

## 4. DISKUSSION

Interleukin 16 (IL-16) ist ein immunmodulierendes Zytokin mit anti-retroviralen Eigenschaften und einer chemotaktischen Aktivität auf CD4-positive Zellen. IL-16 wird über ein Vorläuferprotein, Pro-IL-16 synthetisiert. Dieses besteht in lymphatischen Zellen aus 631 Aminosäuren (AS). In einigen Nervenzellen des Kleinhirns und des Hippocampus existiert eine aminoterminal verlängerte Form, das neuronale Pro-IL-16 (nPro-IL-16), welches 1331 AS lang ist. Für beide Formen konnte gezeigt werden, dass die Caspase-3 durch proteolytische Spaltung das Zytokin IL-16 freisetzen kann, welches aus den carboxyterminalen 121 AS des Vorläuferproteins besteht.

Aufgrund der zahlreichen Protein-Bindungsmotive im Pro-IL-16 war zu erwarten, dass es nicht ausschließlich als Vorläufermolekül für IL-16 dient. Sowohl die Prolin-reiche Hälfte als auch die drei PDZ-Domänen von Pro-IL-16 sind potenzielle Interaktionsdomänen für andere Proteine. Aufgrund dieser Proteinbindungsmotive in Pro-IL-16 und nPro-IL-16 ist zu erwarten, dass diese Regionen wichtige Funktionen erfüllen, die in engem Zusammenhang mit der Speicherung und Prozessierung des Vorläufers sowie der Sekretion des Zytokins stehen könnten. Darüber hinaus existieren Hinweise auf zusätzliche, noch unbekannte zelluläre Funktionen dieser Proteine. Die Wechselwirkung der ersten beiden PDZ-Domänen im neuronalen IL-16 mit den NMDA-Rezeptoruntereinheiten und einigen weiteren Kationenkanälen macht deutlich, dass dieses Protein Aufgaben erfüllt, die über die Regulation der Prozessierung und Sekretion des IL-16 hinausgehen. Auch die strukturelle Ähnlichkeit zwischen den PDZ-Domänen von Pro-IL-16 und dem *Postsynaptic Density Protein-95* (PSD-95) macht eine verwandte Funktion von Pro-IL-16 im Zusammenhang mit der Bindung an carboxyterminale Enden von Ionenkanälen bzw. Rezeptoren und der Organisation von Zytoskelett-Signal-Komplexen wahrscheinlich. Proteine mit PDZ-Domänen dienen meist als Gerüstproteine bei der Verankerung von Rezeptoren und Proteinen der Signaltransduktion an das Zytoskelett und/oder sind am Vesikeltransport zu bestimmten Zellmembranregionen wie Synapsen oder Adhäsionsorten beteiligt (Harris and Lim, 2001; Naisbitt *et al.*, 2000; Sheng and Sala, 2001).

Bannert *et al.* konnten 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) zeigen. 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).

Ziel dieser Arbeit war es, weitere Bindungspartner für das Interleukin-16-Vorläuferprotein, Pro-IL-16, zu identifizieren und mit ihrer Hilfe weitere Informationen über seine Funktion, die Prozessierung oder die Sezernierung des Zytokins IL-16 zu erhalten.

#### **4.1. PDZ 3-Domäne**

Nachdem Interaktionspartner mit der zweiten PDZ-Domäne von Pro-IL-16 detektiert wurden, wurde die dritte PDZ-Domäne im YTH-Screen auf Bindungspartner hin untersucht. Die PDZ 3-Domäne stellt das sezernierte Protein IL-16 dar, hat aber möglicherweise auch eine Funktion im Vorläuferprotein. Zudem befindet sich ein SH3-Bindungsmotiv an Position AS 607-610. Die Suche nach potentiellen Bindungspartnern für diese Domäne des Pro-IL-16 wurde mit dem LexA-Hefesystem durchgeführt, das bereits erfolgreich zur Detektion von PDZ-Wechselwirkungen verwendet wurde. Mit diesem System sind auch die Interaktionen der zwei aminoterminalen PDZ-Domänen des nPro-IL-16 mit verschiedenen Kationenkanälen aufgezeigt worden (Kurschner and Yuzaki, 1999).

Der Screen mit der Milz-Bibliothek verlief negativ. Der Screen mit der cDNA aus humanen Leukozyten ergab nach der Sequenzierung nur ein Protein als potenziellen Bindungspartner, die ATP-Synthase. Bei diesem mitochondrialen Haushalts-Gen handelt es sich um ein Protein, welches dafür bekannt ist im YTH-Screen häufig als falsch positiver Interaktionspartner detektiert zu werden (<http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html>, unter: „false positive“). Es konnte somit, trotz der hohen Transformationseffizienz von  $2,3 \times 10^6$  bzw.  $4,3 \times 10^6$  cfu/ $\mu$ g DNA, kein Interaktionspartner für die PDZ 3-Domäne, das eigentliche IL-16, gefunden werden. Möglicherweise interagiert diese Domäne

nicht mit einem in den untersuchten cDNA-Bibliotheken vorhandenen Protein, da es sich nach der Spaltung durch die Caspase-3 um das Zytokin IL-16 selbst handelt.

