

1. EINLEITUNG

1.1. Definition und Einteilung der Zytokine

Zytokine sind sezernierte Proteine „zellulären“ Ursprungs mit vielfältigen regulatorischen Effekten und werden von fast allen kernhaltigen Zellen im Körper produziert. Sie umfassen Familien von Regulatoren wie Interleukine (IL), Tumornekrosefaktoren (TNF), Interferone (IF) und bestimmte Wachstumsfaktoren.

Es gibt Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu anderen regulatorischen Proteinen wie Wachstumsfaktoren und Hormonen, die auch an der extrazellulären Signalübertragung beteiligt sind:

- Gemeinsamkeiten sind die strukturellen Merkmale, die sich auch in der Ähnlichkeit ihrer Rezeptoren widerspiegeln.
- Entgegen Wachstumsfaktoren, die konstitutiv von speziellen Geweben oder Zellen hergestellt werden, werden die meisten Zytokine von vielen verschiedenen Zelltypen gebildet. Werden sie nur von lymphoiden Zellen produziert, wie im Falle von IL-2 und IFN γ , dann ist diese Zytokinproduktion nur eine von zahlreichen Funktionen dieser Zellen.
- Während Hormone in die Zirkulation abgegeben werden und in größerer Entfernung wirken, werden Zytokine transient hergestellt und üben ihre Wirkung über eine kurze Distanz aus.
- Im Unterschied zu den Polypeptidhormonen, mit Ausnahme des Insulins, die nur auf bestimmte Zielzellen wirken, sind viele Zytokine pleiotrop, d.h. sie beeinflussen eine Vielzahl von Zellen und Geweben.
- Strukturell unterschiedliche Zytokine, z.B. IL-1 und TNF, können, im Gegensatz zu Hormonen, gleiche Wirkungen haben.

Die Einteilung von Zytokinen dient grundsätzlich eher der Orientierung und stellt eine Vereinfachung des komplexen Zytokinnetzwerkes dar. Strukturelle Merkmale, ihrer Wechselwirkung mit Rezeptorklassen oder die Funktion von Zytokinen sind nur einige der zahlreichen Kriterien, nach denen Zytokine eingeteilt werden.

1.1.1. Entdeckung und Nomenklatur

Bereits in den 20er und 30er Jahren studierte man die Migration von Phagozyten sowie das Absterben von Makrophagen nach Antigenkontakt und beobachtete, dass Produkte von aktivierten Leukozyten Gefäßwände attackieren können (Rich and Lewis, 1932; Zinsser, 1926). Bei den Untersuchungen der Pathogenese des Fiebers vermutete Menkins 1943 eine von Leukozyten sezernierte, pyrogene Substanz, die er „Pyrexin“ nannte. Schon 1955 fanden Atkins und Wood einen zirkulierenden pyrogenen Faktor, den sie als „Endogenes Pyrogen“ (EP) bezeichneten (Atkins, 1955). Dieser wurde 1977 von Dinarello aufgereinigt (Dinarello *et al.*, 1977). Erst nach der Klonierung von Interleukin-1 β fand man 1984 heraus, dass EP und ein als *Lymphocyte Activating Factor* (LAF) bezeichneter endogener Mediator identisch waren (Auron *et al.*, 1984).

Eine weitere Phase der Zytokinforschung begann mit der Entdeckung des *Macrophage Migration Inhibitory Factor* (MIF) von Bloom und Bennett (Bloom and Bennett, 1966). 1969 prägten Dumonde und Mitarbeiter den Begriff „Lymphokin“ für Antigen-unspezifische Polypeptid-Mediatoren, die von Lymphozyten produziert werden (Dumonde *et al.*, 1969). Die Beobachtung, dass LAF/IL-1 β von Monozyten sezerniert wurde, führte zur Einführung des Begriffs „Monokin“. Letztlich wurde der Begriff „Zytokin“ von Cohen eingeführt, als bekannt wurde, dass Zellen unterschiedlichster Herkunft Lymphokine bzw. Monokine produzieren können (Cohen *et al.*, 1974).

Die Bezeichnung „Interferon“ ist ein Produkt der Virologieforschung und begann 1957 mit der Beschreibung eines Faktors, der von virusinfizierten Zellen gebildet wurde und antivirale Resistenz auf andere Zellen übertragen konnte (Isaaks and Lindenmann, 1957).

1992 wurde der Begriff „Chemokin“ auf dem *Third International Symposium on Chemotactic Cytokines* festgelegt und stellt die Kurzform für *Chemotactic Cytokine* dar. Die von diesen Molekülen gebundenen Rezeptoren werden nach der Struktur der Chemokinfamilie bezeichnet (CXCR1-5, CCR1-9).

Auf dem *Second International Lymphokine Workshop* 1978 wurde der Begriff „Interleukin“ eingeführt, um eine systematische Nomenklatur für Proteine zu erhalten, die als Kommunikationssignal zwischen Leukozytenpopulationen fungieren können. Von der *World Health Organization* und den *International Union of Immunological Societies* (WHO/IUIS) wird ein „IL“-Name für ein neues Molekül unter folgenden Voraussetzungen vergeben:

- Nach Klonierung, Expression und Reinigung unterscheidet sich das Molekül von bisherigen Interleukinen,
- es wird von immunologischen Zellen natürlicherweise produziert,
- es zählt nicht zu einer Wirkstofffamilie, deren Hauptfunktion außerhalb des Immunsystems liegt
- und es kann anders nicht besser beschrieben werden.

1.2. Interleukin 16

Bereits 1969 wurde die Einwanderung von mononukleären Zellen in Entzündungsherde mit einem lymphozytären chemotaktischen Faktor in Verbindung gebracht (Ward *et al.*, 1969). 1982 identifizierten Cruikshank und seine Mitarbeiter einen 14,4 kDa großen Faktor in Überständen von mit Concanavalin A (ConA) stimulierten PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells), der für Rattenlymphozyten chemotaktisch aktiv war (Center and Cruikshank, 1982; Cruikshank and Center, 1982). Kurze Zeit später berichteten Van Epps und Mitarbeiter von der Entdeckung eines analogen Zytokins, das von CD8⁺-Zellen produziert wurde und auf humane CD4⁺-T-Lymphozyten chemotaktisch wirkte (Potter and Van Epps, 1986; Van Epps *et al.*, 1983a; Van Epps *et al.*, 1983b). Dieselbe Herkunft und Wirkung beschrieb auch die Cruikshank-Gruppe für ihren *Lymphocyte Chemotactic Factor* (LCF) (Berman *et al.*, 1985), welcher zusätzlich die Expression von CD25 (α -Kette des IL-2-Rezeptors) und von HLA-DR induzierte. Diese konnte ebenso wie die Migration durch Fab-Fragmente des CD4-Antikörpers Leu3a inhibiert werden (Cruikshank *et al.*, 1987). Aus hypersensibilisierten Hautpartien isolierte man den *Epidermal Lymphocyte Chemotactic Factor* (ELCF), der selektiv chemotaktisch auf CD4⁺/CD45RO⁺-Zellen

wirkte, dessen Molekulargewicht aber nicht bestimmt werden konnte (Zachariae *et al.*, 1992; Zachariae *et al.*, 1993).

