
5. Diskussion

5.1 Reaktivität von T-Zellen mit Superantigenen

Als Ausgangsmaterial für die Untersuchung von durch Superantigenen induzierten Signalen in humanen T-Zellen wählten wir alloaktivierte CD4⁺ T-Zelllinien (Ødum, 1986 und Speir, 1998). CD4⁺ T-Zellen sind die zentralen Regulationszellen des Immunsystems. Diese T-Zellpopulation stellt die Mehrzahl der regulativen Effektor T-Zellen der Peripherie dar. Ein großer Vorteil dieses experimentellen Systems ist, dass aktivierte humane T-Zellen MHC Klasse II Moleküle besitzen und somit keine weiteren antigenpräsentierende Zellen benötigt werden.

Um schnelle Aufschlüsse über die Superantigenreaktivität oder Superantigenespezifität einer gegebenen T-Zellen Population zu erhalten, haben wir das Aggregationsverhalten von T-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Superantigenen untersucht. Superantigene binden sich spezifisch an TcR V β -Ketten und MHC Klasse II Moleküle und können somit ein Verklumpen von T-Zellen direkt oder durch Aktivierung von Adhäsionsmolekülen auslösen (Kappler, 1989, und Woodland, 1993). Diese Verklumpung lässt sich schnell und einfach im Mikroskop nachweisen. Das Aggregationsverhalten der einzelnen T-Zelllinien erwies sich als superantigenespezifisch, zeit-, und konzentrationsabhängig.

Das durch Superantigene induzierte Aggregationsverhalten war nur von CD54 abhängig (siehe 4.1.3). Eine Blockade von anderen Adhäsionsmolekülen zeigte keinen Effekt auf das Aggregationsverhalten der T-Zellen. Das Aggregationsverhalten war nicht direkt an andere durch Superantigene induzierte Reaktionen gekoppelt, da die durch Superantigene induzierte Stat3-Aktivierung nicht mit dem Aggregationsverhalten korrelierte (siehe 4.5.8). Verschiedene Adhäsionsmoleküle spielen somit bei unterschiedlichen superantigenvermittelten Reaktionen eine Rolle (Damle, 1993, Fortner, 1998). Das Aggregationsverhalten von T-Zellen nach Inkubation mit Superantigenen lässt sich daher nur als einleitende, oberflächliche Untersuchungsmethode verwenden.

SEA induzierte eine deutliche Reduktion der IL-2- oder IL-15-induzierten T-Zellproliferation nach 48h. Diese antiproliferative Wirkung war kein allgemeiner toxischer Effekt auf aktivierte T-Zellen, da eine PMA-induzierte T-Zellproliferation nicht gehemmt, sondern eher verstärkt wurde (4.2.1).

Eine Möglichkeit, die durch Zytokine induzierte Proliferation von aktivierten T-Zellen zu verändern, stellt die Regulation der betreffenden Zytokinrezeptoren dar (Nakarai, 1994 und Taniguchi, 1995b). Die IL-2R β Kette zeigte nach Inkubation mit SEA eine deutliche Reduktion der durch Zytokine induzierten Phosphorylierung, und eine starke Reduktion der Oberflächenexpression (4.2.2 und 4.3.1).

Diese Resultate stimmen mit anderen Daten über die durch SEA induzierte Regulation der IL-2R Ketten sowie einer Regulation von Jak3 überein (Nielsen, 1995).

Die hier gezeigte Regulation des IL-2R-Signalweges war spezifisch für Superantigene und nur durch den Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A zu hemmen. Das lässt eine Abhängigkeit der SEA-induzierten Signale von Ca²⁺ vermuten. SEA kann unter anderem durch Aktivierung von PLC γ intrazelluläre Kalziumsignale auslösen (Kanner, 1992 und Kanner, 1995).

Andere Hemmer für PKC, PI3-K, mTor, PP1 oder PP2A zeigten keinen Effekt auf die Regulation der IL-2R Signale. Diese Hemmer zeigen jedoch alle deutliche Effekte auf die CD3-induzierte T-Zellproliferation.

Cyclosporin A inhibierte spezifisch den hemmenden Effekt von SEA auf zytokininduzierte Proliferation und den verstärkenden Effekt auf PMA-induzierte Proliferation (4.4.5).

Das unterstreicht die Vermutung, dass die durch Superantigene induzierten Signale über Ca²⁺-abhängige Signalwege vermittelt werden. Diese Daten sind in Übereinstimmung mit Daten von einer MHC Klasse II-, CD4- und TcR-abhängigen Aktivierung von Kalziumsignalen in Monozyten (Damaj, 1992). Cyclosporin A wird weitläufig als immunregulatives Medikament bei Transplantationen eingesetzt und galt bis vor kurzem als spezifischer Hemmer der Ca²⁺-abhängigen Phosphatase Calcineurin. Neueste Daten weisen aber auch auf einen Einfluß von Cyclosporin auf den p38/JNK-Signalweg hin und unterstreichen damit das breite Wirkungsspektrum von Cyclosporin A auf T-Zellsignale (Kreideweiß, 1999 und Matsuda, 2000).

