1994). Jedes RyR-Monomer besitzt eine FKBP-Bindungsstelle. Dieses akzessorische Protein stabilisiert wahrscheinlich den funktionalen Status der RyR-Monomere und vereinfacht dadurch die koordinierte Steuerung (Brillantes et al. 1994). Bindungsstudien mit [³H]-Ryanodin legen die Vermutung nahe, dass der funktionale tetramere Rezeptor eine Bindungsstelle für das Alkaloid besitzt, die in der offenen Konformation zugänglich ist. Somit liegt die Ryanodin-Bindungsstelle wahrscheinlich in der Poren-Region (Williams et al. 2001).

Ryanodin-Rezeptoren sind in zahlreichen Zell-Systemen an der Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern beteiligt und ihre Regulation scheint vom Zelltyp abzuhängen. Calcium, Magnesium, ATP und akzessorische Proteine, wie Calmodulin und Calsequestrin, sind physiologische Modulatoren des Kanals. Zu den auf den RyR agonistisch wirkenden Substanzen gehören Coffein und Ryanodin in niedrigen Konzentrationen (< 1µM). RyR-Antagonisten sind Ruthenium Rot und Ryanodin in hohen Konzentrationen (> 1µM).

Wirkung von cADPR auf Ryanodin-Rezeptoren in verschiedenen Zellsystemen

In mehreren Säugetier-Zelltypen sind Effekte von cADPR auf Ryanodinrezeptoren beschrieben worden. Der RyR-3 wird im Gehirn (Furuichi et al. 1994), im Zwerchfellmuskul der Ratte (Sonnleitner et al. 1998) und in T-Lymphozyten exprimiert (Guse et al. 1999). In jedem dieser Zelltypen sind spezifische Effekte von cADPR auf Ryanodin-Rezeptoren beobachtet worden, entweder durch die Erhöhung der Einzelkanal-Aktivität in künstlichen Lipid-Doppelschicht-Experimenten (Meszaros et al. 1993), durch Freisetzung von [⁴⁵Ca²⁺] aus Gehirn-Mikrosomen (Meszaros et al. 1993), durch den stimulatorischen Effekt auf die Assoziationsgeschwindigkeit von [³H]-Ryanodin an T-Zell-Membranpräparationen (Guse et al. 1999) oder durch die Verschiebung der Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR-Kanäle hin zu niedrigeren Calcium-Konzentrationen im Zwerchfellmuskul (Sonnleitner et al. 1998). Meszaros und Kollegen zeigten in Lipid-Doppelschicht-Experimenten („planar lipid bilayers“), in denen der RyR elektro-physiologisch analysiert wurde, und durch die Freisetzung von [⁴⁵Ca²⁺] aus Mikrosomen ebenfalls cADPR-Effekte auf den RyR-2 (Meszaros et al. 1993). Eine Aktivierung des RyR-2 durch cADPR konnte auch in PC12-Zellen nachgewiesen werden (Clementi et al. 1996). Für den Effekt von cADPR auf den RyR-1 konnten bisher keine eindeutigen Daten

erhoben werden (Morrisette et al. 1993; Fruen et al. 1994; Sitsapesan et al. 1994). Somit scheinen die Ryanodin-Rezeptoren 2 und 3 die Zielproteine für cADPR zu sein.

Ryanodin-Rezeptoren in Immunzellen

Die Bedeutung von Ryanodin-Rezeptoren für die Calcium-Signalgebung in T- und B-Lymphozyten wird immer deutlicher. In Jurkat T-Zellen konnte die Expression des RyR-3 von mehreren Arbeitsgruppen bestätigt werden (Vergleiche Kapitel 1.5: Hakamata et al. 1994; Bourguignon et al. 1995; Guse et al. 1999). In den letzten Jahren wurden auch der RyR-1 und RyR-2 in verschiedensten Immunzellen nachgewiesen. Hosoi und Mitarbeiter zeigten die Expression von Ryanodin-Rezeptoren in einer Vielzahl von T- und B-Zelllinien. Der RyR-1 wurde unter anderem in CD19⁺ positiven B-Zellen und in CD3⁺ positiven T-Zellen und CD14⁺ positiven Monozyten exprimiert. RyR-2 konnte hauptsächlich in CD3⁺ positiven T-Zellen detektiert werden (Hosoi et al. 2001).

Die potentielle Bedeutung der RyR für die Signalgebung in T-Lymphozyten ist in Kapitel 1.5 ausführlich beschrieben worden (vergleiche Arbeiten von Guse et al. 1995, 1997, 1999). Weitere Hinweise für die Beteiligung der RyR am Calcium-Signal in Immunzellen lieferten Sei und Mitarbeiter, die demonstrierten, dass in humanen primären CD19⁺ positiven B-Zellen und DAKIKI-Zellen der RyR-1 an der BCR-vermittelten Calcium-Freisetzung beteiligt ist (Sei et al. 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass in IP₃R-defizienten DT40 B-Zellen, die RyR-1 und RyR-3 exprimierten, RyR die Aktivierung von plasmamembran-ständigen Calcium-Kanälen steuerten (Kiselyov et al. 2001).

Die hier und in Kapitel 1.5 aufgeführten Daten liefern deutliche Hinweise darauf, dass neben den IP₃R ebenfalls RyR an der Calcium-Signaltransduktion in Immunzellen beteiligt sind.

1.8 Problemstellung

Die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration nach Aktivierung von T-Lymphozyten über den TCR/CD3-Komplex ist essentiell für deren Immunreaktivität. Wird der Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration blockiert, kommt es zur Reduktion der IL-2-Expression, der IL-2R-Expression und der T-Zell-Proliferation (Gardner 1989). Neben IP_3 ist auch cADPR als Calcium-mobilisierende Substanz in T-Lymphozyten wirksam. Die mit dem cADPR-Antagonisten 7-Deaza-8-Bromo-cADPR erhobenen Daten zeigten eindeutig die Beteiligung von cADPR am langanhaltenden Calcium-Signal in T-Lymphozyten (Guse et al. 1999). Bindungsstudien mit [3H]-Ryanodin demonstrierten in Gegenwart von cADPR eine erhöhte Assoziationsgeschwindigkeit von Ryanodin an seinen Rezeptor und damit einen modulatorischen Effekt von cADPR auf den in Jurkat T-Zellen exprimierten Ryanodin-Rezeptor Typ3 (Guse et al. 1999). Aus diesen pharmakologisch orientierten Vorarbeiten ergab sich die folgende, mehr molekularbiologisch orientierte Problemstellung für die vorliegende Dissertation:

Zunächst sollte untersucht werden, ob neben dem RyR-3 noch andere Ryanodin-Rezeptor Subtypen in Jurkat T-Zellen exprimiert werden.

Im Hauptteil dieser Arbeit sollten die sich auf pharmakologisch erhobene Daten stützenden Hinweise, dass cADPR seine Wirkung über den Ryanodin-Rezeptor entfaltet, durch einen molekularbiologischen Ansatz erweitert werden.

Dazu sollten durch stabile Transfektion von antisense-Fragmenten eine RyR-3-defiziente Jurkat T-Zelllinie und eine Jurkat T-Zelllinie generiert werden, in der alle drei möglicherweise in Jurkat T-Zellen vorkommenden Ryanodin-Rezeptoren funktional ausgeschaltet sind.

Die Bedeutung des RyR-3, sowie gegebenenfalls zusätzlicher in Jurkat T-Zellen vorhandener RyR-Isoformen für die Calcium-Signalgebung sollte durch ratiometrisch-fluorimetrische Calcium-Messungen an diesen beiden Zelllinien erarbeitet werden.

Die Wirkung von cADPR auf die Ryanodin-Rezeptoren sollte durch Calcium-Freisetzungsexperimente mit cADPR an permeabilisierten Zellen der RyR-defizienten-Linien analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte, Materialien und Reagenzien

2.1.1 Verwendete Geräte

Varifuge 3.OR	Heraeus (Hanau)
CO ₂ -Inkubator	Heraeus (Hanau)
Sterile Werkbank	BDK (Sonnenbühl-Genkingen)
Lichtmikroskop	Will (Wetzlar)
Fluoreszenz-Spektrometer Hitachi F-2000	Colora Messtechnik (Lorch)
Kühlzentrifuge	RC2B, Sorvall (Bad Homburg)
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus (Hanau)
Mikrotiterplatten-Photometer	MWG-Biotec (Ebersberg)
Elektrophorese-Kammer Mighty Small II	Hoefer Scientific Instruments (San Fransisco, USA)
Sequenzierautomat ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Perkin-Elmer (Weiterstadt)
Trans-Blot™ Cell	BioRad (München)
Wasserbad Thermomix UB	Braun (Melsungen)
Tischzentrifuge Mikro Rapid/K	Hettich (Tuttlingen)
Waage Precisa 400 M	Pak Oerlikon (Zürich, Schweiz)
Analysenwaage HS4	Mettler (Giessen)
Schüttler WT12	Whatman (Göttingen)
Gelelektrophoreseapparaturen GNA-100/ GNA-200	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Powersupply Power-Pac 3000	Bio-Rad (München)
UV-Transilluminator IL-350-M ($\lambda=321\text{nm}$)	Bachhofer (Reutlingen)
Brutschrank BE 500	Memmert (Schwabach)
Zentrifuge Superspeed RC2-B, Rotor SS-34	Sorvall (Newtown, USA)
PCR-Cycler Mastercycler Personal	Eppendorf-Netheler-Hinz (Hamburg)
PCR-Gradientencycler Mastercycler Gradient	Eppendorf-Netheler-Hinz (Hamburg)
Vortex-Mischer VF-2	IKA-Labortechnik (Staufen)
Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz (Hamburg)

2.1.2 Verwendete Materialien und Reagenzien

Steriles Kunststoffmaterial für Zell- und Bakterienkultur	Nunc (Wiesbaden), Falcon (BD, Heidelberg), Greiner (Hamburg)
Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht), Eppendorf-Netheler-Hinz (Hamburg)
Lösungsmittel	Mallinckrodt Baker (Griesheim), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Chemikalien	Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Biomol (Hamburg), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg)
Chemikalien für die Molekularbiologie	FMC Bioproducts (Rockland, USA), Biozym (Hessisch Oldendorf), PeqLab (Erlangen), Applichem (Darmstadt)
Zellkulturmedien und Zusätze	GibcoBRL (Eggenstein), Biochrom (Berlin-Buch), Roche (Mannheim)
Bakteriologische Medienbestandteile	Difco (BD, Heidelberg), Becton Dickenson (Sparks, USA), Applichem (Darmstadt)
Röntgenfilme, Hyperfilm	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Protein Molekulargewichtsmarker, vorgefärbt	Bio-Rad (München)
Antikörper	Calbiochem (Bad Soden), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
Ionomycin, freie Säure	Calbiochem (Bad Soden)
Fura 2/AM	Calbiochem (Bad Soden)
Fura2, freie Säure	Calbiochem (Bad Soden)
ATP	Sigma (Deisenhofen)
Creatinphosphat	Sigma (Deisenhofen)
Creatinkinase aus Kaninchenmuskel	Roche (Mannheim)
IP ₃	Biomol (Hamburg)
OKT3	Eigene Herstellung
Saponin	Sigma (Deisenhofen)
cADPR	Sigma (Deisenhofen) und eigene Herstellung

DNA modifizierende Enzyme	MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Roche (Mannheim)
Oligonukleotide, HPLC gereinigt	MWG-Biotec (Ebersberg), Clontech (Heidelberg)
DNA Molekulargewichtsmarker	MBI Fermentas (St.Leon-Rot)
<i>Pfu</i> Turbo DNA Polymerase	Stratagene (La Jolla, USA)
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Promega (Mannheim)

Spezielle Reagenzien und Kits sind bei den einzelnen Methoden aufgeführt.

2.1.3 Verwendete Zellen

Hauseigener *E.coli*. K12 Stamm XL1-blue, Genotyp: F[']:: *Tn10 pro A⁺B⁺ lacIqΔ (lacZ)M15 recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17(r_k⁻m_k⁺) supE44 relA1 lac*

Tet-On Jurkat T-Zellen (Clontech, Heidelberg, Katalog-Nummer: C3009-1): humane T-Lymphoma-Zelllinie, stabil transfiziert mit pTet-On (Clontech, Heidelberg, Katalog-Nummer: K1621-A)

2.1.4 Puffer und Lösungen

Blocklösung: TBST mit 5% (w/v) fettarmen Milchpulver

Blotpuffer: 25mM Tris-HCl pH 8,5; 192mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; 0,1% (w/v) SDS

Calciummesspuffer: 20mM Hepes; 5mM KCl; 140mM NaCl; 1mM NaH₂PO₄; 1mM MgSO₄ ; 1mM CaCl₂ ; 5,5mM Glucose; in bidest. Wasser lösen und pH 7,4 mit KOH einstellen.

Coomassie-Entfärbelösung: 40% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure

Coomassie-Färbelösung: 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue; 40% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure

10x DNaseI-Puffer: 20mM Tris-HCl pH 8; 10mM MgCl₂

10x FA Gel Puffer für RNA Gele: 200mM MOPS; 50mM Natriumacetat; 10mM EDTA

Hepes-Puffer: 1mM Hepes, pH 7,4 mit NaOH einstellen, steril filtrieren

Intrazellulärpuffer: Puffer A ohne EGTA und ohne DTT

4x Laemmli-Puffer: 83,3mM Tris-HCl; pH 6,8; 8% (w/v) SDS; 40% Glycerol; 0,05% (w/v) Bromphenolblau; β-Mercaptoethanol wurde in einer finalen Konzentration von 5% (v/v) jeweils frisch zur Probe zugegeben

Luria Bertani (LB) Medium: 10g/l NaCl; 5g/l Hefeextrakt; 10g/l Trypton; Das Medium wurde autoklaviert und entsprechende Antibiotika danach frisch zugesetzt.

LB Selektivagar: 15g/l Agar in LB Medium; Nach dem Autoklavieren wurde der Agar auf 50°C temperiert, mit entsprechenden Antibiotika versetzt und in Petrischalen gegossen.

Lysispuffer: 110mM NaCl; 20mM Hepes; pH 7,4 mit NaOH einstellen

Puffer A: 20mM Hepes; 110mM KCl; 10mM NaCl; 2mM MgCl₂; 5mM KH₂PO₄; 2mM DTT; 2mM EGTA; pH 7,2

Puffer A mit Saponin: Puffer A mit 30µg/ml Saponin und 0,5mM EGTA

Puffer B: Puffer A ohne EGTA

5x RNA Auftragspuffer: 0,25% (w/v) Bromphenolblau; 4mM EDTA; 2,7% (v/v) Formaldehyd; 20% (v/v) Glycerol; 30,84% (v/v) Formamid in 4x FA Gel Puffer

RF I-Puffer: 30mM Kaliumacetat; 100mM RbCl; 10mM CaCl₂; 50mM MnCl₂; 15% (v/v) Glycerol; pH 5,8 mit Essigsäure einstellen, steril filtrieren

RF II-Puffer: 10mM MOPS; 75mM CaCl₂; 10mM RbCl; 15% (v/v) Glycerol; pH 6,5 mit Essigsäure einstellen, steril filtrieren

SDS-Elektrodenpuffer: 25mM Tris pH 8,5, 192mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS

SDS Sammelgel (3%): 125mM Tris pH 6,8; 3% (v/v)Acrylamid; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED

SDS Trenngel (6%): 375mM Tris pH 8,8; 6% (v/v) Acrylamid; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED

TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer: 40mM Tris; 1mM EDTA; 0,11% (v/v) Essigsäure

TBS (Tris gepufferte Salzlösung): 150mM NaCl, 100mM Tris-HCl, pH 7,4

TBST (Tris gepufferte Salzlösung/Tween 20): TBS mit 0,1% (v/v) Tween 20

2.2 Methoden

2.2.1 Nachweis der RNA von Ryanodin-Rezeptor Subtypen und Herstellung von Ryanodin-Rezeptor antisense-Konstrukten

2.2.1.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Tet-On Jurkat T-Zellen und humanem Hirngewebe

Zur Präparation der Hirn- und der Tet-On Jurkat RNA wurden 100mg der Gewebeprobe bzw. 1×10^7 Zellen in 2ml TriReagent (Sigma) aufgenommen und homogenisiert. Anschließend wurde 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Probe wurde mit 400µl Chloroform ausgeschüttelt und 15 Minuten unter Vermeidung einer Phasentrennung bei RT gehalten. Zur Trennung der Phasen wurde bei 12000 xg und 4°C 15 Minuten zentrifugiert. Die Ausfällung und Pelletierung der RNA aus der wässrigen Phase erfolgte mit 1ml Isopropanol bei RT für 10 Minuten und anschließender Zentrifugation bei 12000 xg und 4°C für 15 Minuten. Das Pellet wurde mit 75%-igem Ethanol gewaschen und die getrocknete RNA in RNase freiem bidest. Wasser gelöst. Zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen wurden 500µg RNA mit 10 U DNaseI (Roche) in 1x DNaseI-Puffer für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die nachfolgende Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 65°C für 15 Minuten. Anschließend wurde die RNA-Lösung aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Zur Quantifizierung wurde mit einer geeigneten Verdünnung der RNA-Präparation ein UV Absorptionsspektrum aufgenommen. Zur Abschätzung der RNA-Konzentration diente die Formel $1,0 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 40\mu\text{g/ml}$.

2.2.1.2 Formaldehyd-Agarose (FA) Gelelektrophorese

Zur Qualitätskontrolle der isolierten RNA wurden RNA-Aliquots mit 1/5 Volumen 5x RNA-Auftragspuffer gemischt, 5 Minuten auf 65°C erhitzt und bis zur Elektrophorese auf Eis abgeschreckt. Für das FA-Gel wurden 1,2g Agarose in 100ml 1x FA-Gel-Puffer durch Sieden gelöst und auf 50°C temperiert. Anschließend wurden 0,1µg/ml Ethidiumbromid und 1,8 ml Formaldehyd (37%) zugesetzt und die Lösung in den Gelträger gegossen. Vor dem Lauf wurde das Gel 30 Minuten in 1x FA-Gel-Laufpuffer (=1x FA-Gel-Puffer mit 0,74% (v/v) Formaldehyd) equilibriert. Die Elektrophorese erfolgte in 1x FA-Gel-Laufpuffer bei 7 V/cm.

2.2.1.3 Klonierungsstrategie

1. Zum Nachweis der Ryanodin-Rezeptor Subtypen 1 bis 3 in Tet-On Jurkat T-Zellen und Hirn wurden über RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion) mit Subtyp-

spezifischen Primern die cDNAs der jeweiligen Fragmente hergestellt. Als Template diente dabei Gesamt-RNA aus Tet-On-Jurkats und Hirn. Auf Grund der nach der RT-PCR im Gel nur schwach oder gar nicht sichtbaren Amplikons wurde anschließend noch eine Nested PCR durchgeführt. Die Fragmente wurden später zur Sequenzierung über TA-Überhänge in den pGemT-easy Vektor kloniert (2.2.1.7, Tab.2.1).

Primername	Sequenz (5'→3')	Fragmentgrößen
RYR1sense	TTG CTG AGC TAC TGG GCA TGG	
RYR1anti	TCA GGT TCA TCC TCA TCC TCG	
RYR1senseN	GGC CAC ACT AGA GAT CAC AGC	324bp
RYR1antiN	ACG GTG TAC AGG TAG ACG ACC	
RYR2sense	CCC ACG TTG CGT ATC TTA GC	
RYR2anti	CAA CAG CTA ATA AGC CAA CGG	
RYR2senseN	AAG GCC AGT GGG ATA GAC TCG	368bp
RYR2antiN	TCC CAT AGC AAT GTC GAG AAG G	
RYR3sense	GAT CTC TAC GGA GCA GAA CGC	
RYR3anti	GTA ACA CGT CAT CAT GAT GTC GCA G	
RYR3senseN	TTA GCC CAG TAG AAG AGA CC	371bp
RYR3antiN	TTC ATA TCG GGC TCG TCA TCG	

Tab.2.1: Ryanodin-Rezeptor Subtyp-spezifische Primer; N = Nested Primer

2. Zur Herstellung der Ryanodin-Rezeptor antisense-Konstrukte wurden über RT-PCR und nachfolgende Nested PCR mit Ryanodin-Rezeptor Typ3 spezifischen Primern zwei verschiedene cDNA-Fragmente aus dem C-Terminus dieses Subtypen synthetisiert. Als Template diente Gesamt-RNA aus Tet-On Jurkat T-Zellen. Über die Primer für die Nested PCR wurden 5'-terminal eine *HindIII*-Schnittstelle (Sequenz unterstrichen) und 3'-terminal eine *BamHI*-Schnittstelle (Sequenz unterstrichen) eingeführt (Tab.2.2.).

Primername	Sequenz (5'→3')	Fragmentgrößen
240sense	AGC CCG ATA TGA AGT GC	
240anti	CAA TCC CAC AGA TGA AAC	
240senseN	CAT <u>AAG CTT</u> CGA CAT GAT GAC GTG TTA CC	240bp
240antiN	CTA <u>GGA TCC</u> TTA GTC TCC ATA TCT TCT CG	
511sense	GTG AAG AGG AAT GTC ACC	
511anti	CAA CCT TCT GAC CAC ACC	
511senseN	CTA <u>AAG CTT</u> TCC AGT TGC TCT TCA CCA TCC	511bp
511antiN	CTA <u>GGA TCC</u> CAC AGG TAC TCA GCT TGC TCC	
EGFPsense	TGA AGT TCG AGG GCG GAC ACC	
EGFPanti	GTG ATC GCG CTT CTC GTT GG	
EGFPsenseN	CTA <u>AAG CTT</u> TGG TGA ACC GCA TCG AGC	250bp
EGFPantiN	CTA <u>GGA TCC</u> CTC AGG TAG TGG TTG TCG	

Tab.2.2: Klonierungsprimer für antisense Konstrukte; N = Nested Primer

Die PCR-Produkte wurden anschließend mit *BamHI* und *HindIII* geschnitten und in die

BamHI/HindIII-Schnittstelle des eukaryotischen Expressionsvektors pTRE2 einkloniert. Da auf dem Vektor die *BamHI*-Schnittstelle 5'-terminal und die *HindIII*-Schnittstelle 3'-terminal lokalisiert sind, kommt es zur Integration des Fragments in der antisense-Orientierung.

Zusätzlich wurde mittels PCR aus dem Plasmid pEGFP-N1 (Clontech) mit spezifischen Primern ein 250bp großes Fragment des EGFP (enhanced green fluorescent protein) amplifiziert und ebenfalls über *BamHI/HindIII*-Schnittstellen in pTRE2 einkloniert.

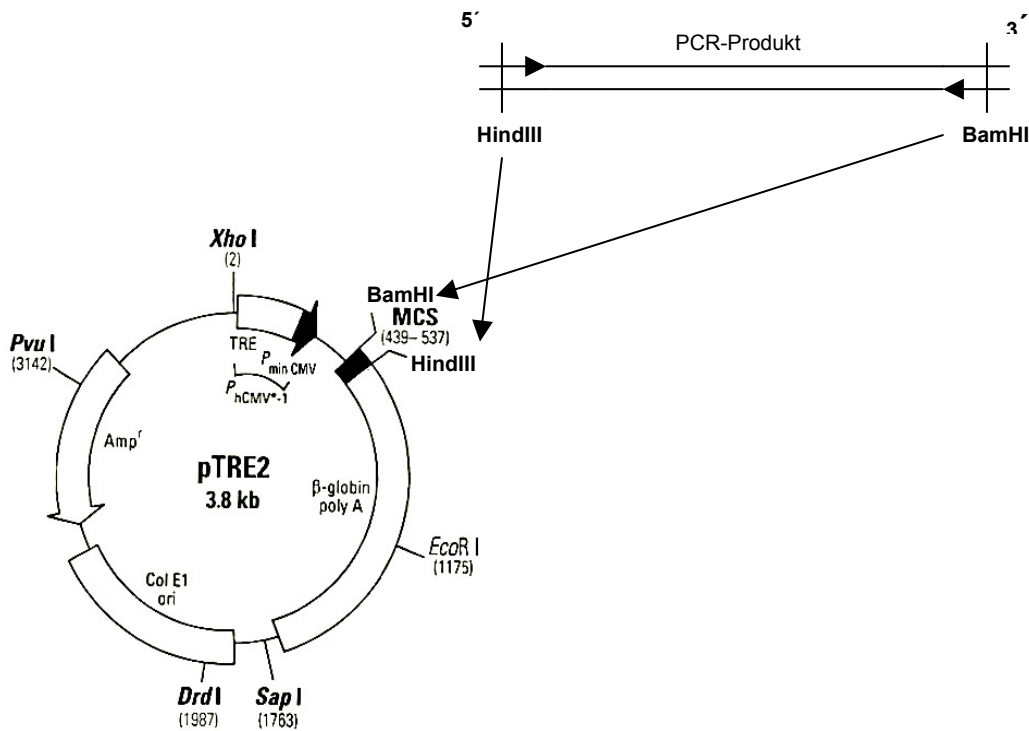


Abb.2.1: Klonierungsstrategie

Die Vektorkarte des eukaryotischen Expressionsplasmids pTRE2 zeigt die Multiple Klonierungsstelle (MCS) mit den *BamHI*- und *HindIII*-Schnittstellen. 5' davon ist der Tet responsive Promotor ($P_{hCMV^{-1}}$), bestehend aus dem Tet responsiven Element (TRE) und dem minimalen CMV Promotor (P_{minCMV}), lokalisiert. Außerdem trägt der Vektor ein Ampicillin-Resistenz-Gen (Amp^r). Über PCR und nachfolgende Nested PCR wurden zwei Fragmente des Ryanodin-Rezeptors Typ 3 und ein Fragment des EGFP synthetisiert. Über die Nested Primer wurden jeweils 5'-terminal eine *HindIII*- und 3'-terminal eine *BamHI*-Schnittstelle eingeführt. Die Fragmente wurden mit *HindIII* und *BamHI* geschnitten und über diese Schnittstellen in den Vektor ligiert, so dass es zur Integration der Fragmente in der antisense-Orientierung kommt.

Eine Übersicht über die erhaltenen Produkte gibt Tab.2.3

Plasmid	Insert in antisense-Orientierung	Produktname
pTRE2	240bp RYR Typ3 C-Terminal (bp14200-14439 der mRNA)	pTRE2-240
pTRE2	511bp RYR Typ3 C-Terminal (bp12657-13167 der mRNA)	pTRE2-511
pTRE2	250bp EGFP (bp359-608 der cDNA)	pTRE2-EGFP

Tab.2.3: Beschreibung der klonierten antisense-Konstrukte

2.2.1.4 One Tube RT-PCR

Sowohl zur Amplifizierung der RyR-Subtypen als auch zur Herstellung der antisense-Fragmente wurde das Titan™ One Tube RT-PCR System (Roche) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Master Mix 1:		Master Mix 2:	
0,2mM	dNTP Mix*	10µl	5x RT-PCR Puffer
0,4µM	sense Primer	1µl	Enzym Mix ⁺
0,4µM	antisense Primer		
500ng	RNA Template		
5mM	DTT		
5U	RNase Inhibitor		
ad 25µl bidest. H ₂ O		ad 25µl bidest. H ₂ O	

Zahl der Zyklen	Zeit	Temperatur	Prozeß
1	30 min	55°C	Erststrangsynthese
1	5 min	95°C	Initiale Denaturierung
30	30 sec	95°C	Schmelzen
	45 sec	x°C	Annealing
	45 sec	68°C	Elongation
1	7 min	68°C	finale Elongation
1	-	4°C	Lagerung

Tab.2.4: Temperaturprogramm der präparativen RT-PCR

Die Annealingtemperatur richtete sich nach den jeweiligen Primern. Da die 30 Zyklen der RT-PCR nicht ausreichten, um die Amplifikate auf einem Agarose-Gel zu visualisieren, wurde eine Nested PCR angeschlossen.

2.2.1.5 Nested PCR

Als thermostabiles Enzym zur Amplifikation der Inserts innerhalb einer Nested PCR kam *Pfu Turbo* DNA-Polymerase zum Einsatz, die über Exonukleaseaktivität verfügt und daher eine besonders niedrige Fehlerrate erreicht. Die Nested Primer sind bereits in den Tabellen 2.1 und 2.2 aufgeführt.

* dNTP Mix: dATP, dTTP, dCTP, dGTP, je 10mM, Amersham Pharmacia Biotech

⁺ AMV-RT, *Taq* Polymerase, *Pwo* Polymerase

Mix:

10µl	Template (10µl RT-PCR Ansatz)
10µl	10x Polymerase Puffer
0,2mM	dNTPs Mix*
0,4µM	sense Primer
0,4µM	antisense Primer
5U	<i>Pfu</i> Turbo DNA-Polymerase

ad 50µl bidest. H₂O

Zahl der Zyklen	Zeit	Temperatur	Prozeß
1	5 min	95°C	Initiale Denaturierung
10 oder 30	2 min	95°C	Schmelzen
	45 sec	x°C	Annealing
	45 sec	72°C	Elongation
1	7 min	72°C	finale Elongation
1	-	4°C	Lagerung

Tab.2.5: Temperaturprogramm der Nested PCR**2.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung von DNA-Fragmenten**

Die Visualisierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Auftrennung der Proben in einer horizontalen Agarosegelelektrophorese. Es wurden 2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen bis zum Sieden gelöst und mit 0,1µg/ml des interkalierenden Fluorophors Ethidiumbromid versetzt. Nach dem Abkühlen des Gels wurden die Proben mit 1/10 Volumen 10xDNA-Auftragspuffer gemischt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei 10V/cm. Als Marker wurde für alle gezeigten Gele eine DNA-Leiter mit Banden der Größen 100bp-3000bp eingesetzt.

Für präparative Zwecke wurden die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus den Agaroseblöckchen erfolgte mit Hilfe des *QIAEX II Gel Extraction Kit* (QIAGEN) nach Vorschrift des Herstellers.

2.2.1.7 Klonierungstechniken

Zur Klonierung und Präparation von Plasmiden wurde der *E.coli* K12 Stamm XL1-blue verwendet.

Genotyp: F⁺:: *Tn10 pro A⁺B⁺ lacIqΔ (lacZ)M15 recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) supE44 relA1 lac*

* dNTP Mix: dATP, dTTP, dCTP, dGTP, je 10mM, Amersham Pharmacia Biotech

1. Zur Klonierung der Ryanodin-Rezeptor Subtyp-spezifischen Fragmente wurde das Klonierungskit pGem® T-easy (Promega) verwendet. Dabei wurden die jeweiligen Fragmente über einen TA-Überhang gemäß den Herstellerangaben in den Vektor eingefügt.

2. Die antisense-Fragmente und der Expressionsvektor pTRE2 wurden mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *HindIII* geschnitten. Um eine Religation unvollständig geschnittener Vektor-DNA zu verhindern, wurde der Vektor außerdem mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (Roche) dephosphoryliert.

<u>Restriktionsansatz der Fragmente:</u>		<u>Restriktionsansatz Vektor:</u>	
20µl	der Nested PCR	1µg	pTRE2
10µl	10x Puffer R ⁺	2µl	10x Puffer R ⁺
10U	<i>BamHI</i>	5U	<i>BamHI</i>
5U	<i>HindIII</i>	2,5U	<i>HindIII</i>
ad 100µl bidest. H ₂ O		ad 20µl bidest. H ₂ O	

Der Ansatz wurde zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

Dephosphorylierungsansatz:

20µl	Restriktionsverdau des Vektors
5U	alkalische Phosphatase
3µl	10x Phosphatase-Puffer
<u>ad 30µl bidest. H₂O</u>	

Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Schließlich wurde die DNA-Konzentration aller aufgereinigter Fragmente und des Vektors auf einem analytischen 2%-igen Agarosegel durch Vergleich mit einem DNA-Standard bestimmt.

