

1. Einleitung und Stand der Forschung

1.1 Das Immunsystem

Diese Arbeit handelt von Signalen, die durch bakterielle Proteine in humanen T-Zellen ausgelöst werden. Ich werde im Folgenden relevante Gebiete wie die Immunantwort, T-Zell-signale, bakterielle Enterotoxine und Zytokinrezeptorsignala kurz einleitend beschreiben.

Wirbeltiere haben im Laufe der Evolution ein komplexes Abwehrsystem entwickelt, um sich gegen Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten oder auch gegen Krebserkrankungen zu schützen.

Die Gesamtheit der Gewebe, Zellen und Moleküle, die an der Abwehrreaktion gegen pathogene Eindringlinge und karzinogene Veränderungen beteiligt sind, bezeichnet man als Immunsystem (Paul, 1999).

Das Immunsystem lässt sich grob in zwei Abwehrlinien einteilen, in ein unspezifisches, angeborenes Immunsystem (*innate immune system*) und ein spezifisches, adaptives Immunsystem (*acquired immune system*). Das unspezifische Immunsystem bildet eine erste, unmittelbar wirksame Verteidigungslinie. Es reagiert direkt gegen einen infektiösen Eindringling und benötigt dabei keine vorherige Aktivierung. Das unspezifische Immunsystem besteht, neben den physikalischen Barrieren wie Haut oder Mukosa, aus professionellen phagozytierenden Zellen (Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile), sowie aus Epitheliumzellen und NK Zellen (*natural killer cells*). Weiterhin umfasst es Antikörper, das Komplementsystem, Zytokine und Interferone. Phagozyten patrouillieren in Blut und in der Lymphe, und infiltrieren Gewebe um mit Antikörpern oder durch Komplement opzonisierte Pathogene zu eliminieren.

Das angeborene Immunsystem stellt somit eine effektive, schnelle Abwehr dar, um Pathogene an der Ausbreitung zu hindern. Das ist wichtig, denn das adaptive Immunsystem ist erst nach 4-5 Tagen zu einer spezifischen Abwehrreaktion in der Lage (Ezekowitz, 1998). Signale des innaten Immunsystems, wie Zytokine, aktivierte Dendritische Zellen, Makrophagen oder Signale von TLR (*toll like receptors*) sind jedoch für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems unabdingbar (Krutzik, 2001).

Das adaptive Immunsystem besteht aus lymphoidem Gewebe und Lymphozyten. Man unterscheidet zwischen B-Lymphozyten (B-Zellen) und T- Lymphozyten (T-Zellen).

B-Zellen (B- für *bursa fabricii*) reifen im Knochenmark, fungieren als antigenpräsentierende Zellen (APC) und können sich nach Stimulation zu antikörperproduzierenden Plasmazellen entwickeln.

T-Zellen entwickeln sich ebenfalls aus den hämatopoetischen, pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks, sie reifen jedoch im Thymus heran. Das spezifische Immunsystem besitzt die Fähigkeit zur Erinnerung (via Gedächtniszellen), d.h. bei Wiederauftreten eines Pathogens ist das Immunsystem in der Lage, schnell eine effiziente Abwehrreaktion zu aktivieren. Die Stärke des adaptiven Immunsystems liegt im Gedächtnis, in der Spezifität und der Fähigkeit zur fortlaufenden Verbesserung des pathogenbindenden Rezeptors. Jeder Lymphozyt trägt mehrere Kopien eines spezifischen Rezeptors auf seiner Zelloberfläche und die betreffende Zelle kann im Bedarfsfall beliebig vermehrt werden.

B-Zellen tragen membrangebundene Antikörper (B-Zellrezeptor oder BcR) auf ihrer Oberfläche, T-Zellen tragen dagegen einen T-Zellrezeptor (TcR). Durch Rekombination einer Vielzahl von Genfragmenten ist die Herstellung von 10^{10} bis 10^{18} verschiedenen Rezeptoren möglich. Es ist von elementarer Bedeutung für unser Überleben, das unser Immunsystem keine körpereigenen Strukturen angreift. Das ist bei Autoimmunerkrankungen, wie z. B. Myasthenia Gravis oder Multiple Sklerose, der Fall. T- und B-Zellen werden deshalb einer genauen Selektion unterzogen. Hierbei werden Lymphozyten mit Rezeptoren gegen körpereigene Strukturen eliminiert (Janeway, 2001).

Im Gegensatz zum BcR ist der TcR immer membrangebunden und nicht in der Lage, die räumliche Struktur eines nativen Proteins zu erkennen. Der TcR erkennt eine antigene Determinate nur, wenn sie vorher von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) aufgenommen, prozessiert und in Form kurzer Peptide auf polymorphen Glykoproteinen, den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Molekülen präsentiert wird (Abb. 1.1.1). MHC Klasse I finden sich auf fast allen kernhaltigen Zellen des Körpers, die dadurch Zellen auf Mutationen oder Virusinfektionen hin überprüft werden können. MHC Klasse I Moleküle präsentieren durch Proteosomen prozessierte Proteine aus dem Zytosol. Alle zytosolischen Proteine, somit auch Virusproteine oder mutierte Proteine, werden routinemäßig proteolytisch abgebaut (York, 1999).

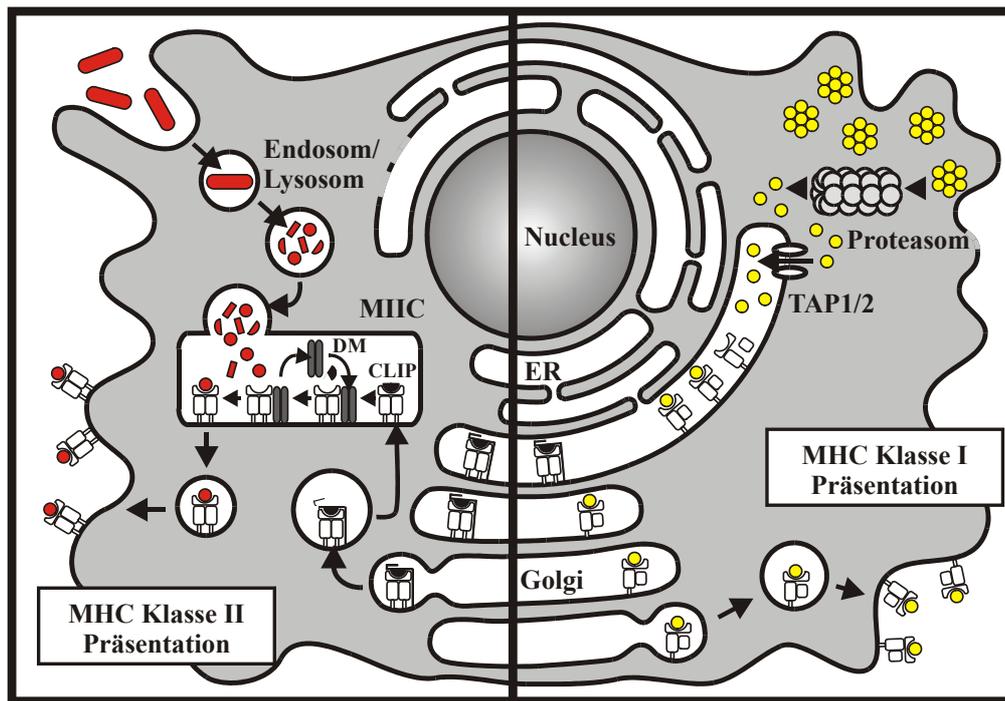


Abb. 1.1.1. Antigenpräsentation durch MHC Klasse I und Klasse II Moleküle.
(mit freundlicher Genehmigung von Teis Jensen)

Die entstehenden, endogenen Peptide werden durch Transportermoleküle (TAP) in das Endoplasmatische Reticulum geschleust und binden sich hier an neutranslatierte MHC Klasse I Moleküle (Uebel, 1999). Die Peptid/MHC Klasse I Komplexe wandern nun über den Golgi-Apparat zur Zellmembran gebracht und dort den T-Zellen präsentiert.

