

4. Ergebnisse

4.1 Von Superantigenen induzierte T-Zellaggregation

Bakterielle Enterotoxine (Superantigene) reagieren mit T-Zellen in einer T-Zellrezeptor V β -spezifischen Weise, d.h. bestimmte Superantigene binden sich an bestimmte TcR V β -Ketten und sie sind deshalb in der Lage, bis zu 20% einer gegebenen T-Zellpopulation zu aktivieren. Eine rasche und einfache Art die Reaktivität von bestimmten T-Zellen mit verschiedenen Superantigenen zu untersuchen ist deshalb einen Aggregationsversuch durchzuführen. T-Zellen werden dazu in einer 24-Loch Platte mit Modulatoren und den verschiedenen Superantigenen in unterschiedlichen Konzentrationen und für verschiedene Zeitintervalle inkubiert (Abbildung 4.1.1)

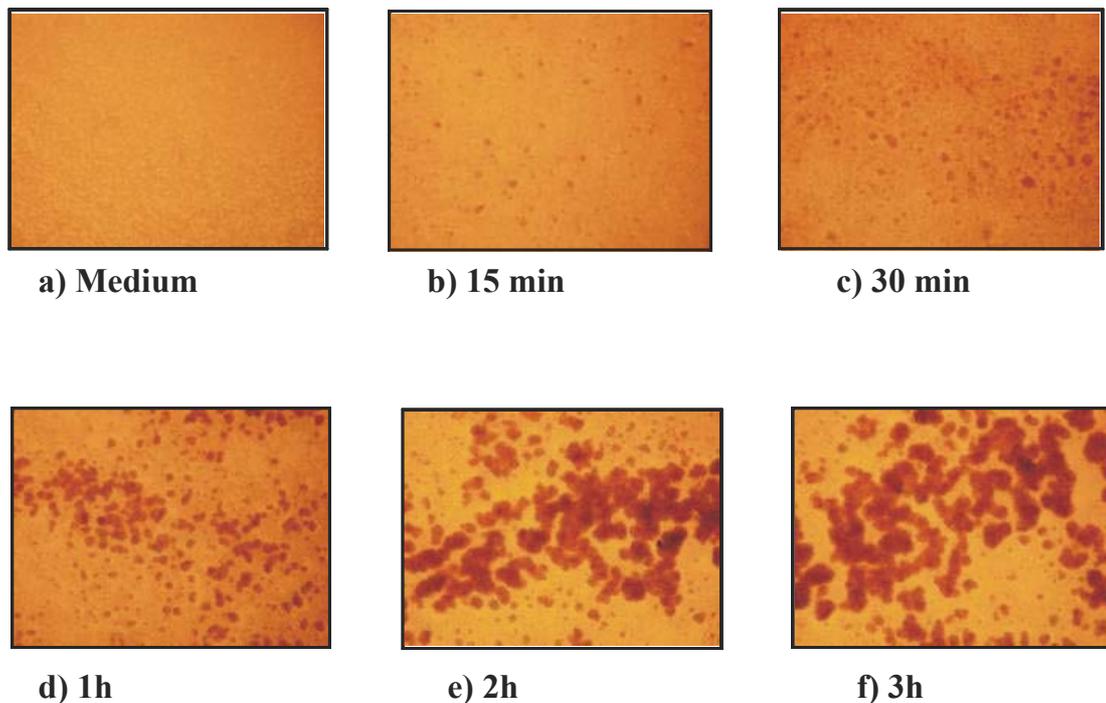


Abb. 4.1.1 Von Superantigenen induzierte T-Zellaggregation (Kinetik)

0.5×10^6 Alloaktivierte, humane T-Zellen wurden für die angezeigten Zeitpunkte mit SEA ($1 \mu\text{g/ml}$) in 1 ml Medium inkubiert und das Aggregationsverhalten mittels einer digitalen Kamera dokumentiert.

