

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Grundlagen

Das Immunsystem dient der Abwehr von Mikroorganismen und Proteinen, sogenannten Antigenen, die vom Organismus als körperfremd erkannt werden. Die Fähigkeit zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu unterscheiden wird in Vertebraten durch die *angeborene Immunität* und die *spezifische* oder *adaptive Immunität* kontrolliert [1, 2].

Die *angeborene Immunität* dient zur frühen Erkennung von Krankheitserregern und als erste Barriere, um eine Invasion von pathogenen Mikroben in den Organismus zu verhindern. Ihr Schutz umfasst humorale Faktoren (pH-Wert, toxische, bakterizid wirkende Substanzen), die Induktion lokaler inflammatorischer Antworten durch Bestandteile des Komplementsystems und zelluläre Faktoren, zu denen alle polymorphkernigen Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Mastzellen und Makrophagen gehören. Gelingt einem Erreger dennoch die Überwindung dieser unspezifischen Verteidigungslinie, reagiert das *adaptive Immunsystem* mit einer gezielten Abwehrreaktion. Im Unterschied zur angeborenen Immunabwehr entwickelt sich die adaptive Immunabwehr erst durch das direkte Aufeinandertreffen mit dem Pathogen, weshalb sie auch als erworbene Immunität bezeichnet wird. Ein weiteres Kennzeichen der adaptiven Immunabwehr ist das Ausbilden eines immunologischen Gedächtnisses, welches den Organismus gegen das erneute Eindringen des gleichen Erregers schützt. Die zellulären Träger der adaptiven Immunabwehr sind im Wesentlichen die B- und T-Lymphozyten, deren Eigenschaften auf einer Vielzahl hochspezifischer Antigenrezeptoren, den B- und T-Zell-Rezeptoren (BCR und TCR), beruhen. Die Spezifität dieser Rezeptoren entsteht aus ihrer Diversität, die sich durch somatische Rekombination und Ergänzung von keimbahnkodierten Gensegmenten während der Lymphozyten-Differenzierung entwickelt und für jeden Rezeptor einzigartig ist. Die Bindung dieser Rezeptoren mit einem spezifischen Antigen führt zu einem weiteren zentralen Prinzip der adaptiven Immunität, nämlich zur Selektion, klonalen Expansion und Differenzierung zu Effektorzellen. Ein Teil dieser Effektorzellen ist nach finaler Differenzierung zu Gedächtniszellen (*memory Th cells*) für das Ausbilden des immunologischen Gedächtnisses verantwortlich. Die adaptive Immunität verfügt über humorale und zelluläre Abwehrmechanismen. Die humoralen Abwehrmechanismen werden durch B-Zellen vermittelt, die mit ihrem BCR, einem membranständigen Antikörper, natives Antigen binden können und auf Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) II-Molekülen den T-Zellen präsentieren. Nach Aktivierung durch T-Zellen differenzieren B-Lymphozyten zu Plasmazellen, die spezifische Immunglobuline (Antikörper) produzieren und diese in das Serum des Blutes sezernieren, wo sie die Eliminierung extrazellulärer Pathogene durch Komplementaktivie-

rung, Phagozytose und Neutralisierung vermitteln. Die Antikörperdiversität wird in antigenstimulierten B-Zellen neben der somatischen Rekombination durch das Phänomen der somatischen Hypermutation in den Keimbahnsequenzen nochmals erhöht.

Die zellulären Abwehrmechanismen werden durch T-Zellen kontrolliert. Sie erkennen Antigene über den TCR als an MHC I bzw. II gebundene Peptide, die von sogenannten professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) präsentiert werden. Periphere T-Zellen lassen sich aufgrund der Expression membranintegrativer Oberflächenmoleküle in zwei große Klassen einteilen, die $CD4^+$ und $CD8^+$ Th-Zellen. Bei den $CD8^+$ Th-Zellen handelt es sich in der Regel um zytotoxische T-Zellen (CTL), die MHC-Klasse I restringiert sind. CTL erkennen Antigene, die aus dem Zytosol infizierter Zellen stammen und daraufhin durch direkten Zellkontakt die Lyse der infizierten Zelle durch Freisetzung zytotoxischer Substanzen bewirken oder den programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren. MHC-Klasse I Moleküle werden auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert. $CD4^+$ Th-Zellen sind im Unterschied dazu MHC-Klasse II restringiert. MHC-Klasse II Moleküle werden konstitutiv auf APC exprimiert und sind mit Peptiden beladen, die extrazellulärer oder endosomaler Herkunft sind. $CD4^+$ Th-Zellen sind die wichtigsten Produzenten von Zytokinen und steuern damit die Immunantwort in Kombination mit ko-stimulatorischen Signalen zu humoralen oder zellulären Immunantworten. Nach Aktivierung entwickeln sie sich zu T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) und aktivieren als Th1-Zellen u.a. Makrophagen zur Unterstützung inflammatorischer Prozesse oder wirken als Th2-Zellen entzündungshemmend und aktivieren B-Zellen [1, 2].

1.1.1 Naive und Antigen-erfahrene $CD4^+$ Th-Zellen in der Peripherie

Nach der Entwicklung der Thymozyten und überstandener Selektion im Thymus wandern die reifen $CD4^+$ Th-Zellen in die Peripherie und zirkulieren dort kontinuierlich über den Blutkreislauf durch die sekundären lymphatischen Organe, bis sie durch antigenspezifische Erkennung aktiviert werden und zu Effektorzellen differenzieren. Die $CD4^+$ Th-Zellen in der Peripherie können daher in naive Antigen-unerfahrene Th-Zellen und Antigen-erfahrene Effektor- oder Gedächtniszellen unterschieden werden, die nach antigener oder mitogener Stimulation *in vitro* ein jeweils charakteristisches Zytokinprofil sekretieren. So produzieren Antigen-erfahrene Th-Zellen neben IL-2 sogenannte Effektorzytokine, wie u.a. $IFN-\gamma$, IL-4 und IL-5, während naive Th-Zellen zunächst nur IL-2 produzieren. Daneben werden diese beiden Entwicklungsstufen der $CD4^+$ Th-Zellen auch über die Expression des klassischen Oberflächenmoleküls CD45 unterschieden, das auf allen Lymphozyten exprimiert wird. Das Transmembranmolekül wird durch alternatives Splicing als CD45RA Isoform auf naiven $CD4^+$ Th-Zellen und als CD45RO Isoform auf Gedächtniszellen

len exprimiert [3]. Nach Aktivierung findet eine phänotypische Konversion von naiven $CD45RA^+CD45RO^-CD4^+$ zu Antigen-erfahrenen $CD45RA^-CD45RO^+CD4^+$ Th-Zellen statt, bei der sich eine Übergangsfraction bildet, die durch eine insgesamt schwächere Expression beider Oberflächenmoleküle ($CD45RA^{low}CD45RO^{low}CD4^+$) gekennzeichnet ist [4, 5].

Tabelle 1: Bedeutung von IL-2 für Zellen des Immunsystems

| Zelltyp | IL-2 Aktivität | Referenz |
|---------------------------|--|----------|
| CD4 ⁺ T-Zellen | Expansion antigenspezifischer Klone über proliferative und anti-apoptotische Mechanismen | [6, 7] |
| | Produktion weiterer Zytokine | [8, 9] |
| | Differenzierung von Th1/Th2 Subpopulationen | [10, 11] |
| | Apoptose aktivierter Th-Zellen via Fas/FasL | [12, 13] |
| | Homöostase und Entwicklung regulatorischer T-Zellen | [14-16] |
| CD8 ⁺ T-Zellen | Expansion antigenspezifischer Klone | |
| | Zytokinsekretion | [17] |
| | Steigerung der zytolytischen Aktivität | |
| B-Zellen | Proliferation der CD8 ⁺ Gedächtniszellen | [18] |
| | Antikörpersekretion | |
| NK-Zellen | Transkription/Synthese der Immunglobulin J-Kette | [19] |
| | Proliferation | |
| | Steigerung der zytolytischen Aktivität | |

Eine der grundlegenden, charakteristischen Konsequenzen der T-Zellaktivierung ist die *de novo* Synthese des Zytokins IL-2. Die Bedeutung der IL-2 Expression umfasst ein weites Spektrum an Auswirkungen auf das gesamte Immunsystem (s. Tabelle 1) und hat fundamentale Bedeutung für die Regulation und Homöostase der Immunaktivität [24]. IL-2 kontrolliert sowohl die klonale Expansion und Differenzierung von CD4⁺ Th-Zellen zu Effektorzellen als auch die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen. Die Produktion von IL-2 gehorcht einer komplizierten multifaktoriellen Regulation, die auf einer differentiellen Aktivierung verschiedener zellulärer Signaltransduktionskaskaden basiert. Die Signale werden in der Zelle orchestriert und durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in den Zellkern weitergeleitet, wo signalabhängig die Transkription von IL-2 und anderen Genen spezifisch induziert wird. Während die molekularen transkriptionellen Grundlagen der IL-2 Expression hinreichend erforscht sind, ist jedoch bisher noch unklar, wie die mit der IL-2 Expression zusammenhängende Signalübertragung innerhalb einer CD4⁺ Th-Zelle reguliert wird und mit der Auslösung verschiedener Aktivierungszustände zusammenhängt. In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit die differentielle Aktivierung der IL-2-abhängigen Signalwege und ihrer aktivierten Transkriptionsfaktoren mit dem induzierten

IL-2 Expressionsprofil in humanen CD4⁺ Th-Zellen korrelieren, da die initiale Aktivierung von CD4⁺ Th-Zellen und die Expression von IL-2 außerordentliche Konsequenzen für das Immunsystem hat.

1.2 Die Bedeutung der Signalweiterleitung in Th-Zellen

Alle zellphysiologischen Entwicklungen von T-Lymphozyten werden durch molekulare Signalprozesse grundlegend bestimmt. Die aktivierten T-Zell-Rezeptoren und Ko-Stimulatoren leiten Signale von der Zelloberfläche ins Zellinnere, indem sie die nachgeschalteten Reaktionskaskaden aktivieren und durch reversible Proteinphosphorylierungen die Enzymaktivitäten der daran beteiligten Proteine modulieren. Zu diesen Proteinen gehören beispielsweise die Proteinkinasen Lyn, Lck oder ZAP-70, die Proteinphosphatase Calcineurin sowie der niedermolekulare Effektor Ca²⁺ (s. Tabelle 2). Am Ende derartiger Enzymkaskaden erreicht das Signal den Zellkern, wo es spezifisch die Transkription von Zielgenen einleitet und die Ausführung zellulärer Programme bewirkt. Die Signaltransduktion zielt damit letztlich auf die Transkriptionskontrolle funktioneller Gene oder Gengruppen, indem in Abhängigkeit der Stimulation Einfluss auf das zelluläre Genexpressionsmuster genommen wird und ein der Situation angepasstes Aktivierungs- und Differenzierungsprogramm ausgelöst wird. Dadurch werden verschiedene aktivierungsabhängige Prozesse, die von entscheidender Bedeutung für die Homöostase einer effektiven Immunreaktion sind, reguliert und kontrolliert, wie beispielweise die Zellproliferation, Apoptose und viele Aspekte der Zelldifferenzierung. Diese Homöostase wird durch eine adäquate Organisation des Zellschicksals, d.h. einer Balance zwischen Aktivierung/Differenzierung und Apoptose, gewährleistet und zeigt sich insbesondere bei Prozessen der positiven und negativen Selektion während der Thymozyten-Reifung, der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Immuntoleranz und der Termination einer Immunreaktion [25].

