

## 5. Diskussion

CD28 ist der wichtigste kostimulatorische Rezeptor in T-Zellen, der zusammen mit dem antigen-spezifischen TZR Proliferation und Zytokinproduktion induziert. Es ist unklar, ob für die kostimulatorische Funktion von CD28 die Generierung eigenständiger Signale, die Stabilisierung des Kontaktes von T-Zelle und APZ oder die Unterstützung TZR-spezifische Signale entscheidend ist.

Ein Paar monoklonaler Antikörper spezifisch für CD28 der Ratte mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften (Tacke et al., 1995; Tacke et al., 1997) erlaubt, CD28-Signaltransduktion mit und ohne TZR-Beteiligung zu analysieren: Die physiologische Situation der Kostimulation kann mit einem kostimulatorischen mAb gegen CD28 imitiert werden, der nur zusammen mit einem TZR-spezifischen mAb T-Zellen aktiviert, während ein mitogener CD28-spezifischer mAb T-Zellen auch ohne TZR-Ligation stimuliert. Der Vergleich dieser direkten CD28-Stimulation mit den durch TZR und Kostimulation aktivierten Signalwegen sollte Hinweise auf die Fähigkeit von CD28 geben, vom TZR-Weg unterschiedliche Signale zu generieren.

### 5.1 Eingesetzte Methoden

Direkt an der Membran ablaufende Signalereignisse stützen sich hauptsächlich auf die Aktivität von Tyrosinkinasen. Daher wurden in biochemischen Versuchen die Aktivität dieser Enzyme in Kinase-Assays und die induzierten Tyrosinphosphorylierungen in phosphotyrosin-spezifischen Western Blots nachgewiesen. Ebenfalls auf Kinase-Assays beruhte die Analyse distaler Signalereignisse, die neben Tyrosin- auch Serin- und Threoninphosphorylierungen beinhalten. Da Phosphorylierung Voraussetzung für die Aktivierung der Kinaseaktivität ist, wurde in einigen Fällen alternativ zum Kinase-Assay ein phospho-spezifischer Western Blot benutzt.

In Proliferationsversuchen wurden Inhibitoren unterschiedlicher Signalwege und -moleküle eingesetzt, um Hinweise auf die Wichtigkeit der einzelnen Kaskaden für die Zellaktivierung zu bekommen. Allerdings sollten bei der Interpretation der Ergebnisse der Proliferationsversuche einige „Caveats“ beachtet werden. Anhand solcher Proliferationsversuche läßt sich nicht unterscheiden, ob das gehemmte Enzym bereits für die primäre, durch Rezeptorligation induzierte Genexpression unentbehrlich ist oder erst in den durch autokrine Wachstumsfaktoren ausgelösten Signalwegen eine wichtige Rolle spielt. Ebenso sind die bereits im Ergebnisteil angesprochenen Probleme des Inhibitoreinsatzes über mehrere Tage hinsichtlich der Spezifität, Toxizität und Stabilität der Inhibitoren zu berücksichtigen. Besonders bei höheren Inhibitorkonzentrationen läßt sich schwerlich überprüfen, inwieweit der

Inhibitor spezifisch nur einen Signalweg oder ein Signalmolekül hemmt oder ob auch andere Enzyme beeinträchtigt werden. Auch kann die dauernde Anwesenheit einer chemischen Substanz toxisch für die Zelle sein. Auf der anderen Seite ist unbekannt, wie stabil die Inhibitoren in ihrer Zielzelle sind. Möglicherweise wird die chemische Substanz im Zellmilieu nach einiger Zeit instabil oder aber sie wird durch die Zelle selbst inaktiviert oder abgebaut. In allen Fällen läßt sich nicht bestimmen, wie lange der inhibitorische Effekt andauerte und ab wann die Zelle ungehemmt aktiviert werden konnte. Daher lassen sich die Inhibitorversuche nur als Vor- und ergänzende Versuche ansehen. Sie können Hinweise auf induzierte Signalwege und deren Wichtigkeit insbesondere dann geben, wenn ein Inhibitor die zunächst ähnlich gute Proliferation nach Ko- und direkter CD28-Stimulation unterschiedlich beeinflusst.

## 5.2 MAPK in TZR-, Ko- und direkter CD28-Stimulation

Auf der Ebene der MAPK sind bislang die Unterschiede zwischen TZR- und Kostimulation und damit der Beitrag, den CD28 zur Kostimulation leistet, am besten beschrieben. So gilt ERK als TZR-spezifische MAPKinase, da bereits Signal 1 über den TZR zu ihrer Aktivierung ausreicht; zusätzliche CD28-Ligation in der Kostimulation erhöht die ERK-Aktivität nicht mehr (Su et al., 1994). Im Gegensatz dazu wird JNK durch den TZR allein nicht induziert, erst das Zusammenwirken von TZR- und CD28-Signal in der Kostimulation aktiviert den Signalintegrator JNK (Su et al., 1994). Ebenfalls als Signalintegrator ist die dritte MAPK p38 beschrieben (Salmon et al., 1997; Zhang et al., 1999a), allerdings ist in manchen Systemen bereits Signal 1 über den TZR ausreichend, um maximale Aktivität von p38 zu induzieren (DeSilva et al., 1997).

In der Ratte konnte durch die hier vorgelegten Ergebnisse sowohl die ERK-Aktivierung allein durch ein TZR-Signal ohne zusätzlichen Beitrag der Kostimulation bestätigt werden als auch die Rolle von JNK als Signalintegrator: TZR-Stimulation reichte bereits zur Induktion von ERK aus, zusätzliche CD28-Ligation in der Kostimulation erhöhte die Aktivität nicht mehr. JNK wurde durch ein TZR-Signal allein wenig induziert, Kostimulation steigerte die Aktivität deutlich. p38 scheint im Rattensystem ein nicht so bedeutender Signalintegrator wie JNK zu sein: Kostimulation erhöhte die durch TZR-Ligation ausgelöste p38-Phosphorylierung nur geringfügig.