Die Ligation des Vektors mit den verschiedenen PCR-Produkten erfolgte mittels der T4 DNA-Ligase von Roche (Mannheim). Dazu wurden 50ng des geschnittenen Vektors mit einem drei- bis achtfachen molaren Überschuß des entsprechenden Inserts über Nacht bei 14°C inkubiert. Als Religationskontrolle wurde ein Ansatz mitgeführt, in dem kein Insert enthalten war.

Ligationsansatz:

50ng pTRE2 (geschnitten und dephosphoryliert)
xng RyR PCR-Produkte (geschnitten)
1µl 10x Ligase-Puffer
3U T4 DNA-Ligase

ad 10µl bis 20µl bidest. H₂O

2.2.1.8 Erzeugung kompetenter *E.coli* und Transformation

Die Methoden zur Kultivierung und Transformation sind den *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, 1994) entnommen. XL1-blue wurden in autoklaviertem Luria-Bertani Medium (LB) mit 12,5µg/ml Tetracyclin bei 37°C und 220 UpM kultiviert. Zur Selektion transformierter Bakterienklone wurden dem Medium 100µg/ml Ampicillin zugesetzt. Dauerkulturen wurden angelegt, indem eine dicht gewachsene Bakterienkultur 5:1 (v/v) mit sterilem Glycerol gemischt und bei -80°C eingefroren wurde.

Zur Erzeugung transformationskompetenter Bakterien wurde eine über Nacht gewachsene Bakterienkultur 1:100 mit LB verdünnt und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600nm} = 0,4-0,6$) bei 37°C kultiviert. Die Bakterien wurden pelletiert (5000xg, 5min, 4°C), in 1/12,5 des ursprünglichen Volumens eiskaltem RF I-Puffer resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert (5000xg, 5min, 4°C) und in 1/10 des ursprünglichen Volumens RF II-Puffer resuspendiert, für weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert und als 100µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.9 Plasmidpräparation aus *E.coli*

Zur Transformation wurde ein 100µl Aliquot kompetenter Bakterien mit 5ng Plasmid-DNA oder 10-20µl Ligationsansatz versetzt. Der Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, eine Minute auf 42°C erwärmt und für zwei Minuten auf Eis abgeschreckt. Anschließend wurde mit 1ml LB-Medium ohne Antibiotikum verdünnt und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Pelletierung der Zellen bei 5000xg, 5 Minuten, RT, wurden 1ml des Überstandes verworfen und 100µl der Bakteriensuspension auf Selektivagar ausplattiert. Die Bakterienkultur-Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden resistente Bakterienklone zur Präparation von Plasmid-DNA expandiert.

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA wurde eine geeignete Menge an Selektionsmedium (2-3ml) mit einer Einzelkolonie transformierter Bakterien beimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus bis zu 3ml Medium wurde das Silica Spin Kit (Biometra) verwendet. Größere Mengen wurden mit dem Nucleobond AX Kit (bis 100ml, Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben isoliert. Die DNA wurde anschließend in einem geeigneten Volumen zweifach destillierten Wassers gelöst. Mit einer Verdünnung der Plasmidpräparation wurde ein UV Absorptionsspektrum aufgenommen. Zur Abschätzung der DNA-Konzentration diente die Formel $1,0 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 50\mu\text{g/ml}$ (Schichtdicke: 1cm). Die Kontrolle der Plasmid-DNA erfolgte durch Restriktionsschnitte mit den Enzymen *BamHI* und *HindIII*.

2.2.1.10 Sequenzierung

Die Identität und Integrität der klonierten Expressionsplasmide wurde durch Sequenzierung verifiziert. Dazu wurde das Big Dye Terminator Cycle Sequenzierkit* verwendet, das auf einer modifizierten Kettenabbruchmethode nach Sanger beruht.

In einer Polymerasekettenreaktion werden dabei statistisch Fluorophor-gekoppelte Didesoxy-Nucleosidtriphosphate (ddNTP's) eingefügt, die zum Kettenabbruch und zur gleichzeitigen Markierung der synthetisierten PCR-Fragmente führen. Da die vier verschiedenen ddNTP's mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, reicht ein Reaktionsansatz zur Sequenzierung aller vier Basen aus. Für alle antisense-Konstrukte wurde jeweils eine Sequenzierreaktion mit innerhalb des Fragments liegenden sense und antisense Primern nach Angaben des Herstellers durchgeführt:

Sequenzieransatz:

500ng	Plasmid-DNA
15pmol	Primer
3µl	Big Dye
5µl	Half Term Puffer

ad 20µl bidest. H₂O

Die Sequenzierreaktion wurde im Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt.

* ABI PRISM Big Dye Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit, PE applied biosystems (Weiterstadt)

Zahl der Zyklen	Zeit	Temperatur	Prozeß
25	10 sec	95°C	Schmelzen
	5 sec	50°C	Annealing
	240 sec	60°C	Elongation
1	-	4°C	Lagerung

Tab.2.6: Temperaturprogramm der Sequenzierung

Anschließend wurde die DNA durch Ethanolfällung gereinigt und durch Kapillar-Gelelektrophorese im ABI PRISM 310 Genetic Analyzer durch die Servicegruppe des Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie unter der Leitung von Dr. F. Buck analysiert.

2.2.2 Herstellung der doppelt stabil transfizierten RyR-defizienten Tet-On

Jurkat T-Zelllinien

Als Modellsystem für die Untersuchung des cADPR vermittelten Calcium-Signalweges in T-Lymphozyten diente das induzierbare Tet-On Expressionssystem von Clontech (modifiziert nach Gossen et al. 1995).

Als Ausgangs-Zelllinie wurden kommerziell erhältliche Tet-On Jurkat T-Zellen verwendet. Diese Zelllinie trägt das Kontrollplasmid pTet-On, das für das Tetracyclin kontrollierte Transaktivatorprotein rTA, einem Fusionsprotein aus der viralen VP16 Aktivator-domäne und dem reversen Tet-Repressor (rTetR) kodiert. Seine Zielsequenz (TRE) ist stromaufwärts zum inaktiven minimalen CMV-Promotor des Expressionsplasmids pTRE lokalisiert. In Anwesenheit von Tetracyclin bindet das Transaktivatorprotein an seine Zielsequenz und aktiviert so die Transkription. Dieses System bietet dadurch eine strikt regulierte Transkriptionskontrolle.

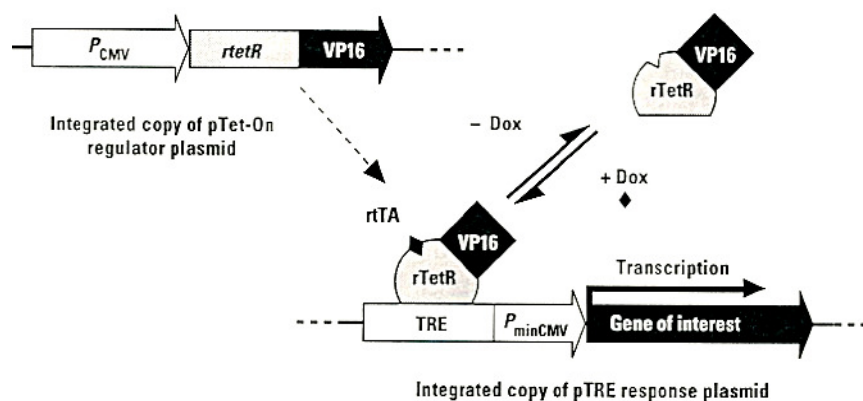


Abb.2.2: Prinzip des Tet-On-Expressionssystems

Das regulatorische Plasmid pTet-On kodiert für den reversen Transaktivator. Der Tetracyclin kontrollierte reverse Transaktivator (rTA) ist ein Fusionsprotein aus dem Wildtyp Repressor (tetR) und der VP16 Aktivierungsdomäne des Herpes Simplex Virus. Das reverse Transaktivator Gen

(*rtetR* / VP16) wird durch den starken CMV-Promotor (P_{CMV}) kontrolliert, was zu seiner konstitutiven Expression führt. In Anwesenheit von Doxycyclin (Dox) oder Tetracyclin bindet das reverse Transaktivatorprotein (rtTA) an das Tet responsive Element (TRE). Das TRE ist stromaufwärts vom minimalen CMV-Promotor (P_{minCMV}) auf dem responsiven Plasmid pTRE2 lokalisiert, der durch Fehlen starker Enhancer Elemente, die normalerweise mit dem CMV-Promotor assoziiert sind, inaktiv ist. Durch die Bindung des rtTA an TRE kommt es zur Aktivierung der Transkription.

2.2.2.1 Passage von Tet-On Jurkat T-Zellen

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Zur Zellzählung wurde eine Probe der Zellsuspension 1+1 (v/v) mit Trypanblaulösung (0,4%) gemischt und mit Hilfe einer Neubauer-Kammer im Lichtmikroskop gezählt. Trypanblau dringt in die Zelle ein und wird von lebenden Zellen aktiv ausgeschieden, während geschädigte oder tote Zellen sich blau färben.

Tet-On Jurkat T-Zellen wurden in RPMI 1640 mit Glutamax I mit 10 % (v/v) FBS (tetracyclinfrei, Biochrom), 25mM HEPES, 100U/ml Penicillin, 50µg/ml Streptomycin und 400µg/ml G418-Sulfat kultiviert und alle 2-3 Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen mit frischem Medium auf eine Dichte von $0,3 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt und bis zu einer maximalen Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml expandiert. Tet-On Jurkat-Sublinien wurden zusätzlich mit 50µg/ml Hygromycin B und 1mM Pyruvat kultiviert.

2.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen wurden in einer Dichte von $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml in FCS (GibcoBRL) mit 10% DMSO eingefroren. Dazu wurden die Zellen in 0°C kaltem FCS/DMSO auf die entsprechende Zellzahl eingestellt und in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden über Nacht bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Bei Bedarf wurden die Zellen dem Stickstoffgefäß entnommen, bei 37°C im Ethanol-Bad aufgetaut und 2-3 mal in 10ml Medium gewaschen (1200 UpM, 5min, RT). Anschließend wurden die Zellen in 10ml frischem Medium aufgenommen, im Brutschrank kultiviert und gegebenenfalls am nächsten Tag nochmals passagiert.

2.2.2.3 Transfektion eukaryotischer Zellen

Zur Herstellung doppelt stabil transfizierter Zelllinien wurden Tet-On Jurkat T-Zellen mit dem Expressionsplasmid pTRE2 und dem Selektionsplasmid pTK-Hyg durch Elektroporation cotransfiziert. Hierbei werden durch Applikation kurzer Pulse hoher Intensität die Plasmamembranen der Zellen perforiert. Im Medium befindliche DNA ist dadurch in der Lage, in das Zellinnere zu diffundieren. Zuvor waren die Träger-DNA (pTRE2+Insert) mit *AatII* und das Selektionsplasmid pTK-Hyg mit *HindIII* linearisiert worden, durch Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt und in sterilem H₂O aufgenommen worden. Es wurden 2×10^7 Zellen in einer Elektroporationsküvette in 400µl Medium vorgelegt. Jeweils 40µg der entsprechenden linearisierten Träger-DNA

(antisense-Konstrukt) wurden mit 2µg des linearisierten Selektionsplasmids (pTK-Hyg) in sterilem zweifach destilliertem Wasser gemischt und zu den Zellen gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 0,2kV und einer Kapazität von 960µF. Anschließend wurden die Zellen 20 Minuten in der Küvette bei RT stehen gelassen und in 10ml komplettem Medium aufgenommen und kultiviert. Die Überlebensrate lag bei 50-60%.

2.2.2.4 Selektion und Klonierung stabiler Klone

48h nach Elektroporation wurden die Zellen durch Gabe von Hygromycin B vier Wochen selektioniert. Eine Woche nach Beginn der Selektion mit 50µg/ml wurde die Hygromycin-Konzentration für drei Tage auf 100µg/ml, anschließend auf 200µg/ml für vier Tage heraufgesetzt und für die letzten zwei Wochen der Selektion wieder auf 50µg/ml Hygromycin gesenkt.

Die überlebenden Hygromycin B resistenten Zellen wurden mittels „limited dilution“ kloniert. Dazu wurden die Zellen in einer Verdünnung von 0,3 Zellen pro well in einer 96 well Mikrotiterplatte in unter 2.2.2.1 beschriebenem Medium in Anwesenheit von 1mM Natrium-Pyruvat ausgesät und vier Wochen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Isolierte Klone wurden wie unter 2.2.2.1 beschrieben in RPMI 1640 Medium mit Glutamax I mit 10% FBS (tetracyclinfrei), 1mM Pyruvat, 100U/ml Penicillin, 50µg/ml Streptomycin, 400µg/ml G418 Sulfat und 50µg/ml Hygromycin B expandiert.

2.2.3 Auswahl und Charakterisierung der stabil transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen

Da der zur Transfektion verwendete Expressionsvektor nicht über ein Reportergen verfügte, wurden keine typischen Reportergenassays zur Evaluierung der Klone durchgeführt. Stattdessen erfolgte die Charakterisierung der Klone auf DNA -, RNA - und Proteinebene.

2.2.3.1 Genomische PCR

Die stabile Integration der antisense-Konstrukte in das Genom der Zellen wurde durch genomische PCR überprüft. Dazu erfolgte die Isolierung genomischer DNA jedes Klons mit Hilfe des Invisorb® Cell DNA Mini HTS 96-Kit/V (Invitac) gemäß den Herstellerangaben. Die PCR verlief mit 500ng Template über 40 Zyklen. Der sense und antisense Primer umspannten dabei einen 208bp großen Bereich der MCS des Expressionsplasmids pTRE2, so dass folgende Größen erwartet wurden:

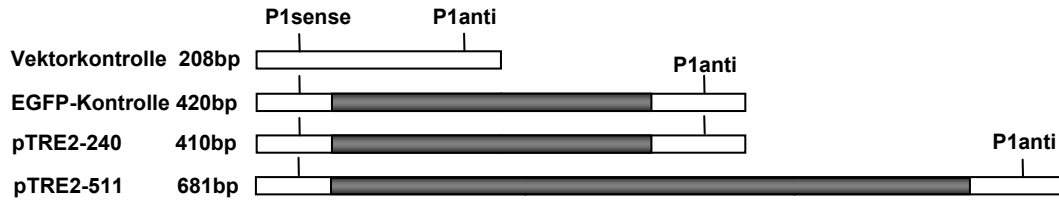


Abb.2.3: Lokalisation der Primer und Größen der Amplikons

Durch die Lokalisation der Primer 5'-terminal in der Promotorregion und 3'-terminal in der MCS des Expressionsplasmids pTRE2 ergeben sich für die nach genomischer PCR erhaltenen Amplikons oben beschriebene Größen.

Primername	Sequenz (5'->3')
P1sense	AGA GCT CGT TTA GTG AAC CG
P1anti	CTC ACC CTG AAG TTC TCA GC

Tab.2.7: Primersequenzen

PCR-Ansatz:

- 500ng Template
- 0,4µM sense Primer
- 0,4µM antisense Primer
- 0,2mM dNTP Mix
- 5µl 10x PCR-Puffer
- 2,5mM MgCl₂
- 2.5U Taq-Polymerase

ad 50µl bidest. H₂O

Zahl der Zyklen	Zeit	Temperatur	Prozeß
1	2 min	95°C	Initiale Denaturierung
40	45 sec	95°C	Schmelzen
	45 sec	55°C	Annealing
	45 sec	72°C	Elongation
1	7 min	72°C	finale Elongation
1	-	4°C	Lagerung

Tab.2.8: Temperaturprogramm der genomischen PCR

Die Amplifikate wurden über ein analytisches 2%-iges Agarosegel visualisiert.

2.2.3.2 RT-PCR

Alle Klone mit stabil integriertem antisense-Konstrukt wurden auf die Expression der entsprechenden antisense-RNA getestet. Dazu wurde die Gesamt-RNA induzierter (1µg/ml Doxycyclin für 48h vor der RNA-Isolierung) und nicht induzierter Klone mittels des RNeasy-Kits (QIAGEN) isoliert. Die Präparation und der nachfolgende DNase-Verdau wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die gewonnene RNA wurde durch Aufnahme eines UV-Absorptionsspektrums quantifiziert und als Template in der RT-PCR eingesetzt. Die sense Primer erkennen das 5'-Ende des jeweiligen Inserts, während der antisense Primer an die transkribierte Polyadenylierungsstelle des Expressionsvektors bindet. Dadurch ergeben sich charakteristische Amplifikatgrößen, die sich von denen der endogenen RNA deutlich unterscheiden. Für Kontrollreaktionen wurde die Reverse Transkriptase vor der cDNA-Synthese inaktiviert.

Primer	Sequenz (5'->3')	Funktion
P1anti	CTC ACC CTG AAG TTC TCA GC	antisense Primer
511antiN	CTA GGA TCC CAC AGG TAC TCA GCT TGC TCC	sense Primer
240antiN	CTA GGA TCC TTA GTC TCC ATA TCT TCT CG	
EGFPantiN	CTA GGA TCC CTC AGG TAG TGG TTG TCG	

Tab.2.9: Primer für die RT-PCR



Abb.2.4: Primerlokalisierung und erwartete Amplikongrößen

Durch die Bindung der spezifischen sense Primer am 5'-Ende des Inserts und durch den universellen antisense Primer, der gegen die transkribierte Polyadenylierungsstelle gerichtet ist, ergeben sich Amplikons, die sich in ihrer Größe vom ursprünglichen antisense-Fragment unterscheiden.

Master Mix1		Master Mix2	
0,2mM	dNTP Mix	10µl	5x RT-PCR Puffer
0,4µM	sense Primer	1µl	Enzym Mix
0,4µM	antisense Primer		
500ng	RNA		
5mM	DTT		
5U	RNase-Inhibitor		
ad 25µl bidest. H ₂ O		ad 25µl bidest. H ₂ O	

Zahl der Zyklen	Zeit	Temperatur	Prozeß
1	30 min	55°C	Erststrangsynthese
1	5 min	95°C	Initiale Denaturierung
28	30 sec	95°C	Schmelzen
	45 sec	60°C	Annealing
	45 sec	68°C	Elongation
1	7 min	68°C	finale Elongation
1	-	4°C	Lagerung

Tab.2.10: Temperaturprogramm für die RT-PCR

Die Amplifikate wurden über ein analytisches 2%-iges Agarosegel visualisiert.

2.2.3.3 Präparation von P10 Membranen und Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Herstellung von Membranfraktionen aus stabilen Klonen wurden pro Präparation 1×10^9 Zellen in 10ml Lysis-Puffer mit Protease-Inhibitor-Cocktail* aufgenommen und 30x auf Eis im Potter-Elvehjem-Homogenisator bei 120U/min aufgeschlossen. Anschließend erfolgte Zentrifugation bei 1500 Upm und 4°C für 5 Minuten. Der Überstand wurde verwahrt und das Pellet nochmals 25x auf Eis im Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert und zentrifugiert. Beide Überstände wurden vereinigt. Die Pelletierung der Zellkerne erfolgte bei 2000 xg und 4°C für 5 Minuten. Die finale Zentrifugation bei 10000 xg, 20 Minuten und 4 °C lieferte die P10 Membranfraktionen. Diese wurden in 500µl bis 1ml Lysis-Puffer gelöst, aliquotiert und bei -70°C gelagert.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden die Fraktionen 1:10 in Lysis-Puffer verdünnt und in Mikrotiterplatten mit 250µl des Bradford-Reagenzes versetzt. Als Standard diente eine BSA-Verdünnungsreihe. Nach 25 Minuten Inkubation bei RT erfolgte die Auswertung am Mikrotiterplatten-Photometer bei 595nm. Mit allen Proben wurden Dreifachbestimmungen vorgenommen.

* 40µM Antipain (Biomol), 80µM Leupeptin (Roche), 4µM Pepstatin (Roche), 2mM Pefabloc SC (Biomol)

2.2.3.4 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Trennung von Proteingemischen erfolgte in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli. Die Proben wurden zunächst durch Erhitzen in Laemmli-Puffer (4 Minuten, 95°C) denaturiert und anschließend auf einem Polyacrylamidgel (6%) getrennt. Zur Größenbestimmung wurde der SEEBLue® Plus 2 Pre-Stained Standard (Invitrogen) verwendet.

In einer vertikalen Elektrophoresekammer wurde zunächst das Trenngel (6%) gegossen. Nach dem Auspolymerisieren wurde ein 3%-iges Sammelgel überschichtet, das die Probenfächer enthielt. Es wurden pro Probe jeweils 50µg Protein aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Elektrodenpuffer bei Stromstärken von 15-20mA im Sammelgel und 20-25mA im Trenngel. Anschließend wurden die Gele zum Western Blot verwendet und mit Coomassie-Färbelösung (30 Minuten, RT) nachgefärbt.

2.2.3.5 Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen

Die Nitrocellulose-Membranen wurden vor dem Transfer 20 Minuten in Blotpuffer equilibriert. Anschließend wurden Acrylamidgel, Membran und vier Filterpapiere wie folgt in die Blotapparatur gestapelt:

Anode (+)

2 Lagen Filterpapier

Nitrocellulose-Membran

Acrylamidgel

2 Lagen Filterpapier

Kathode (-)

Der Proteintransfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 7mA/cm² (gesamt 400mA) für 3 Stunden bei 10°C. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden durch nachfolgende Inkubation mit 5% fettarmen Milchpulver in TBST blockiert (45 Minuten, RT).

2.2.3.6 Immunfärbung

Die Membran wurde ca. 1cm unter der oberen Gelkante horizontal zerschnitten und der obere Teil mit einer Primärantikörperverdünnung des anti-Ryanodin-Rezeptorantikörpers* (1:100), die untere Hälfte mit einer Primärantikörperverdünnung des anti-IP₃-Rezeptorantikörpers⁺ (1:1.000) in 2,5% Milchpulver in TBST über Nacht bei 10°C

* monoklonaler anti-Ryanodin-Rezeptor_{common} Antikörper aus Maus (Calbiochem)

⁺ monoklonaler anti-IP₃-Rezeptor Antikörper aus Maus (Transduction Laboratories)

inkubiert. Anschließend wurden die Membranen dreimal 10 Minuten bei RT in TBST gewaschen und mit einem HRP-(Meerrettich Peroxidase) gekoppelten Sekundärantikörper¹ (1:5.000) 1 Stunde bei RT inkubiert. Die abschließende Waschprozedur beinhaltete drei Waschgänge von je 30 Minuten mit TBST und TBS. Die Detektion der Peroxidaseaktivität erfolgte in einer Chemilumineszenzreaktion mit ECL-Reagenz nach Angaben des Herstellers und Belichtung eines Röntgenfilmes für 3-15 Minuten.

2.2.3.7 Ratiometrisch-fluorimetrische Bestimmung der intrazellulären Calcium-Konzentration mit Fura-2/AM

5×10^6 Zellen wurden pelletiert, in 500µl vorgewärmten Medium resuspendiert und für 5 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde der membrangängige Acetomethyl-Ester des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 in einer Endkonzentration von 4µM mit der Zellsuspension vermischt. Um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu verhindern, erfolgte die anschließende Inkubation für 15 Minuten bei 37°C wie alle folgenden Schritte unter Lichtausschluß. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Medium 1:5 verdünnt und für weitere 15 Minuten bei 37°C gehalten. Um überschüssiges Fura2/AM zu entfernen, wurden die Zellen einmal mit 5ml Ca^{2+} -Messpuffer gewaschen, anschließend in 3ml desselben Puffers aufgenommen und bis zur Messung im Fluoreszenz-Spektrometer bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß aufbewahrt. Zur Messung wurden 750µl Zellsuspension in einer Quarzküvette mit 750µl Ca^{2+} -Messpuffer verdünnt. Nach Erreichen einer konstanten Basislinie wurde OKT3 (Endkonzentration: 10µg/ml) zugegeben. Nach 900 Sekunden wurde durch Zugabe des Ionophors Ionomycin durch Calcium-Freisetzung und Calcium-Einstrom die maximale Ratio gemessen. Zur Bestimmung der minimalen Ratio wurden anschließend 4mM EGTA zugegeben.

2.2.3.8 Permeabilisierung von stabil transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen

Die Permeabilisierung der T-Lymphozyten erfolgte mit dem Steroid-Glykosid Saponin. Die Eigenschaft des Saponins Zellen zu permeabilisieren, beruht auf der Fähigkeit, Komplexe mit dem Cholesterol in der Membran zu bilden, sogenannte Digitonine. Intrazelluläre Membranen, wie die des ER und der Organellen, unterscheiden sich in ihrem Cholesterolgehalt von der Plasmamembran, so dass die Saponinkonzentration so gewählt werden kann, dass zwar Plasmamembranen permeabilisiert werden, intrazelluläre Membranen aber weitestgehend intakt bleiben.

Zum Permeabilisieren wurden 1×10^8 Zellen pelletiert (1600 Upm, 5min, RT) und einmal mit 6ml Puffer A gewaschen (1600 Upm, 2 min, RT). Anschließend wurden die Zellen in

¹ anti-Maus IgG, HRP gekoppelt (Santa Cruz)

6ml Puffer A mit 40µg/ml Saponin aufgenommen und für 22min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die permeabilisierten Zellen pelletiert (3000 Upm, 2 min, RT), einmal in intrazellulärem Puffer gewaschen und in 6ml desselben Puffers aufgenommen. Vor der ersten Messung wurden die permeabilisierten Zellen für 2 Stunden auf Eis gestellt (Guse et al. 1993).

2.2.3.9 Bestimmung der Calcium-Freisetzung durch cADPR in permeabilisierten Tet-On Jurkat T-Lymphozyten

Zur Messung der Calcium-Konzentration wurden in einer Quarzküvette zu 900µl der Suspension der permeabilisierten Zellen Fura2 (Endkonzentration: 1µM), Creatinkinase (Endkonzentration: 20U/ml), Creatinphosphat (Endkonzentration: 20mM) und ATP (Endkonzentration: 1mM), gegeben. ATP sorgt als Substrat der SERCA für die ausreichende Beladung der Calcium-speichernden Vesikel. Creatinkinase und Creatinphosphat regenerieren das umgesetzte ATP. Die Messung erfolgte in einem Fluoreszenz-Spektrometer.

Nach Zugabe von Creatinkinase, Creatinphosphat und ATP nahm die Ratio 340/380 als Folge der Beladung der Speicher und damit der Entnahme von Calcium aus dem extravesikulären Raum ab. Nachdem sich ein Plateau eingestellt hatte, wurden als erstes die cADPR-sensitiven Pools in den Zellen durch Zugabe von 10µM cADPR geleert. Anschließend erfolgte die Freisetzung von Calcium aus dem ER durch Zugabe von 4µM IP₃. Die Freisetzung des restlichen in den permeabilisierten Zellen gespeicherten Calciums erfolgte durch das Ionophor Ionomycin. Zur Bestimmung der maximalen und minimalen Ratio wurden schließlich 1mM Calcium und nachfolgend 4mM EGTA/Tris zugegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von Ryanodin-Rezeptor Subtypen in Tet-On Jurkat

T-Zellen

Zur Untersuchung, ob neben dem RyR-3 noch andere Subtypen der Rezeptorfamilie in Jurkat T-Zellen exprimiert werden, wurde mit Subtyp-spezifischen Primer-Sets aus Tet-On Jurkat T-Zellen RT-PCR mit anschließender Nested PCR durchgeführt. Im Gehirn werden alle drei RyR-Isoformen exprimiert (Giannini et al. 1995). Daher wurde als Positivkontrolle mit den gleichen Primer-Sets zusätzlich RT-PCR mit humaner neuronaler RNA durchgeführt. Zuvor wurden die mRNA-Sequenzen der drei RyR-Isoformen einem multiplen Alignment unterzogen, um Primer aus zueinander möglichst wenig homologen Regionen zu bestimmen. Primer aus den spezifischeren 5'-Enden der einzelnen Subtypen führten jedoch nicht zur erfolgreichen Amplifikation der entsprechenden Fragmente, so dass Primer aus dem 3'-Ende der einzelnen Isoformen verwendet wurden (Kapitel 2.2.1.3). Die Primer wurden anhand der Ryanodin-Rezeptor mRNAs der folgenden Datenbanknummern (Accession numbers) bestimmt: NM_000540.1 (RyR-1), NM_001035.1 (RyR-2), NM_001036.1 (RyR-3).

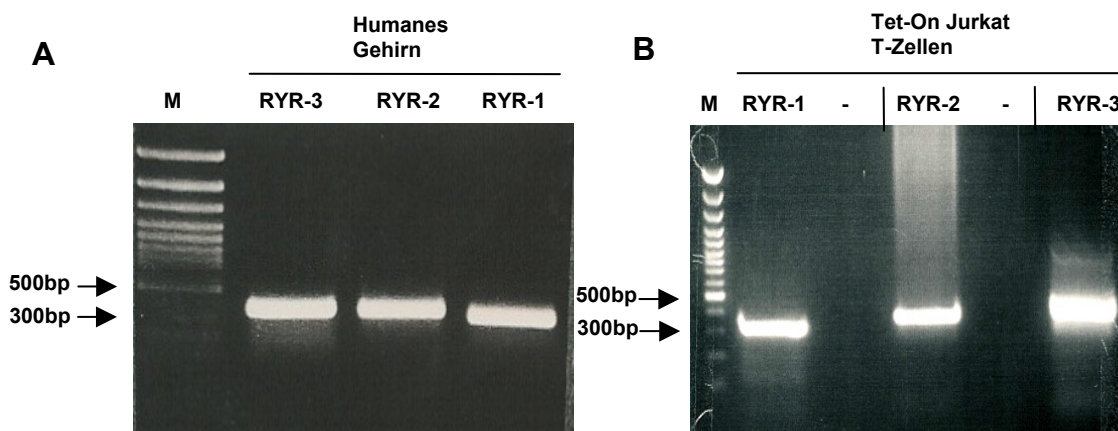


Abb.3.1: Expression von RyR-Subtypen in Tet-On Jurkat T-Zellen und humanem Gehirn

RT-PCR mit 1µg Tet-On Jurkat Gesamt-RNA bzw. 1,6µg Gesamt-RNA aus humanem Gehirn. RT-PCR und nachfolgende Nested PCR verliefen über 30 Zyklen. Je 15µl der PCR-Ansätze wurden über ein 2%-iges Agarose-Gel analysiert. Für die RT-PCR Ansätze aus Tet-On Jurkat T-Zellen wurden Kontrollen ohne Reverse Transkriptase mitgeführt (-). Die Kontrollen für RyR-1 und RyR-2 zeigen, dass die für alle 3 Ansätze verwendete RNA-Präparation frei von Kontaminationen mit genomischer DNA ist. Es wurden Subtyp-spezifische Primer-Sets verwendet (Tab.2.1).

A: RT-PCR aus humanem Gehirn. Für alle drei RyR-Isoformen wurde ein Amplifikat der erwarteten Größe von 324bp (RyR-1), 368bp (RyR-2) und 371bp (RyR-3) erhalten.

B: RT-PCR aus Tet-On Jurkat T-Zellen. Alle drei Primer-Sets lieferten Amplikons der erwarteten Größe von 324bp (RyR-1), 368bp (RyR-2) und 371bp (RyR-3). Die Kontrollreaktionen (-) zeigten keine PCR-Produkte.

M= 100bp DNA-Leiter mit dominanter Bande bei 500bp.

Abb3.1A zeigt PCR-Ansätze aus humaner Gehirn-RNA mit den für die einzelnen Isoformen erwarteten Größen. Erwartungsgemäß konnten alle drei Subtypen aus Hirn amplifiziert werden.