Tabelle 2: Komponenten und Mechanismen der zellulären Signalverarbeitung in T-Zellen

| Gruppe | Mechanismus | Beispiel |
|-----------------------------|---|--|
| Proteinkinasen | Reversible Phosphorylierung von Serin/Threonin- und Tyrosin-Resten | Src, Lyn, ZAP-70, Raf, JNK |
| Proteinphosphatasen | Reversible Rephosphorylierung von Serin/Threonin- und Tyrosin-Resten | Calcineurin, PP1, PP2A, PP2C |
| Schalterproteine | Konformationswechsel von aktivem bzw. inaktivem Zustand durch Bindung an GTP bzw. GDP | GTPase Ras, Rho |
| Adapterproteine | Bildung von Multiprotein-Komplexen | Grb-2, Shc, Crk |
| Niedermolekulare Effektoren | Sekundärbotenstoffe, Steuerung der Enzymaktivität z.B PKA, Calcineurin | Phosphatidylinositol-Derivate, Ca ²⁺ , cAMP |

In Tabelle 2 sind die zentralen Komponenten der Signaltransduktion in T-Zellen sowie die Mechanismen, auf denen die zelluläre Signalverarbeitung basiert, zusammengefasst. Fehlfunktionen solcher Signalproteine und Mutationen zu sogenannten Onkogenen, wie beispielsweise ZAP-70 oder Ras, können mit einer gestörten Signalübertragung einhergehen und haben häufig eine onkogene Zelltransformation und die Entwicklung maligner Tumore zur Folge [26]. So führen entgleiste Signalkaskaden bei der Zellzyklusprogression zu autonomer Teilungsfähigkeit und tragen zur Tumorentstehung bei. Die allogene Transplantatabstoßung wird ebenfalls durch Aktivierung von spezifischen Signalkaskaden in den T-Zellen ausgelöst [27]. Der Eingriff in diese Signalkaskaden stellt eine Möglichkeit zur Induktion einer Transplantattoleranz dar und basiert auf pharmakologischen Immunsuppressiva, wie beispielsweise auf den Calcineurin Inhibitoren FK506 oder Cyclosporin A (CsA). Die Blockade der Calcineurin Aktivität mit FK506 oder CsA führt zu einer Inhibierung der T-Zellaktivierung und einer eingeschränkten IL-2 Expression [28]. Darüber hinaus ermöglicht die gezielte Beeinflussung der Signaltransduktionskaskaden durch CsA die differentielle Erforschung der verschiedenen Signalwege, die bei der T-Zellaktivierung von Bedeutung sind. Die Signalwege einer TCR-vermittelten Signaltransduktion, die zur T-Zellaktivierung und der Expression von IL-2 führen, sollen daher im Folgenden kurz vorgestellt werden.

1.3 Aktivierung und Signalweiterleitung in T-Lymphozyten

1.3.1 Signalweiterleitung über den T-Zell-Rezeptor

Während der Antigenerkennung kommt es an den Kontaktstellen zwischen der APC und Th-Zelle zur Ausbildung einer supramolekularen Struktur, der sogenannten immunologischen Synapse SMAC (*supramolecular activation cluster*), in der T-Zell-Rezeptoren, ko-stimulatorische Signalmoleküle und Adhäsionsmoleküle rekrutiert werden und die zelluläre Signaltransduktion auslösen [29, 30]. Die antigenspezifische Aktivierung von T-Lymphozyten wird durch den membranständigen T-Zell-Rezeptor auf der Zelloberfläche vermittelt, der aus je zwei membranständigen Glykoproteinketten, α und β bzw. γ und δ , besteht. Konventionelle T-Lymphozyten in Mäusen und Menschen mit einem $\alpha\beta$ -TCR machen über 90% aller peripheren Th-Zellen in den zentralen lymphatischen Organen und im Blut aus. Mit den endständigen variablen Domänen der TCR-Ketten und dem Ko-Rezeptor CD4 kann der T-Lymphozyt spezifisch MHC II-assoziierte Antigenepitope erkennen. Zusätzlich ist ein ko-stimulatorisches Signal zwischen dem CD28 Ko-Rezeptor auf der Th-Zelle und den CD80/CD86-Molekülen auf der APC nötig, das zu einer Amplifikation des TCR Signals führt [31, 32]. An die transmembranären $\alpha\beta$ -Ketten des TCR ist

der CD3-Komplex assoziiert, der aus den drei monomeren γ -, δ -, und ϵ -Ketten sowie der homodimeren ζ -Untereinheit besteht [33]. Der CD3-Komplex besitzt ausgeprägte zytoplasmatische Anteile mit konservierten ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) -Sequenzen, die durch die Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) der Src-Familie, $p59^{lyn}$ und $p56^{lck}$, phosphoryliert werden [34]. Durch Phosphorylierung der ITAM Sequenzen wird die PTK ZAP-70 rekrutiert und stabilisiert durch Bindung über die SH2 (*Src-Homology 2*) Domänen den TCR-Komplexes. ZAP-70 induziert über die Adapterproteine LAT und SLP76 die Aktivierung von zwei intrazellulären Signalnetzwerken. Dabei handelt es sich, erstens, um das Signalnetzwerk der GTPasen der Ras- und Rho-Familie, die zur Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK)-Signalkaskade führt. Zweitens, wird der Inositol-Phospholipid Stoffwechsel induziert, der zur Aktivierung der Ca^{2+} /Calcineurin- und der Proteinkinase C Signalkaskade führt (s. Abbildung 1.1) [35].

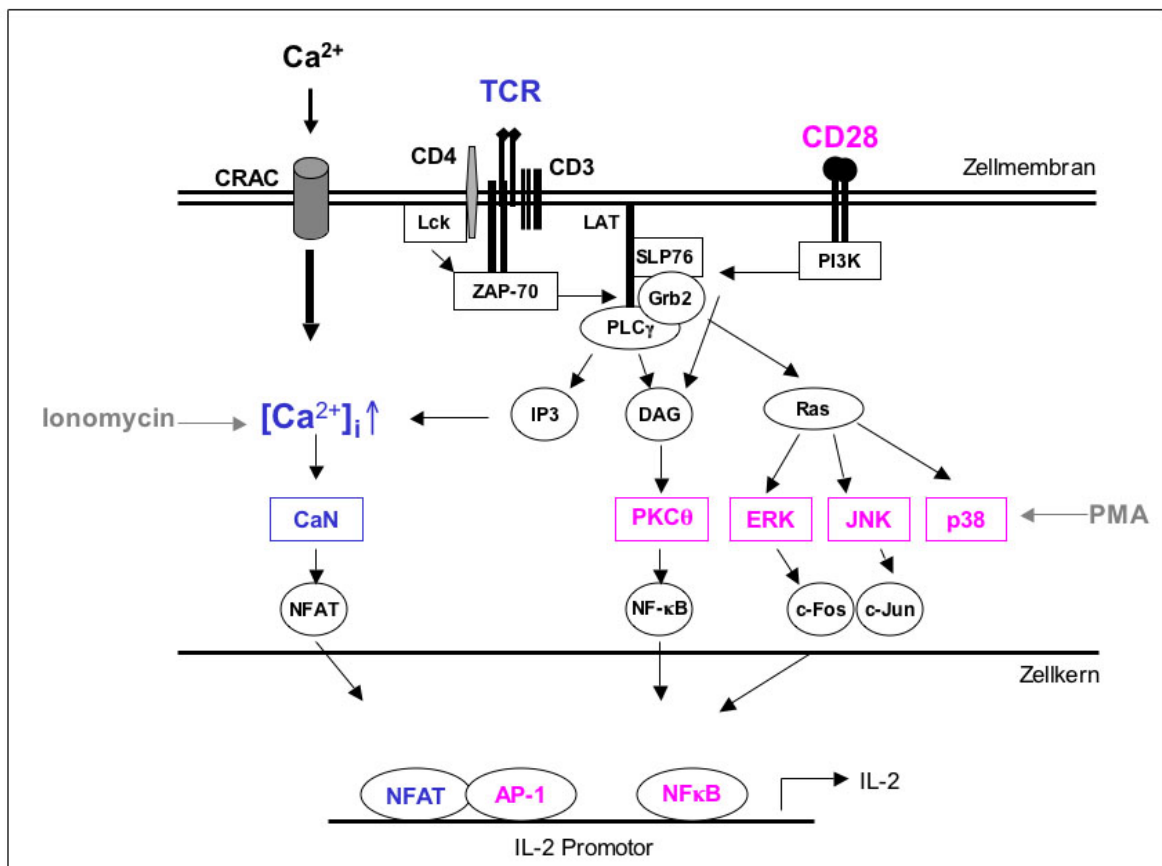


Abbildung 1.1 Die Hauptsignalwege der T-Zellaktivierung und IL-2 Expression. Nach antigenspezifischer Stimulation über den TCR-Komplex und Ko-Stimulation über CD28 werden durch die Protein-Tyrosin-Kinase ZAP70 die Signalnetzwerke der GTPasen Ras/Rho und des Inositol-Phospholipid-Stoffwechsels aktiviert. Der CD28 Rezeptor bewirkt eine Amplifikation des Signales durch Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Ras aktiviert die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalkaskade und die Kinasen ERK, JNK und p38, die die Expression und Aktivierung der c-Fos und c-Jun Proteine zur Bildung des Transkriptionsfaktors AP-1 kontrollieren. Beim Inositol-Phospholipid Stoffwechsel generiert die Phospholipase C_{γ} (PLC γ) die Sekundärbotenstoffe Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). DAG induziert über die Proteinkinase C (PKC) die Aktivierung von NF- κ B. IP_3 bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration und die Öffnung der Speicher-gesteuerten- Ca^{2+} -Kanäle (CRAC) und die Aktivierung von Calcineurin, das NFAT dephosphoryliert. NFAT, NF- κ B und AP-1 translozieren in den Zellkern und regulieren die IL-2 Geninduktion. Durch Umgehung des TCR/CD28-Rezeptor Komplexes können diese Signalwege auch durch PMA und Ionomycin induziert werden.

Die MAPK-Kaskade wird durch das membrangebundene Schalterprotein p21^{ras} induziert, an deren Ende die Phosphorylierung und funktionelle Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 durch die MAP-Kinase ERK2 steht. Elk-1 hat eine Schlüsselfunktion in der Regulation der c-Fos Genexpression. Ebenfalls über p21^{ras} wird die c-Jun N-terminal Kinase (JNK) aktiviert, die zusammen mit der MAP-Kinase p38 die Expression und Aktivierung von c-Jun reguliert [36]. Die c-Fos und c-Jun Proteine bilden zusammen den Transkriptionsfaktor AP-1 (*activator-protein 1*).

