

# 1. Einleitung

## 1.1. Allergie und Asthma

Die Geschichte der Allergien (Hyperreaktion des Immunsystems, gegen Substanzen, die von den meisten Menschen toleriert werden) beginnt mit Pharao Menes, von dem berichtet wird, dass er 3060 v. Chr. an den Folgen eines Insektenstiches gestorben ist. Die exakte wissenschaftliche Erforschung solcher allergischer Reaktionen fängt aber erst im Jahr 1819 mit der Beschreibung einer saisonalen Rhinitis (*catharrus aestivus*) durch den englischen Arzt John Bostock an. Im Jahr 1873 entdeckte Charles Blackley, dass deren erkältungsähnliche Symptome durch pflanzliche Pollen verursacht wird. Prausnitz und Küstner konnten 1921 nachweisen, dass ein „Gewebe sensibilisierender Faktor“ an diesem allergischen Geschehen beteiligt ist, dieser wurde schließlich von Johansen und Ishizakas 1967 unabhängig voneinander als Immunglobulin E (IgE) identifiziert. In der nachfolgenden Zeit gab es durch intensive Forschung einen großen Wissenszuwachs im Bereich der Immunologie und damit auch über Fehlreaktionen des Immunsystems, wie die Allergie. Zu Lebzeiten von Bostock und Blackley traten Allergien nur sehr selten auf, heute sind fast 30 % der Bevölkerung der westlichen Industrienationen von einer allergischen Erkrankung betroffen [1]. Im Fall von Asthma oder beim Eintreten eines anaphylaktischen Schocks, etwa nach Insektenstichen wie bei Pharao Menes, können die allergischen Symptome sogar lebensbedrohlich sein.

Bei der intensiveren Untersuchung der allergischen Prozesse zeigte sich, dass die eng verwandten Cytokine Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13) ursächlich an der Entstehung von Sofort-Typ (Typ I) Allergien wie Heuschnupfen, Hausstaub- und Tierhaarallergien, sowie allergischem Asthma beteiligt sind [2-4]. Erst die Erforschung des Immunsystems im allgemeinen und der Regulation und Wirkungen von IL-4 und IL-13 im besonderen ermöglicht es, die Entstehung von Allergien zu verstehen und spezifische wirkende Pharmaka zu entwickeln.

## 1.2. Das Immunsystem

Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten, die in den Organismus von höheren Wirbeltieren eindringen werden in der Regel von dessen Immunsystem erkannt und beseitigt. Auch entartete körpereigene Zellen können als verändert erkannt und eliminiert werden. Die Zellen, die an solchen Abwehrreaktionen beteiligt sind, werden Leukocyten genannt, sie entwickeln sich wie alle Blutzellen aus hämatopoietischen Stammzellen, die bei erwachsenen Wirbeltieren im roten Knochenmark gebildet werden. Um seine Abwehrfunktion effizient erfüllen zu können ist es entscheidend, dass das Immunsystem zwischen körpereigenem Material (*Selbst*) und körperfremden bzw. neoplastischem Material (*Nicht-Selbst*) unterscheiden kann. Das Immunsystem verfügt über unspezifische (*angeborene*) Abwehrmechanismen, die durch Makrophagen, Phagocyten, natürliche Killerzellen, neutrophile Granulocyten, das Komplementsystem und Lysozym vermittelt werden. Für die spezifische (*erworbene*) Immunantwort sind hingegen antigenspezifische Lymphocyten und Antikörper verantwortlich.

Die verschiedenen, im Organismus weit verteilten Zelltypen des Immunsystems müssen bei einer Immunreaktion koordiniert werden. Dies geschieht mit Hilfe eines komplexen Systems von löslichen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und durch direkte Zell-Zell Interaktionen. Eine wichtige Gruppe der löslichen Faktoren wird unter der Bezeichnung Cytokine zusammengefaßt. Cytokine sind kleine sekretierte Glycoproteine, die meist lokal zum Teil aber auch systemisch agieren. Zu den Cytokinen rechnet man neben den Interleukinen (IL) auch Interferone (IFN), Wachstumsfaktoren, Chemokine, Kolonie-stimulierende-Faktoren (CSF) und Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF). Diese Proteine sind zwar von ihrer Struktur her unterschiedlich, werden aber wegen ihrer vergleichbaren physiologischen Wirkungen zusammengefaßt.

Eine entscheidende Rolle spielen Cytokine auch bei der Regulation der Immunantwort. Durch Bindung eines von antigenpräsentierenden Zellen (APC) prozessierten und präsentierten Antigens werden primäre T-Helfer Lymphocyten ( $T_H0$ ) aktiviert. Abhängig vom auf sie wirkenden Cytokinmuster differenzieren sie dann unter Einfluß von IL-12 und IL-2 zu  $T_H1$ - Zellen oder unter Einfluß von IL-4

und IL-2 zu  $T_H2$ -Zellen. Die für die Differenzierung entscheidenden Cytokine wirken jeweils auch antagonistisch: IL-12 hemmt die Differenzierung zum  $T_H2$ -Subtyp und IL-4 die zum  $T_H1$ -Subtyp.

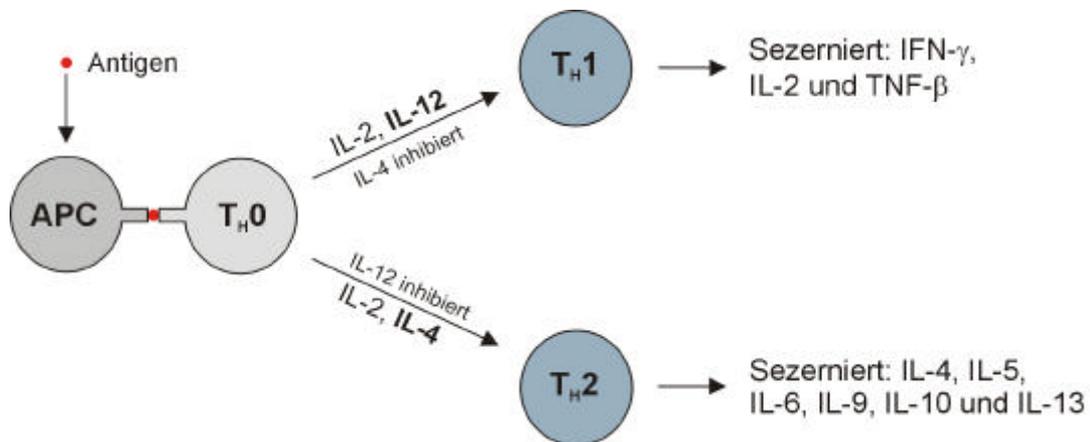


Abb. 1.2-1 IL-4 und IL-12 steuern die Differenzierung von primären T-Helferzellen in  $T_H1$  bzw.  $T_H2$  Subpopulationen

Die ausdifferenzierten  $T_H1$  und  $T_H2$  Zellen können anhand der von ihnen sezernierten Cytokine unterschieden werden [5-7].  $T_H1$ -Zellen produzieren Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), IL-2 und TNF- $\beta$ , was zu einer zellvermittelten Immunantwort führt (Aktivierung von Makrophagen und Cytotoxischen Zellen; Produktion von opsonierenden und Komplement-aktivierenden Antikörpern). Klinisch verläuft eine solche  $T_H1$ -Immunantwort als von Phagozyten dominierte Entzündung [7].  $T_H2$ -Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13 und induzieren dadurch eine stark Antikörper dominierte Immunantwort. Die Aktivierung eosinophiler Granulozyten und Hemmung von Phagozyten im Verlauf einer  $T_H2$  Immunreaktion führt zu einer phagozytenunabhängigen Entzündung [7]. Die Festlegung auf eine der beiden Immunantworten ist von großer Bedeutung für den Organismus. So kann zum Beispiel die Ausprägung einer der beiden  $T_H$ -Subklassen zur Heilung von Infektionen führen, während die Ausbildung der anderen Subklasse die Persistenz der Erkrankung zur Folge hat. Bekannte Beispiele hierfür sind die Leishmanien-Infektion der Maus [8] und die Lepra beim Menschen [9].