## 4.2. Prolin-reiche Region

Die Prolin-reiche Sequenz von Pro-IL-16 enthält 40 der 48 Proline des gesamten Vorläuferproteins. In dieser Sequenz befinden sich zwei SH3-Bindungsmotive der Klasse I (Proteinabfolge: +X $\psi$ PX $\psi$ P, Feng *et al.*, 1994; Lim *et al.*, 1994; Mayer and Eck, 1995; +XXPXXP, Kay *et al.*, 2000) und zwei weitere PXXP-Motive (AS 36-39 und 196-199), die jedoch keiner Klasse zugehörig sind. Des Weiteren ist eine Abfolge von sechs Serinen (AS 132-137) vorhanden. Wegen dieser Vielzahl von potenziellen Proteinbindungsdomänen in der Prolin-reichen Region sollte diese im YTH-Screen auf eventuelle Interaktionspartner hin untersucht werden. Um ein möglichst langes Konstrukt einzusetzen, wurde diese Domäne zusammen mit der PDZ 1-Domäne als Köder-Konstrukt kloniert. Allerdings wies dieser Klon (AS 1-422) eine starke Autoaktivierung auf, musste also verkürzt werden. Erst eine N-terminale Verkürzung um 50 AS und eine C-terminale Verkürzung um 80 AS unterbanden die Autoaktivierung. Das größtmögliche Konstrukt ohne Autoaktivierung war von AS 51 bis AS 342 (Pro-IL-16 51-342) gegeben und enthielt nur 12 AS der PDZ 1-Domäne (Abb. 11 und 12 im Ergebnissteil).

## 4.3. Potentielle Interaktionspartner von Pro-IL-16 51-342

Beim Screen der cDNA-Bibliotheken mit dem Fragment Pro-IL-16 51-342 wurden fünf Proteine als neue potentielle Interaktionspartner für Pro-IL-16 detektiert. Vier dieser Proteine sind eng verwandt und gehören zur Cortactin-Familie: Hematopoietic lineage cell specific protein 1 (HS1), Lim and SH3 protein 1 (Lasp1), F actin-binding protein 1 (Abp1) und Cortactin. Das fünfte Protein, Hook3 gehört zu einer neu beschriebenen Familie von Mikrotubuli-bindenden Proteine (Walenta *et al.*, 2001). Die Interaktionen zwischen den detektierten Proteinen wurden durch YTH-Spezifitätstests für alle fünf Proteine bestätigt.

#### 4.3.1. Die Interaktion mit Hook3

Beim Screen der Milz-cDNA-Bibliothek wurden zwei identische Klone des Hook3-Proteins als mögliche Interaktionspartner der Prolin-reichen Domäne von Pro-IL-16 51-342 identifiziert. Diese Bindung konnte durch YTH-Spezifitätstests verifiziert werden. Weiter Experimente mit unterschiedlich langen Pro-IL-16-Konstrukten ergaben, dass die Bindung des Proteins Hook3 an Pro-IL-16 zwischen den AS 241 und 271 stattfindet. Eine Bindung im YTH-Spezifitätstest konnte zwischen dem Konstrukt Pro-IL-16 241-342 und Hook3 detektiert werden. Mit dem Konstrukt Pro-IL-16 271-342 konnte keine Bindung mit Hook3 festgestellt werden. Ebenso bleibt die Interaktion aus, verkürzt man das Bait-Konstrukt C-terminal. Das Konstrukt Pro-IL-16 241–300 bindet ebenfalls nicht mehr an Hook3.

Hook3 gehört zu einer neu beschriebenen Familie von „cytosolic coiled coil“ Proteinen, welche an Organellen und Mikrotubuli bindet. Dieses Golgi-assoziierte Protein verbindet Membranbestandteile mit Mikrotubuli über konservierte NH<sub>2</sub>-Termini während der divergente COOH-Terminus die Bindung an Organellen vermittelt. Weiterhin wird Hook3 als ein Faktor diskutiert, der membranständige Transportprozesse steuert und in den gerichteten intrazellulären Vesikeltransport involviert ist (Kaiser *et al.*, 2004). Mikrotubuli sind Bestandteile des Zytoskeletts und eine Grundlage für viele zelluläre Bewegungsformen und die Zellgestalt. Die Interaktion von Pro-IL-16 und Hook3 wurde nicht näher untersucht. Es gilt also weiter abzuklären, ob Pro-IL-16 mit Mitgliedern dieser Proteinfamilie wechselwirkt. Eine solche Interaktion kann die Hypothese über eine Beteiligung von Pro-IL-16 bei der Modulation des Zytoskeletts unterstützen.

