

---

## 5. Diskussion

Höhere Organismen benötigen ein hochentwickeltes Kommunikationssystem, um eine exakte Koordination von Proliferation und Differenzierung verschiedener Zell- und Gewebetypen zu erreichen. Dies geschieht einerseits über direkte Zell-Zellkontakte und andererseits durch Sekretion von löslichen Signalmolekülen, die auf ihren Zielzellen spezifisch mit membrangebundenen Rezeptoren interagieren, woraufhin intrazelluläre Signaltransduktionswege selektiv aktiviert werden, die u.a. Einfluss auf die Regulation der Genexpression nehmen. Im Hinblick auf medizinische Anwendungen übt das erstmals 1982 beschriebene Cytokin Interleukin-4 (IL-4) [160] eine wichtige Funktion aus, da es der einzig bekannte Faktor ist, der bei T-Zellen die Differenzierung zum T<sub>H</sub>2 Phänotyp auslösen kann [5]. Zusammen mit dem eng verwandten Cytokin Interleukin-13 (IL-13) induziert IL-4 in B-Zellen den Klassenwechsel zu IgE Antikörpern [161,162], die für Typ I Allergien wie Heuschnupfen und Asthma verantwortlich sind [163-165].

Ein häufiges Problem bei Arzneimitteltherapien sind unerwünschte Nebenwirkungen aufgrund unspezifischer Eigenschaften der eingesetzten Pharmaka. Zur Minderung dieser Risiken ist ein möglichst selektiver Eingriff in den Zellstoffwechsel erstrebenswert. Mögliche Zielstrukturen für solch selektive Interventionen sind auch intrazelluläre Signalwege, da es dabei möglich ist, einzelne Komponenten von Signalkaskaden gezielt auszuschalten, ohne dass die gesamte Signaltransduktion eines Rezeptors gehemmt werden muss.

### 5.1. Stat6 als Zielmolekül für die Entwicklung eines Inhibitors

Stat6 ist ein 850 AS langes Protein, dass im Menschen auf Chromosom 17 (q11-1 bis q22) kodiert ist (Maus: Chromosom 10) [77,166] Es besitzt eine ca. 100 AS lange zentrale DNA bindende Domäne, mit einer C-terminalen Transaktivierungsdomäne und je eine SH3 und SH2 Domäne. Stat6 bindet über seine SH2-Domäne an den phosphorylierten IL-4 Rezeptor und wird dann von den

Janus Kinasen (Jak) 1 und 3 tyrosinphosphoryliert [102,105,167]. In phosphoryliertem Zustand bildet Stat6, durch Interaktion der SH2 Domäne mit dem Phospho-Tyrosinrest eines weiteren Stat6-Moleküls Homodimere. Die Stat-6 Dimere können dann in den Zellkern wandern und aktivieren dort direkt spezifische DNA-Regionen. Diese GAS-Boxen, mit der palindromen Sequenz TTC-N<sub>4</sub>-GAA, befinden sich in den Promotorregionen von IL-4 induzierbaren Genen [103,106].

Die große Bedeutung des Stat6 Transkriptionsfaktors für die IL-4 induzierte Genexpression und somit für die Differenzierung von T<sub>H</sub>0 zu T<sub>H</sub>2 Zellen oder des Klassenwechsels zu IgE Antikörpern in B-Zellen konnte durch Mutationsanalysen der IL-4R $\alpha$  Kette gezeigt werden. Dort führen Mutationen, die die Phosphorylierung von Stat6 verhindern gleichzeitig auch dazu, dass jede IL-4 induzierte Genexpression beendet wird [168].

Stat6 knockout Mäuse (Stat6<sup>-/-</sup>) weisen ebenfalls auf eine essentielle Funktion von Stat6 im IL-4 System hin. Der Phänotyp zeigt zwar eine normale Entwicklung von B- und T- Zellen, der IgE und IgG1- Spiegel im Serum ist jedoch reduziert, die CD23 und MHC II-Expression ist stark verringert und es findet keine T<sub>H</sub>2 Differenzierung von T-Zellen mehr statt [127-129]. Damit zeigt die Stat6<sup>-/-</sup> Maus einen ähnlichen Phänotyp, wie die IL-4<sup>-/-</sup> Maus [169,170] und die IL-4R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Maus [171].

Da die Interaktion von Stat6 mit dem IL-4R sowie die anschließende Homodimerisierung durch eine klar definierte SH2 Domäne stattfindet, erscheint Stat6 und speziell dessen SH2 Domäne als geeignetes Zielmolekül für molekulare Hemmversuche.

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurde ein spezifischer Stat6-Inhibitor entwickelt und dessen Auswirkungen auf verschiedene murine und humane Zelltypen untersucht.