Mitogene CD28-Signale können das gesamte Spektrum der MAPK in T-Zellen aktivieren, wobei im Vergleich zu TZR- und Kostimulation die ERK-Phosphorylierung nach direkter CD28-Stimulation deutlich schwächer ausfiel.

Erstaunlich ist, daß der Signalintegrator JNK durch CD28 allein in gleichem Maße wie durch Kostimulation aktiviert werden kann.

Im Vordergrund der Arbeit standen die durch direkte CD28-Stimulation aktivierten Signalwege und deren Vergleich zu den TZR-spezifischen Signalwegen. Bereits die nach den einzelnen Stimulationsarten unterschiedlich stark aktivierten MAPK zeigen, daß die direkte CD28-Stimulation weder TZR- noch Kostimulation direkt nachahmt. Da das Verhältnis zwischen den induzierten Signalwegen in den einzelnen Stimulationsansätzen verschieden ist, läßt sich die direkte CD28-Stimulation von TZR- oder Kostimulation unterscheiden und abgrenzen. Die vergleichende Untersuchung der membranproximalen Signalereignisse und der Inhibitorwirkung auf die Proliferation untermauerten diese Ergebnisse.

### **5.3 Viele Wege führen zu MAPK**

#### **5.3.1 p56 lck als „frühe“ Kinase**

Gemeinsam ist zunächst noch allen Stimulationsansätzen die Wichtigkeit von src-Kinasen. So unterdrückte Hemmung von src-Kinasen durch einen spezifischen Inhibitor bei allen Stimulationsprotokollen die Proliferation. Wie bereits angesprochen, könnte dieser Effekt auch auf einer toxischen Wirkung des Inhibitors beruhen. Allerdings wirkte in einem Kinase-Assay der Inhibitor im eingesetzten Konzentrationsbereich nach PMA/Iono-Stimulation nicht toxisch, weshalb die Reduktion der Proliferation durch src-Kinasen-Inhibitoren mit großer Wahrscheinlichkeit ein spezifischer Effekt ist.

*In vitro*-Kinase-Assays zeigten direkt, daß die src-Kinase lck sowohl nach TZR- als auch Ko- und direkter CD28-Stimulation aktiviert wird. Dies weist auf die zentrale Rolle hin, die src-Kinasen in den ersten Schritten der Rezeptor-vermittelten Zellaktivierung unabhängig von der Art der Stimulation spielen. So ist p56 lck eine der ersten Kinasen, die nach TZR-Ligation aktiviert werden (Wange und Samelson, 1996); ebenso wird lck aber auch durch CD2- oder CD45-Ligation aktiviert (Danielian et al., 1992). lck kann mit CD28 interagieren (King et al., 1997; Holdorf et al., 1999) und sowohl andere Kinasen als auch Zytoskelettbestandteile phosphorylieren (Ostergaard et al., 1998; Harder und Simons, 1999). Da lck nicht spezifisch für den TZR ist und zahlreiche Signalwege beeinflußt, bedeutet lck-Aktivierung nach direkter CD28-Stimulation noch nicht gleiche Signalweiterleitung wie nach TZR-Stimulation.

### 5.3.2 Bedeutung des Zytoskeletts

Interessant jedoch ist, daß in allen Stimulationsansätzen die lck-Aktivierung durch Einsatz eines Inhibitors der Aktinpolymerisierung, Cytochalasin D, verhindert werden konnte. Bei Aktivierung einer T-Zelle durch Interaktion mit dem MHC-Peptid-Komplex auf einer APZ orientieren sich Rezeptoren der T-Zellen zu der Kontaktstelle hin und bilden die sogenannte „Capstruktur“ aus, eine asymmetrische Anordnung von Rezeptoren auf einer Seite der Zelle (Penninger und Crabtree, 1999). Neben den Rezeptoren werden auch Membranmikrodomänen umgelagert und akkumuliert, die zahlreiche Signaltransduktionsmoleküle enthalten. Durch die Umstrukturierung der Membran und der Rezeptorumgebung werden aktivierungsfördernde Moleküle in die Nähe der Rezeptoren gebracht, während inhibitorische Faktoren aus der Kontaktzone ausgeschlossen werden.

Voraussetzung für alle Umlagerungs- und Transportprozesse ist ein funktionelles Zytoskelett, ohne das Zellaktivierung nicht mehr möglich ist (Huby et al., 1998; Penninger und Crabtree, 1999). Dies könnte den Einfluß von Cytochalasin D auf die lck-Aktivierung erklären: Ohne Zytoskelettumlagerungen werden Moleküle, die lck-Aktivität induzieren können, nicht mehr mit lck zusammengebracht. Ein solches Molekül ist vermutlich die Phosphatase CD45, die durch Dephosphorylierung des inhibitorischen Tyrosins von lck die „offene“ Form von lck induzieren kann, in der die Kinase mit ihrer SH2-Domäne an andere tyrosinphosphorylierte Proteine bindet und so aktiviert wird (Sieh et al., 1993). Gleichzeitig könnten weitere Moleküle umgelagert werden, die prolinreiche Sequenzen bereitstellen. Bindung von lck mit seiner SH3-Domäne an Proline unterstützt ebenfalls die Aktivierung von lck (Holdorf et al., 1999).

Da lck-Aktivität von Aktinpolymerisierung abhängig ist, muß der mitogene CD28-spezifische Antikörper in der Lage sein, Umlagerung des Zytoskeletts bzw. Aktinpolymerisierung zu induzieren. Dies konnte auch direkt durch die Anfärbung von naszierendem F-Aktin mit Phalloidin nach Stimulation mit dem mitogenen CD28-spezifischen mAb bestätigt werden (C.-H. Lin, persönliche Mitteilung). Auch in der Kostimulation ist CD28 in der Lage und notwendig, um sowohl zytoskelettabhängige Transportprozesse als auch Umlagerungen von Membranmikrodomänen zu induzieren (Wulfig und Davis, 1998; Viola et al., 1999).

