

#### 4.5 SEA und Stat-Proteine

Superantigene modifizieren die Oberflächenexpression und die einleitende Phosphorylierung der IL-2R $\beta$  Kette. Ein Signalweg, der unmittelbar durch IL-2R $\beta$  und  $\gamma$ -Kettenphosphorylierung reguliert wird, ist der Jak/Stat-Signalweg.

Rezeptorassoziierte Jak-Kinasen werden durch Rezeptor-Liganden Bindung aktiviert und phosphorylieren danach Stat-Bindungsmotive in der  $\beta$ -Kette und der  $\gamma$ -Kette des IL-2Rs. Stat-Proteine (hier Stat3 und Stat5) binden an die phosphorylierten Abschnitte der Rezeptorketten und werden selbst durch Jak-Kinasen phosphoryliert. Die nun aktivierten Stat-Proteine dimerisieren und translozieren in den Zellkern (*Nukleus*).

Wir wollten wissen, ob SEA-Inkubation von humanen T-Zellen auch die Signale des Jak/Stat-Signalweges beeinflussen können.

Dazu wurden alloaktivierte T-Zellen mit SEA oder IL-2 inkubiert, T-Zellysate mit Anti-Phosphotyrosin Antikörpern präzipitiert, und mit Anti-Stat3 Antikörpern geblottet (Abb. 4.5.1).

Die Stimulation des T-Zellrezeptors mit SEA oder Anti-TcR Antikörpern zeigte nach einer Stunde eine transiente Stat3-Aktivierung durch Tyrosinphosphorylierung. Diese Stat-Aktivierung ist in der Kinetik und der Stat-Spezifität deutlich verschieden zu der IL-2-induzierten Aktivierung von Stat3 und Stat5.

Da eine direkte, durch Signale des T-Zellrezeptors vermittelte Stat-Aktivierung durch Tyrosinphosphorylierung nicht bekannt war, versuchten wir den Mechanismus dieser Reaktion näher zu untersuchen. Wir fanden eine SEA-induzierte Stat3-Phosphorylierung von Serin, die schon nach 10 min deutlich wurde (Abb. 4.5.2)

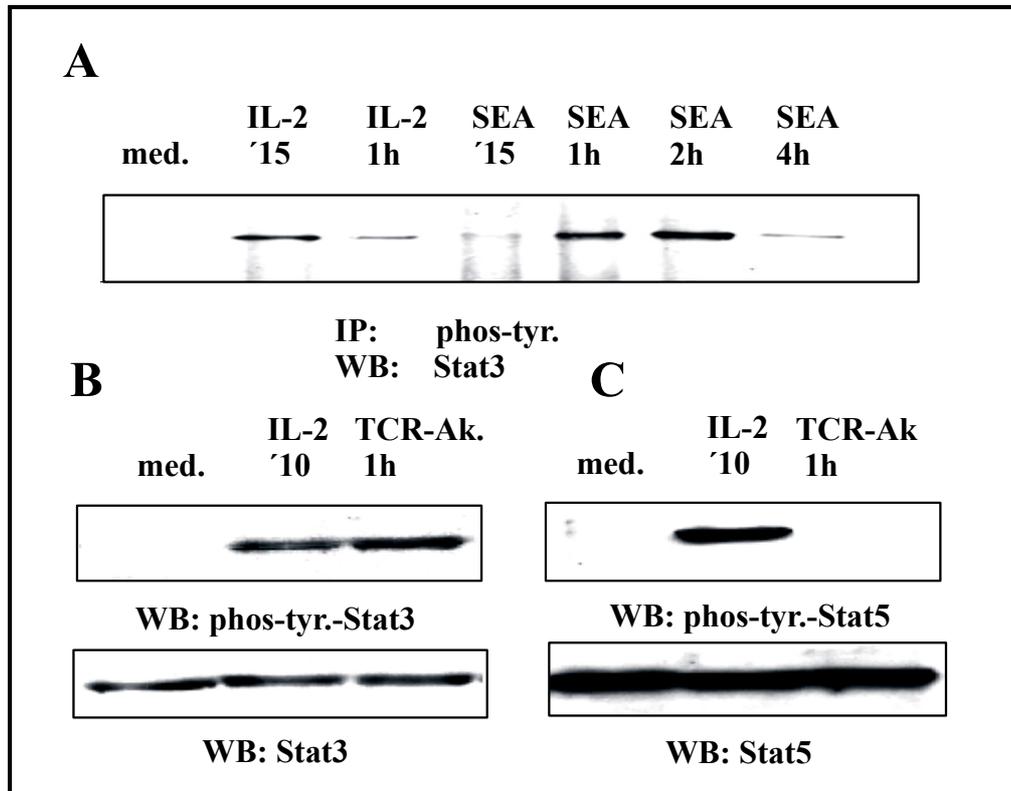


Abb. 4.5.1 Durch SEA induzierte Phosphorylierung von Stat3.

**A)** Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4h *gehungert* (frisches 5% FCS Medium ohne Zytokine), danach mit IL-2 (500 U/ml) oder SEA (100 ng/ml) inkubiert, mit Anti-Phosphotyrosin (4G10) immunopräzipitiert und mit Anti-Stat3 (Transduction Labs) geblottet.

**B)** Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4h *gehungert*, mit IL-2 (500 U/ml) oder anti-TcR Antikörper (F101.01, 1 µg/ml) inkubiert, und mit Anti-Phosphotyrosin-Stat3 (Y705) oder **C)** Anti-phosphotyrosin-Stat5 (Y694) geblottet. Blot B und C wurden mit Anti-Stat3 (Transduction Labs) und Anti-Stat5 (Transduction Labs) *nachgeblottet*, um eine gleichmäßige Beladung des Gels in allen Proben zu visualisieren.

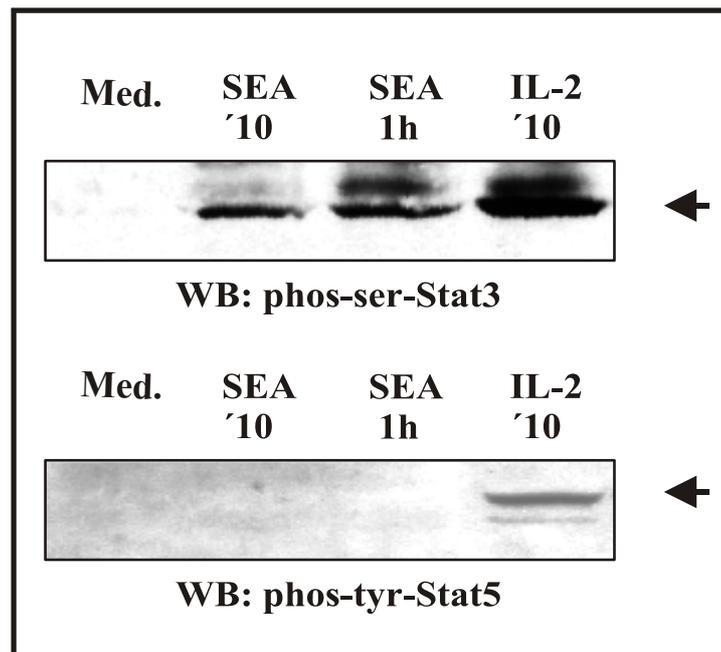


Abb. 4.5.2 Durch SEA induzierte schnelle Serinphosphorylierung von Stat3.

Alloaktivierte T Zellen wurden für 4h *gehungert*, danach mit IL-2 (500 U/ml) oder SEA (100 ng/ml) inkubiert und mit Anti-Phosphoserin-Stat3 (Santa Cruz) oder Anti- Phosphotyrosin-Stat5 geblottet. Die Blots wurden mit Anti-Stat3 (Transduction Labs) und Anti-Stat5 (Transduction Labs) *nachgeblottet*, um eine gleichmässige Probenverteilung zu gewährleisten (nicht dargestellt).

Die Phosphorylierung von Stat3 durch SEA war ein Reaktion, die nur indirekt mit dem gängigen Modell der Stat-Aktivierung durch Zytokine in Einklang zu bringen ist. Wir untersuchten daher mehrere verschiedene alloaktivierte T-Zelllinien (von verschiedenen Donoren) und analysierten die durch SEA induzierte Stat3-Aktivierung.

Wir fanden mit Hilfe verbesserter phosphortyrosinspezifischer Anti-Stat-Antikörper in bestimmtem T-Zelllinien eine rasche SEA- oder TcR-induzierte Phosphorylierung von Stat3 an Tyrosin- und Serinresten (Abb. 4.5.3). Der Fund, dass SEA (oder TcR-Stimulation) in einigen T-Zelllinien eine rasche (nach einer Minute) Phosphorylierung von Stat3 anTyrosin und Serin induzieren kann, war überraschend.

Die Kinetik und die Stat-Spezifität der durch SEA induzierten Stat-Aktivierung zeigte deutliche Unterschiede zu der IL-2-induzierten Stat-Aktivierung. Die extrem schnelle Aktivierung von Stat-Proteinen durch Stimulation des T-Zellen Rezeptors ließ sich jedoch nur in wenigen (2 von 10) der getesteten, alloaktivierte T-Zelllinien feststellen.