Das  $T_H1/T_H2$  Konzept ist sicher eine Vereinfachung der tatsächlichen Vorgänge der Immunregulation, es ist aber trotzdem ein gutes Modell für das grundlegende Verständnis der Differenzierung des Immunsystems.

### 1.3. IL-4 und die Typ 1-allergische Reaktion

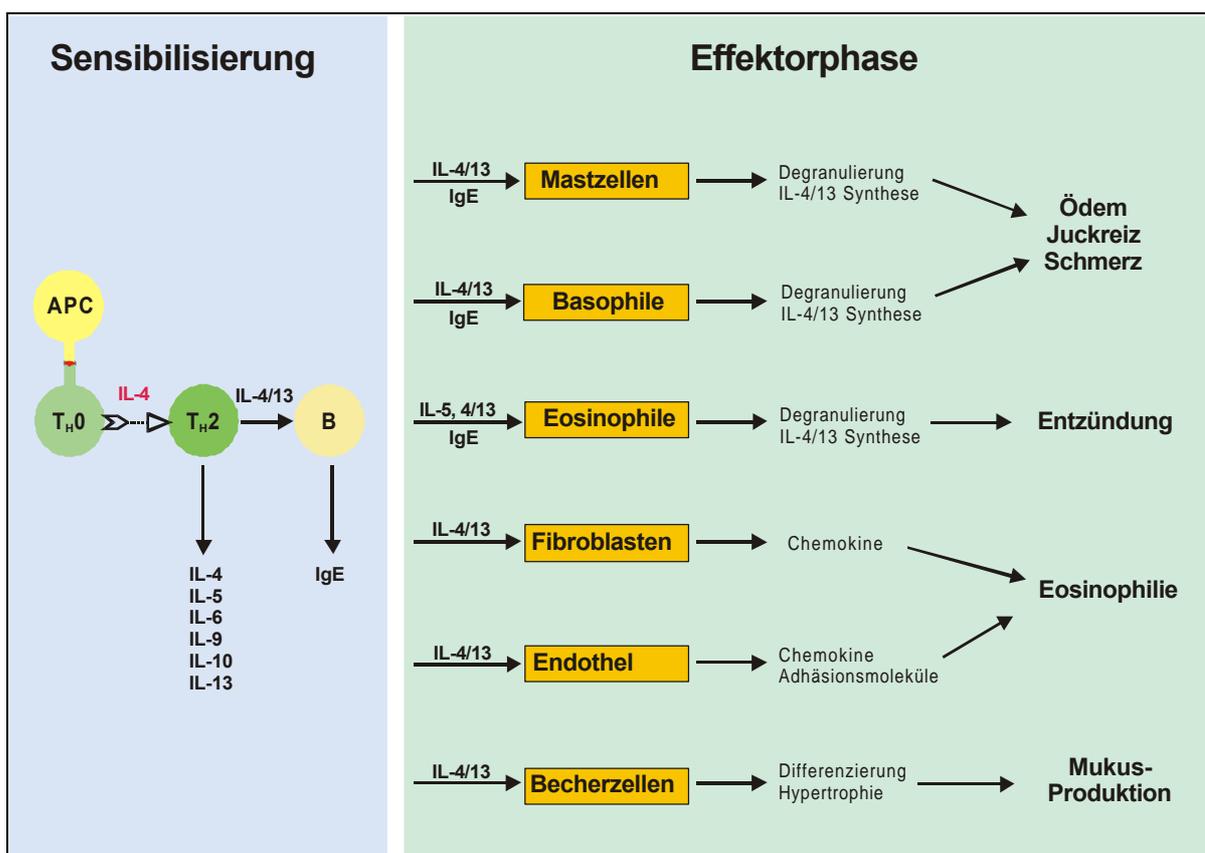


Abb. 1.3-1 Schematische Darstellung von Sensibilisierungs- und Effektorphase der allergischen Soforttyp-Reaktion

Der entscheidende IL-4 induzierte Differenzierungsschritt bei der Entstehung einer Typ 1 Allergie ist die Entwicklung von  $T_H2$  Zellen. Wird ein Antigen von antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufgenommen und über den MHC II-Komplex primären T-Helferzellen präsentiert, so kann sich die T-Zelle nur bei zusätzlicher Stimulierung durch IL-4 zu einer  $T_H2$ -Zelle ausdifferenzieren. Die Herkunft dieses

frühen IL-4 ist nicht vollkommen geklärt, es kommen aber Mastzellen und einige T-Zell Subtypen in Betracht [6]. Sind diese Voraussetzungen gegeben, wird das präsentierte Antigen fortan als Allergen behandelt. Da  $T_H2$  Zellen neben anderen Cytokinen auch IL-4 sezernieren, kommt es zu einer autokrinen Verstärkung. Zusammen mit dem ebenfalls von  $T_H2$  Zellen produzierten IL-13 induziert IL-4 in aktivierten B-Zellen den Klassenwechsel („class switch“) vom Immunglobulin M (IgM)-Isotyp zum Immunglobulin E (IgE)-Isotyp [10-12]. Das so hergestellte IgE bindet über  $F_c$ -Rezeptoren an die Oberfläche von Granulocyten (Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen). Damit ist die Sensibilisierung gegen das Allergen abgeschlossen, bei einem späteren Kontakt mit dem gleichen Allergen läuft dann die Soforttyp-Reaktion ab. Dabei wird das Allergen von mit Granulocyten assoziiertem IgE gebunden, was zur Degranulation der Effektorzellen führt. Bei dieser Zellyse werden eine Reihe von Substanzen freigesetzt, von denen vor allem Histamin, Serotonin und inflammatorischen Lipide wie Leukotriene und Prostaglandine zu nennen sind. Typische darauf folgende allergische Reaktionen sind Juckreiz, lokale Entzündung und Erhöhung der Gefäßpermeabilität, was zur Bildung von Ödemen führt. Im Falle von allergischem Asthma kommen noch weitere Reaktionen hinzu, wie gesteigerte Mukus-Produktion in den Bronchien, erhöhte Reaktivität der Bronchialmuskulatur und die Bildung eines von eosinophilen Granulocyten dominierten Infiltrats im Lungengewebe, das bei einem chronischen Krankheitsverlauf zu Gewebszerstörungen führt [13].

