

5. SUMMARY

T cell activation is supposed to require two signals via engagement of the TCR and a costimulatory molecule. However, the signaling cascade of costimulatory molecules has remained elusive. Here, I provide evidence that CD44 supports proliferation as well as apoptosis mainly, if not exclusively, by enhancing signal transduction via the TCR/CD3 complex.

Blockade of CD44 interferes with mounting of an immune response. This has been demonstrated by the significantly decreased IL-2 production of a T helper line, when stimulated in the presence of a competing CD44 receptor globulin. To evaluate the underlying mechanism, CD44 was cross-linked by an immobilized antibody (IM7). Cross-linking of CD44 induces proliferation of peripheral T cells and apoptosis of thymocytes and a T helper line in the presence of subthreshold levels of anti-CD3. CD44-induced proliferation was accompanied by an upregulation of the activation markers CD25 and CD69 and an increased cytokine production. TCR-mediated apoptosis was accompanied by an upregulation of CD95 ligand and CD95 receptor, which could be greatly enhanced by costimulation via CD44. On the level of signal transduction, coligation of CD44 with CD3 resulted in a strong and sustained increase of early tyrosine phosphorylation events and upregulated downstream signal transduction pathways, such as the ras/ERK and the JNK signaling cascades. These pleiotropic effects of CD44 are due to its involvement in the most proximal events in TCR signaling, as demonstrated by a strong increase in the phosphorylation of the TCR ζ -chain and ZAP-70. Notably, cross-linking of CD44 was binding-site dependent and was only effective when supporting colocalization of the TCR/CD3 complex and CD44. Cross-linking of CD44 via immobilized IM7 also induced profound changes in cell morphology, characterized by strong adhesion, spreading and development of surface extensions, which were dependent on a functional tubulin and actin cytoskeleton. These cytoskeletal rearrangements were mediated by rac1, a small GTPase of the rho subfamily, and src-family kinases, two of which, fyn and lck, were found to be associated with CD44. By cross-linkage of CD44 these kinases were redistributed into so called lipid rafts. It is supposed that for T cell activation a relocation of the TCR/CD3 complex into the same membrane microdomains is required.

The data are interpreted in the sense that the costimulatory function of CD44 relies on its cooperativity with the TCR. Most likely by recruitment of phosphokinases CD44 significantly lowers the threshold for the initiation of signaling via the TCR. The requirement for immobilized anti-CD44, the necessity for neighbouring anti-CD3 and the dependence on the binding site of CD44 strongly suggest that the costimulatory mechanism involves cytoskeletal rearrangements, which facilitate recruitment and redirection of src-family protein kinases in glycolipid enriched membrane microdomains.

ZUSAMMENFASSUNG

Es ist bekannt, dass die Aktivierung von T-Zellen zwei Signale erfordert, die Bindung des T-Zell-Rezeptors (TZR) an den Peptid-Haupthistokompatibilitätskomplex und die Bindung sogenannter kostimulatorischer Moleküle an ihren Liganden. Über diese Rezeptor-Liganden-Interaktionen wird eine Kettenreaktion von Signalen ausgelöst, die die Aktivierung einer ganzen Reihe von Genen bewirken. Die Signale, die über die Liganden-Bindung des TZR in Gang gesetzt werden, sind weitgehend bekannt. Hingegen ist unser Wissen über das Funktionsprinzip kostimulatorischer Moleküle äußerst lückenhaft. In der vorliegenden Arbeit wird aufgezeigt, dass und auf welche Weise CD44, eines dieser kostimulatorischen Moleküle, maßgeblich zur Verstärkung der über den TZR transduzierten Signale beiträgt.

Ausgangspunkt der vorgelegten Studie war der Befund, dass eine Blockade von CD44, z.B. mittels eines kompetitiven löslichen CD44 Moleküls, die Antigen-induzierte Aktivierung einer T-Zelllinie blockieren kann. Zur Klärung des zugrunde liegenden Mechanismus wurde CD44 mittels immobilisierter Antikörper quervernetzt. Bei gleichzeitiger, suboptimaler Stimulation des T-Zell-Rezeptors induzierte die Quervernetzung von CD44 zum einen die Proliferation reifer T-Zellen, zum anderen den apoptotischen Zelltod von Thymozyten beziehungsweise einer T-Helferzelllinie. Erwartungsgemäß war die CD44-induzierte Proliferation mit der Expression sogenannter Aktivierungsmarker wie CD25 und CD69 und einer erhöhten Zytokinproduktion verbunden. Dementsprechend wurde bei CD44-induzierter Apoptose eine deutlich gesteigerte Expression des CD95 Moleküls und seines Liganden beobachtet. Die kostimulatorische Aktivität von CD44 war mit einer gesteigerten Tyrosinphosphorylierung und einer Hochregulation der ras/ERK und JNK Signalkaskaden verbunden. Da von allen beobachteten Veränderungen bekannt ist, dass sie auch über die Besetzung des TZR mit einem geeigneten Stimulus ausgelöst werden können, war es naheliegend anzunehmen, dass sich die kostimulatorische Funktion von CD44 auf eine Verstärkung der TZR-vermittelten Signale zurückführen lässt. Der Befund einer gesteigerten Phosphorylierung der TZR- ζ -Kette und der ZAP-70 Kinase, über die die Aktivierung von T-Zellen eingeleitet wird, unterstützt nachhaltig diese Hypothese. Hinzu kommen zwei weitere Befunde: 1. Die Quervernetzung von CD44 führt nur unter der Voraussetzung einer räumlichen Annäherung von CD44 und dem TZR zu einer Unterstützung der T-Zellaktivierung. Diese findet in sogenannten "Rafts" statt; 2. Die Quervernetzung von CD44 führt zu Adhäsion und Zellspreizung, bedingt durch ein Rearrangement des Zytoskeletts an dem die GTPase rac1 und die src-Kinasen fyn und lck beteiligt sind. Diese beiden Kinasen sind konstitutiv mit CD44 assoziiert. Bei Quervernetzung des Moleküls und Reorganisation des Zytoskeletts wird eine deutliche Anreicherung von fyn und lck in den Rafts, also in direkter Nachbarschaft zum TZR, beobachtet.

Diese Daten unterstützen nachhaltig meine Arbeitshypothese, dass sich die kostimulatorische Funktion von CD44 auf eine kooperative Aktivität mit dem TZR zurückführen lässt. Es ist wahrscheinlich, dass durch Rekrutierung der Kinasen Lck und Fyn der Schwellenwert für die Initiierung von Signalen über den TZR signifikant erniedrigt wird. Die Rekrutierung dieser Kinasen wird durch eine Reorganisation des Zytoskeletts, die mit der Einbringung dieser Kinasen in den Bereich der Rafts einhergeht, ermöglicht. Inwieweit die erhobenen Befunde zur kostimulatorischen Aktivität des Adhäsionsmolekls CD44 im Sinne eines Verstärkungsmechanismus eingeleitet durch räumliche Anordnung generelle Gültigkeit haben, kann noch nicht abschließend beantwortet werden. Die Mehrheit der in jüngster Zeit erhobenen Befunde zur Klärung des Funktionsprinzips kostimulatorischer Moleküle bestätigt jedoch das Prinzip nachbarschaftlicher Kooperation.