1994 wurde das von Cruikshank und Mitarbeitern klonierte LCF vom *IUIS/WHO Standing Committee on Interleukin Designation* in Interleukin 16 (IL-16) umbenannt (Cruikshank *et al.*, 1994; Anonymous, 1996a; Anonymous, 1996b; Anonymous, 1996c).

1.2.1. Expression von IL-16

Zu den IL-16-produzierenden Zellen zählen CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten (Cruikshank *et al.*, 1994; Center *et al.*, 1996; Laberge *et al.*, 1995; Laberge *et al.*, 1996), Mastzellen (Rumsaeng *et al.*, 1997; Laberge *et al.*, 1997), Eosinophile (Cheng *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 1996), B-Lymphozyten (Kaser *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2000), CD34⁺-Zellen (Majka *et al.*, 2001) und Dendritische Zellen (Reich *et al.*, 2001; Kaser *et al.*, 1999) sowie einige Typen von Epithelzellen (Laberge *et al.*, 1997; Bellini *et al.*, 1993; Arima *et al.*, 1999; Little *et al.*, 2001), Fibroblasten (Franz *et al.*, 1998; Pritchard *et al.*, 2002; Scala *et al.*, 1997; Sciaky *et al.*, 2000) und Neuronale Zellen des Kleinhirns und des Hippocampus (Schluesener *et al.*, 1996; Kurschner and Yuzaki, 1999; Schwab *et al.*, 2001). In diesen Zellen konnte die Synthese der mRNA nachgewiesen werden, während das Zytokin IL-16 ohne Stimulus nur von CD8⁺-T-Zellen prozessiert wird.

Die Zielzellen von IL-16 sind T-Lymphozyten, Eosinophile, Monozyten, Dendritische Zellen, Neuronale Zellen und Pro-B-Zellen. Der Einfluss von IL-16 bezüglich Zellaktivierung und Zellzyklus wurde bisher am besten in T-Lymphozyten beschrieben.

Tab. 1: Vorkommen von IL-16-mRNA bzw. Protein

Die Synthese der mRNA von IL-16 erfolgt konstitutiv oder ist durch einen Stimulus (rechte Spalte) induzierbar. Das sezernierte Zytokin wird ohne Stimulus (Spalte „IL-16-Protein“) nur von CD8⁺-T-Zellen gebildet. *nur für einige Zelltypen nachgewiesen.

Abk.: PMA, Phorbol-12-myristat-13-acetat; C5a, Komplement-komponente 5a; GM-CSF, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor; TGF β , Transformierender Wachstumsfaktor β ; TNF α , Tumornekrosefaktor α (Tabelle modifiziert nach Cruikshank *et al.*, 2000).

Zelltyp	mRNA	IL-16-Protein	Stimulus
CD8 ⁺ -T-Zellen	konstitutiv	vorhanden	Histamin, Serotonin, Antigen, Mitogen
CD4 ⁺ -T-Zellen	konstitutiv	nicht nachgewiesen	Antigen, Mitogen
Mastzellen	konstitutiv induzierbar	nicht nachgewiesen	PMA, C5a
Eosinophile	konstitutiv	nicht nachgewiesen	GM-CSF
Dendritische Zellen	konstitutiv	nicht nachgewiesen	IL-4, GM-CSF
Epithelzellen*	induzierbar	nicht nachgewiesen	TGF β , TNF α
Neuronale Zellen*	konstitutiv	nicht nachgewiesen	nicht untersucht
Fibroblasten*	konstitutiv	nicht nachgewiesen	IL-1 β , TGF β

1.3. Biologische Funktionen von IL-16

1.3.1. CD4-Interaktion

IL-16 wirkt chemotaktisch auf CD4⁺-Zellen. Diese sind Bestandteil des Entzündungsprozesses. Somit beeinflusst IL-16 viele chronische Erkrankungen wie Asthma, Sarkoidose, Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Rheumatoide Arthritis, Systemischer Lupus Erythematosus, Multiple Sklerose sowie Atopische Dermatitis (Center *et al.*, 2000). Die spezifische Wirkung auf

CD4⁺-Zellen ließ vermuten, dass CD4 ein physiologischer Rezeptor für IL-16 ist. Cruikshank und Mitarbeiter untersuchten und bestätigten die Interaktion von CD4 und IL-16 durch folgende Ergebnisse:

- Mit Anti-CD4-Antikörpern kann mittels Affinitätschromatographie natives sowie rekombinantes IL-16 aus Zellkulturüberständen isoliert werden (Cruikshank *et al.*, 1991; Rand *et al.*, 1991).
- Rekombinantes IL-16 aus E.coli kann mit löslichem, rekombinatem CD4 durch Zugabe von Anti-CD4-Antikörpern präzipitiert werden (Cruikshank *et al.*, 1994).
- Erst nach der rekombinanten Expression von CD4 wird die CD4-negative murine T-Zell-Hybridomalinie L3T4⁻ IL-16-responsiv, wobei der zytoplasmatische Teil von CD4 für die initiierte Signaltransduktion (Anstieg von IP₃ und intrazellulärem Calcium über eine Aktivierung von p56^{lck} und Proteinkinase C) vorhanden sein muss (Parada *et al.*, 1996; Cruikshank *et al.*, 1991; Ryan *et al.*, 1995).
- Die chemotaktische Wirkung von IL-16 wird durch Antikörper gegen das D4-Epitop von CD4 (OKT4), inhibierende Peptide dieser Region sowie die CD4-Mutagenese inhibiert (Liu *et al.*, 1999; Theodore *et al.*, 1996).
- Weisen aktivierte CD8⁺-T-Lymphozyten eine erhöhte Expression von CD4 auf, wirkt IL-16 chemotaktisch auf diese (Kitchen *et al.*, 2002).

Center *et al.* stellten aufgrund der publizierten Daten zur CD4-Interaktion ein hypothetisches Modell auf, bei dem es durch die IL-16-Interaktion zu einem Wechsel von einer immunologischen zu einer inflammatorischen Funktion von CD4 kommt (Center *et al.*, 2000).