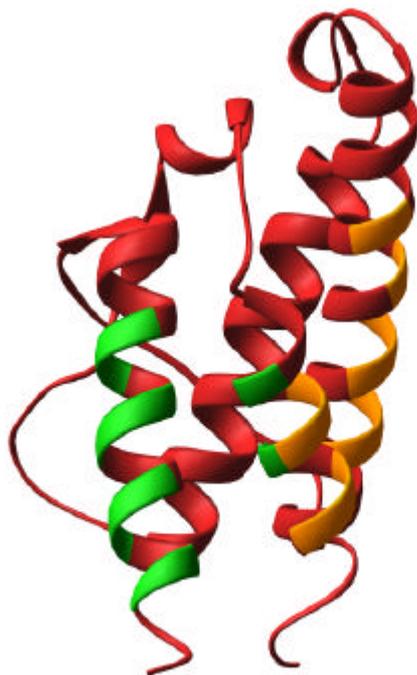
IL-4 und IL-13 spielen nicht nur bei der allergischen Sensibilisierung eine wichtige Rolle, sondern sind auch an der Effektorphase maßgeblich beteiligt. Sie erhöhen die Aktivität der Mastzellen [14], Basophilen [15] und Eosinophilen [16], führen zur Hypertrophie der mukusproduzierenden Becherzellen der Atemwege [17,18] und sind durch die Induktion von Adhäsionsmolekülen [19] und Chemokinen [20] an der Bildung von eosinophilen Infiltraten beteiligt.

IL-4 spielt bei der allergischen Reaktion vor allem in der Sensibilisierungsphase eine entscheidende Rolle, da es bei der anfänglichen Differenzierung von  $T_H0$  zu  $T_H2$  Zellen nicht durch IL-13 ersetzbar ist [21]. In der Effektorphase der Allergie scheint jedoch IL-13 zu dominieren, da es über längere Zeit und in größeren Mengen produziert wird als IL-4 [22-25].

## 1.4. Interleukin-4

### 1.4.1. Struktur von IL-4

Das reife humane IL-4 (Abb. 1.3-1) ist ein monomeres Protein, besteht aus 129 AS und besitzt zwei potentielle Glykosylierungsstellen. Es zeigt nach Expression in eukaryotischen Zellen ein vom Glykosylierungsgrad abhängiges Molekulargewicht von 15 bis 20 kDa [26]. Die dreidimensionale Struktur von IL-4 wurde durch Röntgenkristallographie [27,28] und NMR Spektroskopie [29-31] aufgeklärt. Es gehört zu einer Familie von Cytokinen mit einer konservierten Typ II-Vier-Helix-Bündel-Struktur [32], die auch als Hämatopoietin-Familie [33] bezeichnet wird. Die Topologie von hIL-4 ist durch vier antiparallele  $\alpha$ -Helices gekennzeichnet, die durch eine kurze und zwei lange Schleifen (sog. *overhand loops*) zu einer up-up-down-down Konnektivität verbunden sind. Aus Segmenten der die Helices A und B bzw. C und D verbindenden Schleifen wird außerdem noch ein zweisträngiges  $\beta$ -Faltblatt gebildet. Zusammen mit den Interleukinen 2, 3, 5, 7, 9, 13 und 15 und GM-CSF gehört IL-4 zu den kurzkettigen Vier-Helix-Bündel-Cytokinen. Langkettige Vier-Helix-Bündel-Cytokine wie Wachstumshormon (GH), Prolactin (PRL), Erythropoietin (Epo), G-CSF oder IL-6 können neben größeren  $\alpha$ -Helices zusätzliche Helices in den Verbindungsschleifen aufweisen, sie besitzen jedoch keine  $\beta$ -Faltblatt Strukturen [34].

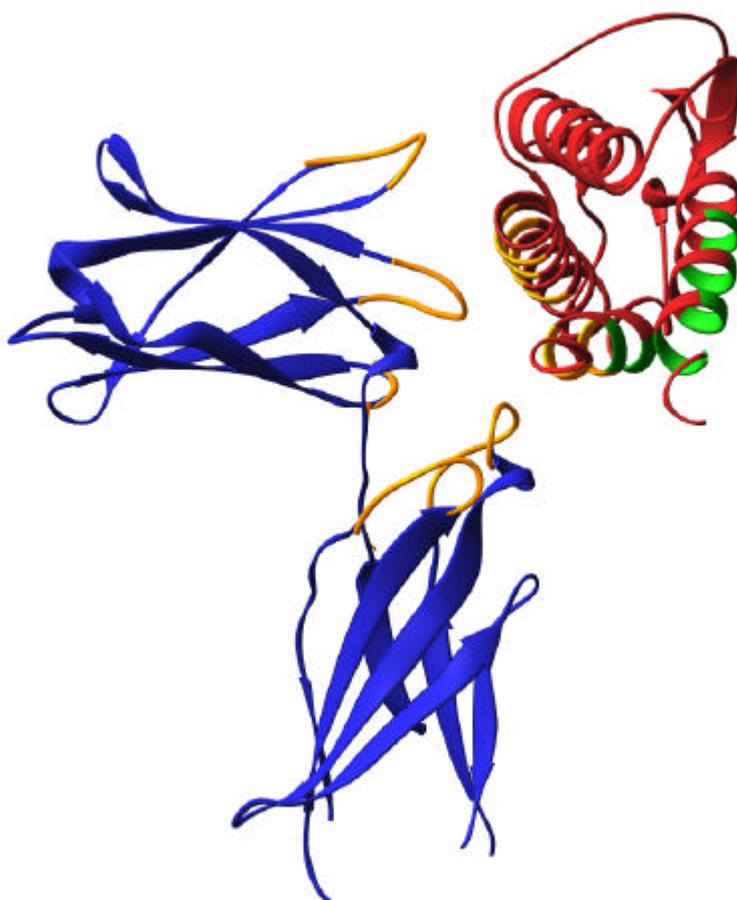


*Abb. 1.4-1 Schematische Darstellung der Struktur von hIL-4; Die Rezeptorbindungsepitope sind farblich hervorgehoben: hochaffines Bindungsepitop (site 1) zur Bindung an IL-4Ra (orange); niederaffines Bindungsepitop (site 2) zur Bindung der  $\alpha$ c (grün) [35].*

## 1.5. Der IL-4 Rezeptorkomplex

Die IL-4 Rezeptor  $\alpha$ -Kette gehört zur Klasse-I-Cytokinrezeptor Superfamilie (CRSF), die konservierte Sequenzbereiche (cytokin receptor homology (CRH) region) in ihren extrazellulären Domänen aufweisen [36,37]. Die ca. 200 AS umfassende CRH ist für die Ligandenbindung der Rezeptoren verantwortlich und zeichnet sich durch zwei jeweils 90 Aminosäuren lange Fibronectin-III ähnliche Domänen aus, die aus jeweils sieben antiparallelen  $\beta$ -Faltblattsträngen bestehen. Weitere Charakteristika der Typ-I-Cytokinrezeptoren sind vier konservierte Cysteinreste in der membrandistalen Hälfte, die durch Disulfidbrücken die dreidimensionale Struktur stabilisieren sowie ein hochkonserviertes WSXWS-Motiv

nahe der hydrophoben Transmembranregion [36]. Der endgültige Beweis dafür, dass auch die IL-4 Rezeptor  $\alpha$ -Kette zu den Typ-I-Cytokinrezeptoren gehört konnte erstmals durch die Röntgenstrukturanalyse eines 1 : 1 Komplexes aus der Ektodomäne der IL-4 R $\alpha$ -Kette und IL-4 eindeutig belegt werden (Abb. 1.4-1) [38]. Die eng verwandten Klasse-II-Rezeptoren weisen ein CRH mit vier unterschiedlichen konservierten Cysteinen, aber kein WSXWS-Motiv auf [36].



