

# 1. Einleitung

„Das Leben ist immer lebensgefährlich“ (Kästner), scheint im Hinblick auf die zahlreichen Bakterien, Viren, Parasiten und sonstigen Erreger, die den Menschen und andere Tiere befallen und Krankheiten auslösen können, eine nur zu wahre Aussage. Zur Verteidigung gegen diese Heerschar von Angreifern haben besonders Vertebraten ein sehr effizientes Immunsystem entwickelt, dessen Aufgabe in der Abwehr und Vernichtung v. a. fremder, schädlicher Organismen und Substanzen liegt. Zwei Verteidigungslinien wirken daran mit: Zum einen die angeborene Immunität mit physiologischen (z. B. pH-Wert) und anatomischen Barrieren (z. B. Haut), phagozytierenden Zellen, natürlichen Killer (NK)-Zellen und Entzündungsreaktionen, die eine eher unspezifische erste Abwehrfront bildet. Spezifische Erkennung von Fremdantigenen, zunehmende Effektivität während einer Immunantwort und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses charakterisieren zum anderen die adaptive Immunität. Zu den spezialisierten Zellen der erworbenen Immunität gehören die B- und T-Zellen.

## 1.1 B- und T-Zellen, Antigenpräsentation

B-Zellen, benannt nach der Bursa fabricii, ihrem Reifungsort bei Vögeln, wo sie zuerst entdeckt wurden, als Träger der humoralen Immunität erkennen native, nicht-prozessierte Antigene über den B-Zellrezeptor (BZR). Durch Sezernierung des löslichen Rezeptors (= Antikörper, Immunglobulin) markieren, agglutinieren und neutralisieren sie eingedrungene Fremdstoffe.

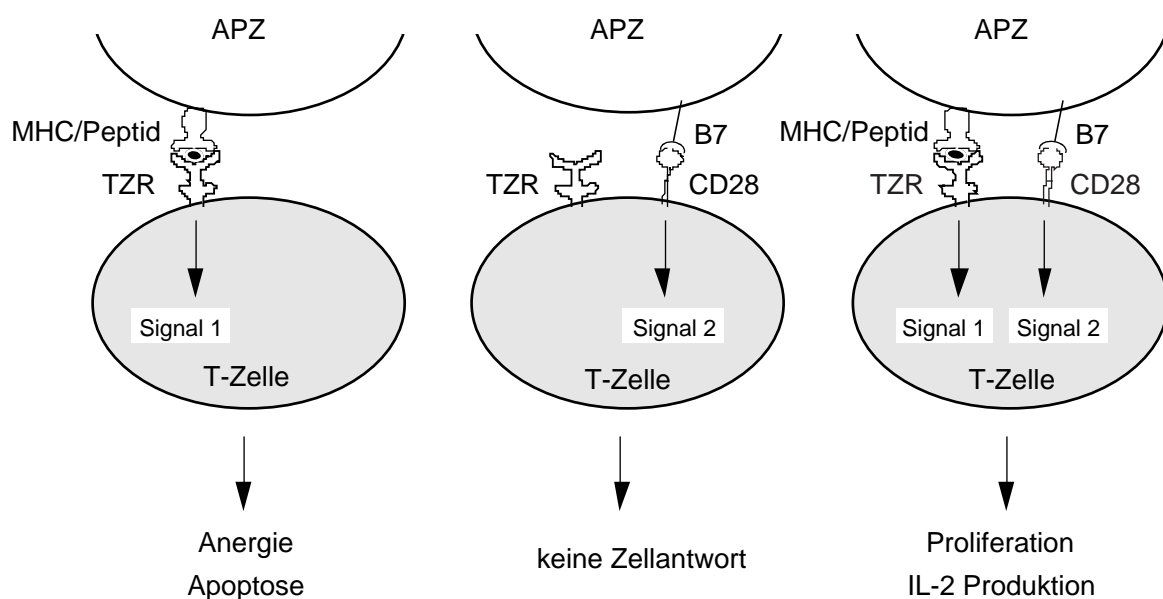
Die Antigenerkennung bei T-Zellen, ihr Reifungsort ist der Thymus, unterscheidet sich von der der B-Zellen. T-Zellen erkennen nur Antigen, das bereits prozessiert wurde und als Peptidfragment des ursprünglichen Antigens durch eine sogenannte Antigen-präsentierende Zelle (APZ) gebunden an die Produkte des Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (MHC = major histocompatibility complex) auf ihrer Oberfläche ausgestellt wird. T-Zellen binden an MHC-Peptid-Komplexe mit Hilfe ihres Rezeptors, des T-Zellrezeptors (TZR). Wichtig dabei ist, daß die T-Zellen nur durch die Kombination von Fremdpeptid auf Selbst-MHC aktiviert werden und die Stimulation durch Selbstpeptid auf Selbst-MHC verhindert wird, da dies zu Autoimmunerkrankungen führen würde. Um das Auftreten autoreaktiver Zellen zu unterbinden, gehen T-Zellen durch eine strenge Schule, den Thymus. Der Thymus gehört zu den Bereichen, in denen das Immunsystem scheinbar verschwenderisch mit seinen Ressourcen umgeht. Nur 3 - 5% der T-Zellvorläufer, die den Thymus erreichen, um hier ihre Entwicklung und Ausbildung zur reifen T-Zelle zu durchlaufen, verlassen diesen wieder und wandern in die Peripherie aus, wo sie in

der Blutbahn, den lymphatischen Organen und anderen Orten der Immunreaktion nach Aktivierung als CD4<sup>+</sup> T-Helferzelle oder zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zelle ihre Aufgaben erfüllen. Diese Verschwendung ist nur eine scheinbare: Durch negative Selektion werden diejenigen T-Zellen aus dem Verkehr gezogen, die Selbstpeptid-Selbst-MHC erkennen und sich somit potentiell gegen den Organismus selbst richten könnten; nach der positiven Selektion sind auch diejenigen T-Zellen eliminiert, deren Rezeptor an nichts bindet, die nutzlos sind.

## 1.2 T-Zellaktivierung, Kostimulation

Eine ähnliche Verschwendung wie im Thymus scheint bei der Aktivierung der T-Zellen zu herrschen, zu der nach der Zwei-Signal-Hypothese (Bretscher und Cohn, 1970) zwei Stimuli nötig sind. T-Zellen erkennen mit ihrem Rezeptor Peptid und MHC auf der APZ. Allein dieser antigenspezifische Kontakt ist jedoch nicht ausreichend, um die T-Zelle vollständig zu aktivieren. Gleichzeitig muß ein zweites, kostimulatorisches Signal erfolgen, um Proliferation und Effektorfunktionen wie Zytokinproduktion zu induzieren. Interaktion des TZR mit „seinem“ Antigen-MHC-Komplex ohne kostimulatorische Signale macht die T-Zelle unreaktiv für weitere Aktivierung, sie wird anergisch, oder leitet Apoptose, programmierten Zelltod, ein (Abb. 1a) (Jenkins und Schwartz, 1987; Mueller et al., 1989). Das antigenunabhängige, kostimulatorische Signal kann von löslichen Faktoren wie Interleukin (IL)-2 vermittelt werden oder aber von Rezeptoren, die Liganden auf den antigenpräsentierenden Zellen erkennen. Der wichtigste kostimulatorische Rezeptor ist CD28 (Hara et al., 1985). Es handelt sich dabei um ein 44kD großes Glykoprotein, das als Homodimer konstitutiv auf der Zelloberfläche von T-Zellen exprimiert wird. CD28 besitzt im extrazellulären Teil zwei Immunglobulindomänen, der zytoplasmatische Schwanz besteht aus 41 Aminosäuren (Aruffo und Seed, 1987). Über ein MYPPPY-Motiv (M=Methionin, Y=Tyrosin, P=Prolin) im extrazellulären Teil (Peach et al., 1994; Metzler et al., 1997) bindet CD28 an seine natürlichen Liganden B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86), die beide auf APZ exprimiert werden. B7-1 und B7-2 werden unterschiedlich reguliert: Während B7-2 konstitutiv exprimiert wird, wird B7-1 erst im Verlauf einer Immunreaktion hochreguliert (zusammengefaßt in June et al., 1994). Die beiden Liganden scheinen die Zytokinproduktion der Ziel-T-Zelle unterschiedlich zu regulieren und die Immunreaktion in verschiedene Richtungen zu beeinflussen (Freeman et al., 1995; Kuchroo et al., 1995; Lenschow et al., 1995; Slavik et al., 1999). Im Gegensatz zu TZR-Ligation ohne Kostimulation ist das antigenunabhängige kostimulatorische Signal allein ein neutrales Ereignis: die alleinige Bindung von CD28 an seine Liganden führt

unter physiologischen Umständen zu keiner Reaktion, die Zelle wird nicht aktiviert, aber auch nicht anergisch (Abb. 1b) (June et al., 1994). In der Kostimulation, also bei dem Zusammenwirken mit einem TZR-vermittelten Signal (Abb. 1c), senkt CD28 die Aktivierungsschwelle (Viola und Lanzavecchia, 1996), verlängert die Dauer der Zellantwort (Viola et al., 1999) und vermindert die Apoptoserate (Boise et al., 1995). Vermittelt werden diese Effekte u. a. durch verstärkte Transkription und Stabilität von Zytokin-mRNA, insbesondere von IL-2 und IL-4 (Fraser et al., 1991; Thompson, 1995; Chen et al., 1998). Die verlängerte Lebensdauer der Zelle wird durch verstärkte Expression anti-apoptotischer Gene wie *bcl-X<sub>L</sub>* erreicht (Boise et al., 1995), proliferationsfördernd wirken die Expression von G1-Zellzykluskinasen (Nagasawa et al., 1997; Brunner et al., 1999) und die Degradierung des Zellzyklusinhibitors p27Kip (Firpo et al., 1994; Brunner et al., 1999; Chambers und Allison, 1999).