### 5.1.1. Struktur von SH2 Domänen

SH2 Domänen sind nichtkatalytische Proteindomänen mit einer Länge von etwa 100 AS, mit der Eigenschaft pTyr-Reste mit sehr hoher Spezifität zu binden. Diese Bindung hängt jedoch sehr stark von den direkt auf den pTyr-Rest C-terminalen folgenden AS ab [125,172-174]. Besonders wichtig sind dabei die nächsten drei auf das Phospho-Tyrosin folgenden AS (Abb. 5.1-1; Xxx, Yyy, Zzz), wobei die Sekundärstruktur dieser Consensussequenz aber keine Rolle spielt [172,173] (Abb. 5.1-1). Diese grundlegenden Bindungseigenschaften von SH2-Domänen konnten durch Röntgen- bzw. NMR Strukturanalyse an einer Reihe von Proteinen mit SH2-Domäne wie z.B. Src [175], Abl [176], Grb2 [177], Syp [178], PLC $\gamma$  [179], p56<sup>lck</sup> [180], Syk [181] und Zap70 [182] bestätigt werden.

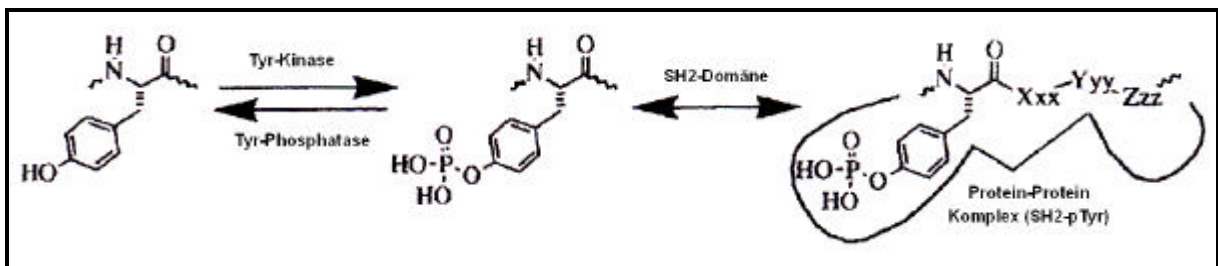


Abb. 5.1-1 Molekulare Erkennung von phosphoryliertem Tyrosin durch eine SH2-Domäne; [183]

### 5.1.2. SH2-bindende antagonistische Peptide

Da die Consensus-Sequenzen von SH2-Domänen sehr klein sind und keine besondere Sekundärstruktur aufweisen müssen, ist es naheliegend, synthetisch hergestellte phosphorylierte Peptide als Antagonisten in Zellen zu schleusen, um dort Signaltransduktionsprozesse zu unterbrechen.

Dass dieser Ansatz funktioniert, konnte schon durch die Hemmung der Grb2-Sos vermittelten Proliferation in CCL 39 Fibroblasten gezeigt werden. Bei diesem

Experiment wurde die Interaktion von Grb2 mit Sos durch Einschleusen eines SH3 bindenden, prolinreichen Peptids inhibiert, das aus der Grb2 Erkennungssequenz von Sos abgeleitet war. Daraufhin konnte die MAP-Kinase nicht mehr aktiviert werden und die Proliferation der Zellen wurde gehemmt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass Protein-Protein Wechselwirkungen intrazellulär durch kurze Peptide gestört werden können [184]. Auch durch SH2-Domänen vermittelte Wechselwirkungen wurden schon erfolgreich inhibiert. Dabei konnte die Bindung von Grb2 an den Epidermal Growth Factor (EGF)-Rezeptor durch ein synthetisches Peptid, das vom Grb2-SH2 Bindungsepitop des Rezeptors abgeleitet war, gehemmt werden, wodurch die EGF und PDGF induzierte Aktivierung der MAP-Kinase stark verringert wurde [185].

In einem weiteren methodisch vergleichbaren Ansatz wurde erfolgreich die Aktivierung der Phospholipase  $C\gamma$  (PLC $\gamma$ ) in Kleinhirnzellen nach Stimulierung mit Fibroblast Growth Factor (FGF) verhindert. Hierbei wurde ein kurzes Peptid mit einer aus dem FGF-Rezeptor abgeleiteten AS-Sequenz verwendet, das an die SH2-Domäne der PLC $\gamma$  bindet. Nach dem Einschleusen des Peptids in die Neuronen wurde die Phospholipidhydrolyse inhibiert und die Bildung von Neuriten wurde in den behandelten Zellen gehemmt [136].