### 5.3.3 Analyse der lck-Substrate TZR $\zeta$ und ZAP-70

#### Indizien gegen eine indirekte Aktivierung des TZR-Komplexes

Ein Kernpunkt bei der Analyse der zu den MAPK führenden Signalwege war die Frage nach der Beteiligung des TZR-Komplexes an der direkten CD28-Stimulation.

Der Nachweis des Status der TZR-zeta-Ketten gelang selbst nach TZR-Stimulation nicht zweifelsfrei, vermutlich wegen zu geringer Affinität der zur Verfügung stehenden zeta-spezifischen Antikörper für die phosphorylierten Formen der zeta-Kette. ZAP-70, eine TZR-spezifische Syk-Kinase und damit ein Indikator für TZR-Ligation (Gelfand et al., 1995), war sowohl nach TZR- als auch Kostimulation (letzteres nicht gezeigt) phosphoryliert, nicht aber nach direkter CD28-Stimulation. Diese fehlende Phosphorylierung von ZAP-70 läßt den Rückschluß zu, daß die zeta-Ketten nach direkter CD28-Stimulation nicht ausreichend phosphoryliert sind, um ZAP-70 Bindung und anschließende Phosphorylierung durch src-Kinasen zu ermöglichen.

ZAP-70 spielt eine zentrale Rolle in der T-Zellaktivierung: ZAP-70 Defizienz führt in Mäusen zu einem völligen Block in der T-Zellentwicklung (Negishi et al., 1995). Im Menschen lösen Mutationen im ZAP-70-Gen, die die Expression von funktionellem ZAP-70 verhindern, schwere Immundefizienz aus, verursacht durch gestörte Entwicklung der CD8 T-Zellen und Defekte der TZR-Signalgebung reifer CD4 T-Zellen (Arpaia et al., 1994; Chan et al., 1994; Elder et al., 1994; Gelfand et al., 1995). Aus diesem Grund ist es erstaunlich, daß die direkte CD28-Stimulation ohne ZAP-70 auszukommen scheint, da auch nach längerer Stimulation keine ZAP-70-Phosphorylierung nachweisbar ist. Dies läßt sich als eindeutiger Hinweis dafür verstehen, daß die direkte CD28-Stimulation sich nicht der TZR-Maschinerie bedient, um die Zellen zu aktivieren.

Es läßt sich nicht ausschließen, daß die zweite Syk-Kinase in T-Zellen, Syk, nach direkter Stimulation aktiviert ist und die Funktion von ZAP-70 übernimmt. Dies ist allerdings unwahrscheinlich, da Syk Immundefekte bei ZAP-70-Defizienz nicht verhindern kann und Syk-defiziente  $\alpha\beta$  T-Zellen keine Defekte in der Signaltransduktion aufweisen (Turner et al., 1995). Aus diesen Gründen scheint Syk im Gegensatz zu B-Zellen für die Signaltransduktion der  $\alpha\beta$  T-Zellen nur eine untergeordnete oder keine Rolle zu spielen, weswegen nicht zu vermuten ist, daß die direkte CD28-Stimulation Syk anstelle von ZAP-70 benutzt. Dennoch ließe sich diese Frage nur mit der direkten Analyse des Phosphorylierungsstatus von Syk nach direkter CD28-Stimulation beantworten.

#### **5.3.4 Untersuchung der ZAP-70-Substrate LAT und SLP-76**

Mit der fehlenden ZAP-70-Phosphorylierung nach direkter CD28-Stimulation stimmt überein, daß zwei weitere, für die TZR-Signaltransduktion unentbehrliche Adaptermoleküle und Substrate von ZAP-70, LAT und SLP-76, nach Zellaktivierung mit dem mitogenen CD28-spezifischen Antikörper nicht oder kaum phosphoryliert sind. Nach TZR-Ligation konnte, wie erwartet, die Phosphorylierung dieser Proteine

gezeigt werden. Sowohl LAT als auch SLP-76 Defizienz oder stark reduzierte Mengen der beiden Proteine in der Tumorzelllinie Jurkat unterbinden die TZR-Signaltransduktion (Finco et al., 1998; Yablonski et al., 1998; Zhang et al., 1999b).

In den hier beschriebenen Versuchen wurden beide Moleküle mit einem GST-Grb-2-Fusionsprotein präzipitiert. Die Interaktion von LAT und Grb-2 erfolgt über die SH2-Domäne von Grb-2. Da SH2-Domänen Spezifität für phosphorylierte Tyrosine besitzen, sollte die Bindung von LAT an Grb-2 phosphorylierungsabhängig sein, d. h. unphosphoryliertes LAT sollte sich nicht mit dem Fusionsprotein präzipitieren lassen. Allerdings zeigt sich, daß auch in unstimulierten Zellen, in denen LAT, wie im Phosphotyrosin-Blot sichtbar, nicht phosphoryliert ist, LAT präzipitiert wird. Möglicherweise unterscheiden sich die Bedingungen in diesem *in vitro* System von den *in vivo* herrschenden. So könnte das Fusionsprotein in seiner Konformation nicht genau mit dem nativen Grb-2 übereinstimmen, so daß auch ohne Phosphorylierung eine Interaktion von LAT und GST-Grb-2 möglich ist. Da mit einem LAT-spezifischen Antiserum die Identität des präzipitierten Proteins als LAT nachgewiesen wurde, sind die Ergebnisse trotz der Diskrepanz zwischen Fusionsprotein und nativem Protein interpretierbar. Die Bindung von SLP-76 an GST-Grb-2 erfolgt über die SH3-Domäne von Grb-2 und ist damit unabhängig von SLP-76-Phosphorylierung. Es entspricht daher der Erwartung, daß auch aus unstimulierten Kontrollzellen SLP-76 mit Hilfe des Fusionsproteins präzipitiert wird.