Bereits nach 15 min zeigte sich eine durch Superantigene induzierte T-Zellaggregation. Nachfolgend wurde die Konzentration des Superantigens titriert (Abb. 4.1.2)

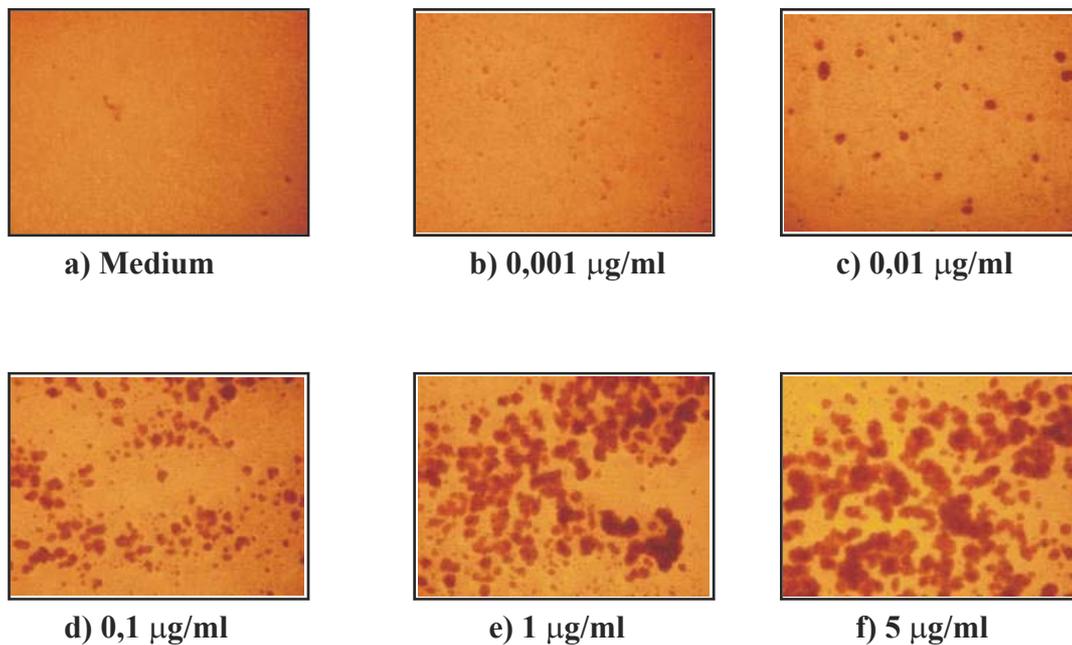


Abb. 4.1.2 Von Superantigenen induzierte T-Zellaggregation (Titration)

0.5×10^6 Alloaktivierte, humane T-Zellen wurden mit SEA in den angezeigten Konzentrationen für 2h in 1 ml Medium inkubiert und das Aggregationsverhalten mittels einer digitalen Kamera dokumentiert.

Es zeigte sich, dass SEA schon ab einer Konzentration von 10 ng/ml eine deutliche T-Zellaggregation induzieren kann. Dieses Aggregationsverhalten war nicht abhängig vom Adhäsionsmolekül LFA-1, da alloaktivierte T-Zellen eines LFA-1 negativen Patienten das gleiche Aggregationsverhalten zeigten.

Superantigene können T-Zellaggregationen durch direktes *crossbinding* von Tcr und MHC auf zwei verschiedenen T-Zellen aktivieren. Hierbei spielt die Aktivierung von verschiedenen Adhäsionsmolekülen sicher eine Rolle.

Um den Einfluss von Adhäsionsmolekülen auf das von Superantigenen induzierte Aggregationsverhalten zu untersuchen, wurden verschiedene blockierende Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle verwendet (siehe auch Ergebnisse 4.5.8).

| | Hemmung der Adhäsion ? |
|-------------------|------------------------|
| anti CD2 | nein |
| anti CD11a | nein |
| anti CD29 | nein |
| anti CD54 | ja |

Tabelle 4.1.3 Einfluss von Adhäsionsmolekülen auf SEA-induzierte T-Zellaggregation

Alloaktivierte T-Zellen (3×10^6 /Probe) wurden mit 10^6 Zellen/ml in 24-Loch-Platten (Nunc, Dänemark) für 1h mit den entsprechenden blockierenden Antikörpern (25 $\mu\text{g/ml}$, Leinco, Deutschland) vorinkubiert und danach mit SEA (1 $\mu\text{g/ml}$) für 3h behandelt. Das Aggregationsverhalten wurde nach 3h unter einem Mikroskop qualitativ festgehalten.

Weder LFA-1, noch CD2, CD29 oder CD11a spielen bei der SEA-induzierten T-Zellen Aggregation eine entscheidende Rolle. Nur ein blockierender Antikörper gegen ICAM1 (CD54) war in der Lage, die SEA-induzierte T-Zellen Aggregation zu verhindern.

Da Superantigene *in vivo*, je nach Applikation, verschiedene Reaktionen (Proliferation, Apoptosis, Anergie usw.) hervorrufen können, haben wir im Folgenden den Einfluss von SEA auf das durch Zytokine induzierte Wachstumsverhalten von alloaktivierten T-Zellen untersucht.