In ähnlichen Experimenten konnten durch Internalisierung von kurzen phosphorylierten Peptiden die Hemmung der Signaltransduktion von CD44 [186] und die Stimulation der Proliferation durch ein PI3-Kinase bindendes Peptid [137] gezeigt werden. Des weiteren konnte mit einem nicht phosphorylierten Peptid, abgeleitet von dem cdk Inhibitor p21<sup>WAF1</sup>, die Proliferation von humanen Krebszellen gehemmt werden [187]. Diese Studien zeigen, dass phosphorylierte antagonistische Peptide, die in lebende Zellen transportiert werden, dort ihr Zielprotein finden und mit endogenen Substraten dieser Proteine kompetieren können. Ferner sind die Peptide in der Regel im zellulären Milieu so stabil, dass sich ihre Wirkung auch auf längerfristige Vorgänge, wie etwa die Proliferation, auswirken kann. In einzelnen Fällen konnten die Wirkung von Peptiden bis zu 8 Tagen nach der Applikation in Zellen nachgewiesen werden [135,188].

Protein	Domänenstruktur	Erkrankungen
Src	SH3-SH2-Kinase	Krebs, Osteoporose
Hck	SH3-SH2-Kinase	AIDS
Zap70	SH2-SH2-Kinase	Autoimmunerkrankungen
Syp	SH2-SH2-Phosphatase	Anämie
Stat6	DNA-Bindung-SH3-SH2	Allergie, Asthma
Grb2	SH3-SH2-SH3	Krebs, Leukämie
Shc	SH2-PTB	Krebs, Erythroleukämie
p85 (PI3K)	SH3-SH2-SH2	Krebs
Gap	SH2-SH3-SH2-PH-GAP	Krebs
Bcr/Abl	SH3-SH2-Kinase	Chronische Myeloische Leukämie

Tab. 5-1 Proteine mit SH2-Domänen von potentiell therapeutischen Interesse

### 5.1.3. Wirkung von Stat6BP

Im Zusammenhang mit den o.g. Studien ist es überraschend, dass die Wirkung von Stat6BP nur in einem extrem kurzen Zeitfenster stattfindet. Dabei scheinen endogene Phosphatasen eine entscheidende Rolle zu spielen, denn die gleichzeitige Behandlung von Zellen mit AP/Stat6BP und dem Phosphataseinhibitor Natriumpervanadat führt zu einer wesentlichen Verlängerung der hemmenden Wirkung von Stat6BP. Andererseits scheint auch der zelluläre Hintergrund wichtig zu sein, da sich Unterschiede in der Wirkung von Stat6BP auf verschiedenen Zelltypen finden: RAMOS und Ba/F3 -Zellen zeigen einen plötzlichen Eintritt der Hemmung von Stat6BP und nach der vollständigen Hemmung der Stat6-Phosphorylierung für 80 min wieder ein plötzliches Auftreten von Phospho-Stat6 in einer Stärke, die der von ungehemmten Zellen entspricht. In Caki-1, PBL und HeLa Zellen verläuft die Hemmung abgestufter. Schon nach 10

min Vorinkubation mit AP/Stat6BP ist eine deutliche Hemmung erkennbar. In Caki-1 und HeLa Zellen findet sich dafür aber auch nach 60 min wieder erstes Phospho-Stat6. Da Stat6BP auch in Ba/F3 die Tyrosinphosphorylierung hemmt, ist das Peptid auch ein guter Inhibitor für die Phosphorylierung von murinem Stat6. Dies entspricht auch den Erwartungen, da die SH2-Domäne hochkonserviert ist und innerhalb der Säugetierarten eine sehr hohe Sequenzhomologie aufweist.

Der Versuch die möglicherweise durch endogene Phosphataseaktivität bedingte zeitliche Limitierung der Stat6BP Hemmung durch das Ersetzen des hydrolysierbaren Phospho-Tyrosins im Stat6BP mit dem nicht mehr hydrolysierbaren Analog Phosphonomethyl-L-Phenylalanin [149] zu umgehen, scheiterte. Das modifizierte Analog zeigte keinerlei hemmende Eigenschaften mehr. Eine mögliche Ursache für dieses Verhalten könnte sein, dass im Phospho-Tyrosin die freien Elektronenpaare des Sauerstoffatoms an der Bindung der SH2-Domäne beteiligt sind. Dieses Sauerstoffatom ist im 4-Phosphonomethyl-L-Phenylalanin durch einen Methylrest substituiert, somit kann eine solche Wechselwirkung nicht mehr stattfinden. Offensichtlich genügen also geringe Änderungen an Struktur- und/oder Ladungseigenschaften eines Phospho-Tyrosinrestes um nicht mehr von der Stat6-SH2 Domäne erkannt und gebunden zu werden.