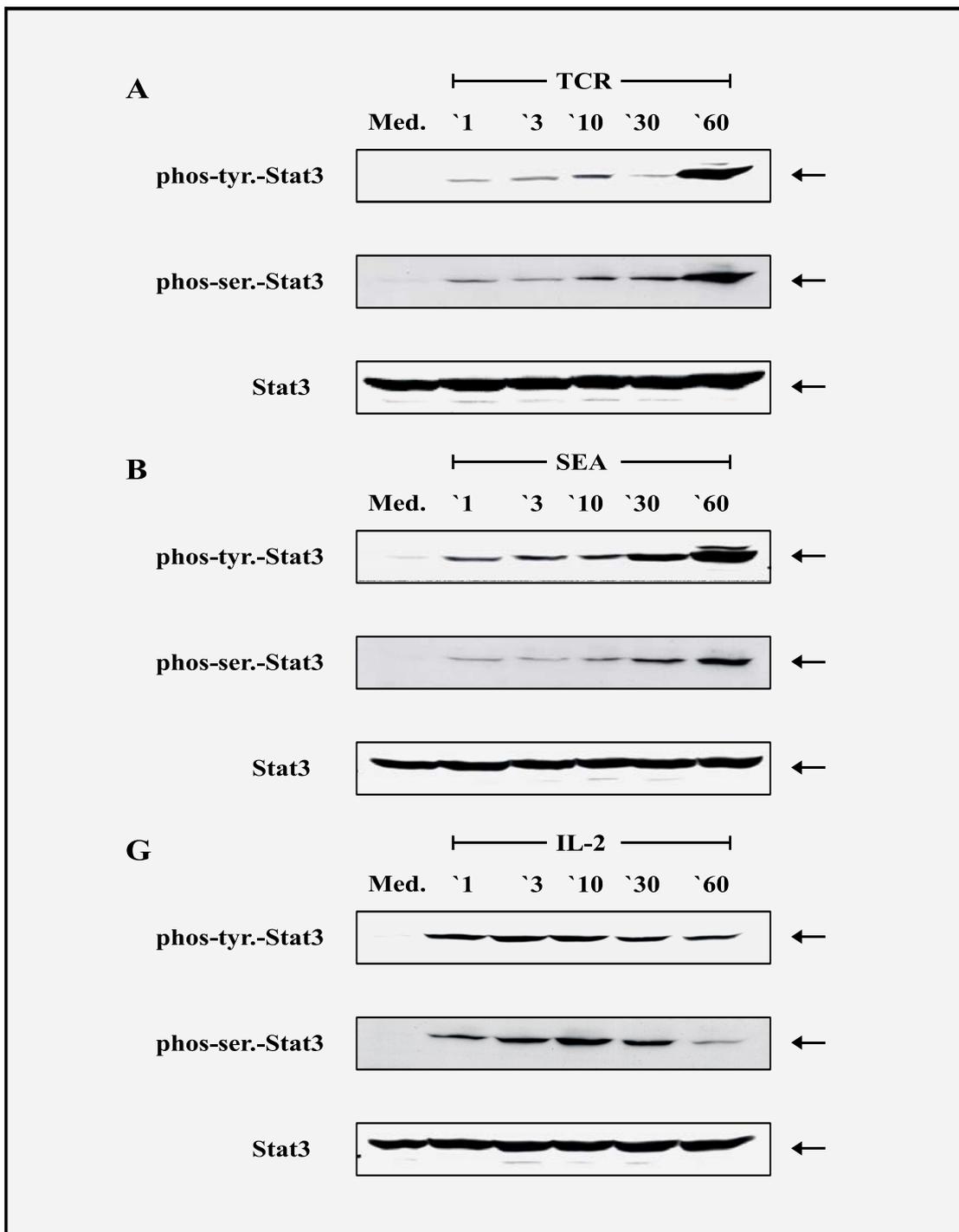


Abb. 4.5.3 Durch SEA induzierte schnelle Stat3-Phosphorylierung.

Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4h *gehungert* (frisches 5% FCS Medium ohne Zytokine) und mit Medium oder **A**) Anti-TcR Antikörper (F101.01, 1 µg/ml) **B**) SEA (1 µg/ml) und **C**) IL-2 (500 U/ml) inkubiert. Nach SDS-PAGE wurde mit Anti-Phosphotyrosin-Stat3, Anti-Phosphoserin-Stat3 und Anti-Stat3 (Transduktion Labs) geblottet. Die Kontrolle mit Anti-Stat3 zeigte eine gleichmässige Beladung der Gele in allen Proben.

Als nächstes wollten wir untersuchen, ob die durch SEA induzierte Stat-Phosphorylierung auch wirklich zu DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren führt. Dazu synthetisierten wir Biotin-gekoppelte DNA-Oligo-Nukleotide (*Bio-Oligos*), mit Sequenzen für bekannte Stat3-Bindungsmotive aus dem ICAM- und dem IL-2R $\alpha$  Promoter. Diese Bio-Oligos sollten in der Lage sein mit Avidin-Agarose-Perlen aktive phosphorylierte Stat-Proteine zu präzipitieren. Dazu wurden alloaktivierte T-Zellen mit SEA oder IL-2 behandelt, die Bio-Oligos wurden zur Immunopräzipitation benutzt, und anschliessend wurden die Proben nach SDS-PAGE mit Anti-Stat3 Antikörpern geblottet (Abb. 4.5.4).

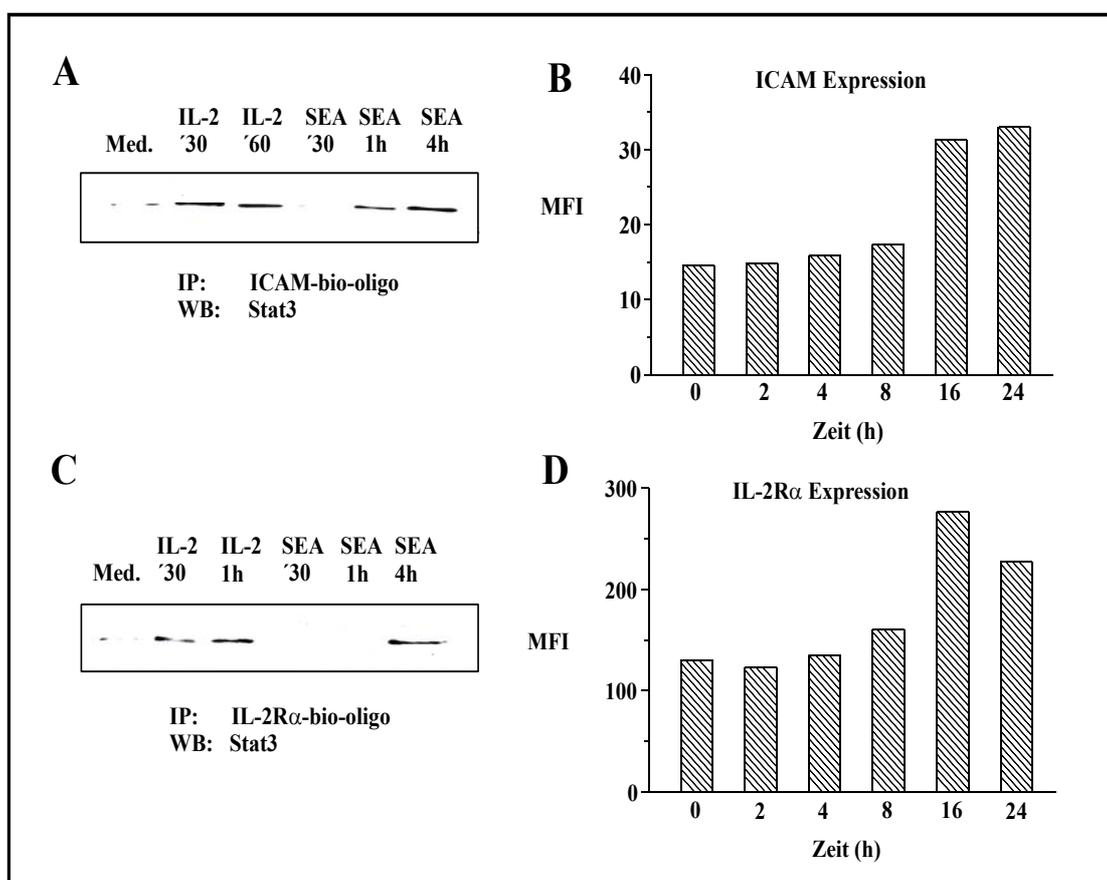


Abb. 4.5.4. SEA induziert biologisch-aktives Stat3

**A)** und **C)** Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4h gehungert, mit IL-2 (500 U/ml) oder SEA (100 ng/ml) inkubiert, mit 144 pmol von Biotin-gekoppelten Oligo-Nukleotids des ICAM- oder des IL-2R $\alpha$  Promotors (DNA-Technologies, Denmark) immunpräzipitiert und danach mit Anti-Stat3 geblottet (Transduction Labs). **B)** und **D)** FACS-Analyse der Expression von ICAM und IL-2R $\alpha$   
Alloaktivierte T-Zellen wurden gehungert, mit SEA inkubiert (100 ng/ml) inkubiert und die Kinetik der Expression von ICAM (Anti-CD54-PE) und IL-2R $\alpha$  (Anti-CD25- PE) mittels FACS-Analyse bestimmt.

SEA induzierte nicht nur die Tyrosinphosphorylierung von Stat3, sondern auch die biologische Aktivität des Transkriptionsfaktors. Das wurde durch Bindung von aktiviertem Stat3 an Biotin-gekoppelte Oligo-Nukleotide des ICAM- und des IL-2R $\alpha$  Promotors nachgewiesen (Abb. 4.5.4 A und C).

Inkubation mit SEA führte parallel zur positiven Regulation der Oberflächenexpression dieser zwei Rezeptoren auf alloaktivierten humanen T-Zellen. (Abb. 4.5.4 B und C).

Um mehr über die Signalwege zu erfahren, die an der durch SEA vermittelten Stat3-Aktivierung beteiligt sind, testeten wir verschiedene spezifische Signaltransduktionsinhibitoren auf ihre Fähigkeit, die SEA-induzierte Stat3-Aktivierung zu hemmen (Abb. 4.5.5.). Dabei zeigte sich, dass nur der src-Kinase Inhibitor PP1 (neben Cyclosporin A) in der Lage war, die SEA-induzierte Stat3 Aktivierung vollständig zu hemmen. Die IL-2-induzierte Stat3-Phosphorylierung wurde jedoch nicht von PP1 gehemmt (Abb. 4.5.5. A).