4.2 Proliferationsverhalten

Um den Einfluss von Superantigen auf die Zytokin-induzierte Proliferation von alloaktivierten humanen T-Zellen zu untersuchen, wurden ^3H -Thymidin-Inkorporationsversuche durchgeführt. Dazu wurden alloaktivierte T-Zellen mit Medium, SEA, IL-2, IL-15 oder Kombinationen der Zusätze inkubiert (Abb. 4.2.1). Um die Zytokinspezifität des SEA-Effektes zu kontrollieren, wurde als Kontrolle PMA als unspezifisches Mitogen verwendet.

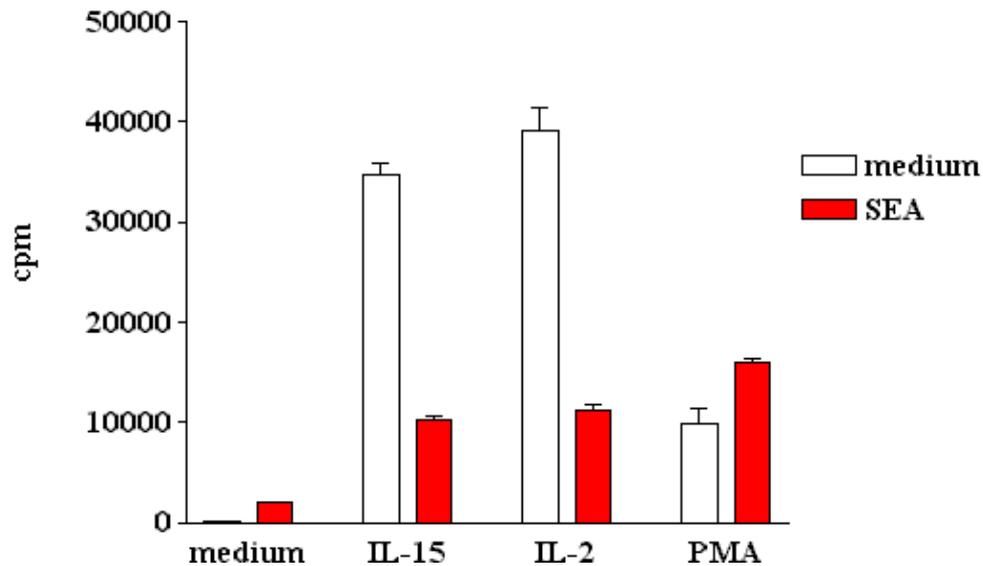


Abb. 4.2.1 Superantigen moduliert durch Zytokine induzierte T-Zellproliferation. Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4h gehungert, mit Medium oder SEA (100 ng/ml) 3h vor der Zugabe von IL-2 (100 U/ml), IL-15 (15 ng/ml) oder PMA (10 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde der ^3H -Thymidin Einbau nach 48h gemessen (cpm = counts per minute).

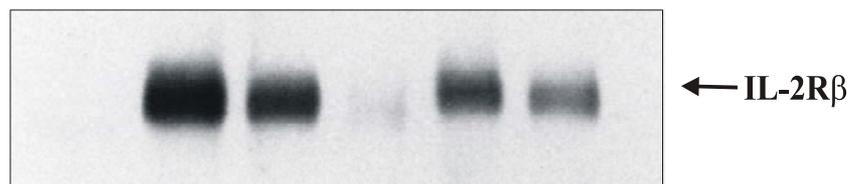
Die Inkubation mit Superantigen reduzierte die IL-2 oder IL-15 induzierte T-Zellproliferation um 70% bzw. 71%. Die Induktion der Proliferation von T-Zellen durch den Phorbolster PMA, einem unspezifischen Aktivator der Proteinkinase C (PKC), wurde dagegen nicht von Superantigen gehemmt, sondern eher verstärkt.

Die proliferationshemmende Wirkung von Superantigen ist daher spezifisch für die durch Zytokine induzierte Proliferation und ist kein allgemeiner toxischer Effekt von SEA auf T-Zellen.

Eines der ersten Signale, das zur Übermittlung des proliferativen Signal von IL-2 oder IL-15 aktiviert wird, ist die Phosphorylierung der IL-2R β Kette (CD122). Der zytoplasmatische Teil von CD122 trägt Bindungsstellen für Src-Kinasen, PI3-K, Jak-Kinasen und Stat-Proteine, und ist für die Übermittlung des proliferativen Signals unabdingbar. Eine Ligation des Zytokinrezeptors führt zu einer raschen Phosphorylierung von Stat-Bindungsmotiven der IL-2R β Kette und zur Aktivierung verschiedener Signalwege.