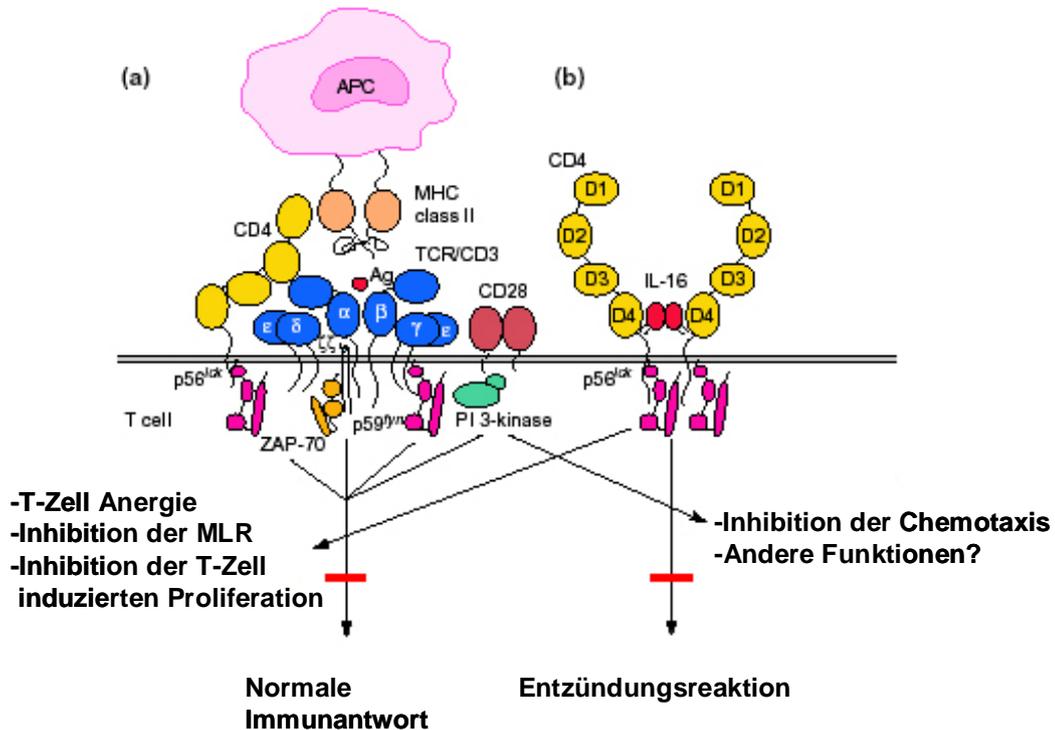


Abb. 1: Hypothetische Rolle von IL-16 und CD4 beim Wechsel zwischen immunologischer und inflammatorischer Funktion

(a) Die Rolle von CD4 bei der Antigen-Aktivierung. Während der normalen Immunantwort ist CD4 direkt assoziiert mit MHC II-Molekülen über die D1-Domäne, mit dem T-Zellrezeptor (TCR) über die Domänen D2-D3 und mit ZAP-70 über eine p56^{lck}-Interaktion. Daraus resultiert eine verstärkte Signaltransduktion über den T-Zellrezeptor und zelluläre Aktivierung. Gleichzeitig wird die IL-16-induzierte Chemotaxisfunktion inhibiert (Center *et al.*, 2000).

(b) Die hypothetische Rolle von CD4 nach IL-16-Bindung. CD4 ist isoliert vom T-Zellrezeptor-Komplex, oligomerisiert und induziert TCR-unabhängige Signalwege. Diese resultieren in einem pro-inflammatorischen Zustand, welcher charakterisiert ist durch gezielte Zellbewegung und Zellzyklus-Progression, begleitet von T-Zell-Anergie.

Abk.: APC, Antigen Presenting Cell, PI 3-kinase, Phosphoinositide 3-Kinase, ZAP-70, Tyrosine Kinase ζ -associate Protein-70, p56^{lck}, Tyrosine Kinase p56^{lck}, D1-4, CD4-Domänen, MLR, Mixed Lymphocyte Reaction (Abbildung modifiziert nach Center *et al.*, 2000).

Es konnte mit Hilfe von CD4^{-/-}-Knock-Out-Mäusen gezeigt werden, dass es sich sowohl für die chemotaktische Wirkung als auch für die Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-15) um CD4-unabhängige Funktionen von IL-16 handelt (Mathy *et al.*, 2000a; Stoitner *et al.*, 2001). Für die CD4/IL-16-Interaktion stehen nach wie vor grundlegende Bestimmungen der Bindungskinetik, z.B. die Messung der Dissoziationskonstanten, aus.

1.3.2. Immunmodulation

Die verschiedenen Aktivitäten des pleiotropes Zytokins IL-16, können bezüglich Inflammation und Zellproliferation fördernd oder inhibierend sein. Neben den bereits erwähnten Wirkungen wie die Infiltration von CD4⁺-Zellen in Entzündungsherde und das Hervorrufen von Anergie nach Bindung an das CD4-Molekül wird bei CD4⁺-T-Zellen die Induktion der Oberflächenexpression von IL-2R α und β sowie eines G₀-G₁-Zellzykluswechsels beschrieben (Parada *et al.*, 1998). Die in Lymphozyten induzierte Expression von IL-2R α und HLA-DR weist auf ein Aktivierungs- und indirektes Proliferationspotenzial hin (Katz *et al.*, 1994; Cruikshank *et al.*, 1994). Mit IL-16 stimulierte humane PBMC zeigen eine Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-15 (Mathy *et al.*, 2000b) und eine Hemmung der *Mixed Lymphocyte Reaction* (MLR) (Theodore *et al.*, 1996). Für die Inhibition der MLR scheinen aminoterminaler Bereiche von IL-16 wichtig zu sein, während an der Chemotaxis eher carboxyterminale Regionen beteiligt sind (Adler, 2000; Nicoll *et al.*, 1999).

Pinsonneault *et al.* wiesen nach, dass IL-16 unterschiedliche Effekte auf T-Zell Subpopulationen hat. Nach Antigen-Stimulation wird die Sekretion von Th2-Zytokinen blockiert, während die der Th1-Zytokine unbeeinflusst bleibt (Pinsonneault *et al.*, 2001). Im Maus-Modell wurde demonstriert, dass die Wirkung von IL-16 als chemotaktischer Faktor auf Th1-Zellen effektiver ist als auf Th2-Zellen. (Lynch *et al.*, 2003). Diese Wirkung auf Th1-Zellen kombiniert mit der selektiven Inhibition der Th2 Zytokinproduktion deutet auf eine Th1-dominierte T-Zell-Antwort hin. Verschiedene Studien zeigen, dass bei einer Behandlung mit IL-16-Antikörpern die Krankheitsparameter bei Th1-Krankheiten wie z.B. Crohn's disease (Keates *et al.*, 2000), delayed type hypersensitivity (Yoshimoto *et al.*, 2000) und Typ I Diabetes (Mi *et al.*, 2003) abgeschwächt werden. Diese Ergebnisse lassen auf einen proinflammatorischen Effekt von IL-16 bei diesen Erkrankungen schließen.

Die inhibierende Funktion von IL-16 dominiert in Th2-abhängigen Antigen induzierten Entzündungen der Lunge (DeBie *et al.*, 2002). IL-16 induziert somit Th1-Typ- und inhibiert Th2-Typ Entzündungsprozesse und Immunantworten (Abb. 2).