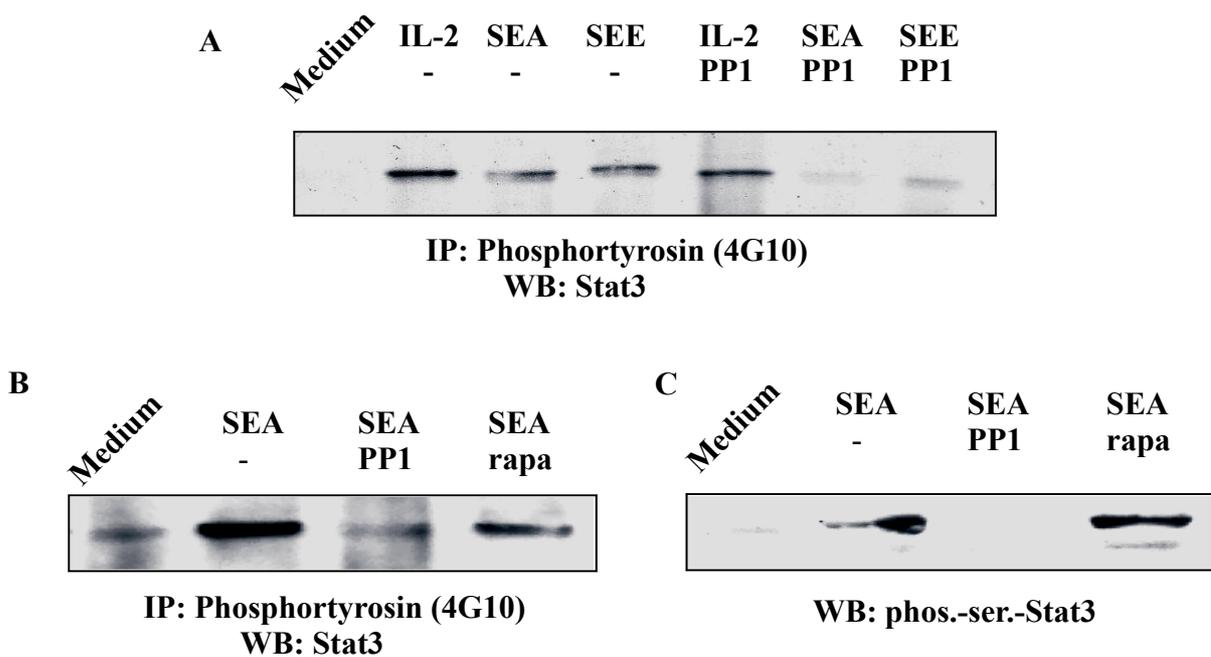


Abb. 4.5.5. PP1 hemmt die durch SEA induzierte Stat3-Aktivierung.

Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4h gehungert, mit PP1 (10  $\mu$ M) oder Rapamycin (25 ng/ml) für 1h vorinkubiert und dann mit Medium, mit IL-2 (500 U/ml) für 15min, mit SEA (1 $\mu$ g/ml) oder SEE (1 $\mu$ g/ml) für 1h wie dargestellt inkubiert. Die Proben wurden lysiert, mit Anti-Phosphotyrosin (4G10) präzipitiert und nach SDS-PAGE mit Anti-Stat3 (A und B) oder ohne Immunpräzipitation direkt mit Anti-Phosphoserin-Stat3 (C) geblottet.

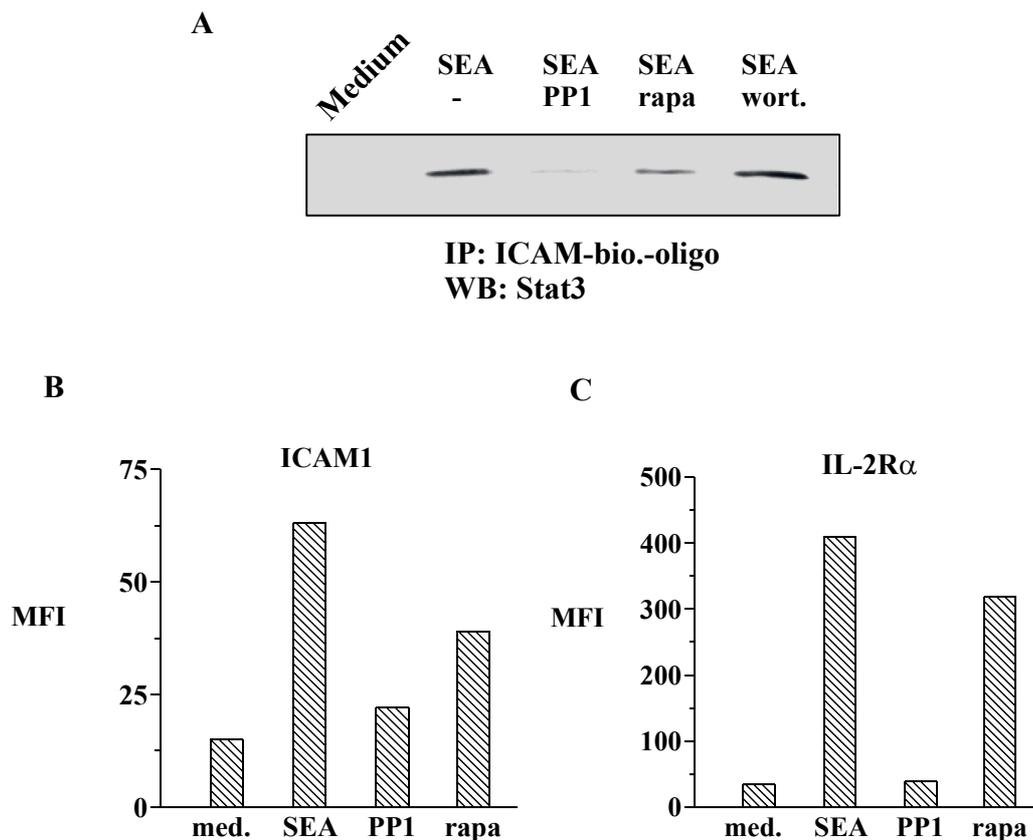
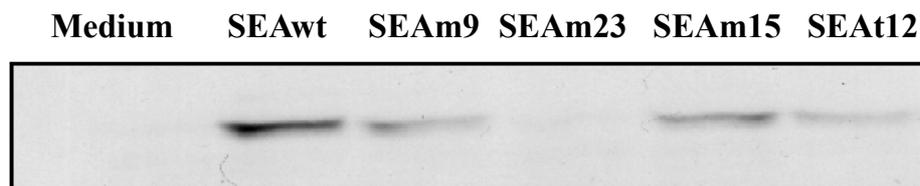


Abb. 4.5.6. PP1 hemmt die durch SEA induzierte Stat3-Aktivität.

Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4h gehungert, mit PP1 (10  $\mu$ M), Rapamycin (25 ng/ml) oder Wortmannin (5 $\mu$ M) für 1h vorinkubiert und dann mit Medium oder mit SEA (1 $\mu$ g/ml) für 1h wie dargestellt inkubiert. **A)**  $20 \times 10^6$  Zellen/Probe wurden lysiert, mit Biotin-gekoppelten Oligo-Nukleotiden des ICAM-Promotors präzipitiert und nach SDS-PAGE mit Anti-Stat3 geblottet. Die Oberflächenexpression von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/Probe von ICAM1 und CD25 wurde mittels FACS-Analyse mit Anti-ICAM1- PE (**B**) oder Anti-CD25-PE (**C**) untersucht. Die unspezifische Bindung einer Isotypenkontrolle wurde als Hintergrund abgezogen. Dargestellt wurde ein repräsentatives FACS-Resultat von drei identischen Experimenten.

Der mTOR Inhibitor Rapamycin und der PI3-K Inhibitor Wortmannin zeigten nur eine partielle Hemmung der durch SEA induzierten Stat-Aktivierung oder der Regulation der Oberflächenexpression von ICAM1 und CD25. Neben der Tyrosinphosphorylierung von Stat3 (Abb. 4.5.5. B), der Serinphosphorylierung von Stat3 (Abb. 4.5.5.C) und der Bindung an Promotersequenzen des ICAM1-Promotors (Abb. 4.5.6. A), wurde dagegen auch die durch SEA induzierte Regulation der Oberflächenexpression von ICAM (Abb. 4.5.6. B) und CD25 (Abb. 4.5.6. C) durch PP1 inhibiert.

Mit Hilfe von an verschiedenen Bindungsstellen mutierten SEA-Mutanten (von Dr. M. Dohlsten, Pharmacia, Schweden) untersuchten wir, ob die TcR-Bindungsstelle oder die MHC Klasse II-Bindungsstellen des Superantigenmoleküls für die durch SEA induzierte Stat3-Aktivierung funktionell notwendig waren. Dazu wurden T-Zellen mit den verschiedenen SEA-Mutanten für eine Stunde inkubiert und die Stat3-Aktivierung durch Western Blot untersucht (Abb. 4.5.7).



**WB: phos.-tyr.-Stat3**

Abb. 4.5.7. Stat3-Aktivierung durch SEA ist von TcR- und MHC II-Bindung abhängig. Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4h gehungert und mit Medium, SEA *wildtyp* (1 µg/ml), SEA Mutant 9 (1 µg/ml), SEA Mutant 23 (1 µg/ml), SEA Mutant 15 (1 µg/ml) und SEA Mutant T12 (1 µg/ml) für 1h inkubiert. Die lysierten Proben wurden auf ein SDS-PAGE aufgetragen und mit Anti-Phosphotyrosin-Stat3 geblottet. Ein Reblot mit Anti-Stat3 zeigte eine gleichmässige Verteilung von Protein in allen Proben.

In Abb. 4.5.7 lässt sich eine Abhängigkeit der SEA-induzierten Stat3 Aktivierung von MHC Klasse II und der TcR-Bindung erkennen. Der SEA Wildtyp induziert eine deutliche Stat3-Tyrosinphosphorylierung, während die Stat3-Aktivierung der Mutanten 9 (Punktmutation in der Zn<sup>2+</sup> abhängigen Bindungsstelle der MHC Klasse II β-Kette) und Mutanten 15 (Punktmutation in der Bindungsstelle der MHC Klasse II α-Kette) bei gleicher Konzentration schwächer ist. SEA Mutant 23 (Punktmutationen in beiden MHC II Bindungsstellen) zeigte dagegen keine Stat3 Aktivierung. Die durch SEA induzierte Stat3-Aktivierung von SEA Mutant T12 (Punktmutation in Bindungsstelle für die TcR Vβ-Kette) ist ebenfalls gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert.