**Abb. 1.5-1** Strukturmodell eines 1:1 Komplexes des extrazellulären Anteils der IL-4R $\alpha$ - Kette und IL-4. Die Struktur des Rezeptorkomplexes basiert auf den Röntgenstruktur-Daten von Dr. Thorsten Hage, der die Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat.

Die cytoplasmatischen Anteile von Proteinen der Cytokinrezeptor-Superfamilie haben keine intrinsische Kinaseaktivität und unterscheiden sich sowohl in ihrer

Länge, als in ihrer Sequenz teilweise beträchtlich, so ist z.B. der cytoplasmatische Anteil der IL-4R $\alpha$  569 AS lang, der des IL-13R $\alpha$ 2 nur 18 AS. Für einige konservierte cytoplasmatische Bereiche konnte jedoch eine Rolle bei der Bindung signalvermittelnder Proteine gezeigt werden [39]. So finden sich bei vielen Typ I Cytokinrezeptoren in Membrannähe prolinreiche und saure Sequenzmotive, die als box 1- und box 2-Motive bezeichnet werden [40,41].

### 1.5.1. Der IL-4 Rezeptor aus IL-4R $\alpha$ und $\gamma$

Durch molekulare Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Signalweiterleitung des IL-4 Rezeptors mit der Bindung von IL-4 an IL-4R $\alpha$  ( $K_D = 20$  bis  $300$  pM) und der anschließenden Heterodimerisierung der  $\alpha$ -Kette mit einer zweiten Rezeptoruntereinheit beginnt [42]. Der dominierende Dimerisierungspartner der IL-4R $\alpha$  bei der IL-4 Signaltransduktion, ist in vielen Zelltypen die  $\gamma$ c, die zuerst als Bestandteil des IL-2 Rezeptors beschrieben wurde [43-45]. Die  $\gamma$ c-Kette gehört wie die IL-4R $\alpha$  auch zur Hämatoopoietin Rezeptor-Superfamilie und ist neben dem IL-2- und dem IL-4-Rezeptor noch Bestandteil weiterer Cytokin-Rezeptor-Komplexe (IL-7R, IL-9R und IL-15R) [46], sie wird deshalb als common gamma Untereinheit bezeichnet.

Unter stark artifiziellen Bedingungen gelang es eine IL-4 Signaltransduktion durch Homodimerisierung der IL-4R $\alpha$  herbeizuführen [47-50]. Dieses Phänomen scheint jedoch keine physiologische Bedeutung zu haben.

### 1.5.2. Der IL-4 Rezeptor aus IL-4R $\alpha$ und IL-13 $\alpha$ 1

Neben dem **Typ 1 IL-4 Rezeptor** aus den Untereinheiten IL-4R $\alpha$  und  $\gamma$ c kann die  $\alpha$ -Kette eine weitere Rezeptoruntereinheit rekrutieren. Dies konnte in Zelltypen nachgewiesen werden, die auf IL-4 reagieren ohne die  $\gamma$ c zu benutzen [51-54]. Schließlich wurde IL-13 $\alpha$ 1 als alternative Rezeptorkomponente identifiziert [52,55-60]. Dieser Rezeptor wird **Typ 2 IL-4 Rezeptor** genannt. Neuere Studien

legen sogar nahe, dass in nicht hämatopoietischen Zellen IL-13R $\alpha$ 1 die bevorzugte akzessorische Rezeptoruntereinheit bei der IL-4 Signaltransduktion ist [61].

### 1.5.3. IL-4-Rezeptorbindung

Die Signaltransduktion von IL-4 wird durch Oligomerisierung von membrangebundenen Rezeptorproteinen eingeleitet. Dies geschieht in einem zweistufigen, sequentiellen Vorgang über zwei separate Bindungs epitope auf dem IL-4 Molekül. Im ersten Schritt bindet IL-4 mit hoher Affinität die  $\alpha$ -Kette seines Rezeptors. Dieser präformierte 1 : 1 Komplex, der allein nicht in der Lage ist, ein zelluläres Signal zu vermitteln, bindet im zweiten Schritt (Aktivierungsschritt) die zweite Rezeptoruntereinheit ( $\gamma$ c oder IL-13 $\alpha$ 1). Dieser heterodimere Rezeptorkomplex führt dann schließlich zur Signalauslösung. Ligandenbindung und anschließende Dimerisierung der Rezeptorketten stellen hierbei zwei voneinander getrennte Prozesse dar. Die beschriebene 1 : 1 Stöchiometrie des IL-4 Rezeptorkomplexes ist mit löslichen Ektodomänen der Rezeptoren belegt [62]. Durch systematische Mutagenesestudien wurden im IL-4 zwei Epitope identifiziert, die für die Interaktion mit den einzelnen Rezeptoruntereinheiten wichtig sind [35]. Die sog. **site 1** umfaßt Bereiche der Helices A und C des IL-4, die um die Aminosäuren Glu9, Arg88 und Lys84 zentriert sind. Mutationen in diesen Bereichen führen zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Bindung von IL-4R $\alpha$ . Mutationen in der **site 2**, die um die Aminosäuren Arg121, Tyr124 und Ser125 der D-Helix von IL-4 zentriert ist, führen hingegen dazu, dass hIL-4 mit unverändert hoher Affinität an die IL-4R $\alpha$  bindet, jedoch keine Dimerisierung der Rezeptorkomponenten und damit auch kein intrazelluläres Signal mehr auslösen kann (Abb. 1.3-1).

Mutationen an den Positionen R121, Y124 und S125 von hIL-4 führen zu Proteinen, die an die  $\alpha$ -Kette des IL-4 Rezeptors binden, aber abgeschwächte Bioaktivität zeigen [35,63-65]. Besonders wirksam ist der Austausch des Tyrosinrestes an der Position 124 durch ein Aspartat. Im Gegensatz zu Wildtyp-hIL-4 zeigt Y124D keine Proliferation in primären T-Zellen, sowie ein 10-fach schwächere CD23-Expression in B-Zellen. Die IL-4 Doppelmutante R121D/Y124D zeigt einen vollständigen

Ausfall der IL-4 vermittelten Signale, wobei die Bindung an die  $\alpha$ -Kette des IL-4 Rezeptors nicht beeinträchtigt ist.

Es wird zur Zeit untersucht ob solche antagonistisch wirkenden IL-4 Mutanten klinisch für die Therapie von Typ 1 Allergien eingesetzt werden können.