Die schwache Phosphorylierung von LAT nach 60 min direkter CD28-Stimulation scheint für die Induktion nachgeordneter Signalwege wie JNK nicht entscheidend, da diese zu diesem Zeitpunkt bereits voll aktiviert sind. Es ist unklar, welche Kinase diese leichte Phosphorylierung auslöst, da ZAP-70, die normalerweise diese Aufgabe übernimmt, nicht aktiviert ist. In transfizierten Zellen kann Syk sowohl LAT als auch SLP-76 phosphorylieren, während Ick nur minimale LAT und keinerlei SLP-76-Phosphorylierungen auslöst (Wardenburg et al., 1996; Zhang et al., 1998). Ob Syk, Ick, ITK/Tec oder andere, möglicherweise noch unbekannte Kinasen in primären Rattenzellen diese Rolle übernehmen, bleibt Spekulation.

In Jurkatzellen existieren widersprüchliche Daten hinsichtlich des Einflusses von CD28 auf LAT: (Nunes et al., 1996) konnten keine LAT-Phosphorylierung durch Ligation von CD28 mit mAb nachweisen, (Tsuchida et al., 1999) konnten mit CD28 mAb LAT-Phosphorylierung ohne Erhöhung der basalen ZAP-70-Phosphorylierung induzieren. In beiden Fällen werden die Zellen durch die CD28-spezifischen Antikörper aber nicht über das für eine Leukämiezelllinie übliche Maß weiter aktiviert; so werden z. B. keine Zytokingene induziert.

Die starke Aktivierung von T-Zellen ohne LAT- und SLP-76-Beteiligung durch den mitogenen CD28-spezifischen mAb in der Ratte scheint in klarem Gegensatz zu den

erwähnten Befunden zu stehen, nach denen bereits reduzierte LAT- und SLP-76-Mengen die Zellaktivierung unterbinden. Allerdings gilt dies in Systemen, in denen die Zellaktivierung durch TZR-Ligation ausgelöst wurde. Die hier erzielten Ergebnisse zeigen, daß LAT- und SLP-76-Phosphorylierung zumindest nicht generell für die Induktion der frühen zur T-Zellaktivierung führenden Ereignisse nötig ist: Sobald der TZR-Signalkomplex umgangen wird, etwa dadurch, daß CD28 zu mitogenen Signalen angeregt wird, kann die Aktivierung der MAPK auch ohne LAT- und SLP-76-Phosphorylierung erfolgen.

Die fehlende oder schwache Phosphorylierung TZR-spezifischer Signalmoleküle nach direkter CD28-Stimulation unterstützt die auf der schwachen ERK-Aktivierung basierende Interpretation, daß mitogene CD28-Signale nicht vollständig die TZR-Signale imitieren, sondern sich von diesen unterscheiden. Allerdings läßt die Hemmung der Proliferation nach direkter CD28-Stimulation durch Blockierung der ERK-Aktivierung vermuten, daß trotz der schwachen Phosphorylierung ERK auch für die Proliferation in diesem System wichtig ist.

Weiterhin scheint ERK in der direkten CD28-Stimulation nicht mit Hilfe der Adapterproteine LAT und SLP-76 aktiviert zu werden, da die schwache ERK-Phosphorylierung bereits vor der ebenfalls schwachen LAT- und SLP-76-Phosphorylierung sichtbar ist. Es bleibt im Bereich der Spekulation, wie ERK in der direkten CD28-Stimulation aktiviert wird. Da ein PI3-K-spezifischer Inhibitor die Proliferation nach direkter Stimulation inhibierte, scheint PI3-K unverzichtbar für die direkte CD28-Stimulation zu sein. Dies betrifft vermutlich nicht die späten, durch autokrine Faktoren wie IL-2 induzierten Signalwege, da in diesem Fall auch die Kostimulation von der PI3-K-Inhibition betroffen sein müßte, sondern eher die primären Aktivierungsschritte. Denkbar wäre ein Weg von PI3-K zu ERK: Durch PI3-K vermittelte Rac-Aktivierung kann die Proteinkinase PAK3 induziert werden, die ihrerseits Raf-1-Aktivität über Serinphosphorylierung auslöst (King et al., 1998); dies könnte ERK-Aktivierung ermöglichen ohne membranproximale TZR-Ereignisse. In Übereinstimmung mit der ERK-Aktivierung ohne Beteiligung früher TZR-Ereignisse steht der Befund, daß der CD28-Gegenspieler CTLA-4, ein Negativregulator in T-Zellen, ERK- ebenso wie JNK-Phosphorylierung unterdrücken kann, ohne die Phosphorylierung der TZR-zeta-Ketten und von ZAP-70 zu beeinflussen (Calvo et al., 1997). Der genaue Angriffspunkt der CTLA-4 Effekte ist nicht bekannt, könnte aber die GTPase p21 Ras sein, die dem TZR nachgeordnet ist und sowohl auf ERK als auch JNK Einfluß nehmen kann (Rayter et al., 1992; Su und Karin, 1996). GTPasen könnten auch in der direkten CD28-Stimulation eine Rolle spielen, um unter Umgehung der TZR-assoziierten Moleküle MAPK zu aktivieren.