Bakterielle Superantigene sind unter anderem mit den Krankheitsbildern von Psoriasis und Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht worden (Lewis, 1993 und Leung, 1995). Die hier verwendeten Psoriasis T-Zelllinien wurde aus einer Biopsie von infizierten Hautbereichen gewonnen (Kaltoft, 1995). Diese T-Zellen stellen somit *in vivo*-aktivierte, zytokin-sensitive T-Zellen dar.

Psoriasis T-Zelllinien, welche nicht proliferativ auf SEA reagieren (*non-responder*), zeigten erstaunlicherweise eine Verstärkung der durch Zytokine induzierten Proliferation, jedoch keine Regulation der Zytokinrezeptorketten.

Auch dieser Effekt von SEA war von Kalziumsignalen abhängig und konnte durch Cyclosporin A gehemmt werden (4.4.6).

SEA hat zwei Bindungsstellen für MHC Klasse II Moleküle. *Crosslinking* von MHC Klasse II Molekülen durch fixierte monoklonale Antikörper zeigte ebenfalls regulative Effekte auf IL-2-induzierte Signale (Ødum, 1993 und Nielsen, 1994). Eine Induktion von durch SEA induzierten proliferativen Signalen durch *crosslinking* von MHC Klasse II Molekülen in T-Zellen kann daher nicht ausgeschlossen werden (Mehindate, 1995).

Unsere Ergebnisse, dass selbst SEA-*nonresponders* nach Behandlung mit SEA eine Verstärkung der durch Zytokine induzierten Proliferation aufweisen, unterstreicht die mögliche Rolle von Superantigenen in Psoriasis (Gerwien, 1998). Superantigene können die Proliferation von aktivierten T-Zellen in mit Bakterien infizierten Hautbereichen verstärken und somit eine durch Zytokine gesteuerte, entzündliche Reaktion auslösen oder verstärken (Christophers, 1996, Debets, 1996 und Boehncke, 1996).

5.2 Superantigene und Stat-Proteine

Wir haben gezeigt, dass Superantigene die Oberflächenexpression und die einleitende Phosphorylierung von Zytokinrezeptorketten regulieren können (Gerwien, 1998). Ein Signalweg, der unmittelbar durch IL-2R β Phosphorylierung reguliert wird, ist der Jak/Stat-Signalweg. Stat-Proteine (hier Stat3 und Stat5) binden sich an die phosphorylierten Abschnitte der Rezeptorketten und werden danach selbst durch Jak-Kinasen phosphoryliert.

Es lag deshalb nahe, eine mögliche Modulation der Stat-Proteine durch Superantigen zu untersuchen.

Bis jetzt konnte keine durch Superantigene induzierte Aktivierung von Jak-Kinasen gefunden werden (Daten nicht dargestellt, Beading, 1994 und Nielsen, 1995). Jedoch deuten einige Resultate auf den Einfluss von TcR-Signalen auf Stat-Proteine hin (Henttinen, 1995 und Ng, 1997).

Durch Immunpräzipitation mit Anti-Phosphotyrosin Antikörpern fanden wir eine deutliche Phosphorylierung von Stat3 an Serin- und Tyrosinresten nach Inkubation für eine Stunde mit SEA oder Anti-TcR-Antikörpern (4.5.1 und 4.5.2). Die durch Superantigene induzierte Stat3-Phosphorylierung war in der Kinetik und der Stat-Spezifität von der durch IL-2 induzierten Stat-Phosphorylierung deutlich verschieden (Ihle, 1995).

Eine weitere Untersuchung verschiedener alloaktivierter T-Zelllinien mit phosphotyrosinspezifischen Stat-Antikörpern ergab, dass einige oligoklonale Linien (2 von 10) eine deutlich schnellere, akkumulierende Phosphorylierung von Stat3 an Serin und Tyrosin zeigten (4.5.3). Während die durch Zytokinrezeptoren induzierten Stat-Signale gut untersucht sind (O'Shea, 1997 und Schindler, 1999), existieren kontroverse Ergebnisse bezüglich der durch SEA- oder TcR induzierten Stat-Phosphorylierung. Die Unterschiede liegen vor allem in der Stat-Spezifität, der Kinetik oder der Serin- und Tyrosin-Phosphorylierung.

Beading et al. fanden erst keine TcR induzierte Stat-Phosphorylierung in humanen T-Zellen, später jedoch fanden Ng et al. eine Mek/Erk-abhängige Serinphosphorylierung von Stat3 (Beading, 1994 und Ng, 1997). Lafont et al. fanden in B- und T-Zellen eine langsame, durch Antigenrezeptoren vermittelte Aktivierung von Stat1 durch PI3-K und Akt/PKB (Lafont, 2000). Henttinen et al. fanden in humanen T-Zellen nach drei Stunden eine IL-6-abhängige Aktivierung von Stat3 (Henttinen, 1995) und Welte et al. zeigte in Mäusen eine direkte, Lck-abhängige Assoziation des TcR's mit Stat5 nach TcR-Stimulation (Welte, 1999). Kürzlich konnte Tomita et al. eine von Zytokinen unabhängige, direkte Assoziation von Jak3 und dem T-Zellen Rezeptor nachweisen (Tomita, 2001). Somit kann eine direkte Aktivierung von Stat-Proteinen durch TcR-Signale nicht ausgeschlossen werden.