Exogene Antigene werden dagegen durch MHC Klasse II Moleküle präsentiert. MHC Klasse II Moleküle finden sich auf allen APC's und auf einigen aktivierten Zellen (z.B. humanen aktivierten T-Zellen). Im humanen MHC-System bezeichnet man MHC Klasse II Moleküle als HLA (*human leucocyte antigen*) -DR, -DQ und -DP. Exogene Antigene (Antigene von Bakterien oder Parasiten) werden durch Endozytose oder Phagozytose aufgenommen und in speziellen Phagolysosomen enzymatisch abgebaut. Diese Vesikel fusionieren mit vom Golgi Apparat kommenden MHC Klasse II Transportvesikeln. Im ER werden Klasse II Moleküle im Gegensatz zu Klasse I Molekülen vor vorzeitiger Peptidbindung durch ein spezielles „Deckelprotein“, der *invarianten Kette* (Ii), geschützt. Die *invariante Kette* wird in den fusionierten Vesikeln (MIIC-Vesikel) proteolytisch abgebaut, und gibt damit die Klasse II Moleküle zur Peptidbindung frei (siehe Abb. 1.1.1).

Ein verbleibender Rest der Invarianten Kette, das CLIP-Peptid, wird mittels eines speziellen Klasse II-ähnlichen Proteins (DM) entfernt. Nach der nun möglichen Peptidbindung werden die MHC Klasse II/Peptid-Komplexe zur Zellmembran der APC's transportiert (Pieters 2000). Peptid/MHC Komplexe sind nun in Lage, sich an bestimmte TcR's zu binden und damit T-Zellen zu aktivieren. Eine TcR-Bindung ist an bestimmte körpereigene MHC Allele gebunden. Die MHC Moleküle selbst können nicht zwischen körpereigenen oder körperfremden Peptiden unterscheiden. Diese Unterscheidung ist ausschliesslich eine Funktion der selektierten T-Zellen.

1.2 T-Zellen

T-Zellvorläufer wandern aus dem Knochenmark in den Thymus ein, wo die unreifen T-Zellen sich von $CD4^+/CD8^-$ -Thymozyten über mehrere Stufen der TcR Rekombination zu $CD4^+/CD8^+$ -Thymozyten entwickeln (Zuniga-Pflücker, 1996). Diese doppelt positiven Zellen werden jetzt einer strengen Selektion unterzogen (Strasser, 1995). Der zweiteilige Selektionsprozess soll die Bindung an körpereigene MHC Allele gewährleisten (positive Selektion), eine Bindung an körpereigene Peptide aber verhindern helfen (negative Selektion) (von Boehmer, 1994 und Nossal, 1994).

Die positive Selektion erlaubt nur ca. 1-2% aller Thymozyten nach Interaktion mit MHC Klasse I oder Klasse II Molekülen auf dem Epithel des Thymuscortex zu überleben und sich zu $CD4^+$ (bei Bindung an MHC Klasse II) oder $CD8^+$ (bei Bindung an MHC Klasse I), naiven, einfach positiven T-Zellen zu entwickeln (Singer, 1999). Diese naiven T-Zellen gelangen in die Peripherie und in die verschiedenen, sekundären lymphoiden Organe (z.B. Lymphknoten oder Milz). Treffen die naiven T-Zellen hier auf eine TcR-stimulierende Kombination aus MHC und Peptid werden die T-Zellen aktiviert, proliferieren und können dann als ausgereifte Effektor T-Zellen in der Peripherie beim wiederholten Zusammentreffen mit der gleichen MHC/Peptid Kombination das Pathogen wirksam bekämpfen (Abb.1.2.2). Ein Teil dieser aktivierten T-Zellen bleiben als Gedächtnis T-Zellen über Jahre hinaus wirkungsvoll. Gedächtnis T- und B-Zellen gewährleisten, dass beim Wiederauftreten eines Pathogens eine Immunantwort schneller und wirkungsvoller aktiviert werden kann (Lanzavecchia, 2000).

T-Zellen unterscheidet man grob in γ/δ^- , $CD4^+$ und $CD8^+$ -T Zellen. γ/δ^- T Zellen sind nicht an die MHC/Peptid-Restriktion gebunden und befinden sich hauptsächlich im Epithelgewebe und

dem Dünndarm (Havran, 1994). $CD4^+$ T-Zellen bezeichnet man auch als Helfer T-Zellen (T_H -Zellen) und $CD8^+$ T-Zellen werden als Killer T-Zellen (T_K -Zellen) bezeichnet.

Die $CD4$ - und $CD8$ -Moleküle sind Korezeptoren, die sich an die nichtvariablen Domänen von MHC Klasse II, bzw. Klasse I Molekülen binden (Singer, 1999). Die Bindung des Korezeptors erhöht die Affinität des TcR's zu dem betreffenden MHC Molekül um den Faktor 100. Andere Zell-Zell-Interaktions verstärkende Adhäsionsmoleküle, wie LFA-1, CD2 und ICAM1 spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der vollständigen Aktivierung der T-Zellen (Bachmann, 1997).

Der T-Zellen Rezeptor der $CD8^+$ T_K -Zellen wird durch MHC Klasse I Moleküle stimuliert, welche endogen Peptide präsentieren, die z.B. von mutierten Proteinen oder von Virusproteinen stammen. Aktivierte Effektor T_K -Zellen zerstören ihre Zielzellen nach Zell-Zell Kontakt durch Ausschüttung von Zytotoxinen (Granzym, Perforin) und durch Produktion von Zytokinen (Fas-Ligand, $IFN\gamma$, $TNF\alpha,\beta$) (Griffiths, 1995).

$CD8^+$ T_K -Zellen werden nach ihrem Zytokinprofil neuerdings auch in T_K1 ($IFN\gamma$ -produzierende) und $T_K2/0$ (IL-4-produzierende) T-Zellen unterschieden (Vulmanovic-Stejic, 2000).

$CD4^+$ T_H -Zellen sind die zentralen Regulationszellen des adaptiven Immunsystems. Die Bedeutung dieser Zellen wird durch angeborene Defekten, bei Infektionen oder bei Ausfall dieser Zellen (z.B. durch HIV) besonders deutlich.

Der TcR der $CD4^+$ T_H -Zellen wird durch exogene Peptide stimuliert, die auf MHC Klasse II Molekülen präsentiert werden (z.B. aktivierte Makrophagen oder Dendritische Zellen). Abhängig vom stimulierenden Antigen, den antigenpräsentierenden Zellen, der Lokalisierung des Antigens, der Dosis und der Stimulationszeitspanne, sowie von den Zytokinen der Umgebung, können sich aus T_H0 Zellen T_H1 - oder T_H2 -Zellen entwickeln (Wang, 1993 und Moser, 2000). T_H1 -Zellen bekämpfen durch Aktivierung und Mobilisierung von Makrophagen, intrazelluläre Pathogene. Verschiedene Viren und Bakterien induzieren die Produktion von IL-12 von Makrophagen, sowie die Produktion von $IFN\gamma$ von NK-Zellen. IL-12 und $IFN\gamma$, sowie eine kräftige Bindung zwischen TcR und Ligand bewirken eine Differenzierung von T_H0 -Zellen zu $CD4^+$ T_H1 -Zellen (Abb. 1.2.1) (Rogers, 1999).

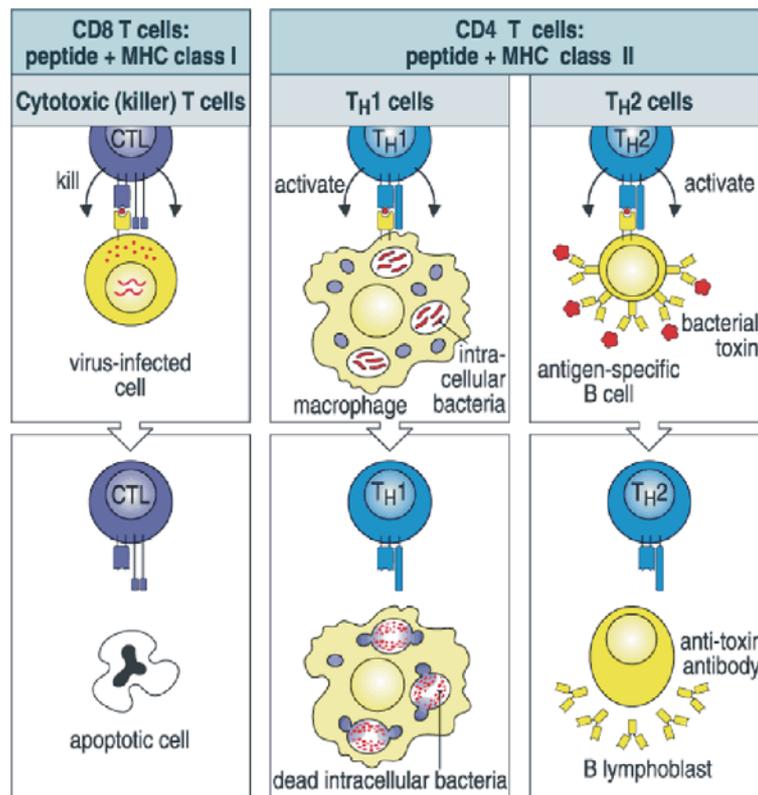


Abb. 1.2.1 T-Zellen Differenzierung in T_K-, T_H1- und T_H2-Zellen.
(nach Janeway: Immunobiology, 5th edition)

