

4. Ergebnisse

4.1 Proliferation und IL-2-Produktion

Der Zwei-Signal-Hypothese (Bretscher und Cohn, 1970) zufolge benötigen T-Zellen zwei Signale, um proliferieren und Zytokine produzieren zu können: Eines wird antigenabhängig über den T-Zellrezeptor (TZR) vermittelt, das zweite Signal erfolgt über lösliche Faktoren wie Zytokine, v. a. IL-2, oder kostimulatorische Rezeptoren, von denen CD28 der wichtigste ist. Werden aus Lymphknotenzellen die antigenpräsentierenden Zellen (APZ) wie B-Zellen und Makrophagen entfernt, so lassen sich die verbleibenden T-Zellen durch TZR-Stimulation kaum zu Proliferation (Abb. 7) und IL-2-Produktion (Tab. 1) anregen. Nach zwei Tagen ist im Mikroskop sichtbar, daß die überwiegende Zahl der Zellen tot ist (Daten nicht gezeigt). Für den Versuch wurden T-Zellen durch Nylonwollreinigung aus Lymphknotenzellen von Ratten gewonnen (siehe Methoden) und auf einer Plastikplatte mit immobilisiertem TZR-spezifischen Antikörper (R73) stimuliert. Die Fixierung des anti-TZR-Antikörpers geschieht indirekt über einen gegen den konstanten (Fc-) Teil des TZR-Antikörpers gerichteten kreuzvernetzenden Antikörper.

Ein zusätzliches, zweites Signal über den kostimulatorischen Rezeptor CD28 überwindet die unvollständige Aktivierung: Gibt man im obigen System neben dem immobilisierten anti-TZR monoklonalen Antikörper (mAb) löslich CD28-spezifischen mAb hinzu, so proliferieren die Zellen stark (Abb. 7), in Übereinstimmung mit der Zwei-Signal-Hypothese.

Im Rattensystem sind zwei CD28-spezifische mAb des gleichen Isotyps ($\gamma 1\kappa$) entwickelt, JJ316 und JJ319 (Tacke et al., 1995; Tacke et al., 1997), die zusammen mit einem TZR-Signal (Signal 1) T-Zellen aktivieren können, also kostimulatorisch wirken (Abb. 7). Wie aus Abb. 7 ersichtlich, bleibt der konventionelle, kostimulatorische CD28-spezifische mAb JJ319 allein ohne Effekt. Im Gegensatz dazu induziert der mitogene CD28-spezifische mAb JJ316 auch ohne TZR-Beteiligung Proliferation, die sogar stärker ist als mit Kostimulation, was der Zwei-Signal-Hypothese zu widersprechen scheint. Ein Antikörper mit ähnlichem mitogenen Potential ist auch im humanen System entwickelt (Siefken et al., 1997; Siefken et al., 1998), der allerdings nur in einer Untergruppe der T-Zellen Proliferation induzieren kann, während der mitogene CD28-spezifische mAb JJ316 in der Ratte alle ruhenden T-Zellen aktiviert (Tacke et al., 1997). Diese „direkte“ CD28-Stimulation erfordert allerdings sehr hohe Antikörperkonzentrationen ($> 1\mu\text{g/ml}$), für ein kostimulatorisches Signal ist eine mehr als 100fach geringere Konzentration ausreichend (Abb. 7). Außerdem besitzt der mitogene CD28-spezifische Antikörper eine sehr langsame Bindungskinetik (Tacke et al., 1997), gleichzeitige Stimulation des

TZR beschleunigt aber die Bindung des mitogenen anti-CD28 mAb an CD28 (C.H. Lin, persönliche Mitteilung). Wie am Ende der vorliegenden Arbeit zu diskutieren sein wird, erlaubt diese Beobachtung, die autonome mitogene Aktivität einiger anti-CD28 mAb in die Zwei-Signal-Hypothese einzufügen und den scheinbaren Widerspruch zum Modell aufzulösen.

