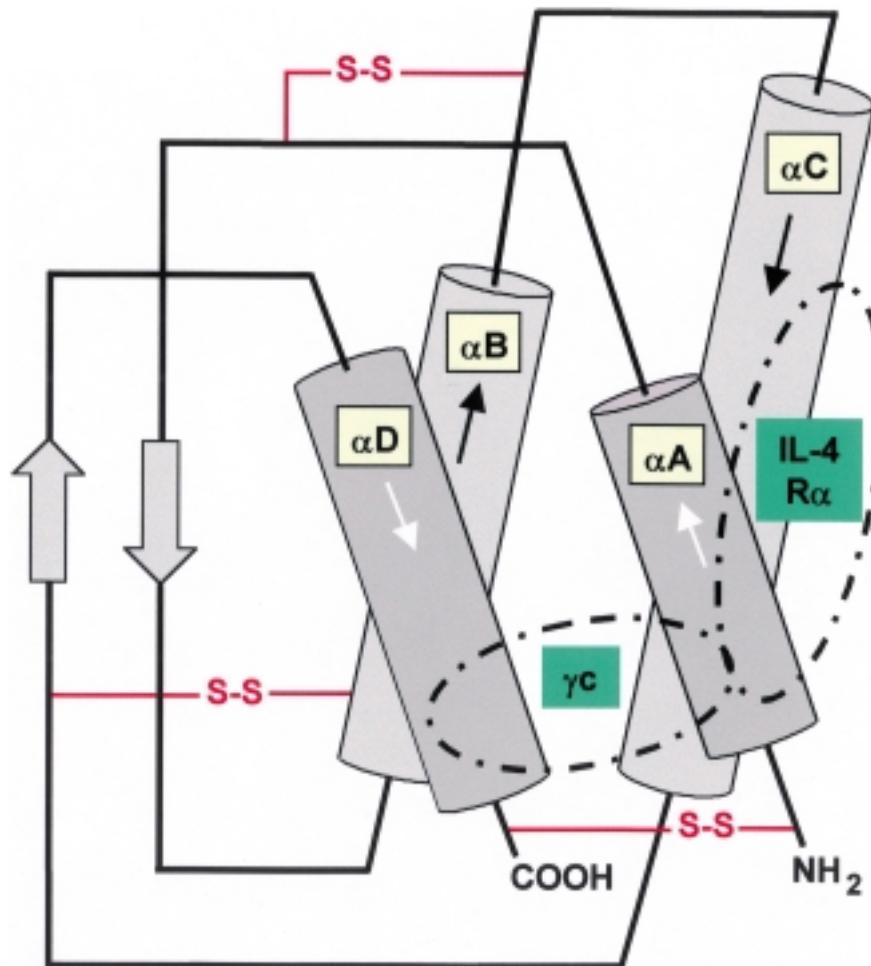


A

Die Struktur des proallergischen Proteinhormons Interleukin-4 ist seit den frühen neunziger Jahren bekannt (A). Durch die Aufklärung der Wechselwirkung mit seinen Rezeptorketten (B) ist es gelungen, das Moleköl zu einem antiallergischen Wirkstoff umzuformen.

B

Der Interleukin-4-Rezeptor: vom Erkennungsmechanismus zur pharmakologischen Zielstruktur

Peter Reinemer, Walter Sebald und Albert Duschl*

Die organische Synthese von Hormonderivaten ist heute ein etablierter Weg zu pharmakologischen Wirkstoffen. War dieser Weg ursprünglich nur für kleine organische Verbindungen möglich, so ist inzwischen auch die Herstellung entsprechender Antagonisten für große Proteinhormone gangbar. Interleukin-4 war für einen solchen Ansatz ein besonders günstiges Ziel. Der Interleukin-4-Rezeptor

spielt eine zentrale Rolle bei Auslösung und Verlauf allergischer Erkrankungen, sodass an der Entwicklung von Hemmstoffen ein großes medizinisches Interesse besteht. Die Strukturaufklärung des Ligand/Rezeptor-Komplexes und ein genaues Verständnis der Bindungs- und Aktivierungsmechanismen erlauben ein rationales Design von Interleukin-4-Varianten mit hemmenden Eigenschaften. Da

auf diese Weise das Interleukin-4-Rezeptorsystem spezifisch inhibiert werden kann, wird ein völlig neuer Ansatz für die Entwicklung neuer Medikamente gegen Allergien und Asthma geschaffen.