Der Inositol-Phospholipid Stoffwechsel wird durch die Phospholipase C γ (PLC γ) in Gang gesetzt, indem sie aus dem Substrat Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat (PIP₂) die Sekundärbotenstoffe Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) erzeugt. IP₃ bindet an die IP₃-Rezeptoren des Endoplasmatischen Retikulums (ER), wodurch die Entleerung der intrazellulären Ca²⁺ Speicher in das Zytosol bewirkt wird. Die damit verbundene Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration führt über einen noch nicht hinreichend geklärten Mechanismus zur Öffnung sogenannter Speicher-gesteuerten Ca²⁺ Kanäle (*Ca²⁺ release activated Ca²⁺ channel*, CRAC) in der Zellmembran, durch die mit hoher Spezifität Ca²⁺ Ionen aus dem extrazellulären Raum in die Zelle strömen und die freie zytosolische Ca²⁺ Konzentration [Ca²⁺]_i weiter erhöhen [37]. Hierdurch wird u.a. die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Serin/Threonin Phosphatase Calcineurin (CaN) aktiviert, die durch Dephosphorylierung die Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) in den Zellkern induziert [38]. Zusätzlich zum Ca²⁺ Signal induziert DAG über die Proteinkinase C θ (PKC θ) die Aktivierung von NF- κ B [39]. PKC θ wird überwiegend in hämatopoetischen Zellen exprimiert [40] und wird als einzige PKC Isoform während einer Immunantwort nach TCR Aktivierung in der Kontaktzone zwischen TCR und APC lokalisiert [41]. Zusätzlich steigert die Bindung des CD28 Ko-Rezeptors über Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) die Aktivierung über PKC θ und den MAPK-Signalweg von sowohl AP-1 als auch NF- κ B/Rel Faktoren [32, 42]. Die T-Zellaktivierung kann auch durch Umgehung der Oberflächenrezeptoren durch Verwendung der pharmakologischen, membrangängigen Substanzen Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Ionomycin direkt intrazellulär induziert werden. Der Phorbol-ester PMA aktiviert stellvertretend für den CD28 Signalweg die Proteinkinase PKC θ und den MAPK Signalweg [43], während das Ca²⁺ Ionophor Ionomycin einen anhaltenden extrazellulären Ca²⁺ Einstrom, wie er normalerweise durch den TCR ausgelöst wird, induziert (s. Abbildung 1.1). Die initiale Aktivierung über den TCR/CD28 Komplex führt somit zur simultanen Aktivierung von drei Hauptsignalkaskaden, der Ca²⁺/CaN-, der PKC θ - und der MAPK Signalkaskade, deren Zielkomponenten NFAT, NF- κ B und AP-1 die IL-2 Gentranskription und den Eintritt in den Zellzyklus kontrollieren (s. Abbildung 1.1).

1.3.2 Die Bedeutung und Erzeugung von Ca^{2+} Signalen in Th-Zellen

Die Aktivierung des CaN-Signalwegs erfolgt als direkte Folge der TCR Aktivierung über eine Veränderung der zytosolischen Konzentration des niedermolekularen Effektors Ca^{2+} . Die universale Bedeutung der Ca^{2+} -induzierten Signalweiterleitung für T-Zell-basierte Immunantworten umfasst Proliferations- und Differenzierungsprozesse [44] und ist vor allem durch die Tatsache beschrieben worden, dass 75% aller TCR-induzierten Gene eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ benötigen [45]. Zudem kontrollieren Ca^{2+} Signale die Expression apoptotischer Signalkomponenten, wie das Fas System, oder induzieren Apoptose über das Wechselspiel von Mitochondrien und ER als Reaktion auf verschiedene pathologische Reize [46]. Die in der Zelle generierten Ca^{2+} Signale unterscheidet man generell in transiente, kurzzeitige und langanhaltende Signale. Kurzzeitige Ca^{2+} Signale treten auf einer Zeitskala von Sekunden bis Minuten auf und bewirken schnelle Veränderungen der Zellmotilität. Dies betrifft vor allem die Reorientierung des Aktin Zytoskelettes bei der Ausbildung der immunologischen Synapse in der Kontaktzone der T-Lymphozyten mit einer APC [47]. Ebenso wird über Ca^{2+} die Polarität des Zellkontaktes bei der directionalen CTL-vermittelten Zelllyse reguliert, wodurch die CTL den zytotoxischen Inhalt ihrer Granula gezielt an die Zielzelle sezernieren kann [48].

Dieser zumeist lokalisierte, transiente Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist allerdings unzureichend für die T-Zellaktivierung oder die Einleitung komplexer Differenzierungsprozesse [45, 49]. So ist für die Bildung des Zytokins IL-2 eine mindestens zwei Stunden andauernde hohe $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erforderlich [50]. Ein langandauernd hoher zytosolischer Ca^{2+} Spiegel über einen Zeitraum von Minuten bis Stunden wird durch eine biphasische Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über die intrazelluläre Ca^{2+} Speicherentleerung und den CRAC vermittelten Ca^{2+} Einstrom über die Plasmamembran erreicht [51]. In ruhenden Zellen wird die spontane Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern und der unspezifische Einstrom von Ca^{2+} von den sarcoplasmatischen-endoplasmatisch-retikulären- Ca^{2+} -ATPasen (SERCA) und den Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPasen (PMCA) kontrolliert, so dass es nicht zu einer signifikanten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kommt. Bei der TCR-Aktivierung bindet der gebildete Sekundärbotenstoff IP_3 an Rezeptoren des ER und bewirkt einen transienten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf etwa 500nM, der aber innerhalb von ungefähr 100sek von den SERCAs durch Zurückpumpen in das ER wieder auf den Basalwert von etwa 100nM gesenkt wird [44]. Bei andauernder TCR Stimulation werden die intrazellulären Ca^{2+} Speicher allerdings vollständig entleert, was nach dem Modell des *kapazitiven Ca^{2+} Einstroms* zur Aktivierung der Speicher-regulierten CRAC Kanäle in der Zellmembran führt und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf $>1\mu\text{M}$ anhebt [50, 52, 53]. Wie das Signal zwischen der Entleerung der Ca^{2+} Speicher und der Öffnung der CRAC Kanäle vermittelt wird, ist bislang nicht eindeutig geklärt. Ein wesentliches

Merkmal dieser Kanäle ist, dass ihre Aktivierung nicht nur über IP_3 Moleküle, sondern auch durch rezeptorunabhängige Stimuli ausgelöst werden kann, die zu einer Ausschüttung des Ca^{2+} aus dem ER führen. Dazu zählen Thapsigargin, ein selektiver Inhibitor der SERCA Pumpen des ER, sowie Ca^{2+} Chelatoren, die mit der Wiederaufnahme des Ca^{2+} durch das ER interferieren. Im Gegensatz dazu aktiviert das lipophile und damit membranängige Ionomycin, die Ca^{2+} Ausschüttung aus dem ER und löst eine CRAC vermittelte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ aus [44, 54, 55]. Ein durch Ionomycin ausgelöster Ca^{2+} spezifischer und nicht spannungsabhängiger Strom I_{CRAC} (*calcium release activated calcium current*) ist identisch mit dem durch TCR Signale erzeugte I_{CRAC} hinsichtlich der Ionenselektivität und Leitfähigkeit und kann durch zusätzliche TCR-Stimulation nicht weiter erhöht werden [56-58]. Die Inaktivierung der CRAC Kanäle erfolgt entweder durch Rückpumpen des freien Ca^{2+} durch SERCAs und PMCAs oder durch eine lokale, intrazelluläre Ca^{2+} Akkumulation an den Porenregionen des CRAC Kanals, der daraufhin geschlossen wird. [44, 56, 59].

1.3.3 Beeinflussung der zellulären Transkription durch Ca^{2+} Signale

Wie genau der Botenstoff Ca^{2+} mit seinen nachgeordneten Zielkomponenten die Ausführung selektiver zellphysiologischer Prozesse kontrolliert, ist eine überwiegend ungelöste Frage im Rahmen der Signalgebung von Th-Zellen. Allerdings hat man bereits festgestellt, dass die TCR-induzierten Ca^{2+} -Signale zu *dynamischen* Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ führen und dadurch Einfluss auf eine differentielle Aktivierung von Signalwegen haben können. Beispielsweise wurde in $CD4^+$ Gedächtniszellen ein höherer Ca^{2+} Einstrom nach Stimulation mit $\alpha CD3$ als in naiven $CD4^+$ Th-Zellen gezeigt, der zudem mit einer erhöhten Konzentration an DAG Molekülen verbunden war [62, 63]. Der höhere Ca^{2+} Einstrom und Anteil an Signalmolekülen wurde als Ursache für die schnellen proliferativen Reaktionen nach Restimulation in $CD4^+$ Gedächtniszellen infolge einer effizienteren Überschreitung des Aktivierungsschwellenwerts diskutiert. Neben einer transienten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, die Plateaus von 200nM bis 1 μ M umspannt, wurden auch Veränderungen der Ca^{2+} Konzentration in Form von CRAC-gesteuerten Ca^{2+} Oszillationen mit unterschiedlicher Amplitude und Frequenz gemessen, die neben anderen Faktoren in hohem Maße vom Zelltyp, Differenzierungsgrad und der Beschaffenheit des physiologischen Stimulus abzuhängen scheinen [37, 50, 64-66]. Durch Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ wird eine effizientere Detektion schwacher Stimuli, beispielsweise durch geringe Rezeptorbindung, ermöglicht und die Sensitivität der Th-Zelle gegenüber geringen Antigenmengen gesteigert. So induzieren in Th-Zellen gebildete Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ eine effektivere NFAT-abhängige Transkription im Vergleich zu einer gleichmäßig ansteigenden $[Ca^{2+}]_i$ [67, 68]. Bei starker Stimulation

und hohen $[Ca^{2+}]_i$ Konzentrationen verlieren die Oszillationen jedoch ihren ‚Vorteil‘ auf die Transkriptionsinitiation. Darüber hinaus nimmt die Frequenz der $[Ca^{2+}]_i$ Oszillationen Einfluss auf die Kombination von aktivierten Transkriptionsfaktoren, wodurch ausgewählte Ca^{2+} -abhängige Gene durch ‚Frequenz Verschlüsselung‘ differentiell aktiviert werden [68]. So können in einer Population von gleichartigen Zellen durch den Einstrom von Ca^{2+} unterschiedliche zelluläre Prozesse durch Induktion spezifischer Transkriptionsprofile hervorgerufen werden. Daher überrascht es nicht, dass Veränderungen des $[Ca^{2+}]_i$ mit Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden. Patienten mit schweren kombinierten Immundefekten (*Severe combined immunodeficiency*, SCID), weisen beispielsweise keine CRAC Aktivität auf, weshalb nach TCR Stimulation kaum ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ gemessen werden kann und die Induktion von entsprechenden Immunantworten ausbleibt [69, 70].