Neben ZAP-70, LAT, SLP-76 und ERK weist die Beteiligung der PI3-K auf unterschiedliche Aktivierungswege nach Ko- und direkter CD28-Stimulation hin. Wie bereits erwähnt, scheint die PI3-K in der direkten CD28-Stimulation wichtig zu sein, da ihre Hemmung die durch direkte CD28-Stimulation ausgelöste Proliferation negativ beeinflusst; dies ist nach Kostimulation nicht der Fall. Letzteres ist in Übereinstimmung mit neueren Ergebnissen von PI3-K p85 $\alpha$  defizienten Mäusen, in denen die Proliferation der T-Zellen nach Kostimulation ebenfalls nicht vermindert war (Fruman et al., 1999). Allerdings könnten hier andere Adapterisoformen das Fehlen von PI3-K p85 $\alpha$  ausgeglichen haben. Die Abhängigkeit der durch Kostimulation induzierten Proliferation von PI3-K ist in der Literatur umstritten (siehe Einleitung), im Rattensystem scheint es allerdings diesem Versuch zufolge keine Abhängigkeit zu geben. Demgegenüber benötigt die durch direkte CD28-Stimulation ausgelöste Proliferation PI3-K. Vermutlich liegt ein weniger redundantes System als in der Kostimulation vor, in dem PI3-K-Inhibition nicht durch alternative Moleküle ausgeglichen werden kann. Möglich wäre eine Verbindung von PI3-K über Akt/PKB und p70S6Kinase zu dem Zellzyklusregulator E2F, wie sie für den IL-2-Rezeptor beschrieben ist (Brennan et al., 1997; Brennan et al., 1999). E2F könnte an der Induktion der Proliferation in der direkten CD28-Stimulation beteiligt sein.

Sowohl über die Rolle der MAPK p38 als auch von Calcium in den unterschiedlichen Stimulationsbedingungen lassen sich keine gesicherten Aussagen anhand der Proliferationsversuche machen.

Höhere Konzentrationen des p38-Inhibitors und des Calcium-Chelators EGTA wirken toxisch auf die Zellen; der fehlende Einfluß bei niedrigeren Konzentrationen könnte bedeuten, daß weder p38 noch Calcium für die Proliferation absolut essentiell sind, könnte aber auch durch die Wirkungslosigkeit der Substanzen bei diesen niedrigen Konzentrationen erklärt werden. Diese Frage nach der Rolle von p38 und Calcium in den einzelnen Stimulationsansätzen kann anhand der Inhibition der Proliferation nicht geklärt werden, da eine positive Kontrolle der Inhibitorwirkung augenblicklich nicht möglich ist: Im Gegensatz zu p38-Phosphorylierung ist noch kein Test für den Nachweis von p38-Aktivität im Labor etabliert. Direkte Calcium-Messungen erfordern ein Suspensionssystem, während die direkte CD28-Stimulation in Plastikschalen mit immobilisierten Zellen durchgeführt wird. Hinsichtlich der Rolle von Calcium läßt sich allerdings anfügen, daß sowohl Kostimulation als auch direkte CD28-Stimulation insensitiv für CSA sind (Tacke, 1995), einem Inhibitor der Phosphatase Calcineurin. Danach scheint der calciumabhängige NFAT-Aktivator Calcineurin und damit NFAT zumindest für die Proliferation nicht essentiell zu sein.

Bestätigt wird dies durch im Vergleich zu Kostimulation nur geringe und transiente NFAT-Aktivierung nach direkter CD28-Stimulation (T. Hara, persönliche Mitteilung, Bischof et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Dies schließt jedoch nicht aus, daß direkte CD28-Stimulation Calciumflux auslöst, dessen Nachweis aber aus den oben angesprochenen Schwierigkeiten mit dem Stimulationssystem noch nicht gelang.

#### **5.4 Aktivierung des Signalintegrators JNK durch direkte CD28-Stimulation**

Die Analyse der MAPK p38 und JNK zeigte, daß mitogene CD28-Signale das gesamte Spektrum der MAPK in T-Zellen aktivieren können. Ob und wie sich die Aktivierungswege zu p38 nach TZR- oder CD28-Ligation unterscheiden, kann zum augenblicklichen Zeitpunkt nicht gesagt werden, da entsprechende Inhibitorversuche für die p38-Aktivierung nicht durchgeführt wurden.

Wegen der Abhängigkeit der JNK-Aktivierung von CD28 in der Kostimulation ist die Aktivierung dieses Signalintegrators durch mitogene CD28-Signale von besonderem Interesse und eröffnet die Möglichkeit, den Signalweg von JNK zu CD28 zurückzuverfolgen.

Deutliche Unterschiede in der Empfindlichkeit der JNK-Aktivität gegenüber verschiedenen pharmakologischen Inhibitoren in Abhängigkeit vom Stimulationsprotokoll bestätigen, daß in der Stimulation mit mitogenem CD28-spezifischen mAb andere Signalwege benutzt werden als nach TZR- und Kostimulation.

Die JNK-Aktivierung durch mitogene CD28-Signale ist abhängig von src-Kinasen. Der lck-spezifische Inhibitor Emodin inhibiert JNK-Aktivität nach Kostimulation und direkter CD28-Stimulation in einer Konzentration von 50µM fast völlig, 20µM Emodin reduzieren JNK-Aktivität nach Kostimulation, nicht aber nach direkter CD28-Stimulation. Geht man davon aus, daß die reduzierte JNK-Aktivität bei der hohen Konzentration von 50µM auf toxische Effekte zurückzuführen ist, hat die spezifische Hemmung von lck mit 20µM Emodin keinen Einfluß auf die direkte Stimulation, verhindert aber JNK-Aktivität nach Kostimulation. Im Gegensatz dazu vermindert der Einsatz des src-Kinasen-Inhibitors PP1, der seine Wirkung sowohl auf lck als auch fyn ausübt, die JNK-Aktivität nach beiden Stimulationsarten. Dies würde bedeuten, daß die durch direkte CD28-Stimulation vermittelte JNK-Aktivität durch fyn induziert wird, während für die Kostimulation auch lck wichtig ist.

Weiterhin spielt PI3-K keine Rolle in der durch den mitogenen CD28-spezifischen mAb vermittelten JNK-Aktivität, während nach TZR-Beteiligung die JNK-Aktivierung von PI3-K abhängig wird. Vermutlich leistet der TZR einen PI3-K-

abhängigen Beitrag zur JNK-Aktivierung, der durch den mitogenen CD28-spezifischen Antikörper umgangen wird. Wo genau sich diese PI3-K-Abhängigkeit manifestiert bzw. wie sie in der direkten CD28-Stimulation vermieden wird, ist unklar.