Stichwörter: Allergien • Gentechnologie • Hormone • Interleukin-4 • Wirkstoff-Forschung

1. Emasculated Hormones – entschärzte Hormone

James Black hat 1988 in seinem Nobelpreisvortrag das Konzept der „emasculated hormones“ dargestellt – von Hormonderivaten, die noch an ihren Rezeptor binden, diesen aber nicht mehr aktivieren können.^[1] Die von ihm entwickelten Betablocker und Antihistaminika sind besonders eindrucksvolle Beispiele für eine Verwirklichung dieser Idee.

Durch das heute verfügbare Methodenspektrum der Gentechnologie und Biotechnologie kann dasselbe Prinzip inzwischen auch auf Proteinhormone angewandt werden. In diesem Beitrag wird ausgeführt, wie gezielte Mutagenese im Fall von Interleukin-4 (IL-4) zur Entwicklung eines spezifischen Antagonisten geführt hat. Das IL-4-Rezeptorsystem ist ein Glücksfall für einen solchen Ansatz, da über den IL-4-Rezeptor zwei Proteinhormone signalisieren, die für die Entstehung von allergischen Erkrankungen und von Asthma essentiell sind (siehe Abschnitte 2 und 3), wobei Struktur und Erkennungsmechanismus dieses Rezeptors einen direkten Weg zur Entwicklung eines „emasculated“ IL-4-Hormons aufzeigen.

Der IL-4-Rezeptor ist ein Prototyp für Rezeptoren, die durch Oligomerisierung – meist Dimerisierung – von Rezeptorketten in der Plasmamembran der Zellen aktiviert werden und dadurch das Hormonsignal in die Zelle übermitteln.^[2,3] Die Kenngrößen des IL-4-Rezeptors – heterodimerer Aufbau, hochaffine Bindungsstelle nur auf der α -Kette, geringe Kopplung zwischen den Rezeptorketten – bieten einen direkten Zugang zur Konstruktion von antagonistischen IL-4-Varianten, die noch hochaffin binden, aber nicht mehr die Dimerisierung der Rezeptorketten vermitteln. Eine verfeinerte Mutantenanalyse liefert auch selektive Agonisten, die nur auf besondere Rezeptorsubtypen und damit nur auf bestimmte Zellen wirken, sowie Superagonisten, die bei erniedrigten Konzentrationen wirken.

Es erscheint als realistische Perspektive, dass diese antagonistischen Proteine zu therapeutischen Wirkstoffen entwickelt werden können. Eine wissenschaftliche Herausforderung für die Zukunft ist es, aufgrund der genauen Kenntnis der Erkennungsmechanismen in diesem Rezeptorsystem gezielt niedermolekulare, organisch-chemisch synthetisierbare α -Ketten-Blocker zu entwickeln.

2. Allergie als Fehlreaktion des Immunsystems

Eine Allergie ist eine Hyperreakтивität des Immunsystems gegen Substanzen, die von den meisten Menschen vertragen werden. Nichtimmunologisch bedingte Hyperreaktivitäten, etwa gegen Hitze oder UV-Licht, werden nicht zu den

[*] Priv.-Doz. Dr. A. Duschl, Prof. Dr. W. Sebald
Biozentrum der Universität Würzburg
Physiologische Chemie II
Am Hubland, 97074 Würzburg (Deutschland)
Fax: (+49) 931-888-4113
E-mail: duschl@biozentrum.uni-wuerzburg.de

Dr. P. Reinemer
Bayer AG
Pharmaforschung (PH-R LSC-NP)
Postfach 101709, 42096 Wuppertal (Deutschland)

Allergien gerechnet. Durch die Beschränkung auf hyperreaktive Menschen wird die Allergie von der Toxizität abgegrenzt. Einzelne Allergene, wie etwa Bienengift, können durchaus toxisch sein, doch ist diese Eigenschaft nicht kausal für ihr allergenes Potential. Die allergische Reaktion wehrt also in der Regel Substanzen ab, die für den Körper ohne diese Reaktion harmlos wären.