Eine wichtige Eigenschaft von Stat6BP ist die sehr hohe Selektivität; Stat6BP hemmt zwar die Phosphorylierung von Stat6 sehr gut, nicht jedoch die von Stat5. Trotz der sehr kurzen Konsensussequenz bindet Stat6BP somit ausschließlich an Stat6, womit es wahrscheinlich ist, dass neben der Struktur der an der Bindung beteiligten Aminosäuren keine weiteren strukturellen Bedingungen für einen Inhibitor bestehen, der spezifisch an Stat6 binden soll. Dies macht die Stat6-SH2 Domäne zu einem sehr attraktiven Ziel für die Entwicklung von niedermolekularen organochemisch hergestellten Pharmazeutika zur therapeutischen Hemmung von Stat6 bei allergischen Erkrankungen [189].

Stat6BP war auch in der Lage die Stat6 kontrollierte Reporterogenaktivität in der stabil transfizierten murinen Zelllinie Ba/F3 zu hemmen. Dies zeigt, dass

AP/Stat6BP auch für Prozesse, die der Stat6 Phosphorylierung nachfolgen, ein potenter Inhibitor ist, wobei Stat6BP sogar in der Lage ist die Reporterogenaktivität unter die Basalaktivität abzusenken. Dies legt nahe, dass sogar in nicht mit IL-4 stimulierten Zellen eine permanente Basalaktivität von Stat6 kontrollierten Genen vorhanden ist.

## 5.2. Intrazellulärer Transport durch membranpermeable Peptide

Die geringe Membranpermeabilität von intrazellulär wirkenden Peptiden, oder auch antisense Oligonukleotiden schränkte deren Einsatz in Forschung und Therapie lange Zeit ein. Die Entdeckung von kleinen membranpermeablen Vektor-Peptiden, die auch sehr viel größere Peptide und Oligonukleotide in Zellen transportieren können, eröffneten für deren Einsatz neue Möglichkeiten.

Neben dem in dieser Arbeit als Peptidvektor verwendeten Antennapediapeptid können noch eine ganze Reihe anderer Peptide und Proteine Zellmembranen eukaryotischer Zellen durchqueren, ohne dafür Energie oder ein spezifisches Transportsystem zu benötigen. Die unterschiedlichen Eigenschaften dieser Peptide und Proteine sollen hier kurz diskutiert werden.

### 5.2.1. Antennapedia und ähnliche Homöopeptide

Als 1994 die Eigenschaft des *Drosophila melanogaster* Transkriptionsfaktors Antennapedia entdeckt wurde, Membranen eukaryotischer Zellen durchqueren zu können, ohne dafür Energie oder einen Rezeptor zu benötigen, galt diese Eigenschaft als einzigartig [114,115]. Eine nähere Untersuchung dieses Phänomens ergab, dass für dieses Phänomen ein nur 16 AS langes Peptid (AS 43→58) der dritten Helix der Homöodomäne des Antennapediaproteins verantwortlich ist. Es zeigte sich, dass dieses Peptid (Antennapediapeptid (AP) oder auch Penetratin) in der Lage war andere Peptide oder auch Oligonukleotide, die kovalent mit dem Antennapediapeptid verknüpft sind in Zellen zu transportieren. Die Internalisierung des Antennapediapeptids findet sowohl bei 37 °C, als auch bei 4

°C statt und ist nicht abzusättigen [110,114], was zeigt, dass die Internalisierung völlig unabhängig von Rezeptoren stattfindet. Der intrazelluläre Transport von AP funktioniert mit Zellen, die  $\alpha$ -2.8-Polysialinsäure (PSA) auf der Zelloberfläche exprimieren besser, als mit solchen, die kein PSA tragen [111]. Es wird vermutet, dass PSA die intrazelluläre Aufnahme von AP durch lokale Erhöhung der Konzentration an der Zellmembran oder durch die Stabilisierung der Wechselwirkung des Antennapediaptids mit der Membran verbessert. In der Zwischenzeit hat sich gezeigt, dass viele Homöoproteine ähnliche Internalisierungseigenschaften wie das Antennapediaprotein haben [118], so dass die Familie der Peptidvektoren, die sich von Homöodomänen abgeleitet lassen, in nächster Zeit noch anwachsen dürfte.