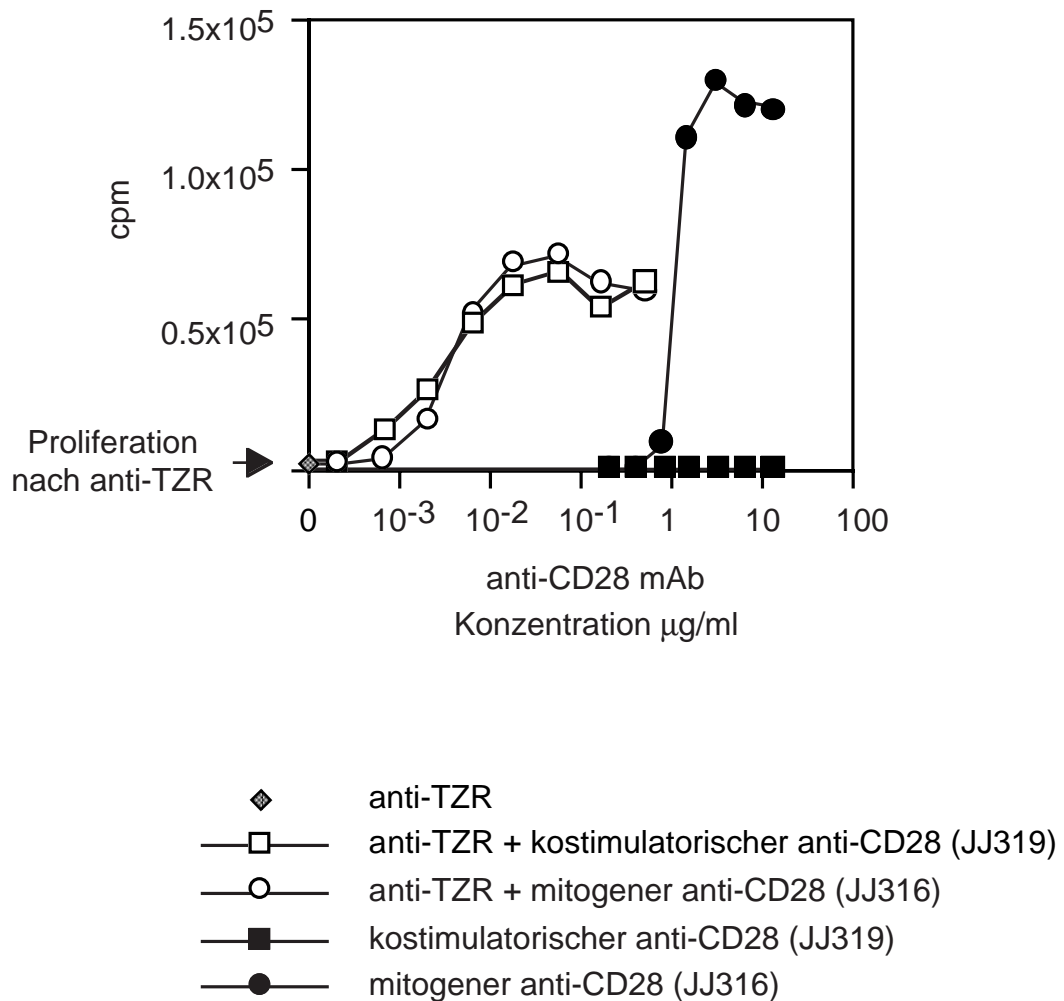


Abb. 7: Kostimulation und autonome Stimulation durch anti-CD28 mAb

Primäre Ratten-T-Zellen wurden mit und ohne immobilisiertem anti-TZR mAb in 96-Napfplatten kultiviert, kostimulatorischer und mitogener anti-CD28 mAb wurden titriert. Der mit einer grauen Raute gekennzeichnete Datenpunkt stellt die Proliferation nach alleiniger TZR-Stimulation dar. Die Bestimmung der Proliferation erfolgte durch Messung des ³H-Thymidineinbaus an Tag 2.

Gleiches wie für die Proliferation gilt für die IL-2-Produktion (Tab. 1).

Tabelle 1: IL-2-Produktion primärer T-Zellen der Ratte nach unterschiedlichen Stimuli

Stimulus	IL-2-Produktion pg/ml (Tag 2)
ohne (Medium)	<10
anti-TZR	65
anti-TZR + kostimul. anti-CD28	750
kostimulatorischer anti-CD28	n. d.
mitogener anti-CD28	1000

Ratten-Lymphknotenzellen wurden in Plastikpetrischalen mit den angegebenen Stimulatoren in optimalen Konzentrationen (siehe Methoden) kultiviert. Der IL-2-Gehalt des Überstandes wurde mittels ELISA bestimmt.

Konventioneller, kostimulatorischer CD28 mAb stimuliert IL-2-Produktion in Verbindung mit einem TZR-Signal, mitogener CD28 mAb löst ohne TZR-Beteiligung in hohen Konzentrationen IL-2-Produktion aus, die sogar höher als in der Kostimulation ist. In niedrigeren Konzentrationen unterstützt er kostimulatorisch zusammen mit anti-TZR mAb R73 die IL-2-Produktion (nicht gezeigt).

Ziel der Arbeit war, die Signaltransduktionswege zu beschreiben, die in der vom mitogenen CD28-spezifischen Antikörper vermittelten T-Zellaktivierung genutzt werden. Von besonderer Bedeutung war dabei, ob sich die Signalwege bei Beteiligung des TZR in der Kostimulation und der von TZR-Ligation unabhängigen direkten CD28-Stimulation unterscheiden. Dies sollte eine weitergehende Charakterisierung der CD28-Signaltransduktionswege erlauben.

4.2 Effekte pharmakologischer Inhibitoren auf die Proliferation

Um einen ersten Überblick über die beteiligten Signalmoleküle und -kaskaden zu erhalten, wurden primäre Ratten-T-Zellen nach den unterschiedlichen Protokollen (TZR-, Ko-, direkte CD28-Stimulation) für zwei Tage stimuliert. Während der Stimulation wurden bestimmte Signalmoleküle und die ihnen nachgeordneten Schritte durch pharmakologische Inhibitoren gehemmt und die Auswirkungen auf die Proliferation als einem Endpunkt der Aktivierung gemessen. Die Inhibitoren

wirken dabei sowohl auf die initialen Signalwege, die von TZR und CD28 ausgehen, als auch auf die Signalwege, die die induzierten Zytokine bei der Bindung an ihre Rezeptoren aktivieren.