#### 4.3.2. Die Interaktion mit HS1, Lasp1, Cortactin und Abp1

Als Interaktionspartner der Prolin-reichen Domäne von Pro-IL-16 51-342 wurden aus der Milz-cDNA-Bibliothek zu den zwei Hook3-Klonen noch 20 weitere Klone identifiziert. Davon kodierten 16 für das Lasp1-Protein, zwei für Abp1 und jeweils ein Klon für HS1 und Cortactin. Dieses Ergebnis wurde durch einen Screen mit der cDNA-Bibliothek von humanen Leukozyten unterstützt, wobei 23 mal Lasp1 und je einmal HS1 und Abp1 identifiziert wurde. Alle vier Proteine der Cortactin-

Familie enthalten C-terminal eine SH3-Domäne welche ein potentieller Bindungspartner für SH3-Bindungsmotive (PXXP) in Prolin-reichen Domänen ist (Ren *et al.*, 1993; Kay *et al.*, 2000). Interessanterweise enthielt jeder der detektierten Klone das C-terminale Ende der Proteine, welches die SH3-Domäne enthält. Es wurde kein Klon gefunden, bei dem die SH3-Domäne nicht an der Bindung beteiligt war. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden SH3-Deletionsmutanten und die SH3-Domäne alleine kloniert und für die Ko-Retransformation eingesetzt. Es konnte bestätigt werden, dass nur die kompletten Targetproteine und die SH3-Domänen dieser mit Pro-IL-16 51-342 interagieren, nicht jedoch die  $\Delta$ SH3-Konstrukte.

Durch die YTH-Experimente mit unterschiedlich langen Pro-IL-16-Konstrukten sollte der Bindungsort im Pro-IL-16 definiert werden. Als potentieller Ort der Interaktion wurde eines der SH3-Bindungsmotive vermutet, da diese für die Interaktion mit SH3-Domänen bekannt sind. Kotransformationen mit den Targetproteinen der Cortactin-Familie ergaben, dass es mit dem Konstrukt Pro-IL-16 78-342 zu keiner Interaktion kommt. Eine Interaktion mit dem Pro-IL-16 Konstrukt 51-195, bei welchem das PXXP-Motiv an Position AS 196-199 und das zweite SH3-Bindungsmotiv deletiert sind, findet wiederum statt. Das heißt, dass die Domäne um das erste SH3-Bindungsmotiv ab AS 72 für die Interaktion essentiell sein kann (eine Interaktion mit Pro-IL-16 71-342 findet noch statt), auf jeden Fall aber die AS ab Position 78 wichtig sind. Es muss weiter überprüft werden, ob die erste SH3-Bindungsdomäne der Interaktionsort in Pro-IL-16 ist.

Weitere Experimente wurden nur noch mit dem HS1-Protein durchgeführt, da die bisherigen Ergebnisse auf denselben Bindungsort in allen Proteinen der Cortactin-Familie schließen lassen. Zudem ist die Expression von HS1 wie die Expression von IL-16 auf Leukozyten beschränkt. Des Weiteren weisen die SH3-Domänen der gefundenen Proteine eine hohe Homologie zueinander auf (Alignment siehe Ergebnisteil Abb. 14).

Eine Mutation des ersten SH3-Bindungsmotivs soll Aufschluss über seine Notwendigkeit für die Interaktion geben. Die Proline des PXXP-Motivs wurden gegen Alanine ausgetauscht, so dass die Funktion als SH3-Bindungsmotiv

zerstört ist. Alanin gehört wie Prolin zur Gruppe der hydrophoben Aminosäuren. Im YTH-Experiment konnte im Plattentest gezeigt werden, dass nach einer Kotransformation der Hefen mit Pro-IL-16 PXXP-mut1 und HS1 keine Interaktion mehr stattfindet (Abb. 19). Um eine Funktion bzw. Notwendigkeit an der Interaktion des zweiten SH3-Bindungsmotivs (AS 234-237) zu überprüfen, wurde zusätzlich für den *in vitro*-Bindungs Assay dieses zweite Motiv mutiert (Pro-IL-16 PXXPmut2). Zudem wurde ein Konstrukt kloniert, bei welchem beide SH3-Bindungsmotive mutiert sind (Pro-IL-16 PXXPmut1+2). Auch im *in vitro*-Bindungs Assay lässt sich keine Interaktion zwischen der SH3-Domäne von HS1 und Pro-IL-16 PXXPmut1 nachweisen. Eine Interaktion zwischen HS1 SH3 und Pro-IL-16 ist nachweisbar. Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen der YTH-Experimente. Des Weiteren interagieren HS1 SH3 und PXXPmut2 (Mutation im zweiten SH3-Bindungsmotiv), so dass ein Einfluss bzw. eine Beteiligung dieses Motivs auf die Interaktion ausgeschlossen werden kann.