Auch der Einfluß eines PKC-Inhibitors auf die JNK-Aktivität beweist die Verschiedenartigkeit der Signalwege nach unterschiedlicher Stimulation. Danach ist die direkte CD28-Stimulation weniger empfindlich gegenüber dem PKC-Inhibitor als die Kostimulation. Möglicherweise wird PKC besonders stark durch den mitogenen Antikörper aktiviert, so daß erst höhere Inhibitormengen einen Effekt ausüben. Obwohl bei der höchsten Inhibitorkonzentration die Zellen noch lebten, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die fast vollständige Unterdrückung der JNK-Aktivität durch 1µM des PKC-Inhibitors auf unspezifische Hemmung anderer Enzyme zurückzuführen ist. In diesem Fall wäre PKC an der Induktion von JNK in der direkten Stimulation überhaupt nicht beteiligt. Um genaue Aussagen über die Beteiligung von PKC und spezieller PKC-Isoformen an den einzelnen Stimulationswegen zu machen, müßte die PKC-Aktivität in den einzelnen Stimulationsansätzen bestimmt werden.

Der Einfluß des PKC-Inhibitors Gö6850, der die meisten PKC-Isoformen und auch PKC $\theta$  hemmt (Toullec et al., 1991; Martiny-Baron et al., 1993), auf die JNK-Aktivität wurde vor dem Hintergrund getestet, daß PKC $\theta$  und Calcineurin bzw. ein Calciumionophor in Jurkat T-Zellen synergistisch JNK aktivieren können (Avraham et al., 1998; Werlen et al., 1998; Ghaffari-Tabrizi et al., 1999). Diese PKC $\theta$  Funktion erfordert zumindest teilweise die GTPasen Rac und Ras (Ghaffari-Tabrizi et al., 1999). Außerdem ist die Aktivierung des IL-2 Promoters durch PKC $\theta$  zusammen mit einem Calciumionophor nachgewiesen (Ghaffari-Tabrizi et al., 1999). PKC $\theta$  wird vorrangig in T-Zellen exprimiert (Martiny-Baron et al., 1993) und findet sich membranständig im Kontaktbereich von T-Zelle und APZ nach Antigenstimulation (Monks et al., 1997; Monks et al., 1998). Aus diesen Gründen könnte PKC $\theta$  bei der direkten CD28-Stimulation und insbesondere der durch sie ausgelösten JNK-Aktivität eine Rolle spielen. Ob dies tatsächlich der Fall ist und zusammen mit Calcium erfolgt, wie obige Daten implizieren, läßt sich zu diesem Zeitpunkt nicht sagen. Inhibition von Calcineurin durch Cyclosporin A führte zu widersprüchlichen Ergebnissen hinsichtlich der CD28 vermittelten JNK-Aktivität. Nur in einigen Fällen wurde die JNK-Aktivität vermindert, in einem anderen Experiment blieb CSA ohne Einfluß (Daten nicht gezeigt).

Weniger auf die Verschiedenartigkeit der Signalwege als auf Querverbindungen zwischen den einzelnen Signalkaskaden weist der Befund hin, daß ein p38-Inhibitor die JNK-Aktivität fördert. Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, scheint ein Teil dieses Phänomens durch eine Stress-induzierte Aktivierung der JNK erklärbar, da der Anstieg auch in der unstimulierten Kontrolle nachweisbar ist. Möglicherweise hemmt aber zusätzlich p38 direkt oder indirekt die c-Jun Kinase, so daß der Wegfall dieser Hemmung erhöhte c-Jun-Phosphorylierung ermöglicht. Der p38-Weg scheint an der Th1-/Th2-Polarisierung der Immunreaktion und der Aktivierung von ausdifferenzierten Th1- bzw. Th2-Zellen beteiligt zu sein, wobei Unterschiede bei Maus und Mensch beschrieben sind (Schafer et al., 1999a). Durch eine solche Querverbindung zwischen zwei Kaskaden kann der eine Signalweg die Signalstärke der anderen Kaskade beeinflussen und damit die Balance zwischen beiden Signalen verändern. Dies könnte eine Rolle bei der Entscheidung zugunsten einer Th1- oder Th2-Immunreaktion spielen (s. u.).

### **5.5 CD28 als autonomer Signalgenerator**

In einer Reihe neuerer Veröffentlichungen wurde gezeigt, daß CD28 den TZR in seiner Signalgebung unterstützt, indem CD28 TZR-Signale verstärkt und verlängert (Tuosto und Acuto, 1998; Salojin et al., 1999; Viola et al., 1999). Von einigen Autoren wird dabei die Funktion von CD28 als die eines Adhäsionsmoleküls angesehen (Shaw und Dustin, 1997), das den Kontakt zwischen T-Zelle und APZ stabilisiert, oder als die eines Hilfsmoleküls, das den TZR unterstützt und nur im Zusammenhang mit dem TZR und über ihn seine Funktion ausüben kann, aber keinen eigenen, vom TZR unabhängigen Beitrag zur T-Zellaktivierung leistet. Die vorliegende Arbeit zeigt, daß CD28 über seine dem TZR zuarbeitende Aktivität hinaus auch eigenständig mitogene Signale generieren kann. Da der mitogene CD28-spezifische mAb ruhende T-Zellen auch ohne TZR-Ligation und unter Umgehung früher TZR-Ereignisse wie ZAP-70-Phosphorylierung aktivieren kann, scheint ein autonomer CD28-spezifischer Aktivierungsweg zu existieren. Ob diese autonomen CD28-Signale vollkommen unabhängig von der TZR-Maschinerie sind, ließe sich nur in Zellen ohne TZR zeigen, in denen die direkte CD28-Stimulation gleich starke Proliferation und IL-2 Produktion wie in TZR-positiven Zellen auslösen müßte. Leider standen solche primären TZR-negativen Zellen bei Anfertigung der Arbeit noch nicht zur Verfügung, so daß offen bleibt, ob die direkte CD28-Stimulation völlig unabhängig vom TZR ist.