Darüberhinaus besteht beim Einsatz der Inhibitoren ein generelles Problem: Es kann in den Proliferationsversuchen nicht einwandfrei festgestellt werden, in wie weit der Inhibitor spezifisch wirkt oder - vor allem in höheren Konzentrationen - auch andere Enzyme blockiert bzw. generell toxisch ist. Zusätzlich erstrecken sich diese Versuche über zwei bis drei Tage, in denen die Zellen mit der potentiell toxischen Substanz inkubiert werden. Neben den erwähnten unspezifischen Effekten ist es auch möglich, daß der Inhibitor nach einiger Zeit instabil oder abgebaut wird, seine Wirkung also nicht mehr entfalten kann. Dies könnte den in einigen Fällen zu beobachtenden Anstieg der Proliferationswerte bei steigenden Inhibitorkonzentrationen im Vergleich zur inhibitorfreien Kontrolle erklären. Während die Zellen der Kontrollansätze ihr Proliferationsmaximum bereits überschritten hatten, wurden die niedrigeren Inhibitorkonzentrationen ausgesetzten Zellen möglicherweise zunächst in ihren Teilungen gehemmt, nach Abbau oder Zerfall des Inhibitors konnten sie aber zum Zeitpunkt der Analyse von Tag zwei auf drei „nachträglich“ proliferieren und höhere Werte erreichen.

Aus diesen Gründen waren die Versuche, T-Zellproliferation pharmakologisch zu inhibieren, lediglich als Vorversuche gedacht, die Hinweise auf die in den einzelnen Stimulationen benutzten Signaltransduktionswege geben sollten.

Abb. 8 zeigt, daß PP1, ein src-Kinasen-Inhibitor, der in T-Zellen p56 lck (lck) und p59 fyn (fyn) inhibiert, sowohl die Kostimulation als auch die direkte CD28-Stimulation negativ beeinflusst und in höheren Konzentrationen völlig unterdrückt. Demnach spielen src-Kinasen in der Kostimulation und in der direkten CD28-Stimulation ohne TZR-Beteiligung eine zentrale Rolle für die Proliferation. Da lck und fyn nach TZR-Ligation aktiviert werden und die TZR-vermittelte Signaltransduktion kontrollieren, indem sie die zeta-Ketten phosphorylieren (Wange und Samelson, 1996), da außerdem lck-Aktivierung nach CD28-Kreuzvernetzung beschrieben ist (King et al., 1997) und Kostimulation die Interaktion von CD28 und lck erfordert (Holdorf et al., 1999), ist dieses Ergebnis nicht unerwartet. Gleichzeitig besagt es nicht, daß Kostimulation und direkte CD28-Stimulation gleiche Signaltransduktionswege beschreiten, da src-Kinasen in zahlreiche Signalkaskaden eingreifen (Wange und Samelson, 1996).

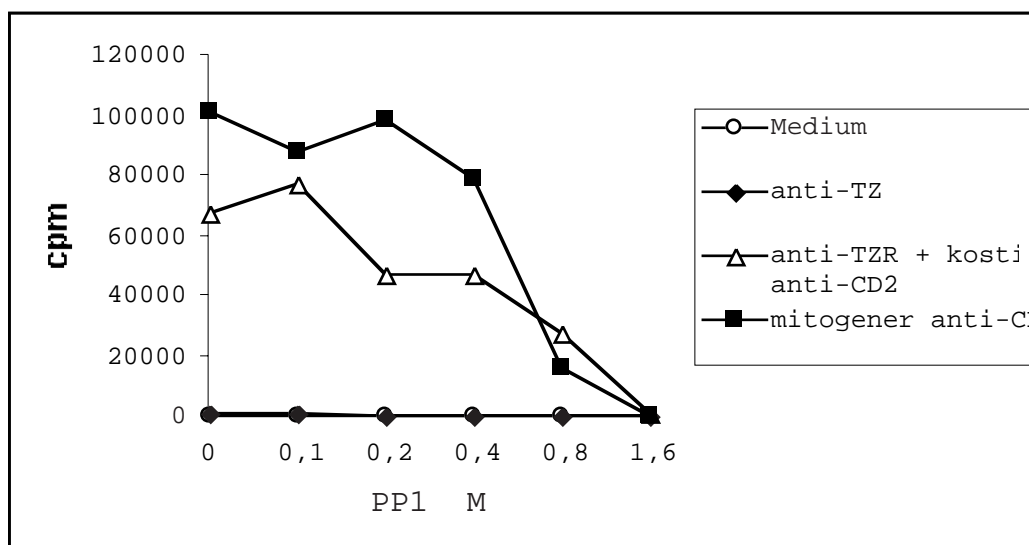


Abb. 8: Src-Kinasen sind für Kostimulation und direkte CD28-Stimulation essentiell

Ratten-T-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen des src-Kinaseninhibitors PP1 bei 37°C vorinkubiert und dann in Anwesenheit der gleichen Inhibitorkonzentrationen stimuliert. Die Proliferationsrate wurde durch Bestimmung des ^3H -Thymidineinbaus an Tag 2 ermittelt.