### 5.2.2. Vom HIV Tat-Protein abgeleitete Peptide

Tat ist ein für die Replikation des HIV-Virus wichtiges Protein, mit einer Größe von 86 bis 102 AS (abhängig vom Virenstamm), das ebenso wie die Homöoproteine ohne Rezeptorvermittlung in eukaryotische Zellen gelangen kann [190]. Bislang konnten für mehrere unterschiedliche Peptidsequenzen, die vom Tat-Protein abgeleitet sind, gezeigt werden, dass sie ebenso wie das Antennapediaptid andere Peptide in Zellen transportieren können. Auch bei diesen Peptiden ist die Internalisierung rezeptor- und energieunabhängig, da sie sowohl bei 37 °C, als auch bei 4 °C funktioniert. Eine 12 AS lange Sequenz Tat (48→60), die zugleich ein Kernimportsignal (Nuclear localisation signal; NLS) enthält, zeigt dabei die größte Effizienz. In einigen Studien wurde außerdem das komplette Tat-Protein zum Transport anderer Proteine *in vitro* und *in vivo* benutzt [191,192]. Im Rahmen der *in vivo*-Studie gelang es in Mäusen ein 120 kDa Fusionsprotein aus Tat und  $\beta$ -Galactosidase nach intraperitonealer Applikation in fast alle Gewebe u.a. auch durch die Blut-Hirn-Schranke zu transportieren [191]. Damit konnte gezeigt werden, dass die Internalisierung von sehr großen Molekülen in Zellen auch im ganzen Organismus möglich ist.

Der intrazelluläre Transport des gesamten Tat-Proteins wird in Anwesenheit von Polyanionen, wie Heparin oder Dextransulfat jedoch stark gestört [193]. Eine



Ursache dafür könnte die Verdrängung des Tat-Proteins von geladenen Zelloberflächenmolekülen sein, die für die Aufnahme in die Zellen wichtig zu sein scheinen.

### 5.2.3. Synthetische Peptide

Das synthetische Fusionspeptid Transportan besteht aus dem modifizierten Neuropeptid Galanin-1-13 und dem Wespengiftpeptid Mastoparan [194]. Auch Transportan wird sehr schnell energie- und rezeptorunabhängig von eukaryotischen Zellen aufgenommen. Zudem hat es die Eigenschaft in Zellen zu akkumulieren. In der Sättigung ist die intrazelluläre Konzentration von Transportan fast zweimal so hoch wie die extrazelluläre [194]. Problematisch beim Einsatz von Transportan als Vektorpeptid ist, dass es die GTPase Aktivität in behandelten Zellen herabsetzt [194,195]. Zur Lösung dieses Problems wurde ein neues Fusionspeptid, genannt Transportan2, bestehend aus einer modifizierten Form des Neuropeptids Galanin-1-12 und dem inaktiven Mastoparan Analog Mas17, hergestellt [196]. Transportan2 hemmt die zelluläre GTPase nicht mehr und internalisiert in Zellen. Lediglich die Geschwindigkeit der Aufnahme in die Zellen ist gegenüber Transportan stark herabgesetzt.

Anhand der Eigenschaften von verschiedenen membrangängigen Peptiden, vor allem aber von Mastoparan, wurde ein amphipatisches Modellpeptid hergestellt [197]. Dieses aus rein theoretischen Überlegungen heraus entstandene 18 AS lange Peptid ist in der Lage, die Plasmamembranen von Mastzellen und Endothelzellen sowohl energieunabhängig als auch energieabhängig zu durchqueren und dabei auch andere Peptide mitzutransportieren [197]. Ausgehend von diesem synthetischen Peptid wurden noch weitere Peptide synthetisiert, um die Aufnahme in die Zellen weiter zu verbessern und die vorhandenen cytotoxischen Eigenschaften des Peptids zu beseitigen [198].

Name des Peptids	Aminosäuresequenz
Antennapediapeptid (AP)	R-Q-I-K-I-W-F-Q-N-R-R-M-K-W-K-K
Tat-Peptid (48→60)	G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R-P-P-Q
Transportan	G-W-T-L-N-S-A-G-Y-L-L-K-I-N-L-K-A-L-A-A-L-A-K-K-I-L
amphipathisches Modellpeptid	K-L-A-L-K-L-A-L-K-A-L-K-A-A-L-K-L-A

Tab. 5-2 Sequenzen der diskutierten membrangängigen Peptide

#### 5.2.4. Transportmechanismen der Peptide

Der Mechanismus durch den die membrangängigen Peptide in Zellen gelangen ist noch unklar. Am besten untersucht ist der Vorgang am Antennapediapeptid. Dass die Internalisierung hier rezeptorunabhängig funktioniert, konnte sehr gut dadurch bestätigt werden, dass auch die inverse Form (AS 58→43) und die D-Aminosäurenvariante des Antennapediapeptids Plasmamembranen durchqueren können [115].

