

T-Zellaktivierung bei Ataxia teleangiectatica

Ralf Schubert, Nicola Kopenhagen, Janine Reichenbach, Stefan Zielen

Zusammenfassung

Immunologische Untersuchungen von Patienten mit Ataxia teleangiectatica (AT) zeigen Defekte sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene. Typisch für den humoralen Immundefekt bei AT sind ein IgA-, und IgE-Mangel sowie ein IgG2-Subklassenmangel. Zellulär finden sich verminderte B-, und T-Zellzahlen. Die T-Zell-Lymphopenie beruht in erster Linie auf dem Schwund der naiven CD4/CD45RA-Zellen. Dies führt zu einer Dominanz aktivierter memory (CD45RO)-Lymphozyten im peripheren Blut der Patienten. Mit dem Verlust der T-Zellen weisen Patienten mit AT gleichzeitig eine Störung der Funktionalität ihrer Lymphozyten auf. In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die verminderte Proliferation bzw. Zytokinproduktion der AT-Lymphozyten in einem funktionellen Defekt der CD45RO-Zellen begründet liegt. Dabei konnten frühere Ergebnisse hinsichtlich der Lymphopenie und der beeinträchtigten Funktion der AT-Lymphozyten bestätigt werden. Die Untersuchungen gereinigter CD45RO-Zellen zeigten eine gestörte Antwort auf die T-Zellrezeptor vermittelte Aktivierung der AT-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen. Es ließen sich keine Störungen in der Proliferationsantwort und der INF- γ Produktion an memory-Lymphozyten nach direkter Stimulation der Proteinkinase C (PKC) mit Phorbol ester feststellen. Dies deutet auf einen Defekt proximal der PKC hin. Weiterführende Untersuchungen des T-Zellaktivierungsweges werden klären, ob der Defekt in einer fehlerhaften Konfiguration des T-Zellrezeptors oder einer Störung der Signaltransduktion zu suchen ist.

Schlüsselwörter

Immundefekt, CD45RO-Lymphozyten, Proliferation, INF- γ Produktion

Summary

T-cell activation in patients with Ataxia-telangiectasia

Immunological investigations of patients with Ataxia-telangiectasia (AT) show defects in the humoral as well as in the cellular part of the immune system. Typically, the humoral immunodeficiency is manifested in a decrease of IgA, IgE and the IgG2-Subclass. Declension of peripheral lymphocytes in T and B cell population is responsible for the cellular immunodeficiency in AT. The reduced level of circulating T lymphocytes is mainly due to the absence of CD4/CD45RA cells which results in a majority of memory T-cells in the peripheral blood of AT patients. This is supported further by a diminished functionality of AT lymphocytes. In our work we analysed whether reduced proliferation and impairment of cytokine (INF- γ) production is due to a defective function of the CD45RO population. Previous data of AT-lymphopenia and the diminished functionality of lymphocytes could be confirmed. Our studies of isolated CD45RO lymphocytes show a decreased immune response to the T-cell receptor dependent activation in AT-cells compared to controls. However, there was no difference in the proliferation rate and in cytokine production in AT-cells after direct stimulation of the protein kinase C (PKC) with Phorbol ester. This points to an activation defect in T-cell stimulation proximal of the PKC. Further investigations will clarify if the defect is due to a deficient configuration of the T-cell receptor or a defective signal transduction pathway.

Keywords

Immunodeficiency, CD45RO-lymphocytes, proliferation, INF- γ production

Einführung

Die autosomal rezessive Erkrankung Ataxia teleangiectatica (AT) zeichnet sich durch ein sehr pleomorphes Erscheinungsbild aus. Bezeichnend sind zerebelläre Ataxien, Teleangiectasien, Immundefekte sowie eine genomische Instabilität verbunden mit einer erhöhten Malignominzidenz und eine erhöhte Radiosensitivität (1, 2). Dem vielschichtigen Gesamtbild der Erkrankung folgend, ist auch die Immunologie durch ein breites Spektrum von Defekten charakterisiert. Diese Immundefekte finden sich sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Seite des Abwehrsystems und äußern sich in erster Linie durch rezidivierende sinopulmonale Infektionen. Verantwortlich dafür ist auf humoraler Seite ein kompletter IgA-Mangel (40–60%), häufig in Kombination mit einem IgG2-Subklassenmangel (80%) (3). Auch die IgE-Produktion ist vermindert oder fehlt völlig (80–90%). Die Immunantwort gegen Pneumokokken ist gestört (4). Der zelluläre Immundefekt ist gekennzeichnet durch eine Verminderung der T-Lymphozyten, und meist parallel hierzu auch einer Erniedrigung der B-Zellzahl. Das Fehlen der T-Zellen liegt vor allem in einer Lymphopenie auf der Ebene der CD4-Zellen begründet. Der Zellschwund betrifft hierbei die naiven (CD45RA) Zellen, so daß in der Peripherie der Patienten in großer Mehrzahl aktivierte memory (CD45RO)-Lymphozyten anzutreffen sind (5). Gleichzeitig mit dem Verlust der T-Zellen, weisen AT-Lymphozyten funktionelle Störungen im Bereich der Proliferation und der Produktion von Zytokinen auf (6, 7). Aufgrund dieser Befunde stellte sich die Frage inwieweit die verminderte Proliferation bzw. Zytokinproduktion der AT-Lymphozyten in einem funktionellen Defekt der CD45RO-Lymphozyten begründet liegt.