Für die Aktivierung der ERK-Kaskade ist Signal 1 durch den TZR ausreichend, Kostimulation verstärkt die Aktivierung nicht (Su et al., 1994). Unter diesem Gesichtspunkt sollte analysiert werden, ob die direkte CD28-Stimulation ohne die ERK-Kaskade auskommt und PD98059, ein Inhibitor der ERK-aktivierenden Kinase MEK, keinen Einfluß auf diese Stimulation nimmt. Dies ist nicht der Fall (Abb. 9): PD98059 unterdrückt die durch Kostimulation und den mitogenen CD28-spezifischen Antikörper ausgelöste Proliferation gleichermaßen. Die im Bereich einer Inhibitorkonzentration bis 1 μM scheinbar geringere Sensitivität der Proliferation nach direkter CD28-Stimulation gegenüber dem Inhibitor hat sich in anderen Versuchen nicht bestätigt (Daten nicht gezeigt).

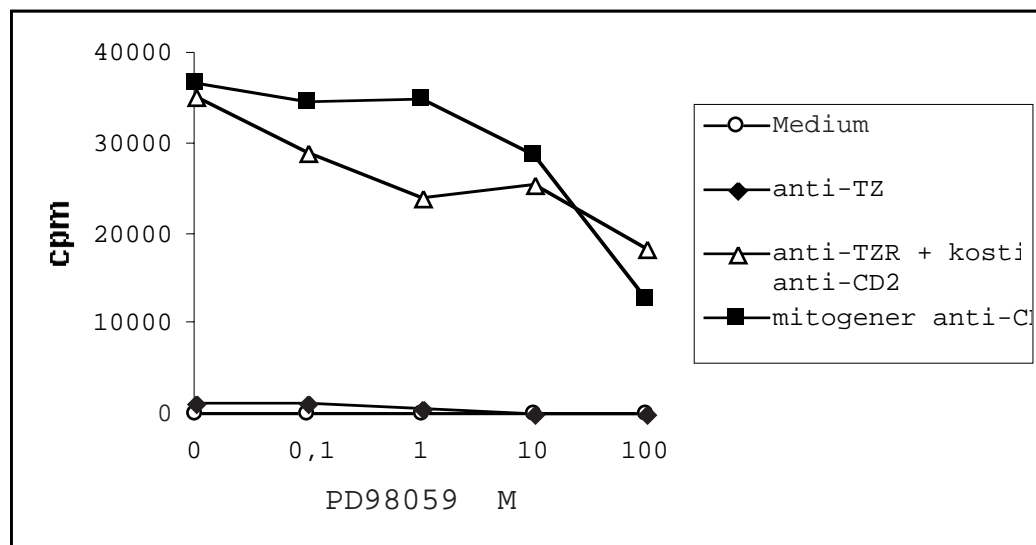


Abb. 9: Fehlende ERK-Aktivierung beeinflusst Kostimulation und direkte CD28-Stimulation

Ratten T-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen des MEK-Inhibitors PD98059 bei 37°C vorinkubiert und in Anwesenheit des Inhibitors stimuliert. Die Proliferationsrate wurde durch Bestimmung des ^3H -Thymidineinbaus an Tag 2 ermittelt.

PI3-Kinase kann mit CD28 assoziieren, seine Rolle in der Kostimulation ist allerdings nicht klar (siehe Einleitung). Ly 294002 hemmt das Enzym durch reversible Blockierung der ATP-Bindungsstelle. Die Hemmung von PI3-Kinase mit Hilfe von Ly294002 hat keinen Einfluß auf die Proliferation nach Kostimulation, inhibiert aber die direkte CD28-Stimulation (Abb. 10). Dies kann als ein Hinweis auf die Wichtigkeit von PI3-Kinase in der direkten CD28-Stimulation gesehen werden.