## 1.6. Signaltransduktion des IL-4 Rezeptorkomplexes

Die Signaltransduktion der Cytokinrezeptoren ist durch ein dynamisches Gleichgewicht von Phosphorylierung und Dephosphorylierung zellulärer Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Kinasen und den entsprechenden Phosphatasen gekennzeichnet. Der IL-4 Rezeptor weist, wie viele andere Cytokinrezeptoren auch, keine interne enzymatische Aktivität auf und ist bei der Signalweiterleitung in das Innere der Zelle auf eine Reihe von assoziierten cytoplasmatischen Proteinen angewiesen. Nach Ligandenbindung und Rezeptordimerisierung werden Kinasen aktiviert, die sich gegenseitig phosphorylieren. Daraufhin werden andere Signalmoleküle, sowie die intrazellulären Rezeptoruntereinheiten phosphoryliert und so vielfältige Signalkaskaden eingeleitet [4,53]. Die Proteine, die in verschiedenen Zelltypen durch das IL-4 Signal aktiviert oder in den IL-4 Rezeptorkomplex rekrutiert werden (Abb.1.6-1) sind nachfolgend aufgeführt:

Die Kinasen der **Jak-Familie** Jak1 [66] und Jak3 [67], sowie Jak2 und Tyk [68]; die **Tyrosinkinasen** c-fes [69] und syk [70]; die **Src-Typ Kinasen** p56<sup>lck</sup> [54,71] und p59<sup>fyn</sup> [72]; die **Phosphatasen** SHP1 [73] und SHP2 [74,75]; die **Transkriptionsfaktoren** Stat5a/b [76], Stat6 [77] und Stat3 [76]; die **Adapterproteine** IRS1 [78], IRS2 [78], Nck [79], Shc [80], Grb2/sos [79,81] und FRIP [82] ; die **Lipidkinase** Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase) [78,83]; die **Jak-Stat-Inhibitoren** SOCS-1 [84], SSI [85] und JAB [86]. Die genaue zellphysiologische Funktion der meisten dieser Signalmoleküle ist bisher allerdings noch nicht geklärt.

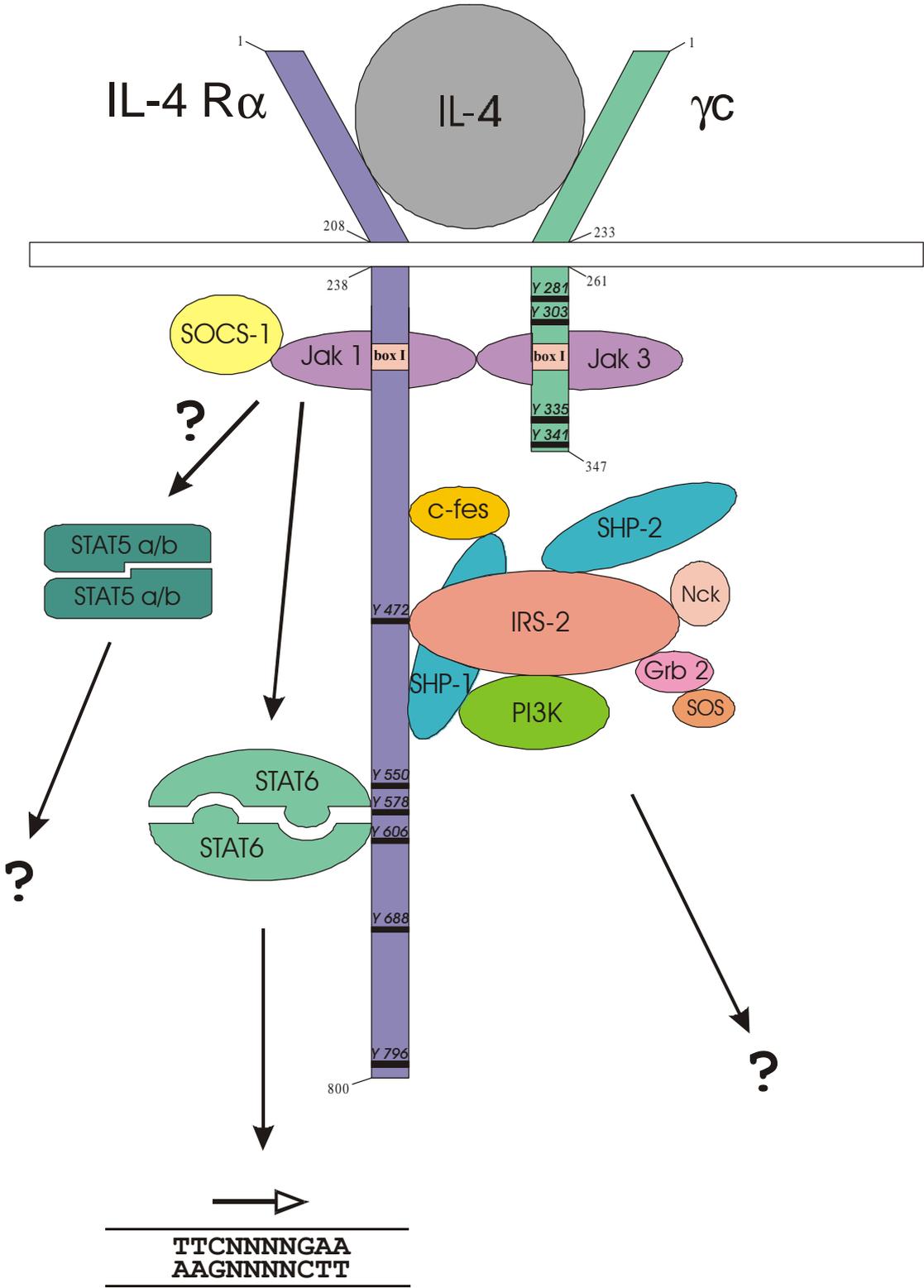


Abb. 1.6-1 Modell des aktivierten hIL-4 Rezeptors mit den assoziierten Signalmolekülen

### 1.6.1. Der IRS-2 Komplex

Als größtes Protein bindet das 170 kDa schwere IRS-2 über eine PTB- (phosphotyrosine binding) Domäne an das phosphorylierte Y472 der IL-4R $\alpha$ -Kette. Der Tyrosinrest liegt innerhalb der Consensussequenz NPAY. Dieses IRS-2 bindende Kernmotiv wird auch I4R-Motiv genannt [87-89]. Ursprünglich war IRS-2 als 4PS (IL-4-induced phosphotyrosine substrate) beschrieben worden [78], wurde aber nach seiner Klonierung aufgrund seiner Sequenzhomologie zu IRS-1, dem wichtigsten Phosphorylierungssubstrat des Insulinrezeptors, umbenannt [90]. Die Vermutung, daß die beiden IRS Proteine sich gegenseitig funktionell ersetzen können, scheint zumindest in einigen Zelltypen falsch zu sein, da IRS-2 knockout Mäuse ungeachtet des Vorhandenseins von IRS-1 eine Typ 2 Diabetes entwickeln [91].

IRS-1 und IRS-2 sind im Insulinrezeptor- und IL-4-Rezeptorsystem wichtige Adapterproteine. Nach Bindung an den Rezeptor werden die IRS an mindestens acht Tyrosinresten phosphoryliert [92] und bilden somit Andockstellen für andere Phosphotyrosin-bindende Proteine. Eines der Proteine, das im IL-4 Rezeptorsystem an IRS-2 bindet, ist die heterodimere p85/p110 Lipidkinase Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die in einigen Zellen durch Tyrosinphosphorylierung von p85 nachgewiesen wurde [83,93,94]. Die mögliche Beteiligung der PI3K an der IL-4 Signaltransduktion über Serin/Threonin Phosphorylierung von Proteinen oder die Assoziation zellulärer Kinasen der Src-Familie wie p56<sup>lck</sup> oder p59<sup>fyn</sup> [95] konnte nicht direkt nachgewiesen werden. Der nach Aktivierung der PI3K beobachtbare Anstieg von Inositol-3-Phosphat (IP<sub>3</sub>), cAMP und Ca<sup>2+</sup> und die Aktivierung weiterer Signalmoleküle wie Akt und der Protein Kinase C (PKC), lassen einen Einfluß der IL-4 Signaltransduktion auf das Zellwachstum und die Hemmung von Apoptose vermuten [4]. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass durch die Hemmung der PI3K in verschiedenen hämatopoietischen Zelllinien die antiapoptotische Wirkung von IL-4 aufgehoben wird. [96].