Auch die amphipathischen Eigenschaften alleine sind nicht ausreichend, um die Internalisierung zu erklären, da der Austausch von zwei Tryptophanresten (AS 48 und AS 56) gegen Phenylalanine dazu führt, dass das Peptid nicht mehr in Zellen aufgenommen wird [114]. Im Gegensatz zum amphipathischen Modellpeptid, wo die Zerstörung der  $\alpha$ -helikalen Struktur auch die Internalisierung beendet [198], ist die Aufnahme des Antennapediapeptids völlig strukturunabhängig [115]. Diese beiden Beispiele zeigen auch, dass der Mechanismus der Internalisierung bei den verschiedenen membranpermeablen Peptiden unterschiedlich zu sein scheint. Für das Antennapediapeptid wird momentan ein auf NMR-Studien basierendes Modell diskutiert, nach dem das Peptid zunächst an negativ geladene Phospho- oder Glykolipide auf Zelloberflächen bindet. Eines der beiden enthaltenen Tryptophane destabilisiert dann die Struktur der Plasmamembran, was schließlich zur Bildung einer Micelle führt, in deren hydrophilem Innenraum das

---

Antennapediapeptid und ggf. ein gekoppeltes Cargo-Peptid eingeschlossen sind. Zuletzt wird der Inhalt der Micelle ins Cytoplasma entlassen [115].

### 5.3. Die Beteiligung der Src-Typ Kinasen p56<sup>lck</sup> und p59<sup>fyn</sup> an der IL-4 Signaltransduktion

In der Signaltransduktion von Cytokinen spielt die Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine eine entscheidende Rolle. Da die Rezeptoruntereinheiten der Cytokinrezeptoren jedoch keine intrinsische Tyrosinkinase Aktivität zeigen, ist für bisher drei Familien cytoplasmatischer pTyr Kinasen (PTK) nachgewiesen worden, an der Signaltransduktion von Cytokinrezeptoren beteiligt zu sein: Jak, Syk/Zap70 und Src Kinasen [99]. Zur Analyse solcher Signalkaskaden müssen sowohl die beteiligten Kinasen, als auch ihre Substrate identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der beiden Src-Kinasen p56<sup>lck</sup> (Lck) und p59<sup>fyn</sup> (Fyn) bei der IL-4 Signalweiterleitung näher untersucht.

Die Kinase p56<sup>lck</sup> wird ausschließlich auf lymphoiden Zellen exprimiert. Man findet sie hauptsächlich in T- und NK-Zellen, geringere Mengen wurden auch in einigen B-Zellpopulationen nachgewiesen [199]. Lck ist essentiell für die Entwicklung und Aktivierung von T-Zellen. p56<sup>lck</sup> knockout Mäuse zeigen eine verminderte Ausbildung des Thymus [200], während die p56<sup>lck</sup> defiziente Zelllinie Jurkat J.CaM1.6 nicht über den T-Zell Rezeptor stimuliert werden kann [201].

Nach Stimulation mit IL-2 konnte in T-Zellen die Induktion von c-jun und c-fos durch aktiviertes p56<sup>lck</sup> nachgewiesen werden. Die letztendliche Rolle von lck in der IL-2 vermittelten Signaltransduktion ist aber noch unklar. Durch Mutationsstudien im lck bindenden Bereich der IL-2R $\beta$  wurde gezeigt, dass p56<sup>lck</sup> für die IL-2 induzierte Proliferation in BAF-BO3 Zellen nicht gebraucht wird, während ähnliche Mutationen am IL-2R $\beta$  bestimmter T-Zellklone eine erhebliche Verschlechterung der mitogenen Wirkung von IL-2 bewirkten [202]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass zumindest Lck in einigen T-Zell Populationen eine kritische Funktion in der IL-2 Signaltransduktion spielt. Die unterschiedliche Bedeutung von Lck in verschiedenen Zelllinien ist offenbar auf Redundanzen

zwischen Kinasen aus der Src Familie zurückzuführen, zumal auch Interaktionen von Fyn und Lyn mit IL-2R $\beta$  nachweisbar sind [183,203,204].

Erste Hinweise darauf, dass Src Kinasen auch bei der IL-4 Signaltransduktion eine Rolle spielen ergaben sich aus der Beobachtung, dass sich mit SH2-GST Fusionsproteinen der Kinasen Lck und Fyn phosphorylierte Proteine aus IL-4, IL-2 und IL-7 stimulierten T-Zellen präzipitieren ließen [158].

Nähere Untersuchungen am IL-4 Rezeptorsystem ergaben dann, dass p56<sup>lck</sup> mit IL-4R $\alpha$  in Verbindung steht, da sich diese mit lck-SH2-Fusionsproteinen kopräzipitieren ließ, während mit fyn-SH2-Fusionsproteinen ein solcher Nachweis nicht gelang [54]. Weiterhin konnte durch in-vitro Kinase-Tests eine IL-4 induzierte Steigerung der Autophosphorylierung von lck, sowie die Unterdrückung dieser Reaktion durch den Src-Kinase Inhibitor PP1 gezeigt werden [54]. In einer Burkitt-Lymphom-B-Zelllinie ist ferner die Aktivierung von Fyn nach Stimulation mit IL-4 beschrieben [72]. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde näher untersucht, unter welchen Bedingungen Lck und Fyn nach IL-4 Stimulierung aktiviert werden. Dazu wurde ein in-vitro Kinase Test etabliert, bei dem neben der Autophosphorylierung der Kinasen auch die Phosphorylierung eines exogenen Substrates (Enolase; isoliert aus dem Muskelgewebe von Kaninchen) gemessen werden konnte.