Ein entsprechendes Experiment mit RNA aus Tet-On Jurkat T-Zellen ist in Abb3.1B dargestellt. Mit jedem Primerpaar wurde ein Amplikon der erwarteten Größe von 371bp (RYR-3), 368bp (RYR-2) und 324bp (RYR-1) erhalten. Die Kontrollreaktionen ohne Reverse Transkriptase lieferten keine Amplifikate. Da für alle drei PCR-Ansätze dieselbe RNA-Präparation benutzt wurde, handelte es sich bei den PCR-Produkten nicht um DNA-Kontaminationen. Die Banden wurden wie unter 2.2.1 beschrieben ausgeschnitten, gereinigt und zur Sequenzierung kloniert. Die Sequenzanalysen bestätigten die Spezifität der Banden eindeutig (Vergleich mit RyR mRNAs der oben angegebenen Datenbank-Nummern, siehe Anhang 2).

In Tet-On Jurkat T-Zellen konnten somit alle drei RyR-Isoformen mittels der sehr sensitiven RT-PCR und Nested PCR nachgewiesen werden.

3.2 Generierung der Ryanodin-Rezeptor defizienten Tet-On Jurkat T-Zelllinien

Zur Untersuchung des Einflusses von Ryanodin-Rezeptoren auf das Calcium-Signal in T-Lymphozyten sollten über antisense-Technologie zwei verschiedene RyR defiziente T-Zelllinien generiert werden. Für die stabile Transfektion von Jurkat T-Zellen mit RyR antisense-Fragmenten wurde das induzierbare Tet-On Expressionssystem von Clontech verwendet. Induzierbarkeit erschien sinnvoll, um antiproliferative Effekte, die durch fehlende RyR-Expression denkbar waren, zu vermeiden.

3.2.1 Tet-On Expressionssystem

Das Tet-On System (Gossen et al. 1995) basiert auf der Interaktion zweier stabil integrierter Plasmide, dem regulatorischen Plasmid pTet-On und einem responsiven Plasmid (hier: pTRE2). pTet-On kodiert für ein Transaktivatorprotein, das konstitutiv exprimiert wird, in Anwesenheit von Tetracyclin (oder Doxycyclin) an seine Zielsequenz auf dem responsiven Plasmid bindet und somit dort die Transkription aktiviert.

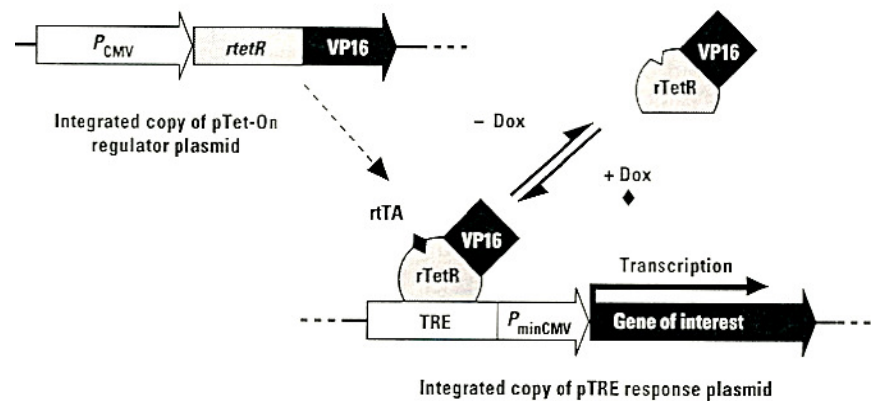


Abb. 3.2 Tet-On Expressionssystem Übersicht

Das Transaktivatorprotein rTA wird durch den starken CMV-Promotor kontrolliert und ist ein Fusionsprotein aus der viralen Aktivierungsdomäne des Herpes Simplex Virus (VP16) und dem Wildtyp Tet Repressor (TetR). Die Zielsequenz des Transaktivatorproteins, das Tet responsive Element (TRE) besteht aus sieben Kopien der tet Operator Sequenz tetO. Das TRE ist 5' des minimalen, inaktiven Cytomegalivirus (CMV)-Promotors des responsiven Plasmids lokalisiert. In Anwesenheit von Tetracyclin oder Doxycyclin bindet rTA an TRE und aktiviert die Transkription. Dadurch ist eine strenge Regulation der Transkription gewährleistet.

3.2.2 Auswahl und Klonierung der antisense-Konstrukte

Als Mutterzelllinie wurde die kommerziell erhältliche Tet-On Jurkat T-Zelllinie (Clontech) verwendet. Dabei handelt es sich um eine mit dem Regulator-Plasmid stabil transfizierte Jurkat Zelllinie. Diese Zelllinie wurde mit dem responsiven Plasmid pTRE2 und dem Selektionsplasmid pTK-Hyg cotransfiziert.

Es sollten zwei verschiedene RyR-defiziente Zelllinien generiert werden: Eine RyR-3-defiziente Zelllinie und eine Zelllinie, in der die Expression aller drei RyR-Isoformen reprimiert ist. Dazu wurden als antisense-Fragmente ein 240bp und ein 511bp großes Fragment aus dem 3'-Ende des RyR-3 verwendet. Das 240bp große Fragment ist 70% homolog zu den RNA-Sequenzen der RyR Subtypen 2 und 1 und kann dadurch mit diesen Isoformen kreuzreagieren. Dagegen ist das 511bp große Fragment deutlich spezifischer für Subtyp 3. Die Homologie zu den anderen beiden Isoformen liegt bei 29%. Um unspezifische Effekte auszuschließen, die auf die stabile Integration eines beliebigen antisense-Konstrukts zurückzuführen sind, wurde als Kontrolle ein 250bp großes antisense-Fragment des in Jurkat T-Zellen nicht exprimierten EGFP eingesetzt. Alle Fragmente wurden wie unter 2.2.1.3 beschrieben in das responsive Plasmid pTRE2 einkloniert.

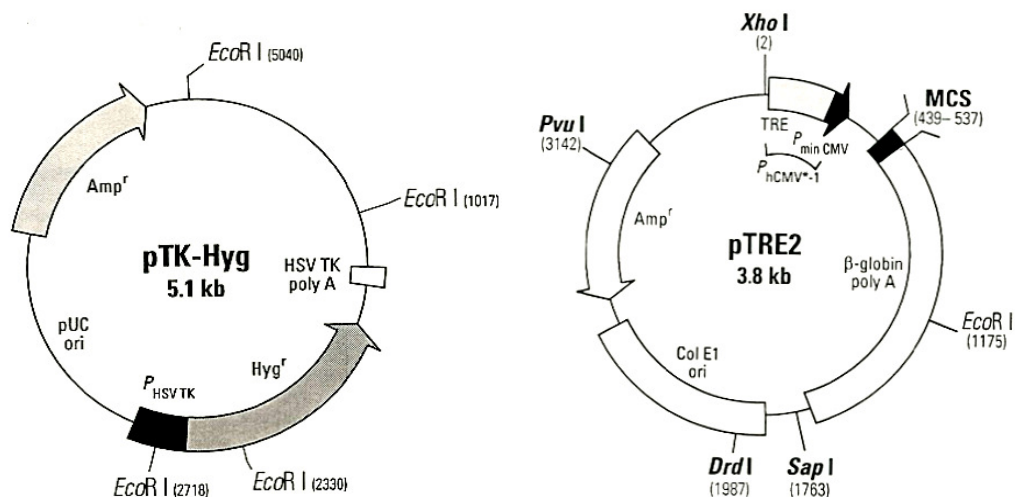


Abb.3.3 Vektorkarten des pTK-Hyg und pTRE2

Die Kointransfektion von pTK-Hyg mit pTRE2 erlaubt die Selektion der Klone durch Hygromycin-Resistenz. pTK-Hyg enthält ein Ampicillin-Resistenz-Gen (Amp^r) und das Hygromycin-Resistenz-Gen (Hyg^r). pTK-Hyg enthält keine enhancer-Elemente, um die unspezifische Aktivierung der in pTRE2 integrierten Fragmente zu verhindern. Die vollständige Sequenz des pTK-Hyg kann in der Genbank unter der Datenbank-Nummer (Accession Number) U40398 abgefragt werden. pTRE2 beinhaltet den Tet-responsiven Promotor P_{hCMV*-1}. Dieser enthält das Tet-responsive Element TRE, das stromaufwärts des minimalen Promotors lokalisiert ist und dem jegliche Enhancer-Elemente fehlen. Abwärts davon befindet sich die MCS. Außerdem enthält das Plasmid ein Ampicillin-Resistenz-Gen (Amp^r). Die komplette Sequenz des pTRE2 ist dem Vektor-Protokoll PT3038-5 (Clontech) zu entnehmen.

Plasmid	Insert in antisense Orientierung	Produktname
pTRE2	240bp RYR Typ3 C-Terminal (bp14200-14439 der mRNA)	pTRE2-240
pTRE2	511bp RYR Typ3 C-Terminal (bp12657-13167 der mRNA)	pTRE2-511
pTRE2	250bp EGFP (bp359-608 der cDNA)	pTRE2-EGFP

Tab.3.1: Beschreibung der klonierten antisense-Konstrukte

3.2.3 Transfektion, Selektion und Isolation stabiler Klone

Transfektion, Selektion und Klonierung der Zellen erfolgten wie unter 2.2.2 beschrieben. Als zusätzliche Kontrolle wurden Zellen mit dem pTRE2 ohne Insert transfiziert und als „Vektorkontrolle“ bezeichnet. Die Anzahl der durch „limited dilution“ erhaltenen Hygromycin resistenten Klone ist in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Konstruktbezeichnung	Zahl der ausgesäten Zellen	Zahl der isolierten Klone
Vektorkontrolle	266	31
pTRE2-EGFP	266	29
pTRE2-240	500	73
pTRE2-511	400	57

Tab.3.2: Anzahl ausgesäter und isolierter Klone

3.3 Auswahl und Charakterisierung stabiler Klone

Da das zur Transfektion verwendete Expressionsplasmid pTRE2 nicht für ein Reportergen kodiert, erfolgte die Auswahl der isolierten Klone nicht über klassische Reportergen-Assays. Aus diesem Grunde wurde jeder einzelne isolierte Klon mittels genomischer PCR auf die stabile Integration der antisense-Konstrukte überprüft. Um die Zahl potentieller antisense-Klone weiter einzuschränken, wurden Klone, die das Konstrukt stabil in ihr Genom integriert hatten, über RT-PCR auf die Expression der antisense-RNA getestet. Anschließend wurden wenige ausgewählte Klone durch Western Blot-Analyse und ratiometrische Calciummessungen charakterisiert.

Die Klone werden im folgenden durch Angabe des Namens des entsprechenden antisense-Konstrukts (siehe Tab.3.1) und über fortlaufende Nummerierung bezeichnet.

3.3.1 Stabile Integration der antisense-Konstrukte in das Genom der Tet-On Jurkat T-Zellen

Die genomische PCR wurde 3 Monate nach Beginn der Selektion der transfizierten Zellen durchgeführt, so dass nach Elektroporation aufgenommene antisense-Konstrukte zuvor entweder stabil integriert oder degradiert worden waren.

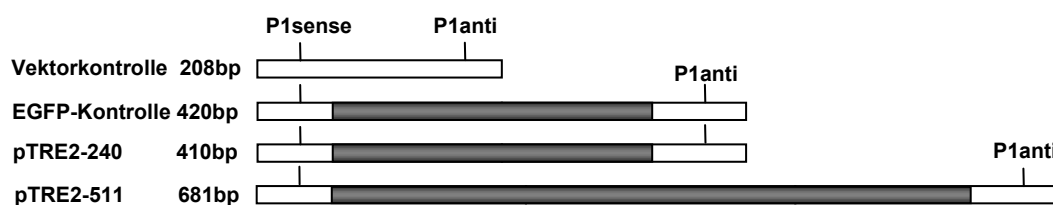


Abb.3.4: Lokalisation der Primer und Größen der Amplikons

Durch die Lokalisation der Primer 5'-terminal in der Promotorregion und 3'-terminal in der MCS des Expressionsplasmids pTRE2 ergeben sich für die nach genomischer PCR erhaltenen Amplikons oben beschriebene Größen.

Alle Klone, die ein Amplikon der erwarteten Größe zeigten, wurden als positiv bezeichnet. Klone, deren PCR-Produkte eine andere Größe aufwiesen, oder die keine Produkte zeigten, wurden als nicht stabil transfizierte Klone verworfen.

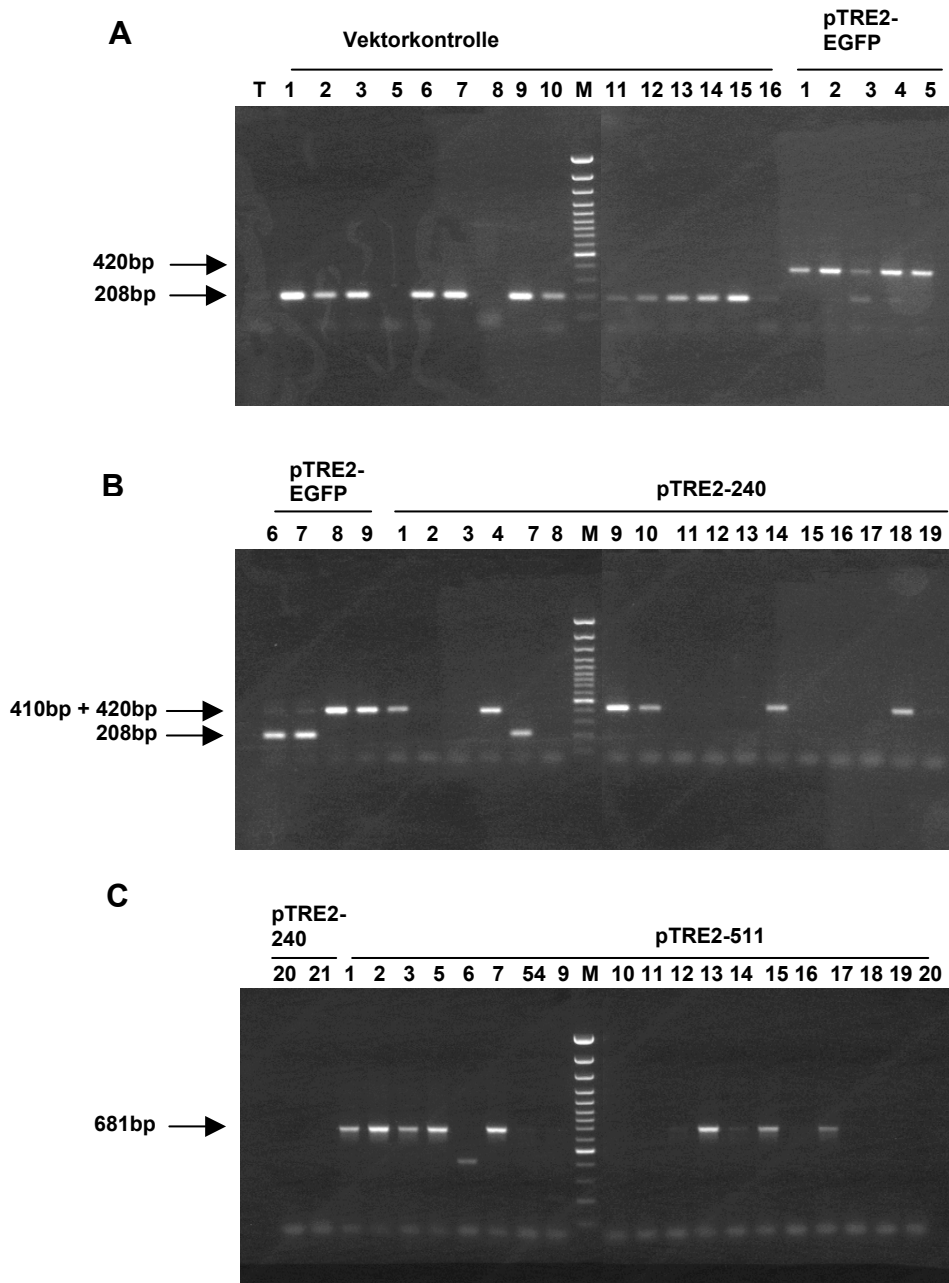


Abb. 3.5: Stabile Integration der antisense-Konstrukte in das Genom der Tet-On Jurkat T-Zellen I

Genomische PCR mit 500ng DNA über 40 Zyklen. 15µl der PCR-Ansätze wurden über ein 2%-iges Agarose-Gel analysiert. Die verwendeten sense und antisense Primer gegen das Expressionsplasmid pTRE2 umspannten die MCS über einen Bereich von 208bp. Somit ergaben sich Amplikongrößen von 208bp für die Vektorkontrolle, 420bp für pTRE2-EGFP, 410bp für pTRE2-240 und 681bp für pTRE2-511.

A: Stabile Integration des Leervektors pTRE2 und pTRE2-EGFP. Nahezu alle Ansätze lieferten Amplifikate der erwarteten Größe.

B: Stabile Integration von pTRE2-EGFP und pTRE2-240. Acht Klone zeigten Amplifikate der erwarteten Größe.

C: Stabile Integration von pTRE2-511. Für acht Klone wurden Banden der erwarteten Größe erhalten.

M= 100bp DNA-Leiter mit dominanter Bande bei 500bp.

T= PCR der nicht transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen.

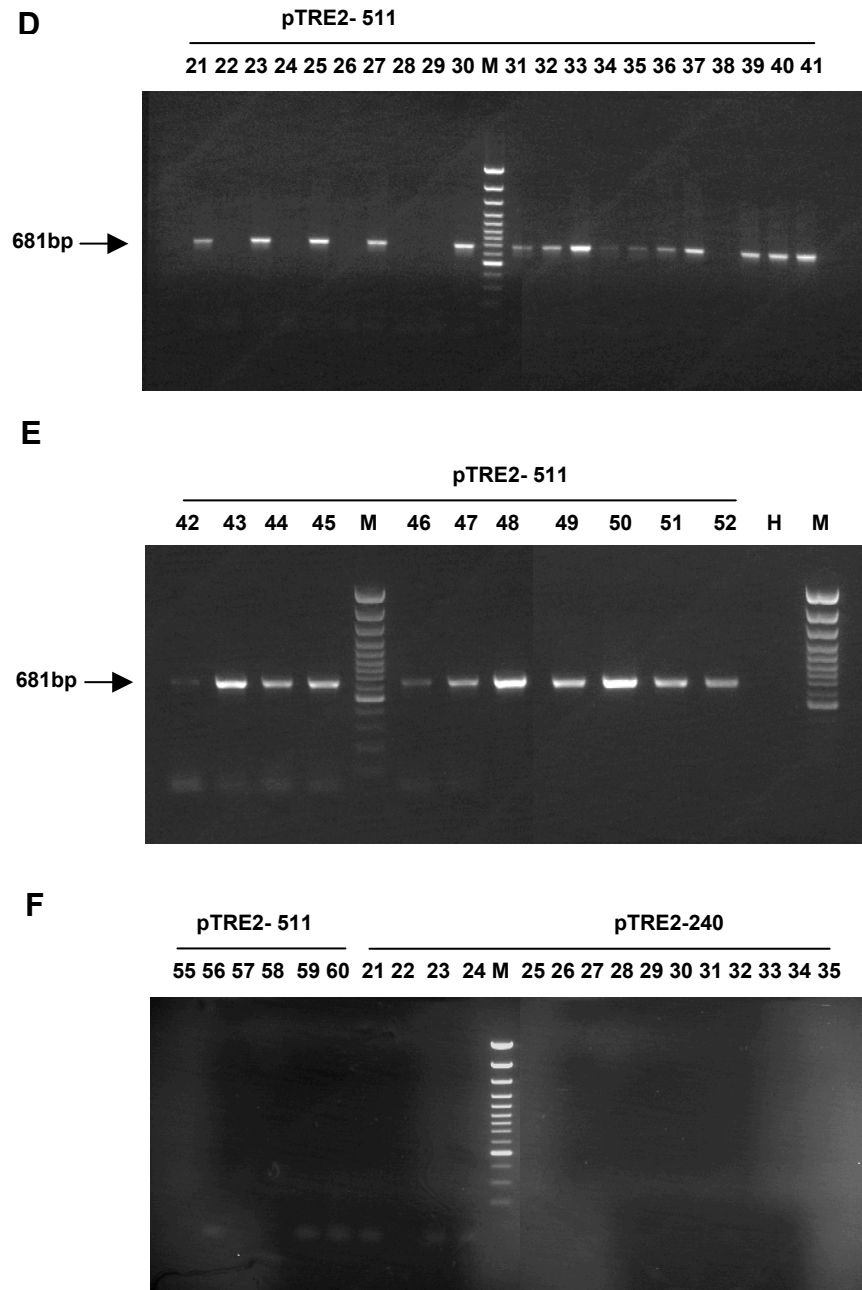


Abb.3.6: Stabile Integration der antisense-Konstrukte in das Genom der Tet-On Jurkat T-Zellen II

Genomische PCR mit 500ng DNA über 40 Zyklen. 15µl der PCR-Ansätze wurden über ein 2%-iges Agarose-Gel analysiert. Die verwendeten sense und antisense Primer gegen das Expressionsplasmid pTRE2 umspannten die MCS über einen Bereich von 208bp. Somit ergaben sich Amplikongrößen von 208bp für die Vektorkontrolle, 420bp für pTRE2-EGFP, 410bp für pTRE2-240 und 681bp für pTRE2-511.

D + E: Stabile Integration des antisense-Konstrukts pTRE2-511. Die Gele zeigten bei nahezu allen Klonen Amplikons der erwarteten Größe von 681bp.

F: Die hier gezeigten Klone tragen die antisense-Konstrukte pTRE2-511 und pTRE2-240 nicht.

M= 100bp DNA-Leiter mit dominanter Bande bei 500bp.

H = Wasserkontrolle

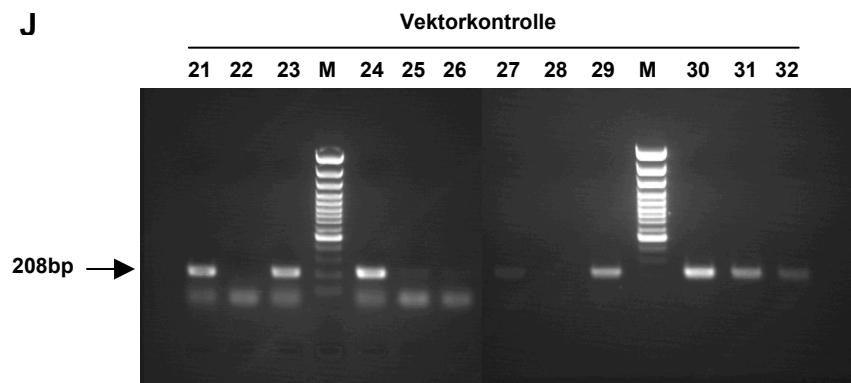
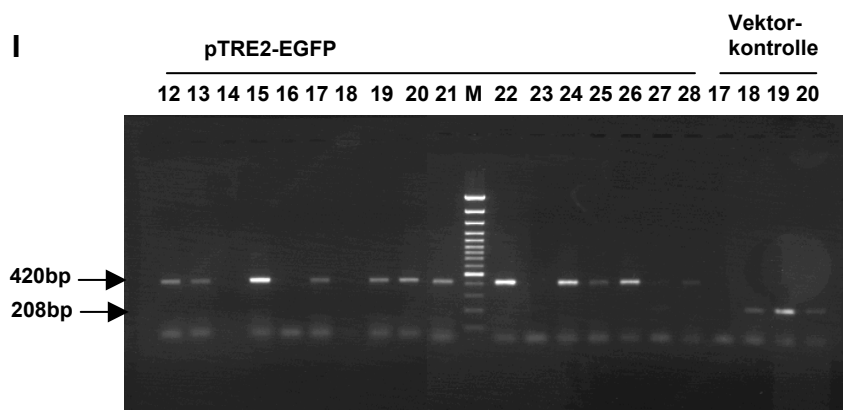
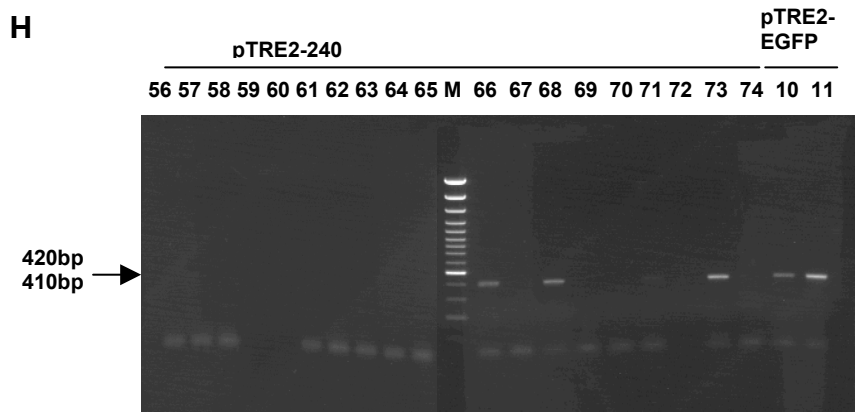
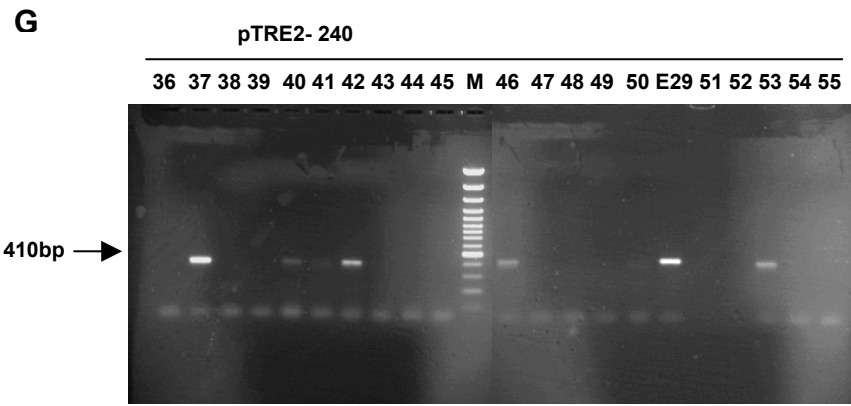


Abb.3.7: Stabile Integration der antisense-Konstrukte in das Genom der Tet-On Jurkat T-Zellen III

Genomische PCR mit 500ng DNA über 40 Zyklen. 15µl der PCR Ansätze wurden über ein 2%-iges Agarose-Gel analysiert. Die verwendeten sense und antisense Primer gegen das Expressionsplasmid pTRE2 umspannten die MCS über einen Bereich von 208bp. Somit ergaben sich Amplikongrößen von 208bp für die Vektorkontrolle, 420bp für pTRE2-EGFP, 410bp für pTRE2-240 und 681bp für pTRE2-511.

G + H: Stabile Integration des antisense-Konstrukts pTRE2-240 und pTRE2-EGFP

I: Stabile Integration des antisense-Konstrukts pTRE2-EGFP und des Leervektors.

J: Stabile Integration des Leervektors pTRE2.

Alle amplifizierten Fragmente zeigten die erwartete Größe.

M= 100bp DNA-Leiter mit dominanter Bande bei 500bp.

E20= Mit pTRE2-EGFP transfizierter Klon

Abb.3.5A zeigt für zwölf der fünfzehn aufgetragenen Vektorkontrollen PCR-Produkte der für den Leervektor erwarteten Größe. Für sechs der neun der in Abb.3.5A+B dargestellten EGFP-Kontrollen wurden Banden amplifiziert, die ihrer Größe nach dem pTRE2-EGFP Konstrukt zugeordnet werden konnten. Diese Klone galten somit ebenfalls als positiv. Aus genomischer DNA nicht transfizierter Tet-On Jurkat T-Zellen ließ sich erwartungsgemäß kein PCR-Produkt synthetisieren (T in Abb.3.5A).

In Zellen, die mit pTRE2-240 transfiziert worden waren, konnten in sechs von siebzehn Fällen ein Amplikon der erwarteten Größe erhalten werden.

In den Abbildungen 3.5C bzw. 3.6D und E erkennt man Amplifikate mit einer Größe von 681bp. Damit hatten 32 der 51 dargestellten Klone das pTRE2-511 Konstrukt stabil in ihr Genom integriert.

Aus den in Abb.3.6F aufgetragenen Klonen konnten keine Produkte synthetisiert werden. Die PCR-Reaktionen der Klone pTRE2-EGFP/6/7, pTRE2-240/7 und pTRE2-511/6 in Abb.3.5A-C lieferten zu kleine Amplikons, um als positiv zu gelten. Klon pTRE2-EGFP/3 wurde aufgrund der amplifizierten Doppelbande ebenfalls verworfen.

Abb.3.7G, H, I und J zeigen bei allen Ansätzen jeweils nur ein Amplikon der erwarteten Größe. Acht der mit pTRE2-240, fünfzehn der mit pTRE2-EGFP und zehn der mit pTRE2 transfizierten Zellen hatten das Konstrukt stabil in ihr Genom integriert.

Insgesamt waren 74% der Vektorkontrollen und 72% der EGFP-Kontrollen, 21% der mit pTRE2-240 und 56% der mit pTRE2-511 transfizierten Klone erfolgreich stabil transfiziert worden. Der Anteil der Klone mit stabiler Integration der Kontrollkonstrukte war deutlich höher als bei den mit pTRE2-240 und pTRE2-511 transfizierten Klonen.

3.3.2 Expression der antisense-RNA in stabil transfizierten Klonen

Klone, die das Konstrukt stabil in ihr Genom integriert hatten, wurden auf die Expression der antisense-RNA überprüft. Dazu wurden mit Gesamt-RNA der zwei Tage mit 1µg/ml Doxycyclin induzierten (i) und nicht induzierten Klone RT-PCRs durchgeführt. Die Auswahl der Primer schloss die Amplifikation der Fragmente aus endogener RNA aus, da

der antisense Primer sich gegen den Polyadenylierungsbereich des Expressionsplasmids pTRE2 richtete.



Abb.3.8: Primerlokalisierung und erwartete Amplikongrößen

Durch die Bindung der spezifischen sense Primer am 5'-Ende des Inserts und durch den universellen antisense Primer, der gegen die transkribierte Polyadenylierungsstelle gerichtet ist, ergeben sich Amplikons, die sich in ihrer Größe vom ursprünglichen antisense-Fragment unterscheiden.

Die Bezeichnung und Nummerierung der Klone in den Abbildungen der RT-PCR ist dieselbe wie in den Abbildungen der Genomischen PCR.

In Abbildungen 3.9A,B und C sind die RT-PCR Produkte der mit pTRE2-240 stabil transfizierten Klone aufgetragen. Alle Kontrollreaktionen ohne Reverse Transkriptase (-) lieferten keine Amplifikate. Somit handelte es sich bei den PCR-Produkten keinesfalls um DNA-Kontaminationen.

Dreizehn von sechzehn der hier untersuchten Klone wiesen Amplikons der erwarteten Größe von 287bp auf. Bei pTRE2-240/10 war die Bande des induzierten Klons deutlich stärker als die des nicht induzierten Klons. Bei allen anderen Klonen waren die Banden, ob induziert oder nicht induziert, von etwa der gleichen Intensität.

Abbildung 3.10D zeigt die mit pTRE2-EGFP stabil transfizierten Klone. Von sechs untersuchten Klonen zeigten fünf Klone Banden der erwarteten Größe von 297bp. Bei E1 und E8 waren die Banden der induzierten Klone deutlich stärker als in nicht induziertem Zustand. Bei E4 erschien die Bande des nicht induzierten Klons intensiver als die des induzierten.

In den Abbildungen 3.10E und F sind die RT-PCR Ansätze der mit pTRE2-511 stabil transfizierten Klone aufgetragen. Alle Kontrollansätze ohne Reverse Transkriptase (-) wiesen kein Produkt auf. Die in diesen Ansätzen verwendete RNA enthielt keine DNA-Kontaminationen. Von zwölf geprüften Klonen konnte bei sieben Klonen die antisense-RNA (558bp) synthetisiert werden. Bei pTRE2-511/3 bzw. 5 waren die Banden der induzierten Klone etwas schwächer als die der nicht induzierten. Alle anderen Klone, induziert oder nicht induziert, wiesen Banden vergleichbarer Intensität auf.