T_H1-Zellen produzieren hauptsächlich IFN γ , CD40L, IL-2 und TNF β und fördern eine Zellvermittelte Immunantwort, wobei IFN γ die Differenzierung von T_H2 Zellen blockiert (Romagnani, 2000). In murinen T-Zellen Linien fand man die T_H1- und T_H2-spezifischen Transkriptionsfaktoren t-Bet, c-maf und Gata3, deren jeweilige Produktion die Produktion des anderen Transkriptionsfaktors inhibierte. Die Differenzierung in T_H1- und T_H2-Zellen scheint jedoch für bis zu 5 Zellteilungen reversibel zu sein (Rengarajan, 2000 und Grogan, 2001). Andere Pathogene, wie z.B. Würmer, bewirken keine IL-12 Produktion durch Makrophagen, sondern stimulieren eine spezielle Gruppe von NK-Zellen (NK1.1⁺ CD4⁺ T-Zellen) zur Produktion von IL-4 (Bendelac, 1997). IL-4, IL-6 und eine relativ schwache Bindung von TcR und Ligand bewirken, dass sich T_H0-Zellen zu CD4⁺ T_H2-Zellen differenzieren (Rogers, 1999). T_H2-Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-13, CD40L und IL-10.

Sie helfen B-Zellen sich in antikörperproduzierende Plasmazellen zu verwandeln, unterstützen die humorale Immunantwort und blockieren durch IL-4 und IL-10 Produktion eine Differenzierung von T_H1-Zellen.

Eine weitere Subpopulation von CD4⁺ T-Zellen sind die seit kurzem wieder heftig diskutierten regulativen T-Zellen (Treg) (Maloy, 2001 und Waldmann, 2000). Treg Zellen hat man vor 10 Jahren noch als *suppressor* Zellen bezeichnet; ein Begriff, der lange Zeit verpönt war. Diese T-Zellen, deren Herkunft noch nicht geklärt ist, inhibieren T_K- und T_H-Zellen durch Produktion von TGFβ und IL-10 (Levings, 2000). Eine gezielte Regulation dieser T-Zellen kann enorme Bedeutung für die Entwicklung von Krebsimpfstoffen und für die Bekämpfung von Autoimmunerkrankungen bekommen.

Eine MHC/Peptidspezifische Aktivierung des TcR's führt zu einer klonalen Expansion der T-Zellen. T-Zellen können jedoch auch antigenunabhängig durch Komplexierung verschiedener Oberflächenproteine polyklonal stimuliert werden (z.B. durch Lektine, Anti-TcR/CD28-Antikörper oder Superantigene). Eine andere Möglichkeit ist, T-Zellen durch direkte Aktivierung verschiedener Signalwege, durch z.B. PMA oder Ionomycin, zu stimulieren.

Bevor es durch Stimulation des TcR zur Proliferation der T-Zelle kommen kann, muss erst in der G₁ Phase des Zellzyklusses Interleukin 2 (IL-2) und der hochaffine IL-2-Rezeptor (IL-2Rαβγ) synthetisiert werden. Die autokrine Stimulation des IL-2Rs führt dann zu einem S-G₂-M-Phasen Übergang und zur Zellteilung (Gomez, 1998).

Neben der antigenspezifischen Stimulation des TcRs (Signal 1) ist die Aktivierung des Kostimulators CD28 (Signal 2) durch B7.1 /B7.2 (CD80/CD86) auf den APCs für die primäre Aktivierung der T-Zellen unabdingbar. Stimulation von Signal 1 (TcR) ohne gleichzeitige Stimulation von Signal 2 (CD28) führt zu Anergie und einer Nichtreaktion auf proliferationsstimulierenden Zytokine, wie z.B. IL-2 (Abb. 1.2.2) (Schwartz, 1989).

Nach Aktivierung einer naiven T-Zelle durch Signal 1 (TcR) und Signal 2 (CD28) verändert die naive T-Zelle ihre Adhäsionsmoleküle (von L-Selektin zu LFA-1 und VLA-4), verlässt die Lymphknoten und benötigt als fertigdifferenzierte Effektorzelle nur noch Signal 1 (TcR-Stimulation), um als Effektorzelle in der Peripherie aktiv zu werden (Picker, 1994).

Das etwas rigide Signal1/Signal2-Modell der T-Zellaktivierung (Schwartz, 1989) benötigt durch die Entdeckung weitere Moleküle mit kostimulatorischer Wirkung (CTLA-4, CD40L, ICOS, Ox40, PD-1, 4-1BB und CD27) eine Revalidierung (Chambers, 2001). CTLA-4 und PD-1 haben vermutlich eine inhibitorische Wirkung, während ICOS und Ox40 vermutlich bei der Regulation der T-Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle spielen (Watts, 1999 und Fecteau, 2001).

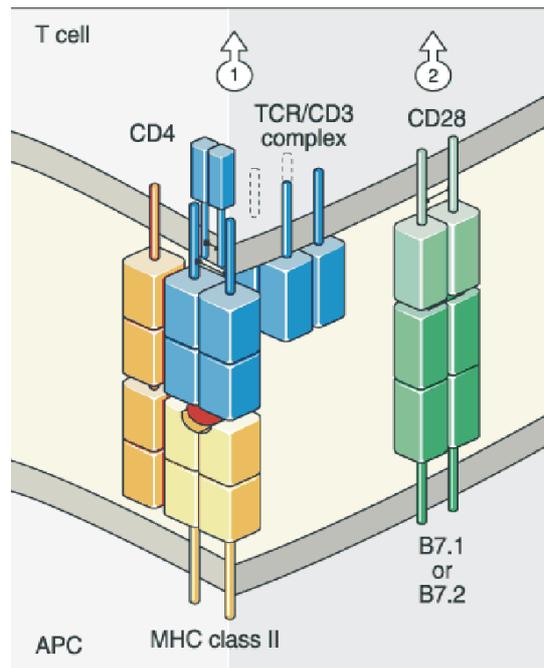


Abb. 1.2.2. T-Zellen Aktivierung durch Signal 1 und Signal 2.
(nach Janeway: Immunobiology, 5th edition)

Eine weitere Herausforderung des Signal1/Signal2-Modells der T-Zellaktivierung stellt das "*Danger-Model*" dar (Matzinger, 1994 und Gallucci, 2001). Hier gehen die Autoren davon aus, dass unser Immunsystem erst nach der Erkennung von Gefahrensignalen aktiviert wird und nicht allein durch die Erkennung von körperfremden Antigenen. Der Tod von Zellen durch Nekrose oder Signale des unspezifischen Immunsystems (z.B. TLR) könnten zur notwendigen Aktivierung von Dendritischen Zellen führen, als Gefahrensignale fungieren und das spezifische Immunsystem aktivieren (Aderem, 2000).

1.3 T-Zellsignale

Der TcR besteht aus einem $\alpha\beta$ -antigenbindenden Heterodimer und einer als CD3 bezeichneten Signaltransduktionseinheit. Das CD3 Molekül besteht aus 3 Dimeren, einem $\epsilon\delta$ -, einem $\gamma\epsilon$ - und einem $\zeta\zeta$ -Dimer (Abb. 1.3.1). Das $\alpha\beta$ -Dimer ist im Gegensatz zum BcR monovalent. Die beiden Glykoproteine, die auch zur Superfamilie der Immunoglobuline gehören, werden durch eine Disulfidbrücke verbunden (Borst, 1996).