Einen interessanten Hinweis auf eine Zweiteilung der CD28-Signale in einen vom TZR abhängigen und einen unabhängigen Zweig lieferten aber kürzlich auf einem

Kongreß vorgestellte Daten (Sirim et al., 1999). Fusionsproteine aus den extrazellulären Domänen des humanen IgG1-Moleküls und dem intrazellulären Anteil von CD28 können nach Kreuzvernetzung der extrazellulären Domänen Calciumflux in Jurkatzellen auslösen. In TZR-negativen Jurkatzellen (J.RT3-T3.5) ist immer noch Calciumflux induzierbar, aber in geringerem Maße als in Zellen mit TZR. Dies spricht dafür, daß das CD28-Signal partiell unabhängig vom TZR ist, volle Stärke erreicht die Signalgebung aber erst durch das Zusammenwirken der unabhängigen mit den abhängigen Komponenten.

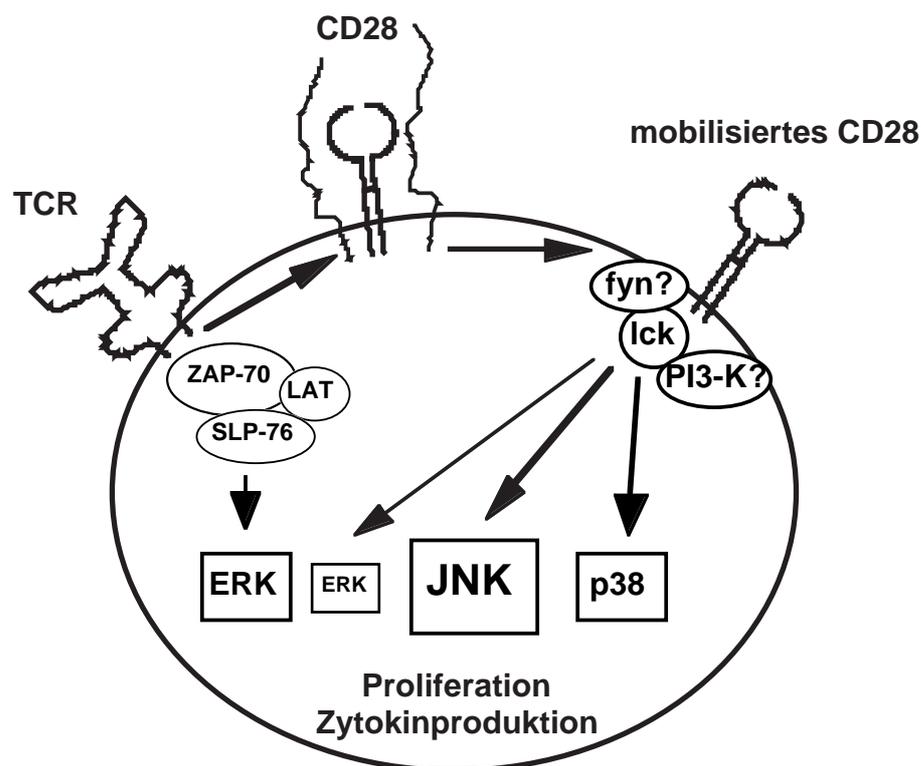
Ähnlich läßt sich eine Studie interpretieren, nach der in Jurkatzellen TZR und CD28 synergistisch p38 und JNK via ZAP-70, Vav, Rac1 und PAK1 aktivieren (Salojin et al., 1999). Dort ist auch in ZAP-70 defizienten Zellen sowie bei Blockierung von Vav durch antisense-Oligonukleotide noch, wenn auch vermindert, JNK Aktivierung möglich. Auch dies deutet auf einen zweiten von ZAP-70 (und Vav) unabhängigen Weg der CD28-vermittelten JNK-Aktivierung hin. Die hier vorgestellten Ergebnisse, zusammen mit der in T-Zellklonen gezeigten Verstärkung des TZR-Signals durch CD28, weisen darauf hin, daß diese Zweiteilung des CD28-Signals auch in primären Zellen ihre Gültigkeit hat.

### **5.6 Zwei-Schritt-Modell der Kostimulation**

Die Stimulation mit dem mitogenen CD28-spezifischen mAb stellt an sich ein artifizielles System dar, das unter physiologischen Bedingungen so nicht verwirklicht ist. Allein durch CD28 vermittelte Zellaktivierung umginge die Antigen-spezifität der T-Zellantwort und trüge somit die Gefahr von Autoimmunerkrankungen in sich. Dennoch läßt das System einige Rückschlüsse zu auf die unter physiologischen Bedingungen vor sich gehende Zusammenarbeit von TZR und CD28. Wie bereits erwähnt, bindet der mitogene CD28-spezifische mAb mit einer sehr langsamen Bindungskinetik an sein Epitop, im Gegensatz zum konventionellen CD28 mAb, der rasch bindet. Gleichzeitige TZR-Ligation beschleunigt die Bindung des mitogenen mAb erheblich (C.-H. Lin, persönliche Mitteilung, Bischof et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Dieses Phänomen ließe sich mit einer Mobilisierung von CD28 durch den TZR erklären. Denkbar wäre ein durch das Zytoskelett vermittelter Umbau der Umgebung von CD28, durch den negativ-regulierende oder große Moleküle ausgeschlossen werden (Shaw und Dustin, 1997), wie etwa CD43 (Sperling et al., 1998), das ein sterisches Hindernis bei der Besetzung von CD28 durch seine natürlichen Liganden darstellen könnte. In Übereinstimmung mit dem Segregationsmodell der T-Zellaktivierung (Shaw und Dustin, 1997) könnte auch die Anordnung von Kinasen und Phosphatasen in der

Nähe von CD28 so verändert werden, daß aktivierungs-fördernde Einflüsse auf CD28 und assoziierte Signalmoleküle nicht sofort durch Negativregulation rückgängig gemacht werden. Der genaue Prozess der Mobilisierung von CD28 liegt noch im dunkeln, kann aber offenbar durch den mitogenen CD28-spezifischen mAb in Gang gesetzt werden. Dieser mAb scheint die auf ruhenden T-Zellen wenig verfügbare Form von CD28 zu erkennen, die mitogene Signale generieren kann. In einem Prozess, der Aktinpolymerisierung erfordert, kann der Antikörper selbst die Mobilisierung von CD28 induzieren.