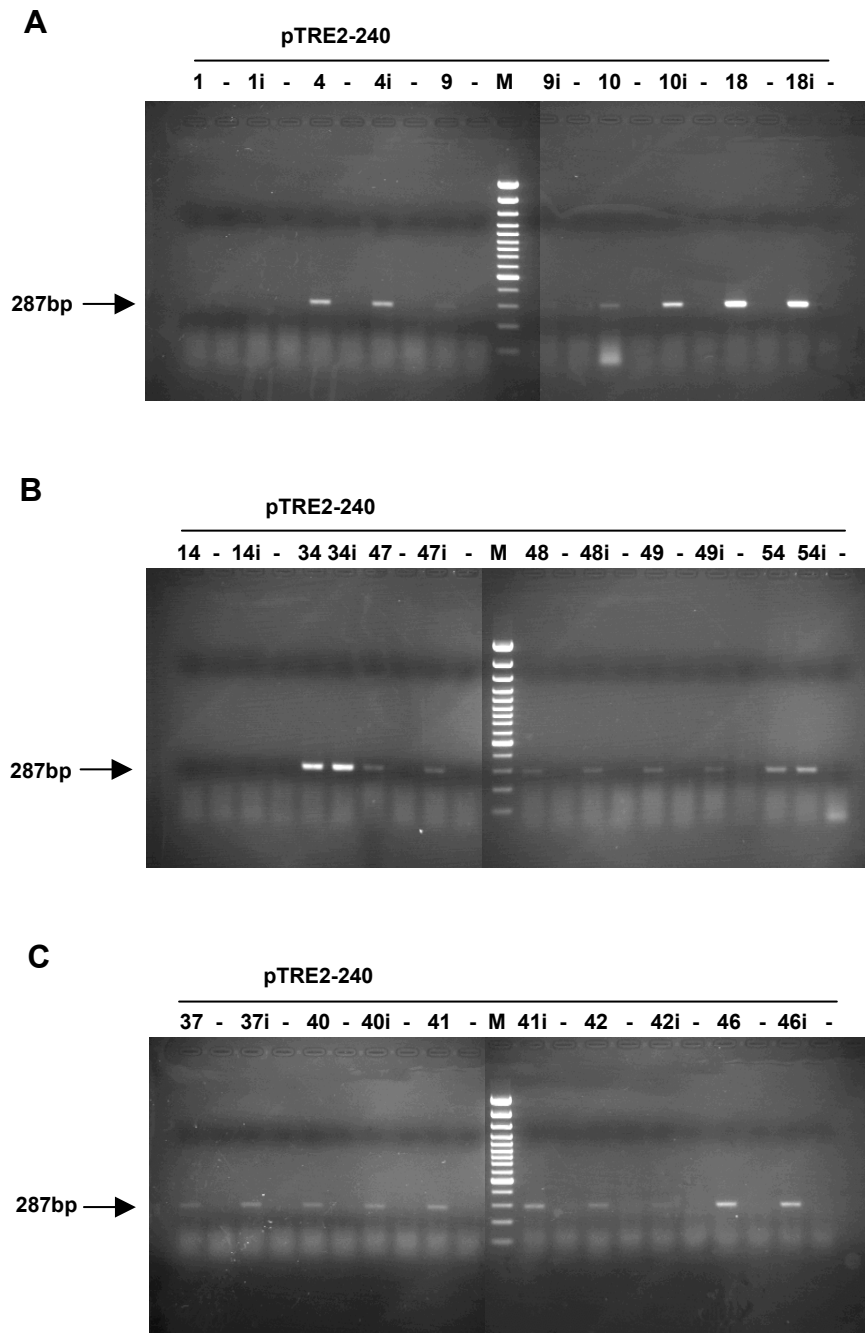


Abb.3.9: Expression der antisense-RNA I

RT-PCR mit 500ng Gesamt-RNA über 28 Zyklen. Die Analyse von 15µl der RT-PCR Ansätze erfolgte über ein 2%-iges Agarose-Gel. Die sense Primer waren spezifisch für die einzelnen antisense-Fragmente. Der antisense Primer richtete sich gegen den transkribierten Polyadenylierungsbereich des Expressionsplasmids pTRE2. Daraus ergaben sich für die Amplikons die Größen von 287bp für pTRE2-240, 297bp für pTRE2-EGFP und 558bp für pTRE2-511.

i = RT-PCR der für 2 Tage mit 1µg/ml Doxycyclin induzierten Klone

- = RT-PCR ohne RT. Für nahezu alle Klone wurden Kontrollansätze mitgeführt, bei denen vor Erststrangsynthese die Reverse Transkriptase inaktiviert wurde. Sie wurden jeweils rechts neben den entsprechenden Klonen aufgetragen.

A,B + C: Expression der antisense-RNA des antisense-Konstrukts pTRE2-240. Alle Amplikons zeigten die erwarteten Größe von 287bp.

M = 100bp DNA-Leiter mit dominanter Bande bei 500bp.

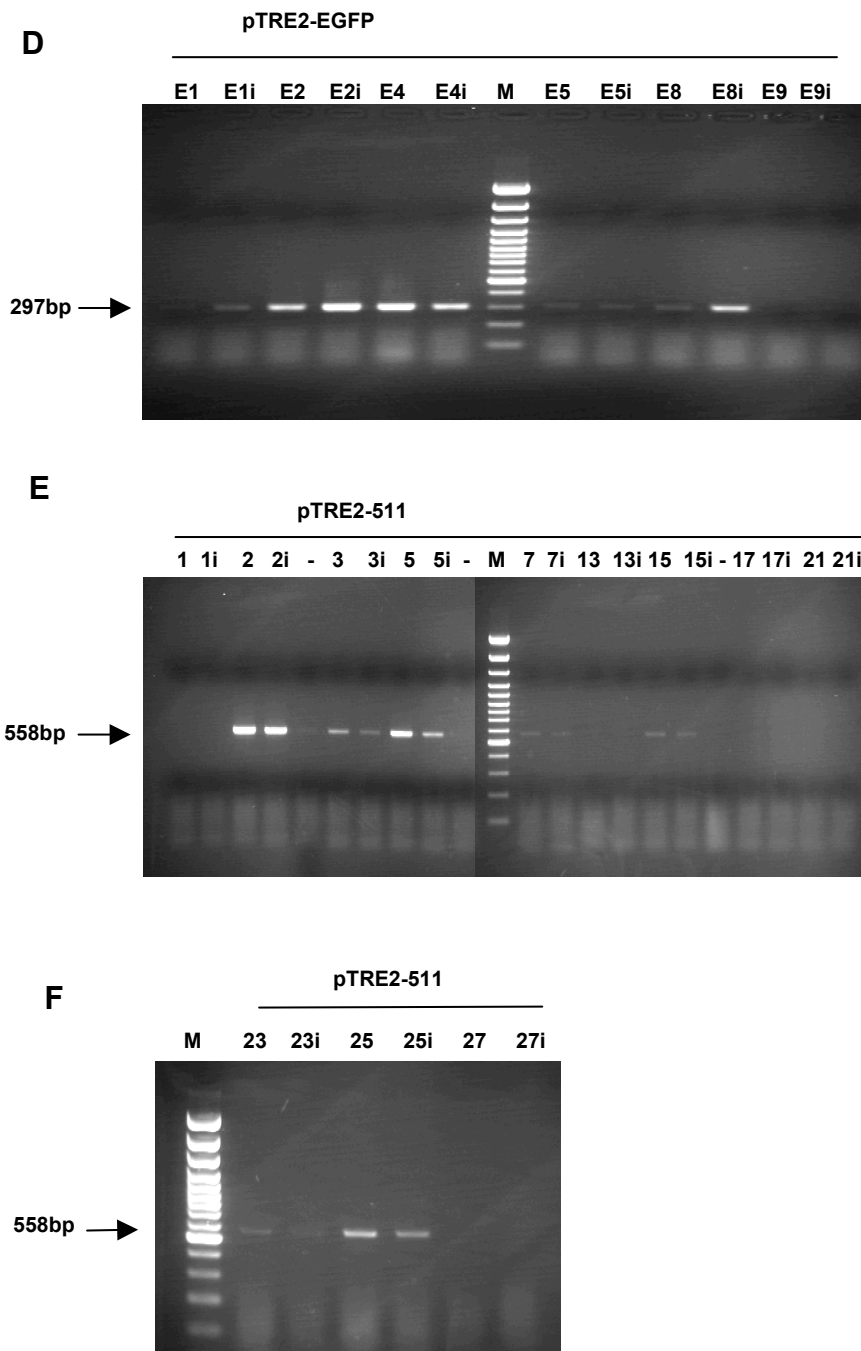


Abb.3.10: Expression der antisense-RNA II

RT-PCR mit 500ng Gesamt-RNA über 28 Zyklen. Die Analyse von 15µl der RT-PCR Ansätze erfolgte über ein 2%-iges Agarose-Gel. Die sense Primer waren spezifisch für die einzelnen antisense-Fragmente. Der antisense Primer richtete sich gegen den transkribierten Polyadenylierungsbereich des Expressionsplasmids pTRE2. Daraus ergaben sich für die Amplikons die Größen von 287bp für pTRE2-240, 297bp für pTRE2-EGFP und 558bp für pTRE2-511.

i = RT-PCR der für 2 Tage mit 1µg/ml Doxycyclin induzierten Klone

- = RT-PCR ohne RT. Für nahezu alle Klone wurden Kontrollansätze mitgeführt, bei denen vor Erststrangsynthese die Reverse Transkriptase inaktiviert wurde. Sie wurden jeweils rechts neben den entsprechenden Klone aufgetragen.

D: Expression der antisense-RNA des Konstrukts pTRE2-EGFP. Amplikons hatten die erwartete Größe von 297bp.

E + F: Expression der antisense-RNA des Konstrukts pTRE2-511. Die Amplikate zeigten die erwartete Größe von 558bp.

M = 100bp DNA-Leiter mit dominanter Bande bei 500bp.

Insgesamt konnte in 81% der mit pTRE2-240, in 83% der mit pTRE2-EGFP und in 54% der mit pTRE2-511 stabil transfizierten, überprüften Klone mittels RT-PCR die antisense-RNA nachgewiesen werden. Die höhere Bandenintensität bei induzierten gegenüber nicht induzierten Klonen wie pTRE2-240/10, pTRE2-EGFP/E1 und E8 lässt Induzierbarkeit dieser Klone vermuten. Bei allen anderen Klonen, ob induziert oder nicht induziert, waren die Bandenintensitäten vergleichbar. Eine deutliche Induzierbarkeit dieser Klone war zumindest über RT-PCR nicht festzustellen.

Zur Charakterisierung auf Proteinebene wurden aus praktischen Gründen von allen Klonen, die die antisense-RNA exprimierten, nur wenige ausgewählt. Die Auswahlkriterien umfassten dabei die mutmaßliche Induzierbarkeit, die Bandenintensität der antisense-RNA und die Auswahl mindestens eines Klons pro gewähltem Ansatz (pTRE2-EGFP, pTRE2-240bp, pTRE2-511bp). Auf Grund dessen wurden als EGFP-Kontrollen die Klone pTRE2-EGFP/E1 und pTRE2-EGFP/E2 ausgewählt. Sie werden im folgenden als Klon E1 und Klon E2 bezeichnet. Als potentieller RyR-3-defizienter Klon wurde Klon pTRE2-511/25 ausgewählt. Er wird im folgenden als Klon 5 bezeichnet. Als Klon, in dem die Expression aller drei RyR-Isoformen inhibiert sein sollte, wurde Klon pTRE2-240/10 ausgesucht und im folgenden als Klon 2 bezeichnet.

3.3.3 Verminderte Ryanodin-Rezeptor Expression in Klon 2 und Klon 5

Um Aufschluss über die Expression des Ryanodin-Rezeptor Proteins zu erhalten, wurden Membranfraktionen der ausgewählten induzierten und nicht induzierten Klone 2, 5, E1 und E2 im Western Blot mit einem anti-Ryanodin-Rezeptor-Antikörper überprüft. Der Antikörper erkennt ein Epitop im C-Terminus aller RyR-Subtypen.

Da nichts über den Protein-Turnover des RyRs bekannt ist, wurde eine sechstägige Induktion (1µg/ml Doxycyclin) der Zellen vor Präparation der Membranfraktionen als ausreichend angenommen. Wenn antisense-RNA zur kompletten Hemmung der Neusynthese führt und keine weitere Degradation hinzukommt, reduziert sich das Protein in sechs Tagen allein auf Grund der Zellteilung auf ein Neuntel der ursprünglichen Menge. Dieser Effekt wurde als detektierbar angenommen.

Als zusätzliche Kontrolle wurden nicht transfizierte Tet-On Jurkat T-Zellen mitgeführt. Um zu überprüfen, dass die Expression des IP₃Rs als wichtige Komponente der Calcium-Signaltransduktion in T-Zellen durch die stabile Transfektion der Konstrukte nicht beeinträchtigt wurde und um zu zeigen, dass überall gleiche Proteinmengen aufgetragen worden waren, wurde ein Teil der Blotmembranen auch mit anti-IP₃-Rezeptor-Antikörper inkubiert.

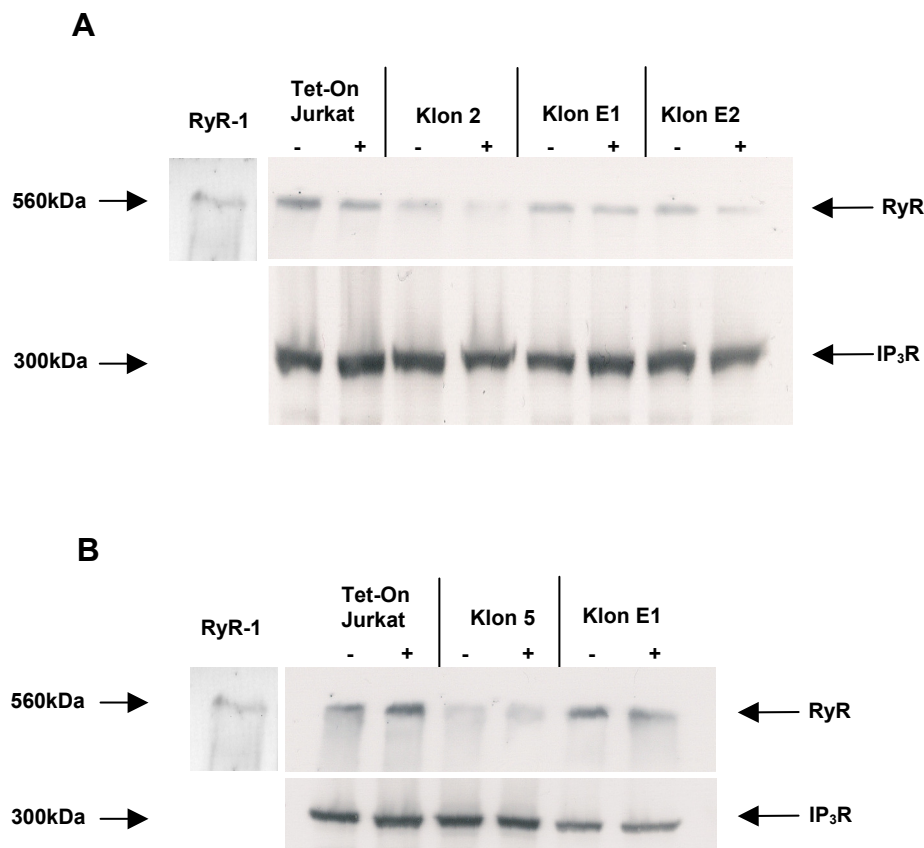


Abb.3.11: Verminderte Proteinexpression von RyR in Klon 2 und 5

Western Blot-Analyse der RyR-Proteinexpression in den ausgewählten Klonen 2, 5, E1 und E2. Aufgetragen wurden P10 Membranfraktionen nicht induzierter Zellen (-) und sechs Tage mit 1µg/ml Doxycyclin induzierter Zellen (+). Als zusätzliche Kontrolle wurde eine P10 Membranfraktion nicht transfizierter Tet-On Jurkat T-Zellen aufgetragen. Es wurden jeweils 50µg Gesamtprotein über 6% SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Proteintransfer wurde die Nitrocellulosemembran in zwei Teile zerschnitten. Die obere Hälfte wurde mit anti-RyR-Antikörper, die untere mit anti-IP₃R-Antikörper inkubiert und anschließend mit einem HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper über Chemilumineszenz (ECL) immungefärbt. Filme wurden 5 Minuten exponiert. Die Banden konnten über den verwendeten Molekulargewichtsstandard und einen RyR-Marker (Solubilisierter RyR-1 aus Skelettmuskel, Prof. Hohenegger, Wien) dem IP₃R-Monomer (ca. 300kDa) und dem RyR-Monomer (ca. 560kDa) zugeordnet werden.

A+B: Die RyR-Banden der Klone 2 und 5 waren deutlich schwächer als die Banden der Kontrollzellen. Die IP₃R-Banden waren in allen Klonen von etwa gleicher Intensität. Für Klon 2 und Klon E1 wurde dieses Ergebnis in drei, für Klon 5 und Klon E2 in zwei Western Blot-Experimenten reproduziert.

Abbildung 3.11A zeigt im oberen Teil des Gels Banden, die auf Grund eines zuvor verwendeten RyR-Markers (solubilisierter RyR-1 aus Kaninchen-Skelettmuskel, Prof. Hohenegger, Wien) einer Größe von etwa 560kDa zugeordnet werden konnten. Die Banden darunter zeigen IP₃R-Monomere von etwa 300kDa.

In den Kontrollklonen E1 und E2 (nicht induziert), die mit dem antisense-EGFP-Fragment transfiziert worden waren, war die RyR-Bandenintensität mit der der nicht transfizierten

Tet-On Jurkat T-Zellen vergleichbar. Die RyR-Expression von Klon 2 (transfiziert mit dem 240bp großen Fragment) war im Vergleich zu nicht transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen und den Klonen E1 bzw. E2 deutlich reduziert. Zudem erschien die Bande des induzierten Klon 2 etwas schwächer als die des nicht induzierten Klons. Alle anderen Klone, mit Ausnahme von Klon E2, zeigten keine Unterschiede der Bandenintensitäten zwischen induzierten und nicht induzierten Zellen. Die Expression des IP₃R war in allen Klonen etwa gleich stark. Bei Klon E2 war sowohl die RyR-Bande als auch die IP₃R-Bande des induzierten Klons etwas schwächer als die des nicht induzierten Klons. Möglicherweise war die Randposition im Gel kritisch für den Proteintransfer.

In Abbildung 3.11B ist erkennbar, dass die Expression des RyR-3 in Klon 5 ebenfalls stark reduziert war. Hierbei unterschieden sich die Bandenintensitäten der induzierten und nicht induzierten Ansätze nicht voneinander. Die Banden der nicht transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen und des Klon E1 waren, ob induziert oder nicht induziert, von deutlich stärkerer Intensität als bei Klon 5.

Die Expression des IP₃R war in allen Klonen vergleichbar. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die RyR-Bandenintensität der Kontrollklone E1 und E2 (nicht induziert) mit der nicht transfizierter Tet-On Jurkat T-Zellen gut übereinstimmte. Die stabile Integration des EGFP-Fragments hatte somit keinen Einfluss auf die RyR-Expression. Klon 2 und Klon 5 wiesen hingegen beide eine stark verminderte RyR-Expression auf.

3.3.4 RyR-Expression nach Induktion mit Doxycyclin

Die zuvor beschriebenen Experimente wurden nach einer Induktionszeit von sechs Tagen durchgeführt. Um zu überprüfen, ob es zu einem anderen Zeitpunkt zu einer stärkeren Reduktion der Proteinexpression kommt, wurden Zellen des Klon 2 vor der Präparation von P10 Membranen für unterschiedliche Zeiten mit 1µg/ml Doxycyclin induziert, präpariert und anschließend über Western Blot analysiert. Diese Kinetik-Studie wurde mit Klon 2 durchgeführt, weil er geringfügig induzierbar erschien und die RyR-Expression nicht so stark reduziert war wie bei Klon 5. Um Unterschiede in der Expression deutlicher erkennen zu können, wurden bei diesem Experiment die doppelten Mengen an Protein (100µg) auf die SDS-PAGE aufgetragen.

Die Abb.3.12 zeigt in allen Ansätzen RyR-Banden ähnlicher Intensität. Die Proteinexpression unterschied sich in induzierten und nicht induzierten Klonen nicht voneinander, war aber im Vergleich zu nicht transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen deutlich reduziert. Die IP₃R-Bandenintensität war in allen Ansätzen gleich stark. Somit hatte weder die Induktionsdauer noch die Induktion selber Einfluss auf die RyR-Expression. Eine deutliche Induzierbarkeit des Klon 2 war daher nicht gegeben.

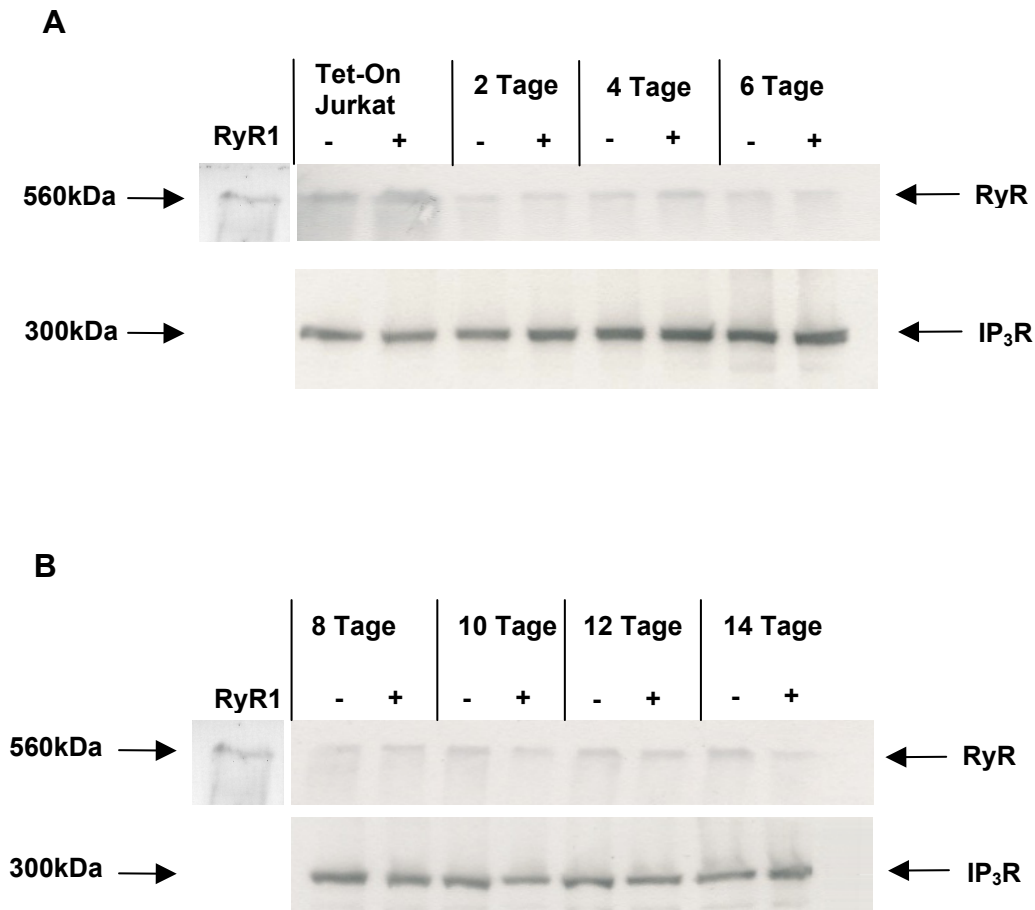


Abb. 3.12: RyR-Expression nach Induktion mit Doxycyclin

Western Blot-Analyse der Klon 2 P10 Membranfraktionen von Zellen, die vor der Präparation mit 1µg/ml Doxycyclin für 2, 4, 6, 8, 10, 12, und 14 Tage induziert (+) oder uninduziert (-) belassen wurden. Als zusätzliche Kontrolle wurden P10 Membranfraktionen nicht transfizierter Tet-On Jurkat T-Zellen aufgetragen. Die Auftrennung von 100µg Gesamtprotein erfolgte über 6% SDS-PAGE. Nach Proteintransfer wurde die Nitrocellulosemembran in zwei Teile zerschnitten. Die obere Hälfte wurde mit anti-RyR-Antikörper, die untere mit anti-IP₃R-Antikörper inkubiert und anschließend mit HRP-gekoppeltem Sekundär-Antikörper über Chemilumineszenz (ECL) immungefärbt. Filme wurden 5 Minuten exponiert. Die Banden konnten über den verwendeten Molekulargewichtsstandard und einem RyR-Marker (Solubilisierter RyR-1 aus Skelettmuskel, Prof. Hohenegger, Wien) dem IP₃R-Monomer (ca. 300kDa) und dem RyR-Monomer (ca. 560kDa) zugeordnet werden.

A+B: Die Intensität der RyR-Banden der Klone unterschied sich nach den gegebenen Induktionszeiten nicht voneinander, war aber deutlich schwächer als bei den Tet-On Jurkat-Kontrollzellen. IP₃R-Banden waren in allen Klonen von gleicher Stärke. Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt.

3.3.5 Calcium-Signale in den intakten RyR-defizienten Klonen 2 und 5

Die Stimulation von Tet-On Jurkat T-Zellen über den TCR/CD3 Komplex führt zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, der einen biphasischen Verlauf aufweist. Diese Calcium-Signale bestehen aus einem initialen Peak mit anschließendem Plateau erhöhter Calcium-Konzentration. Um zu untersuchen, welche Rolle die einzelnen Ryanodin-Rezeptor-Isoformen für dieses Calcium-Signal in T-Lymphozyten spielen,

wurden die Ryanodin-Rezeptor defizienten Klone mit Fura2/AM beladen und in Suspension nach Stimulation mit dem anti-CD3-Antikörper OKT3 im Fluorimeter ratiometrisch vermessen. Da zum Zeitpunkt der Calciummessungen die Ergebnisse der Kinetik-Studie noch nicht vorlagen, wurden die Klone für die Messungen sechs Tage induziert (1µg/ml Doxycyclin). Abbildungen 3.13A+B zeigen repräsentative Calciummessungen. In den Abbildungen 3.13C+D sind gemittelte Peak- und Plateauwerte dargestellt, die als $\Delta [Ca^{2+}]$ [nM] mit Standardabweichungen auf der Y-Achse aufgetragen sind. Sie ergeben sich aus folgenden Zusammenhängen:

$$\Delta_{\text{peak}} = [Ca^{2+}]_{\text{peak}} - [Ca^{2+}]_{\text{basal}}; \quad \Delta_{\text{Plateau}} = [Ca^{2+}]_{\text{Plateau}} - [Ca^{2+}]_{\text{basal}}$$

Die Zahl der gemittelten Experimente lag zwischen 8 und 20. Die basalen Calciumkonzentrationen aller Klone lagen im Mittel zwischen $40\text{nM} \pm 13\text{nM}$ und $57\text{nM} \pm 19\text{nM}$ und stimmten damit gut überein. Die Induktion hatte keinen Einfluss auf den Basalwert der Klone. Die gemittelten Basalwerte der Klone sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Klon	Tet-On	Klon 2	Klon 5	Klon E1	Klon E2
nicht induziert [Ca^{2+}] [nM]	43 ± 13 (n=20)	40 ± 17 (n=15)	55 ± 16 (n=9)	52 ± 19 (n=13)	52 ± 16 (n=11)
induziert [Ca^{2+}] [nM]	43 ± 15 (n=11)	45 ± 18 (n=10)	57 ± 17 (n=8)	53 ± 16 (n=13)	50 ± 14 (n=11)

Tab.3.3: Gemittelte basale Calcium-Konzentrationen in nicht induzierten und induzierten Klonen

Die Calciummessungen wurden teilweise von Sandra Frederichs (BTA-Schülerin) im Rahmen ihrer praktischen Ausbildung durchgeführt.

In den Abbildungen 3.13A+C erkennt man, dass nach Stimulation mit OKT3 die intrazelluläre Calciumkonzentration der nicht transfizierten Tet-On Jurkat Kontrollzellen um 626nM anstieg. Im Mittel stellte sich 900 sec nach Stimulation bei Tet-On Jurkat T-Zellen ein Plateau mit einer Calciumkonzentration von 114nM über dem Basalwert ein. Das Plateau blieb über den betrachteten Zeitraum stabil. Die Calciummessungen der Klone E1 und E2 zeigten, dass die Plateauwerte nach 900 sec Messzeit mit denen der Tet-On Jurkat T-Zellen gut übereinstimmten. Die Höhe des Peakwerts von Klon E2 entsprach ebenfalls dem der Tet-On Jurkat Kontrollzellen. Klon E1 wies dagegen einen größeren Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration direkt nach OKT3 Stimulation auf. Bei Betrachtung der Klone 5 und 2 ist erkennbar, dass der Peakwert des Klon 5 im Bereich der Kontrollwerte lag, während der des Klon 2 deutlich kleiner war. Die Plateauwerte beider Klone hingegen waren im Vergleich zu den Kontrollen signifikant reduziert.

Abbildungen 3.13B+D stellen Calciummessungen und gemittelte Peak- und Plateauwerte induzierter Tet-On Jurkat T-Zellen und induzierter Klone dar. Die Peak- und Plateauwerte wiesen keinen Unterschied zu denen der nicht induzierten Partner auf. Nach OKT3-Stimulation der induzierten Tet-On Jurkat T-Zellen kam es zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration um 647nM. Nach 900 sec Messzeit hatte sich ein Plateau mit einer durchschnittlichen Konzentration von 115nM Calcium über dem Basalwert eingestellt. Bei Betrachtung der Kontrollklone E1 und E2 war erkennbar, dass die Plateauwerte nach 900sec Messzeit mit denen der Tet-On Jurkat T-Zellen vergleichbar waren. Der Peakwert des Klon E2 war im Vergleich zu den Tet-On Jurkat T-Zellen nicht signifikant erniedrigt. Im Vergleich dazu wies Klon E1 einen deutlich höheren Peakwert auf. Der induzierte Klon 5 lag mit seinem Peakwert wieder im Bereich der Kontrollen, während der induzierte Klon 2 einen signifikant erniedrigten Peakwert aufwies. Die Plateauwerte der Klone 2 und 5 waren ebenfalls signifikant niedriger als die aller Kontrollzellen (Klon E1, Klon E2 und Tet-On Jurkat T-Zellen).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich in den RyR-defizienten Klonen 2 und 5 das Calcium-Signal nach Stimulation über den TCR/CD3-Komplex deutlich von nicht transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen und den Kontrollklonen E1 und E2 unterscheidet. Die Reduktion des Peakwerts von Klon 2 lag im Vergleich zu den Tet-On Jurkat T-Zellen bei 41%. Die Plateauwerte von Klon 2 und 5 waren um 39% bzw. um 53% reduziert.

Der Peakwert des induzierten Klon 2 war im Vergleich zu induzierten Tet-On Jurkat T-Zellen um 38% reduziert. Die Plateauwerte der induzierten Klone 2 und 5 wiesen im Vergleich zu den induzierten Tet-On Jurkat T-Zellen eine Reduktion von 40% bzw. 56% auf. Die Induktion hatte somit nur einen geringen, aber nicht signifikanten Einfluss auf das Calcium-Signal der Klone nach Stimulation über den TCR/CD3-Komplex. Der mit pTRE2-EGFP stabil transfizierte Klon E2 wies mit den Tet-On Jurkat T-Zellen gut übereinstimmende Calcium-Konzentrationen nach Stimulation über den TCR/CD3 Komplex auf und stellt somit eine ausgezeichnete Kontrollzelllinie dar.