Methoden und Ergebnisse

Zu diesem Zweck untersuchten wir periphere Lymphozyten (PBL) von 10 Patienten mit AT, die regelmäßig in unserer Ambulanz betreut werden, im Vergleich zu PBL von gesunden Kontrollen. Die Charakterisierung der Lymphozytensubpopulationen mittels Durchflußzytometrie bestätigte den Zellschwund bei AT. Sowohl die T-, als auch die B-Zellzahlen der Patienten

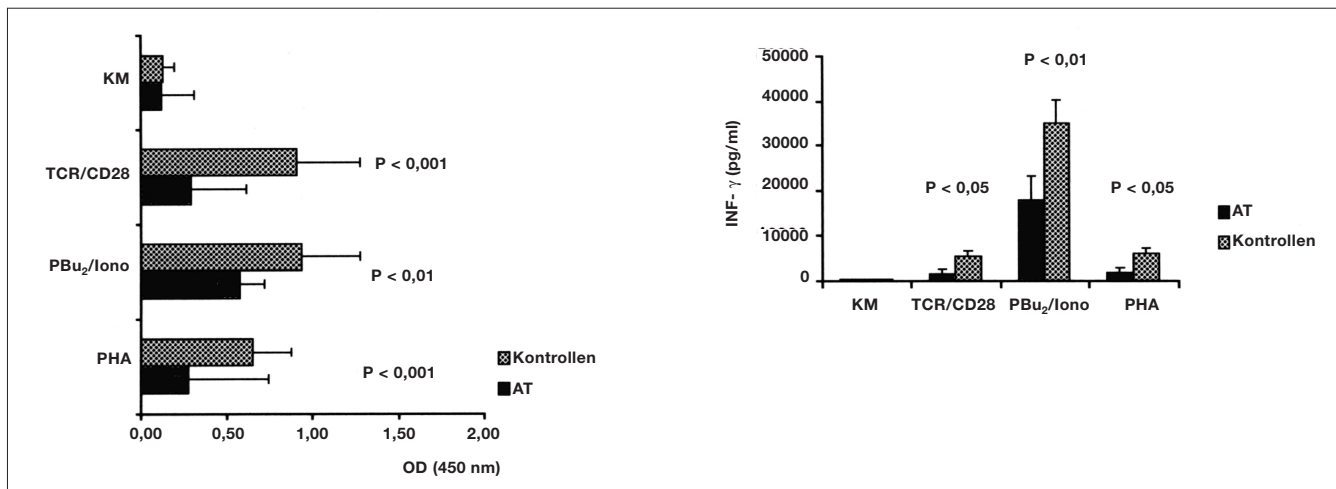


Abb 1

Aktivierungsuntersuchungen peripherer Lymphozyten von Patienten mit AT und Kontrollen

Die Zellen wurden mit Phorbol ester/Ionomycin, T-Zellrezeptor/CD28 und Phytohämagglutinin stimuliert, als Negativkontrolle diente Kulturmedium (KM). Die Aktivität der Lymphozyten wurde anhand des Einbaus von 5-Bromo-2-deoxyuridin (links) und der INF-γ Produktion mittels ELISA (rechts) bestimmt.

Tab 1

Lymphozytensubpopulationen bei AT

Absolute Anzahl der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut von Patienten mit AT und Kontrollen

	Kontrollen (n = 10)	(Zellen/ml)	Patienten (n = 10)	(Zellen/ml)	
CD3	2345	(1414-3333)	883*	(837-1836)	P < 0,005
CD4	1326	(413-2053)	453*	(178-973)	P < 0,005
CD8	1073	(528-2326)	682	(451-1713)	n.s.
CD19	216	(60-797)	50*	(12-614)	P < 0,05
CD4/CD45RA	665	(265-1556)	107	(14-434)	P < 0,001
CD45RA	2269	(995-5109)	901	(435-1475)	P < 0,005
CD4/CD45RO	414	(147-1123)	398	(78-744)	n.s.
CD45RO	855	(270-1704)	778	(418-1236)	n.s.

waren erniedrigt. Hiervon betroffen war auf T-Zellseite vor allem die CD4/CD45RA Zellpopulation, während die CD4/CD45RO-Zellen im Normbereich lagen. Die CD8-Zellzahl war ebenfalls vermindert (Tab 1).