Atopie ist eine genetische Prädisposition, auf geeignete Stimuli hin eine allergische Sensitivität zu entwickeln. Bis zu 5% aller Menschen lassen sich als Atopiker beschreiben. Die Betroffenen haben ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Allergien, leiden gehäuft unter multiplen Allergien, und sind besonders anfällig für die Entwicklung von allergischem Asthma.^[4] Atopie geht auf Mutationen in allergieassoziierten Genen zurück, nach denen besonders im Zusammenhang mit Asthma intensiv gesucht wird.^[5] Es ist inzwischen klar, dass zahlreiche Gene an der Entstehung von Asthma beteiligt sein können. Eine ständig aktualisierte Übersicht über den Stand der Forschung auf diesem Gebiet bietet die Asthma Gene Database (<http://cooke.gsf.de/asthmagen/main.cfm>) am GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in München.

Unter den bekannten Asthma-Risikogenen sind auch IL-4 und die IL-4-Rezeptor- α -Kette.

IL-4 ist spezifisch für die Entwicklung von Soforttyp-Allergien verantwortlich.^[6–8] Charakteristisch dafür ist das schnelle Auftreten von Symptomen nach Exposition gegenüber dem Allergen. Es kommt bei vorsensibilisierten Menschen innerhalb von Minuten zu Ödembildung, Erweiterung von Kapillaren und Stimulierung von Schmerzrezeptoren sowie besonders bei Asthma zur Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur. Zu den Soforttyp-Allergien gehören allergische Rhinitis (Heuschnupfen), Allergien gegen Hausstaub, Tierhaare oder Insektenstiche sowie das allergische Asthma. Allergien mit verzögterer Symptombildung, wie die Nickelallergie, gehören nicht zum Soforttyp und gehen nicht auf IL-4 zurück. Bei IL-4-abhängigen Allergien wird das gleiche Spektrum an Molekülen und Zellen verwendet wie in der Abwehr von helminthischen Makroparasiten, sodass man Soforttyp-Allergien als irrtümliche Aktivierung eines Parasitenabwehr-Systems ansieht.

Der Verlauf einer Allergie ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Ein Antigen wird von antigenpräsentierenden

Peter Reinemer studierte 1983–1989 Chemie an der Universität Düsseldorf, wo er seine Diplomarbeit am Institut für Anorganische Chemie über Röntgenstrukturanalysen von Aminophosphonsäuren und Ethantetrakisphosphinsäuren anfertigte. Von 1990 bis 1993 promovierte er im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Huber am MPI für Biochemie in Martinsried über Röntgenstrukturanalysen von Glutathion-S-Transferasen. Zwischen 1993 und 1994 war er Postdoc am Institut für Biotechnologie des Geschäftsbereichs Pflanzenschutz der Bayer AG in Monheim und am MPI für Biochemie mit Arbeiten über Röntgenstrukturanalysen von pflanzlicher Glutathion-S-Transferase, Collagenasen und P22-Tailspike-Protein. Seit 1995 ist er Laborleiter im Geschäftsbereich Pharma der Bayer AG in Wuppertal mit Aufgaben in der Proteinreinigung, in der Proteinkristallographie und im Naturstoff-Screening.



P. Reinemer



W. Sebald



A. Duschl

Walter Sebald studierte 1959–1965 Chemie an der Universität München. 1965–1969 fertigte er dort am Institut für Physiologische Chemie bei Prof. Dr. Dr. T. Bücher seine Dissertation „Zur mitochondrialen Proteinsynthese“ an. 1974 habilitierte er sich an der medizinischen Fakultät der Universität München über die „Identifizierung und Charakterisierung mitochondrial synthetisierter Proteine“. 1978–1986 war er an der GBF Braunschweig tätig, 1983 wurde er zum Professor ernannt. 1986 wurde er auf den Lehrstuhl II für Physiologische Chemie berufen und seit 1990 ist er am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften (Biozentrum) der Universität Würzburg. Seine Forschungsgebiete sind seit 1986 die Struktur und Funktion von Cytokin-Rezeptoren, vor allem Interleukine und Bone Morphogenetic Proteins (BMPs).