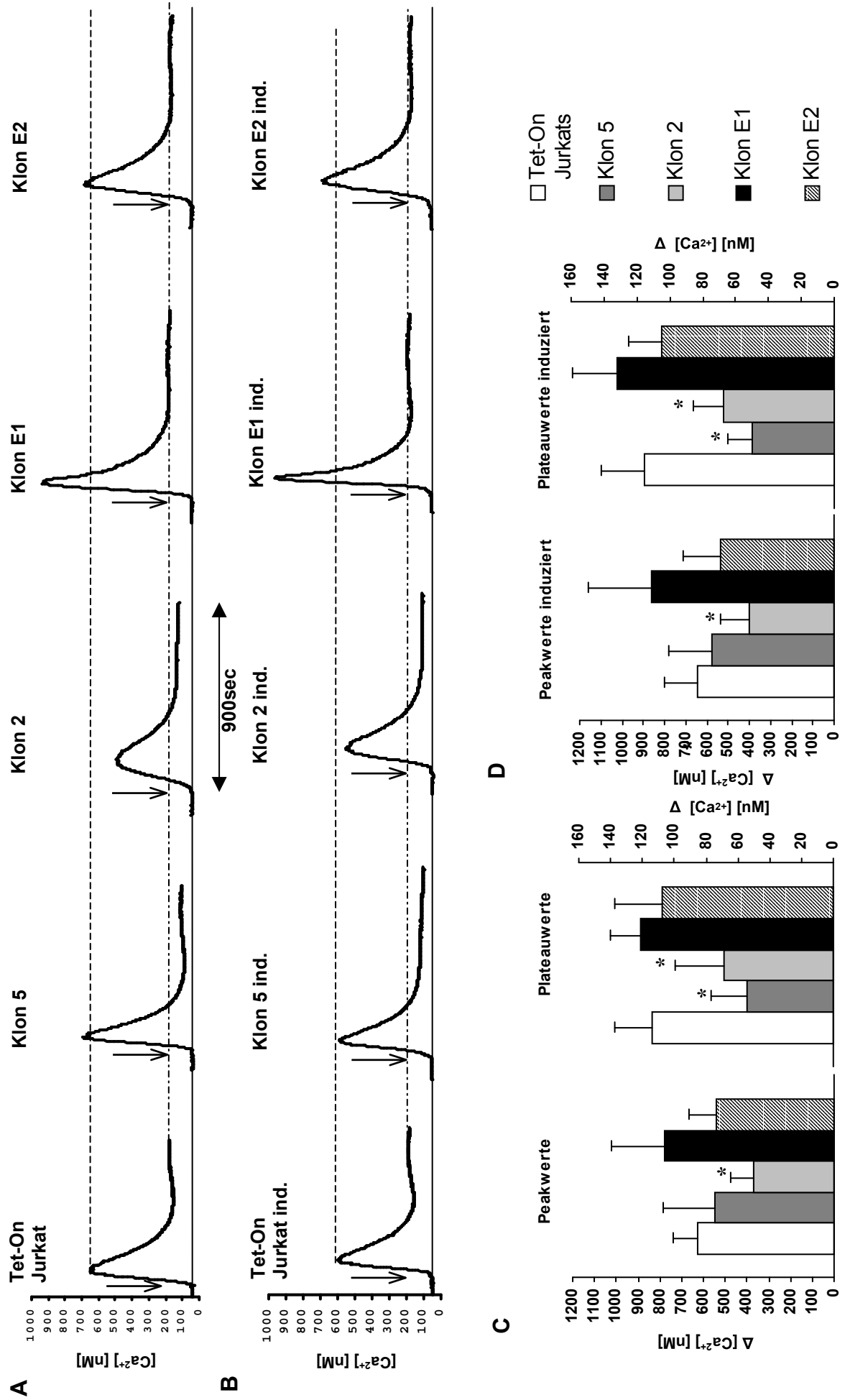


Abb.3.13 : Calcium-Signale in den intakten RyR-defizienten Klonen 2 und 5

Abb.3.13: Calcium-Signale in RyR-defizienten Klonen**A: Repräsentative Calciummessungen der nicht induzierten Klone 5, 2, E1 und E2**

Fura2 beladene Zellen wurden in Suspension im Fluorimeter nach Stimulation mit OKT3 (10µg/ml Endkonzentration) für 15 Minuten vermessen. Als zusätzliche Kontrolle wurden nicht transfizierte Tet-On Jurkat T-Zellen vermessen. Repräsentative Calciumkurven der Klone sind nebeneinander dargestellt. Der Zeitpunkt der OKT3-Zugabe ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

B: Repräsentative Calciummessungen der induzierten Klone 5, 2, E1 und E2

Alle Klone wurden für sechs Tage mit 1µg/ml Doxycyclin induziert. Mit Fura2 beladene Zellen wurden in Suspension mit OKT3 (10µg/ml Endkonzentration) stimuliert und für 15 Minuten im Fluorimeter gemessen. Als zusätzliche Kontrolle wurden nicht transfizierte Tet-On Jurkat T-Zellen mitgeführt. Repräsentative Calciumkurven der Klone sind nebeneinander dargestellt. Der Zeitpunkt der OKT3-Zugabe ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

C+D: Gemittelte Peak- und Plateauwerte in induzierten und nicht induzierten Klonen

In den Säulendiagrammen sind die gemittelten Peak- und Plateauwerte mit Standardabweichungen aufgetragen. Die Anzahl der durchgeführten Experimente war wie folgt: Tet-On (n=20), Tet-On induziert (n= 11), Klon 2 (n= 15), Klon 2 induziert (n = 10); Klon 5 (n= 9), Klon 5 induziert (n= 8), Klon E1 (n= 13), Klon E1 induziert (n= 13), Klon E2 (n =11), Klon E2 induziert (n= 11). Klone im induzierten und nicht induzierten Zustand wurden am gleichen Tag vermessen.

* = signifikant unterschiedliche Werte der Klone im Vergleich zu allen Kontrollklonen (E1, E2 und Tet-On Jurkat T-Zellen). Die Analyse statistischer Signifikanz erfolgte mit dem t-Test nach Student. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 5\%$ festgelegt. Damit gelten Ergebnisse mit $P < 0,05$ als signifikant.

Gemittelte Peakwerte abzüglich des Basalwerts nicht induzierter Klone waren wie folgt: Tet-On Jurkat T-Zellen = $626\text{nM} \pm 115\text{nM}$; Klon 5 = $547 \pm 238\text{nM}$; Klon 2 = $371\text{nM} \pm 107\text{nM}$; Klon E1 = $775\text{nM} \pm 250\text{nM}$; Klon E2 = $542\text{nM} \pm 121\text{nM}$.

Gemittelte Plateauwerte abzüglich des Basalwerts nicht induzierter Klone waren wie folgt: Tet-On Jurkat T-Zellen = $114\text{nM} \pm 23\text{nM}$; Klon 5 = $54\text{nM} \pm 23\text{nM}$; Klon 2 = $69\text{nM} \pm 30\text{nM}$; Klon E1 = $121\text{nM} \pm 19\text{nM}$; Klon E2 = $108\text{nM} \pm 29\text{nM}$.

Gemittelte Peakwerte abzüglich des Basalwerts induzierter Klone: Tet-On Jurkat T-Zellen = $647\text{nM} \pm 151\text{nM}$; Klon 5 = $577\text{nM} \pm 205\text{nM}$, Klon 2 = $400\text{nM} \pm 133\text{nM}$; Klon E1 = $860\text{nM} \pm 298\text{nM}$; Klon E2 = $537\text{nM} \pm 175\text{nM}$.

Gemittelte Plateauwerte abzüglich des Basalwerts induzierter Klone: Tet-On Jurkat T-Zellen = $115\text{nM} \pm 27\text{nM}$; Klon 5 = $50\text{nM} \pm 15\text{nM}$; Klon 2 = $67\text{nM} \pm 19\text{nM}$; Klon E1 = $132\text{nM} \pm 27\text{nM}$; Klon E2 = $105\text{nM} \pm 20\text{nM}$.

Damit konnten als Ergebnis dieser Arbeit zwei Zelllinien erzeugt werden, in denen die RyR-3-Expression (Klon 5) und die Expression aller RyR-Isoformen (Klon 2) erheblich reprimiert war. Zudem wiesen diese beiden Zelllinien nach TCR/CD3-Stimulation eine stark unterschiedliche Calcium-Signalgebung im Vergleich zu nicht transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen sowie zu den Kontrollzelllinien (E1 und E2) auf, und unterschieden sich auch untereinander bezüglich ihrer Calcium-Signale nach OKT3 Stimulation.

Am Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration in intakten Zellen nach Stimulation über den T-Zell-Rezeptor sind neben der frühen Calcium-Freisetzung durch IP_3 aus dem ER noch mindestens zwei weitere Mechanismen beteiligt: die Freisetzung von Calcium durch cADPR aus Speichern mit RyR, sowie der Einstrom von Calcium über die Plasmamembran. Damit zeigen die Ergebnisse der Messungen an intakten Zellen, dass die reduzierte RyR-Expression zur Verminderung initialer und langanhaltender Calcium-Anstiege führt. RyR-1 und RyR-2 sind dabei offensichtlich in der initialen Phase des Calcium-Signals beteiligt, während RyR-3 im langanhaltenden Calcium-Signal involviert

ist. Um Aufschluss über die am späten Calcium-Signal beteiligten Mechanismen zu bekommen, wurden nachfolgend die Second Messenger-aktivierte Freisetzung von Calcium in permeabilisierten Zellen gemessen.

3.3.6 cADPR-vermittelte Freisetzung von Calcium in den permeabilisierten RyR-defizienten Klonen 2 und 5

In permeabilisierten Zellen sind Calcium-Einstrom und Calcium-Freisetzung durch Zerstörung der Plasmamembran als Permeabilitätsbarriere vollkommen voneinander entkoppelt. Dadurch wird ermöglicht, die direkte Wirkung der RyR-Repression auf die Calcium-Freisetzung durch cADPR zu untersuchen. Da wie schon in Kapitel 3.3.5 beschrieben wurde, die Induktion der antisense-RNA keinen Einfluß auf die Calcium-Signale hatte, wurden nur nicht induzierte Klone analysiert.

In Abbildung 3.14A ist die Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern nach Gabe von 10µM cADPR dargestellt. Die Menge an freigesetztem Calcium war in Kontrollklon E1 höher als in nicht transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen. Dennoch war im Vergleich zu Klon E1 und den Tet-On Jurkat T-Zellen die Konzentration an freigesetztem Calcium in den Klonen 2 und 5 deutlich reduziert.

Abbildung 3.14B zeigt, dass sich die Menge an freigesetztem Calcium nach Gabe von 4µM IP₃ in Tet-On Jurkat T-Zellen und Klon E1 nicht unterschied. Im Vergleich der Klone 2 und 5 mit Tet-On Jurkat T-Zellen war tendenziell eine leichte Zunahme des freigesetzten Calciums zu erkennen: Tet-On Jurkat T-Zellen < Klon 2 < Klon 5.

Abbildung 3.14C lässt erkennen, dass sich die Mengen an insgesamt freigesetztem Calcium nach Zugabe von cADPR, IP₃ und IM in allen Klonen und nicht transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen etwas voneinander unterschieden. Es war eine tendenzielle Zunahme zu erkennen: Tet-On Jurkat T-Zellen < Klon 2 < Klon 5 < Klon E1.

Der prozentuale Anteil des gesamten, in intrazellulären Speichern befindlichen Calciums, der durch 10µM cADPR mobilisiert wurde, betrug in nicht transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen 20% und im Kontrollklon E1 24% (Abb.3.14D). Der durch cADPR freigesetzte prozentuale Anteil an intrazellulärem Calcium in den Klonen 2 und 5 war deutlich, wenn auch im Vergleich zu den Tet-On Jurkat T-Zellen nicht signifikant reduziert (15% bzw. 11%). Betrachtet man Klon 5 im Vergleich zu Klon E1 ergibt sich mit 11% eine signifikante Reduktion des durch cADPR freigesetzten intrazellulären Calciums.

In Abbildung 3.14E ist erkennbar, dass der prozentuale Anteil des durch IP₃ freigesetzten Calciums am insgesamt freigesetzten Calcium in Klon E1 mit 51% niedriger war als in den anderen Klonen. Bei Tet-On Jurkat T-Zellen und den Klonen 2 und 5 war eine tendenzielle Zunahme zu erkennen. Tet-On Jurkat T-Zellen 56% < 61% Klon 2 < 65% Klon 5.

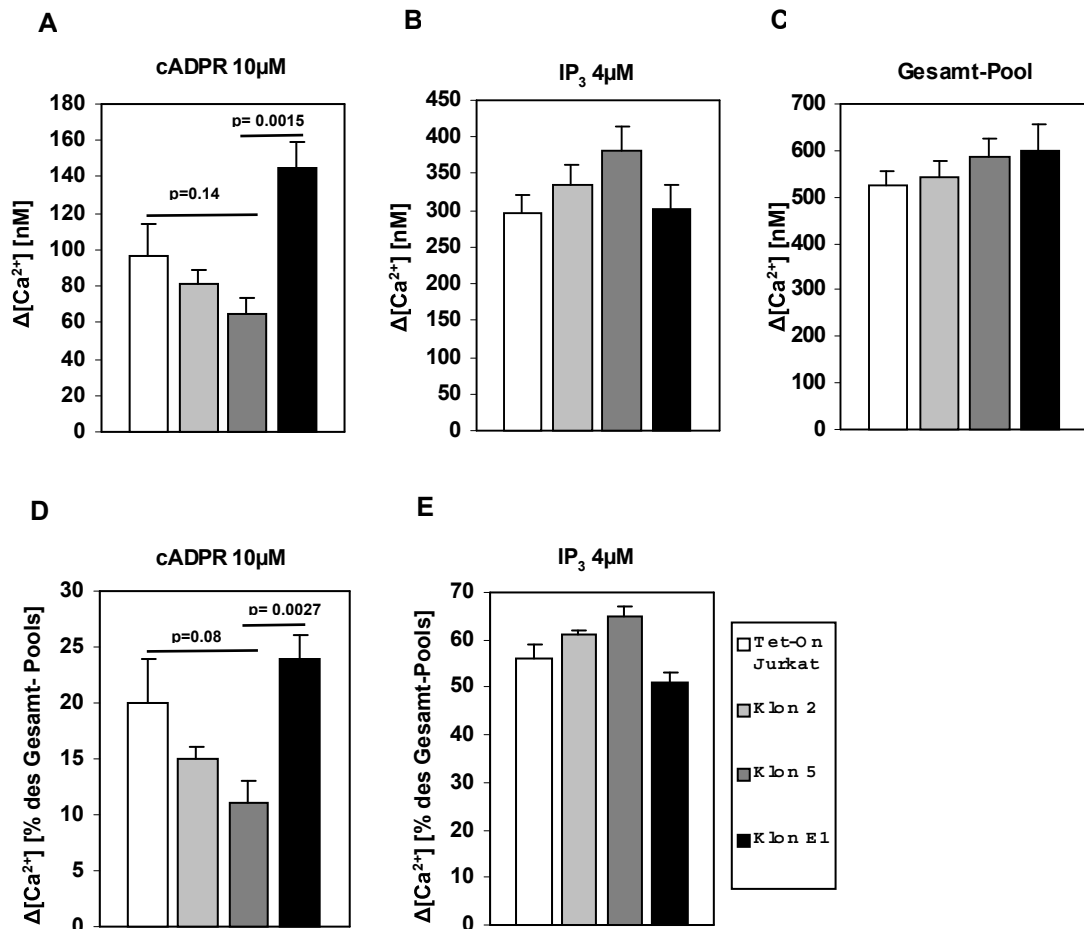


Abb.3.14 cADPR-vermittelte Freisetzung von Calcium in permeabilisierten RyR-defizienten Klonen

Um die ausreichende Beladung der Calcium-speichernden Vesikel zu gewährleisten, wurden zu Beginn der Messung Creatinkinase, Creatinphosphat und ATP zur Zellsuspension gegeben. Als Folge davon nahm die Ratio 340/380 ab. Nachdem sich ein konstanter Calcium-Wert eingestellt hatte, wurde zuerst cADPR, dann IP₃ und anschließend Ionomycin zugegeben. Zum Schluß wurden erst Calcium und dann EGTA zur Bestimmung der maximalen und minimalen Ratio zugegeben. Diese Messungen wurden von Karin Weber durchgeführt.

A+B+C: Dargestellt sind Mittelwerte an freigesetztem Calcium im Vergleich zur basalen Calciumkonzentration nach sukzessiver Zugabe von 10μM cADPR (A), 4μM IP₃ (B) und 1μM IM (C) aus nicht transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen, Klon 2, Klon 5 und Klon E1. Es wurden nur Experimente miteinbezogen, in denen die Zellen eine Gesamt-Pool-Konzentration von ≥399nM Calcium aufwiesen. Die Anzahl der durchgeführten Experimente war wie folgt: Tet-On = 7; Klon 2 = 8; Klon 5 = 9; Klon E1 = 3.

Mittelwerte an freigesetztem Calcium nach Zugabe von cADPR aus den verschiedenen Klonen waren wie folgt: Tet-On Jurkat T-Zellen = 97nM ± 17nM; Klon 2 = 81nM ± 8; Klon 5 = 65nM ± 9nM; Klon E1 = 145nM ± 14nM.

Mittelwerte an freigesetztem Calcium nach Zugabe von IP₃ aus den verschiedenen Klonen war wie folgt: Tet-On Jurkat T-Zellen = 295nM ± 27nM; Klon 2 = 335nM ± 27nM; Klon 5 = 381nM ± 33nM; Klon E1 = 303nM ± 33nM.

Mittelwerte des Gesamtanstiegs an freigesetztem Calcium (cADPR+IP₃+IM) aus den verschiedenen Klonen war wie folgt: Tet-On Jurkat T-Zellen = 526nM ± 28; Klon 2 = 543nM ± 35nM; Klon 5 = 585nM ± 40nM; Klon E1 = 598nM ± 60nM.

D+E: Die Höhe der Calcium-Anstiege nach Zugabe der einzelnen Agonisten wird prozentual auf den Gesamtanstieg (cADPR + IP₃ + IM) bezogen.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Calcium-Freisetzung durch cADPR in permeabilisierten Zellen gestatten die Aussage, dass in RyR-defizienten Klonen cADPR deutlich weniger Calcium mobilisiert als in den Kontrollzellen. Das deutet darauf hin, dass an der durch cADPR vermittelten Calcium-Freisetzung Ryanodin-Rezeptoren maßgeblich beteiligt sind.

4 Diskussion

4.1 Expression von Ryanodin-Rezeptor Subtypen in Tet-On Jurkat

T-Lymphozyten

Ryanodin-Rezeptoren, in der Membran intrazellulärer Calcium-Speicher lokalisierte Calcium-Kanäle, sind maßgeblich an der Calcium-Signaltransduktion in verschiedensten Zellsystemen beteiligt (Übersicht in Williams et. al. 2001). In T-Lymphozyten ist die Expression von Ryanodin-Rezeptoren auf RNA- und Protein-Ebene von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben worden (Bourgignon et. al. 1995, Ricard et. al. 1997, Hakamata et. al. 1994, Guse et. al. 1999). Die RyR-Expression konnte durch Bindungsstudien mit [³H] Ryanodin und Western Blot-Analyse mit einem anti-RyR Antikörper in Jurkat T-Zellen (Guse et al. 1999) und murinen BW5147 T-Lymphozyten (Bourguignon et al. 1995) gezeigt werden. Guse und Hakamata wiesen mittels RT-PCR in Jurkat T-Lymphocyten den Ryanodin-Rezeptor Typ3 nach (Hakamata et al. 1994; Guse et al. 1999). In der hier vorliegenden Dissertationsschrift wurden in Tet-On Jurkat T-Zellen mittels RT-PCR und anschließender Nested PCR neben dem RyR-3 erstmals auch Subtyp1 und 2 nachgewiesen. RT-PCR war die einzige verfügbare Methode, Subtypspezifisch zu arbeiten, da keine Isoform-spezifischen Antikörper gegen humane RyR kommerziell erhältlich sind und die hohe Homologie der RyR-Isoformen untereinander die Auswahl einer hochspezifischen Northern Blot-Sonde erheblich erschwert hätte. Die konventionelle RT-PCR über 30 Zyklen reichte nicht aus, um die Amplifikate im Agarose-Gel sichtbar zu machen. Da jedoch mit steigender Zyklenzahl die Anzahl unerwünschter Artefakte häufig zunimmt, ohne dass mehr Ziel-DNA gebildet wird, wurde eine Nested PCR angeschlossen. Eine Nested PCR erhöht die Spezifität der Vervielfältigung erheblich, weil nur die exakt komplementären Sequenzen den innen liegenden Primern als Matrize zur Verfügung stehen. Damit bleiben alle unspezifischen Kopien unberücksichtigt (Newton & Graham, PCR, 1994). Die Bedingungen beider PCRs wurden so ausgelegt, dass die Reaktionsprodukte eindeutig mit RNA in Verbindung gebracht werden konnten. So wurde die Matrizen-RNA zuvor einem DNase-Verdau unterzogen und für alle Ansätze wurden Kontrollen ohne Reverse Transkriptase mitgeführt. Die RNA-Sequenzen der drei Ryanodin-Rezeptor-Subtypen waren zuvor einem multiplen Alignment unterzogen worden (siehe Anhang 1), so dass die Primer-Sets absolut Subtyp-spezifisch ausgewählt werden konnten. Da im humanen Gehirn alle drei RyR-Isoformen exprimiert werden (Giannini et al. 1995), wurde als Positivkontrolle mit den gleichen Primer-Sets aus humanem Gehirn amplifiziert.

Wenngleich die RT-PCR keine quantitative Aussage über die Stärke der RyR-Expression zulässt und nicht unbedingt immer eine Korrelation zwischen RNA-Expression und

Expression des funktionalen Proteins besteht, konnte durch die Sequenz-Analyse aller Amplifikate eindeutig die Expression der mRNAs aller drei RyR-Subtypen in Tet-On Jurkat T-Lymphozyten bestätigt werden (Anhang 2).

Die Bedeutung der Ryanodin-Rezeptoren für die Calcium-Signaltransduktion in T-Zellen wird kontrovers diskutiert. Pharmakologische Untersuchungen von Guse und Mitarbeitern (Guse et al. 1999) zeigten eindeutig einen direkten modulatorischen Effekt der Calcium-mobilisierenden Substanz cADPR auf den Ryanodin-Rezeptor. Im Gegensatz dazu zeigten Untersuchungen an einer RyR3^{-/-} Knock-out Maus, dass der RyR-3 nicht essentiell für die Reifung und Proliferation muriner T-Lymphozyten war (Takeshima et. al. 1996). Dennoch wurde die Beteiligung von Ryanodin-Rezeptoren am Calcium-Signal in T- und auch in B-Lymphozyten inzwischen von mehreren Arbeitsgruppen bestätigt. In einer Arbeit von Ritter und Mitarbeitern resultierte die Gabe von Coffein in primären Lymphozyten in einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration, die durch Ryanodin blockiert werden konnte (Ritter et al. 2001). Sei und Mitarbeiter zeigten die Beteiligung des RyR-1 am BCR-vermittelten Calcium-Signal in CD19+ B- und DAKIKI-Zellen (Sei et. al. 1999). In IP₃R-defizienten DT40-B-Zellen, die RyR-1 und RyR-3 exprimierten, inhibierten Ryanodin-Rezeptor-Antagonisten die Aktivierung von Calcium-Kanälen in der Plasmamembran (Kiselyov et al. 2001). Zudem wurde die Expression von RyR-1 und RyR-2 in CD3+ T-Zellen, RyR-1 in CD19+ B-Zellen und CD14+ Monozyten und in diversen T-Zelllinien nachgewiesen (Hosoi et. al. 2001).

Die Expression der verschiedenen RyR-Isoformen in einer Vielzahl von Immunzellen und deren augenscheinliche funktionale Bedeutung für BCR- und TCR-vermittelte Calcium-Signale bestärken und untermauern die Hypothese, dass neben den drei IP₃-Rezeptor-Isoformen und den Plasmamembran-ständigen Calcium-Kanälen auch verschiedene Ryanodin-Rezeptor-Isoformen für die Calcium-abhängigen Mechanismen in T-Zellen eine wichtige Rolle spielen.

4.2 Generierung der RyR-defizienten Zelllinien und Auswahl der Klone

4.2.1 Antisense-Technologie

Die Bedeutung der RyR-Isoformen für die Calcium-Signaltransduktion in Jurkat T-Zellen wurde durch eine „loss-of-function“ Analyse untersucht. Dazu wurden zur Generierung von RyR-defizienten T-Zelllinien unter Verwendung des Tet-On Expressionssystems (Clontech) zwei verschiedene antisense-Fragmente stabil in das Genom der Tet-On Jurkat T-Zellen integriert. Mit einem 240bp großen Fragment (aus RyR-3 und 70% homolog zu RyR-1 und RyR-2) sollte die Expression aller drei RyR-Subtypen, mit einem 511bp großen Fragment (aus RyR-3, 29% homolog zu RyR-1 und RyR-2) die Expression des RyR-3 reprimiert werden.

Der funktionale „Knock-down“ eines Proteins durch Antisense-Technologie basiert auf der Bindung der in die Zelle eingeschleusten antisense-Nukleotide an die endogene Ziel-RNA. Doppelsträngige RNA kann nicht translatiert werden und initiiert oftmals Prozesse, die ihren eigenen Abbau durch RNAsen fördern (Jen & Gerwitz 2000).

Der in der vorliegenden Arbeit gewählte Ansatz wurde dem eines Knock-outs durch homologe Rekombination vorgezogen, da die Generierung von transgenen Mäusen zu zeitaufwendig und kostenintensiv gewesen wäre.

Eine weitere Alternative wäre der Einsatz von antisense Oligodesoxynukleotiden gewesen (Paterson et al. 1977; Stephenson & Zamecnik 1978). Für diesen Ansatz ist die Verwendung von modifizierten Oligonukleotiden, den Phosphorothioaten, auf Grund ihrer größeren Stabilität angezeigt (Stein 1995; Übersicht in Jen & Gerwitz 2000). Die unspezifische Bindung dieser Oligonukleotide ruft jedoch oftmals unerwünschte biologische Effekte hervor, die die Interpretation der Ergebnisse erschweren können (Übersicht in Stein 1995). Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Injektion von Phosphorothioaten in Mäusen eine dramatische Erhöhung der Immunglobulin-Sekretion zur Folge hatte (Krieg et al. 1995), dass diese Oligonukleotide T-Zell-Aktivierung modulieren oder die Freisetzung bestimmter Interleukine stimulieren können (Stein 1995).

Außerdem erfordert diese Antisense-Strategie eine große Menge an Phosphorothioaten. Dadurch sind Experimenten mit größeren Zellmengen sehr kostenintensiv. Zudem sollten durch die stabile Transfektion von antisense-Fragmenten ständig verfügbare und sich wenig verändernde RyR-defiziente Zelllinien generiert werden.

Der in der vorliegenden Arbeit gewählte prinzipielle Ansatz der antisense-Technologie in stabil transfizierten Zellen war zuvor von Jayaraman und Mitarbeitern erfolgreich beschrieben worden: Die stabile Transfektion einer IP₃R-1 antisense cDNA in Jurkat T-Zellen führte dabei zur effektiven Reduktion der Proteinexpression (Jayaraman et al. 1995).

Generell wird der Einsatz von antisense-Molekülen zur Blockierung der Genexpression kontrovers diskutiert, da der Erfolg einer „loss-of-function“ Analyse von vielen kritischen Parametern abhängt. Entscheidend ist die sequenzspezifische Hybridisierung der antisense-RNA bei physiologischer Temperatur und Salzkonzentration. Dabei ist die Hybridisierungseigenschaft von der Länge des Moleküls abhängig. Die in diesem Experiment ausgewählten antisense-Fragmente wurden zuvor durch Datenbanksuche auf ihre Spezifität untersucht. Um die sequenzspezifische Wirkung zu demonstrieren, müssen die Kontrollen sorgfältig ausgewählt werden. Negativkontrollen sollten unspezifische Nebeneffekte detektieren. Hierfür verwendete antisense-Moleküle sollten eine ähnliche Länge und Basenzusammensetzung aufweisen wie die antisense-Fragmente, jedoch zu

keiner der zellulären mRNA eine Homologie aufweisen. Als Kontrolle eingesetzte Sense-Fragmente weisen dagegen häufig unspezifische Kreuzhybridisierungen auf. Ebenso ist von Kontrollen mit Zufalls-Sequenzen abzuraten, da sie oftmals eine hohe Toxizität aufweisen (Eickhoff 2000). In der vorliegenden Dissertationsschrift wurde als Kontrolle ein 250bp großes antisense-Fragment aus EGFP verwendet. Dieses Fragment weist zu dem 240bp großen antisense-Fragment eine vergleichbare Länge, zu beiden antisense-Fragmenten eine vergleichbare Basenzusammensetzung auf und EGFP wird in Jurkat T-Zellen nicht exprimiert.

Ein weiteres Problem für die Effektivität des antisense-Moleküls ist die Konformation, in der die mRNA in lebenden Zellen vorliegt. In weiten Bereichen des Polymers dominieren hierbei Sekundärstrukturen, so dass nur partielle Sequenzbereiche für die Hybridisierung zugänglich sind. Doch sind Programme, die dreidimensionale RNA-Struktur-Muster auf Grund von Energie-Berechnungen erstellen, oft unzuverlässig (Jen et al. 2000).

Die gewählte Länge der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten antisense-Fragmente sollte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass sie Bereiche beinhalten, die in der endogenen Ziel-RNA zugänglich sind.

Zudem umfasst das 240bp große Fragment einen Bereich, der für 2 putative Transmembranregionen kodiert, so dass durch die Entstehung eines möglicherweise trunkierten Proteins kein funktionaler Kanal mehr gebildet werden kann. Das 240bp große Fragment aus RyR-3 weist eine 70%-ige Homologie zu den RNA-Sequenzen der RyR-2 und RyR-1 auf. Damit ist dieses antisense-Fragment bei einer Identität von 70% und der Länge von 240bp ausreichend homolog, um die Expression des RyR-1 und RyR-2 durch Kreuzreaktion zu blocken. Im Ansatz von Jayaraman führte die antisense IP₃R-1 cDNA, die eine 60-75%-ige Homologie zu den anderen beiden Subtypen aufwies, ebenfalls zur Reduktion der IP₃R-2- und IP₃R-3-Expression (Jayaraman et al. 1995). Im Gegensatz dazu ist das 511bp große Fragment spezifischer für Typ 3. Seine Homologie zu den anderen beiden Subtypen liegt bei nur 29% (siehe Anhang 1).

4.2.2 Induzierbarkeit in RyR defizienten Klonen

Die bestmögliche Kontrolle, die auf die kritischen Parameter eines antisense-Experiments anwendbar ist, ist der Einsatz eines induzierbaren Systems. Induzierbarkeit stellt ein gutes Mittel dar, um die Funktion eines Gens in Abhängigkeit vom Expressionsniveau zu untersuchen, oder die Expression toxischer oder wachstumshemmender Gene auf Dauer zu vermeiden. Durch Induzierbarkeit lässt sich die Wirkung der Expression eines bestimmten Gens direkt an ein und demselben Klon vergleichen. Auf Grund von Studien mit dem cADPR-Antagonisten 7-Deaza-8-Bromo-cADPR, der zur Hemmung der Proliferation von peripheren T-Zellen führte (Guse et. al. 1999), erschien

die Verwendung eines induzierbaren Systems sinnvoll.