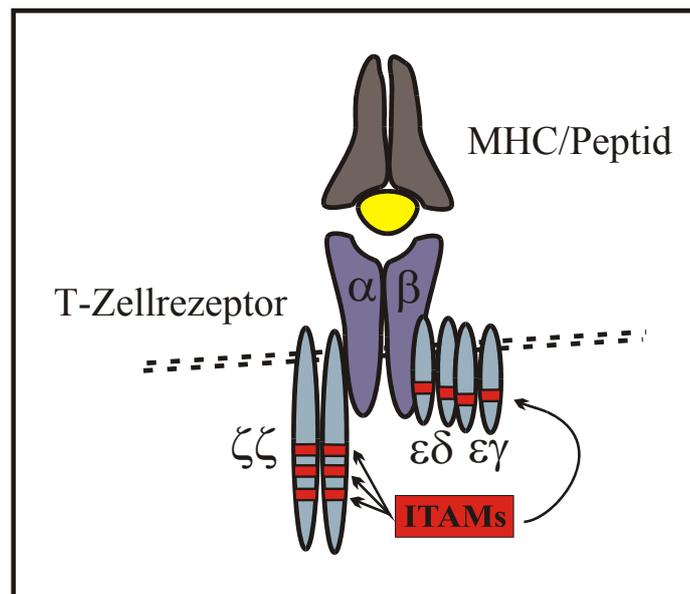


Abb. 1.3.1 Der T-Zellrezeptor Komplex (TcR)

Seine Variabilität erreicht der TcR durch Rekombination einer begrenzten Anzahl Gene, besonders im Peptidbindungsbereich des CDR3 Segments. Die Abwesenheit von somatischer Hypermutation verhindert das postselektive Auftreten von selbstreaktiven T-Zellen.

Die Stimulation des TcR's durch Liganden oder Antikörper resultiert in einer Aktivierung von mehreren Signalwegen. Ein wichtiger Mechanismus zur Signalübertragung durch Rezeptorstimulation ist das Gleichgewicht und die Erkennung von phosphorylierten oder dephosphorylierten Aminosäuren. Neben der Phosphorylierung von Tyrosin und Serin/Threonin können auch Histidine phosphoryliert werden (Hunter, 1995). Eine Tyrosinkinase phosphoryliert einen Tyrosinrest durch Anhängen einer Phosphatgruppe, an die sich dann eine SH2-Domäne (*src-homology 2 domain*) spezifisch binden kann. Die meisten Phosphatgruppen werden dann durch eine spezifische Phosphatase wieder entfernt. Eine SH3-Domäne bindet sich an eine prolinreiche Region (Buday, 1999).

Nach dem Zustandekommen eines T-Zellen-APC Kontaktes initiiert die Bindung von TcR und passendem MHC/Peptid-Komplex die T-Zellsignalkaskade. Nach Bildung des trimeren Komplexes aus TcR/MHC/Peptid wird die CD4/CD8-assoziierte src-Kinase Lck durch CD45 dephosphoryliert und damit aktiviert (Abb. 1.3.2). Lck und Fyn phosphorylieren als ITAMs (*immuno-receptor tyrosine based activation motifs*) bezeichneten Bereich der CD3-Ketten ζ , δ , γ und ϵ . Zap-70 bindet sich an die phosphorylierten Tyrosinreste der ITAMs durch seine SH2-Domäne und wird danach aktiviert (Visco, 2000). Zap-70 aktiviert nun die membran-assoziierten Adaptermoleküle LAT und SLP-76.

Die Aktivierung von LAT ist von zentraler Bedeutung für die T-Zellaktivierung und dient auch über andere Adaptermoleküle als zentraler Anker für Moleküle wie SLP-76, Vav, Nck, Gads, Grb2, Sos, Fyb und Itk (Peterson, 1997 und Zhang, 2001).

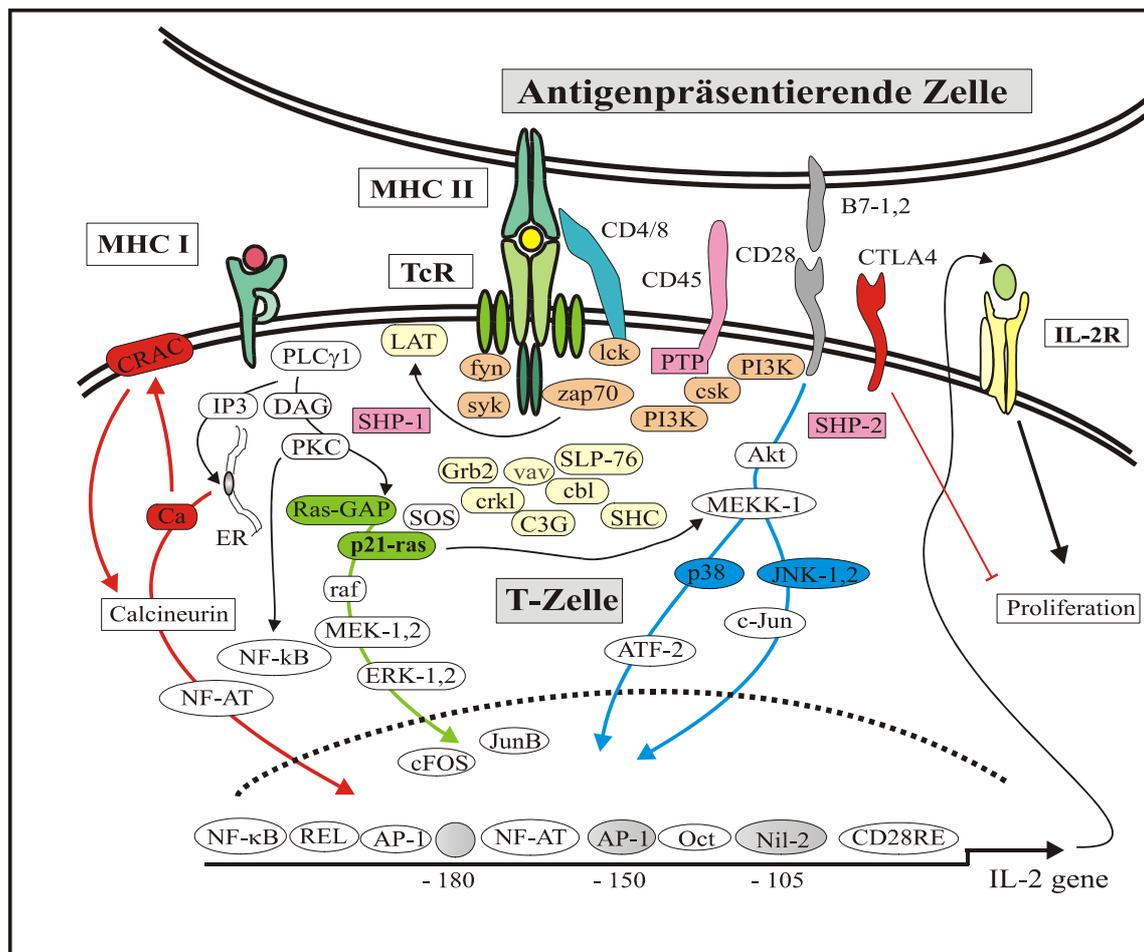


Abb. 1.3.2 Durch Antigene stimulierte T-Zellsignale.

LAT rekrutiert nach seiner Aktivierung die Phospholipase $\text{C}\gamma 1$ ($\text{PLC}\gamma 1$). $\text{PLC}\gamma 1$ spaltet

PtdIns(4,5)P₂ zu DAG und IP₃. DAG und IP₃ bezeichnet man auch als *second messenger*. DAG aktiviert nun RasGap und verschiedene Isoformen von PKC.

IP₃ mobilisiert Ca²⁺ aus dem ER, welches CRAC-Kanäle (*Ca²⁺ release activated Ca²⁺ channels*) öffnet und damit einen Ca²⁺-Influx einleitet. Der Ca²⁺-Influx aktiviert Calcineurin, welches NF-AT dephosphoriert und die Translokation des Transkriptionsfaktor NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*) auslöst. Ras wird durch die LAT assoziierten Moleküle Grb2 und Sos, sowie durch RasGRP und PKC aktiviert. Ras aktiviert Raf und die MAP-Kinasen (*mitogen activated protein*) MEK, Erk1/2, MEKK-1, JNK, und p38 (Marshall, 1995 und Lin, 2001). Diese MAP-Kinasen sind durch die Aktivierung von Jun und Fos an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP1 beteiligt. Ein weiterer, wichtiger Transkriptionsfaktor, der an der IL-2 Synthese beteiligt ist, ist NF-κB.

Die Aktivierung des Korezeptors CD28 durch B7 stimuliert PI3-K und Akt-Kinase, welche zusammen mit PKC den Transkriptionsfaktor NF-κB aktivieren. Weitere Proteine, die sich an den Promoterbereich des IL-2 Genes binden, sind neben AP1, NF-AT und NF-κB, die Transkriptionsfaktoren REL, Oct, Nil-2 und CD28RE. Andere Adaptermoleküle, deren spezifische Funktion bei der Übertragung von TcR-Signalen noch nicht geklärt ist, sind Vav, Cbl und TRIM (Schraven, 1999).