1.3.4 Sensoren und Effektoren Ca^{2+} -sensitiver Prozesse

Die Komplexität der zellulären Ca^{2+} Signalmodulation illustriert sehr deutlich, dass es sich bei der Aktivierung von Ca^{2+} Signalen nicht um einen binären Schalter der T-Zell-aktivierung handelt, sondern um eine Fülle von Informationen, die maßgeblich zu zellulären Entscheidungsprozessen beitragen und über den TCR in einem bestimmten immunologischen Kontext übertragen werden. Daran beteiligt sind verschiedene Signalkomponenten, die die Ca^{2+} Signale in eine zelluläre Antwort übersetzen. Ein klassischer intrazellulärer Ca^{2+} Sensor in Th-Zellen ist Calmodulin (CaM), das über vier EF-Hand Strukturmodule in einer hoch kooperativen Weise Ca^{2+} Ionen bindet und daraufhin eine Konformationsänderung eingeht, die zu einer Aktivierung der Ca^{2+} /CaM-abhängigen Protein Kinasen II und IV (CaMKII, CaMKIV), konventioneller PKC Isoformen (α , $\beta 1$, βII und γ) sowie der Protein Phosphatase CaN führen. Sie bilden eine Art molekularen Übersetzer der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration, indem sie durch enzymatische Aktivität die Ca^{2+} -modulierten Informationen in eine Änderung des Phosphorylierungsgrades eines Proteins und damit seines Aktivierungszustandes dekodieren [61]. Die Kinasen der CaMK Familie besitzen eine Art ‚molekulares Gedächtnis‘ für einen transienten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, und können nach Ca^{2+} Exposition ihre Aktivität durch kontinuierliche Autophosphorylierung nach Rückkehr der $[Ca^{2+}]_i$ auf Basalniveau unabhängig von Ca^{2+} /CaM aufrechterhalten. Im Gegensatz dazu benötigt die Phosphatase CaN zur Aufrechterhaltung ihrer Aktivität anhaltend hohe $[Ca^{2+}]_i$. Die Bedeutung der TCR-abhängigen Ca^{2+} Signalgebung und seines Effektors CaN für die Aktivierung von T-Lymphozyten wird vor allem durch die Hemmung der CaN Aktivität als Ursache einer induzierten T-Zell Inhibierung durch Anwendung von CsA oder FK506 hervorgehoben [61, 71]. Zudem ergab eine Studie, dass Ca^{2+} -

abhängige Gene, die über den TCR aktiviert wurden, zum überwiegenden Teil durch CaN kontrolliert werden [45]. Die Bedeutung von CaN als Vermittler von Ca^{2+} -abhängigen Prozessen bei der initialen T-Zellaktivierung und Induktion der IL-2 Genexpression soll daher im Folgenden näher betrachtet werden.

1.4 Die Phosphatase Calcineurin

CaN, oder Protein Phosphatase 2B (PP2B), ist eine hoch konservierte ubiquitär exprimierte Serin-/Threonin Phosphatase, die als multifunktionaler Regulator in Hefen und nahezu allen eukaryontischen Lebewesen zu finden ist. CaN wird in vielen Zellen und Geweben, wie Herz, Leber Lunge, Niere, Muskulatur, lymphatischen Zellen, vor allem aber in neuronalen Geweben bzw. im Gehirn exprimiert, wo es ca. 1% der gesamten Proteinmenge ausmacht. CaN ist die bisher einzige bekannte Serin-/Threonin Phosphatase, die direkt über Ca^{2+} /CaM reguliert wird und die Dephosphorylierung von NFAT induziert. Damit ist CaN ein bislang einzigartiger Mediator intrazellulärer Ca^{2+} Signale, die ausschließlich über den TCR aktiviert werden. Nachfolgend sollen Struktur, Regulation und schließlich die Funktionen von CaN in Th-Lymphozyten beschrieben werden.

1.4.1 Struktur und Regulation von CaN

CaN ist ein heterodimeres Enzym, das aus einer großen katalytischen 60kDa schweren Untereinheit (Calcineurin A, CaNA) und einer kleinen hoch-affinen Ca^{2+} -bindenden regulatorischen 19kDa schweren Untereinheit (Calcineurin B, CaNB) besteht [72]. In Säugetieren existieren drei CaNA Isoformen α , β und γ , die eine hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen und in verschiedenen Organismen hochkonserviert vorkommen [73]. Während die Isoformen CaNA α und β ubiquitär auftreten und gleichermaßen im peripheren Immunsystem zu finden sind [74], handelt es sich bei CaNA γ um eine spezifisch in Testis exprimierte und die Spermatogenese regulierende Isoform [75]. CaNA liegt mit zwei Isoformen von CaNB assoziiert vor, CaNB1 und CaNB2. Während CaNB1 ubiquitär als Heterodimer mit CaNA α oder β exprimiert vorliegt, wird CaNB2 ausschließlich in Testis zusammen mit CaNA γ exprimiert [76]. CaNA besitzt neben den Bindungsstellen für CaNB und CaM am Carboxy-terminalen Ende eine autoinhibitorische Domäne. Die regulatorische CaNB Untereinheit besitzt mit vier integralen Ca^{2+} -bindenden EF-Handmotiven eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit CaM [77]. CaN benötigt für seine enzymatische Aktivität *in vitro* und für eine NFAT-abhängige Transkription *in vivo* die Überschreitung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von ca. 300nM [49, 50, 78]. Das heterodimere CaNA/CaNB Molekül ist bei geringen Ca^{2+} Kon-

zentrationen nur schwach assoziiert und katalytisch kaum aktiv. Durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration wird eine Bindung von $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ und eine reversible Konformationsänderung an der CaNA Untereinheit induziert, die zur Dissoziation der autoinhibitorischen Domäne vom katalytischen Zentrum führt und die Dephosphorylierung entsprechender Substrate erlaubt [79-81]. Die basale Aktivität von CaN wird durch eine kooperative Ca^{2+} -abhängige CaM Aktivität und die strukturell unterstützende Wirkung von CaNB um das 20-fache gesteigert und ermöglicht CaN die feine Differenzierung verschiedener Ca^{2+} Schwellenwerte [73]. Die Bedeutung der $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -abhängigen Regulation von CaNA im CaN Holoenzym, konnte durch Deletion der autoinhibitorischen Domäne und dem C-terminalen Bereich der CaM Bindungsdomäne gezeigt werden. Dadurch wurde eine konstitutiv aktive CaNA Untereinheit gebildet, die unabhängig von einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]$; katalytisch aktiv war [28, 82]. Im Gegensatz dazu führte eine dominant-negative Mutante der CaNA Untereinheit durch Bindung endogener CaNB Untereinheiten zur kompletten Hemmung der endogenen CaN Aktivität [73].

1.4.2 Inhibitoren der CaN Aktivität

Die Identifikation von CaN als essentiellm Regulator der T-Zellaktivierung gelang erst durch den Nachweis des Enzyms als Substrat der immunsuppressiven Substanzen CsA und FK506 [82, 83]. Bei CsA handelt es sich um ein lipophiles, zyklisches Peptid, das ursprünglich aus dem Pilz *Hypocladium inflatum gams* isoliert und dessen immunsuppressive Aktivität 1976 erstmals beschrieben wurde [84]. Seit 1983 findet es vor allem in der Transplantationsmedizin klinische Anwendung. FK506 wurde 1987 als ein makrolidisches Antibiotikum klassifiziert, das von dem Pilz *Streptomyces tsukabaensis* produziert und seit 1989 als Medikament eingesetzt wird. Die systemische Verabreichung von CsA und FK506 zur Aufrechterhaltung einer lebenslangen, systemischen Immunsuppression nach Transplantation führt allerdings zu schweren Nebenwirkungen, z.B Nephrotoxizität und Infektionen [85], die vermutlich auf die Wirkungsweise von CsA und FK506 bzw. auf die unterschiedlichen Funktionen des ubiquitär im Organismus exprimierten CaN Enzyms zurückzuführen ist. Die Wirkungsweise von CsA und FK506 beruht trotz struktureller Unterschiede auf der kombinierten Bindung mit kleinen endogenen Proteinen, den sogenannten Immunophilinen: die FK506 bindenden Proteinen (FKBP) und den Cyclosporin A bindenden Proteinen oder Cyclophilinen (Cyp). FK506, CsA oder die Immunophiline allein sind nicht in der Lage die Phosphatase Aktivität von CaN zu hemmen. Erst die Bildung des CsA/Cyclophilin- bzw. FK506/FKBP Komplexes erlaubt in einer *gain of function* Wirkungsweise die hoch-affine Bindung an die Bindungsgrube zwischen CaNA und CaNB Untereinheiten und verhindert durch sterische Blockierung die Bindung und in der Folge

die Dephosphorylierung seiner Substrate [83, 86, 87]. CsA/Cyp hat dabei keinen Einfluss auf die bei der TCR-Stimulation induzierte Bildung der Sekundärbotenstoffe Ca^{2+} oder IP_3 und interferiert auch nicht mit dem wichtigsten Substrat der CaN Aktivität, dem Transkriptionsfaktor NFAT [88-90]. Bei den Immunophilinen handelt es sich um Peptidyl-Prolin-*cis-trans*-Isomerasen (PPlasen), die ubiquitär im Zytosol exprimiert werden und vermutlich bei der Faltung zytosolischer Proteine beteiligt sind [91]. Daneben wurden kürzlich das FK506 Analog L-732/531 und das CsA Analog $\text{ISA}_{\text{TX}}247$ beschrieben, für die eine höhere immunsuppressive Aktivität verbunden mit einem weitaus günstigeren Nebenwirkungsprofil festgestellt wurde [92].

Neben den pharmakologischen Substanzen CsA und FK506 gibt es auch verschiedene endogene Regulatoren und Inhibitoren der CaN Aktivität. Hierzu zählen sogenannte Ankerproteine, die anderen Signalproteinen die Bindung mit CaN ermöglichen oder die subzelluläre Lokalisation von CaN verändern. Ein prominenter Vertreter dieser Gruppe ist AKAP-79 (*A-kinase associated protein*), das CaN mit PKA und PKC verbindet oder inhibitorische Funktion ausübt [93, 94]. Zu den endogenen Inhibitoren von CaN zählen Cabin1/Cain und CHP (*CaN homologous protein*). Während Cabin1/Cain in einer negativen Rückkopplungsschleife die CaN Aktivität nach T-Zellaktivierung dämpft, formt CHP heterodimere inaktive Komplexe mit der CaNA Untereinheit, die erst durch ein aktivierungsbedingtes Absinken der CHP-Konzentration wieder mit den CaNB Untereinheiten ein funktionelles CaN Molekül bilden können. CHP fungiert als Antagonist für Calmodulin oder kompetiert mit den CaNB Untereinheiten um die Bindung an CaNA, wodurch in beiden Fällen die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der CaNA Untereinheit inhibiert wird [95, 96]. Auch CBP1 (*calcineurin binding protein-1*) oder Calcipressin binden die CaNA Untereinheit und hemmen die CaN Aktivität durch eine Rückkopplungsschleife der CaN-abhängigen Signalgebung. Calcipressin (MCIP, DSCR1) gehört zur Familie der DSCR Gene [97] und befindet sich auf dem Chromosom 21 in der sogenannten Down Syndrom kritischen Region (*Down's Syndrome critical region*), die als Folge einer Trisomie 21 für die Entwicklung des Down Syndroms beim Menschen verantwortlich gemacht wird. In Gehirnen von Patienten mit dem Down Syndrom wurde eine stark überexprimierte DSCR1 Form nachgewiesen. Daher wird vermutet, dass die Inhibierung der CaN Aktivität aufgrund des DSCR1 Proteins als eine mögliche Folge der Trisomie 21 die Entwicklung von Gehirn, Herz, Immun-, Muskel- und Knochenaufbau behindert [98, 99].