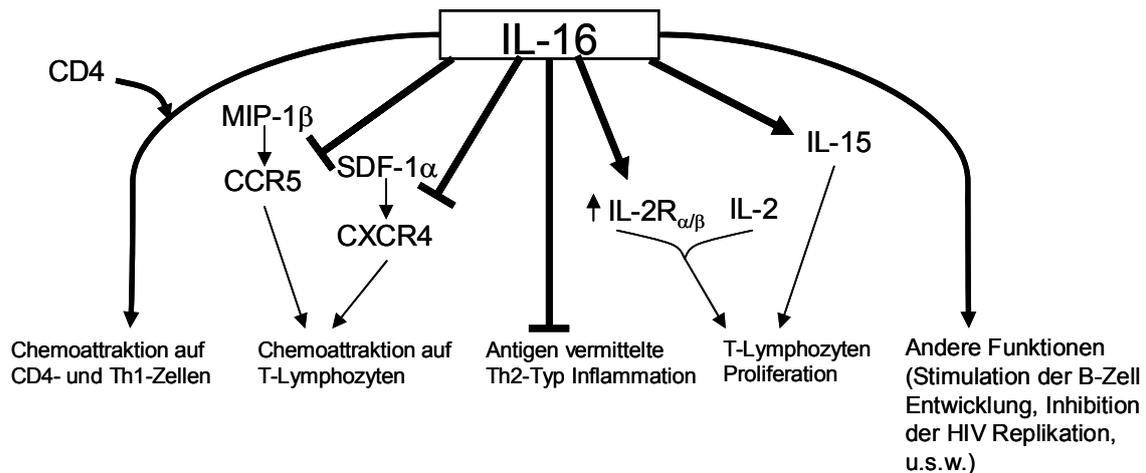


Abb. 2: Zusammenfassung der Funktionen von IL-16

IL-16 bindet an seinen Rezeptor CD4, induziert die Chemotaxis von CD4 positiven Th1-T-Zellen und inhibiert die Antigen vermittelte Th2-T-Zell Inflammation. Die IL-16/CD4 Interaktion kreuz-desensibilisiert CCR5 und CXCR4, was die MIP-1 β und SDF-1 α vermittelte T-Zell Chemoattraktion schwächt.

IL-16 induziert die Erhöhung der IL-2R α und β Expression, was zur Steigerung der IL-2 vermittelten T-Zell Proliferation führt. Ebenso wird die IL-15 vermittelte T-Zell Proliferation während der Anwesenheit von IL-16 erhöht. (Abbildung modifiziert nach Wilson *et al.*, 2004).

—| Funktion blockiert —> Funktion gefördert

1.3.3. Anti-retrovirale Aktivität

Der anti-retrovirale Effekt von IL-16 wurde in mehreren Arbeitsgruppen nachgewiesen (Baier *et al.*, 1995; Amiel *et al.*, 1999; Idziorek *et al.*, 1998; Maciaszek *et al.*, 1997; Truong *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1997). Als Mechanismus hierfür konnte die über Signaltransduktionswege vermittelte Hemmung des HIV-1-Long-Terminal-Repeats (HIV-1-LTR) nachgewiesen werden (Maciaszek *et al.*, 1997). Auch die Produktion von anti-retroviralen β -Chemokinen wie MIP-1 α , MIP-1 β (*Macrophage Inhibiting Protein 1 α/β*) und RANTES (*Regulated Upon Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*), die in Anwesenheit von IL-16 von humanen PBMC induziert werden, kann zu dem Effekt beitragen. Diese binden an ihre Chemokinrezeptoren, die von HIV als Kofaktoren bei der Fusion mit der Zelle benötigt werden, und blockieren so den Infektionsprozess (Feng *et al.*, 1996; Bleul *et al.*, 1996). Zusätzlich triggern sie die Internalisierung ihres Rezeptors, der dann für kurze Zeit von der Zellmembran verschwindet (Amara *et al.*, 1997). Für den Anti-CD4-Antikörper 13B8-2 konnte eine indirekte Inhibition

des HIV-1-LTR durch die Beeinflussung bestimmter Signaltransduktionswege gezeigt werden, die auch von IL-16 aktiviert werden könnten (Benkirane *et al.*, 1993; Benkirane *et al.*, 1995; Berube *et al.*, 1996).

Zudem existiert eine Korrelation zwischen der Abnahme der IL-16-Konzentration im Plasma und der Krankheitsprogression bei der HIV-1-Infektion (Amiel *et al.*, 1999) sowie ein drastischer Anstieg von IL-16 im Serum nach erfolgreicher HIV-Proteaseinhibitor-Therapie mit Indinavir (Bisset *et al.*, 1997). Außerdem hat man bei HIV-1-Infizierten einen Anstieg des IL-16-Serumspiegels beobachtet, der ein Maximum im Krankheitsstatus der CDC-Klasse B2 erreicht und dann wieder abfällt (Bader *et al.*, 2001). Langzeitüberlebende (*Long-Term-Non-Progressors*), die sich mit HIV-1 infiziert haben aber stabile CD4-Zellzahlen aufweisen, zeigen keinen bei der HIV-1-Infektion sonst zu beobachteten Abfall von IL-16 im Serum (Scala *et al.*, 1997).

1.4. Das Vorläuferprotein Pro-Interleukin 16

1.4.1. Sequenzanalyse und Genlokalisierung

Auch IL-16 wird wie IL-1 β , IL-18 (Dinarello *et al.*, 1998), FGF (*Fibroblast Growth Factor*), Endostatin und andere Zytokine über ein Vorläuferprotein synthetisiert. In einer Studie mit IL-16-Sequenzen von Primaten wurden Hinweise auf Fehler in der ursprünglichen, von Cruikshank *et al.* publizierten humanen Sequenz, gefunden (Cruikshank *et al.*, 1994). Bannert, *et al.* führten eine Reanalyse der gesamten humanen IL-16-Sequenz durch (Bannert, *et al.*, 1998), was zu der Erkenntnis führte, dass IL-16 in Form eines Precursors, Pro-Interleukin 16 (Pro-IL-16), synthetisiert wird (Baier *et al.*, 1997). Der offene Leserahmen kodiert für ein konserviertes Protein von 631 Aminosäuren, wobei lediglich ein carboxyterminales Fragment von 121 Aminosäuren sezerniert wird. Mit 86% weist dieser Bereich die höchste Homologie zwischen humanem und murinem IL-16 auf (Bannert *et al.*, 1998).

Das IL-16-Gen ist auf Chromosom 15q26.1 lokalisiert und besteht aus sieben Exons und sechs Introns. Es besitzt zwei Polyadenylierungsstellen und einen Promotor ohne TATA-Box. Der Promotor enthält zwei CAAT-Box-ähnliche Motive

und drei Bindungsstellen für GA-Bindungsproteine, wobei zwei dieser Motive Teil eines induzierbaren *Dyad Symmetry Element* (DSE) sind (Bannert *et al.*, 1999).

1.4.2. Die Spaltung des Pro-IL-16 und die neuronale Form

Das zytoplasmatische Pro-IL-16 weist keine Signalsequenz auf, wodurch der typische Sekretionsweg von Zytokinen nicht stattfinden kann. Das sezernierte IL-16 entsteht nach Spaltung des Vorläuferproteins zwischen Asp⁵¹⁰ und Ser⁵¹¹ (Baier *et al.*, 1997) (Abb. 3). *In vitro*-Untersuchungen zeigten, dass diese Schnittstelle von der Caspase-3 erkannt wird und dass diese als Aspartat-Protease die Spaltung vornehmen kann (Zhang *et al.*, 1998).