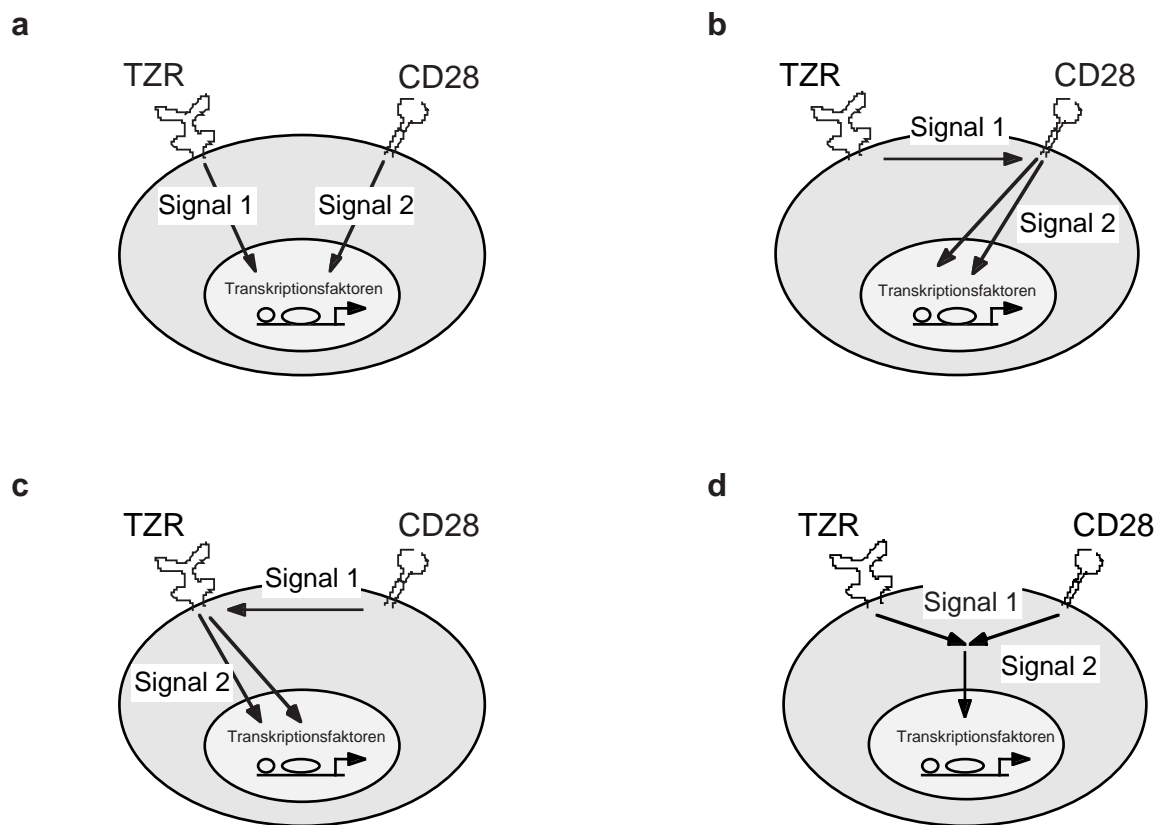


**Abb. 1: Mögliche Ergebnisse der Interaktion von T-Zelle und antigenpräsentierender Zelle (APZ)**

Die APZ präsentiert Antigen auf dem MHC und exprimiert Liganden aus der B7-Familie, die T-Zelle besitzt TZR und kostimulatorische Rezeptoren wie CD28. Abhängig von den an der Interaktion beteiligten Rezeptor-Liganden-Paaren kommt es zu unterschiedlichen T-Zellantworten.

Wie in der Kostimulation antigenspezifisches erstes und kostimulatorisches zweites Signal auf molekularer Ebene zusammenarbeiten, um die Zelle zur Proliferation und Zytokinproduktion anzuregen, ist nach wie vor Gegenstand intensiver Forschung. Prinzipiell gibt es verschiedene Möglichkeiten des Zusammenwirkens zweier Signale

(Abb. 2). Möglich wäre, daß beide Rezeptoren unterschiedliche, voneinander getrennte Signalwege ansprechen und im Zellkern unterschiedliche Transkriptionsfaktoren aktivieren, die gemeinsam für die Expression von Zytokinen notwendig sind (Abb. 2a). Weiterhin könnte der TZR Signale an CD28 geben, die von CD28 ausgehende Signalkaskaden aktivieren und steuern (Abb. 2b). Umgekehrt ist es denkbar, daß CD28 auf den TZR und dessen Signalketten Einfluß nimmt (Abb. 2c). Schließlich können zwei anfänglich getrennte Signale an einem oder mehreren Punkten zusammenkommen und - als integriertes Signal - zum Kern weitergeleitet werden (Abb. 2d).



**Abb. 2: Verschiedene Möglichkeiten des Zusammenwirkens zweier Signale zur Induktion von Transkriptionsfaktoren und Genexpression**

*Nähere Einzelheiten siehe Text.*

Im Falle von TZR und CD28 ist noch unklar, ob Möglichkeit a verwirklicht ist: Zwar wird die ERK-Kaskade (s.u.) allein durch TZR-Ligation aktiviert (Su et al., 1994), ob CD28 in gleicher Weise eigene Signale generiert und CD28-spezifische Transkriptionsfaktoren aktiviert - wie auch in b impliziert -, ist strittig und

Gegenstand dieser Arbeit. Wie in b beschrieben, bewirkt CD28-Besetzung nur bei gleichzeitiger TZR-Aktivierung eine Zellantwort; ob dies aber eigenständige Signaltransduktion beinhaltet, ist - wie erwähnt - unklar. Die dritte Möglichkeit ist in T-Zellen verwirklicht: CD28 unterstützt und verlängert frühe TZR-Signalevents (s.u.) (Tuosto und Acuto, 1998; Salojin et al., 1999; Viola et al., 1999). Eine besondere Bedeutung kommt der Signalintegration auf dem Niveau von MAPK (s.u.) insbesondere JNK (s.u.) in T-Zellen zu (d) (Su et al., 1994). Diese Signalintegration kann aber schon bei den MAPK vorgeschalteten Molekülen erfolgen (b oder c). Signalintegration ist prinzipiell auf mehreren Ebenen möglich: bereits auf der Ebene der Membran durch Umstrukturierung von Membranmikrodomänen, auf der Ebene der Signalkaskaden und bei den Transkriptionsfaktoren.

### 1.3 Membranumlagerungen und Mikrodomänen

Bei Aktivierung von T-Zellen erfolgt eine Umorientierung von Rezeptoren und Signalmolekülen an der Oberfläche des Lymphozyten zur Kontaktstelle mit der antigenpräsentierenden Zelle. Diese Polarisierung der für die Übermittlung der Information nötigen Elemente auf einer Seite der Zelle wird „Cap“ genannt. Neuere Untersuchungen zeigen, daß nach Aktivierung eine Segregation der Moleküle erfolgt und die an der Kontaktstelle ausgebildeten Strukturen hoch organisiert sind: Der zentrale Bereich enthält die die Signale aufnehmenden und generierenden Moleküle, wie TZR, CD3, CD28, p56 lck, p59 fyn und PKC $\theta$  (s.u.) und ist umgeben von einem Ring mit dem Adhäsionsmolekül LFA-1 und dem Zytoskelettprotein Talin (Monks et al., 1998). Für die Umlagerung der Rezeptoren und Signalmoleküle notwendig ist eine Beteiligung des Aktin-Zytoskeletts (Wulfing et al., 1998), das eine Bewegung des Mikrotubulus-organisierenden Zentrums und des Golgiapparates hin zur antigenpräsentierenden Zelle ermöglicht (Kupfer und Singer, 1989). Bereits TZR-Ligation allein löst Polymerisierung des Aktin-Zytoskeletts aus (DeBell et al., 1992). Kostimulation induziert Bewegungen des Zytoskeletts und der darin verankerten Rezeptoren (Wulfing und Davis, 1998).

Weiterhin sind spezielle Membran-Mikrodomänen bekannt, in denen zahlreiche Signalmoleküle angereichert sind und denen daher eine wichtige Funktion bei der Signaltransduktion zugeschrieben wird (Simons und Ikonen, 1997; Moran und Miceli, 1998). Während der Großteil der Plasmamembran aus Glycerophospholipiden besteht, beinhalten die etwa 70nm großen (Varma und Mayor, 1998) Mikrodomänen einen höheren Anteil an Cholesterin und Sphingolipiden. Diese Membranabschnitte sind dichter gepackt als die sonstige an Phospholipiden reiche Membran, sie weisen eine höhere Schmelztemperatur auf,

bedingt durch einen höheren Anteil an gesättigten Fettsäuren. In unstimulierten Zellen sind die Mikrodomänen, die aufgrund ihrer Unlöslichkeit in bestimmten Detergenzien auch als DRMs (detergent resistant membranes) oder DIGs (detergent insoluble glycosphingolipid enriched domains) bezeichnet werden, gleichmäßig in der Membran verteilt (zusammengefaßt in Harder und Simons, 1997; Xavier und Seed, 1999). CD28-Ligation führt zu einer Reorganisation der Mikrodomänen hin zum Kontaktbereich, zur immunologischen Synapse, zwischen T-Zelle und APZ (Viola et al., 1999). Auf diese Weise werden die in den Mikrodomänen enthaltenen und für die Signaltransduktion essentiellen Moleküle, wie die src-Kinasen lck und fyn, CD4 und LAT (s.u.), in die Nähe der Rezeptoren und ihrer Substrate gebracht. In der Tat verlängert sich als Effekt der Umverteilungsprozesse die Dauer der TZR-vermittelten Phosphorylierungen und der lck-Aktivität (Viola et al., 1999). Eine Blockierung oder Störung der Umstrukturierung führt zur Inhibition der TZR-vermittelten Zytoskelettlagerung und der TZR-Signale (Xavier et al., 1998).

Diese Reorganisation bringt nicht nur wichtige Signalmoleküle miteinander in Kontakt, zusätzlich werden auch Moleküle, die die Interaktion der beiden Zellen durch ihre Größe behindern könnten, aus der Kontaktzone verdrängt. Völlig ausgeschlossen wird so z. B. das im Vergleich zum TZR mindestens sechsmal größere CD43-Molekül, das eine sterische Hinderung für den Kontakt von TZR und MHC-Molekül darstellen kann (Sperling et al., 1998). Umstritten ist noch die Rolle der Phosphatase CD45, die für die Aktivierung von lck notwendig ist, andererseits durch ihre Phosphataseaktivität aber auch aktivierungsfördernde Phosphorylierungen von lck rückgängig machen kann (Thomas, 1999). Da sie sich auch im Kontaktbereich befindet (Sperling et al., 1998), aber nicht in Mikrodomänen wandern kann (Rodgers und Rose, 1996), wurde zunächst vermutet, daß sie nicht in der Nähe der ligandengebundenen TZR-Moleküle lokalisiert ist (Thomas, 1999) bzw. Kolo-kalisation mit dem Rezeptor zumindest hemmend auf die Signaltransduktion wirken sollte (Shaw und Dustin, 1997). Inzwischen ist aber gezeigt, daß bestimmte CD45-Isoformen mit kleinen extrazellulären Domänen mit dem TZR assoziieren und dies aktivierungsfördernd ist (Leitenberg et al., 1999). Möglicherweise gehören nur die CD45-Isoformen mit großen extrazellulären Domänen zu den Molekülen, die aus dem Kontaktbereich von T-Zellen und APZ ausgeschlossen werden.