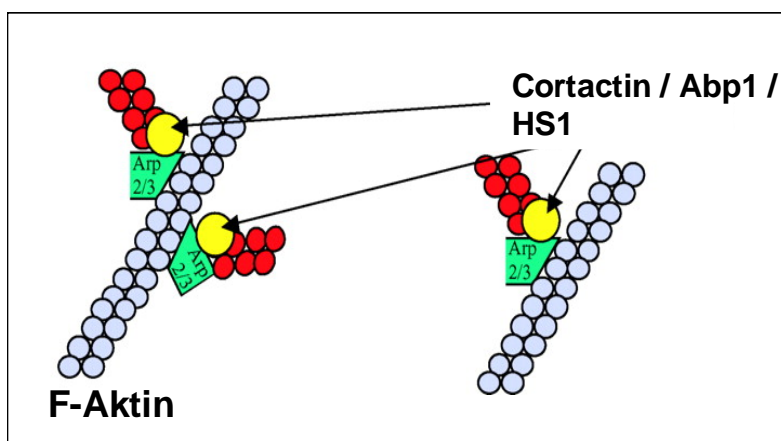
Die Ko-Immunopräzipitation, bei welcher die Interaktion der Proteine in transfizierten Zellen nachgewiesen werden soll, bestätigte die Schlüsse aus den bisherigen Experimenten. Sobald das erste SH3-Bindungsmotiv im Pro-IL-16 fehlt (bei der Ko-Immunopräzipitation durch den Einsatz eines Klones bei welchem die ersten 178 AS und somit das erste SH3-Bindungsmotiv deletiert wurden (Pro-IL-16 $\Delta$ 179) oder die SH3-Domäne des HS1 deletiert wurde (HS1 $\Delta$ SH3)), kommt es zu keiner Interaktion zwischen den beiden Proteinen.

Die Ergebnisse der bisherigen Experimente sprechen für eine Interaktion zwischen Pro-IL-16 und den Proteinen der Cortactin-Familie. Die Bindung von HS1 und Pro-IL-16 findet zwischen der SH3-Domäne von HS1 und dem Pro-IL-16 SH3-Bindungsmotiv an Position AS 80-86 statt, wobei die AS vor diesem Motiv Einfluss auf die Interaktion haben. Die übereinstimmenden Ergebnisse der YTH-Tests lassen auf den gleichen Bindungsort für die Proteine Cortactin, Abp1 und Lasp1 schließen. Zudem weißt die AS-Sequenz des N-terminus, der Wiederholungsmotive und der SH3-Domäne von Cortactin eine 65 %ige Homologie zu der AS-Sequenz von HS1 auf (Urano *et al.*, 2003), was die Annahme desselben Interaktionsortes unterstützt.

Der Nachweis der endogenen Proteine in T-Zellen zeigt, dass beide Proteine, HS1 und IL-16, auch in nativen T-Zellen vorhanden sind. Ihre Interaktion konnte durch die Ko-Immunopräzipitation bestätigt werden. Durch Aufnahmen am konfokalen Laserscan-Mikroskop wurde, in Übereinstimmung mit den von Bannert *et al.* publizierten Daten, Pro-IL-16 vor allem in der corticalen Region der Zellen sowie am Aktin-Zytoskelett und den Stress-Fibern lokalisiert (Abb. 27). Ebenso wurde HS1 in der corticalen Region und mit dem Zytoskelett assoziiert und somit mit Pro-IL-16 kolokalisiert nachgewiesen. Auch dieses Ergebnis unterstützt die Annahme der Interaktion zwischen Pro-IL-16 und HS1.

#### 4.4. Modulation des Zytoskelett

Bei den Proteinen der Cortactin-Familie handelt es sich um F-Aktin Bindepoteine die in die Modulation des Zusammenbaus von Aktin involviert sind. Bis auf Lasp1 sind die Proteine direkt mit dem Arp 2/3-Komplex (actin-related protein = Arp) assoziiert (Urano *et al.*, 2003; Olazabel and Machesky, 2001). Im Protein Lasp1 fehlt die Interaktionsstelle für den direkten Kontakt mit dem Arp 2/3-Komplex, jedoch moduliert dieses Protein den Komplex indirekt, möglicherweise über eine Interaktion mit dem Protein Dynamin II (Chew *et al.*, 2002). Der Arp 2/3-Komplex ist eine primäre Komponente für die Verzweigungen der Aktinfilamente und stimuliert die Aktinpolymerisation (Abb. 28) (Lodish *et al.*; Molekulare Zellbiologie; S. 816 und 853). Dies spielt eine große Rolle in der Reorganisation des kortikalen Aktin-Zytoskeletts während vieler physiologischer und morphologischer Prozesse der Zelle, inklusive der Aktivierung von Lymphozyten oder der Apoptose.



