

Die Rolle von Chemokinen in der Etablierung der immunologischen Synapse

J. Adam, M. Cramer, J. Fuchs, S. Weg-Remers, ITG

Steuerung zellulären Verhaltens durch Zell-Zell-Kommunikation

In allen vielzelligen Organismen ist die Steuerung zellulären Verhaltens von entscheidender Bedeutung. Zellen müssen sich durch extrazelluläre Botenstoffe oder durch direkten Informationsaustausch mit einer benachbarten Zelle darüber verständigen, welches Verhalten gerade notwendig ist. Wichtige Aspekte des Verhaltens von Zellen sind dabei Zellwanderung (Migration), Zellvermehrung (Proliferation) und die Übernahme von neuen Funktionen durch Zellen (Differenzierung). Diese Verhaltensweisen werden durch genetische Programme gesteuert, die in den Zellen an- oder ausgeschaltet werden. Darunter verstehen wir die vielfältigen molekularen Mechanismen, die dazu führen, dass eine Zelle die in ihrer Erbinformation festgelegte Information in Proteine umsetzt, die dazu dienen, bestimmte Funktionen auszuüben. Für das Ein- oder Ausschalten genetischer Programme sind – unter Vermittlung von Signalkaskaden – extrazelluläre Botenstoffe verantwortlich, die an Rezeptorproteine auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren binden. Damit die Zelle mit dem richtigen Programm auf den gleichzeitigen Einfluss verschiedener extrazellulärer Stimuli reagiert, muss sie synergistische und antagonistische Signale auf Ebene der Signalkaskaden integrieren. Die Mechanismen der intrazellulären Signalverarbeitung werden noch nicht vollständig verstanden. Um bei einer Fehlfunktion korrigierend in die zellulären Programme eingreifen

zu können, ist es jedoch wichtig, zu verstehen, wie sich einzelne Signale gegenseitig beeinflussen.

Die immunologische Synapse zwischen T-Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen – ein Modell zur Untersuchung des Informationsaustauschs zwischen Zellen

T-Lymphozyten haben eine Schlüsselrolle im Immunsystem, das es uns als komplexes Abwehrsystem ermöglicht, in einer Umgebung zu überleben, in der wir Erregern wie Bakterien, Pilzen oder Viren ausgesetzt sind, die zum Teil lebensgefährliche Infektionen hervorrufen können. Es verfügt über sich ergänzende Abwehrmechanismen. Durch die angeborene (naive) Immunität erfolgt eine unspezifische Erkennung und Bekämpfung eines Erregers, des sogenannten Antigens, innerhalb weniger Minuten. Diese „Sofortmaßnahmen“ werden hauptsächlich durch phagozytierende Zellen vermittelt und bieten keinen andauernden Schutz. Die Zellen der naiven Immunität regulieren jedoch auch die Zellen der erworbenen (adaptiven) Immunantwort, beispielsweise durch Sekretion von Zytokinen.

Die adaptive Immunität erlaubt unserem Körper das gezielte Erkennen und Bekämpfen eines spezifischen Antigens. Dabei können langlebige Gedächtniszellen gebildet werden, die bereits bekannte Antigene wieder erkennen und eine schnelle Reaktion ermöglichen. Die adaptive Immunantwort wird hauptsächlich von Lymphozyten vermittelt, die aus pluripo-

ten hämatopoetischen Stammzellen entstehen und nach dem Ort ihrer Reifung in zwei Klassen, B-Lymphozyten (Reifung im Knochenmark, engl. *bone marrow*) und T-Lymphozyten (Reifung im Thymus), unterteilt werden. B-Zellen vermitteln eine humorale (in Blut und Lymphe ablaufende) Immunantwort; nach Aktivierung reifen sie zu Plasmazellen und sezernieren spezifische Immunglobuline, die Pathogene beseitigen bzw. Toxine neutralisieren. Der erste Schritt einer Immunreaktion ist jedoch die Aktivierung von T-Zellen, die die zelluläre Immunantwort vermitteln. Ihre Aufgabe ist es, Antigene zu erkennen und zu bekämpfen, sowie andere Zellen des Immunsystems, wie B-Zellen, zu regulieren. Ihre zentrale Rolle bei der Regulation der Immunantwort macht sie zu einem besonders interessanten Modell für die Untersuchung der Mechanismen, die bei der Steuerung des Zellverhaltens wichtig sind.