Leider lag bei den in der vorliegenden Arbeit generierten und untersuchten RyR-defizienten Klonen keine Induzierbarkeit vor.

Obwohl zur Kultivierung der Klone FBS verwendet wurde, das zuvor durch den Hersteller auf das Vorhandensein von Tetracyclin hin überprüft wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass trotzdem Spuren von Tetracyclin oder biologisch aktiven Tetracyclin-Derivaten im Serum vorhanden waren, die für die konstitutive Expression der antisense-Fragmente verantwortlich sind. Tetracyclin ist in der Lage, in einer Konzentration von weniger als 1µg/ml die Transkription zu initiieren (Clontech Protokoll PT3001-1, Version PR85369). Dagegen aktiviert Doxycyclin schon in einer Konzentration von weniger als 10ng/ml die Transkription (Clontech Protokoll PT3001-1, Version PR85369).

Ein weiterer Grund für die fehlende Induzierbarkeit könnte sich durch den zufälligen Charakter der Genintegration ergeben. Integrationsort-spezifische Effekte, wie konstitutive Expression oder Repression sind sehr häufig, wenn Fremd-DNA eingeführt wird (Shockett & Schatz 1996).

Wahrscheinlich ist die fehlende Induzierbarkeit der in der vorliegenden Arbeit erzeugten antisense-Klone auf Integrationsort-spezifische Effekte zurückzuführen, die genaue Ursache konnte jedoch nicht ermittelt werden.

Es wurde aber auch von anderen Gruppen gezeigt, dass Induzierbarkeit unter Verwendung des Tet-Systems in Jurkat T-Zellen und anderen Zelllinien nicht oder nur geringfügig erreichbar war (S. Horn, IMBM, Hamburg, persönliche Mitteilung). Weitere eigene, im Rahmen dieser Dissertation nicht erwähnte Resultate mit einem anderen Vektor (pBI-EGFP) führten ebenfalls zu keiner oder nur geringer Induzierbarkeit. Dies deutet darauf hin, dass nicht das Tet-System per se, sondern die Verwendung dieses Systems in der onkogen transformierten Jurkat T-Zelllinie nur in Ausnahmefällen zu der gewünschten Induzierbarkeit durch Tetracyclin oder Doxycyclin führt.

Nichts desto trotz bieten die isolierten RyR-defizienten Klone ein aussagekräftiges System für Studien des cADPR-vermittelten Calciums-Signal in T-Lymphozyten, weil die antisense- und Kontrollklone nach strengen Regeln ausgewählt wurden. Da die eingangs befürchtete Proliferationshemmung bei den ausgewählten Klonen nicht sehr ausgeprägt war, konnten die Klone mit der konstitutiv aktivierten Transkription der antisense-Fragmente auch in allen geplanten Experimenten verwendet werden.

4.2.3 Integration der antisense-Konstrukte und Expression der antisense-RNA

Zuvor durchgeführte Transfektionsexperimente mit einem für EGFP als Reportergen kodierenden Expressionsplasmid (pBI-EGFP; Clontech) lieferten keine induzierbaren Klone. Auch von anderen Arbeitsgruppen wurde berichtet, dass es mit diesem Plasmid Probleme bezüglich der Induzierbarkeit gab (Stefan Horn, IMBM, persönliche Mitteilung). Auf Grund dessen wurde das Expressionsplasmid pTRE für nachfolgende Transfektionsexperimente ausgewählt. Zum Zeitpunkt der Transfektion war die Version dieses Plasmids, das für ein Reportergen kodiert, noch nicht kommerziell erhältlich. Deswegen konnte die Vorauswahl der Klone nicht über Fluoreszenz oder andere Reportergenassays erfolgen. Stattdessen wurde in jedem Klon die Integration des antisense-Konstrukts direkt durch genomische PCR geprüft. Dabei richteten sich die verwendeten Primer gegen Sequenzen in der Promotorregion und den Polyadenylierungsbereich. Dadurch konnte gleichzeitig die Integrität dieser Sequenzbereiche kontrolliert werden. Eine durchgeführte Wasserkontrolle schloss Fremdkontaminationen aus.

Obwohl die Klone durch Hygromycin-Resistenz selektiert wurden, wurden auch Klone isoliert, die das antisense-Konstrukt offenbar nicht in ihr Genom integriert hatten (Abb.3.5-7). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass das Träger-Plasmid das Hygromycin-Resistenz-Gen nicht beinhaltet, weswegen eine Cotransfektion des Träger-Plasmids (pTRE2) mit dem Selektionsplasmid pTK-Hyg durchgeführt wurde. Es wird zwar postuliert, dass zwei cotransfizierte Plasmide dazu tendieren, in das Genom zu cointegrieren (Protokoll PT30001-1, Clontech). Dennoch ist nicht auszuschließen, dass nur das Selektionsplasmid allein integriert wird.

Wie sich herausstellte, war der prozentuale Anteil der auf die Integration der Kontrollkonstrukte untersuchten Klone, die das Plasmid stabil integriert hatten, größer als für die mit den antisense-Konstrukten transfizierten Klone. Ein möglicher Grund für diesen Effekt könnte sein, dass die antisense-Fragmente (240bp und 511bp) unter Umständen eine antiproliferative Wirkung entfalten. Da offensichtlich bereits in Abwesenheit von Doxycyclin, also im nicht induzierten Zustand, bei nahezu allen Klonen eine Expression von antisense-RNA stattfand, ist vorstellbar, dass bei antiproliferativer Wirkung der antisense-Fragmente die Klone, bei denen das antisense-Fragment integriert wurde, in ihrem Wachstum benachteiligt sind. Diese Hypothese wird durch das langsamere Wachstum der antisense-Klone und ihrer höheren Sterberate schon bei Beginn der Expansion untermauert. Die Vitalität der Zellen war etwa vier Wochen lang nach Beginn der Expansion alle zwei Tage durch Zellzählung und Trypanblau bestimmt worden (Daten nicht gezeigt).

Klone, die die Konstrukte stabil in ihr Genom integriert hatten, wurden mittels RT-PCR daraufhin überprüft, ob die entsprechende antisense-RNA exprimiert wird. Die Auswahl der Primer schloss die Amplifikation aus endogener RNA hierbei aus. Die verwendete RNA war zuvor einem DNase-Verdau unterzogen worden. Zusätzlich wurden für fast alle Ansätze Kontrollen ohne Reverse Transkriptase durchgeführt, um auszuschließen, dass es sich bei den Amplifikaten um DNA-Kontaminationen handelte. Aus dem Vergleich der PCR-Produkte eines Klons im induzierten und nicht induzierten Zustand geht hervor, dass außer bei Klon pTRE2-240/10 (Abb.3.9), pTRE2-EGFP/E1 und pTRE2-EGFP/E8 (Abb.3.10) keine Induzierbarkeit zu erkennen war. Da jedoch die RT-PCR unter den gewählten Bedingungen keine quantitative Aussagen über die PCR-Produkte zulässt, war auch bei diesen drei Klonen die Induzierbarkeit nur tendenziell zu erkennen. Die Quantität einer PCR wird durch ihren exponentiellen Verlauf bestimmt. Die PCR verläuft nur anfänglich exponentiell (Newton & Graham, PCR, 1994). Bei 10^8 Amplikonkopien erreicht sie ein Plateau. Für eine quantitative PCR sollte man sich deshalb auf weniger als 20 Zyklen beschränken (Newton & Graham, PCR, 1994). Sind nur wenige der Ausgangskopien im Ausgangsmaterial enthalten, sollte die Anzahl der Amplikons nach 20 Zyklen nur mit hochempfindlichen Nachweismethoden bestimmt werden. Einer Untersuchung zufolge bleibt die Vervielfältigung bei 12-400 Anfangskopien bis bestenfalls 30 Zyklen exponentiell (Kellogg et al. 1990). Da die RT-PCR indessen mit 28 Zyklen durchgeführt wurde, kann über die Ausgangsmenge der Matrizen-RNA keine Aussage gemacht werden.

Durch die Auswahl der beschriebenen RT-PCR-Bedingungen stellen die PCR-Produkte jedoch eindeutig Produkte aus antisense-RNA dar (Vergleiche Kapitel 4.1).

Die in diesem Kapitel beschriebene Kombination aus genomischer PCR und RT-PCR ist ein sicheres System, die richtigen Klone für weitere Untersuchungen auszuwählen. Es ist sinnvoll, zunächst die Anwesenheit der antisense-RNA direkt nachzuweisen, um nachfolgend eine Korrelation zwischen vorhandener antisense-RNA und verminderter Proteinexpression herstellen zu können. Diese Vorgehensweise ist häufig beschrieben worden (Trojan et al. 1992, Vilenchik et al. 2002, Pereverzev et al. 2002). Nur Klone, die eindeutig das antisense-Konstrukt in ihr Genom integriert hatten und zusätzlich die antisense-RNA exprimierten, wurden in weiteren Studien auf Protein-Ebene evaluiert.

4.2.4 RyR Proteinexpression in RyR-defizienten Klonen

Zur Untersuchung der RyR Proteinexpression wurden folgende RyR-defizienten Klone ausgewählt: Klon pTRE2-240/10 (Abb.3.5B und Abb.3.9A) und pTRE2-511/25 (Abb.3.6D und Abb.3.10F). Als EGFP-Kontrollklone wurden pTRE2-EGFP/E1 und pTRE2-EGFP/E2 (Abb.3.5A und 3.10D) bestimmt. Klon 240/10 wird im folgenden als Klon 2, Klon 511/25

als Klon 5, Klon EGFP/E1 als Klon E1 und Klon EGFP/E2 als Klon E2 bezeichnet. Für die Western Blot-Analyse wurde ein monoklonaler anti-RyR_{common}-Antikörper verwendet, der alle drei Isoformen erkennt. Die RyR-Bande konnte durch den Gebrauch eines solubilisierten RyR-1 aus Kaninchen Skelettmuskel (Prof. Hohenegger, Wien) eindeutig zugeordnet werden. Zudem wurden hierbei durch zusätzliche Immunfärbung mit anti-IP₃R-Antikörpern unspezifische Effekte auf die Calcium-Signalgebung durch das Fehlen der wichtigen Signaltransduktions-Komponente IP₃R ausgeschlossen. Die Expression des RyR-Proteins konnte zwar nicht exakt quantifiziert werden, jedoch erlaubt die Schwärzung des Films bei gleicher Expositionsdauer eine semi-quantitative Einschätzung von Veränderungen der Expression.

Bei Betrachtung der Kontrollklone E1 und E2 stellte sich heraus, dass die Stärke der RyR-Expression mit der von nicht transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen gut übereinstimmte und auch die IP₃R-Expression in keinem Kontrollklon beeinträchtigt war. Vergleicht man jedoch die induzierten Klone E1 und E2 mit den dazugehörigen nicht induzierten Klonen E1 und E2 in den Abb.3.11B und Abb.3.11A, sind geringe Unterschiede in der RyR-Bandenintensität zu erkennen. Dieser Effekt ist nicht auf einen Einfluss der Induktion auf die RyR-Expression in diesen Kontrollklonen zurückzuführen, da bei Klon E1 in Abb.3.11A solche Effekte nicht auftreten. Zudem stellte sich später heraus, dass die Calcium-Signalgebung in den induzierten und nicht induzierten Klonen E1 bzw. E2 identisch war. Daher ist anzunehmen, dass die beschriebenen Schwankungen in der Protein-Expression auf einen nicht optimalen Proteintransfer solch großer Proteine aus dem Randbereich der Gele zurückzuführen ist. Diese Vermutung wird durch die ebenfalls etwas geringeren IP₃R-Bandenintensitäten bei Klon E1 in Abb.3.11B und Klon E2 in Abb.3.11A untermauert.

Demnach hatte das EGFP-antisense-Konstrukt keinen Einfluss auf die RyR-Expression in den Kontrollklonen E1 und E2.

Die RyR-Protein-Expression der ausgewählten Klone 2 und 5 war im Vergleich zu allen Kontrollzellen deutlich und etwa in gleichem Maße reduziert. Zudem war die IP₃R-Expression in keinem der antisense-Klone beeinträchtigt. Dieses Ergebnis wurde für Klon 5 zweimal und für Klon 2 dreimal mit unterschiedlichen P10 Membranpräparationen reproduziert.

Da jedoch Klon 2 mit dem 240bp großen antisense-Fragment transfiziert worden war, das eine 70%-ige Homologie zu den RyR Subtypen 1 und 2 aufweist, wäre zu erwarten gewesen, dass auf Grund der Blockierung der Protein-Expression aller Isoformen in dieser Zelllinie die RyR-Bande im Western Blot vollkommen fehlt oder zumindest deutlich schwächer ist als die des Klon 5, der mit dem für den RyR-3 spezifischen 511bp großen

Fragment transfiziert worden war. Daher ist denkbar, dass das 511bp große Fragment auf Grund seiner Länge spezifischer als das 240bp große Fragment die Expression des RyR-3 blockiert, wodurch eine Restexpression bei Klon 2 bestehen bleibt.

Die Reduktion der RyR-Expression in Klon 5 war unabhängig von der Induktion. Im Gegensatz dazu erschien bei Klon 2 die Bande des induzierten Klons etwas schwächer als die des nicht induzierten. Dieses Ergebnis in Übereinstimmung mit der dazugehörigen RT-PCR-Analyse legte die Vermutung nahe, dass bei Klon 2 geringfügige Induzierbarkeit vorlag.

Um zu überprüfen, ob es sich tatsächlich um einen induzierbaren Klon handelt, wurde mit Klon 2 eine Induktions-Kinetik durchgeführt (Abb.3.12). Damit Unterschiede in der Proteinexpression deutlicher zu erkennen waren, wurden in diesem Experiment die doppelten Proteinmengen aufgetragen. Die nur sehr kleinen Schwankungen in der Bandenintensität ohne zeitliche Tendenz sprechen allerdings gegen eine Induzierbarkeit dieses Klons. Diese geringen Schwankungen in den Bandenintensitäten sind vermutlich auf einen ungleichmäßigen Proteintransfer zurückzuführen. Wie auch schon in den Abb.3.11A und B beobachtet werden konnte, sind bei dieser Kinetik-Studie besonders in den Randbereichen der Gele die Proteinbanden häufig schwächer. Wahrscheinlich sind Randpositionen problematisch für den Proteintransfer großer Proteine.

Damit konnten als Ergebnis der vorliegenden Arbeit zwei Tet-On Jurkat-T-Zelllinien erzeugt werden, in denen die RyR-3-Expression (Klon 5) und die Expression aller RyR-Subtypen (Klon 2) erheblich reprimiert war, wenngleich eine Induzierbarkeit dieser Klone nicht gegeben war. Zudem war es gelungen, zwei Kontroll-Zelllinien (Klon E1 und Klon E2) zu isolieren, die in ihrer RyR-Expression nicht beeinträchtigt waren. In allen hier untersuchten Klonen blieb die IP₃R-Expression durch die stabile Integration der antisense-Konstrukte unbeeinflusst.

4.3 Verminderte Calcium-Signale in RyR-defizienten Klonen

Wie in der Einleitung erwähnt (Kapitel 1.3), resultiert die Stimulation von T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor in einem biphasischen Calcium-Signal, bei dem die frühe Phase partiell durch Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern bewirkt wird, während die späte Phase vor allem durch den Calcium-Einstrom in die Zelle getragen wird.

4.3.1 CICR

Bei der Betrachtung der ratiometrisch-fluorimetrischen Calcium-Messungen an den intakten Tet-On Jurkat Klonen fällt auf, dass bei Klon 2 die Calcium-Konzentration während des initialen Peaks im Vergleich zu allen anderen Klonen und den nicht transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen signifikant reduziert war. Im Vergleich zu den nicht transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen ergab sich beim nicht induzierten Klon 2 eine Reduktion um 41% und beim induzierten Klon 2 eine Reduktion um 38%. Im Gegensatz dazu wies der RyR-3 defiziente Klon 5 einen mit den EGFP-Kontrollen und den nicht transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen vergleichbaren Peak auf. Da in Klon 2 zusätzlich zum RyR-3 auch noch die Expression von RyR-1 und RyR-2 reduziert war, liegt die Vermutung nahe, dass RyR-1 oder RyR-2 oder beide in T-Lymphozyten am initialen Calcium-Signal beteiligt sind. Dagegen ist der RyR-3 wahrscheinlich nicht während der frühen Phase des Calcium-Signals wirksam.

Bisher wurde davon ausgegangen, dass die frühe Phase des Calcium-Signals in T-Lymphozyten zum größten Teil durch die IP_3 -vermittelte Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern bewirkt wird (Übersicht in Guse 1998). In dieser Phase steigt die IP_3 -Konzentration in der Zelle sehr schnell an. Dadurch kommt es zur schnellen Calcium-Freisetzung aus dem ER. In vielen Zellsystemen verstärkt diese erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration wiederum die weitere Calcium-Freisetzung durch IP_3 aus dem ER. Dieser selbstverstärkende Mechanismus wird als CICR (calcium-induced calcium-release) bezeichnet.

Es ist bekannt, dass Ryanodin-Rezeptoren in anderen Zellsystemen ebenfalls über CICR-Mechanismen an der Calcium-Signalgebung beteiligt sind (Übersicht in Fabiato et al. 1983). Zum Beispiel führt der Calcium-Einstrom über die Dihydropyridin-Rezeptoren im Herzmuskel zur Aktivierung der RyR-2, wodurch Calcium aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird (Fabiato & Fabiato 1979).

Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass RyR-1 und/oder RyR-2 auch in T-Lymphozyten durch CICR-Mechanismen an der frühen Calcium-Signalgebung beteiligt sind. Eine solche Hypothese wird durch die unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber Calcium zwischen den einzelnen Ryanodin-Rezeptor Isoformen bestärkt. Bezüglich der Calcium-abhängigen Aktivierung und Inaktivierung weist RyR-2 dabei eine etwas höhere Calcium-Sensitivität auf als RyR-1 (Meissner et al. 1991), während RyR-3 nur durch sehr hohe Calcium-Konzentrationen aktiviert werden kann und damit die von allen Subtypen niedrigste Sensitivität gegenüber Calcium aufweist (Sonnleitner et al. 1998; Takeshima et al. 1995). Zudem demonstrierten Macrez und Mitarbeiter durch den Einsatz von Subtypspezifischen RyR antisense-Oligonukleotiden in Myozyten der glatten Muskulatur der Ratte, dass RyR-1 und RyR-2 absolut essentiell für CICR-Effekte waren, während die

Blockierung des RyR-3 nicht in geringstem Maße zur Inhibition dieser Effekte beitrug (Coussin et al. 2001).

Der initiale Peak des Klon E1 war im Gegensatz zu den nicht transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen und Klon E2 erhöht. Dieser Effekt könnte durch gestörte Calcium-Clearance-Mechanismen hervorgerufen worden sein. Die Integration des antisense-Konstrukts könnte SERCA oder PMCA (Plasmamembran-ständige Calcium-ATPasen) oder die Calcium-Aufnahme in die Mitochondrien beeinträchtigt haben. Hoth und Mitarbeiter zeigten in T-Lymphozyten, dass durch die Blockierung der PMCA die intrazelluläre Calcium-Konzentration nach Stimulation zunimmt (Hoth et al. 2002). Obwohl eine solche Störung der Calcium-Aufnahme-Mechanismen nicht gezeigt wurde, ist dieser Klon damit, trotz unveränderter RyR-Expression, als Kontrolle nicht mehr optimal geeignet. Gegen diese Hypothese spricht allerdings, dass die basalen Calcium-Konzentrationen des Klon E1 mit denen der Tet-On Jurkat T-Zellen gut übereinstimmen.

Im Gegensatz zu Klon E1 stimmten die Calcium-Signale des Klon E2 und von nicht transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen gut miteinander überein. Die Induktion mit Doxycyclin hatte weder einen Einfluss auf die basale Calcium-Konzentration noch auf das Calcium-Signal nach Stimulation über den TCR/CD3-Komplex. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Western Blot-Experimenten, in denen gezeigt wurde, dass sich die RyR-Expression des Klon E2 und der nicht transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen weder voneinander unterschied, noch durch Induktion beeinflussen ließ. Damit stellt Klon E2 zur Untersuchung der Rolle des RyR in der Calcium-Signalgebung eine sehr gute Kontrollzelllinie dar.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der RyR-1 und/oder RyR-2 am initialen Calcium-Signal in Jurkat T-Lymphozyten nach Stimulation über den TCR/CD3-Komplex beteiligt sind. Dabei ist zu vermuten, dass die initiale Calcium-Freisetzung über den IP₃-Rezeptor dann sowohl diesen selbst als auch RyR-1 und/oder RyR-2 durch CICR aktiviert. Weiterhin belegen die vorliegenden Daten, dass der RyR-3 nicht an der Bildung des frühen Calcium-Signals beteiligt ist, sondern eine Rolle beim langanhaltenden Calcium-Signal spielt.

4.3.2 Calcium-Freisetzung

Bei den Calciummessungen an intakten Klonen ist zusätzlich eine signifikante Reduktion des langanhaltenden Calcium-Signals 15 Minuten nach Stimulation über den TCR/CD3-Komplex in den RyR-defizienten Klonen 2 und 5 zu erkennen. Die späte Phase des Calcium-Signals in T-Lymphozyten wird durch die Calcium-Freisetzung aus intrazellulären

Speichern und dem daraus resultierenden, sekundären Calcium-Einstrom über die Plasmamembran getragen (kapazitiver Mechanismus).

In dieser späten Phase des Calcium-Signals wies der RyR-3 defiziente Klon 5 im Vergleich zu nicht transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen eine deutlich stärkere Reduktion (um 53% beim nicht induzierten Klon 5, um 56% beim induzierten) auf als Klon 2, in dem die Expression aller drei Subtypen blockiert war (Reduktion um 39% beim nicht induzierten Klon 2 und um 40% beim induzierten). Geht man davon aus, dass beide antisense-Fragmente gleich effektiv die Expression des RyR-3 blocken, müsste die Reduktion des intrazellulären Calciums in der späten Phase bei beiden Klonen gleich stark sein. Die Unterschiede könnten damit erklärt werden, dass das 511bp große Fragment wahrscheinlich auf Grund seiner Länge oder Hybridisierungseigenschaften effektiver die Proteinexpression des RyR-3 inhibiert als das 240bp große antisense-Fragment. Diese Vermutung korreliert mit den Ergebnissen der Western Blot-Analyse. Dort zeigten Klon 2 und 5 eine etwa gleich starke Reduktion der RyR-Banden, obwohl in Klon 2 im Gegensatz zu Klon 5 die Expression aller Ryanodin-Rezeptor-Isoformen vermindert ist.

Die starke Reduktion des langanhaltenden Signals in beiden Klonen zeigt eindeutig, dass der RyR-3 maßgeblich am langanhaltenden Calcium-Signal beteiligt ist.

Im Gegensatz dazu kann über die Funktion der RyR-1 und RyR-2 im einzelnen keine Aussage gemacht werden, da die Bedingungen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht dafür ausgelegt wurden. Es wäre aber hochinteressant, auch RyR-1 und RyR-2-defiziente Klone zu generieren, um deren selektive Verminderung und damit den potentiellen Einfluss auf das späte Calcium-Signal analysieren zu können.

Durch welche Mechanismen Ryanodin-Rezeptoren in T-Lymphozyten aktiviert werden, ist noch unklar. Ein guter Kandidat für die Modulation von RyR ist der Calcium-mobilisierende Botenstoff cADPR (aufgelistet in Lee 1997).

Guse und Mitarbeiter zeigten, dass cADPR Calcium aus Coffein-sensitiven Speichern in permeabilisierten Jurkat T-Lymphozyten freisetzt (Guse et al. 1995). Der Effekt von cADPR war konzentrationsabhängig und konnte spezifisch durch 8-NH₂-cADPR, dem Ryanodin-Rezeptor-Antagonisten Ruthenium Rot (Guse et al. 1995) und hohe Magnesium-Konzentrationen (Guse et al. 1996) inhibiert werden. Zudem erhöhte cADPR in Bindungsstudien die Assoziationsgeschwindigkeit von [³H] Ryanodin an seinen Rezeptor (Guse et al. 1999) und zeigte damit seine modulatorische Wirkung auf den RyR in Jurkat T-Lymphozyten (Guse et al. 1999).

Die Kinetik des Botenstoffs spricht für eine Wirkung während des langanhaltenden Calcium-Signals, da cADPR in dieser späten Phase des Calcium-Signals in Jurkat

T-Lymphozyten seine maximale Konzentration erreicht (da Silva et al. 1998). Zudem wurde durch Einsatz von 7-Deaza-8-Bromo-cADPR gezeigt, dass das cADPR-vermittelte, langanhaltende Calcium-Signal durch diesen cADPR-Antagonisten deutlich inhibiert wurde (Guse et al. 1999).

Um direkt zu zeigen, dass cADPR ein physiologischer Agonist für Ryanodin-Rezeptoren ist, wurde in permeabilisierten RyR-defizienten Klonen die Calcium-Freisetzung nach Zugabe von cADPR gemessen.

In diesem Messsystem sind Calcium-Freisetzung und Calcium-Einstrom vollkommen voneinander entkoppelt, so dass man durch Zugabe von cADPR nur Effekte auf die Calcium-Freisetzung untersuchen kann. Die Calcium-Freisetzung durch Zugabe von 10 μ M cADPR aus intrazellulären Speichern war in beiden RyR-defizienten Klonen im Vergleich zu nicht transfizierten Tet-On Jurkat T-Zellen deutlich reduziert. Jedoch war hier wieder eine stärkere Reduktion des Calciums-Signals in dem RyR-3 defizienten Klon zu erkennen als in Klon 2. Dieser Effekt zeigt eindeutig, dass der RyR-3 das Zielprotein für cADPR ist. In diesem Zusammenhang lässt dieses System wiederum keine Aussage über den Typ1 oder Typ2 zu, da keine selektiv RyR-1- und RyR-2-defizienten Klone generiert wurden.

Desweiteren kam es in den Klonen 2 und 5 zu einem tendenziellen Anstieg der Menge des freigesetzten Calciums nach Gabe von IP₃. In gleichem Maße wie die Calcium-Freisetzung nach cADPR-Gabe am Gesamt-Calcium abnahm, stieg die Calcium-Freisetzung nach IP₃-Gabe an. Diese Phänomene untermauert frühere Arbeiten, die gezeigt haben, dass der in Jurkat-Zellen vorkommende IP₃ und der Coffein-sensitive Pool zwar eigenständig existieren, aber miteinander überlappen (Guse et al. 2002).

Die deutlich verminderte Calcium-Freisetzung durch cADPR im RyR-3 defizienten Klon 5 erweitert die zuvor pharmakologisch erhobenen Daten, die zeigten, dass der cADPR-vermittelte Effekt über den Ryanodin-Rezeptor verläuft (Guse et al. 1999; Guse et al. 1995; Guse et al. 1996; Takemura et al. 1996).

Gleichwohl wird der direkte Effekt von cADPR auf Ryanodin-Rezeptoren sehr kontrovers diskutiert. Elektrophysiologische Einzelkanal-Messungen in künstlichen Lipid-Doppelschicht-Experimenten sowie Freisetzung von [⁴⁵Ca²⁺] aus Mikrosomen deuten darauf hin, dass RyR-2 und RyR-3, aber nicht RyR-1 durch cADPR aktiviert werden (Meszaros et al. 1993). Sonnleitner und Kollegen zeigten einen direkten Effekt von cADPR auf RyR-3 im Zwerchfellmuskel, in dem RyR-1 und RyR-3 coexprimiert werden. Dabei wurde in Gegenwart von 1 μ M cADPR die Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR-3 hin zu niedrigeren Calcium-Konzentrationen verschoben (Sonnleitner et al. 1998). In

Jurkat T-Lymphozyten zeigte cADPR einen stimulatorischen Effekt auf die Assoziationsgeschwindigkeit von [³H] Ryanodin an T-Zell-Membranpräparationen (Guse et al, 1999). Zusätzlich konnte eine Aktivierung des RyR-2 durch cADPR in permeabilisierten PC12-Zellen nachgewiesen werden (Clementi et al. 1996). Für den Effekt von cADPR auf den RyR-1 konnten bisher keine eindeutigen Daten erhoben werden (Übersicht in Guse et al. 2000). Entweder rief cADPR keine Wirkung hervor (Meszaros et al. 1993) oder die Effekte waren nicht spezifisch für cADPR, weil ähnliche Wirkungen durch NAD⁺ oder ADPR hervorgerufen werden konnten (Sitsapesan & Williams 1995). Eine neuere Studie an RyR-3^{-/-} Knock-out Mäusen zeigte hingegen, dass cADPR im Zwerchfell erwachsener Tiere unter anderem die Calcium-Freisetzung aus Mikrosomen verstärkte, weswegen eine direkte Wirkung von cADPR auf den RyR-1 postuliert wurde (Fulceri et al. 2001). Da aus diesen Daten keine klare Aussage über die Beteiligung von RyR-1 an cADPR-vermittelten Effekten abgeleitet werden kann, werden als Zielproteine für cADPR eher RyR-2 und RyR-3 favorisiert.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene deutliche Reduktion der cADPR-vermittelten Calcium-Freisetzung im permeabilisierten RyR-3 defizienten Klon 5 zeigt eindeutig die Wirkung von cADPR auf RyR-3 und demonstriert, dass in dieser späten Phase des Calcium-Signals in T-Lymphozyten der RyR-3 durch cADPR an der Calcium-Freisetzung beteiligt ist.

4.3.3 Calcium Einstrom

Im Gegensatz zu vielen anderen nicht erregbaren Zelltypen ist der Anteil der Calcium-Freisetzung in T-Lymphozyten am späten Calcium-Signal relativ gering im Vergleich zum Anteil, den der Calcium-Einstrom über die Plasmamembran ausmacht (Lewis et. al. 1989; Donnadieu et. al. 1992; Dolmetsch et. al. 1994). Es konnte gezeigt werden, dass in Jurkat T-Lymphozyten die cADPR-vermittelte Calcium-Freisetzung auch zum Calcium-Einstrom über die Plasmamembran führt. Die Mikroinjektion von cADPR in Jurkat T-Zellen rief dabei konzentrationsabhängig und spezifisch langanhaltende Calcium-Spikes hervor (Guse et. al. 1997), die durch einen cADPR-Antagonisten komplett blockiert wurden. In ähnlichen Experimenten in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium oder mit Calcium-Kanal Inhibitoren wie Zn²⁺ oder SK-F 96365 wurden diese Calcium-Signale ebenfalls komplett unterdrückt (Guse et al. 1997). Zusätzlich wurde das langanhaltende Calcium-Signal in Jurkat T-Zellen nach Stimulation über den TCR/CD3-Komplex durch den cADPR-Antagonisten 7-Deaza-8-Bromo-cADPR zum größten Teil blockiert (Guse et al. 1999). Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass der RyR-3 das Zielprotein von cADPR ist, ist daher wahrscheinlich, dass der RyR-3 zusätzlich zur Calcium-Freisetzung ebenfalls am Calcium-Einstrom in T-Lymphozyten beteiligt ist.

Auf welche Weise der Einstrom in T-Lymphozyten vermittelt wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Putney zeigte, dass in exokrinen Zellen der Calcium-Einstrom noch stattfand, lange nachdem die intrazellulären IP_3 -Konzentrationen wieder basale Werte erreicht hatten. Daraus leitete er das inzwischen am weitesten etablierte Modell des kapazitiven Einstroms ab, wobei die Entleerung intrazellulärer Calcium-Speicher die Öffnung von SOC-Kanälen (store-operated calcium channels; in T-Lymphozyten CRAC-Kanäle) in der Plasmamembran und damit den Calcium-Einstrom bewirkten (Putney 1990). Da IP_3 zur Speicher-Entleerung führt, wurde postuliert, dass IP_3 am Calcium-Einstrom gemäß des kapazitiven Modells beteiligt ist (Berridge et al. 1995).