Albert Duschl studierte 1977–1984 Biologie an der Universität Gießen, 1984–1986 promovierte er am Botanischen Institut I in der Gruppe von Prof. Dr. G. Wagner über bakterielle Chloridtransportsysteme. 1987–1989 war er Postdoc bei Prof. Dr. J. K. Lanyi an der University of California in Irvine und 1990 bei Prof. Dr. D. Oesterhelt am MPI für Biochemie in Martinsried. Danach war er zunächst wissenschaftlicher Mitarbeiter, später Assistent am Biozentrum der Universität Würzburg am Lehrstuhl von Prof. Dr. W. Sebald. 1997 habilitierte er sich im Fach Physiologische Chemie mit dem Thema „Molekulare Mechanismen des immunmodulierenden Cytokins IL-4“. Seine Forschungsschwerpunkte sind die Signalübertragung und Genexpression durch Interleukine sowie In-vitro- und In-vivo-Modelle für allergische Erkrankungen.

A: Sensibilisierung

B: Effektorphase

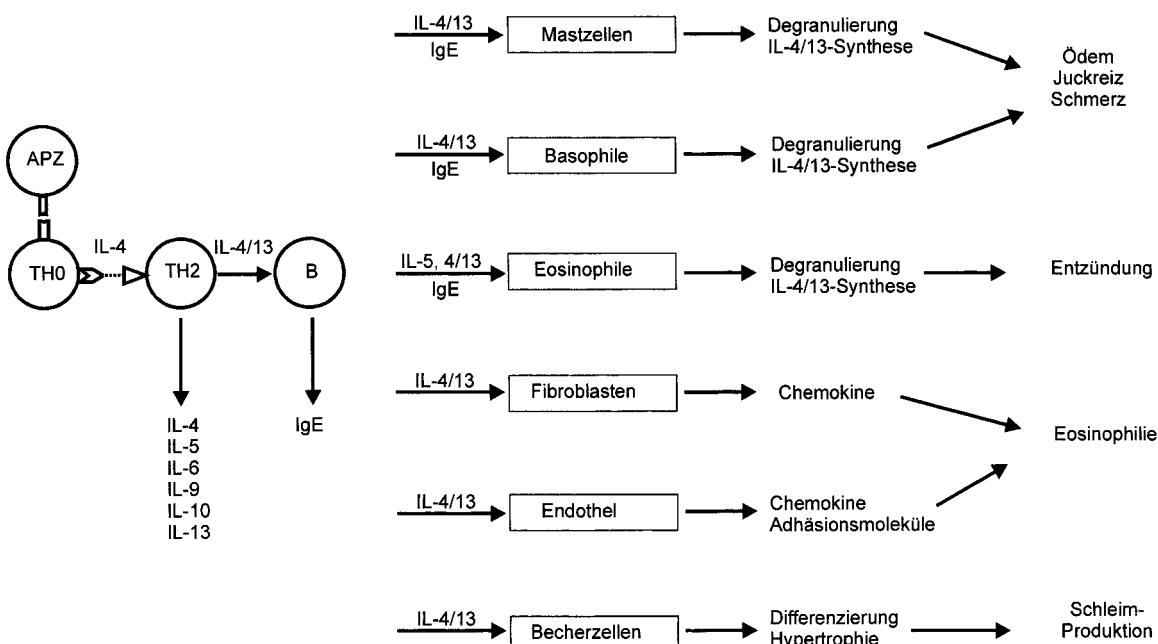


Abbildung 1. Schematische Darstellung von Sensibilisierungsphase (A) und Effektorphase (B) der allergischen Soforttyp-Reaktion. IL-4 und IL-13 sind an beiden Vorgängen beteiligt, da sie auf die beteiligten Zelltypen aktivierend und/oder differenzierend wirken. APZ = antigenpräsentierende Zelle, TH0 = T-Helferzelle Typ 0, TH2 = T-Helferzelle Typ 2, B = B-Zelle, IgE = Immunglobulin E.