Um die adaptive Immunität gegenüber einem bestimmten Antigen aufzubauen, muss die T-Zelle zunächst aktiviert werden. Hierfür ist immer eine Partner-Zelle erforderlich, die sogenannte Antigen-präsentierende Zelle. „Professionelle“ Antigen-präsentierende Zellen kommen in fast allen Geweben des Körpers vor. Sie sammeln dort kontinuierlich Antigene auf, verarbeiten sie und präsentieren sie im Komplex mit körpereigenen Proteinen aus dem Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) auf der Zelloberfläche. Zu Beginn einer entzündlichen Reaktion erfolgt die Reifung der Antigen-präsentierenden Zellen, die sich daraufhin auf

den Weg in die regionalen Lymphknoten machen. Hier begegnen sie den im Körper zirkulierenden T-Zellen. Trifft eine T-Zelle in den lymphatischen Geweben nicht auf ihr spezifisches Antigen, so zirkuliert sie weiter durch den Körper. Interagiert jedoch ein Proteinkomplex auf ihrer Oberfläche, der sogenannte T-Zell-Rezeptor, mit seinem spezifischen Antigen, gebunden an den MHC-Komplex auf der Oberfläche einer Antigen-präsentierenden Zelle, so beenden beide Partner die Migration und bilden einen stabilen, lang anhaltenden Kontakt aus. Dieser Kontakt zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle wird in Analogie zu neuronalen Synapsen auch als „immunologische Synapse“ bezeichnet. Die Verbindung muss über mehrere Stunden aufrechterhalten werden, um eine volle Aktivierung der T-Zelle zu ermöglichen.

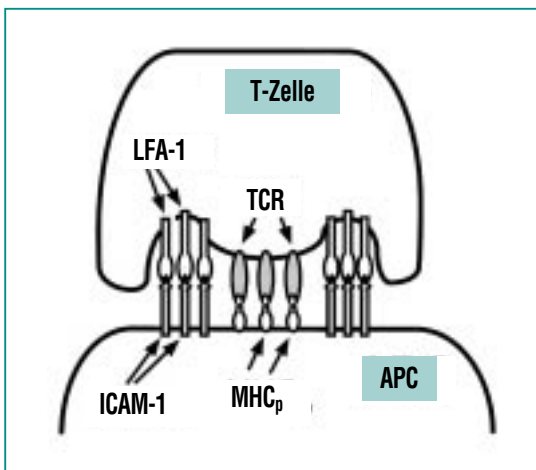


Abb. 1: Schematische Darstellung der immunologischen Synapse: Querschnitt durch T-Zelle und Antigen-präsentierende Zelle (APC) mit Darstellung der Verteilung der Rezeptoren und Liganden. Im Zentrum befinden sich MHC-Antigen-Komplexe, die mit dem T-Zell-Rezeptor-Komplex interagieren, in einem äußeren Ring finden sich LFA-1-Proteine, die an ICAM-1 binden.

Dabei tastet die T-Zelle die Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zelle ab, integriert die vielfältigen Signale von T-Zell-Rezeptor und ko-stimulatorischen Molekülen und organisiert die Signalübertragung. Die Aktivierung der T-Zelle durch die synaptische Verbindung mit der Antigen-präsentierenden Zelle führt zur Proliferation und Differenzierung der T-Zelle, wodurch sie Funktionseigenschaften erhält, die für das Bekämpfen eingedrungener Erreger erforderlich sind (sogenannte Effektor-T-Zellen) oder für den Aufbau einer bleibenden Immunität (Gedächtnis-T-Zellen).