Um zu untersuchen, ob sich der antiproliferative Effekt von SEA auch auf die Phosphorylierung der β -Kette auswirkt, haben wir T-Zellen mit SEA vorinkubiert, mit IL-2 und IL-15 stimuliert, und die Phosphorylierung der β -Kette analysiert (Abb. 4.2.2)

| | | | | | | |
|--------------|---|---|---|---|---|---|
| IL-2 | - | + | - | - | + | - |
| IL-15 | - | - | + | - | - | + |
| SEA | - | - | - | + | + | + |



**Immunpräzipitation (IP) mit Phosphotyrosin (4G10)
Western Blot (WB) mit anti-IL-2R β**

Abb. 4.2.2. Durch SEA induzierte Modulation der CD122 Phosphorylierung.

Alloaktivierte T-Zellen wurden gehungert, mit SEA (100 ng/ml) für 4h vorinkubiert und mit IL-2 (500 U/ml) oder IL-15 (15 ng/ml) für 15 min stimuliert. Lysierte Zellen wurden mit Anti-Phosphotyrosin (4G10) präzipitiert und anschließend das SDS-PAGE mit anti-CD122 geblottet. Unspezifische Immunglobulinbanden markierten, dass äquivalente Probenmengen aufgetragen wurden (nicht dargestellt).

Man sieht eine klare Reduktion der durch IL-2 und IL-15 induzierten CD122-Phosphorylierung nach Inkubation mit SEA, was einer verminderten Signalaktivierung gleichkommt.

Die durch IL-2 induzierte Proliferation von T-Zellen wird auch durch die differentielle Expression der einzelnen IL-2R Ketten reguliert. Deshalb haben wir als nächstes den Einfluss von Superantigenen auf die Oberflächenexpression der einzelnen IL-2R Ketten untersucht.

4.3 Von SEA induzierte Modulation der IL-2R Ketten

Alloaktivierte T-Zellen wurden mit SEA inkubiert und die Kinetik der Oberflächenexpression der einzelnen IL-2R Ketten (α , β + γ -Kette) mittels *flow cytometry* untersucht (Abb. 4.3.1)