Wird nach der TcR-Stimulation IL-2 und IL-2Rα synthetisiert, kommt es nach IL-2R/IL-2-Bindung zur Zellzyklusprogression und zur Proliferation der T-Zelle. Andere durch den TcR stimulierte Signalwege führen zur Änderung des Zytoskeletts (durch Pak, Fyb, Vav und Rac), sowie zur Produktion von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen (Dustin, 2000).

T-Zellen sind die wichtigsten regulativen Zellen der zellulären Immunantwort. Die Regulation der T-Zellaktivität ist daher ein komplex reguliertes Netzwerk aus positiven und negativen Signalen. Trotz der Vielzahl der bekannten Signalmoleküle die bei der Signalübertragung des T-Zellrezeptors eine Rolle spielen, funktioniert dieser Prozess nicht wie ein Lichtschalter. Röntgenstrukturanalysen zeigen, dass der TcR mit oder ohne gebundenem Ligand dieselbe Konformation einnimmt. Somit ist eine Signalübertragung durch Aggregation von TcRs und eine nachfolgende Gruppierung (*receptor clustering in lipid rafts*) von intrazellulären Signalüberträgern eher wahrscheinlich (Germain, 1997).

Die wirkliche Affinität und die Halbwertszeit der TcR/Peptid/MHC-Bindung wird durch Korezeptoren, Kostimulatoren und Adhäsionsmoleküle, sowie durch die Bildung einer

„immunologischen Synapse“ deutlich erhöht (Monks, 1998, Grakoui, 1999 und Viola, 1999). Hierbei ist auch die Exklusion von sterisch sperrigen Molekülen (wie z.B. CD45) aus den *lipid rafts* wichtig (Shaw, 1997). Durch aufeinanderfolgende Stimulierungen von mehreren TcRs durch einen Peptid/MHC-Komplex für die benötigte Zeitspanne (1-60 sec), ist die Hemmschwelle von ungefähr 1500 nötigen TcR-Stimulationen pro T-Zelle leichter zu erreichen (Rothenberg, 1996, Viola, 1996, und Valitutti, 1997)

1.4 Bakterielle Enterotoxine

Bakterielle Enterotoxine (Superantigene) sind biologisch extrem aktive globuläre Proteine von 22-29 kDa und gehören zu den kräftigsten Stimulatoren von T-Zellen. Superantigene (oder Sag) sind proteaseresistent, relativ unempfindlich gegenüber Wärmedenaturierung und werden vom Epithelium als intakte Proteine absorbiert (White, 1989 und Kotzin, 1993).

Die am besten untersuchten Gruppen von bakteriellen und viralen Enterotoxinen sind die *staphylococcal enterotoxine* (SE) A bis I, *staphylococcal toxic shock syndrome toxin* (TSST-1), *streptococcal mitogenic exotoxins* (SME), *streptococcal superantigens* (SSA) und die *streptococcal pyrogenic exotoxins* (SPE A-C und F) (Papageorgiou, 2000). Andere Superantigene sind die *exfoliative toxins*, *mycoplasma arthritis mitogens*, *yersinia enterocolitica mitogens* und die viruskodierte Superantigene von *mouse mammary tumor virus*, Epstein Barr virus (EBV) und HIV (Fuleihan, 1994, Huber, 1996 und Krakauer, 1999).

Superantigene verursachen Lebensmittelvergiftungen, *scarlett fever*, *toxic shock syndrome* und werden häufig mit Autoimmunerkrankungen (z.B. Rheumatoide Arthritis oder EAE), sowie Allergien, Asthma, Psoriasis und auch HIV-Erkrankungen in Zusammenhang gebracht (Paliard, 1991, Schiffenbauer, 1993, Strange, 1994, Conrad, 1997, Sayama, 1998 und Hauk, 1999).

Im Gegensatz zu konventionellen Antigenen binden sich Superantigene unprozessiert außerhalb der Peptidbindungsdomäne am nichtpolymorphen Teil von MHC Klasse II Molekülen (Fraser, 2000) und gleichzeitig, V β -spezifisch, am T-Zellrezeptor (Abb. 1.4.1).

Trotz der Bindung des $CD4^+$ Moleküls an MHC Klasse II Moleküle reagieren nicht nur $CD4^+$, sondern auch $CD8^+$ T-Zellen mit Proliferation auf Inkubation mit Superantigenen (Herrmann, 1992). Dadurch können Sags bis zu 20% einer gegebenen T-Zellpopulation aktivieren, während klassische Antigene nur 0,01%-0,001% einer T-Zellpopulation aktivieren können (Li, 1999). T-Zellen reagieren auf Stimulation von Superantigenen mit Aktivierung, massiver Zytokinproduktion, und nachfolgend mit Anergie, Toleranz oder Apoptosis (Uchiyama, 1994).

Die Produktion verschiedener Zytokine oder das Eliminieren eines großen Teils der T-Zellpopulation könnte für die eindringenden, pathogen Bakterien von selektivem Vorteil sein.

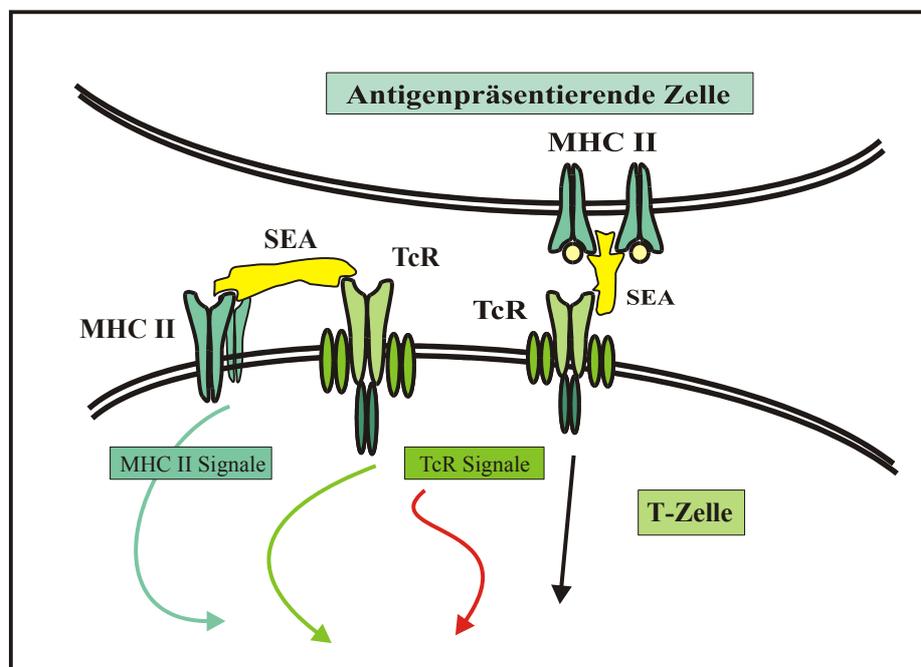


Abb. 1.4.1 Superantigen Bindung an MHC Klasse II und TcR.

Die am besten untersuchten Superantigene sind die *Staphylococcal Enterotoxine* (SE), die sich nach ihrer Struktur grob in zwei Gruppen einteilen lassen (Herman, 1991). Die eine Gruppe umfasst SEA, SED, SEE, SEH und SEI und die andere Gruppe SEB, SEC, SEG, SSA und SPE-A. Röntgenstrukturanalysen von SEA, SEB (Swaminathan, 1992 und Schad, 1995), sowie von SE/MHC II-Komplexen (Jardetzky, 1994) und SE/TcRV β (Malchiodi, 1995 und Fields, 1996) ergaben eine Bindung des N-terminalen Teils der Superantigene zu der α -Kette des MHC Klasse II Moleküls und eine weitere, Zn^{2+} abhängige Bindungsstelle im C-

terminalen Bereich der β -Kette von SEA (Seth, 1994).

Die Zn^{2+} -unabhängige Bindungsstelle der SEA Moleküle zur MHC II α -Kette hat eine Affinität (K_D) von 100 μM , die Zn^{2+} -abhängige Bindungsstelle zur MHC II β -Kette hat eine weitaus höhere Affinität (K_D) von 100 nM.

Beide Bindungsstellen zusammen ergeben eine höhere Affinität ($K_D \sim 13$ nM) von SEA zum MHC Klasse II Molekül als bei SEB und durch *crosslinking* von zwei MHC Klasse II Molekülen die Möglichkeit, MHC/Peptid/TcR-ähnliche, stimulatorische Signale zu initiieren (Khandehar, 1997 und Li, 1998). Superantigene mit nur einer MHC II Bindungsstelle müssen durch mögliche Interaktionen von TcR $V\alpha$ und MHC II $\beta 1$ versuchen, die Halbwertszeit des Sag/MHC/TcR Komplexes auf die notwendigen 1-60 sec zu bringen, und durch *serial triggering* eine T-Zellantwort auszulösen (Leder, 1998).