Um zu untersuchen, ob die Induktion von Stat3 durch SEA vom Aggregationsverhalten der T-Zellen abhängt, wurden verschiedene blockierende Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle eingesetzt (Abb. 4.5.8)

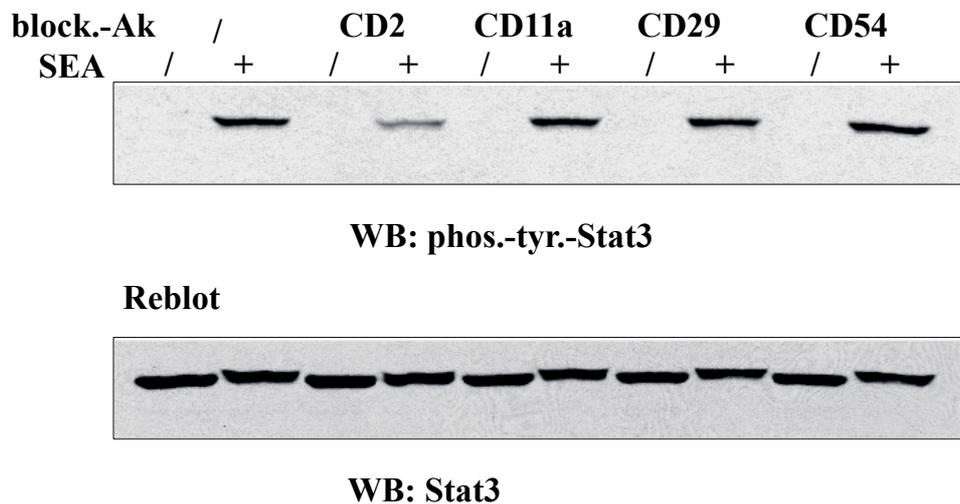


Abb. 4.5.8 Der Einfluss von Adhäsionsmolekülen auf die Induktion von Stat3 durch SEA. Alloaktivierte T-Zellen ( $3 \times 10^6$  / Probe) wurden mit  $10^6$  Zellen / ml in 24-Loch-Platten (Nunc, Dänemark) für 1h mit den entsprechenden blockierenden Antikörpern (25  $\mu\text{g/ml}$ , Leinco) vorinkubiert und danach mit SEA (1 mg/ml) für 3h behandelt. Das Aggregationsverhalten wurde nach 3h unter einem Mikroskop qualitativ festgehalten. (siehe Tabelle 4.1.3) Die T-Zellen wurden lysiert, auf ein SDS-PAGE aufgetragen und anschliessend mit Anti-Phosphotyrosin-Stat3 und nachfolgend mit Anti-Stat3 geblottet. Der dargestellte Versuch wurde in Zusammenarbeit mit C. Brender (Universität Kopenhagen) durchgeführt.

Die blockierenden Antikörper gegen verschiedene Adhäsionsmoleküle zeigten, dass nur anti-CD54 in der Lage war, das SEA-induzierte Adhäsionsverhalten zu blockieren (siehe Tab. 4.1.3). Die mit anti-CD54 vorinkubierten T-Zellen sind aber trotz mangelnder Aggregation noch in der Lage nach Inkubation mit SEA Stat3 zu phosphorylieren. Da aber nur der anti-CD2 Antikörper in der Lage war, die durch SEA induzierte Aktivierung von Stat3 zu blockieren (Abb. 4.5.8.) zeigt sich, dass die durch SEA induzierte Aggregation und die durch SEA induzierte Aktivierung von Stat3 voneinander unabhängig sind. Der Mechanismus, durch den ein anti-CD2 Antikörper die durch SEA induzierte Stat3-Phosphorylierung hemmt, ist noch ungeklärt.



Die Analyse der SEA-induzierten Zytokin-mRNAs mittels RPA ergab eine deutliche Induktion von IFN $\gamma$  und IL-13 bereits nach einer Stunde, sowie eine schwächere transiente Induktion von IL-5, IL-10, IL-4, IL-15 und IL-9.

Da eine mRNA Induktion nicht gleichbedeutend mit der Proteinproduktion oder Proteinfreisetzung ist, wurde nun nachfolgend das Vorkommen von Zytokinen im Zellsupernatant durch ELISA bestimmt.

Es wurden 6 verschiedene alloaktivierte T-Zelllinien (von verschiedenen Donoren) getestet. Alle produzierten ähnliche Mengen der betreffenden Zytokine nach Inkubation mit SEA. In Abb. 4.6.2 wird ein repräsentatives Beispiel der resultierenden ELISA-Daten dargestellt.

Eine parallele Analyse der mRNAs für die verschiedenen Zytokinrezeptorketten (Daten nicht dargestellt) ergab keine durch SEA induzierte Regulation der einzelnen Zytokinrezeptorketten (z.B. von CD122).

In einleitenden ELISA-Versuchen konnte keine Zytokinkonzentration von IL-6, IL-9, IL-10 und IL-15 über der Nachweisgrenze gefunden werden. Die folgenden ELISA-Tests beschränkten sich daher auf die Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 und IFN $\gamma$ .

Die Messung der Zytokinkonzentration mittels ELISA ergab ein etwas differenzierteres Bild, verglichen mit den Daten des RNase Protection Assays (Abb. 4.6.1). Wir fanden eine starke Produktion von IL-13 und IL-5 (im Bereich 10-20 ng/ml), eine Produktion von IFN $\gamma$  im Bereich von 2-3 ng/ml, sowie eine schwache, transiente Produktion von IL-4. Die Produktion von IL-4 war nach 12h am größten. Das Zytokinprofil der SEA-stimulierten T-Zellen zeigte damit eine starke Produktion von Th2-Zytokinen (IL-13 und IL-5), jedoch zu den hier getesteten Zeitpunkten, geringe Mengen von IL-4. Die Messung von IL-4 könnte durch die direkte Bindung von IL-4 an die produzierende Zelle beeinträchtigt werden.

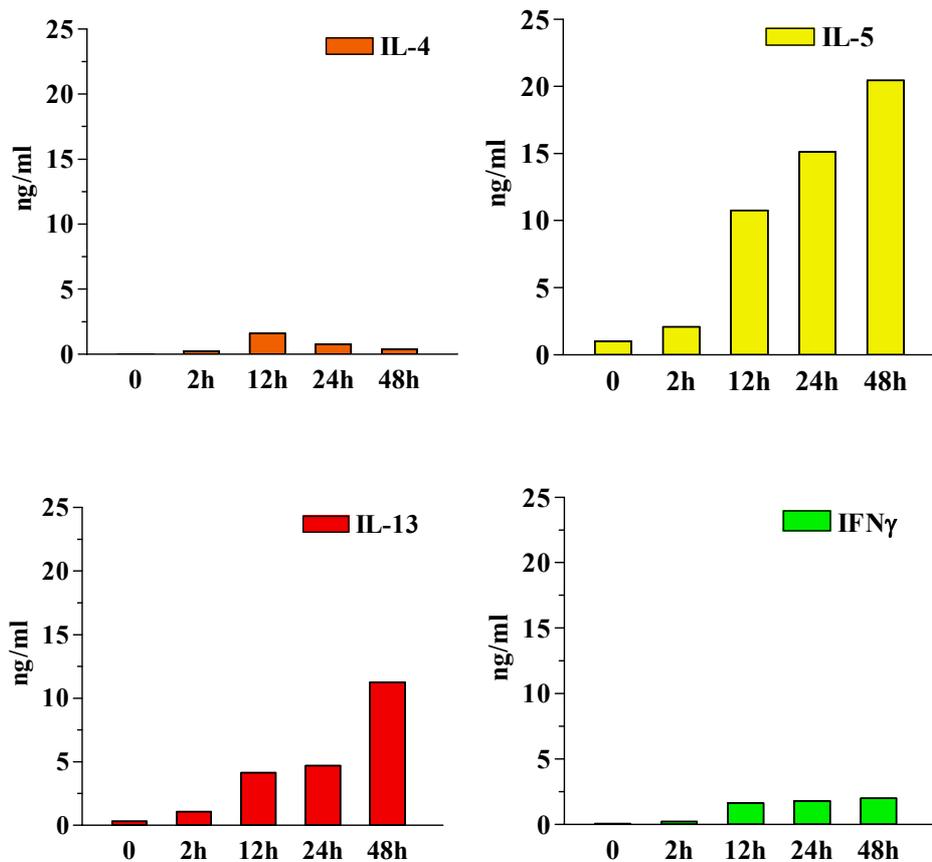


Abb. 4.6.2 Zytokin-Analyse von T-Zellen mittels ELISA nach SEA Inkubation.

Die Kinetik der Zytokinkonzentration von IL-4, IL-5, IL-13 und IFN $\gamma$  im Zellkulturüberstand von mit SEA (1  $\mu$ g/ml) inkubierten T-Zellen ( $10^6$  Zellen/ml) wurde mittels ELISA gemessen. Die Zytokinproduktion von unstimulierten T-Zellen wurde als Hintergrundwert abgezogen.

Um zu untersuchen, ob die durch SEA stimulierte Produktion von Th2 Zytokinen auch in anderen T-Zelllinien nachzuweisen war, wurden die Zellen einer T-Zelllinie (RB4.1 von K.Kaltoft, Århus Universität) eines Patienten mit Atopischer Dermatitis (AD) auf ihr Zytokinprofil hin untersucht. Bakterielle Superantigene gelten seit Längerem als ein Faktor der zu den Symptomen der chronischen Entzündungen bei Atopischer Dermatitis beiträgt.

Das Profil der induzierten Zytokine der AD T-Zelllinie RB4.1 gleicht dem der alloaktivierten T-Zellen, die Mengen der produzierten Zytokine sind jedoch verschieden (Abb. 4.6.3).