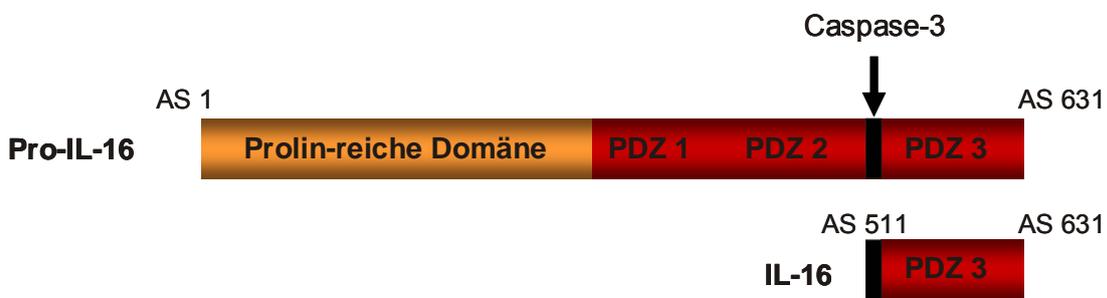


Abb. 3: Aufbau von Pro-IL-16 und IL-16

Pro-IL-16 besteht aus 631 Aminosäuren und enthält eine Prolin-reiche Domäne (orange) sowie drei PDZ-Domänen (rot). Das sezernierte Zytokin IL-16 wird nach Spaltung durch Caspase-3 gebildet und enthält die C-terminalen 121 Aminosäuren des Vorläuferproteins (AS 511-631).

Die neuronale Form des IL-16, neuronales humanes Interleukin 16 (nIL-16), besteht aus 1331 Aminosäuren und wird ausschließlich in Neuronen des Cerebellum und Hippocampus detektiert. Das humane IL-16 besitzt Analog zum murinen neuronalen IL-16 aminoterminal zwei weitere PDZ-Domänen sowie eine verlängerte Prolin-reiche Domäne und wird vermutlich über einen alternativen Promotor erzeugt (Kurschner and Yuzaki, 1999) (Abb. 4).



Abb. 4: Aufbau des neuronalen IL-16

Das neuronale IL-16 besteht aus 1331 Aminosäuren und enthält das lymphozytäre Pro-IL-16, welches der carboxyterminalen Hälfte des neuronalen Proteins entspricht, sowie zwei weitere PDZ-Domänen (PDZ 1, PDZ 2) und eine verlängerte Prolin-reiche Domäne.

1.4.3. Die Prolin-reiche Domäne von Pro-IL-16

In der aminoterminalen Hälfte des Pro-IL-16 sind 40 Proline vorhanden. Solche Prolin-reichen Domänen werden von verschiedenen Proteinstrukturen als Bindungspartner bevorzugt, z.B. von SH3- (*Src homology 3*) und WW-Domänen (Kay *et al.*, 2000). Letztere enthalten zwei konservierte Tryptophane im Abstand von ca. 20-22 Aminosäuren. Die Bindung zwischen Prolin-reicher Sequenz und SH3- bzw. WW-Domäne fungiert als Adapterprotein und dient als Bindungsstelle für weitere Proteine (Lodish *et al.*; Molekulare Zellbiologie; S. 924). In der Prolin-reichen Domäne von Pro-IL-16 befinden sich vier sogenannte PXXP-Motive, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht. Bei zwei dieser Motive handelt es sich um SH3-Bindungsdomänen der Klasse I, welche der Abfolge: positive AS - beliebige AS - hydrophobe AS - Prolin - beliebige AS - hydrophobe AS - Prolin (+X ψ PX ψ P) entspricht (Abb. 5) (Feng *et al.*, 1994; Lim *et al.*, 1994; Mayer and Eck, 1995; Kay *et al.*, 2000). Dieses Motiv wird von Proteinen mit SH3-Domänen erkannt. Sie bilden eine PP II-Helix aus, wobei sich die beiden Proline auf einer Seite der Helix befinden und dort mit Proteinen interagieren können. Aufgrund der starren Struktur können keine sehr festen Bindungen entstehen, dafür lassen sich diese schnell modifizieren und regulieren. Durch die Bindung der SH3-Bindungsdomäne an Prolin-reiche Regionen von Proteinen können diese in die Signalübertragung miteinbezogen werden. Proteine mit SH3-Domänen haben meist keine eigene Kinaseaktivität, sondern im Allgemeinen die Funktion, andere Proteine zu aktivierten Rezeptoren zu lotsen (Janeway *et al.*, Immunologie, S. 207).

SH3-Bindungsdomäne Klasse 1: $+X\psi\underline{P}X\underline{\psi}P$
 Pro-IL-16 PXXP-Motiv 1: $KGP\underline{P}VAP$
 Pro-IL-16 PXXP-Motiv 2: $KTL\underline{P}PGP$

Abb. 5: Die SH3-Bindungsdomäne der Klasse 1 (oben) und die beiden SH3-Bindungsdomänen der Prolin-reichen Domäne von Pro-IL-16 im Vergleich.

Neben den prolinhaltigen Motiven befindet sich eine auffällige Abfolge von sechs Serinen an Position 132-137 in der aminoterminalen Hälfte von Pro-IL-16, über deren Funktion noch keine Informationen vorliegen .

```

1 MDYSFDTTAE DPWVRISDCI KNLFSPIMSE NHGHMPLQPN ASLNEEEGTQ
51 GHPDGTPPKL DTANGTPKVY KSADSSTVKK GPPVAPKPAW FRQSLKGLRN
101 RASDPRGLPD PALSTQPAPA SREHLGSHIR ASSSSSIRQ RISSFETFSG
151 SQLPDKGAQR LSLQPSSGEA AKPLGKHEEG RFSGLLGRGA APTLVPQQPE
201 QVLSSGSPAA SEARDPGVSE SPPPGRQPNQ KTLPPGPDPL LRLSTQAE
251 SQGPVLKMP SQRARSFPLTR SQSCETKLLD EKTSKLYSIS SQVSSAVMKS
301 LLCLPSSISC AQTPCIPKEG ASPTSSSNED

```

Abb. 6: Aminosäuresequenz des aminoterminalen Bereichs von Pro-IL-16

In dem Bereich von AS 1-330 befinden sich 40 der insgesamt 48 Proline von Pro-IL-16. Die vier PXXP-Motive sind rot, die PXXP-Motive Klasse I fett dargestellt, die Abfolge der sechs Serine in blau.

1.4.4. Die drei PDZ-Domänen im Vorläuferprotein

Die Bezeichnung „PDZ“ stammt von den Anfangsbuchstaben der ersten drei Proteine, bei denen man die ca. 90 Aminosäuren großen Sequenzwiederholungen gefunden hat: PSD-95 (Postsynaptic Density-Protein, 95 kDa), DLG (Discs-large-Protein aus *Drosophila*) und ZO-1 (Zonula occludens 1-Protein) (Itoh *et al.*, 1993; Cho *et al.*, 1992; Willott *et al.*, 1993). Das Vorläuferprotein enthält neben der Prolin-reichen Domäne drei PDZ-Domänen (Bannert *et al.*, 1996). Sie werden auch als DHR (Discs large homology region) oder GLGF-Repeat bezeichnet und interagieren bevorzugt mit carboxyterminalen Bereichen von Peptiden und Proteinen. Viele Bindungspartner von PDZ-Domänen sind Transmembranproteine, darunter diverse Ionenkanäle (Irie *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1995), zelluläre Rezeptoren (Sato *et al.*, 1995) und Adhäsionsmoleküle (Itoh *et al.*, 1993). Andere Proteine mit PDZ-Motiven sind in Signaltransduktionskaskaden involviert (Tsunoda *et al.*, 1997) oder binden an Transkriptionsfaktoren (Poulat *et al.*, 1997).