Verschiedene Superantigene binden sich an verschiedene $V\beta$ -Ketten der T-Zellrezeptoren. Das Superantigen TSST bindet sich ebenfalls an die TcR $V\alpha$ -Region. Auch eine Bindung von Superantigenen (SEA) an humane $\gamma\delta$ -T-Zellen wurde kürzlich nachgewiesen (Morita, 2001). Die Superantigen-TcR Bindung ist jedoch nicht völlig MHC/Peptid unabhängig, da Mutationen im MHC-Bindungsereich des Superantigens die TcR-Spezifität beeinflussen (Newton, 1996).

Neben den klassischen APC's, den Keratinozyten und einigen Epithelzellen (z.B. Synoviozyten) besitzen humane aktivierte T-Zellen auch MHC Klasse II Moleküle auf ihrer Oberfläche und haben die Möglichkeit als APC's zu fungieren. Aktivierte human T-Zellen können somit von Superantigenen nicht nur in *trans* (von Zelle zu Zelle), sondern auch in *cis* (MHC II und TcR auf einer Zelle) stimuliert werden (Abb 1.4.1) (Kanner, 1992).

1.5 Zytokinsignale

Zytokine umfassen eine breite Gruppe von kleinen löslichen Proteinen, die ihre regulativen Effekte im Immunsystem auf die produzierende Zelle direkt (autokrin) oder über längere Distanzen hinweg ausüben können. Der Begriff Zytokin umfasst unter anderem die Interleukine (oder Lymphokine), Interferone, Chemokine und die TNF-Familie. Zytokine haben verschiedene Effekte in Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptosis (Paul, 1994 und Hunter, 2000). Einzelne Zytokine können unterschiedliche Reaktionen in verschiedenen Geweben hervorrufen, einige Zytokine können aber auch stark überlappende

Funktionen aufweisen (*cytokine pleiotrophy and redundancy*).

Zytokine binden sich an spezifische Rezeptoren, wobei die einzelnen Ketten der Rezeptorkomplexe ebenfalls überlappen, d.h. in verschiedenen Zytokinrezeptoren auftreten können (siehe Abb. 5.4.1). Zytokinrezeptoren teilt man nach ihrer Struktur in mehrere Familien ein (Bazan, 1990 und Janeway, 1994). Zu unterscheiden sind die Familien der Rezeptoren für Wachstumsfaktoren mit Tyrosinkinaseaktivität im zytoplasmatischen Teil (z.B. PDGFR und EGFR), der Rezeptoren mit Serin/ Threoninkinaseaktivität im zytoplasmatischen Teil (z.B. BMPR und ActivinR) und die Superfamilie der Typ1-Zytokinrezeptoren (z.B. IL-2, G-CSF, GH und Prolaktin) ohne endogene, katalytische Aktivität. Die Superfamilie der Typ1-Zytokinrezeptoren wird weiterhin in die IL-6R Familie (benutzen gp130) (Bravo, 2000), die IL-2R/IL-4R Familie (diese Rezeptoren benutzen alle die γ -Kette, γ_c) und die IL-3R/IL-5R Familie (diese Rezeptoren benutzen alle die β -Kette, β_c) unterschieden (Taniguchi, 1995 und Ihle, 1995).

Ich werde im Folgenden die Signalwege der Zytokinrezeptoren an Hand des IL-2-Rezeptors erläutern. Interleukin 2 (IL-2) ist ein Glykoprotein von 15 kDa mit einer für seine biologische Funktion wichtigen Disulfidbrücke. IL-2 ist nicht nur ein Aktivierungs- bzw. Wachstumsfaktor für T-Zellen, sondern wirkt auch auf B-Zellen, NK-Zellen und LAK-Zellen (Lin, 1997). Cyclosporin A, ein Calcineurin (PP2A)-Inhibitor, der die IL-2-Synthese blockiert, hemmt eine durch T-Zellen vermittelte Abstoßungsreaktion bei Transplantationen und unterstreicht damit die zentrale Rolle von IL-2 für das Immunsystem (Emmel, 1989). IL-2^{-/-} Mäuse weisen überraschenderweise eine T-Zellüberproduktion auf. Das deutet auf einen Einfluss von IL-2 auch auf die negative Regulation der Immunantwort und der Apoptose hin (Kundig, 1993 und Johnston, 1996).

Der hochaffine IL-2 Rezeptor besteht aus drei Ketten, einer 55kDa α -Kette (CD25), einer 75kDa β -Kette (CD122) und einer 64kDa γ -Kette (γ_c , CD132). Der IL-2 Rezeptor weist starke Homologien zum IL-15R auf, genau wie IL-2 zu IL-15. Die α -Kette ($K_D \sim 10^{-8}$ M) wird nach TcR- und CD28-Stimulation verstärkt translatiert und verbindet sich mit dem konstitutiv produzierten β/γ_c -Dimer ($K_D \sim 10^{-9}$ M) zu dem hochaffinen IL-2R $\alpha\beta\gamma$ ($K_D \sim 10^{-11}$ M). Stimulation des IL-2R führt zur Aktivierung einer Vielzahl von Signalwegen (Abb. 1.5.1) (Leonard, 1985, und Liu, 1996).

Der wichtigste dieser Signalwege ist der Jak/Stat Signalweg. Die Bindung von IL-2 an den trimeren IL-2 Rezeptor bewirkt eine Transphosphorylierung der rezeptorassoziierten Jak-Kinasen. Die transaktivierten Jak-Kinasen phosphorylieren Tyrosinreste der P-Region der β -Kette (Y392 und Y510), an welche sich nun die latent zytoplasmatischen Stat-Proteine Stat3 und Stat5 via SH2-Domänen binden können (Ihle, 1995 und Hibi, 1998).

Die rezeptorgebundenen Stat-Proteine (*signal transducer and activator of transcription*) werden von aktiven Jak-Kinasen phosphoryliert, die Stat-Proteine dimerisieren und binden sich nach Translokation in den Zellkern (Nukleus) an GAS-Motive (*IFN γ -activated sequence*)(Pawson, 1995).

Die Jak-Kinasen wurden zuerst im Zusammenhang mit Interferonsignalen entdeckt und funktionell beschrieben (Silvennoinen, 1993 und Darnell, 1994). Der Jak/Stat-Signalweg stellt eine Möglichkeit dar, Zytokinsignale extrem schnell (in Minuten) und spezifisch von der Plasmamembran in den Nukleus zu transportieren. Andere Transkriptionsfaktoren und *second messenger* die durch den IL-2R aktiviert werden, sind PKC, PI3K, STAM, CREB, c-myc (via Syk), c-jun, c-fos und AP1 (via Lck, ras und MAP), sowie bcl-2 (via rho) (Gomez, 1998).

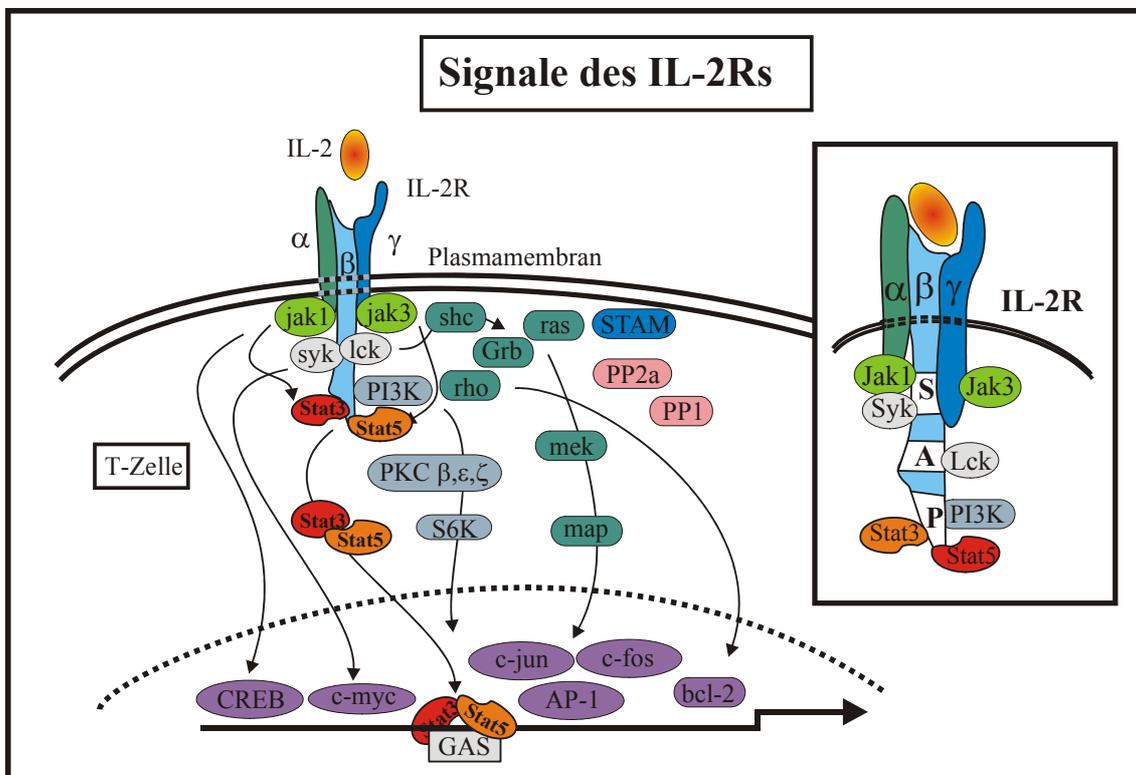


Abb. 1.5.1 Die Signalübertragung des IL-2-Rezeptors.