Die unterschiedlichen Resultate können an den verschiedenen Spezies der verwendeten T-Zellen, an den verschiedenen Aktivierungsstufen der verwendeten T-Zellen, oder an den unterschiedlichen Untersuchungsmethoden liegen und erfordern weitere Untersuchungen.

Um die biologische Aktivität der induzierten Stat-Proteine zu testen, benutzen wir Biotin-gekoppelte Oligo-Nukleotide von verschiedenen Stat-Bindungsregionen. Es zeigte sich, dass Stat3 nicht nur an Serin und Tyrosin phosphoryliert war, sondern auch DNA-bindende Aktivität besaß.

Stat3 band nach Inkubation der T-Zellen mit Superantigenen an Stat-Bindungsregionen des ICAM1-Promotors und des IL-2R α -Promotors. SEA-Inkubation verstärkte parallel dazu die Oberflächenexpression von ICAM1 und IL-2R α (4.5.4).

Verschiedene Gruppen haben, neben den Jak-Kinasen, auch den Einfluß von src- und Map-Kinasen auf die Phosphorylierung von Stat-Proteinen nach TcR-Stimulation nachgewiesen (Chung, 1997 und Welte, 1999).

Es ließ sich nachweisen, dass auch in unserem System die Aktivierung von Stat3 durch Superantigene von src-Kinasen reguliert wurde. Der src-Kinasehemmer PP1 blockierte bei durch Superantigene induzierte Stat3-Phosphorylierung an Serin und Tyrosin, die durch Superantigene induzierte Bindung von Stat3 an einen ICAM1-Bio-Oligo und die verstärkte Oberflächenexpression von ICAM1 und IL-2R α (4.5.5 und 4.5.6). Hemmer von mTor und PI3-K zeigten dagegen nur geringen Einfluss auf SEA-induzierte Signale (Lafont, 2000). Diese Daten deuten auf eine durch Superantigene induzierte Aktivierung von Stat3 in aktivierten humanen T-Zellen durch src-Kinasen hin (Gerwien, 1999). Diese Stat3-Aktivierung unterschied sich deutlich von der IL-2-induzierten Stat3-Aktivierung.

Um zu untersuchen, ob die einzelnen Bindungsstellen für MHC Klasse II oder TcR einen Einfluss auf die SEA-induzierte Stat3-Phosphorylierung haben, benutzten wir verschiedene SEA-Mutanten zur Stimulation von aktivierten T-Zellen (4.5.7). Hier zeigte sich, dass eine Mutation in beiden MHC Klasse II Bindungsstellen des SEA-Moleküls die Stat3-Aktivierung stark hemmte (SEAm23). Eine Mutation von nur einer der beiden MHC Klasse II Bindungsstellen setzte die Stat3 Aktivierung herab, blockierte sie aber nicht völlig (SEAm9 und SEAm15). Somit ließ sich kein funktioneller Unterschied zwischen den beiden Mutanten der MHC Klasse II Bindungsstellen feststellen. Eine Mutation der TcR-Bindungsstelle setzte die Stat3-Aktivierung ebenfalls herab, hemmte sie aber nicht vollständig (SEAt12).

Diese Daten verdeutlichen keine absolute Notwendigkeit einer der drei Bindungsdomänen von SEA, sondern deuten eher auf eine Regulation der Stat-Aktivierung durch verschiedene Affinitäten der einzelnen SEA-Mutanten hin.

Diese These wird durch den Umstand unterstützt, dass andere Superantigene als SEA nur eine MHC Klasse II Bindungsstelle besitzen (z.B. SEB), jedoch in der Lage sind, in humanen aktivierten T-Zellen Stat3 zu aktivieren (Jardetzky, 1994). Tiedeman et al. zeigte eine Abhängigkeit der vollen SEA-Reaktivität von zwei MHC Klasse II Bindungsstellen im SEA Molekül (Tiedeman, 1996), während in anderen experimentellen Modellen eine Dimerisierung von MHC Klasse II Molekülen nicht für die Aktivierung von durch Superantigene induzierte Signale notwendig war (Mehindate, 1996). Die grundsätzliche Bedeutung der MHC Klasse II Bindungsstellen für superantigeninduzierte Signale ist jedoch umstritten und sicher vom experimentellen System abhängig (Masewicz, 1993, Mehindate, 1995, Lando, 1996 und Newton, 1996).

Nichtaktivierte T-Zellen zeigten keine SEA-Reaktivität ohne APC's und nur eine gleichzeitige Bindung von Antikörpern gegen MHC Klasse II und TcR induzierte in alloaktivierten T-Zellen superantigenähnliche Signale (Kanner, 1992, Nielsen, 1994). Diese Daten sprechen für die Notwendigkeit der gleichzeitige Bindung von MHC und TcR auf einer T-Zelle. Die Möglichkeit von verschiedenen Superantigenen, an MHC Klasse II Moleküle zu binden, wird von der Peptidbindung des MHC Moleküls, sowie von DM und der *invarianten Kette* (Ii) beeinflusst (Wen, 1996 und Lavoie, 1997).

