

# Zusammenfassung

Dipl.-Biol. Posevitz Vilmos

## The transmembrane adaptor protein SIT regulates T-cell development and homeostasis

In meiner PhD-Arbeit habe ich die *in vivo* Funktion von SIT (SHP-2 interacting transmembrane adaptor protein) untersucht. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass SIT ein negativer Regulator der T-Zell-Rezeptor (TCR) vermittelten Signalwege in Jurkat T-Zellen ist. SIT ist hauptsächlich in lymphatischen Organen exprimiert, wie z.B. Thymus, Lymphknoten oder Milz. Die stärkste Expression von SIT lässt sich im Thymus und in peripheren T-Zellen nachweisen. SIT defiziente Mäuse zeigen eine veränderte T-Zell - aber eine normale B-Zellentwicklung. Thymi von SIT defizienten Mäusen sind größer als von vergleichbaren Kontrollmäusen. Die Anzahl der doppelt positiven (DP CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>) Thymozyten ist erhöht, wohingegen reife CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermindert sind. Thymozyten von SIT<sup>-/-</sup> Mäusen exprimieren mehr Aktivierungsmarker auf ihrer Zelloberfläche, wie z.B. CD5 und CD69. Es ist bekannt, dass die Höhe der CD5 Expression direkt proportional zur Stärke des TCR vermittelten Signals ist. Auf der Grundlage dieser Beobachtung, nehme ich an, dass SIT defiziente Thymozyten einen aktivierten Phänotyp besitzen und eine reduzierte Schwelle für die Zellaktivierung haben. Demnach ist SIT auch ein negativer Regulator der T-Zellaktivierung *in vivo*. Zur weiteren Aufklärung der Funktion von SIT in der T-Zellentwicklung, habe ich mehrere SIT defiziente Mauslinien untersucht, welche unterschiedliche transgene TCRs tragen. Diese transgenen TCRs können nur MHC-Klasse I Moleküle erkennen und haben eine unterschiedliche Affinität zu diesen. Ich benutzte die HY, P14 und OT-I transgenen Mausmodelle, welche eine schwache, mittlere und starke Affinität zu den MHC-Klasse I Molekülen haben. In dem HY<sup>+</sup> TCR Mausmodell, ist die Entwicklung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen sehr stark verändert. Thymozyten von SIT<sup>-/-</sup> HY<sup>+</sup> haben einen aktivierten Phänotyp und besitzen mehr CD5 auf ihrer Zelloberfläche und zeigen eine stärkere Aktivierung der intrazellulären MAP-Kinase ERK. Es ist bekannt, dass ein starkes Signal, welches vom TCR der Thymozyten ausgeht, zur negativen Selektion führt, was eine Reduzierung der DP Zellen zur Folge hat. Ich fand heraus, dass die Anzahl der DP Thymozyten sehr stark reduziert war in SIT<sup>-/-</sup> HY<sup>+</sup> Mäusen. Diese Entdeckung deutet an, dass die positive Selektion in SIT<sup>-/-</sup> HY<sup>+</sup> transgenen Mäusen teilweise zur negativen Selektion konvertiert ist. Die Untersuchung der Thymi von SIT<sup>-/-</sup> P14<sup>+</sup> transgenen Mäusen erbrachte ähnliche Ergebnisse (nämlich eine Konversion der positiven Selektion zur negativen Selektion). Überraschenderweise ist die T-Zellentwicklung in SIT<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> transgenen Mäusen nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse zeigen, dass SIT einen Einfluss auf die Entwicklung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen hat, welche einen TCR exprimieren, der seinen Liganden mit sehr schwacher oder moderater Affinität bindet (HY und P14), wohingegen SIT keinen Einfluss auf die Entwicklung der T-Zellen hat, die einen TCR mit starker Affinität tragen (OT-I). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass SIT einen negativen regulatorischen Einfluss auf die T-Zellentwicklung hat.