Es zeigte sich, dass die Aktivierung der beiden Kinasen stark von der Zelllinien abhängig ist: In peripheren Blutlymphocyten (PBL) wird durch IL-4 Stimulation Lck aktiviert, während bei Fyn nur eine leichte Erhöhung der Autophosphorylierung nachweisbar ist. Eine ähnliche Situation findet sich auch in der T-Zelllinie Jurkat: Lck wird hier aktiviert, wohingegen Fyn eine ähnliche Aktivierung wie im unstimulierten Zustand zeigt. Aufschlußreich ist hier der direkte Vergleich mit der Lck defizienten Zelllinie Jurkat J.CaM1.6. Diese zeigt erwartungsgemäß keine Aktivierung von Lck nach Stimulierung mit IL-4, im Gegensatz zu Jurkat Zellen wird aber Fyn aktiviert, was sich durch starke Phosphorylierung des Substratproteins Enolase zeigt. In der T-Zelllinie MOLT4 schließlich liegen Lck und Fyn schon in unstimulierten Zustand stark autophosphoryliert vor, nach Stimulierung der Zelle mit IL-4 ist bei beiden Kinasen eine gleichstarke Aktivierung zu beobachten.

Die unterschiedlichen IL-4 induzierten Aktivierungsmuster der Kinasen p56<sup>lck</sup> und p59<sup>fyn</sup> in unterschiedlichen T-Zelllinien lassen vermuten, dass auch hier wie im IL-2 System Redundanzen zwischen Kinasen der Src-Familie vorkommen. Unterstützt wird diese These durch die stärkere Aktivierung von Fyn in Lck defizienten Jurkat Zellen. Leider konnte bis heute keine direkte Interaktion von Fyn mit der IL-4R $\alpha$  nachgewiesen werden. Da aber zumindest Lck eine Rolle bei der Zellproliferation spielt, ist eine Interaktion der Src-Kinasen mit dem IRS-2 Signalweg möglich. IRS-2 ist ein an die IL-4R $\alpha$  bindendes Dockingprotein, an das weitere Signalelemente binden können und das unter anderem auch die IL-4 induzierte Proliferation organisiert [168,205].

#### 5.4. Das IL-4 Rezeptor System

IL-4 bindet mit hoher Affinität ( $K_D \approx 100$  pM) an Rezeptoren, die in geringer Anzahl (100 bis 5000) auf nahezu jedem Zell- und Gewebetyp exprimiert werden [144,206]. IL-13 Rezeptoren werden zwar auf B-Lymphocyten, Monocyten, Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen exprimiert [207-209], jedoch nicht auf T-Zellen [210-212]. Im Hinblick auf die Rezeptorbindung sind murines und humanes IL-4 Speciespezifisch [144]. Im Gegensatz dazu können humanes und murines IL-13 auch an Rezeptoren der jeweils anderen Species binden.

Studien mit radioaktiv markiertem hIL-4 haben gezeigt, dass der humane IL-4 Rezeptor aus der 140 kDa IL-4 Rezeptor  $\alpha$ -Kette (IL-4R $\alpha$ , CD124) und der 64 kDa grossen  $\gamma$ -Kette besteht [43,44,206,213,214]. Neben diesem zuerst identifizierten **IL-4 Rezeptor Typ 1** wurden weitere Rezeptoren bzw. Rezeptoruntereinheiten vermutet, da eine Reihe von Zelltypen auf IL-4 reagieren, die keine funktionelle  $\gamma$  exprimieren [53]. Ferner konnte durch den Einsatz der antagonistischen IL-4 Mutante R121D/Y124D, die sowohl die IL-4 als auch die IL-13 Signaltransduktion hemmt, gezeigt werden, dass der IL-4 und der IL-13 Rezeptor eine gemeinsame Untereinheit nutzen [35,63,65,212]. Schließlich wurde die IL-13R $\alpha$ 1 als alternative Rezeptorkomponente des IL-4 Rezeptors ermittelt [52,57-60]. Der IL-

4 Rezeptor, bestehend aus IL-4R $\alpha$  und IL-13R $\alpha$ 1, wird als **IL-4 Rezeptor Typ 2** bezeichnet.

Somit sind bisher folgende Komponenten des IL-4/IL-13 Rezeptorsystems bekannt (Tab. 5-3).