Nach unserer Hypothese vermittelt unter physiologischen Bedingungen die Interaktion des TZR mit dem MHC-Peptid-Komplex in einem ersten Schritt die Mobilisierung von CD28, das dann in der Kostimulation bei Bindung an B7-1 oder B7-2 in einem zweiten Schritt mitogene Signale liefert. Diese CD28-spezifischen Signale beeinhalten die Aktivierung von lck und möglicherweise auch fyn sowie der MAPK JNK und p38, nutzen aber nicht die frühe TZR-Maschinerie wie ZAP-70, LAT und SLP-76 (Abb. 26).



**Abb. 26: Zwei-Schritt-Modell der Kostimulation**

Durch TZR-Ligation wird CD28 mobilisiert und damit in eine Form gebracht, die mitogene Signale generieren kann. Die CD28-spezifischen Signale aktivieren vor allem lck, JNK und p38, frühe TZR-Ereignisse sind nicht von Bedeutung. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Nach diesem Modell ist CD28 nicht nur in der Lage, Veränderungen des Zytoskeletts und Umlagerungen von Membranmikrodomänen zu induzieren (Wulfig und Davis, 1998; Viola et al., 1999), die die TZR-Signalgebung erleichtern, sondern auch zu autonomen mitogenen Signalen befähigt.

### **5.7 Bedeutung mitogener Signale für Th1-/Th2-Polarisierung**

Der Befund, daß CD28 eigenständig mitogene Signale generieren kann, ist wichtig im Hinblick auf die Entstehung einer Th1- oder Th2-gewichteten Immunantwort. Th1-Zellen produzieren hauptsächlich  $\text{IFN}\gamma$  und  $\text{TNF}\beta$  und sind an DTH (delayed type hypersensitivity)-Reaktionen beteiligt, während Th2-Zellen durch IL-4-, IL-5-, IL-10- und IL-13-Produktion gekennzeichnet sind und die humoralen Immunfunktionen fördern. Es ist inzwischen klar, daß die Stärke des TZR im Vergleich zum CD28-Signal über das Auslösen einer Th1- oder Th2-Immunantwort mitentscheidet (Rulifson et al., 1997; Tao et al., 1997; Schulze-Koops et al., 1998). Ein starkes CD28-Signal polarisiert dabei in Richtung einer Th2-Antwort, ein stärkeres TZR-Signal hemmt die Th2-Generierung und fördert eine Th1-gewichtete Reaktion. Befindet sich CD28 in der zur Signalgebung befähigten Form, übernimmt der TZR die Funktion eines antigen-spezifischen Reglers. Wird zu dem CD28-Signal noch eine starke TZR-Komponente beigemischt, entsteht eine Th1-Reaktion, bleibt der TZR-Beitrag gering, überwiegt die Th2-Antwort. In Übereinstimmung damit steht, daß der mitogene CD28-spezifische mAb, der den TZR-Weg in weiten Teilen umgeht und z. B. nur eine schwache ERK-Phosphorylierung auslöst, eine Th2-Polarisierung der T-Zellen induziert (Rodriguez-Palmero et al., 1999).

Auf Ebene der Signalkaskaden ließe sich das Phänomen der Th1-/Th2-Polarisierung durch unterschiedliche Balance und Verhältnisse der einzelnen Kaskaden zueinander erklären, die unterschiedliche Muster von Transkriptionsfaktoren und Genexpression auslösen.

### **5.8 Ausblick**

Die CD28-Signaltransduktion ist nach wie vor nur lückenhaft beschrieben. Der mitogene CD28-spezifische mAb ist ein hervorragendes Werkzeug, um den CD28-Signalweg ohne Einfluß von TZR-Ligation zu untersuchen. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit könnten insbesondere die Wege zu JNK- und p38-Aktivierung und die Rolle, die GTPasen wie Ras und Rac sowie Calcium und verschiedene PKC-Formen, besonders  $\text{PKC}\theta$ , dabei spielen, interessante Aufschlüsse geben. Weiterhin sind - unabhängig von den MAPK - noch die von PI3-K und ITK

bzw. Tec ausgehenden Signalwege zu untersuchen. Im Hinblick auf den Einfluß von PI3-K auf Zellzyklusregulatoren könnte besonders PI3-K in der direkten Stimulation von Bedeutung für die Induktion der Proliferation sein.

Von besonderem Interesse dürfte auch der Mechanismus der CD28-Mobilisierung durch den TZR sein. Dabei ergibt sich z. B. die Frage, ob CD28 durch TZR-Ligation in Membranmikrodomänen rekrutiert wird und damit - wie postuliert - CD28 in eine andere, für die Signalgenerierung förderliche Umgebung kommt.

Zur endgültigen Klärung der Frage, ob mitogene CD28-Signale unabhängig vom TZR sind, muß das Vorhandensein einer Zelllinie oder eines Tiermodells ohne TZR, die aber aktivierbar über den mitogenen CD28-spezifischen mAb ist, abgewartet werden. Bemühungen, eine konditionelle TZR-„knock-out“-Ratte oder eine transgene Maus mit Ratten-CD28 zu generieren, die mit einer TZR-defizienten Maus gekreuzt werden kann, sind im Gange.