Die Mechanismen des in der immunologischen Synapse stattfindenden Signalaustauschs werden bislang nur ansatzweise verstanden. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Etablierung bestimmter räumlicher Muster in der Anordnung der beteiligten Zellmembranrezeptoren, die in den vergangenen Jahren in einer Reihe bahnbrechender Studien unter Zuhilfenahme artifizierender Membranen aufgeklärt wurde [1]. Der Prototyp einer immunologischen Synapse besteht aus einem Muster konzentrischer Ringe von einigen Mikrometern im Durchmesser, bei dem im Zentrum die Interaktionen zwischen T-Zell-Rezeptor und MHC-Antigen-Komplex lokalisiert sind und in einem peripheren Ring die Interaktionen zwischen den Adhäsionsproteinen LFA-1 und ICAM-1 (siehe Abb. 1).

Durch Veränderung der räumlichen Anordnung der Membranproteine mittels nanotechnologischer Methoden konnte man zeigen, dass die Form der Anordnung wesentlich für die Steuerung der Signalübertragung ins Zellinnere ist und

damit für die korrekte Initiation der T-Zell-Proliferation und Differenzierung [2, 3].

Die Rolle von Chemokinen bei der Etablierung der immunologischen Synapse

Neben dem direkten Kontakt zwischen Zellmembranproteinen auf der Oberfläche des T-Lymphozyten und der Antigen-präsentierenden Zelle spielen auch kleine, diffusionsfähige Botenstoffe eine Rolle wie etwa Chemokine. Das sind kleine Proteine, die von vielen Zelltypen gebildet und sezerniert werden und deren primäre Funktion es ist, Zellen an bestimmte Orte des Körpers zu dirigieren. Für die stabile Induktion der oben beschriebenen Signalereignisse ist der andauernde Kontakt zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle notwendig. Es ist noch nicht genau bekannt, welche Faktoren diesen andauernden Kontakt regulieren, jedoch deuten aktuelle Studien auf eine Beteiligung von Chemokinen hin [4]. Diese binden spezifische Rezeptorproteine auf der Zelloberfläche, die alle zur Familie der heptahelikalen Membranrezeptoren zählen (siehe Abb. 2). Die Rezeptoren haben eine dreidimensionale Struktur, bei der Domänen des Proteins insgesamt siebenmal die Zellmembran passieren.

Über die Bindung von Signalproteinen an die drei intrazellulären Schleifen des Rezeptors, aber auch an den intrazytoplasmatischen Teil werden nach Bindung des Chemokins eine Reihe von Signalkaskaden induziert, deren Aktivität bewirkt, dass die Zelle in Richtung ei-