Die IL-2R α -Kette nimmt an der Signalübertragung nicht aktiv teil. Die β -Kette besitzt verschiedene, zytoplasmatische Bindungsregionen für spezifische Proteine. An die S-Region (*serin-rich domain*) binden sich Jak1 und Syk, an die A-Region (*acidic domain*) bindet Lck, während die P-Region (*prolinereiche Domäne*) der β -Kette als Bindungsstelle für PI3-K, sowie Stat3 und Stat5 dient (Miyazaki, 1995 und Taniguchi, 1995).

Der IL-2R besitzt keine eigenständige enzymatische Aktivität sondern ist mit Jak-Kinasen assoziiert. Diese Kinasen heißen Janus-Kinasen nach Janus, dem Gott mit zwei Gesichtern, da Jak-Kinasen zwei Kinase-Domänen besitzen. Es sind bis heute 4 humane Jak-Kinasen bekannt (Jak1-3 und Tyk2), deren Molekulargewicht zwischen 120 und 140 kDa liegt. Die Jak-Kinasen (Abb. 1.5.2.) besitzen 7 JH Domänen (*Jak homology*, JH1-7), eine C-terminale Kinase- (JH1), eine Pseudokinase Domäne (JH2), jedoch keine SH2- oder SH3-Domänen (Miyazaka, 1994 und Liu, 1999).

Die Domänen JH1-7 sind an der Bindung zum Zytokinrezeptor beteiligt. Die JH2 Domäne reguliert die Substratspezifität der Jak-Kinase. Diese Domäne bindet z.B. Stat5a und Stat5b (Schindler, 1995). Jak-Kinasen können neben den Typ 1 Zytokinrezeptoren auch von G-Protein -gekoppelten Rezeptoren oder Onkogenen wie v-abl aktiviert werden (Danial, 1995). Die einzelnen Jak-Kinasen können durch unterschiedliche Zytokinrezeptoren aktiviert werden, d.h., die Aktivierung von Jak-Kinasen allein überträgt keine Zytokinspezifität (IL-2R= Jak1, Jak3; IL-6R= Jak1, Jak2, Tyk2; IFN γ R= Jak1, Jak2, γ -Kette= Jak3).

Permanente Aktivierung von Jak-Kinasen ist mit Krankheiten wie z.B. Sezary Syndrom, CTCL (Cutaneous T cell Lymphoma) oder ATLL (Adult T cell leukemia) in Verbindung gebracht worden (Lacronique, 1997, Yu, 1997, und Ward, 2000).

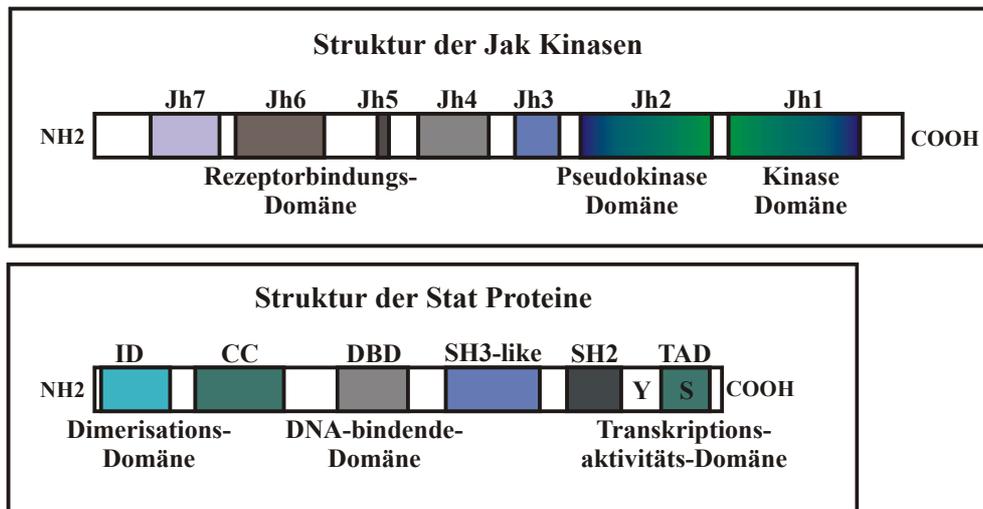


Abb. 1.5.2 Die Struktur von Jak-Kinasen und Stat-Proteinen.

Neben den Ketten der Zytokinrezeptoren, oder den Stat-Proteinen, fungieren auch die Adapterproteine Shc, Grb, Vav und STAM als Jak-Substrate (Yeh, 1999).

Es sind bis heute 7 humane Stat-Proteine bekannt (Stat1-5a,5b,6), die in mehreren Isoformen auftreten können und zwischen 730 und 850 Aminosäuren lang sind (Darnell, 1997, Leonard, 1998 und Ihle, 2001). Die verschiedenen Isoformen eines Stat-Proteins können unterschiedliche Transkriptionsaktivitäten haben (z.B. Stat3 α und Stat3 β) (Caldenhoven, 1996). Spezifische Phosphotyrosin-Bindungssequenzen in den einzelnen Rezeptorketten bestimmen, welche Stat-Proteine durch welche Zytokine aktiviert werden (Lin, 1995). Neben den Jak-Kinasen können auch v-src oder Rezeptortyrosinkinasen (z.B. EGFR) Stat-Proteine phosphorylieren (Fu, 1993 und Yu, 1995). Neueste Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch Rezeptoren der *seven-transmembran G-protein coupled receptor superfamily* (7TM) Stat-Proteine aktivieren können (Showkat, 2000).

Stat-Proteine sind in der Lage, sich direkt mit Jak-Kinasen zu assoziieren und müssen sich nicht unbedingt erst an Zytokinrezeptoren binden (Fujitani, 1997). Unabhängig von der Tyrosin-phosphorylierung werden Stat-Proteine durch TcR-, MAP-Kinasen oder PKC-Stimulation an Serinresten der TAD-Region (*transcription activation domain*) phosphoryliert. Die regulative Bedeutung der Serinphosphorylierung für die volle Transkriptionsaktivität der Stat-Proteine ist jedoch nicht völlig geklärt (Wen, 1995, Jain, 1998, Lim, 1999 und Decker, 2000).

Nach der Tyrosinphosphorylierung können Stat-Proteine, durch Interaktion zweier SH2-Domänen, homo- oder heterodimerisieren. Die Dimerisierung enthüllt dabei vermutlich kryptische NLSs (*nuclear localisation signals*), die aber noch nicht identifiziert wurden. Vorgeformte Stat-Dimere (ohne Phosphorylierung) sind im Zytosol gefunden worden, haben jedoch keine Transkriptionsaktivität. Stat-Dimere werden mit Hilfe von Ran und Importin in den Nukleus transportiert, wo sie sich mit der DNA-bindende Domäne (DBD) an Stat-Konsensussequenzen binden (Sekimoto, 1996 und Johnson, 1999).

Stat-Konsensussequenzen bestehen aus 9 Basenpaaren einer palindromischen Konsensussequenz 5'-TTN₅AA-3', wobei der *spacer* eine gewisse Statspezifität vermittelt. Ein Stat1/-Stat2/p48 Komplex bindet sich jedoch an ein ISRE (*interferon-stimulated response element*, AGTTTNCNTTCC) (Seidel, 1995). Die Bindung von Stat-Proteinen an die DNA wird neben der spezifischen Sequenz auch von anderen Transkriptionsfaktoren (Sp1, CBP), DNA-bindenden Proteinen (p48) reguliert. Auch die Möglichkeit einer Oligomerisierung von Stat-Dimeren durch Interaktion mehrerer IDs (*interaction domains*) spielt eine regulative Rolle (Bhattacharya, 1996). Die *coil/coil domain* (CC) der Stat-Proteine ist in der Lage, weitere Protein/Protein Wechselwirkungen zu vermitteln (Xu, 1996 und Becker, 1998).