Die Möglichkeit, dass die verschiedenen Reaktivitäten von SEA über die Affinität reguliert werden können, wird durch die Blockade von Adhäsionsmolekülen bestätigt (4.5.8). Auch kostimulatorische Moleküle tragen zur Erhöhung der reellen Affinität bei (Mehindate, 1996, Fortner, 1998 und Lamphear, 1998).

5.3 Superantigene und Zytokine

Der hauptsächliche Regulationsmechanismus für die Aktivierung von Stat-Proteinen sind Zytokine und Zytokinrezeptoren (O'Shea, 1997). Um einen Überblick über SEA-induzierte Zytokine zu erlangen, wurde ein RNase Protection Assay durchgeführt (4.6.1). Das lässt die gleichzeitige Messung von 9 verschiedenen, humanen Zytokinen in einer Probe zu.

Bereits nach einer Stunde wurde eine deutliche Produktion von mRNAs für IFN γ und IL-13, sowie eine schwächere, transiente Produktion von IL-5, IL-10, IL-4, IL-15 und IL-9 festgestellt. Eine mRNA-Produktion ist jedoch nicht mit einer reellen Zytokinfreisetzung gleichzusetzen.

Deshalb wurde die Produktion der im RNase Protection Assay identifizierten Zytokine (zusammen mit IL-6) in einleitenden ELISA-Versuchen von sechs verschiedenen allo-aktivierten T-Zelllinien getestet. Hier konnten nur die Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 und IFN γ nachgewiesen werden. Die nachfolgenden Analysen beschränkten sich daher nur auf diese vier Zytokine. Im ELISA zeigte sich eine schwache transiente Produktion von IL-4, eine schwache akkumulierende Produktion von IFN γ , und eine starke Produktion von IL-5 (10 ng/ml nach 12h) und IL-13 (5ng/ml nach 12h) in allen sechs hier getesteten T-Zelllinien (4.6.2).

Superantigene werden, neben Autoimmunerkrankungen (Schiffenbauer, 1998), häufig mit Psoriasis (Boehncke, 1996) oder atopischen Reaktionen (wie Asthma und Allergie) in Zusammenhang gebracht (Herz, 1999, Hauk, 1999 und Taskapan, 2000). Auch in der T-Zelllinie RB4.1 eines Patienten mit Atopischer Dermatitis induzierte eine Inkubation mit Superantigen (SEB) für zwölf Stunden eine starke Produktion von IL-5 (10 ng/ml) und IL-13 (90 ng/ml). Superantigene induzierten in beiden dargestellten T-Zelllinien eine kräftige Produktion der T_H2 Zytokine IL-5 und IL-13, die Menge der IL-13-Produktion lag bei der Zelllinie RB4.1 jedoch deutlich höher (4.6.3).

Um zu untersuchen, ob die Produktion von IL-5 und IL-13 ein generelles Phänomen von humanen T-Zellen nach Inkubation mit Superantigen ist, wurden verschiedene allergenspezifische T-Zellklone untersucht (4.6.4). Hier zeigte sich überraschenderweise eine Produktion von IL-5 und IL-13 nicht nur von einem T_H2-, sondern auch von einem T_H0- und einem T_H1-Klon. Eine allergenspezifische Stimulation der drei birkenpollenreaktiven T-Zellklone (Sparholt, 1997) mit antigenpräsentierenden Zellen und Allergenen resultierte nur bei dem T_H2-Klon in einer deutlichen IL-5/IL-13-Produktion (4.6.5). Sparholt et al. testeten bei der Charakterisierung der Klone jedoch nicht für die Zytokine IL-5 und IL-13.

Diese Daten deuten auf eine generelle durch Superantigene induzierte Produktion von IL-5 und IL-13 auch von nicht als T_H2 charakterisierten humanen T-Zellen hin. Jedoch sind weiterführende Tests von verschiedenen T-Zellen zur Untermauerung dieser These notwendig.

Dass neben IL-13 und IL-5 nicht auch IL-4 in größeren Mengen produziert wurde, war überraschend. Das könnte am hier untersuchten Zeitfenster oder an unseren Analysemethoden

gelegen haben.

Andererseits würde es die individuelle Regulation der T_H2 Zytokine IL-13 und IL-4 unterstreichen (Yu, 1998). Rink et al. untersuchten verschiedene Superantigene und ihre Zytokinstimulation in humanen T-Zellen. Sie fanden eine Induktion von IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IFN γ und TNF α in humanen PBMCs durch fast alle Superantigene. Diese Zellpopulation unterscheidet sich jedoch grundlegend von den in unseren Experimenten verwendeten humanen alloaktivierten T-Zellen (Rink, 1996).