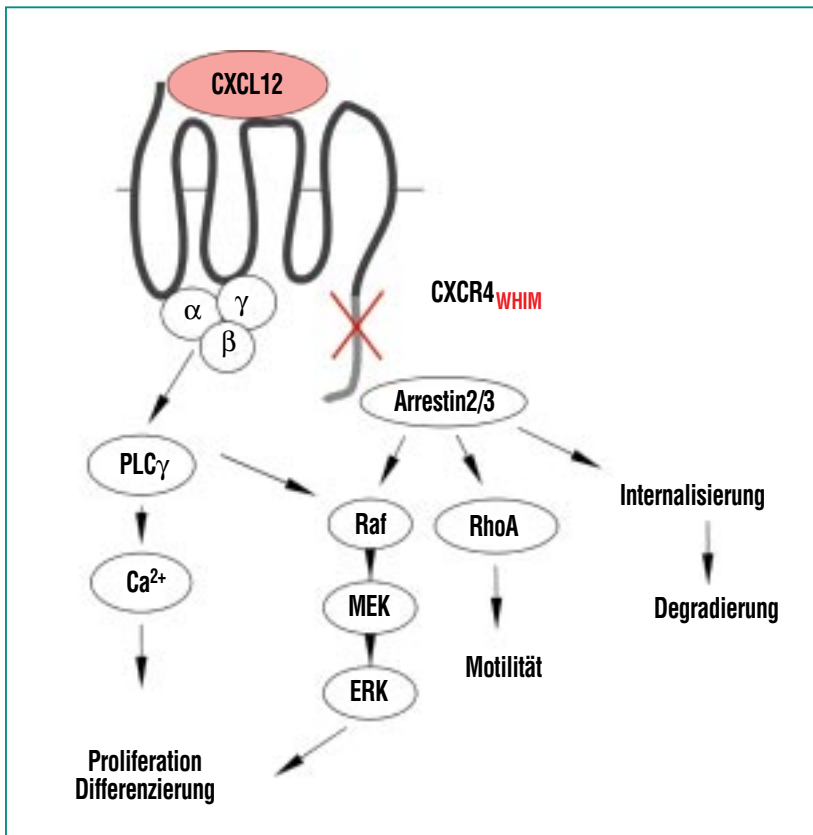


Abb. 2: Schematische Darstellung des heptahelikalen Rezeptors CXCR4 und der von ihm angesteuerten Signalwege: Über heterotrimerere G-Proteine (α , β , γ) wird der PLC γ -Signalweg angeschaltet, der gemeinsam mit dem Ras-Erk-Signalweg Proliferation und Differenzierung reguliert. Arrestine vermitteln die Aktivierung des Ras-Erk- und des RhoA-Signalwegs, der für die Motilität von Zellen mit verantwortlich ist. Darüber hinaus vermitteln sie die Begrenzung der Signalweiterleitung von CXCR4 durch Internalisierung, die zu der Degradierung des Rezeptors führt.

nes Chemokin-Gradienten wandert. Auf diese Weise dirigieren beispielsweise die Chemokine CCL19 und CCL21 über den Chemokin-Rezeptor CCR7 die Migration der T-Zellen zu den Antigen-präsentierenden Zellen in die Lymphknoten. Darüber hinaus wurden die Chemokine CXCL12 und CCL5 in den letzten Jahren als wichtige Regulatoren in der Feinabstimmung der Immunantwort identifiziert. So wurde gezeigt, dass

die korrespondierenden Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CXCR4 auf der T-Zelle zur immunologischen Synapse rekrutiert werden (siehe Abb. 3), dort mit dem T-Zell-Rezeptor assoziieren und nach Bindung der von der Antigen-präsentierenden Zelle sezernierten Chemokine CXCL12 und CCL5 auch aktiv am Signalaustausch teilnehmen [5, 6].

Infolgedessen wird über zwei Mechanismen die synaptische Ver-

bindung zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle verstärkt. Zum einen kommt es durch die Chemokin-Wirkung zu einer Verstärkung der Adhäsionskräfte des Integrin-Rezeptors LFA-1 auf der T-Zelloberfläche, der mit ICAM-1 auf der Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zelle interagiert. Zum anderen vermindert die Rekrutierung von CXCR4 und CCR5 an die Synapse die Sensitivität der nicht-synaptischen Anteile der T-Zell-Membran, so dass die Wahrscheinlichkeit sinkt, dass die T-Zelle durch Chemokin-Signale aus der Umgebung „abgelenkt“ wird und die Synapse verlässt. All dies verstärkt die Proliferation und erhöht die Produktion einer weiteren Familie von Botenstoffen, den Zytokinen, durch die T-Zelle, die ihrerseits zur Proliferation und weiteren Differenzierung der T-Zelle, sowie zur Aktivierung umgebender Immunzellen beitragen.

Das WHIM-Syndrom – ein Krankheitsmodell, das zum besseren Verständnis der Zell-Zell-Kommunikation an der immunologischen Synapse beiträgt

Das WHIM-Syndrom ist eine erbliche Krankheit des Menschen, die auf einer Mutation des Chemokinrezeptors CXCR4 beruht, die zu einem Verlust des regulatorischen intrazellulären Teils des Rezeptors führt [7]. Patienten leiden an einem relativ gut symptomatisch therapierbaren Immunschwäche-Syndrom, das durch wiederkehrende Infektionen der Atemwege, multiple Warzen der Haut nach Infekti-