Obwohl das Grb2/sos Adaptermodul vom IL-4 Rezeptorkomplex rekrutiert wird, konnte eine direkte IL-4 induzierte Aktivierung des ras-Signalweges und eine damit verbundene Stimulierung der Proliferation durch p42/44 MAP-Kinasen

bisher nur in Keratinocyten gezeigt werden [79,80]. In vielen hämatopoietischen Zelllinien dagegen führt IL-4 Stimulierung zu keiner messbaren Aktivierung des ras-Signalweges [94,97,98]. Dies läßt sich möglicherweise damit erklären, dass Phosphorylierung von IRS-2 und Assoziation mit Grb2/sos in bestimmten Zelltypen für die IL-4 induzierte Aktivierung von ras und der MAP-Kinasen nicht ausreicht, möglicherweise ist dafür die Aktivierung weiterer Signalmoleküle, z.B. Shc notwendig [4].

Weitere signalvermittelnde Proteine wie Nck [79] und die Phosphatase SHP-2 [75] konnten nach IL-4 Induktion koprizipitiert werden.

### 1.6.2. Der Jak/Stat Signalweg

Der einzige Signaltransduktionsweg des IL-4 Rezeptors, dessen Weiterleitung detailliert verstanden ist, beginnt mit der Aktivierung der Jak-Tyrosinkinasen. Die Jak-Kinasen (Janus Kinasen), von denen gegenwärtig vier Vertreter (Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2) bekannt sind [99], besitzen eine charakteristische strukturelle Organisation aus 7 JH- (Jak homology) Domänen. Die C-terminale JH1-Domäne hat Kinaseaktivität, die JH2-Domäne ist eine Pseudokinasedomäne. Zusätzlich findet sich in der Mitte eine konservierte DNA-bindende Region, während die Funktionen der weiteren fünf (JH3 bis zur N-terminalen JH7) noch nicht genau aufgeklärt sind. Im Gegensatz zu vielen anderen cytoplasmatischen Kinasen verfügen die Jaks weder über SH2- oder SH3- (Prolin-bindende) noch über PTB- (Phosphotyrosin-bindende) oder Lipid-bindende PH- (plekstrin homology) Domänen.

Im Falle des IL-4 Rezeptors, ist Jak1 an IL-4R $\alpha$  [66] und Jak3 an  $\gamma$ c [67,94] gebunden. In Zellen, die den Typ 2 IL-4R verwenden, wird je nach Zelltyp Jak2 oder Tyk2 anstelle von Jak1 aktiviert [68]. Durch die Dimerisierung von IL4-R $\alpha$  und  $\gamma$ c kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung von Jak1 und Jak3, nachfolgend wird das zelluläre Signal durch spezifische Phosphorylierung von Stat6 Molekülen [77] weitergeleitet. Stat6 ist verantwortlich für die Expression von zahlreichen mit der T<sub>H</sub>2 Differenzierung verbundenen Proteinen, wie z.B. CD23, MHC Klasse II und der IL-4R $\alpha$ -Kette [4]. Die Aktivierung von Stat6 ist auch

Voraussetzung für den Klassenwechsel zu IgE im Menschen und zu IgG1 in der Maus [12]. In einigen Promotoren hat es sogar supprimierende Eigenschaften, wie für E-Selektin [100] und IRF-1 [101].

Stat6 gehört zur Familie der Stat-Proteine (signal transducers and activators of transcription), von der gegenwärtig sieben Vertreter bekannt sind [102]. Die Stat Proteine bestehen aus einer DNA-bindenden Domäne [103], einer Transaktivierungsdomäne am C-Terminus, einer SH3-Domäne, sowie einer SH2-Domäne, über die die Bindung zu Rezeptoren hergestellt wird [104]. Die Aktivierung von Stat6 wird durch die Phosphorylierung von Tyrosinresten der IL-4R $\alpha$ -Kette in den Positionen Y550, Y578 und Y606 durch Jak-Kinasen erleichtert [102,105]. Werden Stat6 Moleküle phosphoryliert und damit aktiviert, so lagern sie sich mit ihren SH2-Domänen zu Homodimeren zusammen und wandern in den Zellkern, wo sie an spezifische DNA-Sequenzen, sog. GAS-Boxen (Interferon  $\gamma$  activated sequence) in Promotorbereichen binden [103,106].

Die Aktivierung von Stat-Proteinen erfolgt, wie für Stat1 und Stat3 gezeigt werden konnte, nicht nur durch Tyrosinphosphorylierungen, sondern auch durch Serin-Phosphorylierung [107], die die Effizienz des Transkriptionskomplexes steigert [102].

Neben der Aktivierung von Signalwegen ist physiologisch auch deren Abschaltung sehr wichtig. So wird der Jak/Stat Weg durch die Expression von SOCS (suppressor of cytokine signalling) [84,108,109], SSI-1 (Stat induced Stat inhibitor-1) [85] oder JAB [86] gehemmt. JAB beispielsweise kann einerseits direkt an die Jak Kinasen binden und so die Rezeptorphosphorylierung und die Aktivierung von Stat Faktoren verhindern, andererseits bindet JAB auch an Stat-Bindestellen an Rezeptoren sowie an Stat-DNA Elemente und hemmt die Stat Aktivität somit auch kompetitiv [86].

### 1.7. Transport hydrophiler Moleküle in lebende Zellen

Lange Zeit galt in der Zellbiologie das Dogma, dass hydrophile Substanzen nur durch Endocytose in das Cytoplasma von Zellen aufgenommen werden können. Im

Jahr 1991 konnte dann aber gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Antennapedia (Antp) aus *Drosophila melanogaster* die Fähigkeit hatte, Zellmembranen zu durchqueren und in Cytoplasma und Kern von lebenden Zellen zu gelangen, ohne dass dafür ein aktiver Transportmechanismus erkennbar war. Es zeigte sich, dass für dieses Verhalten die 60 Aminosäuren lange DNA-Bindedomäne (Homöodomäne) des Transkriptionsfaktors verantwortlich war. Die Homöodomäne internalisiert sowohl bei 37 °C, als auch bei 4 °C in lebende Zellen, was klassische Endocytose als Transportmechanismus ausschließt. [110,111]. Proteine mit Homöodomänen (Homöoproteine), sind eine eigene Klasse von Transkriptionsfaktoren, die zuerst in *Drosophila* beschrieben wurden [112]. Sie spielen vor allem in der Ontogenese eine wichtige Rolle und sind inzwischen in den meisten eukaryotischen Organismen nachgewiesen worden. Homöoproteine binden in den Promotoren ihrer Zielgene an DNA-Abschnitte mit der Sequenz (ATTA)<sub>n</sub>, die DNA-Bindung erfolgt durch die hochkonservierte 60 AS Homöodomäne [113].