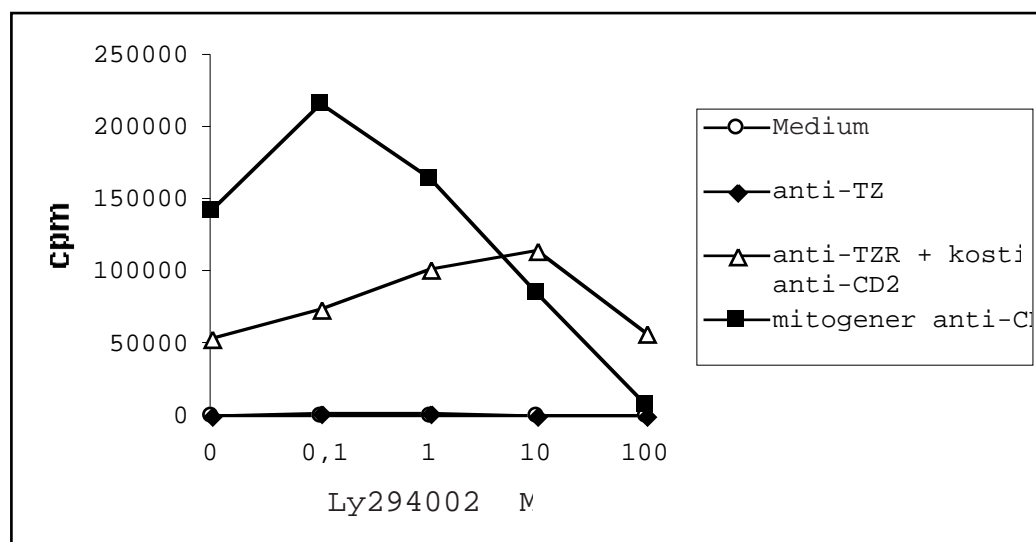


Abb. 10: Inhibition von PI3-K unterdrückt die Proliferation nach direkter CD28-

Stimulation, nicht aber nach Kostimulation

Ratten T-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen des PI3-K-Inhibitors Ly294002 bei 37°C vorinkubiert und in Anwesenheit des Inhibitors stimuliert. Die Proliferationsrate wurde durch Bestimmung des ³H-Thymidineinbaus an Tag 2 ermittelt.

Die MAPK p38 gilt als durch Stress aktivierte Kinase, ihre Induktion ist in T-Zellen aber auch durch TZR-Ligation möglich (Salmon et al., 1997). Je nach System kann ihre Aktivität durch zusätzliche CD28-Signale gesteigert werden (Salmon et al., 1997; Schafer et al., 1999b). Der Einsatz des p38-Inhibitors SB202190 hatte keinen Einfluß auf die Proliferation unabhängig von der Art der Stimulation (Abb. 11). Es kann jedoch nicht unterschieden werden, ob p38 bei der Proliferationsantwort der Zellen keine Funktion hat oder ob der Inhibitor keine Wirkung entfaltete. Der Abfall der Proliferationswerte bei der höchsten Inhibitorkonzentration ist mit einer toxischen Wirkung des Inhibitors zu erklären. Wie im Mikroskop zu sehen, waren die Zellen nach Kultur in Anwesenheit von 100µM SB202190 tot.

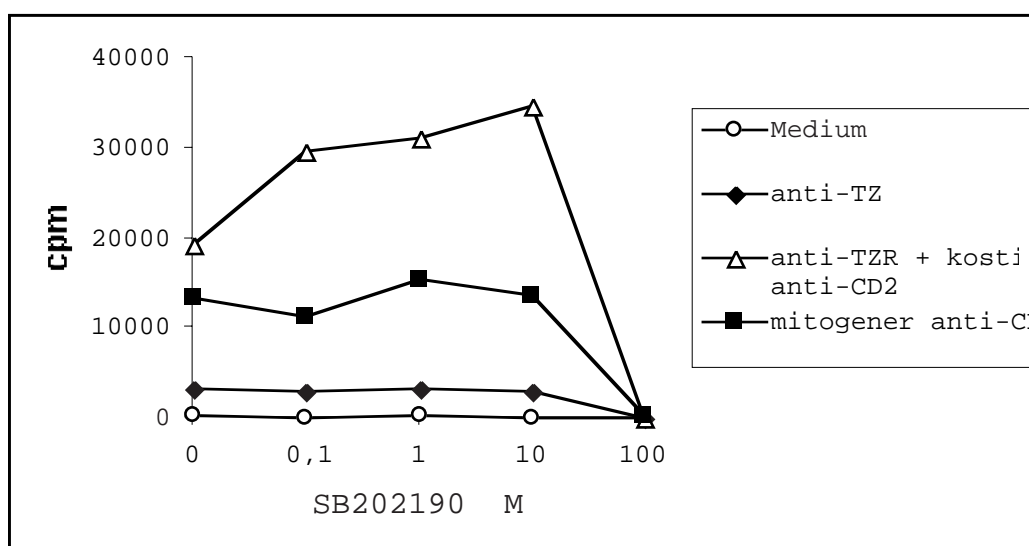


Abb. 11: Der p38-Inhibitor SB202190 unterdrückt weder Kostimulation noch direkte CD28-Stimulation

Ratten T-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen des p38-Inhibitors SB202190 bei 37°C vorinkubiert und in Anwesenheit des Inhibitors stimuliert. Die Proliferationsrate wurde durch Bestimmung des ³H-Thymidineinbaus an Tag 2 ermittelt. Der überall erfolgende Abfall der Proliferation bei der höchsten Inhibitorkonzentration von 100µM ist auf die toxische Wirkung des Inhibitors zurückzuführen, da alle Zellen tot waren.