Die Zusammenarbeit von TZR und CD28 auf Membranebene führt also zur Mobilisierung des Zytoskeletts und Umlagerung bestimmter Membrandomänen, die eine Plattform zur Ansammlung von Signalmolekülen bieten und lang anhaltende Signalweitergabe gewährleisten.

Eine weitere Zusammenarbeit von TZR und CD28 erfolgt auf dem Gebiet der Signalkaskaden.



## 1.4 Signaltransduktionskaskaden

Durch Bindung des natürlichen Liganden oder - nachgestellt im experimentellen System - durch Bindung eines spezifischen Antikörpers werden Transmembranrezeptoren wie TZR oder CD28 aktiviert. Da die Rezeptoren in vielen Fällen keine eigene (intrinsische) Enzymaktivität besitzen, müssen sie nachgeschaltete Enzyme aktivieren. Diese wiederum sind im aktiven Zustand in der Lage, durch Protein-Protein-Wechselwirkungen andere Enzyme, Adapterproteine und weitere Elemente einer Signalkaskade anzusprechen, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und DNA-Transkription führen.

### 1.4.1 Motive, Domänen: ITAM, SH2, SH3, PH

Die Weiterleitung von Signalen von der Zelloberfläche in den Kern ist gekennzeichnet durch Protein-Protein-Wechselwirkungen. Für die Interaktion der Proteine sind verschiedene Strukturmodule und Domänen ausgebildet, die in vielen an der Signalweiterleitung beteiligten Molekülen wiederkehren. Sowohl in den signaltransduzierenden Einheiten des BZR als auch des TZR und der Rezeptoren für den konstanten Teil von Antikörpern (FcεI und FcγIII) finden sich ITAMs (= immunoreceptor based tyrosine activation motifs). Diesen gemeinsam ist ein doppeltes Tyrosin (Y)- und Leucin(L)motiv (YXXL), das unterbrochen wird von einem Einschub aus sechs bis acht Aminosäuren. Im Ein-Buchstaben-Aminosäuren-Code sieht ein ITAM folgendermaßen aus: D/EYXXL(X)<sub>6-8</sub>YXXL, wobei D für Asparaginsäure, E für Glutaminsäure steht und X eine beliebige Aminosäure beschreibt. Tyrosinphosphorylierte ITAMs bieten Bindungsstellen für Proteine mit SH2-Domänen (zusammengefaßt in Cantrell, 1996; Chan und Shaw, 1996).

SH2-Domänen sind die am besten untersuchten Proteinmodule mit regulatorischer Funktion. Sie wurden zuerst als Sequenzmotiv in der ersten bekannten Tyrosinkinase src (damals gefunden in Retroviren von Hühnern) erkannt, daher der Name „SH“ von src-Homolog. SH2-Domänen erkennen und binden spezifisch phosphorylierte Tyrosinreste in Zielproteinen. Das gemeinsame Strukturprinzip von SH2-Domänen ist eine konservierte, von basischen Resten umgebene Tasche, die die Bindung an phosphorylierte Tyrosine vermittelt. Substratspezifität erlangen Proteine mit SH2-Domänen durch die variierende Bindungsstelle für die Sequenz carboxyterminal des Tyrosinrestes (zusammengefaßt in Cohen et al., 1995; Pawson, 1995).

Bindung von Phosphotyrosin kann SH2-haltige Proteine an der Membran lokalisieren, ihre Phosphorylierung einleiten oder ihre Enzymaktivität stimulieren. Dies ist durch eine allosterische Aktivierung, wie etwa bei src-Kinasen, möglich: Die

src-Kinase Ick besitzt sowohl Tyrosinreste als auch eine SH2-Domäne (siehe Abb. 3). Tyrosin 505 in der carboxyterminalen Hälfte ist ein Negativregulator für Ick-Kinaseaktivität. Ist es phosphoryliert, kann es an die interne SH2-Domäne binden, das Enzym faltet sich, die Kinasedomäne ist verdeckt und katalytisch inaktiv. Einen solchen Mechanismus legen Kristallstrukturdaten der Tyrosinkinase Hck und Src nahe (Sicheri et al., 1997; Xu et al., 1997). Die Aktivierung erfolgt entweder durch Dephosphorylierung des inhibitorischen Tyrosinrestes durch CD45 oder durch die Anwesenheit phosphorylierter Tyrosine, etwa in den ITAMs des TZR-Komplexes. Diese konkurrieren mit dem internen Y um die Bindung der SH2-Domäne; wenn diese an einen externen Tyrosinrest bindet, öffnet sich das Enzym, die katalytische Domäne wird frei.

Weiterhin wichtig für Protein-Protein-Interaktionen sind SH3-Domänen. Sie ermöglichen die Bindung an prolinreiche Sequenzen von etwa zehn Aminosäuren im Zielmolekül. Strukturbestimmungen von SH3-Domänen mit gebundenem Liganden haben gezeigt, daß der prolinreiche Abschnitt in Form einer linksgängigen Helix mit drei Aminosäuren pro Windung gebunden wird (Lim und Richards, 1994; Pawson, 1995). Während für SH2-Domänen die Zielsequenz durch Phosphorylierung modifiziert werden muß, sind für SH3-Domänen keine Änderungen der Bindungsstelle nötig. SH3-Domänen scheinen einen wichtigen Beitrag zur Substratspezifität von Tyrosinkinase zu leisten, indem sie eine festere Kopplung des SH3-haltigen Substrats an die Tyrosinkinase vermitteln. Andere mögliche Substrate, die aber keine SH3-Domäne besitzen, sind so von der Phosphorylierung und damit Aktivierung ausgeschlossen. Wichtige Signalmoleküle, die SH3-Domänen enthalten, sind Ick, ITK, Vav, PLC $\gamma$ , PI3-K, Grb-2 (Abb. 3).

Pleckstrin-Homologie (PH)-Domänen sind ca. 100 Aminosäuren umfassende Strukturmodule, die sich u. a. in PLC $\gamma$ , Vav, Kinasen der Tec-Familie (z.B. ITK) und Grb-2 finden lassen (Abb. 3), um einige für die vorliegende Arbeit wichtige Signalmoleküle zu nennen. Ursprünglich wurde die PH-Domäne im Pleckstrin-Protein gefunden, das in Blutplättchen das Hauptsubstrat der Proteinkinase C darstellt (Haslam et al., 1993; Mayer et al., 1993). Bindungspartner für PH-Domänen sind sowohl  $\beta/\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine als auch Phosphoinositide. Die Bindung über die PH-Domäne an Phosphoinositide wie Phosphatidyl-Inositol-3,4-Bisphosphat (PtdIns-3,4-P<sub>2</sub>) und PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub>, beides Produkte der PI3-K, ermöglichen eine regulierte Rekrutierung von Signalmolekülen an die Membran (Lemmon et al., 1996). Mit u. a. FYVE- und PTB-Domänen haben sich unabhängig von PH-Domänen noch weitere Domänen entwickelt, die Phosphoinositide binden und Moleküle zur Membran rekrutieren.



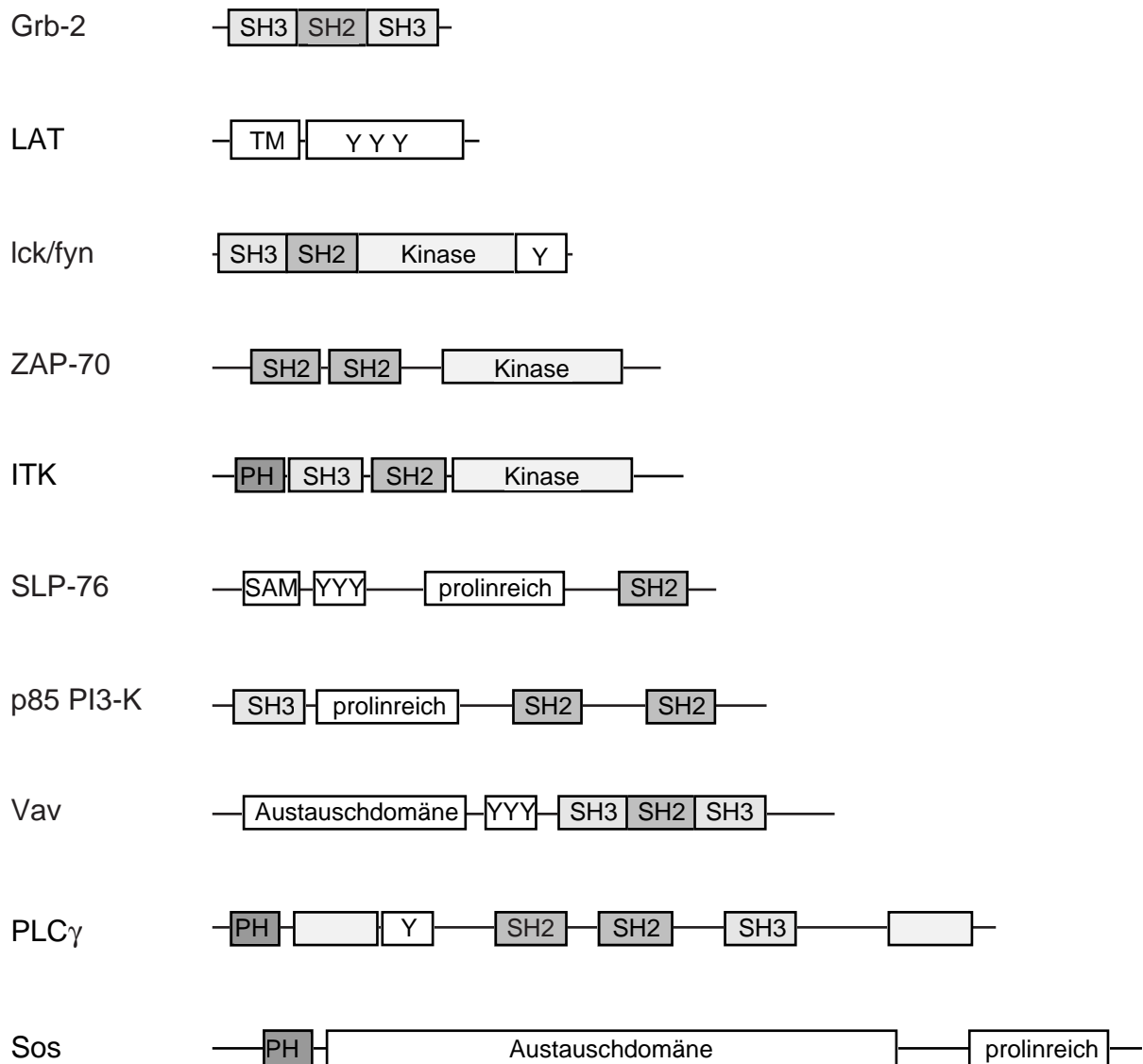


Abb. 3: Signalmoleküle mit SH2-, SH3- und PH-Domänen

### 1.4.2 Struktur/Aufbau von Signalkaskaden

Im Falle des T- und auch B-Zellrezeptors steht ein Rezeptor am Beginn der Signalkaskade, der keine intrinsische Enzymaktivität besitzt. Bei Ligandenbindung an den Rezeptor werden nachgeschaltete Tyrosinkinasen aktiviert und phosphoryliert. Über verschiedene Typen von Effektormolekülen wird die Signalinformation bis in den Kern weitergeleitet. Es läßt sich ein Hauptweg oder gemeinsames Schema erkennen, das im folgenden dargestellt werden soll. Dabei ist wichtig zu erwähnen, daß es zahlreiche Abweichungen vom Schema gibt und vor allem die Signale nicht notwendigerweise entlang einer vertikalen Kaskade in den Kern gelangen. Vielmehr sind die Signalkaskaden als Netzwerke anzusehen, in

denen es auf den verschiedenen Ebenen unter Beteiligung der weiter oben besprochenen Domänen zu Quervernetzungen und Austausch kommt.