PDZ-Domänen sind an der Organisation von Multiprotein-Signalkomplexen beteiligt und haben Funktionen bei der Zellpolarität sowie der Proteinsortierung (Harris and Lim, 2001; Sheng and Sala, 2001).

Meist besteht die Struktur von PDZ-Domänen aus sechs anti-parallelen β -Faltblättern und 1-3 α -Helices. Die Peptidliganden binden in einer hydrophoben Tasche zwischen einem β -Faltblatt und einer α -Helix und erzeugen einen zusätzlichen Strang. Je nach der zu erkennenden Konsensus-Sequenz des Liganden werden die PDZ-Domänen in verschiedene Klassen eingeteilt, wobei bis zu acht der letzten C-terminalen Aminosäuren des Liganden für die PDZ-Interaktion wichtig sein können (Sheng and Sala, 2001). Das sezernierte IL-16, welches die dritte PDZ-Domäne von Pro-IL-16 enthält, ist das einzige extrazelluläre Protein mit einem GLGF-Motiv. Ein Tryptophanrest verengt die Bindungsspalte der PDZ-Domäne im IL-16 (Muhlhahn *et al.*, 1998), so dass der klassische Bindungstyp fraglich ist (Abb. 7).

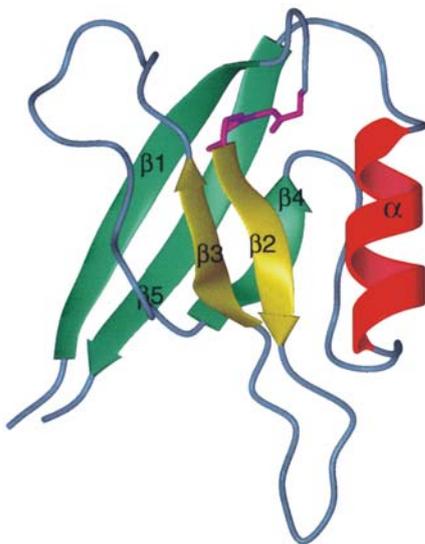


Abb. 7: Struktur der PDZ-Domäne von IL-16

Gezeigt ist die Ribbon-Darstellung der AS 28-118 von IL-16, welche fünf β -Faltblätter und eine α -Helix ausbilden. Das typische GLGF-Motiv ist in violett dargestellt. Eine Bindungstasche für Liganden befindet sich zwischen dem $\beta 2$ -Faltblatt und der α -Helix, welche durch ein Tryptophan verengt wird. (Abbildung modifiziert nach Muhlhahn *et al.*, 1998).

1.4.5. Funktionen von Pro-IL-16

Pro-IL-16 wird konstitutiv im Zytoplasma gebildet und ist dort lokalisiert. Nach Spaltung durch die Caspase-3 wird IL-16 als bioaktives Interleukin sekretiert und kann als Ligand für CD4 fungieren. Nukleäres Pro-IL-16 wird durch ein CcN-Motif gefördert (dual-phosphorylation regulated nuclear localization signal) und inhibiert die Transkription von Skp2 (S-phase Kinase-assoziiertes Protein) was den

cyclinabhängigen Kinase-Inhibitor p27Kip-Spiegel stabilisiert. Dieser Anstieg führt zu einer Arretierung des Zellzykluses G0/G1. (Zhang *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2002; Center *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2003; Center *et al.*, 2004). Wu *et al.* beschrieb, dass Pro-IL-16 in COS-Zellen im perinukleären Zytoplasma vorkommt. Nach einer Spaltung durch die Caspase-3 wird das C-terminale Ende als IL-16 sezerniert, während das N-terminale Fragment im Zellkern lokalisiert ist und dort die Arretierung des G0/G1 Zellzykluses induziert (Wu *et al.*, 1999). Dies zeigt, dass die Fähigkeit des Pro-IL-16 den Zellzyklus zu blockieren, im N-terminalen Teil des Proteins steckt.

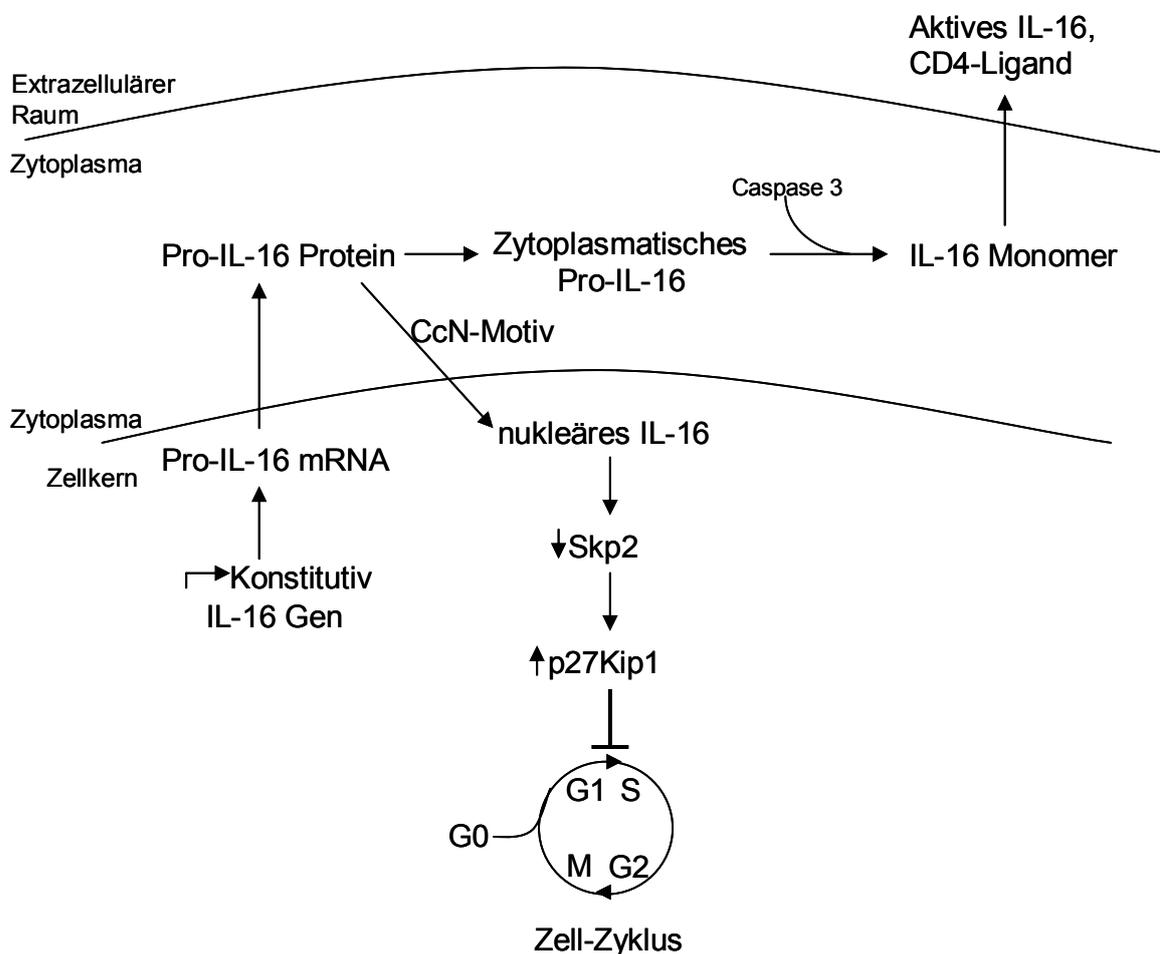


Abb. 8: Zusammenfassung der bisher bekannten Funktionen von Pro-IL-16.