Calcium spielt bei vielen Vorgängen in der Zelle eine unentbehrliche Rolle und ist auch an der Signalweiterleitung beteiligt. So wird der Transkriptionsfaktor NFAT mittels der Calcium-abhängigen Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert und kann danach in den Kern translozieren. EGTA bildet mit Calcium Komplexe und entzieht es damit der Zelle. Der Einsatz von EGTA unterdrückt die TZR-Stimulation

mit steigender Konzentration. Kostimulation und direkte CD28-Stimulation scheinen im Vergleich dazu etwas unempfindlicher gegenüber Calciumentzug, werden bei höheren EGTA-Konzentrationen aber ebenfalls gehemmt (Abb. 12). Auffällig in dem hier gezeigten Versuch ist, daß TZR-Stimulation allein relativ starke Proliferation auslöst (vgl. z. B. mit Abb. 8). Es ist zu vermuten, daß in diesem Versuch nach Aufreinigung der T-Zellen immer noch APZ vorhanden waren, die ein, wenn auch suboptimales, kostimulatorisches Signal lieferten. Die bei optimaler Kostimulation größere Resistenz gegenüber EGTA legt nahe, daß auch in der Ratte über CD28 ein Calcium-unabhängiger Aktivierungsweg stimuliert wird, wie für Maus und Mensch beschrieben. Gleiches gilt für ein CD28-Signal ohne TZR-Beteiligung.

Allerdings kann nicht klar unterschieden werden, ob EGTA - besonders in hoher Konzentration - durch Calcium-Chelatisierung nur die Signaltransduktion behindert oder auch andere Zell- bzw. Stoffwechselfunktionen beeinflusst und toxische Wirkungen hat.

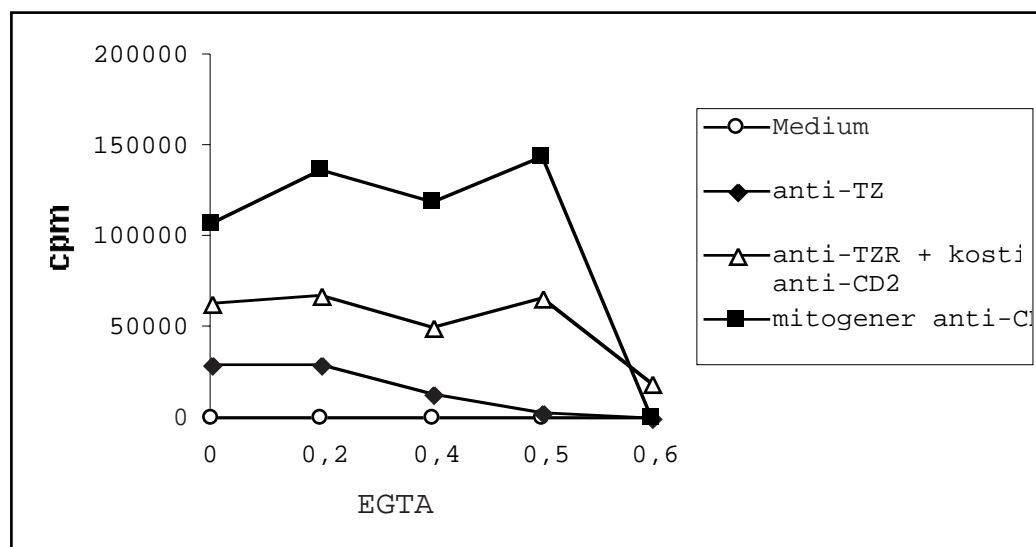


Abb. 12: Einfluß des Calcium-Chelators EGTA auf die Proliferation

Ratten T-Zellen wurden mit den angegebenen EGTA-Konzentrationen im Medium stimuliert. Der ^3H -Thymidineinbau an Tag 2 wurde als Maß für die Proliferationsrate ermittelt.

Den Inhibitorstudien zufolge sind src-Kinasen ebenso wie die MAPKinase ERK sowohl in der Kostimulation mit TZR-Beitrag als auch in der direkten CD28-Stimulation an der Induktion der Proliferation beteiligt. Gleichzeitig weist die unterschiedliche PI3-K-Abhängigkeit von Ko- und direkter CD28-Stimulation darauf hin, daß die in diesen Stimulationsarten aktivierten Signalwege nicht identisch sind. Aufgrund der angesprochenen Unwägbarkeiten können diese Versuche lediglich als Vorversuche angesehen werden. Aufschluß über die von den einzelnen Stimulationsarten angesprochenen Signaltransduktionswege sollten biochemische

Versuche geben, in denen die Aktivität und der Phosphorylierungsstatus spezieller Signalmoleküle in Kurzzeit-Experimenten direkt analysiert wurden.