Die Ligandenerkennung durch den Rezeptor und die Aktivierung von Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen setzen sich in der Phosphorylierung von Adapterproteinen fort (Übersicht in Peterson et al., 1998; Rudd, 1999). Diese Adapterproteine weisen zwar kein katalytisches Zentrum auf, besitzen aber zahlreiche Domänen, an die andere Proteine binden können. Sie fungieren so als Kristallisationspunkte, die nach ihrer Phosphorylierung Verankerungspunkte für andere Enzyme und deren Substrate bereitstellen. Häufig sind sie selbst in der Membran verankert, so daß durch die Bindung an Adapterproteine andere Proteine in die Nähe ihrer in der Membran befindlichen Substrate gebracht werden. Wichtige Faktoren, die an phosphorylierte Adapterproteine binden, sind GEFs (guanine exchange factors). Sie vermitteln die Aktivierung der nächsten Ebene der Signalkaskade, der GTPasen.

Dabei handelt es sich um Proteine, die mit GDP oder GTP assoziieren können. Bei Bindung von GDP befinden sie sich in einer inaktiven Form, mit GTP erreichen sie ihre aktive Konformation. GEFs bewirken eine Verschiebung des Gleichgewichts der GTPasen in Richtung der GTP-gebundenen und damit aktiven Form. Aktive GTPasen wie p21Ras können eine spezifische Wechselwirkung mit Serin-Threonin-spezifischen Proteinkinasen wie Raf eingehen. Während bis hier die Vorgänge weitgehend membranassoziiert ablaufen, wird nun eine Kette von Proteinkinasen aktiviert, die sich frei im Zytoplasma befinden, zum Teil auch in den Kern translozieren können und das Signal bis in den Zellkern weitertragen. Die Signalübertragung durch sequentiell hintereinandergeschaltete Proteinkinasen ist ein effizientes System, um Signale zu amplifizieren und zu regulieren. Auf jeder Stufe ist eine positive und negative Regulation möglich.

Da die Kinasen häufig durch proliferations-induzierende Stimuli aktiviert werden, werden sie in ihrer Gesamtheit als MAPK (mitogen activated protein kinase)-Weg bezeichnet (Übersicht in Henning und Cantrell, 1998; Reif und Cantrell, 1998). Als allgemeines Strukturprinzip kann gelten, daß die Kette aus drei Modulen besteht. Das Endglied, die MAPKinase (MAPK), wird durch MAPKinase Kinasen (MAPKK) phosphoryliert und aktiviert. MAPKK sind Kinasen mit Spezifität für Tyrosin und Threonin, d.h. sie phosphorylieren MAPK an Tyrosin- und Threoninresten. MAPKK ihrerseits werden von MAPKKK aktiviert, die Serin-/Threoninkinasen sind. Die MAPK am Ende der Kaskade phosphorylieren verschiedene Transkriptionsfaktoren oder Untereinheiten dieser, die in den Kern gelangen können und dort Genexpression initiieren. Zu den MAPK zählen ERK (extracellular regulated kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase) und p38. JNK und p38 werden auch als SAPK (stress

activated protein kinases) bezeichnet, häufig wird der Begriff SAPK auch synonym mit JNK gebraucht.

Nach diesem allgemeinen Überblick sollen die bekannten Signalkaskaden von TZR und CD28 dargestellt werden.

### 1.4.3 TZR-Signaltransduktion

Der TZR stellt einen Komplex aus insgesamt sechs verschiedenen Polypeptidketten dar, der getrennte Antigenerkennungs- und Signaltransduktionseinheiten besitzt. Die polymorphen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des TZR sind an der Antigenerkennung beteiligt und besitzen nur einen sehr kurzen zytoplasmatischen Anteil von fünf Aminosäuren, über den keine Signale weitergeleitet werden können. Diese Aufgabe übernehmen die invarianten CD3 $\delta$ -, CD3 $\epsilon$ - und CD3 $\gamma$ -Untereinheiten sowie die TZR $\zeta$ -Ketten, die in ihrem 40 - 113 Aminosäuren langen zytoplasmatischen Teil jeweils ein ITAM (CD3 $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ) oder im Falle der  $\zeta$ -Ketten je drei ITAMs besitzen. Da diese Untereinheiten sich zu zwei Heterodimeren ( $\epsilon$ - $\delta$  und  $\epsilon$ - $\gamma$ ) und einem Homodimer,  $\zeta$ - $\zeta$ , formieren, stellen sie insgesamt zehn ITAMs zur Bindung zytoplasmatischer Proteine bereit (Weiss und Littman, 1994; van Leeuwen und Samelson, 1999).

Das Vorhandensein von zehn ITAMs trägt vermutlich zur Amplifikation der Signalstärke eines einzelnen TZR bei, zusätzlich kann der TZR dadurch als Prozessor wirken, der verschieden starke und lange Ligandenbindung in distinkte Kombinationen phosphorylierter ITAMs und damit unterschiedliche Zellantworten umsetzt. Die Vermittlung spezifischer Interaktionen durch die einzelnen ITAMs unterstützt diese Prozessorfunktion: ZAP-70, Phospholipase C $\gamma$ 1, PI3-K und Shc binden über ihre SH2-Domänen mit unterschiedlicher Spezifität an die verschiedenen ITAMs (zusammengefaßt in Wange und Samelson, 1996; Ardouin et al., 1999).

Weiterhin sind die ITAMs an der nach Aktivierung erfolgenden Assoziation von TCR $\zeta$  und CD3 $\epsilon$  mit dem Aktinzytoskelett beteiligt, für die intakte c-terminale ITAMs von TZR $\zeta$  nötig sind (Caplan et al., 1995; Rozdzial et al., 1995).

Durch Bindung des Antigen-MHC-Komplexes an den TZR werden die src-Kinasen lck und fyn aktiviert. Der dabei zugrundeliegende Mechanismus ist immer noch nicht in allen Einzelheiten erklärt, aber sowohl die interne SH2- als auch SH3-Domäne können im inaktiven Zustand die Kinasedomäne von lck blockieren. Durch die konstitutiv aktive Phosphatase CD45 wird bereits vor Rezeptorligation das negativ regulierende Tyrosin dephosphoryliert, es gibt damit die blockierende SH2-Domäne frei. Gleichzeitig ist aber die Autophosphorylierungsstelle in ruhenden Zellen nur selten phosphoryliert, vermutlich ebenfalls eine Folge der

Phosphataseaktivität von CD45. Rezeptorligation stabilisiert die lck-Konformation durch Umlagerung von Mikrodomänen und Ausschluß von CD45 und von Kinasen, die das inhibitorische Tyrosin phosphorylieren könnten (zusammengefaßt in Thomas, 1999). Zusätzlich scheint die durch Rezeptoraktivierung induzierte Bindung an prolinreiche Sequenzen von z. B. CD28 die SH3-Domäne aus ihrer inaktivierenden Stellung zu entfernen (Holdorf et al., 1999).

lck und fyn phosphorylieren die ITAMs des TZR-Komplexes, an die so weitere zytoplasmatische Proteine binden können. Die Wichtigkeit dieser src-Kinasen ist unterstrichen durch einen frühen Block in der T-Zellentwicklung bei lck-defizienten Mäusen (Molina et al., 1992; van Oers et al., 1996). Neben den src-Kinasen spielt eine zweite Familie von Tyrosinkinasen eine Rolle bei den frühen Ereignissen nach Ligation des TZR, die Syk-Familie, zu der ZAP-70 und Syk zählen (Übersicht in van Leeuwen und Samelson, 1999). ZAP-70 bindet an phosphorylierte ITAMs über seine zwei SH2-Domänen, was seine Phosphorylierung und Aktivierung durch src-Kinasen ermöglicht. ZAP-70 hat eine zentrale Funktion in der Weiterleitung TZR-vermittelter Signale: ZAP-70-Defizienz führt sowohl beim Menschen als auch bei Tieren zu schwerer Immundefizienz (Arpaia et al., 1994; Chan et al., 1994; Elder et al., 1994; Gelfand et al., 1995; Negishi et al., 1995). In den wenigen reifen T-Zellen, die sich bei Fehlen von ZAP-70 noch entwickeln können, ist keine TZR-Signaltransduktion mehr möglich. Syk, dessen Bindung an phosphorylierte ITAMs ohne weitere Phosphorylierung bereits zu seiner Aktivierung ausreicht, ist essentiell in B-Zellen, eine wichtige Funktion in der TZR-Signaltransduktion konnte aber nicht nachgewiesen werden (Cheng et al., 1995; Fargnoli et al., 1995; Turner et al., 1995).

Aktivierung von ZAP-70 als zentrales Element der TZR-Signaltransduktion führt zur Phosphorylierung der Adapterproteine LAT und SLP-76 (Wardenburg et al., 1996) (Abb. 4a) sowie der Phospholipase C $\gamma$  (Weiss et al., 1991), die weitere Kaskaden initiieren.