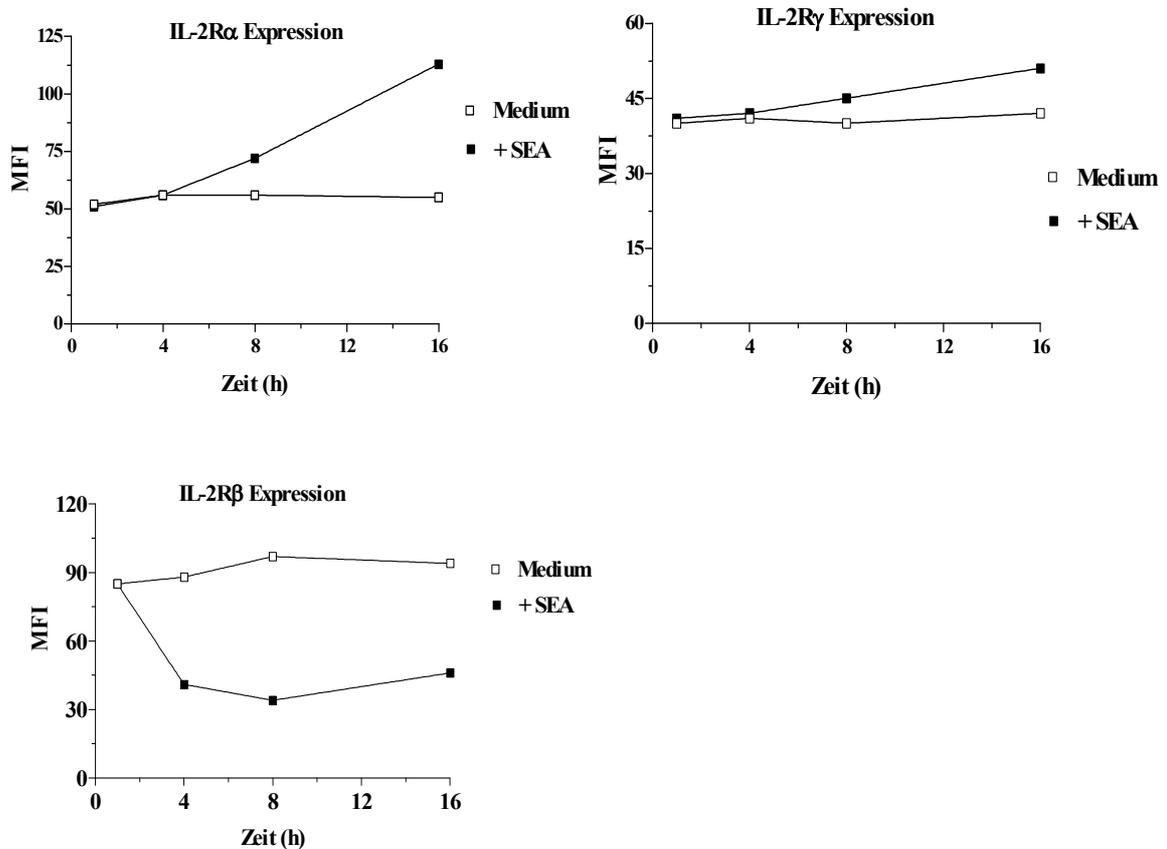


Abb. 4.3.1 Durch SEA induzierte Modulation der IL-2 Rezeptor Ketten.

Alloaktivierte T-Zellen wurden für verschiedene Zeitpunkte mit SEA (100 ng/ml) inkubiert und die Expression des IL-2R mittels *flow cytometry* analysiert. Es wurden phytoeritrimarkierte (PE) Antikörper gegen CD25, CD132 und CD122 verwendet. Die Expression einer unspezifischen Isotypenkontrolle wurde von allen Werten subtrahiert. Dargestellt wurde hier ein repräsentatives Experiment von drei identischen Experimenten (MFI = mean fluorescence intensity).

SEA induziert eine Reduktion der CD122-Oberflächenexpression um 65% nach 8h, die Expression der γ -Kette wird leicht (um 12% nach 8h) erhöht, während die Expression von CD25 deutlich (um 101% nach 16h) erhöht wird. Die Expression von CD25 gilt als ein Zeichen für T-Zellen Aktivierung.

Eine Titration von SEA ergab ein dem Aggregationsversuchen (siehe Abb. 4.1.2.) ähnliches Konzentrationsfenster für den Effekt von SEA auf die Expression von CD122 (Abb. 4.3.2).

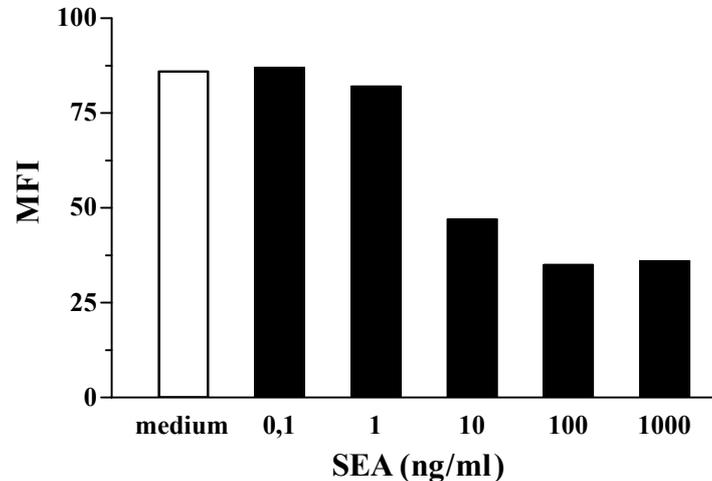


Abb. 4.3.2 Titration von SEA und CD122 Expression.

Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4h gehungert und mit verschiedenen Konzentrationen SEA für 8h inkubiert. Danach wurde die CD122 Expression mittels *flow cytometry* gemessen. Die Bindung einer unspezifischen Isotypenkontrolle wurde als Hintergrund abgezogen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei identischen Experimenten.

Um zu untersuchen welche Signalübertragungswege an der Übermittlung der Proliferationsreduktion sowie der Modulation der IL-2R Ketten-Expression beteiligt sind, haben wir nachfolgend verschiedene spezifische Inhibitoren verwendet.