In humanen T-Zellen ist die Möglichkeit CD4⁺ T-Zellen nach ihrem Zytokinprofil eindeutig in T_H1- oder T_H2-Zellen einzuteilen, nicht so ausgeprägt wie bei murinen T-Zellen (O'Gara, 1998 und Rengarajan, 2000). Auch haben zum Teil T_H1- (IFN γ) und T_H2-Zytokine (IL-13) sich verstärkende Effekte in chronischen Entzündungszuständen und T_H1-Zytokine unterdrücken nicht immer eine T_H2-Reaktion (Ford, 2001).

In den letzten Jahren ist das T_H2-Zytokin IL-13 immer mehr in den Fokus der Forschung geraten. Zuerst wurde IL-13 nur als der kleine Bruder von IL-4 betrachtet, der zwar mit ähnlichen Rezeptoren reagiert, im Gegensatz zu IL-4 aber keine T-Zellreaktivität besitzt (Murata, 1998 und Jiang, 2000). Beide Zytokine haben überlappende Funktionen. Sie aktivieren Stat3, IRS und den T_H2-spezifischen Transkriptionsfaktor Stat6 (Foster, 1999). Stat6 aktiviert dann Gata3, den zentralen T_H2-Transkriptionsfaktor (Rengarajan, 2000). T_H2-Zytokine wie IL-4, IL-5, und IL-13, spielen bei der Regulation von allergischen Reaktionen eine ausschlaggebende Rolle (de Vries, 1999).

IL-5 ist hauptsächlich an der Regulation und Proliferation von Eosinophilen beteiligt (Webb, 2000). Eine von IL-4 deutlich verschiedene Rolle von IL-13, mit spezifischen Effekten besonders bei Asthma, ist im Laufe der letzten Jahre immer deutlicher geworden (de Vries, 1995, McKenzie, 1999). Die spezifische Rolle von IL-13 bei Asthma wird deutlich, da eine Hemmung von IL-4 nicht vollständig vor Asthma schützt, während eine IL-13-Blockade asthmatische Reaktionen in einem Maus-Modell völlig unterbindet (Grünig, 1999 und Brombacher, 2000). Das unterstreicht die wichtige regulative Rolle, die IL-5 und IL-13 in allergischen Reaktionen einnehmen.

Allergien und Asthma sind in den letzten Jahren in der westlichen Welt stark angestiegen (von Mutius, 1994 und Ring, 1997). Eine zentrale Rolle in diesen entzündlichen, atopischen Reaktionen spielen neben den Zytokinen dabei ohne Zweifel die CD4⁺ T-Zellen (Kon, 1999 und Romagnani, 2000b).

Der Zusammenhang von Superantigenen und atopischen Krankheiten wird häufig diskutiert, ist jedoch noch ungeklärt. Es wird aber immer deutlicher, dass Infektion von Hautbereichen und die Kolonisierung der Luftwege und des Darms mit verschiedenen, zum Teil enterotoxinproduzierenden Bakterien, einen großen Einfluss auf das Vorkommen von Allergien und Asthma haben (Kilian, 1995, Björkstén, 1999, Fayon, 1999 und Shimori, 2000).

Da unser Immunsystem besonders in den ersten Lebensjahren lernfähig ist und ausgebildet wird, könnte die bakterielle Flora, sofern sie das T_H1/T_H2-Gleichgewicht verschiebt, ein Faktor sein, der große Bedeutung für unser späteres generelles Zytokinprofil hat (Björkstén, 1999 und Jones, 2000). Ein durch Bakterien induziertes T_H2-Profil könnte somit das Vorkommen von Asthma und Allergien verstärken (de Vries, 1999).

Das Zytokinprofil von T-Zellen lässt sich durch Zytokine, kostimulatorische Moleküle, und durch die Modifikation der T-Zellrezeptorbindung regulieren. Naive T-Zellen entwickelten bei moderater TcR-Stimulation einen T_H2-Phenotyp auch ohne IL-4, und mit zusätzlichen TcR-Signalen konnten diese T-Zellen, auch ohne IL-12, zu T_H1-Zellen modifiziert werden (Moriggl, 1998 und Noble, 2001). Rogers et al. haben ebenfalls eine Abhängigkeit der T_H1/T_H2-Entwicklung von naiven T-Zellen von der anfänglichen Peptiddosis, der Affinität des Liganden, und von kostimulatorischen Molekülen gefunden (Rogers, 1999 und Rogers, 2000).

Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch bei der Reaktion von Superantigen mit aktivierten T-Zellen vorliegen. Die Affinität des TcR für MHC und Peptid ist erstaunlich gering und die K_D liegt im Bereich von nur einigen μM^{-1} . Um eine T-Zellen Aktivierung bei solch kleinen Bindungskonstanten zu erklären, wurde das Modell des *serial triggering* aufgestellt (Lanzavecchia, 2001). Schon geringe Veränderungen der Ligandenstruktur mit einer geänderten Affinität können gravierende Auswirkungen auf die resultierenden T-Zellsignale zur Folge haben (Lord, 1999).