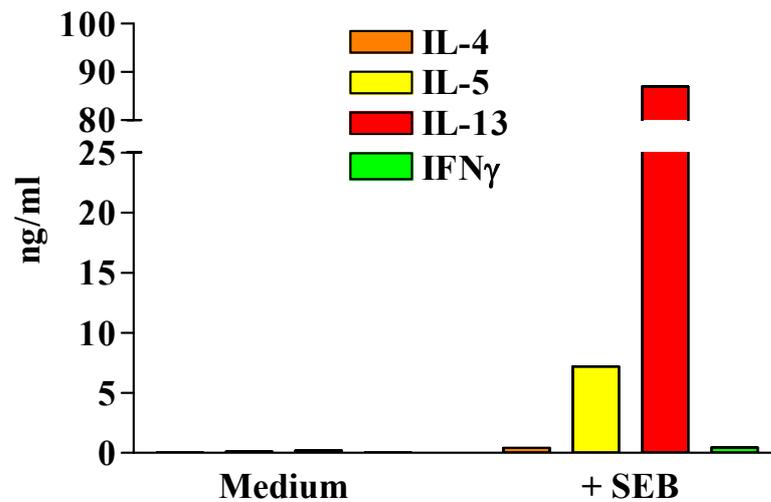


Abb. 4.6.3 SEB-induzierte  $T_H2$ -Zytokin Produktion in AD T-Zelllinien.

Die Kinetik der Zytokinkonzentration von IL-4, IL-5, IL-13 und IFN $\gamma$  im Zellkulturüberstand von mit SEB (1  $\mu\text{g/ml}$ ) für 12h inkubierten T-Zellen (RB4.1,  $10^6$  Zellen/ml) wurde mittels ELISA gemessen. Die Zytokinproduktion von unstimulierten T-Zellen wurde als Hintergrundwert abgezogen.

Aufgrund der verschiedenen TcR-Spezifität von RB4.1 wurde hier ein anderes Superantigen (SEB) zur Stimulierung der T-Zellen verwendet. Die wirkungsvolle Konzentration von SEB wurde in einleitenden Versuchen zusammen mit RB4.1 titriert.

Die Menge des von SEB in AD-T-Zellen induzierten IL-5 ist ähnlich der in alloaktivierten T-Zellen induzierten IL-5 Produktion, jedoch liegt die Menge des produzierten IL-13 deutlich höher (90 ng/ml). Aus Abb. 4.6.2. und Abb. 4.6.3 wird deutlich, dass Superantigene in alloaktivierten T-Zellen, und in T-Zellen von Patienten mit Atopischer Dermatitis eine kräftige Produktion der  $T_H2$  Zytokine IL-5 und IL-13 induzierten.

Da der Einfluss von Superantigenen auch in Zusammenhang mit anderen atopischen Krankheiten, wie Asthma und Allergie, diskutiert wird, untersuchten wir das durch Superantigene induzierte Zytokinprofil von verschiedenen Birkenpollen spezifischen T-Zellen Klonen (Sparholt, 1997).

Die pollenspezifischen T-Zellen Klone (AF19=  $T_{H1}$ , AF24= $T_{H0}$  und AF28= $T_{H2}$ ) wurden bei ALK-Abello´(Hørshol, Dänemark) entwickelt und uns für diese Experimente zur Verfügung gestellt. Die einzelnen T-Zellklone wurden erst auf ihre Superantigenspezifität hin untersucht. Alle drei Klone zeigten eine deutliche SEB-Reaktivität und wurden mit SEB oder Medium inkubiert. Das durch SEB induzierte Zytokinprofil der Klone wurde im Zellkulturüberstand mittels ELISA getestet (Abb. 4.6.4.)

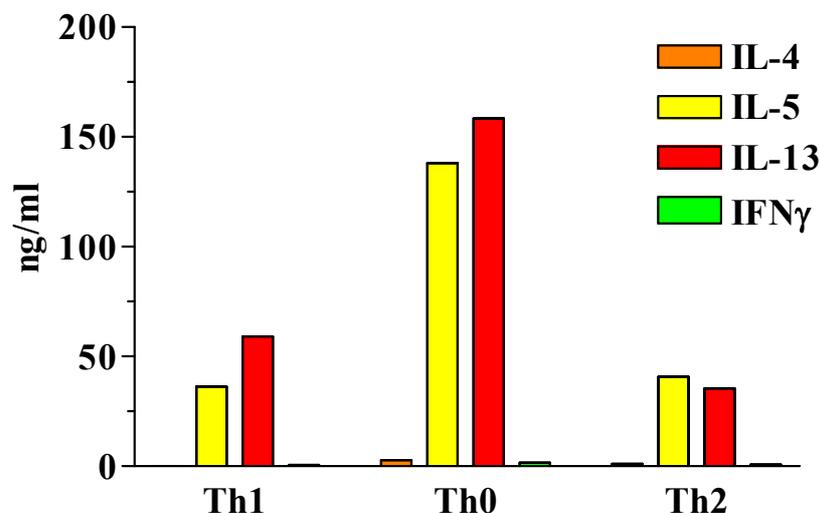


Abb. 4.6.4. Durch SEB induziertes Zytokinprofil von pollenspezifischen T-Zellklonen.

Drei verschiedene Birkenpollen spezifische T-Zellklone (AF19=  $T_{H1}$ , AF24= $T_{H0}$  und AF28= $T_{H2}$ ) wurden bei  $10^6$  Zellen/ml für 12h mit Medium oder SEB (1  $\mu$ g/ml) inkubiert und das Zytokinprofil im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Die Medium-induzierten Werte wurden als Hintergrund abgezogen. Dargestellt wird hier ein repräsentatives Experiment von drei parallelen Experimenten.

Alle drei T-Zellklone zeigten eine starke durch SEB induzierte Produktion der  $T_{H2}$ -Zytokine IL-13 (bis zu 160 ng/ml) und IL-5 (bis zu 140 ng/ml). Der  $T_{H2}$  Klon zeigte keine deutliche IL-4 Produktion in dem hier untersuchten Zeitintervall. Superantigene induzierten selbst im als  $T_{H1}$  charakterisierten Klon überraschenderweise eine deutliche Produktion von  $T_{H2}$  Zytokinen. Die drei birkenpollenspezifischen Klone wurden nun mit bestrahlten, autologen, EBV-transformierten B-Zellen und dem entsprechenden Allergen (rBet v1) inkubiert (Abb. 4.6.5.)

Im Gegensatz zur SEB-Stimulation (Abb. 4.6.4), zeigt sich bei der Stimulation mit antigenpräsentierenden Zellen und dem allergenspezifischen Peptid das typische  $T_H1/T_H2$  Bild für die Produktion von IL-5 und IL-13.

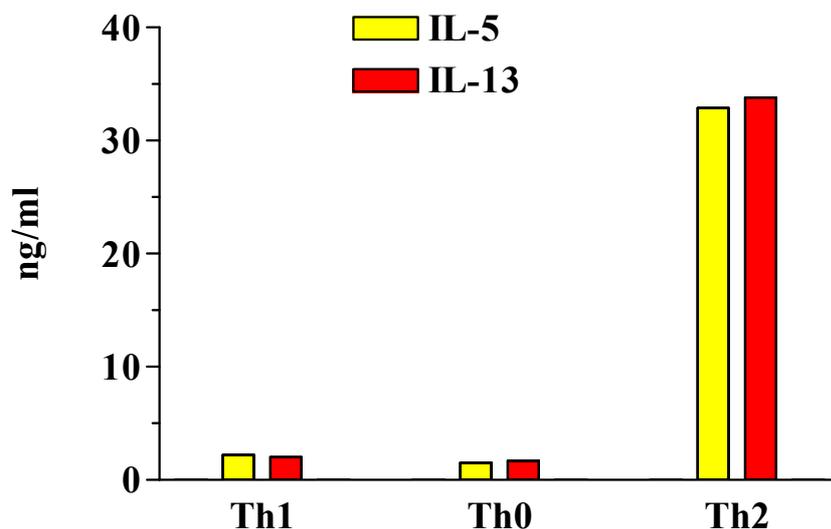


Abb. 4.6.5. SEB-induziertes Zytokinprofil von Bet v1-spezifischen T-Zellen Klonen.

Drei verschiedene Birkenpollen spezifische T-Zellklone wurden bei  $10^6$  Zellen/ml für 12h mit bestrahlten, autologen, EBV-transformierten B-Zellen ( $10^6$  Zellen/ml), mit Medium oder rBet v1 (5  $\mu$ g/ml) inkubiert. Das Zytokinprofil wurde im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Die durch Medium induzierten Werte wurden als Hintergrund abgezogen. Dargestellt wird hier ein repräsentatives Ergebniss von drei parallelen Experimenten.

Nur der  $T_H2$ -Klon (AF 28) produzierte bei Stimulation mit Allergen die  $T_H2$ -Zytokine IL-5 und IL-13 in ähnlichen Mengen wie bei der SEB-Stimulation. Diese Ergebnisse deuten auf eine Induktion von  $T_H2$  Zytokinen auch von  $T_H1$  und  $T_H0$  Klonen hin. Die Daten unterstreichen einen deutlichen Unterschied zwischen den durch Superantigenen oder dem durch Antigenen induzierten Zytokinprofilen in humanen T-Zellen.

Eine durch Superantigene induzierte Verschiebung der Balance zwischen  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zytokinen kann für das Krankheitsbild von Allergien und Asthma von grosser Bedeutung sein. Infektion oder Kolonisierung mit superantigenproduzierenden Bakterien könnte somit ein Faktor sein, der bei der Induktion oder der Verstärkung atopischer Erkrankungen und chronischer Entzündungen eine wichtige Rolle spielt.

#### 4.7 Stat3 und Zytokine

Um den Mechanismus besser zu verstehen, wie Superantigene Stat-Proteine aktivieren und eine  $T_H2$ -spezifische Zytokinproduktion anregen, untersuchten wir als erstes die Abhängigkeit der Stat3-Aktivierung von Proteinsynthese und Proteintransport. Alloaktivierte T-Zellen wurden dazu vor der Inkubation mit Superantigenen mit Hemmern des ER-Golgi-Transportes oder der Proteinbiosynthese vorinkubiert (Abb.4.7.1 und Abb. 4.7.2). Die benötigte Konzentration von Cycloheximid (CHX) wurde vorher titriert.