Zellen aufgenommen, prozessiert und über den MHC-II-Komplex T-Helferzellen präsentiert. Wenn dieser Stimulus eine Differenzierung zu einer TH2-Zelle (T-Helferzelle Typ 2) auslöst, so wird das Antigen als Allergen behandelt. Für die TH2-Differenzierung ist ausschlaggebend, dass die T-Zelle während ihrer Aktivierung mit IL-4 stimuliert wird. Als Quelle für dieses frühe IL-4 werden Mastzellen und Subsets von T-Zellen diskutiert.^[9] Da TH2-Zellen neben einer Reihe weiterer Cytokine auch IL-4 produzieren, kommt es zu einer autokrinen Verstärkung.

Zwei der TH2-Cytokine, IL-4 und IL-13, induzieren in aktivierte B-Zellen den Klassenwechsel der Antikörperproduktion zum IgE-Typ.^[10, 11] Die so hergestellten allergenspezifischen IgE-Antikörper binden an Rezeptoren auf der Oberfläche von Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen. Damit ist die Sensibilisierung erfolgt, sodass bei erneutem Kontakt mit dem Allergen die Soforttyp-Reaktion abläuft. Dabei bindet das Allergen an zellassoziiertes IgE, was zur Degranulierung der Effektorzellen führt. Im Fall von Heuschnupfen degranulieren hauptsächlich Mastzellen in den Schleimhäuten der Augen und Atemwege. Die dadurch freigesetzten Wirkstoffe, wie Histamin, Serotonin und Prostaglandine rufen dann die typischen Symptome hervor. Bei Asthma sind noch eine Reihe weiterer pathologischer Veränderungen zu beobachten, wie gesteigerte Produktion von Schleim in den Bronchien, erhöhte Reaktivität der Bronchialmuskulatur und die Bildung eines von Eosinophilen dominierten entzündlichen Infiltrats im Gewebe.^[12]

IL-4 und IL-13 sind nicht nur an der allergischen Sensibilisierung, sondern auch an den Reaktionen der Effektorphase beteiligt. Sie erhöhen die Aktivität von Mastzellen,^[13] Baso-

philen^[14] und Eosinophilen,^[15] führen zu Differenzierung und Hypertrophie von schleimproduzierenden Becherzellen^[16, 17] und sind durch die Induktion von entsprechenden Adhäsionsmolekülen^[18] und Chemokinen^[19] an der Bildung eines eosinophilen Infiltrats beteiligt.

Die TH2-Differenzierung, die ganz am Anfang der Reaktionskaskade steht, ist die einzige Reaktion bei der ausschließlich IL-4 aktiv ist. IL-13 kann diese Aufgabe nicht übernehmen.^[20] Im späteren Verlauf der Erkrankung scheint jedoch IL-13 zu dominieren, da es für längere Zeit und in größeren Mengen produziert wird als IL-4. In der asthmatischen Lunge ist IL-13 in großen Mengen nachweisbar, während IL-4 kaum messbar ist. IL-13 ist also während der Effektorphase das wichtigere Cytokin.^[21–24]

3. IL-4R α – die Rezeptorkette für die allergische Antwort

Der Grund für die weitgehend gleichen Wirkungen von IL-4 und IL-13 ist die Verwendung einer gemeinsamen Rezeptorkette, IL-4R α . Transgene Mäuse mit einem zerstörten IL-4R α -Gen zeigen keine messbaren Reaktionen auf IL-4 oder IL-13, was darauf hinweist, dass diese Kette für beide Cytokine unverzichtbar ist.^[17, 25–28] Aus Bindungsstudien weiß man, dass IL-4 direkt an IL-4R α binden kann.^[29–31] Je nach Zelltyp wird dann eine zweite Rezeptorkette rekrutiert: Entweder γ_c ^[32, 33] oder IL-13R $\alpha 1$ ^[34–37] (Abbildung 2). IL-13 bindet zuerst an IL-13R $\alpha 1$ und rekrutiert dann IL-4R α . Trotz unterschiedlicher Reihenfolge der Assoziation verwenden IL-4