Wenig ist bisher bekannt über die Funktion von SIT in peripheren, reifen T-Zellen. Um einen Einblick in die Funktion von SIT in peripheren T-Zellen zu bekommen, habe ich periphere T Zellen von SIT<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht. Ich entdeckte, dass SIT<sup>-/-</sup> Mäuse kleinere Lymphknoten haben als Kontrollmäuse. Eine genaue Analyse der Lymphknotenzellen mit der Durchflusszytometrie ergab eine starke Reduktion von CD8<sup>+</sup> CD44<sup>lo</sup> T-Zellen in den Lymphknoten, wohingegen die CD4<sup>+</sup> T-Zellen weniger beeinflusst waren. Um die Ursache für die Reduktion der CD8<sup>+</sup> CD44<sup>lo</sup> T-Zellen zu finden untersuchte ich, ob die T-Zellen von SIT<sup>-/-</sup> Mäusen einen Überlebensdefekt aufwiesen. Ich kultivierte Lymphknoten T-Zellen von SIT<sup>-/-</sup> und Kontrollmäusen *in vitro* und analysierte die Zellen mit der Durchflusszytometrie. Ich konnte keinen Unterschied in der Überlebensfähigkeit der T-Zellen finden. Des Weiteren exprimieren SIT<sup>-/-</sup> T-Zellen genauso viel BCL-2, ein anti-apoptotisches Protein, wie die Kontrollmäuse. Auch die Messung von Annexin-V auf *ex vivo* Lymphknoten T-Zellen erbrachte keinen Unterschied. Der Verlust von naiven CD8<sup>+</sup> CD44<sup>lo</sup> Zellen in SIT<sup>-/-</sup> Mäusen beruht demnach nicht auf einen Überlebensdefekt oder erhöhte Apoptoserate. Bemerkenswerterweise produzieren SIT<sup>-/-</sup> Mäuse weniger SP Thymozyten und haben eine reduzierte Proportion von „recent thymic emigrants“ in der Peripherie. Diese Beobachtung könnte erklären warum in jungen SIT<sup>-/-</sup> Mäusen naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen fehlen. In älteren Mäusen schwindet der Beitrag des Thymus zur Aufrechterhaltung des peripheren T-Zellpool. Da die Anzahl der naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch in älteren SIT<sup>-/-</sup> Mäusen reduziert ist könnte dies auf einen Defekt in der T-Zellhomöostase hindeuten. Während der extensiven Charakterisierung der Lymphknoten fand ich zusätzlich heraus, dass SIT<sup>-/-</sup> Mäuse eine Akkumulation von CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> Zellen aufweisen. Eine detaillierte Analyse der CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> Zellen ergab, dass diese Zellen einen bimodalen Phänotyp besitzen, welcher sowohl naiven, als auch Gedächtnis-T-Zellen ähnelt. Sie sind CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>hi</sup> und CD122<sup>hi</sup>. Interessanterweise haben T-Zellen, welche sich der homöostatischen Proliferation unterziehen einen ähnlichen Phänotyp. Demnach ähneln diese CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>hi</sup> CD122<sup>hi</sup> T-Zellen in SIT<sup>-/-</sup> Mäusen solchen T-Zellen, die eine homöostatische Proliferation durchleben. Deswegen testete ich die Fähigkeit der homöostatischen Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in SIT<sup>-/-</sup> Mäusen. Dafür injizierte ich CFSE beladene Lymphknotenzellen von TCR transgenen Mäusen mit schwacher (HY), mittlerer (P14) und starker (OT-1) Affinität in lymphopenische Wirte. Ich fand heraus, dass SIT<sup>-/-</sup> HY<sup>+</sup> T-Zellen in der Lage sind in lymphopenischen Wirten zu proliferieren. Dies war ein überraschendes Ergebnis, weil in der Literatur berichtet ist, dass normale, HY<sup>+</sup> Wildtyp T-Zellen keine lymphopenisch induzierte Proliferation vollführen. Die Untersuchung von P14<sup>+</sup> transgenen T-Zellen ergab, dass SIT<sup>-/-</sup> T-Zellen stärker proliferierten als Kontroll-T-Zellen, wohingegen OT-1 transgene T-Zellen von SIT<sup>-/-</sup> Mäusen gleich stark proliferierten wie T-Zellen von Kontrollmäusen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass SIT ein negativer Regulator der T-Zellhomöostase ist. SIT übt dabei einen starken Effekt in T-Zellen aus, die einen TCR mit schwacher oder moderater Affinität tragen (HY und P14) wohingegen SIT keinen Einfluss auf T-Zellen hat, die einen TCR mit hoher Affinität besitzen. Ein TCR mit schwacher Affinität übersendet T-Zellen normalerweise ein Überlebenssignal wohingegen er in SIT<sup>-/-</sup> Mäusen ein Signal induziert,

welches diese Zellen zur Proliferation anregt. Dieser Prozess führt dann letztendlich zu dem Verlust der CD8<sup>+</sup> naiven T-Zellen und zur Akkumulation von Gedächtniszellen ähnlichen T-Zellen. Obwohl SIT defiziente Thymozyten und periphere T-Zellen eine verringerte Schwelle zur T-Zellaktivierung haben, ist es erstaunlich das SIT defiziente Mäuse keine Anzeichen für eine gestörte Immunfunktion aufweisen. Dies könnte auf einen kompensatorischen Mechanismus hindeuten, welcher verhindert, dass SIT<sup>-/-</sup> T-Zellen vollkommen aktiviert werden.

Tatsächlich finden sich in SIT<sup>-/-</sup> T-Zellen solche Mechanismen, wie z.B. die Hochregulierung von CD5 und eine Runterregulierung des Co-Rezeptors CD8. Zusätzlich sind die proximalen Signaltransduktionskomponenten in SIT defizienten T Zellen abgeschwächt. Diese kompensatorischen Mechanismen dämpfen den proximalen TCR Signalweg. *In vitro* Stimulierungen von SIT defizienten T-Zellen zeigten, das SIT<sup>-/-</sup> T-Zellen stärker proliferierten als T-Zellen von Kontrollmäusen. Auch die CD5 Hochregulierung deutet daraufhin, das SIT<sup>-/-</sup> T-Zellen ein permanentes, stärkeres Signal durch den TCR erhalten. Immunisierungsversuche mit dem MOG-Peptid zeigten, das SIT defiziente Mäuse eine stärkere EAE (experimentelle autoimmune Enzephalopathie) entwickeln, ein Mausmodel für Multiple Sklerosis. Demnach können diese kompensatorischen Mechanismen nicht die verminderte Schwelle zur T- Zellaktivierung und der daraus resultierenden verstärkten homöostatischer Proliferation und Autoimmunität verhindern.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, das SIT ein wichtiger negativer Regulator der T-Zellaktivierung *in vivo* ist. Durch die Modifizierung der TCR vermittelten Signalstärke regelt SIT die T-Zellentwicklung sowie die T-Zellhomöostase.