LAT (= linker of activated T-cells), ein Transmembranprotein in T-Zellen, NK-Zellen, Mastzellen und Blutplättchen (Zhang et al., 1998), rekrutiert nach seiner Phosphorylierung u.a. PLC $\gamma$ , Grb-2, Grap und PI3-K zur Membran (Abb. 4) (van Leeuwen und Samelson, 1999) und ermöglicht so die Bildung von Multiproteinkomplexen, die für die Signalweitergabe entscheidend sind. In LAT-defizienten Jurkatzellen ist PLC $\gamma$  nicht mehr phosphoryliert, der Calciumflux stark reduziert und der Ras-Weg wird nicht mehr aktiviert (Abb. 4a+b) (Finco et al., 1998; Zhang et al., 1999b).

Eine ähnlich wichtige Funktion übt SLP-76 (= SH2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kD) aus. Das nicht membranständige Adapterprotein vermittelt über eine prolinreiche Domäne die Bindung zu SH3-Motiven von Grb-2

(s.u.) (Wardenburg et al., 1996), über phosphorylierte Tyrosine u. a. an die SH2-Domänen von Vav and Nck (Raab et al., 1997; Wunderlich et al., 1999), außerdem enthält es selbst eine SH2-Domäne. SLP-76-Defizienz führt, ähnlich wie LAT-Defizienz, vermutlich aufgrund fehlender Rekrutierung einer Tyrosinkinase, zu reduzierter Phosphorylierung von PLC $\gamma$ , vermindertem Ca<sup>2+</sup>-Flux und fehlender Ras-Aktivierung (Yablonski et al., 1998).

Grb-2 (= growth factor receptor binding protein 2) besitzt eine SH2-Domäne, flankiert von zwei SH3-Domänen, aber ebenfalls keine Enzymaktivität. Über die Bindung von Sos, einem GTP/GDP-Austauschfaktor für Ras leitet es zu distalen Kaskaden über. Die Überführung von inaktivem Ras in die GTP-gebundene aktive Form ermöglicht die Aktivierung von Raf1, einer MAPKinase Kinase Kinase, und damit der ERK-Kaskade (Abb. 4a). Mit Hilfe von Ras wird Raf in der Membran lokalisiert. Die Aktivierung von Raf erfolgt über einen noch unbekanntem Mechanismus, der Tyrosinphosphorylierung beinhaltet (zusammengefaßt in Wange und Samelson, 1996).

Ebenfalls durch die Bindung an ein Adapterprotein und nachfolgende Phosphorylierung wird ein weiterer GTP/GDP-Austauschfaktor, Vav, aktiviert. Vav ist spezifisch für hämatopoetische Zellen und besteht aus zwei SH3-, einer SH2-, einer der Bindung von Phosphoinositiden dienenden PH-Domäne sowie einer katalytischen Dbl-Homologiedomäne (Collins et al., 1997). Durch Bindung an SLP-76 kommt Vav in die Nähe einer src-Kinase oder von ZAP-70, die alle Vav phosphorylieren können (Abb. 4a+c). Zusätzlich ist für Vav-Aktivität die Bindung von Polyphosphoinositiden erforderlich, die über die PH-Domäne Vav an der Membran lokalisieren oder eine allosterische Modifikation herbeiführen und so zur GEF-Aktivität beitragen (Han et al., 1998). Als Guanosintriphosphat-Austauschfaktor für Rac, das zur PAK-Aktivierung und SAPK Kaskade überleitet, ist Vav an der Induktion von Signalkaskaden beteiligt (Abb. 4c) (Reif und Cantrell, 1998). Gleichzeitig spielt es aber auch eine Rolle in der Zytoskelettlagerung und Aktinpolymerisierung.

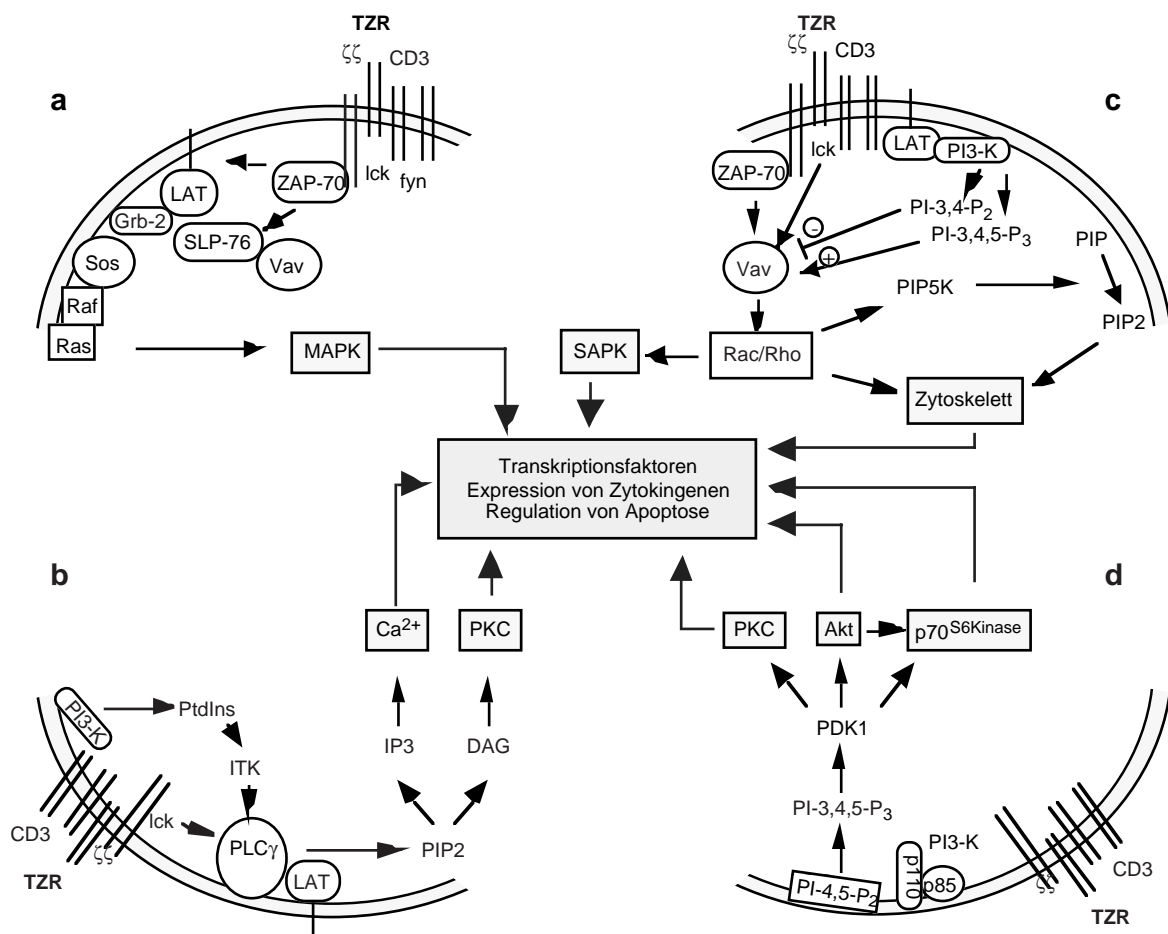
Vav assoziiert mit den Zytoskelettproteinen Talin und Vinculin und ist notwendig für Ausbildung der Capstruktur nach TZR-Ligation (Fischer et al., 1998). Ein möglicher Mechanismus der Vav-Wirkung auf das Zytoskelett mag in der Vav-vermittelten Rac-Aktivierung liegen: Rac stimuliert Phosphatidyl-inositol-4-Phosphat-5-Kinase (PIP5-K)-Aktivität. PIP5-K trägt durch Phosphorylierung von Phosphatidyl-Inositolphosphat (PIP) zur Entstehung von Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) bei (Abb. 4c). Hohe PIP<sub>2</sub>-Konzentrationen fördern die Dissoziation der Aktinregulatoren Profilin und Gelsolin von Aktin, dies ermöglicht Interaktionen zwischen Aktin und den Transmembranproteinen Talin bzw. Vinculin.

Dies wäre ein Mechanismus für lokale Aktinpolymerisation sowie Verankerung des Zytoskeletts in der Membran (zusammengefaßt in Penninger und Crabtree, 1999).

Abhängig von Adapterproteinen ist Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), die die Hydrolyse von Inositol-Phospholipiden reguliert und die Entstehung von Inositol-3-Phosphat (IP $_3$ ) und Diacylglycerin (DAG) katalysiert (Abb. 4b) (Cantrell, 1996). Zur Aktivierung von PLC $\gamma$  muß diese tyrosinphosphoryliert werden, wofür Ick notwendig ist. PLC $\gamma$  rekrutiert die Tyrosinkinase über die zwei SH2-Domänen und gelangt auf diese Weise in Membrannähe, in der sich ihr Substrat, Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (PIP $_2$ ), befindet. Direkt und indirekt sind auch Produkte der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-K, s.u.) an der Aktivierung von PLC $\gamma$  beteiligt: Phospholipide binden an die PH-Domäne und tragen so zur Lokalisation an PIP $_2$ -reichen Membrangegenden bei; indirekt dadurch, daß Phospholipide an PH-Domänen von Kinasen der Tec-Familie (s.u.) binden, diese ebenfalls in der Membran verankern, so daß Tec-Kinasen nun ihrerseits PLC $\gamma$  phosphorylieren können (Abb. 4b) (zusammengefaßt in Scharenberg und Kinet, 1998).

IP $_3$ , als ein Produkt aktivierter PLC $\gamma$ , akkumuliert innerhalb der ersten ein bis zwei Minuten nach TZR-Kreuzvernetzung und löst Ca $^{2+}$ -Flux aus intrazellulären Speichern aus. DAG, das zweite Spaltungsprodukt der von PLC $\gamma$  katalysierten Reaktion, bewirkt PKC-Aktivierung (Übersicht in Alberola-Ila et al., 1997). Zur Tec-Familie zählen ITK (= IL-2-inducible T cell kinase), die in T- und NK-Zellen vorkommt, und Btk (Bruton's tyrosine kinase), die in B-Zellen zu finden ist. ITK wird sowohl nach TZR- als auch CD28- oder CD2-Ligation phosphoryliert (Gibson et al., 1996a; Gibson et al., 1996b; King et al., 1996; Heyeck et al., 1997). Wie bereits beschrieben, spielt bei der Aktivierung auch die Membranverankerung durch Produkte der PI3-K eine wichtige Rolle. Während das Fehlen von Btk in B-Zellen im Menschen und in der Maus in Immundefizienzen resultiert, ist in ITK-defizienten Mäusen die T-Zellentwicklung früh blockiert und die Zahl reifer CD4 $^+$  T-Zellen drastisch reduziert (Liao und Littman, 1995; Liu et al., 1998). Auf Ebene der TZR-vermittelten Signale lassen sich in ITK-defizienten T-Zellen reduzierte PLC $\gamma$ 1-Phosphorylierung, reduzierte IP $_3$ -Produktion und verminderter Ca $^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran feststellen. Diese Defekte der proximalen TZR-Signale äußern sich in reduzierter IL-2-Sekretion (Liu et al., 1998).