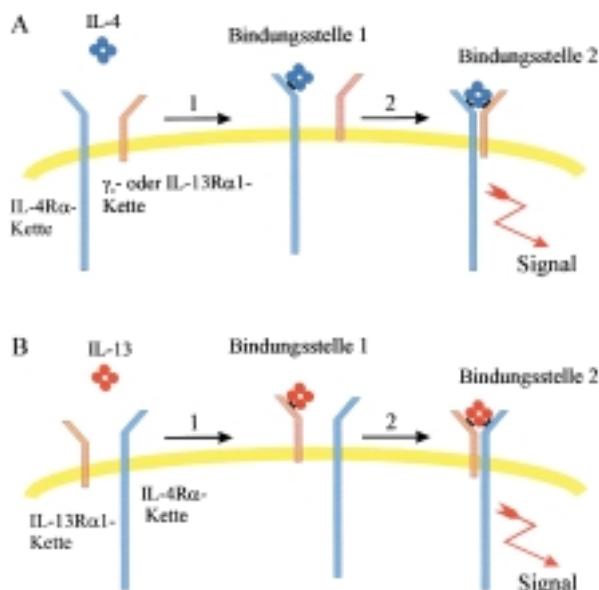


Abbildung 2. IL-4 (A) und IL-13 (B) vermitteln Signale über den identischen heterodimeren Rezeptor aus IL-4R α - und IL-13R α 1-Kette. Die Reihenfolge der Dimerisierung ist jedoch unterschiedlich (siehe Text). Der Komplex aus IL-4 und IL-4R α kann in der Membran entweder mit γ_c oder mit IL-13R α 1 assoziieren. Das entstehende Signal ist, soweit bekannt, gleich.

und IL-13 mit dem IL-4R α /IL-13R α 1-Heterodimer also einen identischen Rezeptorkomplex.^[20, 38]

Im allergischen Geschehen kann IL-4 als Hauptschalter betrachtet werden, der alle nachfolgenden Prozesse auslöst. In diesem Sinne ist das IL-4-System ein ideales Target für die Prävention von Allergien. Transgene Mäuse ohne funktionelles Gen für IL-4 sind nicht in der Lage allergische Reaktionen zu entwickeln, und auch die bereits erwähnten transgenen Mäuse ohne IL-4R α tun dies nicht.^[39] Umgekehrt entwickeln transgene Mäuse mit erhöhter IL-4-Produktion selbst in Abwesenheit von Allergenen allergieähnliche Symptome.^[40–43] Die Applikation von IL-4 in der Lunge von Asthmapatienten löst einen asthmatischen Anfall aus.^[44] Entsprechende Versuche mit IL-13 in Mäusen führen zu einer sehr hohen Schleimproduktion und anderen Asthma-symptomen.^[17, 21, 22, 24] IL-4 und IL-13 spielen also für Auslösung und Unterhalt allergischer Reaktionen eine zentrale Rolle, sodass eine Hemmung des IL-4/IL-13-Systems therapeutisch nützlich sein könnte.

3.1. Die Auswahl des Zielmoleküls

Ein günstiges Target für eine solche Hemmung scheint vor allem IL-4R α zu sein. Da der Rezeptor für beide Cytokine essentiell ist, werden beide gehemmt. Eine direkte Hemmung der Liganden würde dagegen nur jeweils eines der beiden Cytokine treffen. Da die Sequenzen von IL-4 und IL-13 nur etwa 25% Homologie aufweisen, bestehen für die Entwicklung bispezifischer Inhibitoren nur geringe Aussichten. Lösliche Varianten der Rezeptoren binden bestenfalls nur eines

der beiden Cytokine. IL-4R α allein bindet IL-4, IL-13R α 1 allein bindet IL-13, und γ_c allein bindet keinen der beiden Liganden.