Nähere Untersuchungen der Homöodomäne von Antennapedia (Antp-HD) zeigten schließlich, dass die nur 16 Aminosäuren lange dritte Helix (AS: 43→58) der Antp-HD für die membrandurchdringenden Eigenschaften der Homöodomäne verantwortlich ist [114].

R-Q-I-K-I-W-F-Q-N-R-R-M-K-W-K-K

**Abb. 1.7-1** Sequenz der dritten Helix der Antennapedia Homöodomäne (43@58); die für die Internalisierung in Zellen wichtigen Tryptophanreste sind rot gekennzeichnet

Stellt man die dritte Helix der Antp-HD synthetisch her, so wird auch dieses kurze Peptid (im folgenden Antennapediapeptid (AP) genannt) genau wie die Homöodomäne von eukaryotischen Zellen ohne Energieverbrauch aufgenommen

(Abb. 1.7-1) [115]. Das synthetisch hergestellte Antennapediapeptid nimmt in Lösung eine  $\alpha$ -helikale Struktur ein und hat, bedingt durch die Zusammensetzung aus basischen und hydrophoben Aminosäureresten, amphipatische Eigenschaften. Durch Mutationsanalysen konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl die Struktur, als auch die amphipatischen Eigenschaften des AP keine Rolle bei der Aufnahme in Zellen spielen [115]. Mit einer inversen (58→43) und einer aus D-Aminosäuren bestehenden Variante des Antennapediapeptids, konnte außerdem eindeutig nachgewiesen werden, dass der Transport rezeptorunabhängig ist, da die Varianten in gleichem Maße in die Zellen aufgenommen werden wie das Originalpeptid [115]. Entscheidend für die Internalisierung sind die beiden Tryptophanreste (Abb. 1.7-1) des Peptids. Werden diese gegen Phenylalanine ausgetauscht, so verliert das AP die Fähigkeit Plasmamembranen zu durchdringen [114].

Die wahrscheinlichste Erklärung für die Internalisierung des Antennapediapeptids ist, dass sich positiv geladene Aminosäurereste des Peptids an negativ geladene Phospholipide von Zellmembranen anheften. Einer der beiden Tryptophanreste destabilisiert dann die Plasmamembran, so dass sich Micellen bilden in deren hydrophilen Innenraum das AP eingeschlossen ist. Abschließend wird der Inhalt der Micelle ins Cytoplasma entlassen (Abb. 1.7-2 ) [116,117].

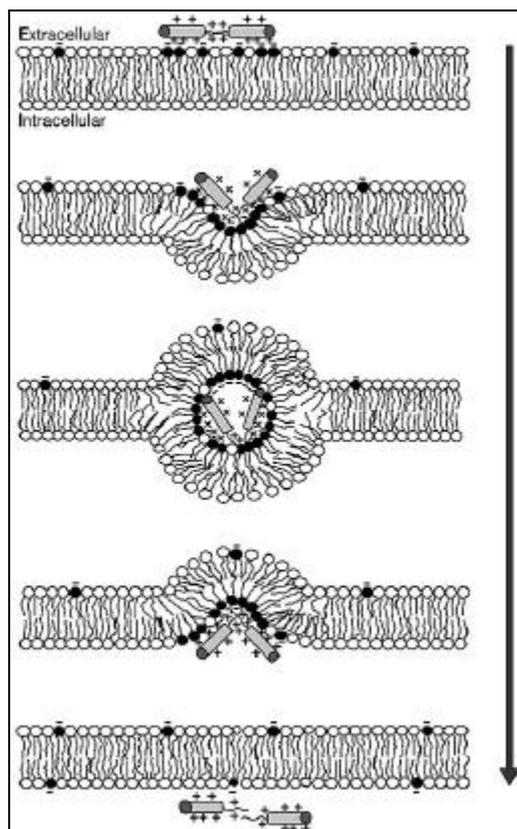


Abb. 1.7-2 Schematische Darstellung der Internalisierung des Antennapediapeptids [116]; © *Current Opinion in Neurobiology* 1996

### 1.7.1. Transport durch das Antennapediapeptid

Bei der Analyse des Antennapediapeptids zeigte sich, dass es in der Lage ist andere hydrophile Makromoleküle, u.a. auch Oligopeptide, in Zellen zu transportieren und somit als Vektor zu dienen. Damit andere Peptide (Cargo peptide) von dem Antennapediapeptid transportiert werden, müssen sie entweder direkt bei der Herstellung mit dem AP zusammen synthetisiert werden, oder über eine Disulfidbrücke mit dem Vektor gekoppelt werden. Letztere Methode erfordert es, dass sowohl das AP, als auch das Cargo peptide mit je einem zusätzlichen terminalen Cystein hergestellt wird, dabei spielt es für den erfolgreichen Transport des Cargo peptides keine Rolle, ob es mit dem C- oder dem N-Terminus des AP verküpft ist [116,118]. Bei der Kopplung der beiden Peptide wird zunächst die freie Thiolgruppe des Cargo peptides mit DTT (Dithiothreitol)

oder auch TCEP (Tris-(2-carboxyethyl)phosphinhydrochlorid) reduziert. Das Cargopeptid wird dann in äquimolarem Verhältnis mit dem Antennapediapeptid zusammengebracht, dessen Cystein mit einer nPys- (3-Nitro-2-Pyridinsulfenyl) Schutzgruppe versehen ist. Die reduzierte Thiolgruppe des Cargopeptids greift die Geschützte des Vektorpeptids an, was schließlich zur Kopplung der beiden Peptide über eine Disulfidbrücke führt (Abb. 1.7-3).

Nach dem Transport ins Cytoplasma wird die Disulfidbrücke des gekoppelten Peptids im reduzierenden Milieu der Zelle wieder gespalten (Abb. 1.7-2) und das Cargopeptid freigesetzt. Dies ist ein erheblicher Vorteil gegenüber den über eine normale Peptidbindung verknüpften Peptiden, da Cargopeptide, die einmal ins Cytoplasma gelangt sind, nicht mehr durch das AP aus der Zelle heraustransportiert werden können.