1.5 CaN als Regulator der T-Zellaktivierung

Der Ca^{2+} /CaN Signalweg wird ausschließlich über den TCR ausgelöst und im Unterschied zum PKC θ und MAPK Signalweg nicht durch ko-stimulatorische Signale oder Zytokine. Das Modell zur T-Zellaktivierung beschreibt, dass die serielle Aktivierung der TCR-Moleküle (*triggering*) zur Auslösung vieler transienter Signale führt, die zu einem Hauptsignal mit bestimmter Amplitude summiert und durch die Beschaffenheit und Konzentration des Antigens und die Dauer der Stimulation bestimmt werden [100]. Zur Aktivierung der nachfolgenden Signalereignisse kommt es allerdings erst, wenn diese Signalamplitude einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Die Funktion der Ko-Stimulation über CD28 wird dabei als Amplifikation des TCR-Signals verstanden, dadurch, dass sie nicht die Frequenz der getriggerten TCR-Moleküle erhöht, sondern die benötigte Anzahl an aktivierten TCR-Molekülen und die benötigte Signaldauer zum Erreichen des Aktivierungsschwellenwerts erheblich senkt. Diese Senkung wird durch die Stabilisierung des TCR-induzierten Signals sowie die effektive Rekrutierung und Generierung der benötigten Signalmediatoren erreicht [101, 102]. Darüber hinaus ergab die Analyse von cDNA Mikroarrays zur Charakterisierung der CD3/CD28 induzierten Genexpression in humanen peripheren T-Zellen [103], dass der prinzipielle Effekt der simultanen Stimulation mit CD28 in der Verstärkung der CD3-induzierten transkriptionellen Geninduktion bestand. Allerdings ist unklar, wo innerhalb der intrazellulären TCR-induzierten Signalkaskade dieser Schwellenwert genau determiniert wird. Die Erhöhung der intrazellulären zytosolischen Ca^{2+} Konzentration beschreibt viele frequenz- und amplitudenmodulierte Muster, die verschiedene Schwellenwerte für die differentielle Aktivierung von Transkriptionsfaktoren bilden und den effektiven intrazellulären Ca^{2+} Schwellenwert zur T-Zellaktivierung modulieren [60, 68]. Dass unter den Signalmolekülen der TCR induzierten Ca^{2+} -abhängigen Signalkaskade die Verfügbarkeit der CaN Aktivität einen limitierenden Faktor der T-Zellaktivierung darstellt [104], wurde durch Untersuchungen an CsA behandelten Patienten bestätigt, da durch Hemmung der CaN Aktivität die Informationsweiterleitung an einem offenbar kritischen Punkt der Signaltransduktionskaskade komplett gehemmt wurde. Die außerordentliche Sensitivität von T-Lymphozyten gegenüber CsA und FK506 zeigte hierdurch die offenbar nicht-redundante Funktion von CaN in der TCR-induzierten Ca^{2+} -abhängigen Signalkaskade. Damit gilt CaN als direkter Effektor der TCR Aktivierung bzw. TCR-modulierter Signale. Beschreibungen über die Regulation der CaN Aktivität in Th-Zellen lassen nach neueren Untersuchungen darüber hinaus die Vermutung zu, dass CaN als molekularer Schalter zwischen den verschiedenen immunologischen Zuständen Aktivierung, Toleranz und Immunsuppression verstanden werden kann. Dies wird durch sein wichtigstes Substrat NFAT vermittelt, für dessen Aktivierung CaN als bisher einzige

Phosphatase identifiziert wurde. Die Menge, das Verhältnis und die Kombination von NFAT mit anderen aktivierungsabhängigen Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise AP-1 oder Foxp3, entscheiden über die Ausführung verschiedener TCR-abhängiger Aktivierungsprogramme wie Aktivierung und Anergie [105], Effektorzelldifferenzierung [106] oder die Entwicklung regulatorischer T-Zellen [107]. Dass CaN der prinzipielle Effektor der TCR-induzierten Ca^{2+} Signale und Aktivator der NFAT-abhängigen Transkription ist, konnte durch verschiedene Untersuchungen belegt werden. Beispielsweise wurde die Induktion aneurer Prozesse durch Inhibierung der CaN Aktivierung mit CsA verhindert [108, 109]. Die Expression einer konstitutiv aktiven Ca^{2+} -unabhängigen CaN Mutante ersetzte den notwendigen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ für die Induktion der IL-2 Expression [28, 104]. Neben der Ca^{2+} -abhängigen Regulation der CaN Aktivität, wurden auch endogene Inhibitoren zur Regulation von CaN entdeckt, deren Manipulation die zentrale Bedeutung von CaN für die T-Zellaktivierung unterstrich. Beispielsweise resultierte die Deletion des Inhibitors Calcipressin zu einer Hyperaktivität von CaN verbunden mit einer dramatischen Senkung des initialen Schwellenwertes zur Induktion der CaN-abhängigen Genexpression. Durch die unkontrollierte CaN Aktivität wurde die normalerweise erst durch starke TCR Stimulation induzierte Fas Ligand Expression angetrieben und führte durch AICD Reaktion zum vorzeitigen Absterben von Th1-Zellen [110]. Erst durch Zugabe von CsA konnten der Schwellenwert der zellulären CaN Aktivität rekonstituiert und der Effekt auf die Lymphozyten aufgehoben werden [110].

Die IL-2 Expression erfolgt nur nach einer simultanen Aktivierung und Kombination des Ca^{2+} /CaN mit dem PKC θ /MAPK Signalweg und gilt daher als intrazellulärer Integrator einer erfolgreichen T-Zellaktivierung und als Voraussetzung der Proliferation.

1.6 Die Regulation der IL-2 Transkription

1.6.1 Die Bedeutung von IL-2 für das Immunsystem

Das schnellste, deutlichste Ergebnis einer effektiven T-Zellaktivierung nach antigenspezifischer Stimulation bildet die *de novo* Synthese des Zytokins IL-2. Seit seiner Entdeckung vor über 20 Jahren als Wachstumsfaktor für T-Zellen gab es eine Reihe von Studien, die IL-2 als essentiellen Faktor für die Entwicklung vieler T-Zell-abhängiger Aktivierungsprozesse, wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Toleranz, und damit elementar für die Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase entdeckten [111]. Dazu zählen drei Hauptaussagen zur Bedeutung von IL-2, die mittels *in vitro* Studien belegt werden konnten: Erstens, IL-2 ist der wirksamste und überwiegend sezernierte Wachstumsfaktor nach initialer T-Zellaktivierung *in vitro* und gehört zusammen mit den Untereinheiten des

IL-2 Rezeptors (IL-2R) zu den sogenannten *immediate early genes*, die unmittelbar nach Aktivierung induziert werden und eine 1000-fache klonale Expansion von CD4⁺ und CD8⁺ Th-Zellen bewirken [112]. Zweitens, Proliferation und T-Zell Effektorfunktionen können durch Verwendung monoklonaler Antikörper spezifisch gegen IL-2 oder IL-2R *in vitro* gehemmt werden, wodurch die Bedeutung von IL-2 für die Auslösung einer Immunantwort nochmals unterstrichen wird [113, 114]. Drittens, die Bedeutung von IL-2 für die Induktion der Apoptose oder des aktivierungsinduzierten Zelltodes (AICD) aktivierter Th-Zellen offenbarte sich als ein essentieller Schritt in der Kontrolle und Termination einer ausgelösten Immunantwort [115, 116]. Über welche molekularen Mechanismen IL-2 die Differenzierung von Effektorzellen kontrolliert, ist bislang kaum untersucht. Allerdings gibt es erste Hinweise, dass IL-2 die Zugänglichkeit des IL-4 Gens und damit die IL-4 Expression stabilisiert [117].

Erst in IL-2- oder IL-2R-defizienten Mäusen, die extreme Symptome von Hyperproliferation, stark reduzierte Frequenzen von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) gefolgt von tödlich endenden Autoimmunreaktionen zeigten, fand man, dass IL-2 *in vivo* eine nicht-redundante Rolle in der Regulation und Aufrechterhaltung der peripheren T-Zell Toleranz zukommt, indem es die Entwicklung und Funktion regulatorischer T Zellen kontrollierte [14-16, 118, 119]. Durch IL-2 Zugabe oder den adoptiven Transfer IL-2 produzierender Zellen konnte die T_{reg}-Entwicklung und T-Zell Homöostase in IL-2-defizienten Mäusen wieder hergestellt werden [15, 120, 121].

IL-2 scheint daher *in vivo* eine paradoxe Bedeutung zu haben, da es sowohl als Proliferationsfaktor der T-Zellaktivierung als auch bei der Termination der Immunantwort und der Aufrechterhaltung der Toleranzinduktion essentiell beteiligt ist [111]. In der Peripherie kann daher die duale Funktion von IL-2 bei der T-Zell Homöostase und Immunantwort einerseits als eine positive Rückkopplungsschleife der Aktivierung von naiven CD4⁺ Th-Zellen zur Entwicklung und Produktion von Effektorfunktionen und andererseits als negative Rückkopplungsschleife durch die Förderung von T_{reg}-Zellen und der Unterdrückung von Effektorantworten betrachtet werden [122]. Aufgrund dieser weitreichenden Konsequenzen der IL-2 Produktion während der T-Zellentwicklung, -aktivierung und -differenzierung ist die exakte Ausführung des IL-2 Genexpressionsprogramms von außerordentlicher Bedeutung für die Funktion der adaptiven Immunantwort.

1.6.2 Regulatorische Sequenzelemente des IL-2 Gens

Die Expression von IL-2 wird während der initialen Phase der T-Zellaktivierung auf mehreren Ebenen kontrolliert und umfasst die Stärke der TCR Stimulation, Veränderungen in der Chromatinstruktur, die Transkriptionsinitiation am IL-2 Promotor, Stabilität der mRNA

Transkripte oder translationale Regulationen [123]. Die IL-2 Signalgebung ist charakterisiert durch eine synergistische, simultane Signaltransduktion über den TCR/CD3 Komplex in Kombination mit zusätzlichen ko-stimulatorischen Signalen der CD28 Rezeptoren [124], die kontinuierlich über 1-2 Stunden andauern muss, um die IL-2 Expression aufrechtzuerhalten [125-127]. Die dadurch aktivierten Transkriptionsfaktoren NFAT, NF- κ B und AP-1 (s. Abschnitt 1.3.1) binden zusammen mit dem konstitutiv exprimierten aktivierungsunabhängigen Protein Oct in einer abgestimmten, nicht-redundanten Weise kooperativ an die proximal zum Transkriptionsstart gelegenen Enhancer/Promotoreregion des IL-2 Gens von 300bp Länge und induzieren die transiente Transkription von *il-2* [128, 129].

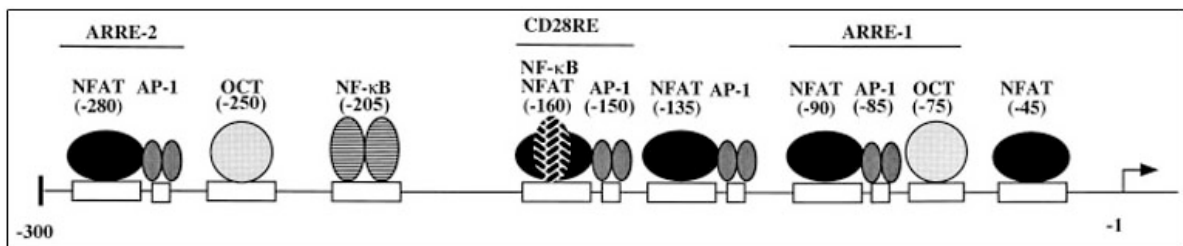


Abbildung 1.2 Zusammenfassung der regulatorischen Bindungsstellen am proximalen IL-2 Promotor. Der 300bp umfassende proximale Promotor/Enhancerbereich enthält die DNA-Bindungsmotive für die aktivierungsabhängigen Transkriptionsfaktoren AP-1, NFAT und NF- κ B sowie das aktivierungsunabhängige Oct. Die Zahlen geben die Position relativ zum Transkriptionsstart an. Die Antigen-Rezeptor-abhängigen Regulationselemente ARRE-1 und ARRE-2 (*antigen regulatory response element*) sowie das CD28 Regulationselement CD28RE (*CD28 response element*) sind eingezeichnet. Abbildung nach Rooney et.al. [130].