Die Affinität der Bindung zwischen TcR, Superantigen und MHC liegt im Bereich von einigen μM^{-1} und damit in der gleichen Größenordnung wie die TcR/MHC-Interaktion (Redpath, 1999). Eine drastische Erhöhung der Konzentration von Superantigenen führte wie bei TcR/MHC-Signalen zu apoptotischen Reaktionen (Lavoie, 2001). Verschiedene Faktoren, wie Oligomerisierung von MHC oder TcR, *serial triggering* oder kooperative Aktivierung von nicht gebundenen TcRs, können somit auch bei der Reaktion von Superantigenen und T-Zellen eine Rolle spielen (Niedergang, 1998, Fraser, 2000 und Papageorgiou, 2000). Eine Regulation des Zytokinprofils der T-Zellen durch Interaktion von TcR und Superantigen kann daher nicht ausgeschlossen werden. Superantigene können somit durch die Stimulation von humanen aktivierten CD4^+ T-Zellen zur Produktion eines betonten $\text{T}_\text{H}2$ -Zytokinprofils deutlich den Krankheitsverlauf von entzündlichen, allergischen Reaktionen beeinflussen. Die produzierten Zytokine IL-5 und IL-13 können bei der Initiierung oder der Aufrechterhaltung der verschiedenen atopischen Reaktionen eine wichtige Rolle spielen.

5.4 IL-13 und Stat-Proteine

Wir wollten als nächstes die Frage klären, ob die produzierten Zytokine für die Aktivierung von Stat3 verantwortlich waren. Dazu wurde als erstes getestet, ob eine Neusynthese von Proteinen (Zytokinen) für die SEA-induzierte Stat3-Aktivierung nötig war.

Verschieden Inhibitoren der Proteinsynthese und des intrazellulären Transportes zeigten eine spezifische Hemmung der durch SEA induzierten Stat3-Aktivierung (4.7.1 und 4.7.2). Lafont et al. zeigte dagegen eine durch den TcR vermittelte Stat1-Serinphosphorylierung, die nicht von der Proteinbiosynthese abhängig war, allerdings in einem anderen Versuchsmodell (Lafont, 2000). Die hier gezeigte Abhängigkeit der durch SEA induzierten Stat-Aktivierung von der Proteinbiosynthese kann nicht die unmittelbare, schnelle Aktivierung von Stat3 in einigen getesteten T-Zelllinien erklären (4.5.3). Bei der schnellen akkumulierenden Stat3-Aktivierung durch SEA scheint in der anfänglichen Phase ein anderer Mechanismus verantwortlich zu sein, der jedoch noch nicht identifiziert ist.

Es lag nahe zu untersuchen, ob das durch SEA induzierte IL-13 das Zytokin ist, welches für die Stat3-Aktivierung verantwortlich ist. Falls SEA-induziertes IL-13 das Stat3-aktivierende Zytokin ist, würde man neben der Stat3- auch eine Stat6-Phosphorylierung erwarten.

In 4.7.3 zeigte sich eine in Relation zu Stat3, schwache und verspätete Stat6-

Phosphorylierung. IL-13 wird zwar von T-Zellen produziert, gilt aber im Gegensatz zu IL-4 als unfähig, T-Zellen zu stimulieren. Um eine IL-13-Reaktivität auszulösen, müssten T-Zellen einen funktionellen IL-13 Rezeptor besitzen (siehe Abb. 5.4.1). Wir haben deshalb die Oberflächenexpression von IL-13R α 2 auf T-Zellen nach SEA-Stimulation mittels FACS-Analyse untersucht (4.7.4).

Hier wurde eine durch SEA induzierte, verstärkte Oberflächenexpression des IL-13R α 2 deutlich. Alloaktivierte T-Zellen wurden nun mit SEA für 12h vorbehandelt, gewaschen und für 4h gehungert. Danach wurde die IL-13-Reaktivität der T-Zellen untersucht.

Wir zeigten hier erstmals eine durch IL-13 induzierte Stat3- und Stat6-Aktivierung in humanen T-Zellen nach Vorbehandlung mit Superantigen. Humane CD4⁺ T-Zellen galten bisher als nicht in der Lage, auf IL-13 zu reagieren.

Um abzusichern, dass IL-13 wirklich das Stat3- und Stat6-aktivierende Zytokin ist, wurden anschließend Versuche mit verschiedenen Zytokinhemmern durchgeführt.