4.4 Von Superantigenen aktivierte Signalwege

Beide Bindungsstellen für Superantigen auf T-Zellen, der TcR und die MHC Klasse II Moleküle, sind in der Lage nach Stimulation PLC γ 1 zu aktivieren und intrazelluläres Ca²⁺ freizusetzen. Intrazelluläres Ca²⁺ steuert als *second messenger* unter anderem die Aktivität von Calcineurin (PP2B). Da bekannt ist, dass verschiedene TcR-induzierte T-Zellreaktionen durch Cyclosporin A (cyA), einem Inhibitor von Calcineurin beeinflusst werden, setzten wir ebenfalls diesen Calcineurin-Inhibitor ein. Es zeigte sich, dass cyA die durch SEA induzierte Modulation der CD122 Expression inhibieren konnte (Abb. 4.4.1) und den Effekt von SEA um bis zu 59,8% herabsetzte. Die Titration ergab eine nontoxische, wirkungsvolle cyA-Konzentration von 100 ng/ml (Abb. 4.4.2)

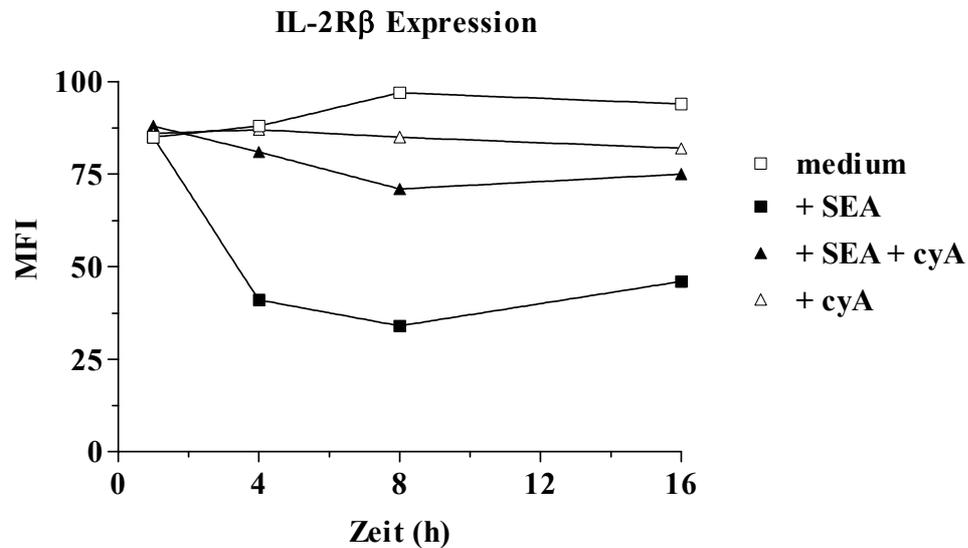


Abb. 4.4.1 CyA blockiert SEA Effekt auf die CD122 Expression.

Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4h gehungert, für eine Stunde mit cyA (100 ng/ml) vorinkubiert, und für verschiedene Zeitpunkte mit SEA (100 ng/ml) inkubiert. Die Expression von CD122 wurde mittels *flow cytometry* analysiert (Anti-CD122-PE). Die Expression einer unspezifischen Isotypkontrolle wurde von allen Werten subtrahiert. Dargestellt wurde ein repräsentatives Experiment von drei identischen Experimenten (MFI = mean fluorescence intensity).

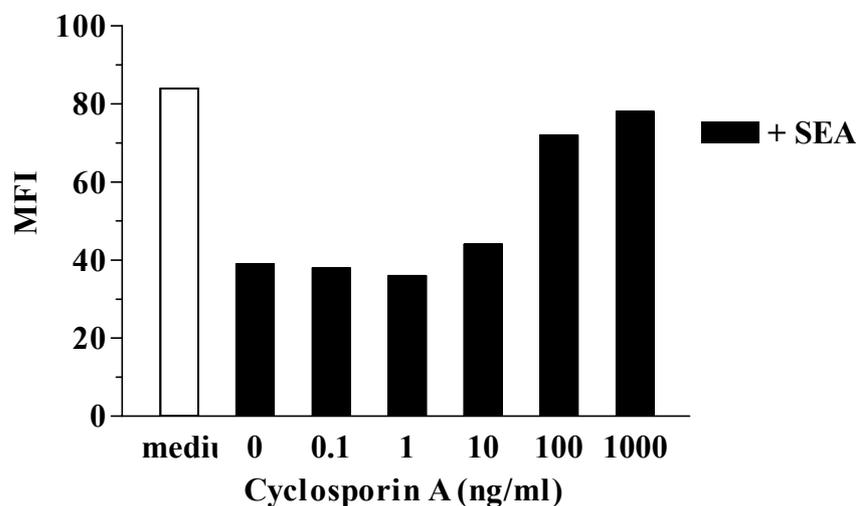


Abb. 4.4.2 Titration von Cyclosporin A

Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4h gehungert und wie dargestellt für eine Stunde mit verschiedenen cyA-Konzentrationen vorinkubiert und für 4h mit SEA (100 ng/ml) inkubiert. Die Expression von CD122 wurde mittels *flow cytometry* analysiert (Anti-CD122-PE). Die Expression einer unspezifischen Isotypkontrolle wurde von allen Werten subtrahiert. Dargestellt wurde hier ein repräsentatives Experiment von drei identischen Experimenten (MFI = mean fluorescence intensity).