Stat-Proteine sind zentrale Mediatoren des durch Zytokine induzierten Zellwachstums, deshalb verwundert es nicht, dass onkogenbedingte Zelltransformationen (via v-src oder v-abl) *in vitro* zu disregulierten, permanent aktiven Stat-Proteinen führen können. Auch bei Patienten mit *acute lymphoid leukemia* (ALL), *acute myeloid leukemia* (AML), *chronic myeloid leukemia* (CML) und *cutaneous T cell lymphomas* (CTCL) findet man permanent aktivierte Stat-Proteine (Gouilleux-Gruart, 1999, Bowman, 2000 und Ward, 2000).

Die negative Regulation des Jak/Stat-Signalweges wird hauptsächlich durch die Phosphatase SHP1, Ubiquitinylierung der Stat-Proteine, Induktion von *protein inhibitors of activated Stat* (PIAS), sowie den SOCS-Proteinen (suppressors of cytokine signalling) gesteuert. SOCS-Proteine binden sich durch SH2-Domänen an die aktivierten Jak-Kinasen und funktionieren somit als negative *feedback* Regulatoren der Zytokinsignalübertragung (Kim, 1996, Aman, 1997, Haque, 1998, Liu 1998, Hilton, 1999 und Krebs, 2000).

1.6 Allergie

Unter Allergie versteht man die Immunreaktion gegen normalerweise harmlose Antigene. Diese Antigen werden auch Allergene genannt (Janeway, 2001). Ob allergieauslösende Antigene gemeinsame strukturelle Eigenschaften aufweisen, ist noch nicht völlig geklärt (Aalberse, 2000 und Furmonaviciene, 2001). Allergien fallen unter die Hypersensibilitätsreaktionen. Nach Coobs und Gell gibt es 4 verschiedene Hypersensitivitätsreaktionen. Als Allergie bezeichnet man die Typ 1 Reaktion oder *immediate-typ hypersensitivity*, die durch die Bindung von Allergenen an IgE auf Mastzellen ausgelöst wird. Zu diesen Reaktion gehören Asthma, Heuschnupfen oder auch der anaphylaktische Schock (Naclerio, 1997, Marone, 1998, und Platts-Mills, 1998).

Die durch IgE induzierte Mastzellaktivierung ist ein zentraler Punkt in allen allergischen Reaktionen (Williams, 2000). Die ausgelösten Symptome unterscheiden sich jedoch stark von Patient zu Patient. Die allergene Dosis spielt eine wichtige Rolle und ob das Allergen gegessen, inhaliert oder injiziert wurde.

Heuschnupfen, Asthma und Atopische Dermatitis sind alle durch IgE ausgelöste Krankheiten und man bezeichnet sie auch als atopische Erkrankungen. Die erbliche Veranlagung zu IgE-Reaktionen bezeichnet man daher als Atopie (Janeway, 2001).

Während einer Sensibilisierungsphase bildet der Patient IgE-Antikörper gegen ein prozessiertes Allergen. Das Allergen initiiert danach durch Komplexierung von IgE-Molekülen auf Mastzellen deren Aktivierung (Abb. 1.6.1). Die Mastzellaktivierung löst dann eine allergische Reaktion aus (Corry, 1999, und Bacharier, 2000). An den IgE-Rezeptor (FcεR1) gebundenes IgE auf Mastzellen und Basophilen bindet bei Wiederautretens des Allergen das native Protein (z.B. Birkenpollen oder Antigene von Staubmilben) und initiiert die Ausschüttung von Mediatoren der allergischen Reaktion wie Histamin, Leukotriene, Prostaglandine, Thromboxane und Bradykinin, aber auch Zytokine und Chemokine.

Einige Mediatoren (z.B Histamin) lösen eine unmittelbare Reaktion aus, andere initiieren längerfristige Reaktionen (z.B Leukotriene oder Zytokine) wie Eosinophilie oder chronische Entzündungszustände (Pearlman, 1999).

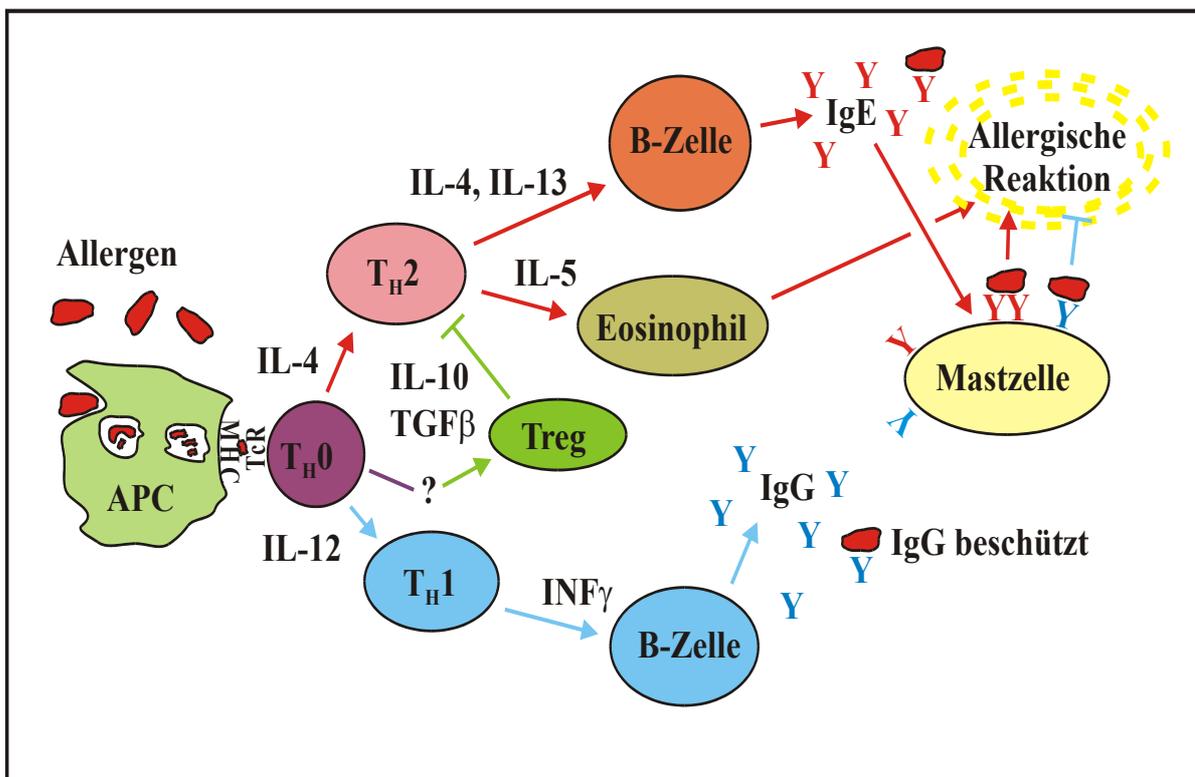


Abb. 1.6.1 Die allergische Reaktion.

T_H2-Zellen sind die zentralen Regulationszellen in allergischen Reaktionen (Romagnani, 1997). Die aktivierten T_H2-Zellen produzieren die Zytokine IL-4, IL5 und IL-13, welche B-Zellen zur Produktion von IgE anregen und Eosinophile aktivieren (Abb. 1.6.1) (Macdonald, 1998, de Vries 1999, Renauld, 2001).

Gegenwärtig werden bei auftretenden Allergien oder Asthma die einsetzenden Symptome noch in den meisten Fällen mit Medikamenten bekämpft, die zahlreiche Nebenwirkungen verursachen (Sampson, 1996). Eine Verhinderung der allergischen Reaktion durch eine spezifische Immuntherapie wäre dagegen vorteilhaft.

Eine spezifische Immuntherapie gegen Allergien geht davon aus, dass die Verschiebung des T_H1/T_H2 Gleichgewichtes durch eine verstärkte Produktion von allergenspezifischen IgG-Antikörpern, durch die Regulation von kostimulatorischen Signalen, sowie durch die Induktion von regulativen T-Zellen von grosser therapeutischer Bedeutung sein könnte (Rolland, 1998, Barnes, 2000, Haselden, 2000, und Winther, 2000).