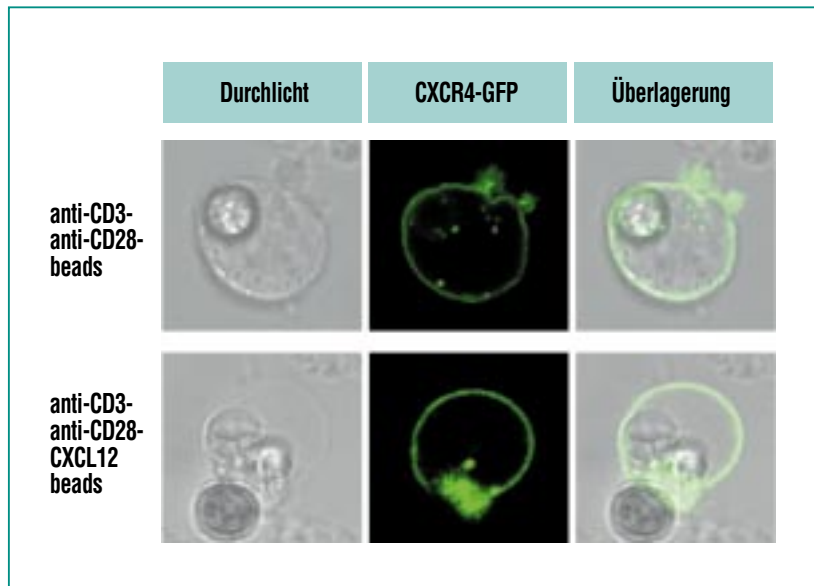


Abb. 3: Translokation des Rezeptors CXCR4 in den Bereich der immunologischen Synapse: Confokale Fluoreszenzbilder von T-Zellen, die ein Green-fluorescent-protein(GFP)-gekoppeltes CXCR4 tragen (obere Reihe). Wenn diese Zellen mit Latex-Kügelchen („beads“, 6 µm Durchmesser) inkubiert werden, an die neben stimulierenden Antikörpern (anti-CD3, anti-CD28) auch der Ligand von CXCR4, CXCL12, gebunden ist, so kommt es zur Simulation der Verhältnisse einer immunologischen Synapse, bei der GFP-CXCR4 in den Bereich der Kontaktfläche transloziert (untere Reihe).

on mit humanen Papillomaviren und erniedrigte Blut-Immunglobulin-Spiegel, sowie verminderte Zahlen weißer Blutkörperchen im Blut charakterisiert ist. Um diese Erkrankung besser zu verstehen, ist es daher von großem Interesse, die Funktionen des intrazellulären Teils des Rezeptors näher zu untersuchen (siehe zum folgenden Abb. 2).

Nach Bindung des Chemokins CXCL12 wird der regulatorische intrazytoplasmatische Teil des Rezeptors CXCR4 durch Phosphorylierung biochemisch modifiziert und bindet daraufhin Arrestine, eine Familie intrazellulärer Proteine [8]. Arrestine vermitteln die Internalisierung des Rezeptors, d. h.

die Aufnahme in das Zellinnere, wodurch eine Reihe von Signalkaskaden, die durch CXCL12 angeschaltet wurden, wieder in den Ruhezustand versetzt werden. Darüber hinaus wirken Arrestine als so genannte „Scaffold-Proteine“, d. h. sie rekrutieren andere Signalmoleküle an die Zellmembran und vermitteln auf diese Weise indirekt deren Aktivierung. Durch den Wegfall (WHIM-Mutation) des zytoplasmatischen Teils von CXCR4 und das Fehlen der Arrestin-Bindung ist daher für einige der von CXCL12/CXCR4 angeschalteten Signalwege durch Ausbleiben der Arrestin-abhängigen Internalisierung von CXCR4 eine verlängerte und ggf. verstärkte Aktivierung zu erwarten. Für die Arrestin-abhän-

gigen Signalwege ist jedoch mit einer fehlenden Aktivierung zu rechnen.