**Abb. 28:** Die Beteiligung von Cortactin, Abp1 oder HS1 an der Aktin-Verzweigung. (Abb. modifiziert nach Olazabal and Machesky, 2001).

Während der Apoptose entsteht der Abbau des Zytoskeletts. HS1, Abp1 und Cortactin werden während der Apoptose Caspase-3-abhängig abgebaut. Es sind direkte Substrate des Enzyms Caspase-3. Die Caspase-3 spaltet die SH3-Domäne vom Rest des Proteins ab. Die Spaltung dieser Proteine könnte die Zell-Signalwirkung bzw. die Signalgebung zu und vom Aktin-Zytoskelett beeinflussen und somit in die morphologische Veränderung der Zellen während der Apoptose involviert sein. Alle drei Proteine sind in die Signaltransduktion involviert. Somit vermitteln diese Proteine spezifische Signalkaskaden zum Aktin-Zytoskelett. Ebenso unterstützt die Spaltung dieser Proteine einen schnellen und effektiven Mechanismus der zur Regulation des Aktin-Zytoskeletts während der Apoptose beiträgt (Chen *et al.*, 2001).

All diese Hinweise sowie die verifizierte Bindung der PDZ 2-Domäne mit Myosin Phosphatase Target Subunits sind weitere Ergebnisse, die die Vermutung unterstützen, dass Pro-IL-16 mit molekularen Komplexen, die in die Modulation des Zytoskeletts involviert sind, wechselwirkt. Zudem wurde von Ren *et al.* ebenfalls eine Assoziation von Pro-IL-16 mit dem Aktin-Bindeprotein, Lasp-1 detektiert, was die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bestätigt (Ren *et al.*, 2005).

#### **4.4.1. Die Interaktion von Pro-IL-16 mit HS1**

Die Interaktion von HS1 und dem ersten SH3-Bindungsmotiv von Pro-IL-16 wurde durch YTH-Spezifitätstests, Ko-Immunopräzipitationen und *in vitro*-Bindungs Assays sowie durch Kolokalisationsexperimente mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop verifiziert.

HS1 ist ein Substrat intrazellulärer Tyrosin-Kinasen in hämatopoetischen Zellen (Kitamura *et al.*, 1989). HS1 und Cortactin sind eng verwandte Proteine. Jedoch fehlt HS1 die vierte Wiederholungsdomäne, mit welcher Cortactin an filamentöses Aktin (F-Aktin) bindet. Cortactin ist ein intrazelluläres Protein welches vorwiegend in adhärennten Zellen exprimiert wird (Zhan *et al.*, 1993 und 1997). Durch Immunfluoreszenzfärbung und pull-down Assays konnte Uruno *et al.* dennoch die Kolokalisation von HS1 mit dem Arp 2/3-Komplex demonstrieren. Des Weiteren konnten sie beweisen, dass HS1 ebenso wie Cortactin eine wichtige Rolle in der



Modulation des Aktin-Assemblies spielt und wie Cortactin ein F-Aktin Bindepotein ist (Urano *et al.*, 2003).