Pro-IL-16 ist als Protein konstitutiv im Zytoplasma lokalisiert. Zytoplasmatisches Pro-IL-16 wird von der Caspase-3 gespalten und als aktives IL-16 sezerniert. Im Zellkern wird Pro-IL-16 von einem CcN-Motiv gefördert, was die Transkription von Skp2 vermindert, was wiederum zu einer Erhöhung des Zellzyklusinhibitors p27Kip1 führt. Dies hat die Arretierung des Zellzyklus zur Folge. (Abbildung modifiziert nach Wilson *et al.*, 2004).

Pro-IL-16 enthält zahlreiche Domänen die üblicherweise an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sind. Trotzdem sind die Funktionen dieses Vorläuferproteins weitestgehend ungeklärt. Die Protein-Bindungsmotive, die Homologie zwischen dem murinen und humanen Protein sowie das hohe Niveau an intrazellulärem Pro-IL-16 lassen eine Beteiligung an regulatorischen intrazellulären Prozessen vermuten.

Myosin Phosphatase Target Subunits (MYPT) wurde als Interaktionspartner der PDZ 2 Domäne durch Yeast-Two-Hybrid Screens identifiziert. Verwendet wurde das LexA-Hefesystem, das bereits erfolgreich zur Detektion von PDZ-Wechselwirkungen eingesetzt wurde. Mit diesem System wurden auch die Interaktionen der zwei aminoterminalen PDZ-Domänen des nPro-IL-16 mit verschiedenen Kationenkanälen nachgewiesen (Kurschner and Yuzaki, 1999). Eine Interaktion der zweiten PDZ-Domäne des Pro-IL-16, sowohl mit den regulatorischen Untereinheiten 1 und 2 der Myosin-Phosphatase als auch mit der Myosin-bindenden Untereinheit 85 (Myosin Binding Subunit, 85 kDa, MBS85) konnte von Bannert *et al.* nachgewiesen werden. Die Proteine Mypt2 und MBS85 weisen eine hohe strukturelle und funktionale Homologie zueinander und zu Mypt1, dem Pendant in der glatten Muskulatur, auf (Bannert *et al.*, 2003).

Myosin-Phosphatasen sind wesentlich in der Relaxation der glatten und quergestreiften Muskulatur beteiligt, befinden sich aber auch in allen nicht Muskelzellen, so z.B. auch in Lymphozyten und IL-16 exprimierenden Zellen. Dort regulieren sie viele kontraktile Prozesse, insbesondere Zellbewegung, Adhäsion oder Zytokinese. Sie sind in Transportprozesse sowie in das corticale Netzwerk involviert.

Die in unserer Arbeitsgruppe erzielten Ergebnisse der Interaktion von Pro-IL-16 mit Myosin Phosphatase Target Subunits entsprachen den für PDZ-Proteine zu erwartenden Assoziationen mit molekularen Komponenten des Zytoskeletts. Eine Zusammenfassung der möglichen Funktionen von Pro-IL-16 und nPro-IL-16, die sich aus dieser Assoziation ergeben sind in Abb. 9 dargestellt. Von Ren *et al.* wurde eine Assoziation von Pro-IL-16 mit einem Aktin-Bindeprotein, Lasp-1 beschrieben. Dieses Ergebnis unterstützt weiter die Vermutung, dass Pro-IL-16

mit molekularen Komplexen, die in die Modulation des Zytoskeletts involviert sind, wechselwirkt (Ren *et al.*, 2005).

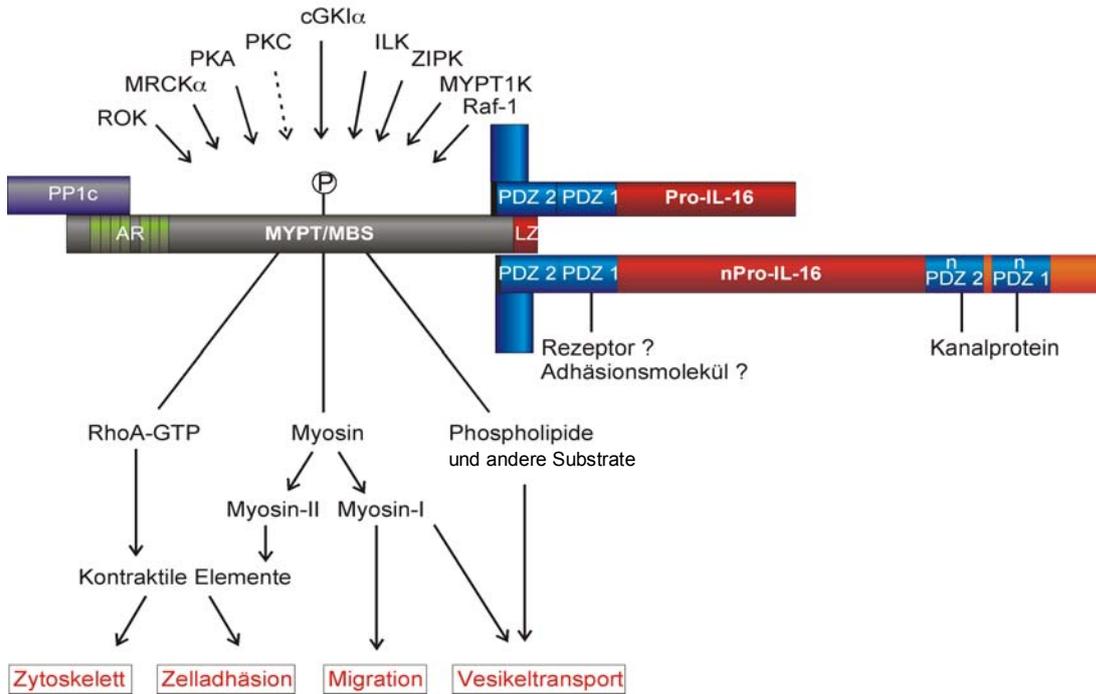


Abb. 9: Zusammenfassung der möglichen Funktionen von Pro-IL-16.