Die Enhancer/Promotoregion ist hoch konserviert und enthält mehrfache, funktional ebenfalls nicht-redundante DNA Bindungsstellen für die einzelnen Transkriptionsfaktoren (s. Abbildung 1.2) [131, 132]. Die beiden ursprünglich identifizierten aktivierungsabhängigen Regulationselemente bilden dabei das distal zum Transkriptionsstart gelegene ARRE-2- und das proximal gelegene ARRE-1 Regulationselement (*antigen regulatory response element*), mit jeweils einem NFAT/AP-1 Motiv. Insgesamt befinden sich fünf NFAT Erkennungsregionen am IL-2 Promotor, von denen das *CD28 response element* (CD28RE) auch durch NF- κ B gebunden wird. NFAT, NF- κ B oder AP-1 können *in vivo* nicht autonom an die Enhancer-Region binden, sondern benötigen die kooperative Bindung und Anwesenheit aller Faktoren sowie die Besetzung aller Bindungsstellen für die Induktion der IL-2 Transkription [128, 133, 134]. Unterstützt werden die Bindung und Aktivität der Transkriptionsfaktoren zusätzlich vermutlich durch aktivierungsabhängige konformationelle Veränderungen der Chromatinstruktur in der proximalen Enhancer/Promotorregion sowie des distalen -600-300bp reichenden Enhancerbereichs des IL-2 Gens [135-137]. Zusätzlich scheinen aktivierungsabhängige epigenetische Veränderungen des Chromatins in Form von Demethylierungen eine Rolle in der transkriptionellen Regulation von IL-2 zu spielen [138]. Neben der transkriptionellen Regulation wird als charakteristisches Merkmal vieler Zytokine, wie IL-2, IL-3, IL-6 oder GM-CSF, die Genexpression auch über die Stabilität

der mRNA Transkripte kontrolliert [139]. IL-2 mRNA Transkripte enthalten verschiedene AU-reiche Sequenzen (*AU-rich elements*, AREs), die sie für eine schnelle Degradation mit einer Halbwertszeit von 30min kennzeichnen und im Verhältnis zur Transkriptionsrate zu einem wesentlich schnelleren Abbau der IL-2 Transkripte führen [140]. Die Ko-Stimulation des CD28 Rezeptors bewirkt über JNK-Aktivierung eine Stabilisierung der IL-2 Transkripte, die über zwei *cis*-Elemente kodiert wird und in der 3' und 5' gelegenen untranslatierten Region (UTR) des IL-2 Gens lokalisiert sind [141, 142]. Die Beendigung der Signalinduktion über die Oberflächenrezeptoren oder Limitierung eines Transkriptionsfaktors führt zum unmittelbaren Abbruch der Transkription.

Die modulare Architektur der IL-2 Promotorstruktur bildet daher ein Gerüst, das durch Integration verschiedener Signaltransduktionswege und die kombinatorische Wirkungsweise ihrer differentiell aktivierten Transkriptionsfaktoren eine präzise Kontrolle über die IL-2 Genaktivität gewährleistet [143].

1.6.3 Aktivierungsabhängige Transkriptionsfaktoren am IL-2 Promotor

1.6.3.1 NFAT

Da die Aktivierung von NFAT ausschließlich über CaN erfolgt, ist NFAT als direktes Substrat von CaN der Schlüsselüberträger einer antigenspezifischen TCR-Erkennung und der daraus resultierenden Ca^{2+} Signale. Der IL-2 Promotor enthält fünf Bindungsmotive für NFAT Proteine, darunter vier zusammengesetzte NFAT/AP-1 Bindungsstellen, die in aktivierten Zellen *in vivo* vollständig besetzt sein müssen, um die IL-2 Transkription zu initiieren [130]. NFAT Proteine binden im Unterschied zu vielen anderen Transkriptionsfaktoren nicht nur als Dimere, sondern auch als Monomere oder kooperativ mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 an die DNA [144, 145] und regulieren die Expression vieler immunregulatorischer Gene, darunter IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, IFN- γ und TNF- α sowie der Oberflächenrezeptoren CD40L, CTLA-4 oder FasL [146]. Die Familie der NFAT Proteine umfasst bislang fünf bekannte Mitglieder, die durch alternatives Splicen zusätzlich verschiedene Isoformen hervorbringen und differentiell exprimiert in teilweise redundanter Weise viele Prozesse des Immunsystems kontrollieren [147]. Sie zeichnen sich durch eine strukturelle Ähnlichkeit in ihrer DNA-bindenden Domäne aus, die eine ausgeprägte Homologie zu den DNA-bindenden Rel-Regionen der der NF- κ B/Rel Familie aufweist und NFAT-Dimeren die Bindung an κ B Stellen erlaubt [148, 149].

Tabelle 3 Übersicht über die NFAT Familie

| Protein | Synonym | Regulation | Phänotyp bei Defizienz im Immunsystem | Referenz |
|---------|------------------|-------------------------------|---|------------|
| NFAT1 | NFATp, NFATc2 | Ca ²⁺ /Calcineurin | Gemäßigte Hyperproliferation mit Splenomegalie. Mäßig gesteigerte B- und T-Zellantworten mit Tendenz Richtung Th2 Immunität. Anhaltende IL-4- und gesenkte IFN- γ -Expression nach TCR Stimulation NFAT1/NFAT2: Eingeschränkte T-Zell Effektorfunktionen, kaum Zytokinproduktion oder zytolytische Aktivität, B-Zellhyperaktivität | [150-154] |
| NFAT2 | NFATc, NFATc1 | Ca ²⁺ /Calcineurin | Eingeschränkte Th2 Zellantworten/ IL-4 Produktion, reduzierte T-Zellproliferation/ eingeschränkte Regeneration und Migration von Lymphozyten in Thymus/ lymphatische Organe | [155, 156] |
| NFAT3 | NFATc4 | Ca ²⁺ /Calcineurin | - NFAT3 wird nicht im Immunsystem exprimiert - | |
| NFAT4 | NFATc3 | Ca ²⁺ /Calcineurin | Eingeschränkte Entwicklung von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Einfach positiven Zellen aufgrund verstärkter Apoptose doppelt-positiver CD4 ⁺ CD8 ⁺ -Zellen NFAT1/NFAT4: TCR Hyperreaktivität und schwere lymphoproliferative Störung, verstärkte Th2-Zellantwort, Allergien, interstitielle Pneumonitis | [157, 158] |
| NFAT5 | TonEBP | Osmotischer Stress | Eingeschränkte T-Zellfunktion unter hyperosmotischen Bedingungen, zellulär degenerierte Struktur von Thymus und Nieren | [159] |

Von allen bislang bekannten NFAT Proteinen scheinen vor allem NFATc2, NFATc1 und NFATc3 eine herausragende Rolle in Th-Zellen zu spielen. Während NFATc3 überwiegend in Thymozyten exprimiert wird und die CD4⁺CD8⁺ Thymozytenentwicklung kontrolliert [155], sind in reifen Th-Zellen vor allem NFATc2 und NFATc1 essentiell für die Aktivierungs- und Differenzierungsprozesse [160]. Die Funktionen der verschiedenen NFAT-Proteine in peripheren Th-Zellen zeigen sich dabei redundant und werden konträr diskutiert, da sie nicht ausschließlich spezifischen Differenzierungsprozessen zugeordnet werden können (s. Tabelle 3). Die Deletion von NFATc1 und NFATc2 führte allerdings zum völligen Verlust der Zytokinproduktion verbunden mit stark eingeschränkten T-Effektorzellfunktionen. In NFATc2-defizienten Mäusen wurde NFATc2 als negativer Regulator der IL-4 Expression beschrieben, da die Abwesenheit von NFATc2 zu einer Akkumulation von IL-4 führte [161, 162]. Im Vergleich zur inhibitorischen Rolle von NFATc2, zeigten NFATc1-defiziente Mäuse große Beeinträchtigungen in der IL-4 Produktion und Ausführung von Th2 Differenzierungsprogrammen, weshalb NFATc1 als positiver Regulator der IL-4 Expression charakterisiert wurde [153, 156]. Die IL-2 Expression kann durch alle NFAT Formen induziert werden, allerdings ist nur NFATc2 an allen initialen TCR Ereignis-

sen beteiligt, insbesondere bei der Regulation der Zytokinexpression, da es 80–90% des Gesamtanteils an NFAT in ruhenden peripheren Th-Zellen ausmacht [163, 164]. Im Gegensatz zum konstitutiv exprimierten NFATc2, wird NFATc1 nach TCR-Stimulation induziert [165] und kann erst nach ca. 2-3 Stunden PMA/Ionomycin Stimulation detektiert werden [164]. Insbesondere die Expression der Isoform NFATc1/A wird dabei durch NFAT selbst in einer positiven auto-regulatorischen Rückkopplungsschleife hochreguliert [166, 167].

In ruhenden Th-Zellen liegt NFAT phosphoryliert im Zytoplasma vor. Erfolgt eine Aktivierung der Th-Zelle über den TCR, bindet das aktivierte CaN an eine spezielle Dockingstelle im N-terminalen Bereich des NFAT Proteins mit der Konsensussequenz PxlIT [168], und dephosphoryliert 13 Serin-Phosphorylierungsstellen in der N-terminalen regulatorischen Domäne des Moleküls [169] (s. Abbildung 1.3). Okamura et.al. [169] postulierten, dass die konzertierte Dephosphorylierung aller Phosphatgruppen die Demaskierung der Kernlokalisationssequenz (NLS) zur Folge hat, wodurch die nukleäre Translokation von NFAT mit Hilfe der Importrezeptoren Importin- α und - β induziert wird [170].

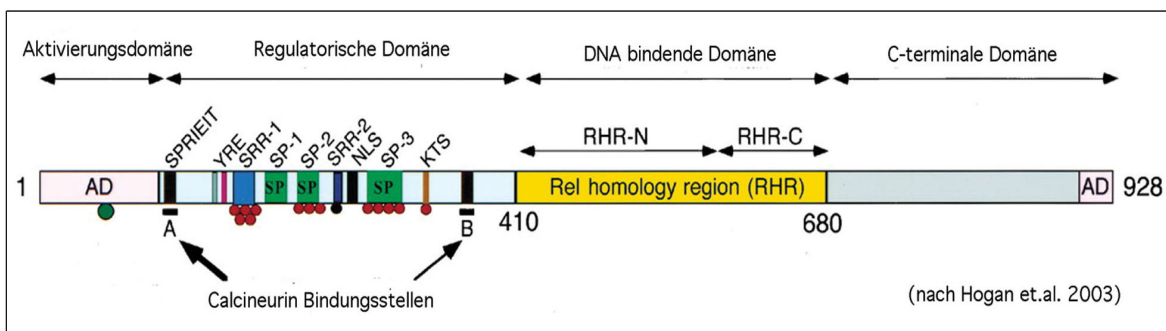


Abbildung 1.3 Allgemeine Struktur von NFAT. Das Diagramm zeigt die murine NFATc2 Proteinsequenz (Okamura et.al., 2000). Die roten Kreise zeigen die 13 Phosphatgruppen, die von Calcineurin entfernt werden. In der regulatorischen Domäne befinden sich die Kontaktbindestellen Region A und B für Calcineurin. Region A ist die PxlIT Sequenz aller NFAT Proteine, während Region B nur in NFATc1 und NFATc3 nachgewiesen wurde. NLS: Kernlokalisationssequenz.