Verschiedene Arbeiten lieferten wichtige Hinweise darauf, dass neben der Entleerung von IP_3 -sensitiven Speichern auch die Entleerung von Coffein-sensitiven Speichern, von denen vermutet wird, dass RyR dort lokalisiert sind, einen Calcium-Einstrom erzeugen.

Die Depletion der Coffein-sensitiven Pools führte dabei in Unterkiefer-Speicheldrüsen-Zellen (Fukushi et al. 1996), in *Anococcygeus* glatten Muskelzellen der Maus (Wayman et al. 1998) und in PC12 Zellen (Bennett et al. 1998) zu einem Calcium-Einstrom über die Plasmamembran. Zudem zeigten Kiselyov und Mitarbeiter, dass in IP_3 R-defizienten DT40-B-Zellen, die RyR-1 und RyR-3 exprimieren, cADPR die Aktivierung von CRAC-Kanälen erleichterte. Die Ryanodin-Rezeptor-Antagonisten 8-NH₂-cADPR und Ruthenium-Rot inhibierten dabei die Aktivierung von CRAC-Kanälen, sogar nach kompletter Depletion intrazellulärer Speicher durch Ionomycin (Kiselyov et al. 2001).

Zusammen mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit, die zeigen, dass es im RyR-3-defizienten Klon 5 zur signifikanten Reduktion des späten Calcium-Signals kommt, ist daher anzunehmen, dass der RyR-3 zusätzlich zur cADPR-vermittelten Calcium-Freisetzung auch am Calcium-Einstrom über CRAC-Kanäle in T-Lymphozyten beteiligt ist. Der genaue Mechanismus, wodurch die Speicher-Entleerung zur Aktivierung dieser Kanäle führt, ist bislang nicht geklärt. Möglicherweise kommt es zu einer direkten Kopplung des RyR-3 an CRAC-Kanäle. Eine neuere Arbeit zeigte, dass neben IP_3 R auch RyR in der Lage sind, mit humanen TRP3-Kanälen in der Plasmamembran von Unterkiefer-Speicheldrüsen-Epithelzellen, die gute Kandidaten für CRAC-Kanäle darstellen, hTRP3-RyR-Komplexe zu bilden und somit zur Steuerung dieser Kanäle beizutragen (Kiselyov et al. 2000).

Obwohl der genaue Mechanismus der Aktivierung von CRAC-Kanälen noch nicht bekannt ist, ist die Beteiligung des cADPR-RYR-3-Signal-Weges am Calcium-Einstrom in T-Lymphozyten wahrscheinlich.

Abschließend lässt sich für die Mechanismen der Calcium-Signalgebung in T-Lymphozyten folgendes Modell entwickeln (Abb.4.1): Die initiale Phase des Signals wird

neben der Calcium-Freisetzung durch IP₃ aus dem ER auch durch vermutlich CICR-gesteuerte Calcium-Freisetzung über RyR-1 und/oder RyR-2 bewirkt. Während des langanhaltenden Calcium-Signals kommt es durch die cADPR-vermittelte Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern über den RyR-3 wahrscheinlich zur Aktivierung des Calcium-Einstroms über die Plasmamembran.

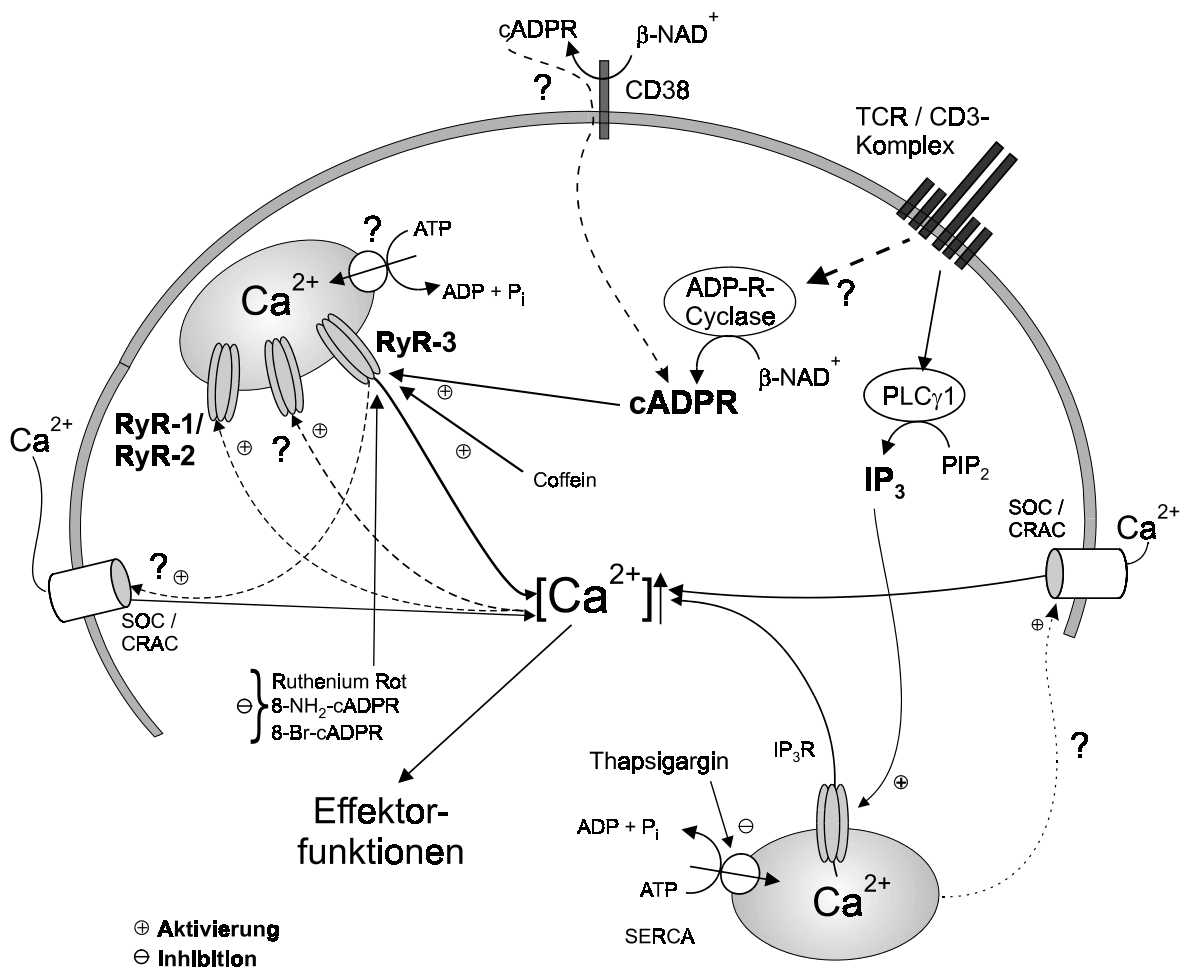


Abb.4.1: Modell der Calcium-Signaltransduktion in T-Lymphozyten

Die Stimulation des TCR/CD3-Komplexes führt zur Bildung von IP₃ und cADPR. In der initialen Phase des Calcium-Signals sind neben dem IP₃R auch RyR-1 und/oder RyR-2 beteiligt, die ihre Wirkung vermutlich über CICR-Mechanismen entfalten. Während des späten Signals setzt cADPR über RyR-3 Calcium aus intrazellulären Speichern frei und aktiviert dadurch wahrscheinlich den Calcium Einstrom über die Plasmamembran. Abkürzungen: IP₃ Inositol-1,4,5-trisphosphat, ADP-R-Cyclase Adenosindiphospho-ribosyl-Cyclase, RyR-3 Ryanodin-Rezeptor Typ3, RyR-2 Ryanodin-Rezeptor Typ2, RyR-1 Ryanodin-Rezeptor Typ1, SERCA Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen oder endoplasmatischen Retikulums, cADPR cyclische Adenosindiphosphoribose, SOC/CRAC durch den Füllstand der Calcium-Speicher gesteuerter Calcium-Kanal der Plasmamembran (store-operated calcium channel /calcium-release activated channel)

4.4 Ausblick

Die Generierung einer selektiv RyR-1 und RyR-2 defizienten Jurkat T-Zelllinie wäre für die weitere Untersuchung der Beteiligung dieser Subtypen an der Calcium-Signalgebung in T-Lymphozyten äußerst sinnvoll. Calcium-Messungen an intakten Zellen dieser Klone würden belegen, ob RyR-1 und/oder RyR-2 am initialen Calcium-Signal beteiligt sind und ob diese Isoformen gegebenenfalls auch am späten Calcium-Signal beteiligt sind. Durch Gabe von cADPR in permeabilisierten Zellen dieser Klone könnte gezeigt werden, ob cADPR auch auf RyR-1 und RyR-2 wirkt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die demonstrieren, dass in RyR-3-defizienten Jurkat T-Lymphozyten das späte, für eine effektive Immunantwort essentielle Calcium-Signal inhibiert wird, eröffnen die Möglichkeit, über Inhibitoren dieses Rezeptors die Immunantwort der T-Lymphozyten zu unterbinden. Da die Wirkung von cADPR auf den RyR-3 gezeigt werden konnte, ist es denkbar, als potentielle Immunmodulatoren RyR-Antagonisten zu synthetisieren, die mit ähnlicher Effizienz das langanhaltende Calcium-Signal in T-Lymphozyten antagonisieren.

5 Literaturverzeichnis

Aarhus, R., Graeff, R. M., Dickey, D. M., Walseth, T. F. und Lee, H. C. (1995). ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J. Biol. Chem.* **270**: 30327-30333.

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. und Pober, J. S. (1997). *Molecular and cellular immunology*. 3rd edition Philadelphia: W. B. Saunders.

Acuto, O. und Cantrell, D. (2000). T cell activation and the cytoskeleton. *Ann. Rev. Immunol.* **18**: 165-184.

Adebanjo, O. A., Shankar, V. S., Pazianas, M., Simon, B. J., Lai, F. A., Huang, C. L. und Zaidi, M. (1996). Extracellular applied ruthenium red and cADP-ribose elevate cytosolic Ca^{2+} in isolated rat osteoclasts. *Am. J. Physiol.* **270**: F469-475.

Appleby, M. W., Gross, J. A., Cooke, M. P., Levin, S. D., Qian, X. und Perlmutter, R. M. (1992). Defective T cell receptor signaling in mice lacking the thymic isoform of p59^{lck}. *Cell* **70**: 751-763.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, G. A., Struhl, K. (1994). *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates/Wiley & Sons: New York.

Bautista, M., Hoth, M. und Lewis, R. S. (2002). Enhancement of calcium signalling dynamics and stability by delayed modulation of the plasma-membrane calcium ATPase in human T cells. *J. Physiol.* **541**: 877-894.

Bennett, D. L., Bootman, M. D., Berridge, M. J. und Cheek, T. R. (1998). Ca^{2+} entry into PC12 cells initiated by ryanodine receptors or inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Biochem. J.* **15**: 349-357.

Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315-325.

Berridge, M. J. (1995). Capacitative calcium entry. *Biochem. J.* **312**: 1-11.

Berridge, M. J. (1997). Lymphocyte activation in health and disease. *Crit. Rev. Immunol.* **17**: 155-178.

Berridge, M. J., Bootman, M. D. und Lipp, P. (1998). Calcium – a life and death signal. *Nature* **365**: 645-648.

Bezprozvanny, I., Watras, J. und Ehrlich, B. E. (1991). Bell-shaped Calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* **351**: 751-754.

Bolen, J. B. (1995). Protein tyrosine kinases in the initiation of antigen receptor signaling. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 306-401.

- Boulay, G., Brown, D. M., Qin, N., Jiang, M., Dietrich, A., Zhu, M. X., Chen, Z., Birnbaumer, M., Mikoshiba, K. und Birnbaumer, L. (1999). Modulation of Ca^{2+} entry by polypeptides of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP_3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP_3R in store depletion-activated Ca^{2+} entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 14955-14960.
- Bourguignon, L. Y., Chu, A., Jin, H. und Brandt, N. R. (1995). Ryanodine receptor-ankyrin interaction regulates internal Calcium release in mouse T-lymphoma cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 17917-17922.
- Brilliantes, A. M. B., Ondrias, K., Scott, A., Kobrinisky, F., Ondriasova, E., Moschella, M. C., Jayaraman, T., Landers, M., Ehrlich, B. E. und Marks, A. R. (1994). Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* **77**: 513-523.
- Cancela, J. M. (2001). Specific Ca^{2+} signaling evoked by cholecystokinin and acetylcholin: The roles of NAADP, cADPR and IP_3 . *Ann. Rev. Physiol.* **63**: 99-117.
- Chan, A. C. und Shaw, A. S. (1996). Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 312-319.
- Chang, T. W., Kung, P. C., Gingras, S. P. und Goldstein, G. (1981). Does OKT3 monoclonal antibody react with an antigen-recognition structure on human T cells? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 1805-1808
- Chen, S. R. W. und MacLennan, D. H. (1994). Identification of calmodulin, Ca^{2+} , and ruthenium red binding domains in the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **269**: 22698-22704.
- Chen, S. R. W., Zhang, L. und MacLennan, D. H. (1993). Antibodies as probes for Ca^{2+} activation sites in the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **268**: 13414-13421.
- Chow, C. W., Rincon, M. und Davis, R. J. (1999). Requirement for transcription factor NFAT in interleukin-2 expression. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 2300-2307.
- Ciapa, B. und Epel, D. (1996). An early increase in cGMP follows fertilization of sea urchin eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**: C426-434.
- Clapper, D. L., Walseth, T. F., Dargie, P. J. und Lee, H. C. (1987). Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **262**: 9561-9568.
- Clementi, E., Riccio, M., Sciorati, C., Nistico, G. und Meldolesi, J. (1996). The type 2 ryanodine receptor of neurosecretory PC12 cells is activated by cyclic ADP-ribose. Role of the nitric oxid/cGMP pathway. *J. Biol. Chem.* **271**: 17739-17745.
- Coussin, F., Macrez, N., Morel, J.-I. und Mironneau, J. (2000). Requirement of ryanodine receptor subtypes 1 and 2 for Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in vascular myocytes. *J. Biol. Chem.* **275**: 9596-9603.
- da Silva, C. P., Emmrich, F. und Guse, A. H. (1994). Adriamycin inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase activity *in vitro* and blocks formation of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate in stimulated Jurkat T-lymphocytes. Does inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate play a role in Ca^{2+} entry? *J. Biol. Chem.* **269**: 12521-12526.

- da Silva, C. P. und Guse, A. H. (2000). Intracellular Ca^{2+} release mechanisms: multiple pathways having multiple functions within the same cell type? *Biochem. Biophys. Acta.* **1498**: 122-133.
- da Silva, C. P., Potter, B. V., Mayr, G. W. und Guse, A. H. (1998). Quantification of intracellular levels of cyclic ADP-ribose by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl.* **707**: 43-50.
- da Silva, C. P., Schweitzer, K., Heyer, P., Malavasi, F., Mayr, G. W. und Guse, A. H. (1998b). Ectocellular CD38-catalyzed synthesis and intracellular Ca^{2+} -signalling activity of cyclic ADP-ribose in T-lymphocytes are not functionally related. *FEBS Lett.* **439**: 291-296.
- Dargie, P. J., Agre, M. C. und Lee, H. C. (1990). Comparison of Ca^{2+} mobilizing activities of cyclic ADP-ribose and inositol trisphosphate. *Cell. Regul.* **1**: 279-290.
- De Koninck, P. und Schulman, H. (1998). Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca^{2+} oscillations. *Science* **297**: 227-230.
- Dolmetsch, R. E. und Lewis, R. S. (1994). Signaling between intracellular Ca^{2+} stores and depletion-activated Ca^{2+} channels generates $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations in T lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* **103**: 365-388.
- Dolmetsch, R. E., Xu, K. und Lewis, R. S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* **392**: 933-936.
- Donnadieu, E., Bismuth, G. und Trautmann, A. (1992). Calcium fluxes in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **267**: 25864-25872.
- Donnadieu, E., Bismuth, G. und Trautmann, A. (1994). Antigen recognition by helper T cells elicits a sequence of distinct changes of their shape and intracellular calcium. *Curr. Biol.* **4**: 584-595.
- Downward, J. (1998). Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **10**: 262-267.
- Dwyer, D. S., Gordon, K. und Jones, B. (1995). Ruthenium Red potently inhibits immune responses both *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Immunopharmacol.* **17**: 931-940.
- Eickhoff, B. (2000). Antisense and ribozyme. *BioTec* 44-47.
- Fabiato, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* **245**: C1-C14.
- Fabiato, A. und Fabiato, E. (1979). Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Annu. Rev. Physiol.* **41**: 473-484.
- Finch, E. A., Turner, T. J. und Goldin, S. M. (1991). Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Science* **252**: 443-446.
- Fliegert, R. (1999). Untersuchungen zur Wirkung von Nucleotidanaloga auf den cADPR/ Ca^{2+} -Signalweg in T-Lymphozyten, Diplomarbeit an der Universität Hamburg.
- Foletta, V. C., Segal, D. H. und Cohen, D. R. (1998). Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *J. Leukoc. Biol.* **63**: 139-152.

- Franco, L., Guida, L., Bruzzone, S., Zocchi, E., Usai, C. und De Flora, A. (1998). The transmembrane glycoprotein CD38 is a catalytically active transporter responsible for generation and influx of the second messenger cyclic ADP-ribose across membranes. *Faseb J.* **12**: 1507-1520.
- Fruen, B. R., Mickelson, J. R., Shomer, N. H., Velez, P. und Louis, C. F. (1994). Cyclic ADP-ribose does not affect cardiac or skeletal muscle ryanodine receptors. *FEBS Lett.* **352**: 123-126.
- Fukushi, Y., Ozawa, T., Nishima, A., Kase, H. und Wakui, M. (1996). Depletion of ryanodine-sensitive Ca^{2+} store activates Ca^{2+} entry in rat submandibular gland acinar cells. *Tohoku J. Exp. Med.* **178**: 399-411.
- Fulceri, R., Rossi, R., Bottinelli, R., Conti, A., Intravaia, E., Galione, A., Benedetti, A., Sorrentino, V. und Reggiani, C. (2001). Ca^{2+} release induced by cyclic ADP ribose in mice lacking type 3 ryanodine receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**: 697-702.
- Furuichi, T., Furutama, D., Hakamata, Y., Nakai, J., Takeshima, H. und Mikoshiba, K. (1994). Multiple types of ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels are differentially expressed in rabbit brain. *J. Neurosci.* **14**: 4794-4805.
- Galione, A., Lee, H. C. und Busa, W. B. (1991). Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science* **253**: 1143-1146.
- Galione, A., McDougall, A., Busa, W. B., Willmott, N., Gillot, I. und Whitaker, M. (1993). Redundant mechanisms of calcium-induced calcium release underlying calcium waves during fertilization of sea urchin eggs. *Science* **261**: 348-352.
- Galione, A., White, A., Willmott, N., Turner, M., Potter, B. V. und Watson, S. P. (1993). cGMP mobilizes intracellular Ca^{2+} in sea urchin eggs by stimulating cyclic ADP-ribose synthesis. *Nature* **365**: 456-459.
- Gardner, P. (1989). Calcium and T-lymphocyte activation. *Cell* **59**: 15-20.
- Giannini, G., Clementi, E., Ceci, R., Marziali, G. und Sorrentino, V. (1992). Expression of a ryanodine receptor Ca^{2+} channel that is regulated by TGF- β . *Science* **257**: 91-94.
- Giannini, G., Conti, A., Mammarella, S., Scrobogna, M. und Sorrentino, V. (1995). The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J. Cell. Biol.* **128**: 893-904.
- Graeff, R. M., Franco, L., De Flora, A. und Lee, H. C. (1998). Cyclic GMP-dependent and -independent effects on the synthesis of the calcium-messengers cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *J. Biol. Chem.* **273**: 118-125.
- Graeff, R. M., Podein, R. J., Aarhus, R. und Lee, H. C. (1995). Magnesium ions but not ATP inhibit cyclic ADP-ribose-induced calcium release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **206**: 786-791.
- Graeff, R. M., Walseth, T. F., Fryxell, K., Branton, W. D. und Lee, H. C. (1994). Enzymatic synthesis and characterizations of cyclic GDP-ribose. A procedure for distinguishing enzymes with ADP-ribosyl cyclase activity. *J. Biol. Chem.* **269**: 30260-30267.
- Grafton, G. und Thwaite, L. (2001). Calcium channels in lymphocytes. *Immunology* **104**: 119-126.

- Grunwald, R. und Meissner, G. (1995). Lumenal sites and C terminus accessibility of the skeletal muscle calcium release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.* **270**: 11338-11347.
- Guse, A. H. (1998). Ca^{2+} -signalling in T-lymphocytes. *Crit. Rev. Immunol.* **18**: 419-448.
- Guse, A. H. (1999). Cyclic ADP-ribose: a novel Ca^{2+} -mobilising second messenger. *Cell. Signal.* **11**: 309-316.
- Guse, A. H. (2000). Cyclic ADP-ribose. *J. Mol. Med.* **78**: 26-35.
- Guse, A. H. (2002). Cyclic ADP-ribose (cADPR) and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP): novel regulators of Ca^{2+} -signalling and cell function. *Curr. Mol. Med.* **2**: 273-282.
- Guse, A. H., Berg, I., da Silva, C. P., Potter, B. V. und Mayr, G. W. (1997). Ca^{2+} -entry induced by cyclic ADP-ribose in intact T-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **272**: 8546-8550.
- Guse, A. H., da Silva, C. P., Berg, I., Skapenko, A. L., Weber, K., Heyer, P., Hohenegger, M., Ashamu, G. A., Schulze-Koops, H., Potter, B. V. und Mayr, G. W. (1999). Regulation of calcium signalling in T-lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature* **389**: 70-73.
- Guse, A. H., da Silva, C. P., Emmrich, F., Ashamu, G. A., Potter, B. V. und Mayr, G. W. (1995). Characterization of cyclic adenosine diphosphate-ribose-induced Ca^{2+} -release in T-lymphocytes. *J. Immunol.* **155**: 3353-3359.
- Guse, A. H., da Silva, C. P., Potter, B. V. und Mayr, G. W. (1997). Ca^{2+} -signalling in human T-lymphocytes. Potential roles for cyclic ADP-ribose and 2'-phospho-cyclic ADP-ribose. *Adv. Exp. Med. Biol.* **419**: 431-436.
- Guse, A. H., da Silva, C. P., Weber, K., Ashamu, G. A., Potter, B. V. und Mayr, G. W. (1996). Regulation of ADPR-ribose-induced Ca^{2+} release by Mg^{2+} and inorganic phosphate. *J. Biol. Chem.* **271**: 23946-23953.
- Guse, A. H. und Emmrich, F. (1991). T-cell receptor-mediated metabolism of inositol polyphosphates in Jurkat T-lymphocytes. Identification of a D-myo-inositol 1,2,3,4,6-pentakisphosphate-2-phosphomonoesterase activity, a D-myo-inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate-1/3-phosphatase activity and a D/L-myo-inositol 1,2,4,5,6-pentakisphosphate-1/3-kinase activity. *J. Biol. Chem.* **266**: 24498-24502.
- Guse, A. H., Roth, E. und Emmrich, F. (1993). Intracellular Ca^{2+} pools in Jurkat T-lymphocytes. *Biochem. J.* **291**: 447-451.
- Hagar, R. E., Burgstahler, A. D., Nathanson, M. H. und Ehrlich, B. E. (1998). Type III InsP_3 receptor channel stays open in the presence of increased calcium. *Nature* **396**: 81-84.
- Hakamata, Y., Nakai, J., Takeshima, H. und Imoto, K. (1992). Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett.* **312**: 229-235.
- Hakamata, Y., Nishimura, S., Nakai, J., Nakashima, Y., Kita, T. und Imoto, K. (1994). Involvement of the brain type ryanodine receptor in T-cell proliferation. *FEBS Lett.* **352**: 206-210.

- Harding, F. A., McArthur, J. G., Gross, J. A., Raulet, D. H. und Allison, J. P. (1992). CD28-mediated signalling co-stimulate murine T-cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* **356**: 607-609.
- Harnick, D. J., Jayaraman, T., Ma, Y., Mulieri, P., Go, L. O. und Marks, A. R. (1995). The human type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from T-lymphocytes. Structure, localization and tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **270**: 2833-2840.
- Hellmich, M. R. und Strumwasser, F. (1991). Purification and characterization of a molluscan egg-specific NADase, a second messenger enzyme. *Cell. Regul.* **2**: 193-202.
- Higashida, H., Yokoyama, S., Hashii, M., Takedo, M., Higashida, M., Takayasu, T., Ohshima, T., Takasawa, S., Okamoto H. und Noda, M. (1997). Muscarinic receptor-mediated dual regulation of ADP-ribosyl cyclase in NG108-15 neuronal cell membranes. *J. Biol. Chem.* **272**: 31272-31277.
- Hirota, J., Baba, M., Matsumoto, M., Furuichi, T., Takatsu, K. und Mikoshiba, K. (1998). T-cell-receptor signalling in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP₃R) type-1-deficient mice: is IP₃R type 1 essential for T-cell-receptor signalling? *Biochem. J.* **333**: 615-619.
- Ho, N., Gullberg, M. und Chatila, T. (1996). Activation protein 1-dependent transcriptional activation of interleukin 2 gene by Ca²⁺/calmodulin kinase type IV/Gr. *J. Exp. Med.* **184**: 101-112.
- Hohenegger, M., Berg, I., Weigl, L., Mayr, G. W., Potter, B. V. und Guse, A. H. (1999). Pharmacological activation of the ryanodine receptor in Jurkat T-lymphocytes. *Brit. J. Pharmacol.* **128**: 1235-1240.
- Hosoi, E., Nishizaki, C., Gallagher, K., Wyre, H. W., Matsuo, Y. und Sei, Y. (2001). Expression of the ryanodine receptor isoforms in immune cells. *J. Immunol.* **167**: 4887-4894.
- Hoth, M., Fanger, C. M. und Lewis, R. S. (1997). Mitochondrial regulation of store-operated calcium signalling in T-lymphocytes. *J. Cell. Biol.* **137**: 633-648.
- Hua, S. Y., Tokimasa, T., Takawasa, S., Furuya, Y., Nohmi, M., Okamoto, H. und Kuba, K. (1994). Cyclic ADP-ribose modulates Ca²⁺ release channels for activation by physiological Ca²⁺ entry in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron* **12**: 1073-1079.
- Huang, X. Q. und Miller, W. (1991). A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.* **12**: 337-357.
- Irvine, R. F. (1990). Quantal Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry by inositol 1,4,5-trisphosphates – a possible mechanism. *FEBS Lett.* **263**: 5-9.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walpot, M., Capra, J. D. (1999). *Immunobiology*. Garland Publishing, New York, 4. Auflage.
- Jayaraman, T. und Marks, A. R. (1997). T cells deficient in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are resistant to apoptosis. *Moll. Cell. Biol.* **17**: 3005-3012.
- Jayaraman, T., Ondrias, K., Ondriasova, E. und Marks, A. R. (1996). Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by tyrosine phosphorylation. *Science* **272**: 1492-1494.

- Jayaraman, T., Ondriasova, E., Ondrias, K., Harnick, D. J. und Marks, A. R. (1995). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for T-cell receptor signalling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6007-6011.
- Jen, K-Y. und Gerwitz, A. M. (2000). Suppression of gene expression by targeted disruption of messenger RNA: available options and current strategies. *Stem Cells* **18**: 307-319.
- Khan, A. A., Steiner, J. P. und Snyder, S. H. (1992). Plasma membrane inositol 1,4,5-trisphosphate receptor of lymphocytes: selective enrichment in sialic acid and unique binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2849-2853.
- Kellog, D. E., Sninsky, J. J. und Kwok, S. (1990). Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **189**: 202-208.
- Kim, H. Y., Thomas, D. und Hanley, M. R. (1995). Chromatography resolution of an intracellular calcium influx factor from thapsigargin-activated Jurkat cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 9706-9708.
- Kiselyov, K. I., Shin, D. M., Wang, Y., Pessah, I. N., Allen, P. D. und Muallem, S. (2000). Gating of store-operated channels by conformational coupling to ryanodine receptors. *Mol. Cell.* **6**: 421-431.
- Kiselyov, K. I., Shin, D. M., Shcheynikov, N., Kurosaki, T. und Muallem, S. (2001). Regulation of Ca²⁺-release-activated Ca²⁺-current (I_{crac}) by ryanodine receptors in inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-deficient DT40 cells. *Biochem.J.* **360**: 17-22.
- Krieg, A. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**: 546-549.
- Lee, H. C. (1997). Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol. Rev.* **77**: 1133-1164.
- Lee, H. C., Aarhus, R., Graeff, R., Gurnack, M. E. und Walseth, T. F. (1994). Cyclic ADP-ribose activation of the ryanodine receptor mediated by calmodulin. *Nature* **370**: 307-309.
- Lee, H. C. und Aarhus, R. (1991). ADP-ribosyl cyclase: an enzyme that cyclizes NAD⁺ into a calcium-mobilizing metabolite. *Cell Regulat.* **2**: 203-209.
- Lee, H. C., Aarhus, R. und Walseth, T. F. (1993). Calcium mobilization by dual receptors during fertilization of sea urchin eggs. *Science* **261**: 352-355.
- Lee, H. C., Walseth, T. F., Bratt, G. T., Hayes, R. N. und Clapper, D. L. (1989). Structural determination of a cyclic metabolite of NAD⁺ with intracellular Ca²⁺-mobilizing activity. *J. Biol. Chem.* **264**: 1608-1615.
- Le Gouvello, S., Manceau, V. und Sobel, A. (1998). Serine 16 of stathmin as a cytosolic target for Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase II after CD2 triggering of human T lymphocytes. *J. Immunol.* **161**: 1113-1122.
- Leppa, S. und Bohmann, D. (1999). Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. *Oncogene* **18**: 6158-6162.
- Lewis, R. S. (1999). Store-operated calcium channels. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **33**: 279-307.

- Lewis, R. S. (2001). Calcium signaling mechanisms in T-lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* **19**: 497-521.
- Lewis, R. S. und Cahalan, M. D. (1989). Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca^{2+} and transmembrane Ca^{2+} current in human leukemic T cells. *Cell. Regul.* **1**: 99-112.
- Loh, C., Shaw, K. T., Carew, J., Viola, J. P., Luo, C., Perrino, B. A. und Rao, A. (1996). Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J. Biol. Chem.* **271**: 10884-10891.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2. Auflage.
- Meissner, G., Lai, F., Anderson, K., Xu, L., Liu, Q., Herrmann-Frank, A., Rousseau, E., Jones, R. und Lee, H. (1991). Purification and reconstitution of the ryanodine- and caffeine-sensitive Ca^{2+} release channel complex from muscle sarcoplasmic reticulum. *Adv. Exp. Med. Biol.* **304**: 241-256.
- Meldolesi, J. und Pozzan, T. (1998). The Heterogeneity of ER Ca^{2+} stores has a role in nonmuscle cell signaling and function. *J. Cell. Biol.* **142**: 1395-1398.
- Meszaros, L. G., Bak, J. und Chu, A. (1993). Cyclic ADP-ribose as an endogenous activator of the non-skeletal type ryanodine receptor Ca^{2+} channel. *Nature* **364**: 76-79.
- Mielke, K. und Herdegen, T. (2000). JNK and p38 stresskinases-degenerative of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **61**: 46-50.
- Miyakawa, T., Maeda, A., Yamazawa, T., Hirose, K., Kurosaki, T. und Iino, M. (1999). Encoding of calcium signals by differential expression of IP_3 receptor subtypes. *EMBO J.* **18**: 1303-1308.
- Morita, K., Kitayama, S. und Dohi, T. (1997). Stimulation of cyclic ADP-ribose synthesis by acetylcholine and its role in catecholamine release in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 21002-21009.
- Morrisette, J., Heisermann, G., Cleary, J., Ruoho, A. und Coronado, R. (1993). Cyclic ADP-ribose induced Ca^{2+} release in rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* **330**: 270-274.
- Mosman, T. R. und Coffman, R. L. (1989). TH1 und TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* **7**: 145-173.
- Nakai, J., Imagawa, T., Hakamata, Y., Shigekawa, M. Takeshima, H. und Numa, S. (1990). Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett.* **271**: 169-177.
- Newton, C. R. und Graham, A. (1994). *PCR*. Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage.
- Ng, J., Gustavsson, J., Jondal, M. und Andersson, T. (1990). Regulation of calcium influx across the plasma membrane of the human T-leukemic cell line, Jurkat: dependence on a rise in cytosolic free calcium can be dissociated from formation of inositol phosphates. *Biochem. Biophys. Acta.* **1053**: 97-105.
- Ogawa, Y., Kurebayashi, N. und Murayama, T. (1999). Ryanodine receptor isoforms in excitation contraction coupling. *Adv. Biophys.* **36**: 27-64.