Die funktionelle Analyse der Lymphozyten erfolgte mittels der Proliferationsantwort und Zytokinsynthese (INF-γ-Produktion) auf verschiedene Stimuli. Die Proliferation wurde anhand des Einbaus von 5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU-Test, Boehringer, Mannheim), die INF-γ Produktion mittels ELISA (INF-γ Test, Genzyme) bestimmt. Dazu wurden periphere Lymphozyten aus Heparinblut isoliert und anschließend mit verschiedenen Stimuli aktiviert. Zur Stimulation der Zellen wurden Phorbol ester (PBu₂ 1 ng/ml)/Ionomycin (Ionomycin 0,5 µg/ml), TCR mAK (625 ng mAK gekoppelt an 1,25x 10⁷ Dynalbeads M450)/CD28 mAK (5 µg/ml) und Phytohämagglutinin (PHA 1 µg/ml) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente Kulturmedium (KM).

Die in Abbildung 1 dargestellten Proliferations-, und INF-γ Produktionsresultate belegen die defekte Funktio-

nalität der AT-Zellen. Die Antworten der peripheren AT-Lymphozyten sind im Vergleich zur Kontrollgruppe, auf alle drei Stimulanzien, sowohl im Proliferationsstest, als auch bei der INF-γ Produktion deutlich geringer.

Um gezielte Aussagen über die Funktionalität der CD45RO-Zellen treffen zu können, separierten wir im nächsten Schritt mittels Negativselektion der CD45RA Zellen (Dynal-Beads) memory Zellen von AT-Patienten und von gesunden Kontrollen. Der Reinheitsgrad der so erhaltenen Lymphozyten betrug ca. 90% isolierte CD45RO positive Zellen. Die Zellen wurden in Kultur gesetzt und die Proliferationsantwort und Produktion von INF-γ nach Stimulation mit PBu₂/Ionomycin, TCR/CD28, PHA und KM gemessen.

Der BrdU-Test zeigte eine signifikant erniedrigte Proliferationsrate der AT-CD45RO-Zellen nach Stimulation über den T-Zellrezeptor im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die Antwort auf PBu₂/Ionomycin und PHA fiel hingegen adäquat aus. Die Messung des gebildeten INF-γ spiegelte die Resultate der Pro-

liferationstests wieder. Auch hier waren nach Stimulation mit PBu₂/Ionomycin und PHA keine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen zu beobachten, allerdings war die Zytokinproduktion via TCR/CD28 deutlich herabgesetzt (Abb 2).

Diskussion

In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen zeigen unsere Ergebnisse bei Patienten mit AT eine Lymphopenie vor allem im Bereich der CD4/CD45RA-Lymphozytenpopulation (6, 7). Gleichzeitig besteht eine erhebliche Störung der T-Zellfunktion.

Um auszuschließen, daß diese quantitative und qualitative Störung der Lymphozyten auf eine Erniedrigung der CD4-Zellen bzw. eine Erhöhung der NK-Population (mögliche inhibitorische Effekte) zurückzuführen ist, wurden die Experimente an gereinigten CD45RO Zellen wiederholt. Diese weitergehenden Untersuchungen der Proliferationsantwort bzw. der INF-γ Produktion an CD45RO-memory-Zellen zeigte, daß keine Aktivierungsstörung nach direkter Stimulation der