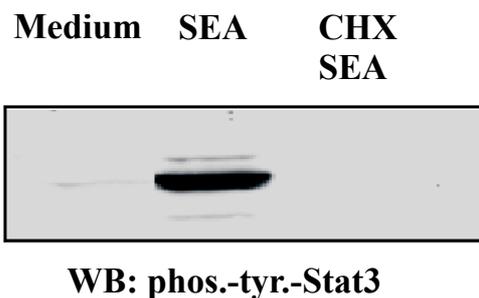


Abb. 4.7.1 Cycloheximid hemmt die durch SEA induzierte Stat3-Aktivierung  
Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4 h gehungert und anschließend mit Medium oder SEA (1 $\mu$ g/ml) für 1h behandelt. Die CHX-Probe wurde nur für 3h gehungert und mit Cycloheximid (10  $\mu$ M) für 1h vorinkubiert. Die Proben wurden lysiert, auf ein SDS-PAGE aufgetragen und mit Phosphotyrosin-Stat3 geblottet.

Eine Vorinkubation mit Hemmern des intrazellulären Transportes von neusynthetisierten Proteinen (Brefeldin A) ergab identische Resultate (Abb. 4.7.2.). Ähnliche Resultate ergab auch die Vorinkubtion der T-Zellen mit Monensin (5  $\mu$ g/ml).

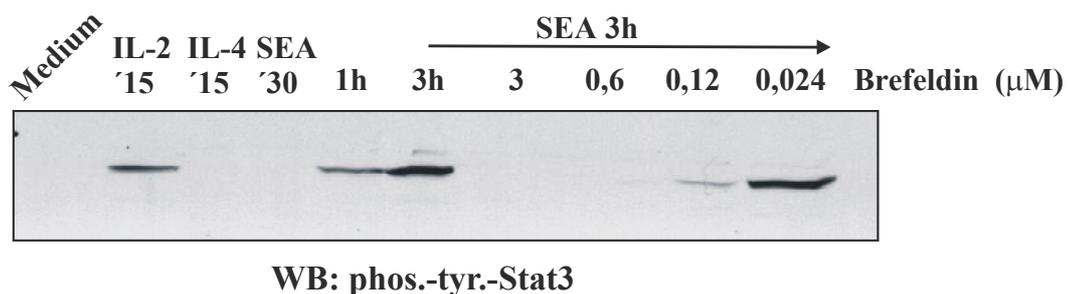


Abb. 4.7.2. Brefeldin hemmt die durch SEA induzierte Stat3-Aktivierung  
Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4 h gehungert und anschließend mit Medium, IL-2 (100 U/ml), IL-4 (500 U/ml) oder SEA (1 $\mu$ g/ml) für verschiedene Zeitspannen behandelt. Ein Teil der Proben wurde nur für 3h gehungert und mit Brefeldin in verschiedenen Konzentrationen für 1h vorinkubiert. Die Proben wurden lysiert, auf ein SDS-PAGE aufgetragen und mit Phosphotyrosin-Stat3 geblottet.

Es zeigte sich eine Abhängigkeit der durch SEA induzierten Stat3-Aktivierung von Proteinbiosynthese und des Transportes von neusynthetisierten Proteinen aus dem Golgi, da Inhibitoren wie Cycloheximid, Monensin und Brefeldin A die durch Superantigen induzierte Stat3-Aktivierung hemmen konnten.

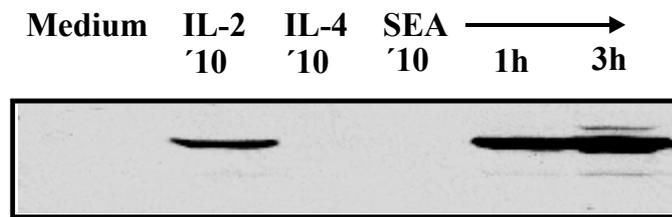
Da Superantigene verschiedene Zytokine induzieren und Zytokine die primären Aktivatoren von Stat-Proteinen sind, lag die Vermutung nahe, dass ein durch Superantigene induziertes Zytokin für die Stat3-Aktivierung verantwortlich ist. Wir testeten deshalb zuerst IL-13, da es ein Zytokin war, dessen Produktion von Superantigenen in allen getesteten T-Zellen induziert wurde.

IL-13 weist überlappende Funktionen mit IL-4 auf und benutzt zum Teil die gleichen Zytokinrezeptorketten (siehe Abb. 5.4.1). Deshalb aktiviert IL-13 auch die gleichen Stat-Proteine wie IL-4, nämlich vor allem Stat6 und das eher unspezifische Stat3.

Falls das durch Superantigene induzierte IL-13 wirklich für die Stat3-Aktivierung verantwortlich sein sollte, hätten wir neben Aktivierung von Stat3 eine parallele Induktion von Stat6 erwartet. Mittels eines Antikörpers gegen Phosphotyrosin-Stat6 versuchten wir, das induzierte Stat-Profil von T-Zellen nach Inkubation mit Superantigen zu untersuchen (Abb. 4.7.3.).

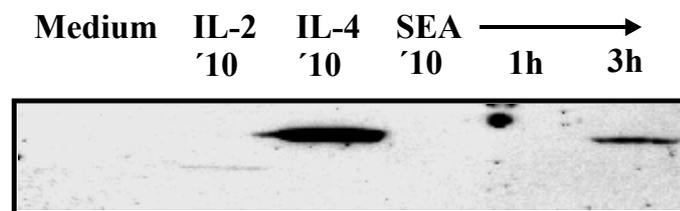
Tests mit Phosphotyrosin-Antikörpern gegen Stat1 , Stat2 und Stat5 ergaben keine Stat-Aktivierung der betreffenden Stat-Proteine (Daten nicht dargestellt).

A



WB: phos.-tyr.-Stat3

B



WB: phos.-tyr.-Stat6

Abb. 4.7.3 Durch Superantigene induzierte Aktivierung von Stat3 und Stat6 in T-Zellen.

Alloaktivierte T-Zellen ( $3 \times 10^6$  Zellen/Probe) wurden für 4h gehungert und mit Medium, IL-2 (100 U/ml), IL-4 (500 U/ml) oder SEA (1  $\mu$ g/ml) für verschiedene Zeitintervalle behandelt. Die Proben wurden lysiert, auf ein SDS-PAGE aufgetragen und mit **A**) Anti-Phosphor-Tyrosin-Stat3 und anschließend **B**) mit Anti-Phosphor-Tyrosin-Stat6 geblottet. Ein Reblotten mit nichtaktiviertem Stat3 ergab eine gleichmäßige Verteilung der Proteinmengen in allen Proben.

Die Abb. 4.7.3 zeigt deutlich, dass Superantigene in der Lage sind Stat6, neben Stat3, in T-Zellen zu aktivieren. Die SEA-induzierte Aktivierung von Stat6 ist etwas schwächer und erst später nachweisbar als die SEA-induzierte Aktivierung von Stat3.

Der Fund, dass Superantigene neben Stat3 auch Stat6 aktivieren können, legt die Vermutung nahe, dass durch Superantigene induziertes IL-13 oder IL-4 die Stat-aktivierenden Zytokine in T-Zellen sind.

Die Oberflächenexpression der mit Superantigen behandelten T-Zellen wurden nun mittels FACS-Analyse untersucht. Hierbei sollte herausgefunden werden, ob diese T-Zellen einen funktionellen IL-13 Rezeptor besitzen, was eine Voraussetzung für die IL-13 vermittelte Stat-Aktivierung ist (Abb. 4.7.4.)

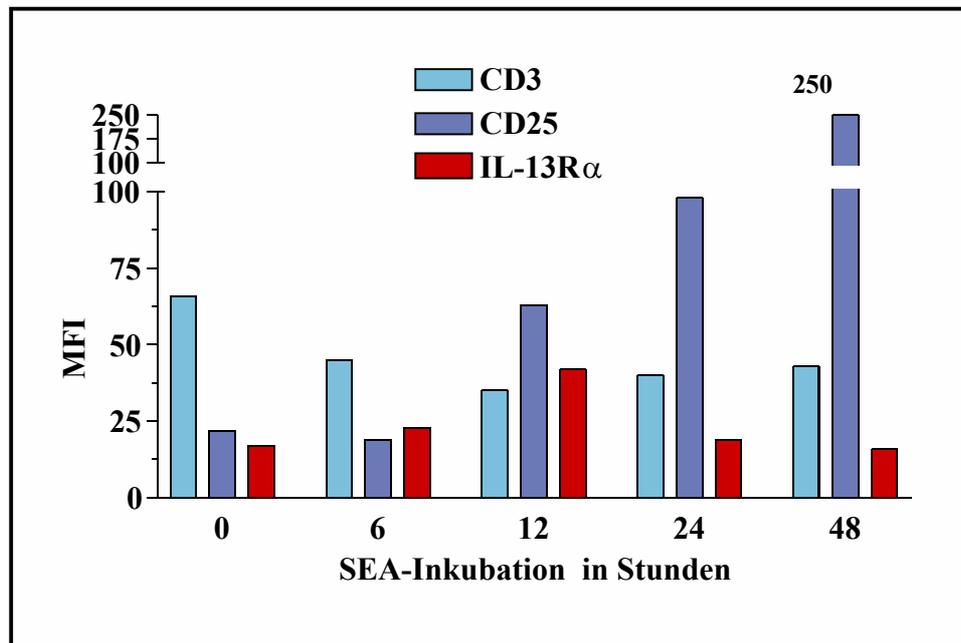


Abb. 4.7.4. Oberflächenexpression des IL-13Rs nach Behandlung von T-Zellen mit SEA. Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4h gehungert und, wie angegeben, mit SEA ( $1\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert.  $0,5 \times 10^6$  Zellen/Probe wurden mit Anti-CD3-PE, Anti-CD25-PE, Maus-anti-IL-13R $\alpha$  oder anti-MausIgG-PE markiert und die Oberflächenexpression mittels FACS-Analyse gemessen. Die Werte einer Isotypenkontrolle oder anti-Maus-IgG-PE alleine wurden als Hintergrund von den entsprechenden Resultaten abgezogen. Dargestellt wird hier ein repräsentatives Experiment von drei Ergebnissen mit gleichem Resultat.