Wird der Ca^{2+} Einstrom unterdrückt oder die CaN Aktivität gehemmt, wird NFAT durch Kinasen rephosphoryliert und innerhalb von 15min aus dem Nukleus über den Exportrezeptor Crm1 ins Zytoplasma retransloziert [61, 163, 171]. Die Rephosphorylierung von NFAT nach Absinken der Ca^{2+} Konzentration erfolgt nach einem noch nicht vollständig geklärten Muster. Sie wird sowohl durch konstitutiv aktive Kinasen wie PKA, GSK3 oder CK1 [172, 173] als auch durch induzierbare Kinasen, wie p38 oder JNK, eingeleitet [174, 175]. Aufgrund der einzigartigen Ca^{2+} /CaN Abhängigkeit, besitzt NFAT eine hohe Sensitivität für dynamische Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration [60, 67, 176]. Es ist bekannt, dass sich mit Zunahme der Phosphorylierungsstellen die Sensitivität des Moleküls gegenüber verschiedenen Signalen innerhalb der Zelle steigert [177]. Daher spekulierten Okamura et.al. [169] über die mögliche Funktion bzw. Notwendigkeit von 13

Phosphorylierungsstellen am NFAT Molekül, dass die komplette Dephosphorylierung eine Art konformationeller Schalter zwischen aktiver und inaktiver Konformation des NFAT Moleküls bildete. Salazar and Höfer kalkulierten daraufhin die Sensitivität von NFAT gegenüber Veränderungen in der CaN Aktivität als eine Funktion, bei der die Anzahl an kooperativen Dephosphorylierungen, die benötigt wird, um eine aktive Konformation zu induzieren, bestimmend für die Reaktionskurve von NFAT auf eine Stimulation ist [178]. Die 13 Phosphorylierungsstellen setzen hierbei einen Schwellenwert für die Aktivierung von NFAT in Form einer steilen hoch kooperativen Dosis-Wirkungs-Kurve. Wurde hingegen angenommen, dass die Kooperativität von nur 1-2 Dephosphorylierungen für eine vollständige NFAT-Aktivierung ausreichte, verlief die Kurve niedrig, d.h. selbst ein hoher Anstieg in der CaN Aktivität führte nur zu einem relativ geringen Anstieg in der NFAT Aktivität [178].

1.6.3.2 NF- κ B

Der IL-2 Promotor verfügt über zwei NF- κ B Bindestellen, an die in stimulierten Th-Zellen Dimere der Rel-Proteinfamilie binden. Nach initialer Stimulation bestehen diese hauptsächlich aus p50/p65 (RelA) Heterodimeren, die bei anhaltender Stimulation durch p50/c-Rel Heterodimere ersetzt werden [179, 180]. Eine nicht-redundante Bedeutung von RelA oder c-Rel für die IL-2 Expression wird kontrovers diskutiert. In c-Rel-defizienten Mäusen konnte im Gegensatz zu RelA-defizienten Mäusen ein spezifischer Verlust der IL-2 Expression festgestellt werden, ohne die Expression anderer NF- κ B abhängige Gene wie CD69 zu beeinflussen [181-183]. Allerdings benötigt c-Rel für seine Aktivierung eine NFAT-abhängige *de novo* Synthese [180, 184] und ist erst einige Stunden nach Aktivierung im Zellkern detektierbar [103, 185]. Im Gegensatz dazu kann RelA bereits 30min nach Stimulation im Zellkern detektiert werden und gilt daher im Komplex mit p50 als initialer NF- κ B Transkriptionsfaktor bei der T-Zellaktivierung und IL-2 Expression [105, 129, 179, 186]. Im Unterschied dazu bindet c-Rel insbesondere durch CD28 Ko-Stimulation an das CD28RE DNA-Bindungsmotiv am IL-2 Promotor und verstärkt die transkriptionelle Aktivität [185]. Daher wird die Funktion und Induktion von c-Rel für die Aufrechterhaltung der IL-2 Expression vor allem bei der CD28-abhängigen Stimulation von naiven Th-Zellen gesehen [185].

Die Aktivierung von NF- κ B geschieht über PKC θ und CaN Stimulation. Der PKC θ und CaN Signalweg aktiviert u.a. über CARMA1/CARD11, MALT1 und BCL10 den Kinasen-Komplex IKK α , β und γ (*I κ B Kinase α , β und γ*), der wiederum den im Zytoplasma an NF- κ B gebundenen Inhibitor I κ B (*Inhibitor of κ B*) phosphoryliert [187-189]. I κ B wird durch Ubiquitinierung degradiert, wodurch NF- κ B in den Zellkern transloziert [190] Eine Erhö-

hung der transkriptionellen Aktivität des IL-2 Promotors wird zudem durch den kostimulatorischen CD28 Rezeptorsignalweg vermittelt, der die nukleäre Translokation von NF- κ B verstärkt und die zusammengesetzte Bindungsstelle CD28RE für vermutlich überwiegend NF- κ B Faktoren im proximalen Promotorbereich kontrolliert [191, 192]. Durch das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α kann NF- κ B ebenfalls spezifisch über einen separaten Sphingomyelinase-abhängigen Signalweg aktiviert werden. Darüber hinaus wird die NF- κ B Aktivität auch durch einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ beeinflusst [39]. CsA inhibiert die NF- κ B Aktivität durch Hemmung der 26S Proteasom-Untereinheit und verhindert damit die Degradation von I κ B α [188, 193]. Daneben muss es weitere Ca^{2+} /CaN-abhängige Regulationsmechanismen geben, da durch CsA beispielsweise die optimale Induktion der c-Rel und p50 Expression beeinträchtigt werden konnte und FK506 die Ionomycin induzierte Translokation von NF- κ B in den Zellkern blockte [184]. Eine divergierende NF- κ B Aktivität führt zu Veränderungen oder Störungen in der Proliferation, Aktivierung und Produktion von Zytokinen, wie z.B IL-2, IL-6, GM-CSF, TNF- α und IFN γ [194].

1.6.3.3 AP-1

NFAT Proteine bilden an spezifischen zusammengesetzten DNA Bindungsstellen starke kooperative Komplexe mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 (s. Abbildung 1.4), der aus Dimeren der Fos- und Jun-Proteinfamilie (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2 bzw. c-Jun, JunB und JunD) gebildet wird [129, 195]. Die Dimerbildung erfolgt über ein Leuzin-Zipper-Motiv, das die Helices der beiden Monomere über eine hydrophobe Wechselwirkung der Leuzin-Reste verbindet. Die Regulation der Fos und Jun Protein Expression erfolgt transkriptionell und über posttranslationale Modifikationen über die Aktivierung der MAP-Kinasen JNK und ERK der MAPK Signalkaskade.

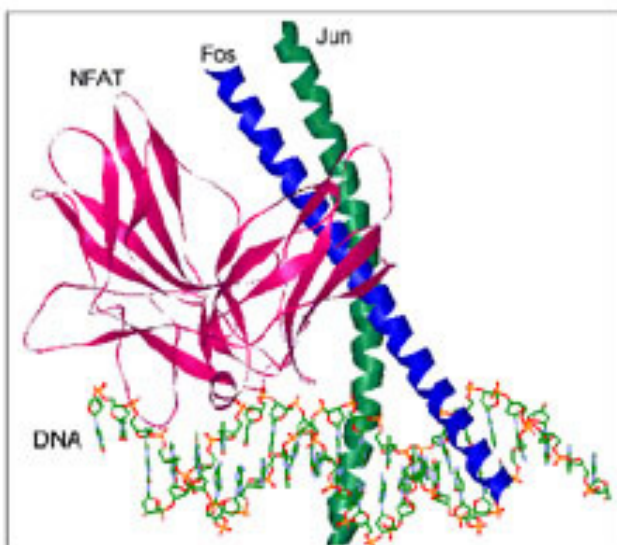


Abbildung 1.4 Ternärer NFAT/AP-1 Komplex bindet an die DNA. AP-1 bindet als Dimer, bestehend aus einem c-Fos und einem c-Jun Monomer, über ein Leuzin-Zipper Motiv an die DNA und kooperiert mit einem NFAT Monomer.

Nach Stimulation ist die *de novo* Synthese und Phosphorylierung der beteiligten c-Fos Proteine sowie die Phosphorylierung von c-Jun durch JNK erforderlich, um einen aktiven AP-1 Komplex mit entsprechenden DNA-bindenden Eigenschaften herzustellen [196, 197]. Die physiologische Bedeutung der NFAT/AP-1 Kooperation konnte eindeutig für die Th-Zellentwicklung im Thymus sowie die Differenzierung in Th1/Th2, anergen und toleranten T-Lymphozyten nach APC-TCR Kontakt nachgewiesen werden [198]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der AP-1 Komplexe großen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität ausübt. So wirken beispielsweise c-Jun/c-Fos Komplexe wie im Fall der IL-2 Expression stimulierend, während JunB/c-Fos Komplexe oder Substitution von c-Fos durch Fra-1- und Fra-2-supprimierende transkriptionelle Aktivität auf die IL-2 Expression ausüben [129]. Die ternären NFAT/Fos/Jun-Komplexe dienen als Signalintegratoren für zwei unterschiedlich aktivierte Signalwege, nämlich den Ca^{2+} /CaN und den PKC/Ras/MAPK-Signalweg, wobei CaN auch über Transaktivierung Einfluss auf die JNK Aktivität auszuüben scheint [197]. Insbesondere in primären Th-Zellen ist daher die kombinierte mitogene Stimulation mit Phorbolestern und Ca^{2+} Ionophoren für eine maximale JNK Aktivierung und der damit verbundenen maximalen AP-1-vermittelten Transaktivierung erforderlich [199]. Allerdings zeigten sich die AP-1 Erkennungsregionen des IL-2 Promotors nicht sensitiv gegenüber der Wirkung von CsA bei der transkriptionellen Aktivität [200].