4.3 Membranproximale Signalereignisse

4.3.1 lck-Aktivität

Kostimulation TZR-vermittelter Signale trägt - wie kürzlich gezeigt - zu der verstärkten und verlängerten Phosphorylierung von Molekülen bei, die mit dem TZR-Weg assoziiert sind (Tuosto und Acuto, 1998; Salojin et al., 1999; Viola et al., 1999). Es stellte sich daher die Frage, ob der mitogene CD28-spezifische mAb bei der durch ihn ausgelösten Zellaktivierung sich der TZR-Signalmaschinerie bedient, sich also in den TZR-Signalweg „einschleicht“, oder unabhängig vom TZR eigene Wege beschreitet. Eines der frühesten Ereignisse nach Bindung des TZR an den Peptid-MHC-Komplex ist die Aktivierung von src-Kinasen, die, wie oben gezeigt, für Proliferation nach Ko- und direkter CD28-Stimulation erforderlich sind. Eine der src-Kinasen in T-Zellen ist p56 lck (lck), die nicht nur die TZR-Ketten, sondern auch zahlreiche andere zelluläre Substrate phosphoryliert. Ob Kinasen nach Zellstimulation aktiviert sind, läßt sich mit einem *in vitro* Kinase-Assay nachweisen. Dazu wird die betreffende Kinase direkt oder in einem Komplex gebunden an andere Proteine präzipitiert, ihr in Anwesenheit von radioaktiv markiertem $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP als Quelle der zu transferierenden Phosphatgruppe ein Substrat zugesetzt oder die Fähigkeit zur Autophosphorylierung ausgenutzt. Die in das Substrat eingebaute radioaktive Phosphogruppe kann nach Auftrennung der Proteine in einem Gel (SDS-PAGE) durch Schwärzung eines angelegten Röntgenfilms sichtbar gemacht werden. Der Grad der Schwärzung im Vergleich zu einer nicht stimulierten Kontrolle gilt als Maß für die Stärke der Stimulation. *In vitro* Kinase-Assays mit lck-Präzipitaten zeigten (Abb. 13), daß lck sowohl nach TZR als auch Kostimulation und direkter CD28-Stimulation aktiviert ist. lck-Aktivität nach direkter CD28-Stimulation weist eine verzögerte Kinetik auf; dies mag mit der erwähnten langsameren Bindung des mitogenen Antikörpers an sein Epitop erklärbar sein.

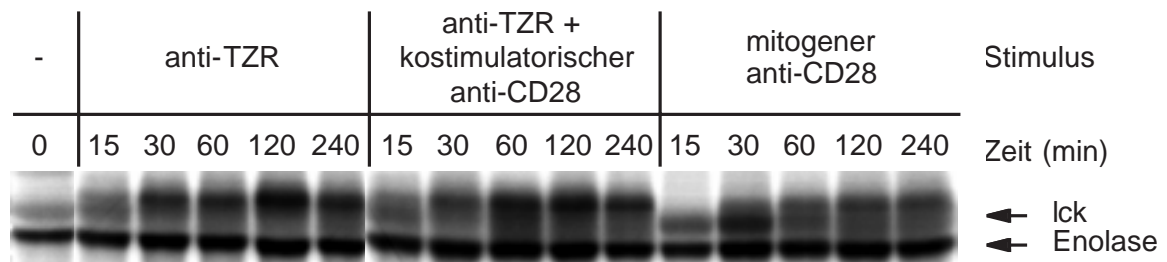


Abb. 13: Ick-Aktivierung nach Stimulation mit mitogenem anti-CD28

Aus den Zellysaten der $1-2 \times 10^7$ wie angegeben stimulierten T-Zellen wurde Ick präzipitiert. Ick-Aktivität ließ sich in einem in vitro Kinase-Test, der Enolase als exogenes Substrat enthielt und die Fähigkeit von Ick zur Autophosphorylierung ausnutzte, durch Einbau von radioaktiv-markiertem $\gamma^{32}P$ -ATP bestimmen.

Erhöhte Aktivität korreliert in diesem Nachweis nicht nur mit stärkerer Bandenintensität, sondern auch mit verminderter Mobilität im Gel: Die stärker phosphorylierte Form von Ick, p60Ick, ist im Gel zu einem höheren Molekulargewicht verschoben. Die Phosphorylierung des exogenen Substrats Enolase reflektiert aus unbekanntem Gründen nicht sehr deutlich die Ick-Aktivität, da der Phosphorylierungsgrad von unstimulierten zu stimulierten Zellen wenig zunimmt. Daher wurden der Grad der Ick-Autophosphorylierung und die Mobilitätsveränderung als Maß für Ick-Aktivität herangezogen.