T-Zellen, die mit Superantigen inkubiert wurden, zeigen eine spezifische, transiente Verstärkung der IL-13R-Expression (Abb. 4.7.4), deren Maximum bei zwölf Stunden liegt.

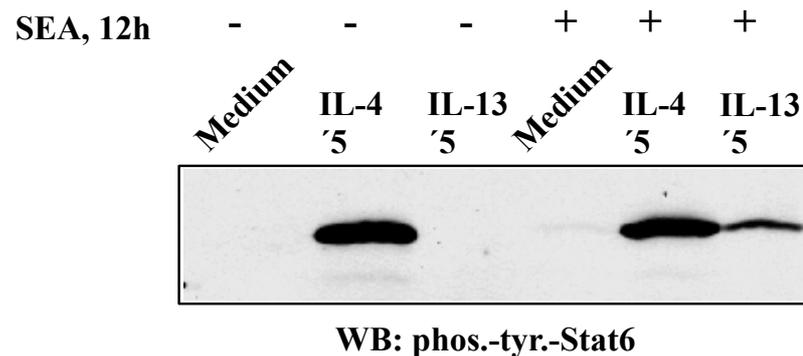
#### 4.8 T-Zellen und IL-13-Reaktivität

Superantigene induzieren einen transienten Zuwachs der Oberflächenexpression des IL-13 Rezeptors auf T-Zellen. Aus der Literatur war bekannt, dass IL-13 zwar von T-Zellen produziert werden kann, jedoch galten T-Zellen als unfähig, auf IL-13 zu reagieren. Die Unfähigkeit von IL-13 T-Zellen zu stimulieren, ist einer der grundlegenden Unterschiede zwischen IL-4 und IL-13.

Da Superantigen hier deutlich die Oberflächenexpression von IL-13R verstärkt, untersuchten wir, ob eine Inkubation mit Superantigenen auch in der Lage ist, die Reaktivität von T-Zellen gegenüber IL-13 zu steigern.

Dazu wurden T-Zellen mit SEA für 12h behandelt und danach wurde ihre Reaktivität auf IL-13 getestet. Nach der Inkubation mit Superantigen mußte ein Wasch- und Hungerschnitt eingefügt werden, um die Reaktivität auf externes IL-13 zu untersuchen und die durch SEA-Inkubation aktivierten Stat-Proteine wieder zu dephosphorylieren.

**A**



**B**

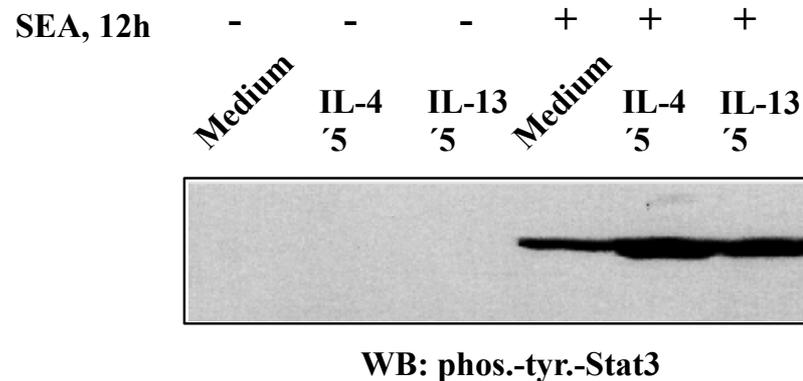


Abb. 4.8.1 Superantigen induzierte eine IL-13-Reaktivität in T-Zellen.

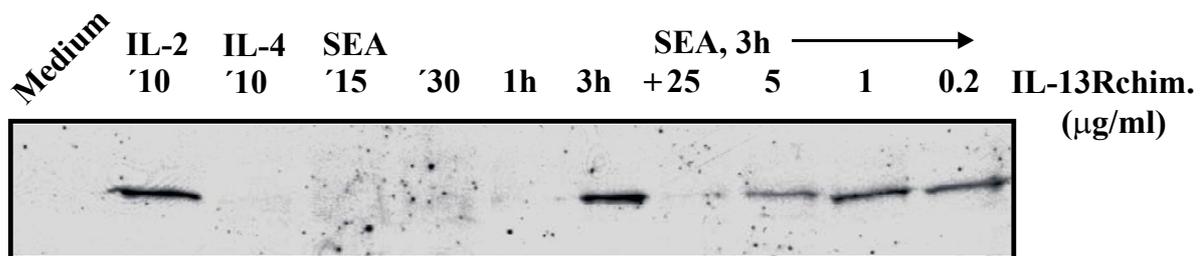
Alloaktivierte T-Zellen wurden für 12h mit SEA (1µg/ml) inkubiert und anschließend gewaschen und für 4h gehungert. 2x10<sup>6</sup> Zellen/Probe von vorbehandelten T-Zellen oder unbehandelte T-Zellen wurden für 5 min mit Medium, IL-4 (500 U/ml) oder IL-13 (100 ng/ml) inkubiert, lysiert und auf ein SDS-PAGE aufgetragen. Danach wurde das Gel mit **A**) Anti-Phosphotyrosin-Stat6 und **B**) Anti-Phosphotyrosin-Stat3 geblottet.

Superantigen induzierte nicht nur eine verstärkte Oberflächenexpression des IL-13 Rezeptors, sondern auch eine IL-13-induzierte Stat6-Aktivierung in humanen T-Zellen. Nicht mit SEA vorbehandelte T-Zellen waren nicht in der Lage, nach Inkubation mit IL-13 Stat6 zu aktivieren.

Auch die IL-13 induzierte Stat3-Aktivierung war nach Vorbehandlung mit SEA verstärkt (Abb. 4.8.1 B). Jedoch zeigte sich eine verbliebene Hintergrundphosphorylierung von Stat3 durch die vorangegangene Inkubation mit Superantigenen. Eine längere "Hungerpause" würde die Hintergrundaktivität herabsetzen, jedoch möglicherweise auch die IL-13-Reaktivität verringern.

#### 4.9. IL-13 und von SEA induzierte Stat-Proteine

Um zu untersuchen, ob IL-13 wirklich an der durch Superantigene induzierten Stat-Protein Aktivierung beteiligt ist, wurden im Folgenden verschiedene IL-13-blockierende Reagenzien eingesetzt. Ein neutralisierender anti-IL-13 Antikörper (R+D Systems) erwies sich als nicht in der Lage, IL-13-Signale in T-Zellen zu blockieren. Ein IL-13R $\alpha$ 2-IgG Chimärmolekül (614-IR, R+D Systems) war jedoch geeignet, die IL-13-induzierte Stat3-Aktivierung spezifisch zu hemmen (Abb. 4.9.1.)



**WB: phos.-tyr.-Stat3**

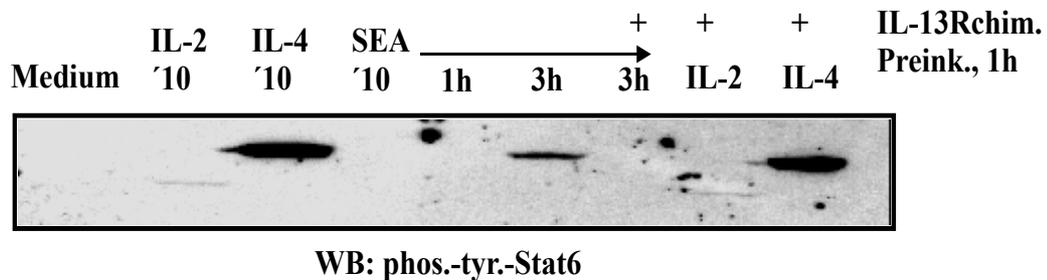
Abb. 4.9.1 IL-13R-Chimär blockierte für die SEA-induzierte Stat3 Aktivierung.

Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4h gehungert und mit IL-2 (100 U/ml), IL-4 (500 U/ml) und SEA (1 $\mu$ g/ml) inkubiert. Einige Proben wurden parallel zur SEA Inkubation für 3h wie dargestellt mit verschiedenen Konzentrationen eines IL-13R $\alpha$ 2-IgG-Chimäres (614-IR, R+D Systems) inkubiert. Die Proben wurden lysiert, auf ein SDS-PAGE aufgetragen und mit Anti-Phosphotyrosin-Stat3 geblottet.

Das Blockieren von IL-13 inhibierte nicht nur die durch SEA induzierte Stat3-, sondern auch die durch SEA induzierte Stat6-Aktivierung. Das IL-13-blockierende IL-13 Rezeptormolekül erwies sich als spezifisch, da weder die IL-2-induzierte Aktivierung von Stat3, noch die IL-4-induzierte Aktivierung von Stat6 durch den IL-13R $\alpha$ 2-IgG-Chimär blockiert wurden (Abb. 4.9.2.)

Parallele Versuche mit blockierenden Antikörpern gegen IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-12 zeigten keinen Effekt auf die durch SEA induzierte Stat3- oder Stat6-Aktivierung.

A



B

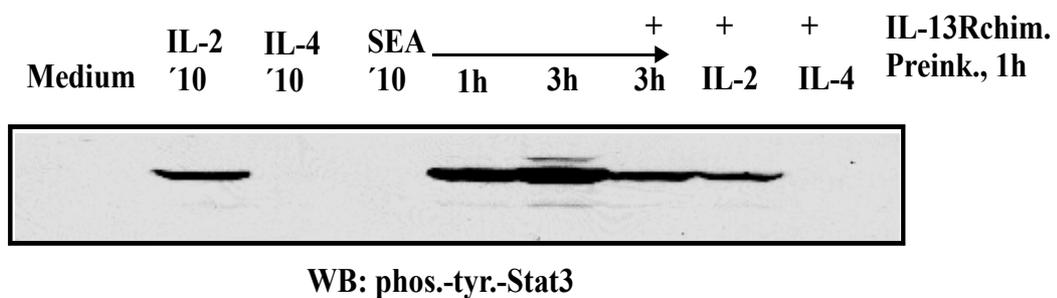


Abb. 4.9.2 Die Stat3- und Stat6-Aktivierung durch SEA ist abhängig von IL-13.

Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4h gehungert und mit IL-2 (100 U/ml), IL-4 (500 U/ml) und SEA (1 $\mu$ g/ml) inkubiert. Einige Proben wurden vor der Inkubation mit SEA, IL-2 und IL-4 wie dargestellt mit 10  $\mu$ g/ml IL-13R $\alpha$ 2-IgG-Chimär (R+D Systems, Dänemark) für 1h vorinkubiert. Die Proben wurden lysiert, auf ein SDS-PAGE aufgetragen und **A**) mit Anti-Phosphotyrosin-Stat3 und danach mit **B**) Anti-Phosphotyrosin-Stat6 geblottet.

Die Blockierung des durch SEA induzierten Stat3 durch Vorinkubation mit dem IL-13R-Chimär (10  $\mu$ g/ml) war in diesem Versuch nicht vollständig (Abb. 4.9.2 B), jedoch ist die Menge des aktivierten Stat3 deutlich reduziert. Die IL-2-induzierte Stat3 Aktivierung ist dagegen nicht reduziert. Parallele Versuche mit einer T-Zelllinie von Patienten mit Atopischer Dermatitis (RB4.1) zeigten, dass auch hier das IL-13 Rezeptormolekül in der Lage war, die SEA-induzierte Stat-Aktivierung spezifisch zu unterbinden.

Die Verwendung des IL-13-blockierenden IL-13 Rezeptormoleküls verdeutlicht, dass Superantigene in der Lage sind durch Induktion einer kräftigen IL-13-Produktion Stat3 und Stat6 zu aktivieren.

#### 4.10. Superantigene und T<sub>H</sub>2-Faktoren

Stat6 ist ein spezifischer T<sub>H</sub>2-Transkriptionsfaktor, der nur von IL-4 und IL-13 aktiviert wird. Stat6 ist jedoch dem dominierenden T<sub>H</sub>2-Transkriptionsfaktor Gata3 vorgeschaltet und allein nicht ausreichend, um eine vollständige T<sub>H</sub>2-Differenzierung auszulösen.

Wir wollten daher wissen, ob Superantigene neben Stat6 und T<sub>H</sub>2-Zytokinen wie IL-13 und IL-5 auch die Produktion von Gata3 aktivieren können.

Dazu wurden T-Zellen für 16h mit SEA inkubiert, in zytosomale und nukleosomale Fraktionen aufgeteilt und auf Gata3 hin untersucht (Abb. 4.10.1.)

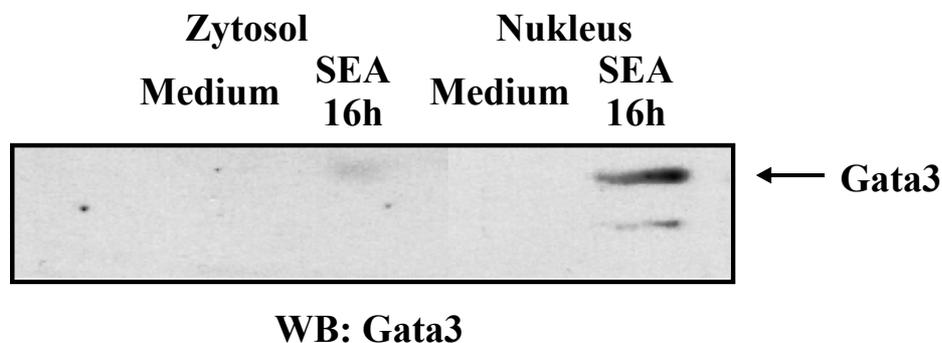


Abb. 4.10.1 Superantigene induzierten eine Gata3-Produktion in T-Zellen.

Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4h gehungert und mit Medium oder SEA (1 µg/ml) für 16h behandelt. Die Proben wurden fraktionell lysiert, auf ein SDS-PAGE aufgetragen und mit Anti-Gata3 geblottet.

Es zeigte sich, dass Superantigene neben T<sub>H</sub>2-Zytokinen wie IL-5 und IL-13 und Stat6 auch die Produktion des T<sub>H</sub>2-Transkriptionsfaktors Gata3 in T-Zellen aktivieren können.

Um einen Überblick über die Proteine zu erhalten, die nach Inkubation von T-Zellen mit Superantigenen verstärkt oder vermindert produziert werden, wurde ein GeneChip-Assay durchgeführt.

Dabei werden T-Zellen mit Superantigenen behandelt, die mRNA isoliert und gegen ca. 12.000 Genfragmente hybridisiert. Gebundene mRNA wird anschließend visualisiert und quantifiziert. Die GeneChip Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Prof. K.Bentzon (Universitätshospital Kopenhagen) durchgeführt.

Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4h, 8h, und 12h mit Superantigen inkubiert, die mRNA wurde isoliert und durch eine GeneChip-Analyse analysiert. Die besonders deutlich regulierten mRNAs wurden in Tabelle 4.10.2 in Relation zu einem durch Medium induzierten Wert (Regulationsfaktor) zusammengefasst.

<b>mRNA</b>	<b>Regulationsfaktor nach 8h</b>
IL-8	38 x
NF-AT	21 x
nur77	18 x
4-1BB	15 x
SOCS3	11 x
CRTH2	7 x
IL-17	5 x
CD40L	4,5 x
CREM	4 x
OX40	4 x

Tab. 4.10.2 Durch Superantigene induzierte mRNAs in T-Zellen.

20 x10<sup>6</sup> mit Superantigen inkubierten T-Zellen wurden in 6 ml Trizol (Life Technologies ) lysiert und die mRNA mittels RNeasy Säulen (Qiagen, Hilden) isoliert. Biotin-gekoppelte cDNA Doppelstränge wurden mittels oligo dT-Primer und in vitro Transkription/Biotinylierung mittels T7 RNA Polymerase (Affymetrix, Santa Clara, USA) hergestellt (HuGene fl array und Hu U95 array) und mittels Streptavidin gekoppelten Pycoerythrin visualisiert (HP G2500A GeneArray Scanner). Die Behandlung der Daten erfolgte durch GeneChip Analysis Suite Software von Affymetrix.

Verschiedene mögliche Ansatzpunkte ergeben sich durch die Analyse der durch die GeneChip-Experimente gewonnenen Daten. Da direkte Daten zu IL-13, IL-5, Stat6, c-maf oder Gata3 nicht sichtbar waren, suchten wir nach anderen, möglicherweise indirekten Kandidaten, um die beobachteten Effekte von Superantigenen zu erklären.

Ein möglicher Mechanismus, durch den Superantigene die T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Balance beeinflussen können, ist die selektive Regulation von Kostimulationsmolekülen, die an der T-Zellen Differenzierung beteiligt sind.

Zwei Kostimulationsmoleküle, die möglicherweise an der Regulation der T-Zellen Differenzierung beteiligt sind, sind OX40 und ICOS. Die durch SEA induzierte Regulation der mRNA für OX40 wurde in unserem Gene-Chip Experimenten deutlich. Wir untersuchten deshalb die Oberflächenexpression von OX40 und ICOS nach SEA-Inkubation von T-Zellen mittels FACS-Analyse (Abb. 4.10.3).

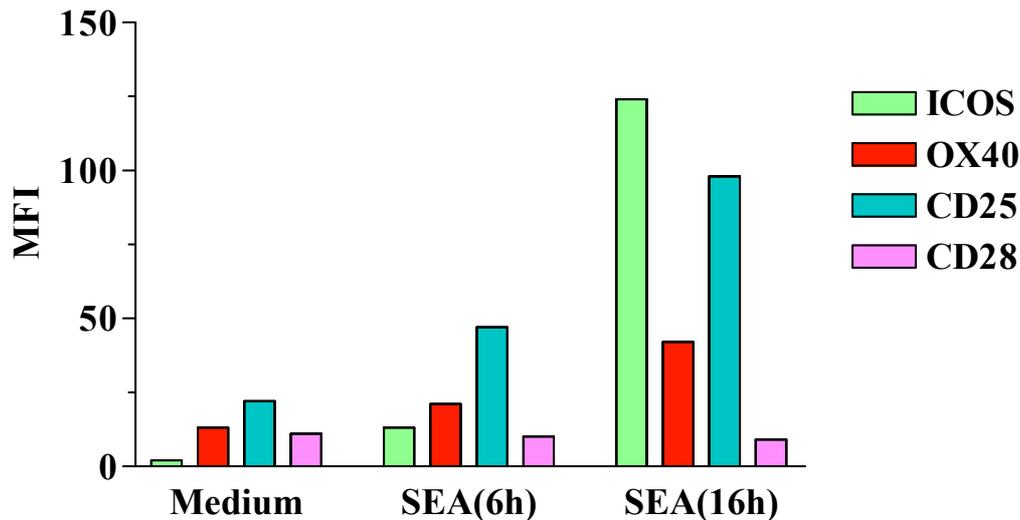


Abb. 4.10.3 Oberflächenexpression von Kostimulationsmolekülen nach SEA-Inkubation. Alloaktivierte T-Zellen wurden für 4h gehungert und, wie angegeben, mit Medium oder SEA (1µg/ml) inkubiert.  $0,5 \times 10^6$  Zellen/Probe wurden mit Anti-CD25-PE, Anti-CD28-PE, Anti-OX40-PE, Anti-ICOS und Anti-Ziege-IgG-FITC markiert und die Oberflächenexpression mittels FACS-Analyse gemessen. Die Werte für eine Isotypenkontrolle oder anti-Ziege-IgG-FITC wurden als Hintergrund von den entsprechenden Resultaten abgezogen. Dargestellt wird hier ein repräsentatives Experiment von drei Experimenten mit gleichem Ergebnis.

Superantigene induzierten neben  $T_H2$ -Zytokinen, Stat6 und Gata3 auch die verstärkte Expression von Kostimulationsmolekülen wie ICOS und OX40, die an der Regulation der T-Zellen Differenzierung beteiligt sein könnten. Die durch Superantigene induzierte Regulation von kostimulatorischen Molekülen könnte einer der Mechanismen sein, durch den Superantigene die Balance der  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Differenzierung von humanen  $CD4^+$  T-Zellen beeinflussen können.