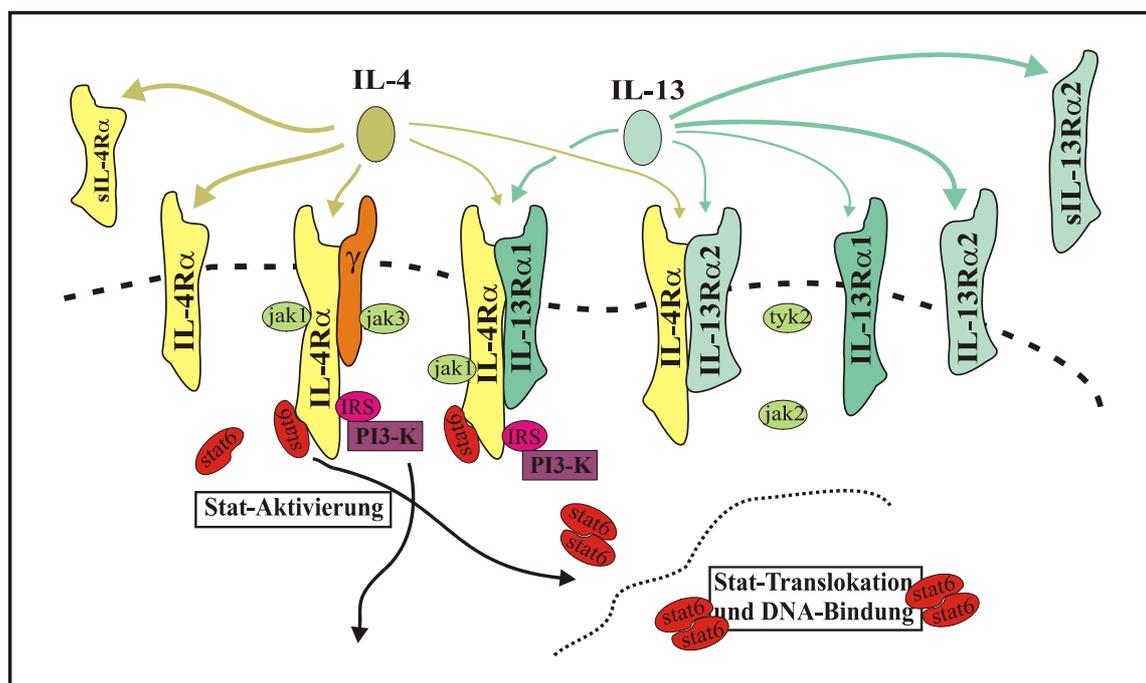


Abb. 5.4.1 Der IL-4 Rezeptor und der IL-13 Rezeptor.
(Die Größe der Pfeile ist proportional zu Bindungsaffinität)

Neutralisierende Antikörper gegen die Zytokine IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-12

waren nicht in der Lage, die Stat3/Stat6-Aktivierung durch SEA zu unterbinden. Dagegen zeigte die Titration eines IL-13-Rezeptormoleküls eine klare spezifische Hemmung der durch SEA induzierten Stat-Aktivierung (4.9.1). Das IL-13 Rezeptormolekül hemmte jedoch weder die durch IL-2 induzierte Stat3-Aktivierung, noch die durch IL-4 induzierte Stat6-Aktivierung und galt damit als IL-13-spezifisch (4.9.2). Diese Versuche belegen, dass Superantigene durch die Produktion von IL-13 die Aktivierung von Stat3 und Stat6 in humanen T-Zellen auslösen können. Die schnelle (in Minuten), direkte Aktivierung von Stat3 in einigen T-Zellen Linien müsste durch einen anderen Mechanismus ausgelöst werden. Die schnelle Freisetzung von gespeicherten Zytokinen aus Vesikeln wäre dazu eine Erklärungsmöglichkeit.

Da die Induktion von Stat6 wahrscheinlich nicht für die vollständige T_H2-Differenzierung von T-Zellen ausreicht, wollten wir wissen, ob Superantigene auch die Produktion des T_H2-spezifischen Transkriptionsfaktors Gata3 auslösen können (Jankovic, 2000, Rengarajan, 2000 und Zhu, 2001). Wir fanden eine verstärkte Produktion von Gata3 in Zellkernen von aktivierten T-Zellen nach Inkubation mit SEA für 16 Stunden (4.10.1).

Superantigene induzierten neben IL-13, IL-5 und Stat6 somit auch den T_H2-spezifischen Transkriptionsfaktor Gata3 in alloaktivierten humanen T-Zellen.

An der durch SEA induzierten Produktion von T_H2-Zytokinen und Transkriptionsfaktoren können viele verschiedene Moleküle beteiligt sein. Um einen Überblick über die durch Superantigen induzierten Moleküle zu bekommen, wurde ein GeneChip Assay durchgeführt. Hierzu wurden alle durch SEA induzierten mRNAs isoliert und auf einem *Array* zu ca. 12.000 Genfragmenten hybridisiert. Die stimulierte Probe kann nun in Relation zu einer unstimulierten Probe gemessen werden. Die am deutlichsten verstärkten Proteine wurden in Tabelle 4.10.2 zusammengefasst. Neben den Zytokinen IL-8 und IL-17, sowie den Transkriptionsfaktoren nur77, CREM und NF-AT, fällt besonders die durch SEA induzierte Produktion von kostimulatorischen Molekülen wie 4-1BB, CD40L und Ox-40 auf. SOCS3 ist ein Zytokininhibitor und CRTH2 gehört zu den Chemokinrezeptoren, und beide Proteine könnten ebenfalls an der Verschiebung des T_H1/T_H2-Gleichgewichts beteiligt sein.

Li et al fanden ebenfalls durch einen GeneChip Assay eine verstärkte Produktion von

Kostimulationsmolekülen in allergenspezifischen T_H2-T-Zellen (Li, 2001). Eine spezifische Reduktion von mRNAs wurde in unseren Versuchen nicht gefunden. Überraschenderweise wurde keine Produktion der erwarteten Zytokine (IL-13 und IL-5) oder Transkriptionsfaktoren (Stat6, Gata3, c-maf) festgestellt.