Der PP2B-Inhibitor Cyclosporin A ist spezifisch in der Lage zeit- und konzentrationsabhängig die durch SEA induzierte Modulation des IL-2 Rezeptors zu hemmen. Andere spezifische Inhibitoren für verschiedene Signalwege waren dagegen nicht in der Lage die von SEA induzierte Modulation des IL-2 Rezeptors zu beeinflussen (Abb. 4.4.3)

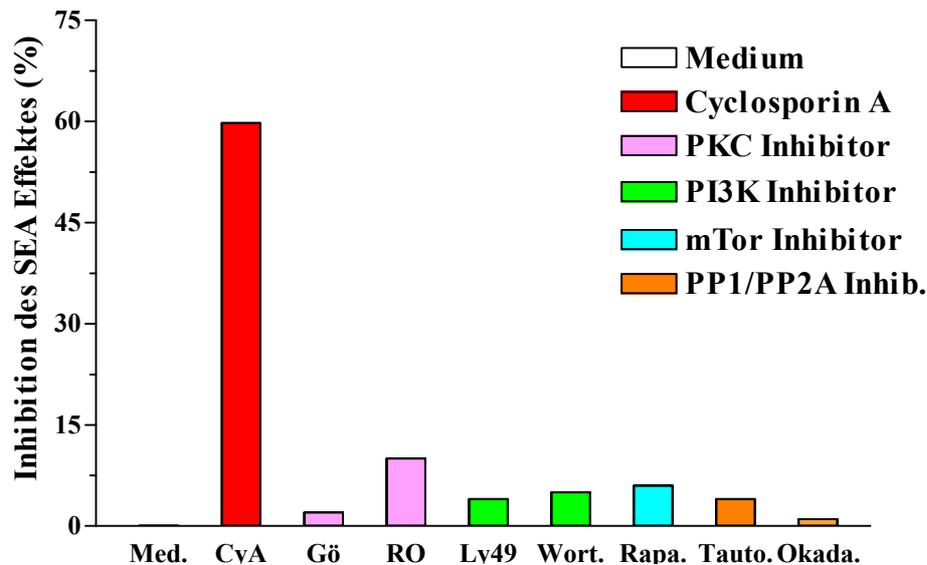


Abb. 4.4.4. Inhibition des SEA-Effektes auf die CD122 Expression.

Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4h gehungert, wie dargestellt für eine Stunde mit verschiedenen Inhibitoren (Cyclosporin A 100 ng/ml, Gö7874 1 μ M, RO318220 100 ng/ml, Ly294002 40 μ g/ml, Wortmannin 5 μ M, Rapamycin 50 ng/ml, Tautomycin 50 nM, Okadaic Acid 25 nM) vorinkubiert und danach für 4h mit SEA (100 ng/ml) inkubiert. Die Expression von CD122 wurde mittels *flow cytometry* analysiert (Anti-CD122-PE). Die Expression einer unspezifischen Isotypkontrolle wurde von allen Werten abgezogen. Dargestellt wurde ein repräsentatives Experiment von drei identischen Experimenten.

Somit wird deutlich, dass von den hier getesteten Signalwegen nur die Ca^{2+} -abhängige Protein Phosphatase 2B (Calcineurin) an der durch SEA induzierten Modulierung der IL-2R β Ketten Expression beteiligt ist. Cyclosporin A wirkt auch hemmend auf den Effekt von SEA auf die durch Zytokine induzierte T-Zellproliferation. Interessanterweise sind beide Effekte von SEA, der hemmende Effekt auf die Zytokin-induzierte Proliferation, und der verstärkende Effekt auf die PMA-induzierte Proliferation (siehe Abb. 4.2.1), Cyclosporin A sensitiv (Abb. 4.4.5).