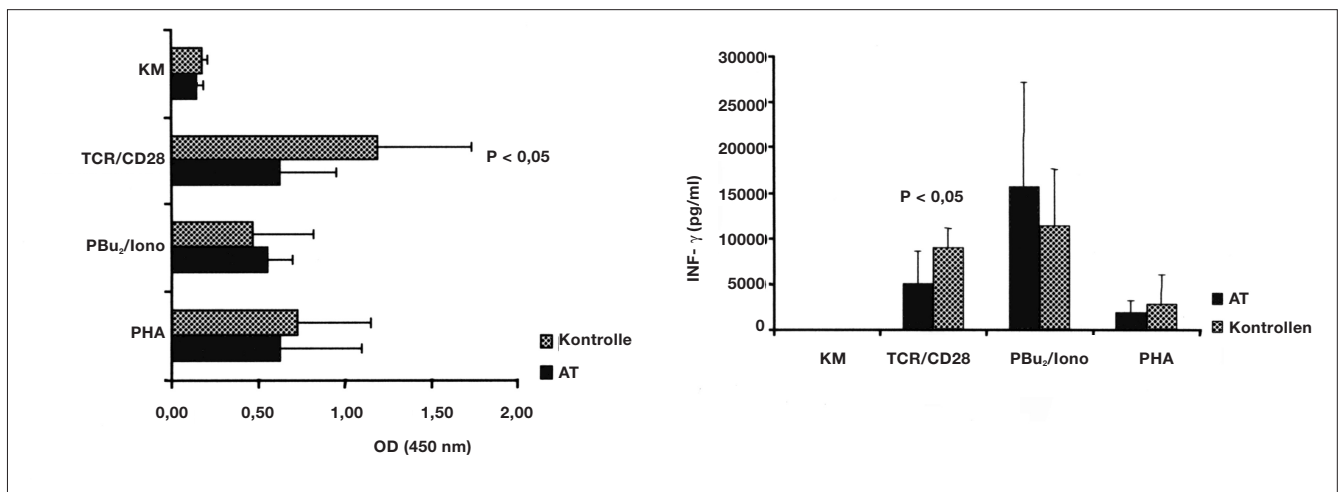


Abb 2

Aktivierungsuntersuchungen separierter CD45RO-Lymphozyten von Patienten mit AT und Kontrollen

Die Zellen wurden mit Phorbol ester/Ionomycin, T-Zellrezeptor/CD28 und Phytohämagglutinin stimuliert, als Negativkontrolle diente Kulturmedium. Die Aktivität der Lymphozyten wurde anhand des Einbaus von 5-Bromo-2-deoxyuridin (links) und der INF-γ Produktion mittels ELISA (rechts) bestimmt.

Proteinkinase C (PKC) mit Phorbol ester vorliegt. Die gestörte Antwort auf die T-Zellrezeptor vermittelte Aktivierung deutet auf einen Defekt proximal der PKC hin. In diesem Zusammenhang könnte die Ursache des Aktivierungsdefektes in der erhöhten Chromosomenbrüchigkeit vor allem in den Regionen der Gene für den T-Zell Rezeptor durch defektes Rearrangement des Rezeptors liegen (8). Eine vermehrte Anzahl δ/γ-Zellen im Verhältnis zu α/β-Rezeptor tragenden T-Zellen als mögliche Ursache der Störung war bei unseren Patienten nicht nachweisbar (Ergebnisse nicht dargestellt). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von (9).

Neben seiner Position im Zellzyklus und der damit verbundenen Kontrolle des Genrearrangements wird dem ATM (ataxia-telangiectasia-mutated)-Genprodukt auch eine Funktion bei der Signaltransduktion zwischen Zellkern und Zytoplasma zugeschrieben (2). Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen dem defekten T-Zellaktivierungsweg und der Rolle des ATM-Proteins bei der Signaltransduktion.

Weitere Untersuchungen des T-Zellaktivierungsweges mit Schwerpunkt auf der Rezeptorkonfiguration werden helfen, die fehlerhafte Aktivierung über die T-Zellrezeptor gerichtete Stimulation bei AT-Zellen zu erklären.

Literatur

- Gatti RA., Boder E, Vinters HV, Sparkes RS, Norman A, and Lange K (1991) Ataxia-telangiectasia: an interdisciplinary approach to pathogenesis. *Medicine* 70:99-117.
- Lavin F, Shiloh Y (1996) Ataxia-telangiectasia: a multifaceted genetic disorder associated with defective signal transduction. *Curr Opin Immunol* 8:459-464.
- Oxelius VA, Berkel A, Hanson LA (1982) IgG2 deficiency in ataxia telangiectasia. *N Engl J Med* 306: 515-517.
- Zielen S, Sehrt P, Schlößer R, Ahrens P (1995) Pneumokokken-Impfung bei chronisch Erkrankten. *TW Pädiatrie* 8:27-29.
- Paganelli R, Scala E, Scarselli E, Ortolani C, Cossarizza A, Carmini D, Aiuti F, Fiorilli M (1992) Selective deficiency of CD4+/CD45+ lymphocytes in patients with ataxia telangiectasia. *J Clin Immunol* 12: 84-91.
- Paganelli R, Cabobianchi M R, Ensoli B, D'Ofizi G P, Facchini FD, Aiuti F (1988) Evidence that defective gamma interferon production in patients with primary immunodeficiencies is due to intrinsic incompetence of lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 72:124-129.
- Waldmann TA, Broder S, Goldmann CK, Frost K, Korsmeyer SJ, Medici MA (1983) Disorders of B cells and helper T cells in the pathogenesis of the immunoglobulin deficiency of patients with ataxia telangiectasia. *J Clin Invest* 71:282-295.
- Taylor AM, Metcalf JA, Thick J, Mak YF (1996) Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood* 87:423-38.
- Carbonari M, Cherdi M, Paganelli R, Giannini G, Galli E, Gaetano E, Papetti C, Fiorilli M (1990) Relative increase of T-cells expressing the gamma/delta rather the alpha/beta receptor in ataxia telangiectasia. *N Engl J Med* 322:73-76.