Die biologische Relevanz der im GeneChip identifizierten Proteine muss nun im Einzelnen geprüft werden. In einleitenden Versuchen wurde die Oberflächenexpression verschiedener Kostimulationsmoleküle untersucht. Mittels FACS-Analyse wurde eine durch SEA induzierte, spezifische Verstärkung der Oberflächenexpression von ICOS und Ox-40 gefunden. Die genaue Funktion der Proteine Ox-40 und ICOS ist noch umstritten, jedoch scheinen beide eine Rolle bei der Differenzierung von aktivierten T-Zellen zu spielen (Ohshima, 1998, Gonzalo, 2001, Sperling, 2001 und McAdam, 2001). In einem Maus-Modell wurde gezeigt, dass der Ausbruch von Asthma stark von der Funktion von Ox-40 und ICOS abhängig ist (Jember, 2001 und Sperling, 2001). Neben der Induktion von Zytokinen ist die durch Superantigene regulierte Oberflächenexpression von kostimulatorischen Molekülen eine Möglichkeit, wie Superantigene regulativ die Balance zwischen T_H1 und T_H2 beeinflussen können.

Wir haben in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass Superantigene in Abhängigkeit von Adhäsionsmolekülen eine T-Zellaggregation auslösen können, die durch Zytokine induzierte Proliferation herabsetzen, jedoch die PMA-induzierte Proliferation verstärken, sowie die Oberflächenexpression der einzelnen IL-2R-Ketten regulativ verändern.

All diese Reaktionen waren von Ca²⁺-Signalen und src-Kinasen abhängig, da sie von Cyclosporin A und PP1 gehemmt werden konnten. Superantigene induzierten eine akkumulierende Phosphorylierung an Serin und Tyrosin von Stat3 und Stat6, in einigen T-Zelllinien sogar schon nach einigen Minuten. Diese Stat-Aktivierung unterschied sich deutlich von der durch Zytokine induzierten Stat-Aktivierung. Durch Superantigene induziertes Stat3 war nicht nur phosphoryliert, sondern auch biologisch aktiv und band an verschiedene Promoterregionen. Es konnte jedoch keine funktionelle Abhängigkeit von einer der drei SEA-Bindungsstellen festgestellt werden, und die durch Superantigene induzierte Stat-Aktivierung erwies sich als abhängig von der Proteinbiosynthese.

Superantigene induzierten in verschiedenen T-Zelllinien eine kräftige Produktion der T_H2-Zytokine IL-5 und IL-13, und IL-13 konnte mit einem IL-13 Rezeptor-Molekül als das Stat3- und Stat6-aktivierende Zytokin identifiziert werden.

Humane T-Zellen waren nach Inkubation mit SEA und verstärkter Produktion des IL-13 Rezeptors in der Lage, durch IL-13 stimuliert zu werden. Dadurch rücken IL-13 und CD4⁺ T-Zellen bei der Diskussion von atopischen Erkrankungen noch deutlicher in den Vordergrund. Neben der kräftigen Produktion von IL-5 und IL-13 sowie Stat6, induzierten Superantigene auch die Produktion von Gata3 und von den Kostimulationmolekülen Ox40 und ICOS in alloaktivierten humanen T-Zellen.

5.5 Ausblick

Die hier erzielten Ergebnisse lassen einige Fragen offen und stellen darüber hinaus ein paar neue Fragen. Der Mechanismus der schnellen, direkten Phosphorylierung, der in einigen T-Zelllinien gefunden wurde, lässt sich nicht durch die Induktion von IL-13 erklären, und muss daher genauer untersucht werden.

Um zu untersuchen, ob die durch Superantigene induzierte Produktion von T_H2-Zytokinen auch von T_H1- und T_H0-Zellen ein generelles Phänomen ist, müssen noch weitere T-Zelllinie und T-Zellklone untersucht werden.

Die Stat6-Aktivierung in humanen T-Zellen durch IL-13 ist überraschend, doch bleibt offen, ob IL-13 auch die Proliferation und Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen beeinflussen kann. In den untersuchten T-Zelllinien könnte die Inkubation mit Superantigenen unterschiedlich auf verschiedene Subpopulationen wirken. Hier könnte Fraktionierung der Subpopulationen und eine Bestimmung der produzierten Zytokine durch intrazelluläres Anfärben und FACS-Analyse die gezeigten ELISA-Daten vervollständigen.

Eine Untersuchung der Reaktivität von naiven T-Zellen könnte bessere Aufschlüsse über die *in vivo*-Effekte von Superantigenen geben. Es wäre sicher interessant zu untersuchen, ob aktivierte T-Zellen ohne MHC Klasse II Moleküle die gleichen, durch Superantigene induzierten Signale zeigen würden. Außerdem ist die biologische Bedeutung der in GeneChip-Experimenten identifizierten Proteine für durch Superantigene induzierten Signale noch unklar und muss weiter untersucht werden.