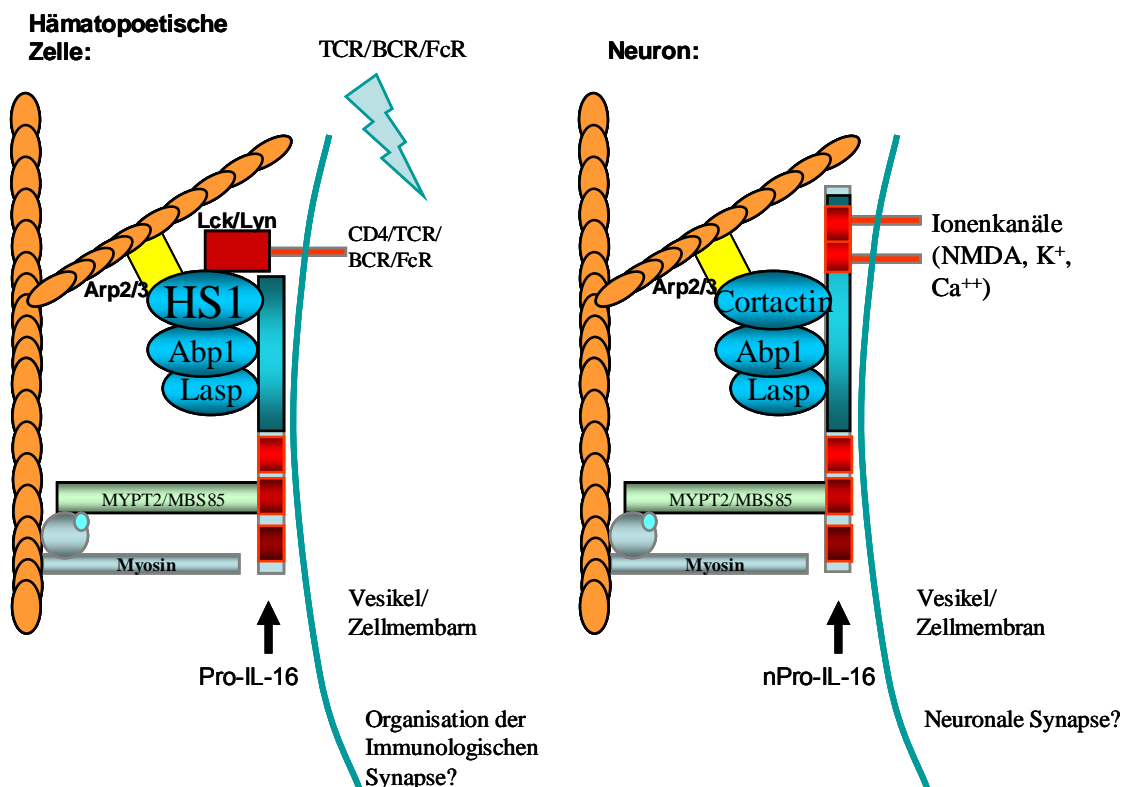
HS1 ist hauptsächlich ein zytoplasmatisches Protein und ist häufig an den Tyrosin-Resten während der Aktivierung von Membran-Rezeptoren inklusive B-Zell-Antigen-Rezeptor, CD3 T-Zell-Rezeptor, und FcR von Mastzellen phosphoryliert. Eine ansteigende Tyrosin-Phosphorylierung bei HS1 ist mit der Aktivierung von einer oder verschiedenen intrazellulären Protein-Kinasen wie Lck, Syk, Lyn, Fgr und TPK-IIB begleitet. Die direkte Assoziation von HS1 mit Lyn und Lck wurde bei B- bzw. T-Zellen beschrieben (Urano *et al.*, 2003). HS1 bindet an die SH2-Domäne von Lyn bzw. an die SH3-Domäne von Lck (Takemoto *et al.*, 1997; Ingley *et al.*, 1999). Die physiologische Funktion von HS1 wurde weiterhin durch Studien mit HS1-Knockout Mäusen, welche einen Defekt in der antigeninduzierten Proliferation und Depletion von Lymphozyten haben, beschrieben (Taniuchi *et al.*, 1995).

## 4.5. Immunologische Synapse

Auch die Formation der Immunologischen Synapse erfordert eine Reorganisation des Zytoskeletts. Alle Hinweise über die potentiellen Bindungspartner von Pro-IL-16 lassen auf eine Funktion von Pro-IL-16 bei der Organisation der Immunologischen Synapse schließen. Dabei handelt es sich um eine hochgradig organisierte molekulare Struktur, die sich an der Kontaktfläche zwischen T-Zellen und Antigen Präsentierenden Zellen (APC) ausbildet (Norcross, 1984). Sie bildet sich bereits in den ersten Minuten des Zell-Zellkontaktes. In der Immunologischen Synapse sind die Moleküle in einem zentralen Bereich, dem central Supramolekular Activation Cluster (cSMAC) und einem peripheren Bereich (pSMAC) angeordnet (Monks *et al.*, 1998). Im cSMAC kommt es zur Anreicherung von TCR-CD3-Komplexen, MHC-Peptid-Komplexen, CD4-, CD28-CD80/CD86-Interaktionen, CD2-CD58-Komplexen und von Signalmolekülen wie Lck, Fyn und ZAP-70. Um diesen Bereich herum bildet sich ein Ring aus ICAM-1, welches mit LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) interagiert und den pSMAC darstellt (Grakoui *et al.*, 1999; Bromley *et al.*, 2001; Bromley *et al.*; 2001 b). Für die Verankerung von T-Zellen sowie APC ist der pSMAC verantwortlich, während im