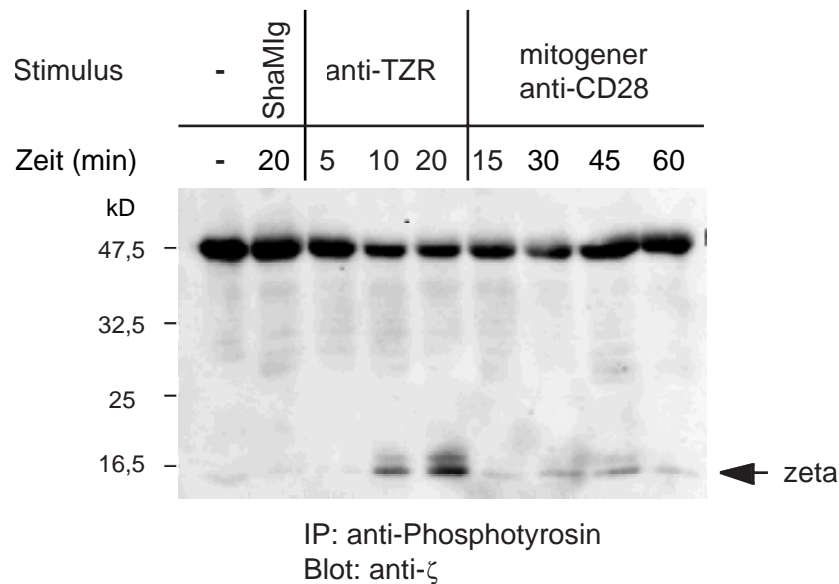
p56Ick wird in T-Zellen als Antwort auf zahlreiche Stimuli aktiviert, so u.a. durch CD2- und CD45-Ligation (Danielian et al., 1992), daher beweist die erhöhte Ick-Aktivität nach Stimulation mit dem mitogenen CD28-spezifischen mAb noch keine Beteiligung des TZR an CD28-vermittelten Signalen. Wichtig für vom TZR ausgehende Signale sind die TZR ζ -Ketten, die nach ihrer Phosphorylierung durch Ick als Ankerpunkte für weitere Kinasen wie ZAP-70 dienen. Um herauszufinden, ob die direkte CD28-Stimulation Elemente des TZR-Weges benutzte, erschien es sinnvoll, die ζ -Ketten zu analysieren.

4.3.2 TZR ζ -Kette

Der Nachweis von ζ -Ketten-Phosphorylierung erwies sich als schwierig. Zunächst wurde TZR ζ mit spezifischen Antikörpern präzipitiert und versucht, im Western Blot mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper die unterschiedlich stark phosphorylierten ζ -Formen (v. a. p21 und p23) nachzuweisen. Da dies selbst für TZR- oder Pervanadat-stimulierte Zellen (Pervanadat löst starke Tyrosinphosphorylierungen in behandelten Zellen aus) auch mit verschiedenen ζ -spezifischen Antikörpern (Hamster anti- ζ 146-968, Kaninchen anti- ζ 551) nicht

gelang (Daten nicht gezeigt), wurde der umgekehrte Weg beschriftet: Tyrosinphosphorylierte Proteine wurden mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper präzipitiert, die unterschiedlichen ζ -Formen sollten im Western Blot mit einem gegen die ζ -Kette gerichteten Antikörper detektiert werden. Dies gelang nur einmal (Abb. 14a). Nach Auftrennung der präzipitierten Proteine unter reduzierenden Bedingungen konnte nach direkter CD28-Stimulation eine im Vergleich zu TZR-Signalen nur geringfügige Phosphorylierung nachgewiesen werden.

a SDS-PAGE reduzierend



b SDS-PAGE nicht-reduzierend

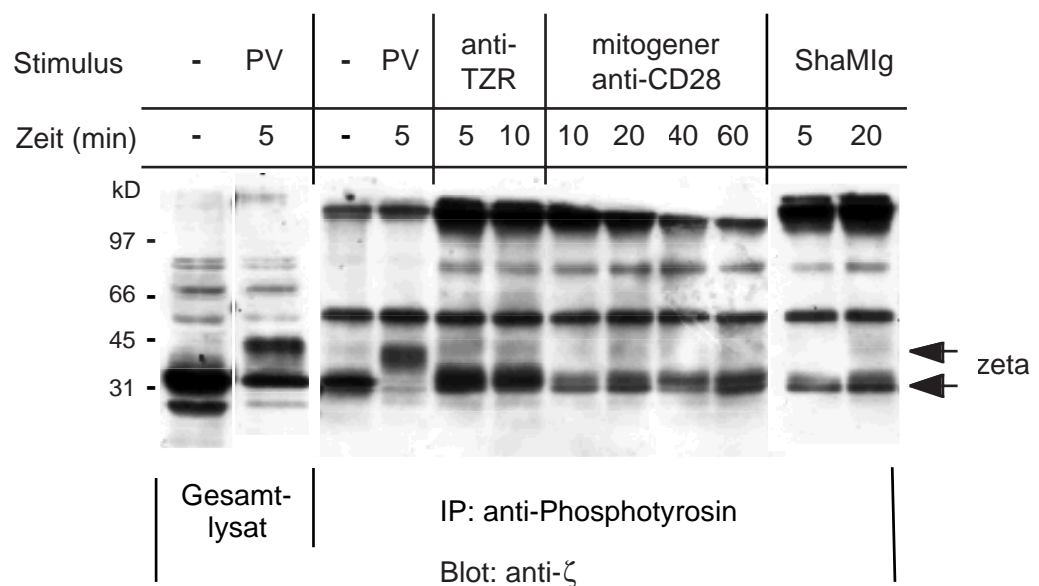


Abb. 14: Phosphorylierungsstatus der TZR ζ -Ketten

Mit den Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpern PY-20 (oben) bzw. PY-99 (unten) wurden tyrosinphosphorylierte Proteine präzipitiert und mit Hilfe von reduzierendem (oben)