Unter den Rezeptorketten bieten sich γ_c und IL-13R α 1 nicht besonders an, da ihre Ausschaltung keine komplette Hemmung beider Liganden zur Folge hätte. Besonders γ_c ist als pharmazeutisches Target kaum geeignet: Diese Rezeptorkette wird auch von IL-2, IL-7, IL-9 und IL-15 verwendet, sodass man in eine ganze Reihe von Regulationssystemen eingreifen würde.^[45] Der genetische Verlust von γ_c führt zu der schweren Immunschwäche-krankheit X-SCID (X chromosome-linked severe combined immunodeficiency), bei der wegen fehlender IL-7-Signale keine T-Zellen gebildet werden, sodass das Immunsystem weitgehend ausfällt.^[45–48] Ein Fehlen von IL-4R α scheint dagegen zumindest von transgenen Mäusen gut vertragen zu werden: Die Tiere sind auch für die Abwehr von Bakterien und Viren normal immunkompetent.^[25–28] Aus diesen Überlegungen heraus kann man IL-4R α als Schlüsselprotein der allergischen Reaktion und als bevorzugtes Ziel einer pharmazeutischen Hemmung identifizieren.

Die IL-4/IL-13-abhängige Signalübertragung wird in erster Linie von IL-4R α organisiert, mit dem eine Reihe von Signalmolekülen assoziieren können.^[8] Ein Komplex aus IRS-2 (Insulin Rezeptor Substrat-2) und daran ankoppelnden Proteinen scheint für die Zellproliferation und für die Hemmung von Apoptose verantwortlich zu sein.^[49] Ein zweiter Signalweg beinhaltet die Aktivierung von Kinasen aus der Jak-Familie und die Phosphorylierung von Stat6.^[50] Stat6 ist ein Transkriptionsfaktor, der vor allem die Expression von Genen aus dem Bereich der Zelldifferenzierung reguliert. Dazu gehören die Verstärkung der IL-4-Produktion während der TH2-Differenzierung,^[51] der Klassenwechsel der B-Zellen zu IgE,^[52–54] die Expression des IgE-Rezeptors CD23 auf B-Zellen und Monozyten^[55, 56] und die Induktion des entzündungshemmenden Proteins IL-1RA in Makrophagen.^[57]

Betrachtet man diese Signalwege auf der Suche nach aussichtsreichen Targets, so scheidet der IRS-2-Weg vermutlich aus, da die IL-4/IL-13-induzierte Kontrolle von Proliferation und Apoptose im Rahmen von Allergien nicht ausschlaggebend ist, während die Zelldifferenzierung eine große Rolle spielt. In der Jak/Stat-Signalstrecke erscheinen die Jak-Kinasen wenig aussichtsreich, da sie von zahlreichen anderen Rezeptoren ebenfalls aktiviert werden, sodass eine Hemmung ohne wesentliche Nebenwirkungen kaum möglich sein dürfte.^[58, 59] Dagegen ist Stat6 zumindest im Bereich der Cytokine für die Signalübertragung von IL-4 und IL-13 spezifisch, sodass es als interessante Zielstruktur gelten kann.^[58, 59]

Eine Hemmung von IL-4R α oder von Stat6 eröffnet für die Therapie allergischer Erkrankungen völlig neue Perspektiven. Bisher gibt es nur die Möglichkeit, durch spezifische Immuntherapie eine Desensibilisierung gegen ein definiertes Allergen zu versuchen oder durch Wirkstoffe wie Antihistaminika, Cromoglicinsäure, Nedocromil oder Corticosteroide den Verlauf der Effektorphase während eines akuten Krankheitszustandes zu beeinflussen. Die Ausschaltung der IL-4/IL-13-Wirkungen würde dagegen eine spezifische Immunsuppression des allergischen Systems bewirken.

4. Strukturaufklärung der IL-4/IL-4R α -Bindungsüberfläche

Die rationale Entwicklung eines Hemmstoffs für das IL-4/IL-13-System beruht auf dem strukturellen Verständnis seiner Komponenten. Aus strukturbiologischer Sicht erfordert die cytokinvermittelte, sequentielle Assoziation verschiedener Rezeptorketten ein fein aufeinander abgestimmtes System von molekularen Erkennungsschritten zwischen dem Cytokin und den extrazellulären Domänen seiner Rezeptorketten. Für die Intervention im IL-4-System ist die Bindungsaktivität der IL-4R α -Kette von zentraler Bedeutung. Ein Verlust der Bindungsfähigkeit würde IL-4 und IL-13 effektiv hemmen.