	IL-4Ra	IL-13a 1	IL-13a 2	gc
Precursor Protein (AS)	825	427	380	369
Reifes Protein (AS)	800	406	354	347
Extrazelluläre Domäne (AS)	207	322	317	230
Transmembran Domäne (AS)	24	24	20	28
Cytoplasmatische Domäne (AS)	569	60	17	89
Molekulargewicht (kDa)	140	75	70	64
N-Glycosylierungsstellen	6	11	4	6
Cytoplasmatische Tyr	5	2	-	3

Tab. 5-3 Molekulare Charakteristika der Komponenten des humanen IL-4/IL-13 Rezeptorsystems (modifiziert nach [21])

Die Züchtung von IL-4 Rezeptor  $\alpha$  knockout Mäusen (IL-4R $\alpha$ <sup>-/-</sup>) [171] eröffnete die Möglichkeit das IL-4 Rezeptor System und besonders die Schnittstellen zum IL-13 System noch weiter zu untersuchen. Durch spezifisches Crosslinking sollten die Bindungspartner für mIL-4, die mIL-4 Variante Q116D/Y119D und mIL-13 auf Milzzellen von IL-4R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Balb/c Mäusen identifiziert werden. Die murine IL-4 Variante Q116D/Y119D (QY) ist das Analog zur humanen R121D/Y124D (RY) IL-4 Variante. Beide Moleküle binden zwar mit ähnlicher Affinität wie der jeweilige Wildtyp an die IL-4R $\alpha$  Kette, initiieren jedoch keine Signaltransduktion mehr.

Mit Milzzellen von Balb/c Mäusen ließen sich QY und mIL-4 gut mit der IL4R $\alpha$ -Kette crosslinken, ferner ist die an mIL-4 und mIL-13 gebundene IL-13R $\alpha$ 1-Kette nachweisbar. Mit IL-4R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Milzzellen ließen sich mit keinem der Cytokine Rezeptoruntereinheiten crosslinken, zumindest zwischen IL-13 und IL-13R $\alpha$ 1 hätte

es auch bei diesen Zellen funktionieren sollen. Warum der Nachweis nicht gelang bleibt unklar.

## 5.5. Ausblick

Die Stimulation von Zellen mit Cytokinen aktiviert ein komplexes intrazelluläres Netzwerk von Signalfaktoren, welches abhängig von Zelltyp und Art des Stimulus zu Proliferation, Apoptose oder Differenzierung der Zellen führt. Erst die genaue Kenntnis des Ablaufs und der Regulation von Signaltransduktionswegen eröffnen die Möglichkeit zur therapeutischen Intervention bei Erkrankungen.

Seit der Entdeckung von IL-4 im Jahr 1982 sind eine Vielzahl von Reaktionen in unterschiedlichsten Zelltypen und Geweben nachgewiesen worden. Die wichtigste biologische Funktion von IL-4 liegt aber in der Differenzierung von aktivierten T-Zellen zu T<sub>H</sub>2 Zellen. Dies macht IL-4 zu einem zentralem Regulator des Immunsystems und durch die enge Verknüpfung dieses Differenzierungsvorganges mit Typ 1 Allergien zu einem wichtigen Forschungsobjekt der molekularen Medizin. Die Entdeckung, dass der Transkriptionsfaktor Stat6 der wichtigste intrazelluläre Faktor für IL-4 induzierte Differenzierungsvorgänge ist und das Stat6 ausschließlich vom IL-4/IL-13 Rezeptorsystem verwendet wird, macht ihn als Zielmolekül für die Allergitherapie interessant.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein spezifischer Stat6 Peptidinhibitor entwickelt, der gezeigt hat, dass die hochspezifische Hemmung einer cytosolischen Signaltransduktionskomponente prinzipiell möglich ist. Ein großes Problem des Stat6-Inhibitors ist momentan die transiente Wirkung, so dass das Hauptaugenmerk weiterer Entwicklungen hier auf der Verlängerung des hemmenden Effekts liegt. Des Weiteren wird die Entwicklung ähnlicher Peptidinhibitoren gegen andere Signaltransduktionskomponenten des IL-4 Rezeptors und weiterer Cytokin Rezeptoren in Zukunft von Bedeutung sein. Um die Verfügbarkeit von Peptidinhibitoren wie Stat6BP zu erhöhen, sollten außerdem bakterielle oder eukaryotische Expressionssysteme für die Herstellung der Peptide eingesetzt werden. Fernziel ist schließlich die Entwicklung von

niedermolekularen organischen Inhibitoren am Modell der hemmenden Peptide, die dann in großem Maßstab hergestellt, pharmazeutisch einsetzbar sind.