**Abb. 4: TZR-Signaltransduktion**

Dargestellt sind hauptsächlich die an und in der Nähe der Membran stattfindenden Ereignisse. a) Raf-Ras-Weg, b) TZR-vermittelter Calciumflux und TZR-vermittelte PKC-Aktivierung, c) Einfluß des TZR auf das Zytoskelett v. a. über Vav, d) Aktivierung anti-apoptotischer und DNA-Synthese fördernder Moleküle.

Ebenfalls nach TZR-Ligation wird die PI3-K aktiviert, die Spezifität sowohl für Lipide als auch für Serin besitzt. PI3-K verfügt über eine regulatorische p85-, p50- oder p55-Untereinheit mit Adapterfunktion sowie eine katalytische Untereinheit, p110. Sie kann Phosphoinositide an der D3-Position des Inositolrings phosphorylieren, dabei entstehen u. a. Phosphatidyl-Inositol-3,4-bisphosphat (PtdIns-3,4-P $_2$ ) und Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-trisphosphat (PtdIns-3,4,5-P $_3$ ) (Übersicht in Ward et al., 1996).

PtdIns tragen zur Aktivierung von PDK1, der Protein Kinase B Kinase, bei (Abb. 4d). PDK1 kontrolliert p70 $^{S6}$ Kinase, PKB (=Akt) und verschiedene PKC-Isoformen (Le Good et al., 1998). PKB/Akt Aktivierung ist vom PI3-K-Produkt PtdIns-3,4-P $_2$  abhängig (Franke et al., 1997b). Damit wirkt PI3-K über PKB und p70 $^{S6}$ Kinase an Verhinderung von Apoptose und an DNA-Synthese mit (Franke et al., 1997b).

Hemmend wirkt PtdIns-3,4-P<sub>2</sub> auf Vav, den Rac/Rho GEF, während Vav unter Mitwirkung von PtdIns-3,4,5-P<sub>2</sub> aktiviert wird (Abb. 4c) (Han et al., 1998). Damit hat PI3-K Einfluß auf den Rac-Weg und Zytoskelettprozesse. Außerdem ist, wie bereits erwähnt, die Induktion von ITK- und PLC $\gamma$ -Aktivität von PtdIns-Produkten der PI3-K abhängig.

Erstaunlicherweise ist die T-Zellentwicklung und -aktivierung in p85-defizienten Mäusen normal (Fruman et al., 1999; Suzuki et al., 1999), vermutlich übernehmen die verbliebenen Adapterisoformen die Aufgabe in der TZR-Signaltransduktion (Fruman et al., 1999).

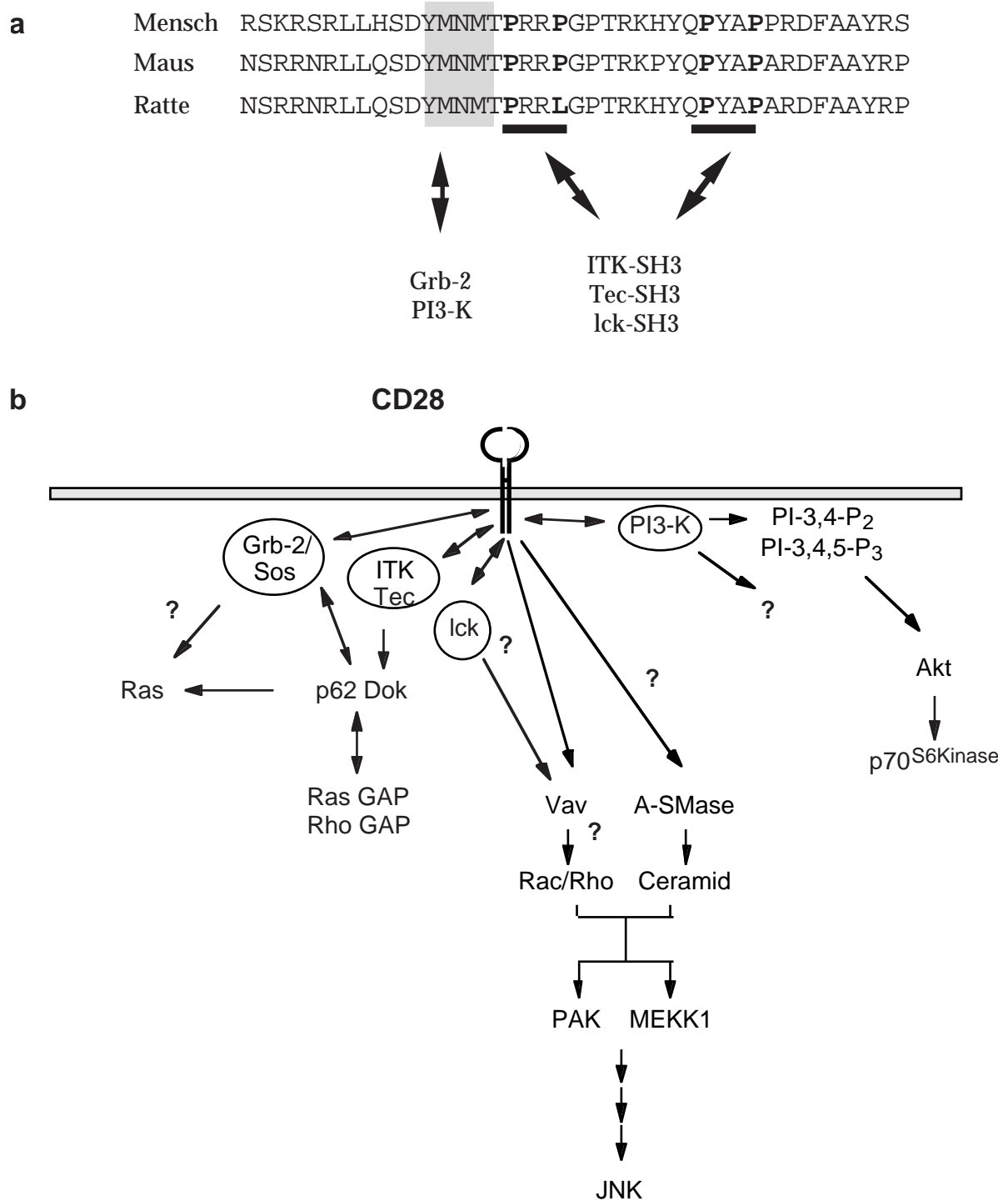
#### 1.4.4 CD28-Signaltransduktion (Abb. 5)

CD28 ist unbestritten einer der wichtigsten kostimulatorischen Rezeptoren, allerdings ist immer noch nicht klar, welchen Beitrag CD28 zur T-Zellaktivierung leistet. Optimale T-Zellaktivierung erfordert neben dem TZR-Signal auch die Interaktion von CD28 mit seinem Liganden, das Fehlen dieses kostimulatorischen Signals führt zu einem lange anhaltenden Zustand der Anergie. In CD28-defizienten Mäusen können immer noch MHC-restringierte T-Zellantworten auf bestimmte Antigene generiert werden (Shahinian et al., 1993). Dies stellt weniger die Zwei-Signal-Hypothese in Frage, als es vielmehr auf andere kostimulatorische Moleküle hinweist, die das Fehlen von CD28 in eingeschränktem Maße kompensieren können. Immer noch wird diskutiert, ob CD28 tatsächlich ein eigenständiges zweites Signal liefert, das sich vom TZR-Signal unterscheidet, oder als Adhäsionsmolekül die Bindung an die APZ stabilisiert und auf diese Weise die Dauer des Zellkontaktes und der Signalgebung durch den TZR verlängert. In der Tat konnte gezeigt werden, daß bei Ligation von CD28 weniger TZR-Moleküle besetzt werden müssen, um die Zelle zu aktivieren, die Aktivierungsschwelle demnach herabgesetzt wird (Viola und Lanzavecchia, 1996). Zusätzlich werden durch CD28 frühe TZR-Signale verstärkt, etwa die Phosphorylierung der zeta-Ketten und von ZAP-70 sowie die lck-Aktivität (Tuosto und Acuto, 1998; Salojin et al., 1999; Viola et al., 1999). Die Ligandenbindung durch CD28 führt zur Umorganisation des Zytoskeletts und Akkumulation von Mikrodomänen an die Kontaktstelle zur APZ (Wulfig und Davis, 1998; Viola et al., 1999). All dies läßt sich mit der Idee vereinbaren, daß CD28 lediglich den TZR bei seiner Signalweiterleitung unterstützt und dessen Signale amplifiziert, klärt aber nicht, ob CD28 eigene, einzigartige Signalwege beschreitet. Erschwert wird die eindeutige Feststellung von CD28-spezifischen Signalwegen dadurch, daß CD28 kaum isoliert betrachtet werden kann. Unter physiologischen Bedingungen, der Stimulation einer T-Zelle durch Antigen, ist immer der TZR beteiligt, die Ligation von CD28 allein führt im allgemeinen nicht zur Aktivierung der T-Zelle. Die

Kreuzvernetzung von CD28-spezifischen Antikörpern und der Einsatz der Liganden B7-1 und B7-2 ohne TZR-Ligation ermöglichte die Identifizierung zahlreicher Moleküle, die in (mögliche) CD28-Signaltransduktionswege eingeschaltet sein könnten. In vielen Fällen ist jedoch nicht klar, ob dies unter physiologischen Bedingungen tatsächlich eine Rolle spielt.

CD28 besitzt mit einem zytoplasmatischen Anteil von 41 Aminosäuren, der in Mensch, Maus und Ratte sehr stark konserviert ist (Abb. 5a), durchaus das Potential zur Signaltransduktion. Zwar enthält er nicht wie die TZR-Ketten ITAMs, aber ein Phosphotyrosin-Motiv YMNM (Tyrosin, Methionin, Asparagin, Methionin) sowie zwei prolinreiche Motive ermöglichen die Bindung von Signalmolekülen. Neben dem Tyrosin des YMNM-Motivs existieren drei weitere Tyrosine; alle vier Tyrosine können nach CD28-Kreuzvernetzung sowohl durch Ick als auch fyn phosphoryliert werden (Raab et al., 1995; Hutchcroft et al., 1996), weder ITK noch ZAP-70 sind dazu in der Lage (zusammengefaßt in Rudd, 1996).