- Okumura, M. und Thomas, M. L., (1995). Regulation of immune function by protein tyrosine phosphatases. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 312-319.
- Otsu, K., Willard, H. F., Khanna, V. K., Zorzato, F., Green, N. M. und MacLennan, D. H. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **265**: 13472-13483.
- Padlan, E. A. und Margulies, D. H. (1997). T-cell receptors feeling out the complex. *Curr. Biol.* **7**: R17-20.
- Parekh, A. B. und Penner, R. (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiol. Rev.* **77**: 901-930.
- Park, I. und Soderling, T. R. (1995). Activation of Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase (CaM-kinase) IV by CaM-kinase kinase in Jurkat T Lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **271**: 30464-30469.
- Paterson, B. M., Roberts, B. E. und Kuff, E. L. (1977). Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 4370-4374.
- Pereverzev, A., Vanja, R., Pfitzer, G., Hescheler, J., Klöckner, U. und Schneider, T. (2002). Reduction of insulin secretion in the insulinoma cell line INS-1 by overexpression of a $\text{Ca}_v2.3$ ($\alpha 1E$) calcium channel antisense cassette. *Eur. J. Endocrinol.* **146**: 881-889.
- Philipp, S., Trost, C., Warnat, J., Rautmann, J., Himmerkus, N., Schroth, G., Kretz, O., Nastainczyk, W., Cavalie, A., Hoth, M. und Flockerzi, V. (2000). TRP4 (CCE1) protein is part of native calcium release-activated Ca^{2+} -like channels in adrenal cells. *J. Biol. Chem.* **275**: 23965-23972.
- Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P. und Meldolesi, J. (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological Reviews* **74**: 595-636.
- Premack, B. A. und Gardner, P. (1992). Signal transduction by T-cell receptors: mobilization of Ca^{2+} and regulation of Ca^{2+} -dependent effector molecules. *Am. J. Physiol.* **263**: C1119-C1140.
- Premack, B. A., McDonald, T. V. und Gardner, P. (1994). Activation of Ca^{2+} current in Jurkat T cells following the depletion of Ca^{2+} stores by microsomal Ca^{2+} ATPase inhibitors. *J. Immunol.* **152**: 5226-5240.
- Putney, J. W. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*. **7**: 1-12
- Putney, J. W. (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* **11**: 611-624.
- Randriamampita, C. und Tsien, R. Y. (1993). Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature* **364**: 809-814.
- Reif, K., Burgering, B. M. und Cantrell, D. A. (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase links the interleukin-2 receptor to protein kinase B and p70 S6 kinase. *J. Biol. Chem.* **272**: 14426-14433.

- Ricard, I., Martel, J., Dupuis, L., Dupuis, G. und Payet, M. D. (1997). A caffeine/ryanodine-sensitive Ca^{2+} pool is involved in triggering spontaneous variations of Ca^{2+} in Jurkat T-lymphocytes by a Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release (CICR) mechanism. *Cell. Signal.* **9**: 197-206.
- Ritter, M., Menon, S., Zhao, L., Xu, S., Shelby, J. und Barry, W. H. (2001). Functional importance and caffeine sensitivity of ryanodine receptors in primary lymphocytes. *Int. Immunopharmacol.* **1**: 339-347.
- Rudd, C. E. (1996). Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function. *Immunity* **4**: 527-534.
- Rudd, C. E. (1999). Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signalling. *Cell* **96**: 5-8.
- Rudd, C. E., Janssen, O., Cai, Y. C., da Silva, A. J., Raab, M. und Prasad, K. V. (1994). Two-step TCR zeta/CD3-CD4 and CD28 signaling in T cells: SH2/SH3 domains, protein-tyrosine and lipid kinases. *Immunol. Today.* **15**: 225-234.
- Sei, Y., Gallagher, K. und Basile A. (1999). Skeletal muscle type ryanodine receptor is involved in calcium signaling in human B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **274**: 5995-6002.
- Shaw, K. T. und Dustin, M. L. (1997). Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* **6**: 272-273.
- Shaw, K. T., Ho, A. M., Raghavan, A., Kim, J., Jain, J., Park, J., Sharma, S., Rao, A. und Hogan, P. G. (1995). Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:11205-11209.
- Shockett, P. E. und Schatz, D. G. (1996). Diverse strategies for tetracycline-regulated inducible gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5173-5176.
- Shoshan-Barmatz, V. und Ashley, R. H. (1998). The structure, function and cellular regulation of ryanodine-sensitive Ca^{2+} release channels. *Int. Rev. Cytol.* **183**: 185-270
- Sitsapesan, R., McGarry, S. J. und Williams, A. J. (1995). Cyclic ADP-ribose, the ryanodine receptor and Ca^{2+} release. *TIPS* **16**: 386-391.
- Sitsapesan, R. und Williams, A. J. (1995). Cyclic ADP-ribose and related compounds activate sheep skeletal sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel. *Am. J. Physiol.* **268**: C1235-C1240.
- Sonnleitner, A., Conti, A., Bertocchini, F., Schindler, H. und Sorrentino, V. (1998). Functional properties of the ryanodine receptor type 3 (RyR3) Ca^{2+} release channel. *EMBO J.* **17**: 2790-2798.
- Sorrentino, V. und Volpe, P. (1993). Ryanodine receptors: how many, where and why? *Trends Pharmacol. Sci.* **14**: 98-103.
- States, R., Walseth, T. F., und Lee, H. C. (1992). Similarities in amino acid sequences of Aplysia ADP-ribosyl cyclase and human lymphocyte antigen CD38. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 495.
- Stein, C. (1995). Does antisense exist? *Nature Medicine* **1**: 1119-1121.

- Stephenson, M. L. und Zamecnik, P. C. (1978). Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 285-288.
- Streb, H., Irvine, R. F., Berridge, M. J. und Schulz, I. (1983). Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature* **306**: 67-69.
- Sugawara, H., Kurosaki, M., Takata, M. und Kurosaki, T. (1997). Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *EMBO J.* **16**: 3078-3088.
- Sugiyama, T., Furuya, A., Monkawa, T., Yamamoto-Hino, M., Satoh, S., Ohmori, K., Miyawaki, A., Hanai, N., Mikoshiba, K. und Hasewaga, M. (1994). Monoclonal antibodies distinctively recognizing the subtypes of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: application to the studies on inflammatory cells. *FEBS Lett.* **254**: 149-154.
- Takahasi, K., Kukimoto, I., Tokita, K-I., Inageda, K., Inoue, S-I., Kontani, K., Hoshina, S-I., Nishina, H., Kanaho, Y. und Katada, T. (1995). Accumulation of cyclic ADP-ribose measured by a specific radioimmunoassay in differentiated human leukemic HL-60 cells with all-trans-retinoic acid. *FEBS Lett.* **37**: 204-208.
- Takasawa, S., Akiyama, T., Nata, K., Kuroki, M., Tohgo, A., Noguchi, N., Kobayashi, S., Kato, I., Katada, T. und Okamoto, H. (1998). Cyclic ADP-ribose and inositol 1,4,5-trisphosphate as alternate second messengers for intracellular Ca^{2+} mobilization in normal and diabetic β -cells. *J. Biol. Chem.* **273**: 2497-2500.
- Takemura, H., Imoto, K., Sakano, S., Kaneko, M. und Ohshika, H. (1996). Lysophosphatidic acid-sensitive intracellular Ca^{2+} store does not regulate Ca^{2+} -release in T-lymphocyte cell lines. *Biochem. J.* **319**: 393-397.
- Takekura, H., Ikemoto, T., Nishi, M., Nishiyama, N., Shimuta, M., Sugitani, Y., Kuno, J., Saito, J., Saito, H., Endo, M., Iino, M. und Noda, T. (1996). Generation and characterization of mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. *J. Biol. Chem.* **271**: 19649-19652.
- Takekura, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T. und Numa, S. (1989). Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* **339**: 439-445.
- Takekura, H., Yamazawa, T., Ikemoto, T., Takekura, H., Nishi, M., Noda, T., Iino, M. (1995). Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in myocytes from dyspedic mice lacking the type-1 ryanodine receptor. *EMBO J.* **14**: 2999-3006.
- Thomas, A. P. und Delaville, F. (1991). The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentrations in cell populations and single cells, in *Cellular Calcium - A Practical Approach*, Hrsg. McCormack, J. G., The Practical Approach Series, S. 1-54, IRL Press, Oxford.
- Thorn, P., Gerasimenko, O. und Petersen, O. H. (1994). Cyclic ADP-ribose regulation of ryanodine receptors involved in agonist evoked cytosolic Ca^{2+} oscillations in pancreatic acinar cells. *EMBO J.* **13**: 2038-2043.
- Tregear, R. T., Hoyland, J. und Mason, W. T. (1991). Calcium signals in single T cells on activation by lectin. *Eur. J. Immunol.* **21**: 1283-1288.

- Trojan, J., Blossey, B. K., Johnson, T. R., Rudin, S. D., Tykocinski, M., Ilan, J. und Ilan, J. (1992). Loss of tumorigenicity of rat glioblastoma directed by insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4874-4878.
- Tunwell, R. E. A., Wickenden, C., Bertrand, B. M. A., Shevchenko, V. I., Walsh, M. B., Allen, P. D. und Lai, F. A. (1996). The human cardiac muscle ryanodine receptor calcium release channel: identification, primary structure and topological analysis. *Biochem. J.* **318**: 477-487.
- Wacholtz, M. C. und Lipsky, P. E. (1993). Anti-CD3-stimulated Ca^{2+} signal in individual human peripheral T cells. Activation correlates with a sustained increase in intracellular Ca^{2+} . *J. Immunol.* **150**: 5338-5349.
- Wange, R. L. und Samelson, L. E. (1996). Complex complexes: Signalling at the TCR. *Immunity* **5**: 195-205.
- Walseth, T. F., Aarhus, R., Kerr, J. A. und Lee, H. C. (1993). Identification of cyclic ADP-ribose-binding proteins by photoaffinity labeling. *J. Biol. Chem.* **268**: 235-242.
- Wayman, C. P., Gibson, A. und McFadzean, I. (1998). Depletion of either ryanodine- or IP_3 -sensitive calcium stores activates capacitative calcium entry in mouse anococcygeus smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* **435**: 231-239.
- Weil, R. und Veillette, A. (1994). Intramolecular and extramolecular mechanisms repress the catalytic function of p56lck in resting T-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **269**: 22830-22838.
- Weismann, M., Guse, A. H., Sorokin, L., Bröker, B., Frieser, M., Hallmann, R. und Mayr, G. W. (1997). Integrin-mediated intracellular Ca^{2+} signaling in Jurkat T lymphocytes. *J. Immunol.* **158**: 1618-1627.
- White, A. M., Watson, S. P., Galione, A. (1993). Cyclic ADP-ribose-induced Ca^{2+} release from rat brain microsomes. *FEBS Lett.* **318**: 259-263.
- Williams, A. J., West, D. J. und Sitsapesan, R. (2001). Light at the end of the Ca^{2+} -release channel tunnel: structures and mechanisms involved in ion translocation in ryanodine receptor channels. *Quarterly Reviews of Biophysics* **34**: 61-104.
- Willmott, N., Sethi, J. K., Walseth, T. F., Lee, H. C., White, A. M. und Galione, A. (1996). Nitric oxide-induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **271**: 3699-3705.
- Wülfing, C., Rabinowitz, J. D., Beeson, C., Sjaastad, M. D., McConnel, H. M. und Davis, M. M. (1997). Kinetics and extend of T cell activation as measured with the calcium signal. *J. Exp. Med.* **185**: 1815-1825.
- Vilenchik, M., Raffo, A. J., Benimetskaya, L., Shames D. und Stein, C. A. (2002). Antisense RNA down-regulation of bcl-xL expression in prostate cancer cells leads to diminished rates of cellular proliferation and resistance to cytotoxic chemotherapeutic agents. *Cancer research* **62**: 2175-2183.
- Voet, D. und Voet, J. G. (1995). *Biochemistry*. John Wiley & Sons, New York, 2. Auflage.
- Yue, L., Peng, J. B., Hediger, M. A. und Clapham, D. E. (2001). Cat1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channels. *Nature* **410**: 705-709.

Ziegler, M., Jorcke, D. und Schweiger, M. (1997). Identification of bovine liver mitochondrial NAD⁺ glycohydrolase as ADP-ribosyl cyclase. *Biochem. J.* **326**: 401-405.

Zorzato, F., Fujii, J., Otsu, K., Green, N. M., Lai, F. A., Meissner, G. und MacLennan, D. H. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **265**: 2244-2256.

Zweifach, A. und Lewis, R. S. (1993). Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T-lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6295-6299.

Anhang 1

A: CLUSTALW Alignment des C-terminalen 240bp großen antisense-Fragments aus RyR Typ3 mit RyR Typ1 und Typ2

RyR 3	14200				CGA	CATGATGACG	TGTTACCTTT	14222
RyR 1	14764				TGA	CATGATGACG	TGTTACCTGT	14786
RyR 2	14542				CGA	TATGCTAACA	TGCTATATGT	14564
RyR 3	14223	TCCACATGTA	CGTGGGAGTG	AGAGCAGGAG	GTGGCATTGG	TGATGAAATT	GAAGACCCTG	14282
RyR 1	14787	TTCACATGTA	CGTGGGTGTC	CGGGCTGGCG	GAGGCATTGG	GGACGAGATC	GAGGACCCCG	14846
RyR 2	14565	TCCACATGTA	TGTTGGAGTT	CGTGCTGGAG	GAGGGATCGG	GGATGAAATC	GAAGACCAG	14624
RyR 3	14283	CTGGTGATCC	TTATGAAATG	TATCGCATTG	TCTTTGACAT	TACCTTTTTC	TTCTTCGTCA	14342
RyR 1	14847	CGGGTGACGA	ATACGAGCTC	TACAGGGTGG	TCTTCGACAT	CACCTTCTTC	TTCTTCGTCA	14906
RyR 2	14625	CAGGAGATGA	ATATGAGATC	TATCGAATCA	TCTTTGACAT	CACCTTCTTC	TTCTTTGTTA	14684
RyR 3	14343	TTGTCATCTT	GCTGGCCATC	ATCAAGGTC	TTATTATTGA	TGCTTTTCGA	GAGCTAAGAG	14402
RyR 1	14907	TCGTCATCCT	GTTGGCCATC	ATCCAGGGTC	TGATCATCGA	CGCTTTTGGT	GAGCTCCGAG	14966
RyR 2	14685	TTGTCATCTT	CTTGCCATA	ATACAAGGTC	TAATTATTGA	TGCTTTTGGG	GAAGTAAGAG	14744
RyR 3	14403	ACCAGCAGGA	ACAAGTACGA	GAAGATATGG	AGACTAA		14439	
RyR 1	14967	ACCAACAAGA	GCAAGTGAAG	GAGGATATGG	AGACCAA		14993	
RyR 2	14745	ACCAACAGGA	ACAAGTCAA	GAAGACATGG	AGACCAA		14781	

B: CLUSTALW Alignment des C-terminalen 511bp großen antisense-Fragments aus RyR Typ3 mit RyR Typ1 und Typ2

RyR 3	12657				T	CCAGTTGCTC	TTCACCATCC	12677
RyR 1	13161				G	GCCGCTGG-C	GCGGGGGCGG	13181
RyR 2	13005				T	GCACTTCGTG	GCCAGCGTTT	13025
RyR 3	12678	TGGGAGGAAT	CTTTCAGATC	CTCTGGAGCA	CAGTGTTTGG	AGGGGGCCTG	GTAGAAGGGG	12737
RyR 1	13182	CGGCGGGCGC	GCTGGGCCTG	CTCTGGGGCT	CGCTGTTTCG	CGGCGGCCTG	GTGGAGGGCG	13241
RyR 2	13026	TCAGAGGCTT	TTTCCGCATC	ATTTGCAGCC	TGCTGCTTGG	GGGAAGCCTC	GTCGAAGGTG	13085
RyR 3	12738	CAAAGAACAT	CAGAGTGACC	AAGATCCTGG	GTGACATGCC	TGACCCAACC	CAATTTGGTA	12797
RyR 1	13242	CCAAGAAGGT	GACGGTGACC	GAGCTCCTGG	CAGGCATGCC	CGACCCACC	AGCGACGAGG	13301
RyR 2	13086	CTAAAAAGAT	CAAAGTTGCA	GAAGTGTAG	CCAACATGCC	AGACCCCACT	CAGGATGAGG	13145
RyR 3	12798	TCCATGATGA	CACTATGGAG	GCTGAGAGGG	CAGAGGTGAT	GGAGCCAGGT	ATCACCCTG	12857
RyR 1	13302	TGCA CGGCGA	GCA GCCGCC	GGCCGGGCG	GAGACGCAGA	CGGCGAGGGT	GCCAGCGAGG	13361
RyR 2	13146	TTAGAGGAGA	TGGGAGGAG	GGAGAGAGGA	AACCCCTGGA	AGCCGCCCTG	CCCTCCGAG	13205
RyR 3	12858	AACTAGTACA	CTTCATAAAG	GGGG--AGAA	GGGAGATACA	GATATCATGT	CAGACCTCTT	12915
RyR 1	13362	GCGCTGGAGA	CGCCGCGGAG	GGCGCTGGAG	ACGAGGAGGA	GGCGGTGCAC	GAGGCCGGGC	13421
RyR 2	13206	ATCTGACCGA	CTT----AAA	GGAGC-TGAC	AGAGGAAAGT	GACCTTCTTT	CGGACATCTT	13260
RyR 3	12916	TGGACTCCAC	CAAAGAAAG	AGGGCAGCTT	AAA-GCATGG	GCCTGAAGTG	GGTTTG----	12970
RyR 1	13422	CGGGCGGTGC	CGACGGGGCG	GTGGCCGTGA	CCG-ATGGGG	GCCCCTTCCG	GCCCGAAGGG	13480
RyR 2	13261	TGGCCTGGAT	CTGAAGAGAG	AAGGAGGACA	GTACAAACTG	ATTCCTCATA	ATCCAAA---	13317
RyR 3	12970	---GGTGACC	TCTCAGAAAT	TATTGGCAAG	-----GATG	AACCCCTAC	ATTAGAGAGT	13021
RyR 1	13481	GCTGGCGGTC	TCGGGGACAT	GGGGGACACG	ACGCCTGCGG	AACCGCCAC	ACCCGAGGGC	13540
RyR 2	13317	--TGCTGGGC	TCAGTGACCT	CATGAGCAAC	---C-----	CAGTCCCAT	GCCTGAGG--	13364

RyR 3 13022 ACTGTACAGA AGAAGAGGAA AGCTCAGGCA GCAGAAATGA AAGCAGCAA TGAAGCAGAA 13081
RyR 1 13541 TCTCCCATCC TCAAGAGGAA ATTGGGGGTG GATGGAGTGG AGG-AGGAGC TCCC GCCAGA 13599
RyR 2 13364 ----- TGCAGGAAAA ATTCAGGAA CAGAAGGCAA AAGAAGAAGA AAAGG---AA 13411

RyR 3 13082 GGAAAAGTAG AATCCGAGAA GGCAGACATG GAAGATGGAG AGAAGGAAGA CAAAGACAAA 13141
RyR 1 13600 GCCAGAGCCC GAGCCGGAAC --CAGAGCTG GAGCCGGAGA AAGCCGATGC CGAGAATGGG 13657
RyR 2 13412 GAAAAAGAAG AAACCAAATC ---T----- GAACCTGAAA AAGCCGAGGG AGAAGATGGA 13462

RyR 3 13142 GAAGAGGAGC AAGCTGAGTA CCTGTG 13167
RyR 1 13658 GAGAAGGAAG AAGTTCCCGA GCCCAC 13683
RyR 2 13463 GAAAAAGAAG AGAAAGCCAA G--GAA 13488

Anhang 2

A: CLUSTALW Alignment der mit für RyR-1 spezifischen Primern erhaltenen Fragmente aus humanem Gehirn und Tet-On Jurkat T-Zellen

RyR 1 NM_000540.1	14300	GGC	CACACTAGAG	ATCACAGCCC	ACAATGAGCG	CAAGCCCAAC	CCGCCGCCAG	GGCTGCT
RyR 1 Gehirn	14300	GGC	CACACTAGAG	ATCACAGCCC	ACAATGAGCG	CAAGCCCAAC	CCGCCGCCAG	GGCTGCT
RyR 1 Tet-On Jurkat	14300	GGC	CACACTAGAG	ATCACAGCCC	ACAATGAGCG	CAAGCCCAAC	CCGCCGCCAG	GGCTGCT
RyR 1 NM_000540.1	14360	GAC	CTGGCTCATG	TCCATCGATG	TCAAGTACCA	GATCTGGAAG	TTCGGGGTCA	TCTTCAC
RyR 1 Gehirn	14360	GAC	CTGGCTCATG	TCCATCGATG	TCAAGTACCA	GATCTGGAAG	TTCGGGGTCA	TCTTCAC
RyR 1 Tet-On Jurkat	14460	GAC	CTGGCTCATG	TCCATCGATG	TCAAGTACCA	GATCTGGAAG	TTCGGGGTCA	TCTTCAC
RyR 1 NM_000540.1	14420	AGA	CAACTCCTTC	CTGTACCTGG	GCTGGTATAT	GGTGATGTCC	CTCTGGGAC	ACTACAA
RyR 1 Gehirn	14420	AGA	CAACTCCTTC	CTGTACCTGG	GCTGGTATAT	GGTGATGTCC	CTCTGGGAC	ACTACAA
RyR 1 Tet-On Jurkat	14420	AGA	CAACTCCTTC	CTGTACCTGG	GCTGGTATAT	GGTGATGTCC	CTCTGGGAC	ACTACAA
RyR 1 NM_000540.1	14480	CAA	CTTCTTCTTT	GCTGCCATC	TCCTGGACAT	CGCCATGGGG	GTCAAGACGC	TGCGCAC
RyR 1 Gehirn	14480	CAA	CTTCTTCTTT	GCTGCCATC	TCCTGGACAT	CGCCATGGGG	GTCAAGACGC	TGCGCAC
RyR 1 Tet-On Jurkat	14480	CAA	CTTCTTCTTT	GCTGCCATC	TCCTGGACAT	CGCCATGGGG	GTCAAGACGC	TGCGCAC
RyR 1 NM_000540.1	14540	CAT	CCTGTCCTCT	GTCACCCACA	ATGGGAAACA	GCTGGTGATG	ACCGTGGGCC	TTCTGGC
RyR 1 Gehirn	14540	CAT	CCTGTCCTCT	GTCACCCACA	ATGGGAAACA	GCTGGTGATC	ACCGTGGGCC	TTCTGGC
RyR 1 Tet-On Jurkat	14540	CAT	CCTGTCCTCT	GTCACCCACA	ATGGGAAACA	GCTGGTGATG	ACCGTGGGCC	CTCTGGC
RyR 1 NM_000540.1	14600	GGT	GGTCGTCTAC	CTGTACAC	CGT	14623		
RyR 1 Gehirn	14600	GGT	GGTCGTCTAC	CTGTACAC	CGT	14623		
RyR 1 Tet-On Jurkat	14600	GGT	GGTCGTCTAC	CTGTACAC	CGT	14623		

B: CLUSTALW Alignment der mit für RyR-2 spezifischen Primern erhaltenen Fragmente aus humanem Gehirn und Tet-On Jurkat T-Zellen

RyR2 NM_001035.1	14001	AAGGCCAGTG	GGATAGACTC	GTAATCAACA	CACAGTCATT	TCCCAACAAC	TACTGGGACA
RyR2 Gehirn	14001	AAGGCCAGTG	GGATAGACTC	GTAATCAACA	CACAGTCATT	TCCCAACAAC	TACTGGGACA
RyR2 Tet-On Jurkat	14001	AAGGCCAGTG	GGATAGACTC	GTAATCAACA	CACAGTCATT	TCCCAACAAC	TACTGGGACA
RyR2 NM_001035.1	14061	AATTTGTTAA	AAGAAAGGTT	ATGGATAAAT	ATGGAGAGTT	CTACGGCCGA	GACAGAATCA
RyR2 Gehirn	14061	AATTTGTTAA	AAGAAAGGTT	ATGGATAAAT	ATGGAGAGTT	CTACGGCCGA	GACAGAATCA
RyR2 Tet-On Jurkat	14061	AATTTGTTAA	AAGAAAGGTT	ATGGATAAAT	ATGGAGAGTT	CTACGGCCGA	GACAGAATCA
RyR2 NM_001035.1	14121	GTGAATTACT	TGGCATGGAC	AAGGCAGCTC	TGGACTTCAG	TGATGCCAGA	GAAAAGAAGA
RyR2 Gehirn	14121	GTGAATTACT	TGGCATGGAC	AAGGCAGCTC	TGGACTTCAG	TGATGCCAGA	GAAAAGAAGA
RyR2 Tet-On Jurkat	14121	GTGAATTACT	TGGCATGGAC	AAGGCAGCTC	TGGACTTCAG	TGATGCCAGA	GAAAAGAAGA
RyR2 NM_001035.1	14181	AGCCAAAGAA	AGACAGCTCC	TTATCAGCTG	TACTGAACTC	CATTGATGTG	AAGTATCAGA
RyR2 Gehirn	14181	AGCCAAAGAA	AGACAGCTCC	TTATCAGCTG	TACTGAACTC	CATTGATGTG	AAGTATCAGA
RyR2 Tet-On Jurkat	14181	AGCCAAAGAA	AGACAGCTCC	TTATCAGCTG	TACTGAACTC	CATTGATGTG	AAGTATCAGA
RyR2 NM_001035.1	14241	TGTGGAAACT	AGGAGTCGTT	TTCACCTGACA	ACTCCTTCCT	CTACCTAGCC	TGGTATATGA
RyR2 Gehirn	14241	TGTGGAAACT	AGGAGTCGTT	TTCACCTGACA	ACTCCTTCCT	CTACCTAGCC	TGGTATATGA
RyR2 Tet-On Jurkat	14241	TGTGGAAACT	AGGAGTCGTT	TTCACCTGACA	ACTCCTTCCT	CTACCTAGCC	TGGTATATGA

RyR2 NM_001035.1	14301	CTATGTCTGT	TCTTGGACAC	TATAACAAC	TTTTTTTTGC	CGCTCACCTT	CTCGACATTG
RyR2 Gehirn	14301	CTATGTCTGT	TCTTGGACAC	TATAACAAC	TTTTTTTT~GC	CGCTCACCTT	CTCGACATTG
RyR2 Tet-On Jurkat	14301	CTATGTCTGT	TCTTGGACAC	TATAACAAC	TTTTTTTTGC	CGCTCACCTT	CTCGACATTG

RyR2 NM_001035.1	14361	CTATGGGA	14368
RyR2 Gehirn	14360	CTATGGGA	14368
RyR2 Tet-On Jurkat	14361	CTATGGGA	14368

C: CLUSTALW Alignment der mit für RyR-3 spezifischen Primern erhaltenen Fragmente aus humanem Gehirn und Tet-On Jurkat T-Zellen

RyR3 NM_001036.1	13821	TTAGCCCAGT	AGAAGAGACC	AAAGCAGAAG	CGGCTTCTCT	GGTGTTCATGG	CTAAGTTCCA
RyR3 Gehirn	13821	TTAGCCCAGT	AGAAGAGACC	AAAGCAGAAG	CGGCTTCTCT	GGTGTTCATGG	CTAAGTTCCA
RyR3-Tet-On Jurkat	13821	TTAGCCCAGT	AGAAGAGACC	AAAGCAGAAG	CGGCTTCTCT	GGGGTCATGG	CTAAGTTCCA

RyR3 NM_001036.1	13881	TAGACATGAA	GTACCATATC	TGGAAGCTTG	GAGTTGTTTT	TACTGACAAC	TCCTTTCTCT
RyR3 Gehirn	13881	TAGACATGAA	GTACCATATC	TGGAAGCTTG	GAGTTGTTTT	TACTGACAAC	TCCTTTCTCT
RyR3-Tet-On Jurkat	13881	TAGACATGAA	GTACCATATC	TGGAAGCTTG	GAGTTGTTTT	TACTGACAAC	TCCTTTCTCT

RyR3 NM_001036.1	13941	ACCTTGCCCTG	GTATACAACC	ATGTCAGTCC	TGGGCCACTA	CAATAACTTC	TTCTTTGCTG
RyR3 Gehirn	13941	ACCTTGCCCTG	GTATACAACC	ATGTCAGTCC	TGGGCCACTA	CAATAACTTC	TTCTTTGCTG
RyR3-Tet-On Jurkat	13941	ACCTTGCCCTG	GTATACAACC	ATGTCAGTCC	TGGGCCACTA	CAATAACTTC	TTCTTTGCTG

RyR3 NM_001036.1	14001	CTCACCTATT	GGACATCGCA	ATGGGCTTCA	AGACACTGAG	GACCATTCTG	TCATCTGTAA
RyR3 Gehirn	14001	CTCACCTATT	GGACATCGCA	ATGGGCTTCA	AGACACTGAG	GACCATTCTG	TCATCTGTAA
RyR3-Tet-On Jurkat	14001	CTCACCTATT	GGACATCGCA	ATGGGCTTCA	AGACACTGAG	GACCATTCTG	TCATCTGTAA

RyR3 NM_001036.1	14061	CTCACAATGG	CAAACAGTTG	GTTCTGACTG	TCGGTCTCCT	GGCCGTGGTG	GTTTATCTCT
RyR3 Gehirn	14061	CTCACAATGG	CAAACAGTTG	GTTCTGACTG	TCGGTCTCCT	GGCCGTGGTG	GTTTATCTCT
RyR3-Tet-On Jurkat	14061	CTCACAATGG	CAAACAGTTG	GTTCTGACTG	TCGGTCTCCT	GGCCGTGGTG	GATTATCTCT

RyR3 NM_001036.1	14121	ATACTGTGGT	GGCTTTCAAC	TTCTTCCGCA	AGTTCTACAA	CAAAAGCGAA	GACGATGACG
RyR3 Gehirn	14121	ATACTGTGGT	GGCTTTCAAC	TTCTTCCGCA	AGTTCTACAA	CAAAAGCGAA	GACGATGACG
RyR3-Tet-On Jurkat	14121	ATACTGNNGT	GGCTTTCAAC	TTCTTCCGCA	AGTTCTACAA	CAAAAGCGAA	GACGATGACG

RyR3 NM_001036.1	14181	AGCCCGATAT	G 14191
RyR3 Gehirn	14181	AGCCCGATAT	G 14191
RyR3-Tet-On Jurkat	14181	AGCCCGATAT	G 14191