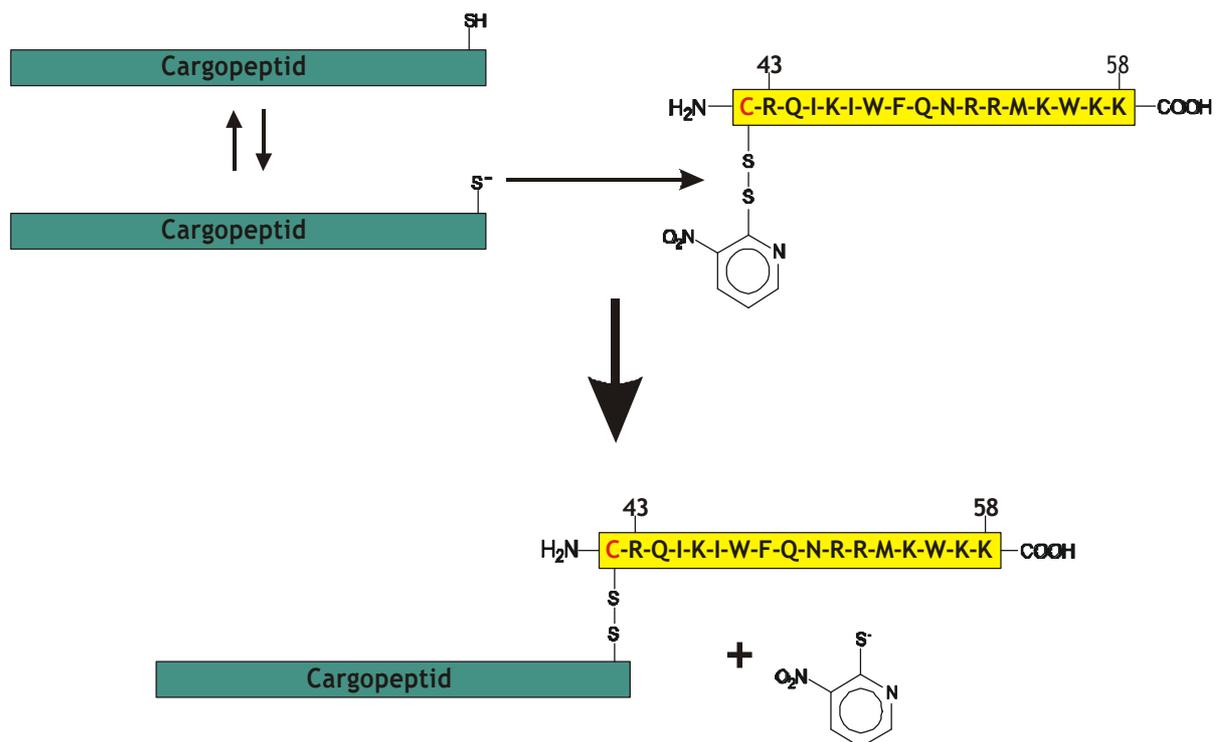


Abb. 1.7-3 Schematische Darstellung der Kopplung des Antennapediapeptides mit einem Cargopeptid

### 1.7.2. Internalisierung von Stat6 hemmenden Peptiden durch das Antennapediapeptid

Bei der Entwicklung von Inhibitoren, die die Signalweiterleitung bestimmter Rezeptoren hemmen, richtete sich das Hauptaugenmerk zunächst meist auf den Rezeptor selbst oder seinen Liganden. Diesem Ansatz folgend, sind im IL-4/IL-13 System unterschiedliche Inhibitoren in der Entwicklung, wie z.B. Antikörper gegen IL-4 [119], eine antagonistische Mutante von IL-4 [63,120] oder eine lösliche Form der extrazellulären Domäne der IL-4R $\alpha$  Kette [121-123].

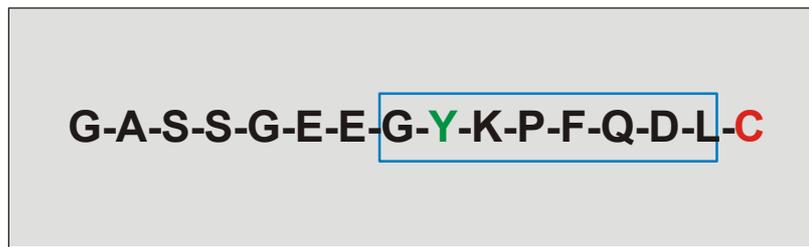
Neben der Hemmung von Liganden oder Rezeptoren bietet sich die spezifische Hemmung von intrazellulären Signalmolekülen als Alternative an. Besonders interessant ist dabei die Störung der Wechselwirkung der Signalmoleküle untereinander und mit dem Rezeptor, da diese über Domänen wie PTB oder SH2 stattfinden. Bei diesen Interaktionsdomänen erkennen sich die Bindungspartner durch kurze, lineare Peptidsequenzen [89,124-126]. Durch das Antennapediapeptid ist es möglich geworden, andere Peptide in lebende Zellen zu transportieren, ohne diese zu schädigen. Daher ist es naheliegend, kurze aus den Consensussequenzen für SH2 oder PTB Domänen von Signalmolekülen abgeleitete agonistische oder antagonistische Peptide als potentielle Inhibitoren in Zellen zu schleusen.

Bei der IL-4 Signaltransduktion bietet sich dafür besonders Stat6 an, da es ausschließlich mit der IL-4R $\alpha$ -Kette interagiert [109]. Stat6 knockout Mäuse zeigen einen normalen gesunden Phänotyp. Lediglich die Bildung von T<sub>H</sub>2 Zellen und der IgE-Klassenwechsel sind stark gestört, wodurch sie vor allergischen Erkrankungen geschützt sind [127-129]. Dies zeigt, dass Stat6 auch im physiologischen System ausschließlich bei der T<sub>H</sub>2 Differenzierung eine Rolle spielt.

In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass Peptide, die aus der Sequenz der IL-4R $\alpha$ -Kette um Y606 abgeleitet wurden, Stat6 aus Zellsaten mit einer K<sub>D</sub> von 300 nM binden können [77,103].

In dieser Arbeit wird nun untersucht, ob ein solches Stat6 bindendes Peptid (Stat6BP) (Abb. 1.7-4), nachdem es mit dem Antennapediapeptid in Zellen

transportiert wurde, in der Lage ist Stat6 zu binden und intrazellulär als Inhibitor zu wirken.



*Abb. 1.7-4 Peptidsequenz aus der IL-4Ra-Kette um Y606. Die blau eingerahmte Sequenz kann Stat6 mit 300 nM binden [103] und soll so die Anlagerung an den Rezeptor verhindern, wobei das grün markierte Tyrosin als Phospho-Tyrosin vorliegen muss. Das rot markierte Cystein dient zur Kopplung an das Antennapediapeptid.*

## 1.8. Ziel der Arbeit

IL-4 ist aufgrund seiner kritischen Wirkung für die Differenzierung von T- und B-Zellen einer der entscheidenden Regulatoren des Immunsystems. Die spezifische Hemmung einzelner Komponenten der komplexen Signaltransduktion von IL-4 ermöglicht es, nachgeschaltete Komponenten der Signalkaskade zu identifizieren und etwaige Verbindungen zwischen einzelnen Komponenten aufzudecken. Die Entwicklung spezifischer Inhibitoren ist aber auch pharmakologisch bedeutsam, da hochspezifische Hemmstoffe die Möglichkeit etwaiger Nebenwirkungen beim Einsatz als Medikament stark begrenzen.

Hauptanliegen der folgenden Arbeit war die Etablierung eines variablen Vektorsystems, auf Basis des zellpermeablen Antennapediapeptids, um Peptide und andere hydrophile Substanzen in Zellen schleusen zu können. Dadurch sollte ein Peptid, für das in vitro die Bindung an Stat6 gezeigt worden ist, in lebende Zellen geschleust werden, um die IL-4 Signalweiterleitung intrazellulär zu hemmen.

Die IL-4 induzierte Phosphorylierung und Hemmung von Stat6 wurde durch spezifische Immunpräzipitation und anschließenden Nachweis im Western Blot getestet. Zur Klärung der Spezifität der Wirkung von Stat6BP wurden auch das nah verwandte Stat5 auf etwaige Beeinflussung durch das Stat6 bindende Peptid untersucht.

Neben der Phosphorylierung wurde auch der Einfluß des Stat6BP auf ein Stat6 kontrollierten Reportergens bestimmt.

Ein weiteres Ziel bei dieser Arbeit war der prinzipielle Nachweis, daß die spezifische Bindung der Stat6-SH2 Domäne durch ein Peptid die Aktivierung von Stat6 in intakten Zellen verhindern kann.