Die Tyrosin-Phosphorylierung des YMNM-Motivs ist Voraussetzung für die Bindung von PI3-K an CD28, die über die SH2-Domäne der regulatorischen p85-Untereinheit erfolgt (Prasad et al., 1994). Welche Rolle PI3-K tatsächlich für die CD28-Signaltransduktion spielt, ist nach wie vor umstritten. Zahlreiche Berichte, vor allem über Experimente mit Jurkat-Zellen, sprechen dafür, daß die CD28-unterstützte IL-2-Produktion PI3-K-unabhängig ist (Crooks et al., 1995; Hutchcroft et al., 1995; Lu et al., 1995; Truitt et al., 1995; Teng et al., 1996). Auch in primären Zellen sind in manchen Fällen Proliferation und IL-2-Produktion nach Kostimulation PI3-K-abhängig (Truitt et al., 1995; Fruman et al., 1999). Andere Gruppen wiederum fanden, u. a. auch in ruhenden primären T-Zellen, daß die Blockierung der PI3-K durch spezifische Inhibitoren oder verhinderte PI3-K-Bindung durch Mutationen in CD28 die IL-2-Produktion unterdrückt (Pages et al., 1994; Cai et al., 1995; Ueda et al., 1995; Ward et al., 1995; Ghiotto-Ragueneau et al., 1996). Unterschiede in der Art der Stimulation und dem Aktivierungszustand der Zellen können diese Diskrepanzen hervorgerufen haben. T-Zellen von Mäusen ohne die regulatorische p85 $\alpha$  Untereinheit der PI3-K proliferieren nach Kostimulation nicht weniger als Wildtypzellen (Fruman et al., 1999), allerdings können hier andere Adapterisoformen die Funktion von p85 $\alpha$  übernommen haben. Damit läßt sich die Frage nach der Funktion von PI3-K in der CD28-Signalgebung nicht beantworten.



**Abb. 5: CD28-Signaltransduktion**

a) Der Vergleich des zytoplasmatischen Anteils von CD28 zeigt einige konservierte Elemente bei Mensch, Maus und Ratte. Dazu gehören das Tyrosinmotiv YMNM, drei weitere Tyrosine sowie zwei SH3-bindende Domänen (PXXP), von denen die eine in der Ratte nicht ganz konserviert ist. b) Durch CD28 aktivierte und mit CD28 assoziierte Moleküle. Dargestellt sind Signalmoleküle, die mit CD28 assoziieren oder durch CD28-Ligation aktiviert werden können, und der potentielle Einfluß von CD28 auf andere Signalkaskaden.

Wie Mutationsanalysen zeigten, bindet das Adapterprotein Grb-2 genau wie PI3-K mit seiner SH2-Domäne an das Phosphotyrosinmotiv YMNM von CD28, allerdings mit etwa 10-100 facher geringerer Avidität als PI3-K (Schneider et al., 1995). Auch hier ist die funktionelle Bedeutung unklar. Zwar konnte der mit Grb-2 assoziierte p21 Ras-Regulator Sos mit CD28 kopräzipitiert werden, so daß prinzipiell CD28 mittels Grb/Sos die GTPase Ras aktivieren könnte (Abb. 5), allerdings resultiert nur antikörpervermittelte CD28-Ligation in Ras-Aktivierung, nicht aber die Aktivierung mit B7-1 (Nunes et al., 1994). Zusätzlich kann Grb-2 phosphorylierungsunabhängig auch über seine zwei SH3-Domänen an die Prolinmotive von CD28 binden. Diese Interaktion ist induzierbar durch CD28-Ligation und könnte an Grb-2-SH2 gebundene, tyrosinphosphorylierte Proteine zu CD28 rekrutieren (Okkenhaug und Rottapel, 1998).

Unabhängig vom YMNM-Motiv bindet die Kinase ITK, ein Mitglied der Tec-Familie, mit der SH3-Domäne an die Prolinmotive von CD28 (Cai et al., 1995; Marengere et al., 1997). ITK wird durch CD28-Ligation Ick-abhängig phosphoryliert und aktiviert (Gibson et al., 1998). Die IL-2-Produktion von T-Zellen ITK-defizienter Mäuse nach Kostimulation ist nur geringfügig vermindert, die Proliferation erhöht, weswegen ein inhibitorischer Effekt von ITK auf die T-Zellproliferation postuliert wurde (Liao et al., 1997). Eine andere Rolle als ITK könnte Tec für die IL-2-Produktion spielen. Tec bindet ebenso wie ITK aktivierungsabhängig mit der SH3-Domäne an CD28 und wird aktiviert nach CD28-Ligation (Yang et al., 1999), Ick steigert die Kinaseaktivität (Yang und Olive, 1999). Überexpression von Tec kann im Gegensatz zu ITK nach Stimulation mit dem PKC-Aktivator PMA und CD28 die IL-2- und IL-4-Promoteraktivität erhöhen (Yang et al., 1999; Yang und Olive, 1999). Tec ist in der Lage, p62 Dok zu phosphorylieren, nicht aber CD28.

p62 ist ein Substrat, das nur nach CD28-Ligation, aber nicht durch CD3-Kreuzvernetzung phosphoryliert wird (Nunes et al., 1996). *In vitro* assoziiert phosphoryliertes Dok nach CD28-Aktivierung mit der SH2-Domäne von Grb-2 (Nunes et al., 1996). Als mit p120Ras GAP und p190Rho GAP assoziierter Adapter könnte p62 diese negativen Regulatoren von aktiven Ras- und Rho-Molekülen fernhalten und damit die Aktivität der Ras- und Rho-Signalwege erhöhen (Reif und Cantrell, 1998).

Neben p62 Dok ist der GDP/GTP-Austauschfaktor für Rho-ähnliche GTPasen Vav eines der Hauptsubstrate nach CD28-Aktivierung. Nach CD28-Ligation mit B7-1 ist Vav stärker phosphoryliert als durch TZR-Stimulation, die Grb-2 und PI3-K-Bindungsstelle ist dazu nicht erforderlich (Nunes et al., 1994; Klasen et al., 1998). Proliferation und IL-2-Produktion in Vav-defizienten Mäusen werden durch CD28-Kreuzvernetzung nicht verstärkt, allerdings unterstützt dort CD28 die durch PMA

hervorgerufene Aktivierung. Dies wiederum läßt vermuten, daß Vav eher dem TZR-CD3-Komplex als CD28 nachgeordnet ist (Penninger et al., 1999). Diese Befunde machen es auch unwahrscheinlich, daß Vav an der PAK-Aktivierung nach CD28-Stimulation beteiligt ist (Kaga et al., 1998).

Die Ser/Thr-Kinase PAK (p21 activated kinase) assoziiert mit GTP-gebundenem Rac1 und CDC42 und wird durch diese aktiviert. In Jurkat-Zellen kann CD28 PAK und MEKK1 (siehe Abb. 5) aktivieren, wie (Kaga et al., 1998) zeigten. Als Austauschfaktor für Rho-GTPasen könnte Vav diese Aktivierung vermitteln, dagegen spricht aber die intakte PAK-Aktivierung in Vav-defizienten Mäusen. Stattdessen könnte Ceramid diese Funktion übernehmen.

Ceramid entsteht durch Sphingomyelinase (A-SMase)-katalysierte Spaltung von Sphingomyelin, das sich in den äußeren Schichten der Plasmamembran befindet, in Phosphorylcholin und Ceramid. Das membranständige Ceramid ist in seiner Funktion als Botenstoff mit Diacyglyzerin (DAG) zu vergleichen. CD28-Kreuzvernetzung aktiviert im Gegensatz zu TZR-Stimulation A-SMase, und A-SMase-Überexpression kann Kostimulation durch CD28 ersetzen (Boucher et al., 1995; Chan und Ochi, 1995; Ridgeway, 1995; Liao et al., 1997). Das A-SMase-Produkt Ceramid oder seine Analoge können PAK aktivieren und zusammen mit TZR-Stimulation eine synergistische Steigerung der PAK- und MEKK1-Aktivität bewirken (Kaga et al., 1998). In Frage gestellt wird diese Rolle von Ceramid in der Kostimulation dadurch, daß in A-SMase-defizienten Mäusen Proliferation und IL-2-Produktion nach Kostimulation zwar reduziert, intrazelluläre IL-2-Mengen allerdings erhöht waren (Stoffel et al., 1998); danach wären A-SMase und Ceramid eher an der Zytokinsekretion als -produktion beteiligt.

Kostimulation über CD28 wirkt anti-apoptotisch auf die T-Zellen. Dies liegt zum einen in der Hochregulation des anti-apoptotischen Moleküls Bcl-x<sub>L</sub> durch CD28 begründet (Boise et al., 1995), zum anderen könnte die Aktivierung von Protein Kinase B (PKB = Akt) in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen (Abb. 5) (Parry et al., 1997). Akt ist als Aktivator der p70<sup>S6</sup>Kinase an DNA-Synthese und somit der Verhinderung von Apoptose beteiligt, auch p70<sup>S6</sup>Kinase ist nach CD28-Stimulation aktiviert (Pai et al., 1994). In diesem Zusammenhang ist interessant, daß zur vollständigen Aktivierung von Akt nicht nur Phosphorylierung an Ser/Thr durch PDK1 erforderlich ist, sondern auch Akt Rekrutierung zur Membran und/oder Dimerisierung (Franke und Cantley, 1997; Franke et al., 1997a). Das Produkt der PI3-K PtdIns-3,4-P<sub>3</sub> ist zur Membranrekrutierung von Akt ebenso nötig wie PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub> zur Aktivierung von PDK1. Daher könnten zumindest die anti-apoptotischen CD28-Signale abhängig von PI3-K sein.