Die Mypt/MBS-Proteine sind über die Ankyrin-Repeats (AR) mit der katalytischen Phosphatase-Untereinheit (PP1c) verknüpft. Die Phosphatase-Aktivität wird über die Phosphorylierung (P) der MYPT/MBS-Untereinheit reguliert, an der verschiedene Kinasen beteiligt sind: ROK, MRCK α , PKA, PKC (indirekt), cGKI α , ILK, ZIPK, MYPT1K, Raf-1. Weitere Substrate der Mypt/MBS-Proteine sind RhoA-GTP, Myosin und Phospholipide. Durch die Interaktion der PDZ-Domäne 2 des Pro-IL-16/nPro-IL-16 mit den C-Termini der Leucin-Zipper-Motive (LZ) der Mypt/MBS-Proteine könnte die Regulation des Zytoskeletts, der Zelladhäsion, der Zellmigration oder des Vesikeltransports beeinflusst werden.

Abk.: ROK, RhoA-assoziierte Kinase; MRCK α , Myotonic dystrophy kinase-related CDC42 binding kinase; PKA, Proteinkinase A; PKC, Proteinkinase C; cGKI α , cGMP-abhängige Proteinkinase I α ; ILK, Integrin-linked kinase; ZIPK, Zipper interacting kinase; Mypt1K, Mypt1-Kinase; Raf-1, Raf-1-Kinase.

Das Aktin-Zytoskelett ist ein hoch flexibles System welches permanent Veränderungen unterzogen ist. Es spielt eine fundamentale Rolle bei der Funktion der lymphatischen Zellen, inklusive Antigen vermittelte Aktivierung von Rezeptoren und Thrombozyten (Acuto and Cantrell, 2000; Westerberg *et al.*, 2001; Gallego *et al.*, 1997), Adhäsion von Leukozyten an vasculären Zellen (Wojciak-Stothard *et al.*, 1999), Formation der Immunologischen Synapse (Grakoui *et al.*, 1999; Monks *et al.*, 1998), Endozytose (Qualmann *et al.*, 2000;

Jeng and Welch, 2001) und die Formation von Transport-Vesikeln (Stamnes, 2002) um nur einige zu nennen. Um all diese Funktionen zu erfüllen benötigt das Zytoskelett Plastizität und Dynamik. Erst nachdem das Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (WASP) und die Aktin-verwandten Proteine (actin-related proteins, Arps) entdeckt wurden, ist der Mechanismus, durch welchen das Aktin-Zytoskelett in hämatopoetischen Zellen reguliert wird, näher bekannt. Die Arps weisen eine 50 %ige Homologie zu Aktin auf. Ein Komplex aus den zwei Aktin-verwandten Untereinheiten Arp 2 und 3 (Arp 2/3) stimuliert die Aktinpolymerisation. Der Arp 2/3 Komplex bindet an Aktinfilamente, dient an der Keimbildungsstelle dem Zusammenbau von Aktinmonomeren und generiert verzweigte Aktinfilamente. Dies führt zu dem charakteristischen Aktin-Netzwerk. Die Stimulation der Keimbildungsaktivität des Arp 2/3 Komplexes setzt die Funktion des WASP oder seinen verwandten Proteinen voraus, welche mit dem aktivierten Arp 2/3 Komplex interagieren während dieser an membranverankerte GTPasen wie Cdc42 bindet (Uruno *et al.*, 2003).

1.5. Das YTH-Hefesystem zur Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen

Protein-Protein-Interaktionen sind an allen zellulären Prozessen beteiligt und haben dabei wichtige Kontrollfunktionen. Die Untersuchung dieser Wechselwirkungen beinhaltet ihre Identifikation, ihre Charakterisierung und ihre Manipulation, welche biochemisch oder genetisch erfolgen kann.

Beim Yeast Two-Hybrid-System findet diese Proteinherstellung *in vivo* in den Hefen statt, so dass lediglich die kodierende DNA-Sequenz für das zu testende Protein bekannt sein muss. Zudem ist die Hefe ein eukaryontisches System und gewährleistet - im Gegensatz zu Prokaryonten - bestimmte Proteinmodifikationen wie Phosphorylierungen, die für die Bindung an andere Proteine notwendig sein könnten.

Beim Two-Hybrid-System bestehen die beiden Domänen aus Fusionsproteinen, wobei üblicherweise die DNA eines bekannten Proteins, dessen Wechselwirkung getestet werden soll, mit der DNA-BD fusioniert wird (Köder) und die DNA der potenziellen Bindungspartner an die AD kloniert werden (Target) (Abb. 10).

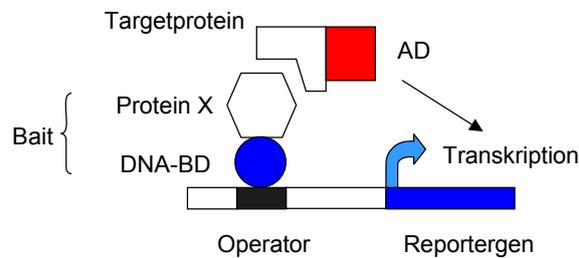


Abb. 10: Schema des klassischen Yeast Two-Hybrid-Systems

Erst durch die Interaktion von Bait- und Targetprotein wird die Transkription von Reportergenen gestartet.

Abk.: AD, Aktivierungsdomäne; DNA-BD, DNA-Bindungsdomäne; Protein X, zu testendes Protein. (Abbildung modifiziert nach Lottspeich, 1998).

1.6. Zielsetzung

Interleukin-16 ist ein immunmodulatorisches Zytokin mit anti-retroviralen Eigenschaften, das durch seine chemotaktische Wirkung auf CD4+-Zellen an vielen entzündlichen Erkrankungen beteiligt ist. Es wird in Form eines Vorläuferproteins, Pro-Interleukin-16 (Pro-IL-16), synthetisiert und durch proteolytische Spaltung freigesetzt.

Ziel dieser Arbeit war es, weitere Erkenntnisse über die physiologischen Funktionen des Interleukin-16-Vorläuferproteins zu erhalten. Trotz zahlreicher Protein-Bindungsdomänen in der Aminosäuresequenz von Pro-IL-16 lagen zum Zeitpunkt dieser Arbeit nur wenige Informationen über interagierende Proteine vor. Die Kenntnis der potenziellen Wechselwirkungspartner könnte Informationen über die Speicherung, Prozessierung oder Sekretion des Pro-IL-16 bzw. IL-16 liefern. So ist anzunehmen, dass diese Proteine an der Kontrolle der lokalen IL-16 Konzentration bei immunologischen Prozessen beteiligt sein könnten. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die Identifizierung der Wechselwirkungspartner interessante, bisher unbekannt zelluläre Funktionen des Pro-IL-16 enthüllt.

Mit Hilfe von Yeast Two-Hybrid-Systemen sollten humane cDNA-Bibliotheken von Pro-IL-16 exprimierenden Zellen nach Bindungspartnern durchsucht werden. Zunächst sollte die PDZ 3-Domäne auf Interaktionspartner hin untersucht werden. Des Weiteren sollten Interaktionspartner für die Prolin-reiche Sequenz gefunden werden.

Detektierte Wechselwirkungen sollten charakterisiert und die Lokalisation der Bindungsdomänen im Pro-IL-16 bestimmt werden. Eine sich anschließende Verifizierung der gefundenen Interaktionen mit alternativen Methoden sollten die Ergebnisse aus den Hefearbeiten bestätigen und Aussagen über die physiologische Relevanz und Funktion zulassen.