1.7 Binäre oder graduelle Geninduktion als Folge der zellulären Signaltransduktion

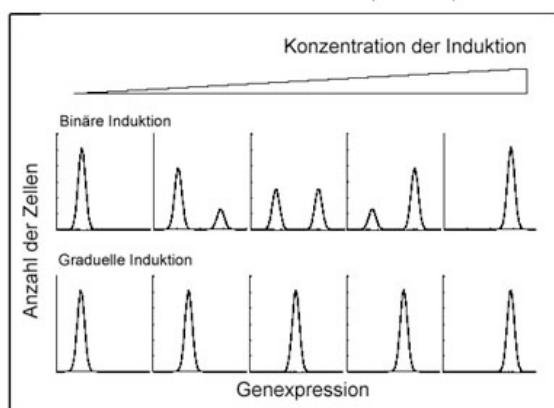
1.7.1 Prinzip der binären und graduellen Geninduktion

Die Konsequenzen der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren für die Genexpression werden zumeist als Induktion der Promotoraktivität eines distinkten Gens beschrieben. Allerdings bleibt an dieser Übergangsstelle von Signaltransduktion zu transkriptioneller Regulation oftmals unbeantwortet, inwieweit die beteiligten Transkriptionsfaktoren dabei die Promotoraktivität und die daraus resultierende Genexpression, zum Beispiel für IL-2, regulieren. Bei der eukaryontischen Geninduktion wurden zwei Modelle der transkriptionellen Regulation vorgeschlagen: Die Transkriptionsfaktoren kontrollieren entweder als binäre Schalter die Promotoraktivität oder bestimmen als graduelle Regulatoren die Transkriptionsrate [201, 202].

Das binäre Modell geht von zwei diskreten transkriptionellen Aktivierungszuständen aus, und zwar erstens, der aktiven/inaktiven Promotorkonfiguration bzw. regulatorischen Enhancerregion, und zweitens, einer schalterähnlichen Aktivierung der transkriptionellen

Aktivatoren des betreffenden Gens. Die Ursachen einer Schalter Regulation können in der binären Aktivierung der transkriptionellen Aktivatoren liegen und durch positive Rückkopplungsschleifen oder kooperative oder kompetitive molekulare Interaktionen von Aktivatoren/Repressoren vermittelt werden [203]. Die Transkription findet nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip statt, d.h. entweder überhaupt nicht oder im aktiven Zustand mit konstanter Rate. Es wird daher vermutet, dass beim binären Modell Enhancerregionen nicht die Stärke der Transkriptionsrate beeinflussen, sondern die Wahrscheinlichkeit der Transkriptionsinduktion des betreffenden Gens erhöhen [204, 205]. Im Gegensatz dazu geht man beim graduellen Modell davon aus, dass der Promotor in seiner transkriptionellen Aktivität variabel ist, und die Transkriptionsfaktoren die Genexpression über die Transkriptionsrate der mRNA beeinflussen [206]. Bei Betrachtung der gesamten Zellpopulation würde sowohl die binäre als auch die graduelle Geninduktion allerdings einen ähnlich hohen Anstieg der mRNA Niveaus zeigen, da in beiden Modellen die Abhängigkeit der Genexpression von der Konzentration oder Stärke der transkriptionsinduzierenden Faktoren (TIF) definiert wird. Vergleicht man allerdings beide Arten der Genexpression in einzelnen Zellen, hat dies völlig verschiedene Konsequenzen für die Proteinexpression des untersuchten Gens auf Einzelzellebene, wie in Abbildung 1.5 schematisch dargestellt ist [203]. Bei einer binären Induktion sind zwei Gipfel im Histogramm sichtbar, die eine produzierende Zellpopulation und eine nichtproduzierende Zellpopulation repräsentieren. Variiert man die Konzentration der TIF, führt dies zu einer Veränderung der Zellanzahl in jeder Population, also der Höhe des jeweiligen Gipfels (y-Achse), aber nicht der Proteinmenge pro Zelle, d.h. der Position der Gipfel entlang der x-Achse.

Detektion auf Einzelzellebene (FACS)



Mechanismus in individuellen Zellen

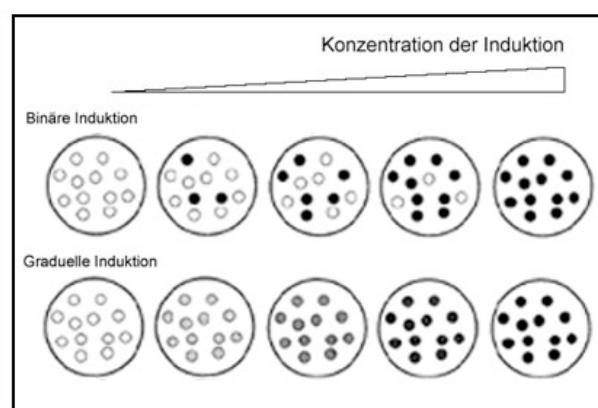


Abbildung 1.5 Schematische Darstellung der zwei Modelle der binären und graduellen Genexpression. Links: Detektion auf Einzelzellebene im Durchflusszytometer (FACS). In Abhängigkeit der Konzentration oder Stärke der transkriptionsinduzierenden Faktoren (TIF) werden bei einer binären Geninduktion die Frequenz der produzierenden und nichtproduzierenden Zellen verändert und nicht die Expression pro Zelle. Bei der graduellen Induktion ändert sich die Intensität der gesamten Expression in allen Zellen. Rechts: Der Mechanismus der binären Geninduktion zeigt sich als Alles-oder-Nichts-Prinzip in individuellen Zellen einer Zellkultur, bei der die Anzahl der produzierenden Zellen zunimmt, während bei der graduellen Geninduktion in allen Zellen eine Zunahme der Produktionsintensität zu beobachten ist. Abbildung nach Kringstein et.al., 1998 und Zhang et.al., 2006.

Bei einer graduellen Geninduktion hingegen wird die Genexpression nur durch einen Gipfel repräsentiert, der sich bei Variation der TIF entlang der x-Achse bewegt, d.h. alle Zellen produzieren proportional zur Induktion mehr Protein.

Die genauen Mechanismen und molekularen Ereignisse, die nach einer binären oder graduellen Weise die Proteinexpression regulieren, sind allerdings kaum bekannt.

1.7.2 Potentielle Kontrollebenen einer binären IL-2 Genexpression

Fiering et.al. [207] fanden 1990 eine bimodale Reporter-geninduktion für β -Galactosidase (β -Gal) unter der Kontrolle eines NFAT, NF- κ B und IL-2 Enhancer-regulierten Plasmid-konstrukts. Als Ursache dieser binären β -Gal- und davon abgeleiteten IL-2 Genexpression wurde angenommen, dass der Schwellenwert zur Aktivierung von β -Gal durch die Konzentration und kooperative Interaktion der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF- κ B als eine stochastische DNA-Transkriptionsfaktor Interaktion bestimmt wird [207, 208]. Fluktuationen bei der DNA-Transkriptionsfaktor Interaktion an Enhancer oder Promotorregionen rufen verschiedene chemische Bindungskinetiken hervor, wodurch graduelle (schnelle Kinetik) oder binäre (langsame Kinetik) Expressionsmuster moduliert werden können [208, 209]. Daneben zeigten weitere Untersuchungen auf Einzelzellniveau, dass eine transkriptionelle Verstärkung durch Enhancer sowohl nach binären als auch nach graduellen Mustern kontrolliert werden kann [201, 210]. Auf der Basis dieser Experimente wurden theoretische Modelle entwickelt, die die Halbwertszeit der gebildeten mRNA und Proteine im Verhältnis zur aktiven/inaktiven Promotorkonfiguration als wichtige Faktoren für das induzierte Proteinexpressionsmuster analysierten [211, 212]. Die mRNA oder Proteinproduktion mit einer wesentlich kürzeren Halbwertszeit als der durchschnittliche Promotoraktivität, wie es beispielsweise für die IL-2 mRNA gilt, würde ausnahmslos zu einem binären Expressionsmuster führen, unabhängig von der Länge der Induktionszeit. Ist die durchschnittliche Halbwertszeit länger oder gleich der durchschnittlichen Promotoraktivität, beeinflusst die Dauer der Induktionszeit das binäre Muster in Richtung gradueller Expression [203]. Aufgrund des heutigen Wissensstands kommen als Kontrollebenen der IL-2 Expression, die zu einer binären IL-2 Expression führen könnten, neben der Aktivierung und kooperativen Interaktion der Transkriptionsfaktoren NFAT, NF- κ B und AP-1 [128, 213], die kombinierte Aktivierung des TCR und des ko-stimulatorischen Rezeptors CD28 [134], eine bestimmte zytosolische Ca^{2+} Konzentration [60], Chromatinmodifikationen am IL-2 Promotor/Enhancer [137, 138], die Transkriptionsinitiation [132], die Stabilität der IL-2 mRNA Transkripte [214] sowie translationelle Regulationen [215] in Betracht.

Durch die Unterscheidung der binären und graduellen Geninduktion wird ein fundamentaler Aspekt bei der Einleitung zellulärer Entscheidungsprozesse deutlich. Graduelle Expressionsmuster gewährleisten fein abgestimmte zelluläre Antworten proportional zum induzierenden Signal, was die Homogenität und damit Funktionalität einer Zellpopulation durch die Fähigkeit zu ähnlichen Veränderungen des Gen- bzw. Proteinexpressionsprofils unterstützt. Binäre Genexpressionsmuster können eine effiziente zelluläre Antwort auf flüchtige Signale sicherstellen und durch Determination von Schwellenwerten die Diversität ihrer zellulären Antworten begrenzen, beispielsweise bei T-Zelldifferenzierungsprogrammen. Dies wäre ein Indiz dafür, wie quantitative Signale einer TCR-Stimulation in eine qualitative Entscheidung auf Einzelzell- oder Populationsebene für die Auslösung eines spezifischen Aktivierungsprogramms übersetzt würde. Dadurch könnten distinkte Subpopulationen mit spezifischen Eigenschaften innerhalb einer Zellpopulation hergestellt werden.

1.8 Ziele dieser Arbeit

Die Sekretion des Zytokins IL-2 ist das charakteristische Kennzeichen des T-Zell-Aktivierungsprogramms *in vitro* und hat entscheidende Konsequenzen für die Homöostase des adaptiven Immunsystems *in vivo*. Die Produktion von IL-2 unterliegt einer multifaktoriellen Regulation, die u.a. Veränderungen in der Chromatinstruktur, die Transkriptionsinitiation oder die Stabilität der mRNA Transkripte betreffen. Während die transkriptionelle Regulation des IL-2 Promotors hinreichend erforscht wurde, sind die zellulären Entscheidungsprozesse der Signaltransduktion, die zur Bildung von IL-2 führen, kaum bekannt. In dieser Arbeit sollten durch Modulation der initialen Th-Zellaktivierung die zellulären und molekularen Entscheidungsprozesse der IL-2 Expression analysiert und charakterisiert werden. Dies umfasste Untersuchungen zu folgenden Aspekten:

- Bedeutung der IL-2 spezifischen Signalwege für die IL-2 Expression durch Modulation der Signalstärken der betreffenden Signaltransduktionskaskaden.
- Charakterisierung des stimulationsabhängigen IL-2 Expressionsprofils innerhalb einer humanen CD4⁺ Th-Zellpopulation auf Einzelzellebene.
- Etablierung eines Analyseverfahrens zur Unterscheidung von IL-2 Produzenten und IL-2 Nichtproduzenten auf Einzelzell- und Populationsebene.
- Identifikation der entscheidenden zellulären Regulationsebenen für die Auslösung der IL-2 Expression, wie Veränderungen der Chromatinstruktur, Transkriptionsinitiation am IL-2 Promotor und Stabilität der IL-2 mRNA.
- Detektion der stimulationsabhängigen Aktivierung von IL-2 relevanten Transkriptionsfaktoren.