### 1.4.5 Serin/Threonin-Kinase-Kaskaden

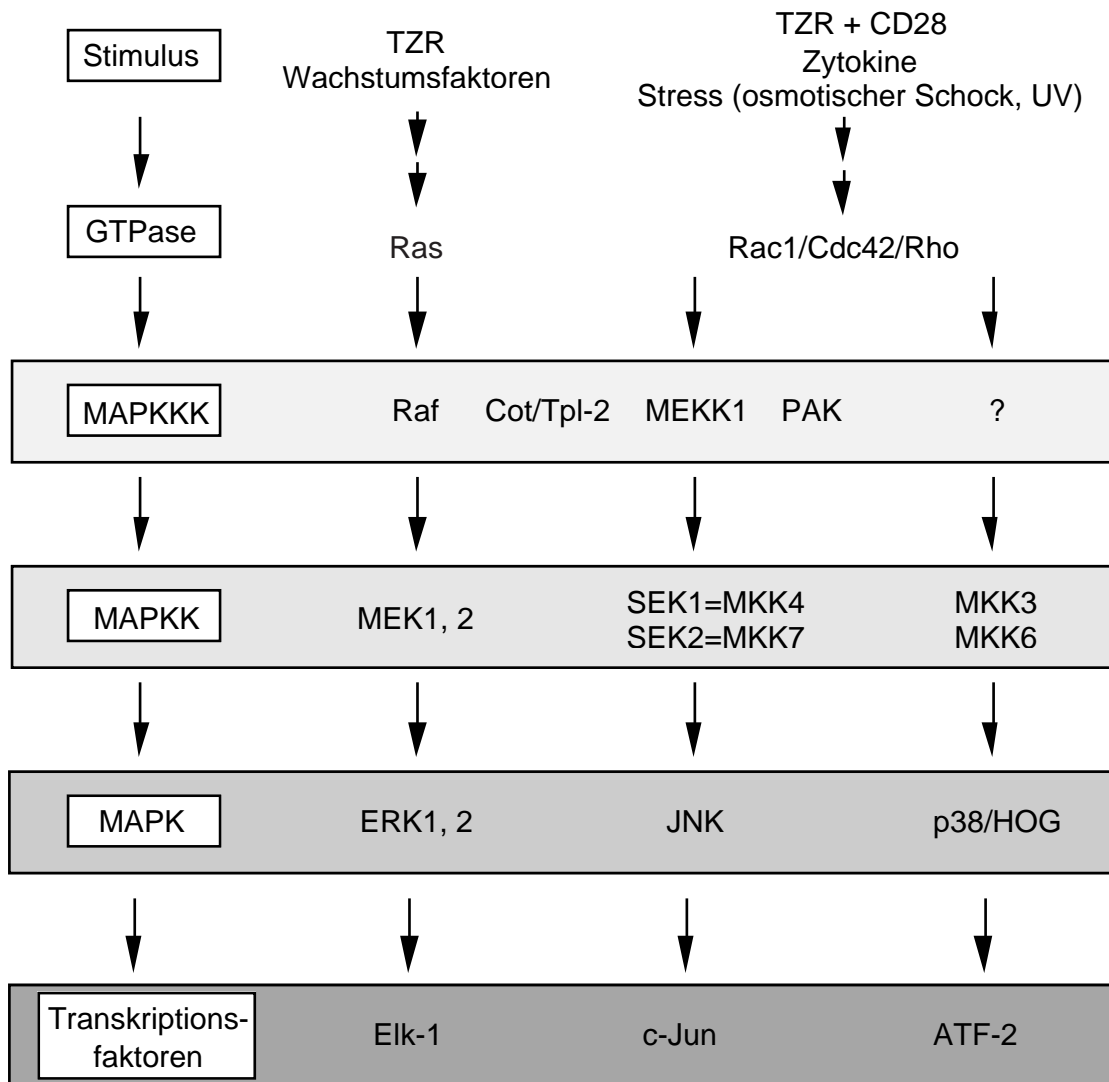
Eine entscheidende Funktion bei der Vermittlung der Signale in den Kern übernehmen die Serin/Threonin-Kinase-Kaskaden. In T-Zellen sind nach heutigem Kenntnisstand drei MAPK von besonderer Bedeutung (Rudd, 1996): ERK, SAPK/JNK und p38 (Abb. 6).

Die ERK (= extracellular regulated kinase)-Kaskade - bestehend aus der von Ras aktivierten Raf1 Kinase, MEK1 sowie ERK1 und 2, die im phosphorylierten Zustand in den Kern translozieren können und dort die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Elk und Fos bewerkstelligen - gilt als hauptsächlich durch den TZR kontrolliert, Kostimulation mit CD28-spezifischen mAb in TRZ-stimulierten Jurkatzellen hat keinen Einfluß (Su et al., 1994). Durch SEE (Staphylococcus Enterotoxin E)-induzierte ERK-Phosphorylierung in Jurkat-Zellen wird allerdings durch die Blockierung der CD28-B7-1 Interaktion reduziert (Tuosto und Acuto, 1998).

Im Gegensatz dazu gilt die JNK- oder SAPK (= stress activated protein kinase)-Kaskade als Signalintegrator von TZR- und CD28-vermittelten Signalen. Weder durch TZR noch durch CD28 allein wird sie in nennenswertem Umfang aktiviert, die gleichzeitige Ligation beider Rezeptoren bewirkt jedoch eine starke Aktivität der JNK (Su et al., 1994; Avraham et al., 1998). Proximal von JNK befinden sich die MAPKKK MEKK1 sowie als MAPKK SEK1 = MKK4 und SEK2 = MKK7, die JNK phosphorylieren können (Übersicht in Garrington und Johnson, 1999). Signalintegration von TZR- und CD28-Signalen erfolgt bereits auf Ebene von SEK1, da maximale SEK1-Kinaseaktivität nur durch Kostimulation erreicht wird (Avraham et al., 1998), Proliferation und IL-2-Produktion nach Kostimulation SEK1-defizienter T-Zellen sind im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Nishina et al., 1997). Aktivierte JNK phosphoryliert den Transkriptionsfaktor c-Jun, der zusammen mit Fos den AP1-Komplex bildet und an den IL-2-Promoter bindet. Über die JNK wird auch die Stabilisierung der IL-2-mRNA reguliert, die ein Charakteristikum der CD28-Effekte ist (Chen et al., 1998).

Die dritte MAPK ist p38, die in vielen Zellen ähnlich wie JNK durch Stress induziert wird. p38 kann durch TZR-Ligation allein aktiviert werden (Salmon et al., 1997), CD28-vermittelte Signale können in manchen Systemen noch einen verstärkenden Effekt haben (Salmon et al., 1997; Schafer et al., 1999b), in anderen jedoch keinen Beitrag leisten (DeSilva et al., 1997). Zum Teil wird p38 auch als Signalintegrator von TZR- und CD28-Signalen beschrieben (Zhang et al., 1999a).

Alle drei beschriebenen Serin-Threonin-Kinase-Kaskaden aktivieren Transkriptionsfaktoren, die im Kern die vom Rezeptor an der Zelloberfläche erhaltene Information in Genexpression umsetzen.



**Abb. 6: ERK, JNK und p38 bilden die drei Haupt-MAPK in T-Zellen**

*TZR-Ligation reicht aus zur Induktion der ERK-Kaskade, in manchen Systemen auch von p38. JNK-Aktivierung benötigt die gleichzeitige Besetzung von CD28, teilweise integriert auch die p38-Kaskade TZR- und CD28-Signale. Der Einfachheit halber sind horizontale Verknüpfungen zwischen den einzelnen Kaskaden weggelassen worden.*

### 1.5 Transkriptionsfaktoren

Die letzte Ebene, auf der Signale des TZR und kostimulatorischer Rezeptoren wie CD28 integriert werden, um u. a. die IL-2-Produktion zu erhöhen, sind die Transkriptionsfaktoren. An den IL-2-Promoter binden die Transkriptionsfaktoren

NFAT, NF $\kappa$ B, AP-1, Oct-1 und Faktoren, die mit dem CD28RE (responsive element) interagieren (Übersicht in Serfling et al., 1995). Der Promoter selbst kann nicht als das integrierende Element angesehen werden, da kein Faktor an ihn bindet, der nur selektiv durch ein Signal induziert wird, maximale DNA-Bindungsaktivität der meisten Transkriptionsfaktoren erfordert bereits beide Signale. Zwar erreicht man durch Stimulation über den TZR (und die ERK-Kaskade) die Aktivierung der distalen NFAT-Bindungsstelle (Kempiak et al., 1999), an die proximale NFAT-Stelle bindet NFAT aber nur mit hoher Affinität zusammen mit AP1, einem Faktor dessen Aktivierung TZR- und CD28-Ligation benötigt. Ebenso ist für die Aktivierung von NF $\kappa$ B der Beitrag von CD28 erforderlich (Fraser et al., 1991; Jung et al., 1995). NF $\kappa$ B kann an das  $\kappa$ B-Enhancer Motiv des IL-2-Promoters binden, ebenso an das CD28RE. CD28RE ist eine c-Rel-Bindungsstelle mit benachbarter AP1-Stelle, die für die Aktivierung essentiell ist. Somit wird CD28RE kontrolliert von c-Rel, c-Fos und c-Jun. Die Kostimulation erfordernde JNK-Kaskade liefert dafür einen doppelten Beitrag: Zum einen durch die Bereitstellung von c-Jun für AP1 und zum anderen durch die Aktivierung von NF $\kappa$ B, da über die JNK-Kaskade der NF $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ B degradiert werden kann (Kempiak et al., 1999). c-Fos, die andere AP-1 Komponente, kann über den TZR-vermittelten ERK-Elk-Weg bereitgestellt werden (Gille et al., 1995).

### 1.6 Ziel der Arbeit

Nach wie vor wird diskutiert, ob CD28 die TZR-Signale nur unterstützt und verstärkt oder als Rezeptor mit eigenständigen Signalen angesehen werden kann. Da Kreuzvernetzung von CD28 unter physiologischen Bedingungen allein keine T-Zellaktivierung hervorruft, was aus der Sicht des Immunsystems auch lebenswichtig ist, da sonst die Antigen-spezifität der T-Zellantwort aufgehoben wäre, stellt sich das Problem, vom TZR und von CD28 ausgehende Signale zu unterscheiden. Die Entwicklung von Antikörpern spezifisch für CD28 der Ratte (Tacke et al., 1995; Tacke et al., 1997), von denen der eine, JJ316, ohne Kreuzvernetzung des TZR primäre T-Zellen zur Proliferation und IL-2-Produktion treibt, erlaubt, CD28-Signaltransduktion zu analysieren, ohne gleichzeitig den TZR stimulieren zu müssen. Ein zweiter CD28-spezifischer Antikörper, JJ319, besitzt nicht das mitogene Potential von JJ316, Kreuzvernetzung von CD28 mit JJ319 führt nicht zur T-Zellaktivierung. Allerdings ist dieser CD28-spezifische mAb in der Lage, zusammen mit einem TZR-spezifischen mAb T-Zellen durch Kostimulation zu aktivieren. Der Vergleich der Signalwege nach TZR-, Kostimulation und direkter CD28-Stimulation mit dem mitogenen mAb JJ316 sollte Aufschluß über die Fähigkeit von CD28 geben,

vom TZR-Weg unterschiedliche Signale zu generieren. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte dabei eine Konzentration auf die an der Membran und im Zytoplasma stattfindenden Ereignisse.