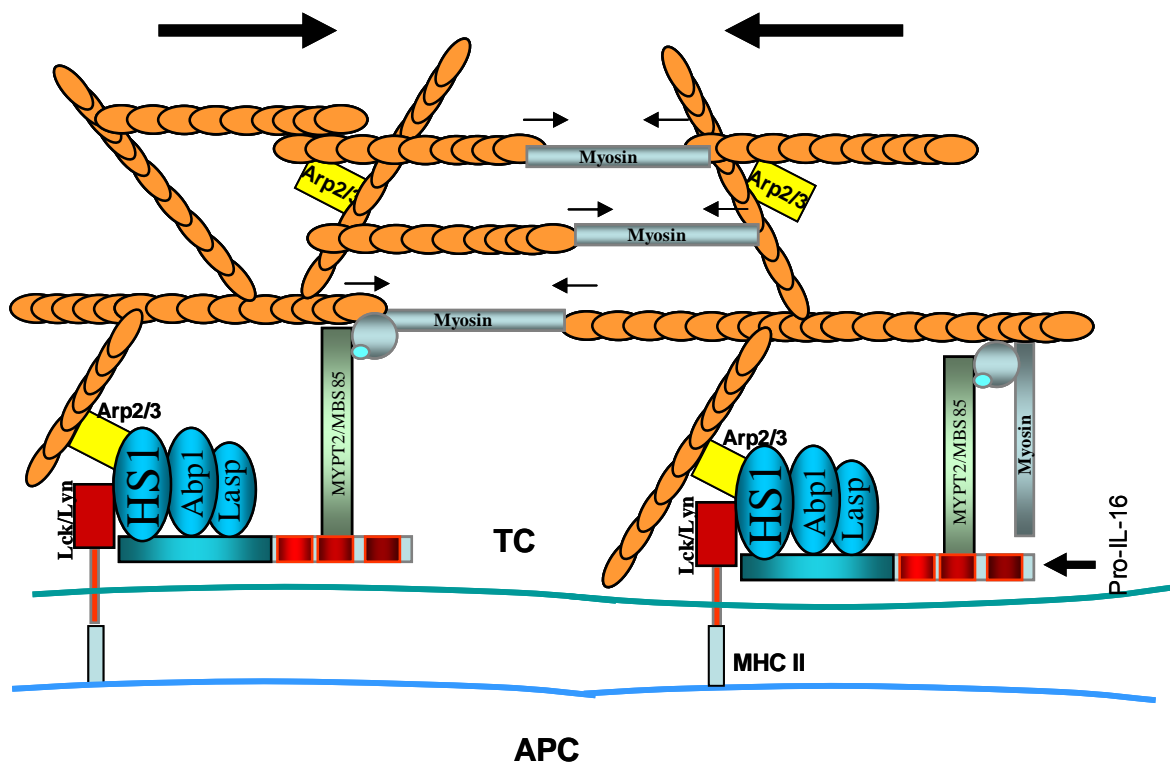
cSMAC die Antigenpräsentation und Signalweiterleitung stattfindet. Durch die Interaktion von ICAM-3 mit seinem Liganden sowie durch die Wechselwirkung von ICAM-1 mit LFA-1 wird der initiale Kontakt zwischen beiden Zellen hergestellt. Erst während der Maturation der Synapse wandern diese in den peripheren Bereich (Montoya *et al.*, 2002; Grakoui *et al.*, 1999).

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse führen zu einem hypothetischen Modell für die Beteiligung von Pro-IL-16 bei der Organisation der Immunologischen Synapse in hämatopoetischen Zellen und der Neuronalen Synapse in neuronalen Zellen. In hämatopoetischen Zellen interagieren HS1, Abp1 und Lasp1 mit Pro-IL-16 und über den Arp 2/3-Komplex mit Aktin. HS1 bindet an die SH2-Domäne von Lyn bzw. an die SH3-Domäne von Lck, welche wiederum über CD4 bzw. den T- oder B-Zell-Rezeptor oder FcR über Signalkaskaden mit entsprechenden Zellen interagieren.



**Abb. 29:** Hypothetisches Modell zur Interaktion von Pro-IL-16 mit den Proteinen der Cortactin-Familie bei der Entstehung der Immunologischen Synapse (links) bzw. Neuronalen Synapse (rechts). Aktin = orange.

Dynamische Umlagerungen des Aktin-Zytoskeletts sind notwendig für die Formation und Stabilisation der Immunologischen Synapse an der Berührungsfläche zwischen APC und T-Zellen. Die Aktinfilamente kontrahieren über Myosin II und die Komplexe aus Aktin/Arp 2/3/Pro-IL-16 werden in den zentralen Bereich der Immunologischen Synapse (cSMAC) „gezogen“ (Abb. 30). Supramolekulare Aktivierungscluster innerhalb der Immunologischen Synapse spielen eine wichtige Rolle für die Aktivierung der T-Zell Antwort und für die Ausführung der T-Zell Effektor Funktionen. Das zytoskelettale Aktin- und Myosinsystem ist notwendig, um aus der instabilen Interaktion von TCR und MHC/Peptid-Komplexen eine stabile supramolekulare Struktur für die Formation der Immunologischen Synapse zu kreieren.



**Abb. 30:** Die Aktin-Umlagerung in der entstehenden Immunologischen Synapse zwischen einer T-Zelle (TC) und einer Antigen Präsentierenden Zelle (APC).