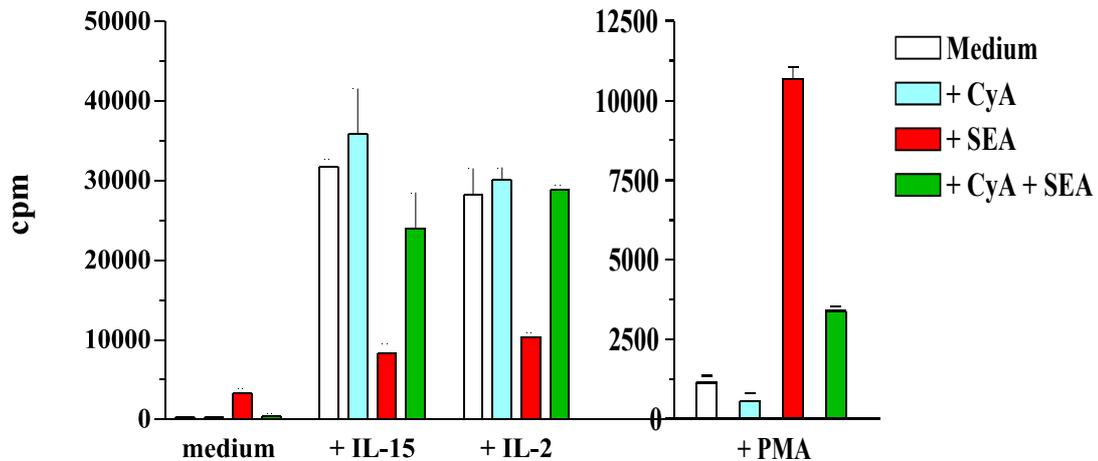


Abb. 4.4.5 Die durch Superantigene modifizierte T-Zellproliferation ist cyA sensitiv. Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4h gehungert, mit Medium, SEA (100 ng/ml) oder Cyclosporin A (100 ng/ml) 3h vor der Zugabe von IL-2 (100 U/ml), IL-15 (15 ng/ml) oder PMA (10 ng/ml) inkubiert. Der ^3H -Thymidin Einbau wurde nach 48h gemessen (cpm = counts per minute).

T-Zellen eines Patienten mit Psoriasis dienten als Beispiel für T-Zelllinien die, wenn sie mit SEA und mit EBV-transformierten B-Zellen als APC's zusammen inkubiert wurden, nicht proliferativ auf SEA reagierten. Diese T-Zelllinien zeigten ebenfalls keine SEA-induzierte Modulation der IL-2R β Kette und wurden als SEA *nonresponder* bezeichnet. Erstaunlicherweise zeigten diese Zelllinien jedoch ein verstärktes durch Zytokine induziertes Wachstum (Abb. 4.4.6.)

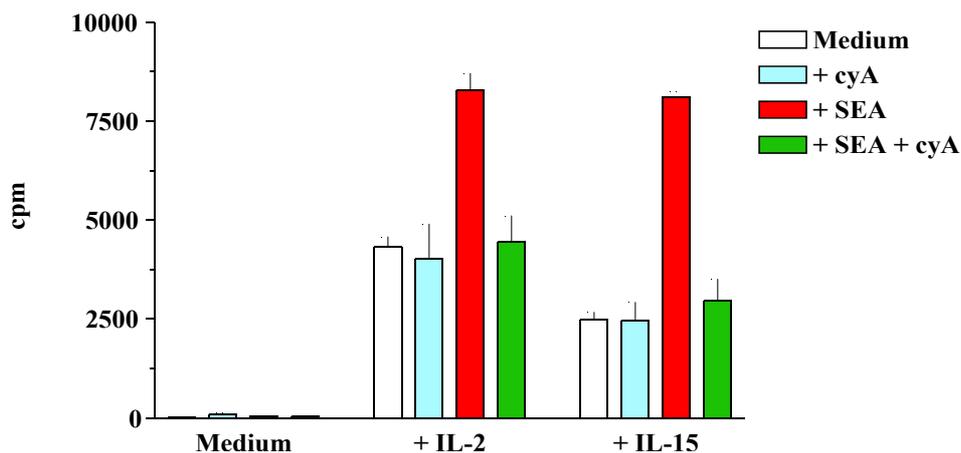


Abb. 4.4.6. SEA verstärkte Zytokin-induziertes Wachstum in SEA-*nonresponders*. Eine Psoriasis T-Zelllinie (Psor2a) wurden mit Medium, SEA (100 ng/ml) oder Cyclosporin A (100 ng/ml) 3h vor der Zugabe von IL-2 (100 U/ml) oder IL-15 (15 ng/ml) inkubiert. Der ^3H -Thymidin Einbau wurde nach 48h gemessen.