Beobachtungen, die wir in einem in unserem Labor etablierten Zellkulturmodell gemacht haben, bestätigen diese Hypothesen. Tatsächlich zeigen CXCR4^{WHIM}-exprimierende T-Lymphozyten eine defekte Internalisierung des Rezeptors nach Stimulation mit CXCL12. Infolgedessen ist die Signaltransduktion im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor dereguliert, was zu einer verstärkten und verlängerten Calciumantwort nach Behandlung mit CXCL12 führt. Auf der anderen Seite ist die Aktivierung Arrestin-abhängiger Signalmoleküle wie der kleinen GTPase RhoA oder der MAP-Kinase Erk in CXCR4^{WHIM}-exprimierenden T-Zellen im Vergleich zum Wildtyp reduziert.

Funktionelle Analysen ergaben, dass CXCR4^{WHIM}-exprimierende T-Zellen eine Reihe von Merkmalen zeigen, die auf eine Funktionsstörung während der Immunantwort hinweisen: Sie reagierten nicht auf das Stoppsignal durch T-Zell-Rezeptor- und Corezeptor-Stimulation, das entscheidend für die stabile Ausbildung der immunologischen Synapse ist. Durch die gestörte Informationsübertragung in einer nicht voll funktionsfähigen immunologischen Synapse, aber möglicherweise auch durch davon unabhängige Mechanismen werden nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation mehrere wichtige Signalwege nicht oder nur schwach aktiviert. Dies hat eine verminderte Produktion des Zytokins Interleukin-2 zur Folge, des Schlüsselproteins, das Proliferation und Differenzierung in den aktivierten T-Zellen weiter vorantreibt. Die de-

taillierte Analyse der gestörten Signalübertragung in CXCR4^{WHIM}-T-Zellen in vitro und in vivo ist Gegenstand unserer aktuellen Arbeiten. Es kann jedoch bereits zum gegenwärtigen Zeitpunkt angenommen werden, dass die Störung der Kommunikation zwischen T-Zelle

und Antigen-präsentierender Zelle in WHIM-Syndrom-Patienten der entscheidende Auslöser für die Immunschwäche ist, die in den Patienten beobachtet wird. Eine Analyse der Mechanismen wird nicht nur unser Wissen über die Biologie der Zell-Zell-Kommunikation er-

weitern, sondern auch möglicherweise zur Behandlung von Patienten mit WHIM-Syndrom oder anderen Formen der Immunschwäche beitragen.

Literatur

- [1] J.T. Groves, 2006, *Spatial mutation of the T cell immunological synapse*, *Curr Opin Chem Biol* 10:544–550
- [2] J. Doh, D.J. Irvine, 2006, *Immunological synapse arrays: Patterned protein surfaces that modulate immunological synapse structure formation in T cells*, *Proc Natl Acad Sci USA* 103:5700–5705
- [3] K.D. Mossman, G. Campi, J.T. Groves, M.L. Dustin, 2005, *Altered TCR signaling from geometrically repatterned immunological synapses*, *Science* 310
- [4] A. Viola, R.L. Contento, B. Molon, 2006, *T cells and their partners: the chemokine dating agency*, *Trends Immunol* 27:421–427
- [5] A. Kumar, T.D. Humphreys, K.N. Kremer, P.S. Bramati, L. Bradfield, C.E. Edgar, K.E. Hedin, 2006, *CXCR4 physically associates with the T cell receptor to signal in T cells*. *Immunity* 25: 213–224
- [6] B. Molon, G. Gri, M. Bettella, C. Gomez-Mouton, A. Lanzavecchia, A.C. Martinez, S. Manes, A. Viola, 2005, *T cell costimulation by chemokine receptors*, *Nat Immunol* 6:465–471
- [7] G.A. Diaz, 2005, *CXCR4 mutations in WHIM syndrome: a misguided immune system?* *Immunol Rev* 203:235–243
- [8] E.V. Gurevich, V.V. Gurevich, 2006, *Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways*, *Genome Biol* 7:236.