Myosinfilamente ziehen das Aktin (orange) in den zentralen Bereich der Immunologischen Synapse (cSMAC).

Le Bras *et al.* konnten die Beteiligung von Abp1 bei der Organisation der Immunologischen Synapse bestätigen. Sie konnten zeigen, dass Abp1 eine entscheidende Verbindung zwischen TCR und Gen-Aktivierung ebenso wie

zwischen TCR und Endozytose ist. Bei diesen beiden Prozessen wird die Reaktivität der T-Zellen kritisch beeinflusst. Abp1 spielt eine funktionelle Rolle in der TCR-Signalkaskade (Le Bras *et al.*, 2003).

Cortactin bindet über seine SH3-Domäne an CortBP1 (Cortactin-Binding Protein 1). Beide Proteine sind im Gehirn kolokalisiert. CortBP ist ein neuronenspezifisches Protein, welches ebenfalls PDZ-Domänen enthält. Beide Proteine wurden in Wachstumskegeln von entstehenden hippocampalen Neuronen beobachtet. Daraus lässt sich schließen, dass die Proteine in die zytoskelettale Reorganisation während der Bildung von Neurite-Auswüchsen (Axons und Dentrите = Neurite) involviert sind (Du *et al.*, 1998). Diese Daten unterstützen das hypothetische Modell, dass Cortactin mit nPro-IL-16 während der Neuronalen Synapse interagieren (Abb. 29, rechte Seite).

## 4.6. Ausblick

Mit HS1, Abp1, Cortactin und Lasp1 wurden neue Interaktionspartner für Pro-IL-16 gefunden. Für die Proteine Abp1, Cortactin und Lasp1 stehen weiterführende Kolokalisationsexperimente (*In vitro*-Bindungs Assay, Ko-Immunopräzipitation, Verifizierung der Bindung in transfizierten Zellen, Nachweis endogener Proteine, Kolokalisationsexperimente mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop) aus. Ebenso kann eine Interaktion zwischen Cortactin und der neuronalen Form des IL-16 (nIL-16) untersucht werden. Teilweise liegen die für diese Experimente benötigten Konstrukte vor und können Bestandteil eines weiterführenden Projekts sein. Ebenso steht die experimentelle Bestätigung der Interaktion von Pro-IL-16 mit Hook3, einem Protein aus der neuen Familie der Mikrotubuli-bindenden Proteine aus und kann ebenfalls in einem weiteren Projekt detaillierter nachgewiesen werden. Diese Proteinfamilie hat, wie die Proteine der Cortactin-Familie, ebenfalls Einfluss auf die Modulation des Zytoskeletts. Eine Interaktion zwischen Hook3 und Pro-IL-16 findet nach den hier gezeigten Ergebnissen am C-terminalen Bereich der Prolin-reichen Domäne des Vorläuferproteins (Pro-IL-16 AS 241-342) statt.

Die nachgewiesene Beteiligung an der Modulation des Zytoskeletts ist eine weitere Funktion von Pro-IL-16. Hierzu kann eine Hypothese über eine Funktion von Pro-IL-16 und seinen Interaktionspartnern bei der Organisation der Immunologischen Synapse erstellt werden, da die gefundenen Interaktionspartner in diesen Prozess involviert sind (Abb. 29). Die Hypothese bedarf weiterer experimenteller Verifizierungen. Die Bildung einer Immunologischen Synapse ist ein Vorgang, welcher die Reorganisation des Zytoskeletts erfordert. Beim Zellkontakt zwischen T-Zellen und APC bildet sich diese hochgradig organisierte Struktur aus. Es könnte zu einer Interaktion zwischen HS1 und Pro-IL-16 und über Lck mit dem CD4-Rezeptor kommen. HS1, Abp1 und Lasp1 interagieren über den Arp 2/3 Komplex mit den Aktinfilamenten. Über Myosin werden diese aneinander gezogen und somit die CD4-Rezeptoren ins Zentrum der Immunologischen Synapse (cSMAC) bewegt (Abb. 30).

---

HS1 bindet über Lck an CD4 und transportiert dieses an die Zellmembran, wo es als Ligand z.B. für extrazelluläres IL-16 zur Verfügung steht. Offen bleibt die Frage, ob es zu einer Anreicherung oder Verminderung des CD4-Rezeptors auf der Zellmembran kommt, wenn Pro-IL-16 an HS1/Lck/CD4 bindet. Experimentell kann diese Frage geklärt werden, transfiziert man T-Zellen mit GFP-markiertem Pro-IL-16. Nach einer Überexpression von Pro-IL-16 können CD4 und GFP durch eine FACS-Analyse quantitativ in transfizierten und untransfizierten Zellen bestimmt werden. Die für dieses Experiment benötigten Konstrukte liegen bereits vor und sind Bestandteil eines weiterführenden Projekts.