Innerhalb der IL-4R α -Kette wird die molekulare Erkennung des Liganden ausschließlich durch die 207 Aminosäurereste umfassende extrazelluläre Domäne vermittelt, die als separat exprimiertes Protein – das IL-4-Bindeprotein (IL4-BP) – die gleiche Affinität, Spezifität und Geschwindigkeit der IL-4-Bindung zeigt wie die vollständige Rezeptorkette ($K_d \approx 150 \text{ pm}$, $K_{on} \approx 10^7 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$).^[60, 61] Vor kurzem gelang die Röntgenstrukturanalyse des binären Komplexes aus IL4-BP und IL-4.^[62] Voraussetzung dafür war die Entwicklung von Verfahren für die Expression von IL4-BP in *E. coli* und für die Rückfaltung des Proteins in die funktionelle Struktur.^[63] Da nun die Struktur und die räumliche Anordnung der Bindungspartner und ihre Wechselwirkungen im binären Komplex bekannt sind, wird zusammen mit der Mutations- und quantitativen Interaktionsanalyse^[64] ein besseres Verständnis der molekularen Erkennung zwischen IL-4 und IL-4R α möglich. Daraus ergeben sich Schlussfolgerungen für eine Hemmstoffentwicklung und für Rezeptor/Ligand-Wechselwirkungen in der Cytokinrezeptor-Superfamilie.

4.1. Die Cytokinrezeptor-Superfamilie

Cytokinrezeptoren werden zu einer Superfamilie zusammengefasst, da sie konservierte Sequenzbereiche – die „cytokine receptor homology (CRH) region“ – in extrazellulären Domänen aufweisen.^[65] Die ca. 200 Aminosäurereste umfassende CRH trägt die ligandenbindenden Determinanten des Rezeptors. Sie besteht aus zwei Proteindomänen, die über ein kurzes Zwischensegment kovalent verbunden sind. Darüber hinaus ist die CRH in den meisten Rezeptoren gekennzeichnet durch vier konservierte Cysteinreste in der N-terminalen Domäne und ein streng konserviertes Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser-Sequenzmotiv in der C-terminalen Domäne. Rezeptoren mit diesen Merkmalen, zu denen auch IL-4R α gehört, werden als Cytokinrezeptoren der Klasse I bezeichnet. Die eng verwandten Klasse-II-Rezeptoren weisen ein CRH mit vier unterschiedlichen konservierten Cysteinen, aber kein Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser-Motiv auf.^[65]

ne und ein streng konserviertes Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser-Sequenzmotiv in der C-terminalen Domäne. Rezeptoren mit diesen Merkmalen, zu denen auch IL-4R α gehört, werden als Cytokinrezeptoren der Klasse I bezeichnet. Die eng verwandten Klasse-II-Rezeptoren weisen ein CRH mit vier unterschiedlichen konservierten Cysteinen, aber kein Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser-Motiv auf.^[65]

4.2. Die Struktur von IL4-BP

Das IL-4-Bindeprotein hat eine L-förmige Struktur und besteht aus den Domänen D1 (Aminosäurerest 1–91) und D2 (Aminosäurerest 97–197), die über ein kurzes, helicales Segment miteinander verbunden sind (Abbildung 3). Die beiden Domänen gehören zur Immunglobulin-Superfamilie und ähneln strukturell dem Fibronectin-Typ-III-Modul.^[66, 67] Ihre Faltung ist durch eine „Sandwich“-artige Struktur charakterisiert, die sieben antiparallele β -Stränge umfasst, welche in einem dreisträngigen (Stränge β A, β B, β E) und einem viersträngigen β -Faltblatt (Stränge β G, β F, β C, β C') organisiert und gegeneinander um ca. 40° verdreht sind. Die Faltung der Domäne D1 gehört zum Subtyp „h“^[66] der Immunglobulin-Familie, wo der β -Strang C zunächst mit dem β -Strang C' wechselwirkt und dann in seiner direkten Verlängerung, die nun β -Strang D genannt wird, mit dem β -Strang E des anderen Faltblattes gepaart ist. Die Domäne

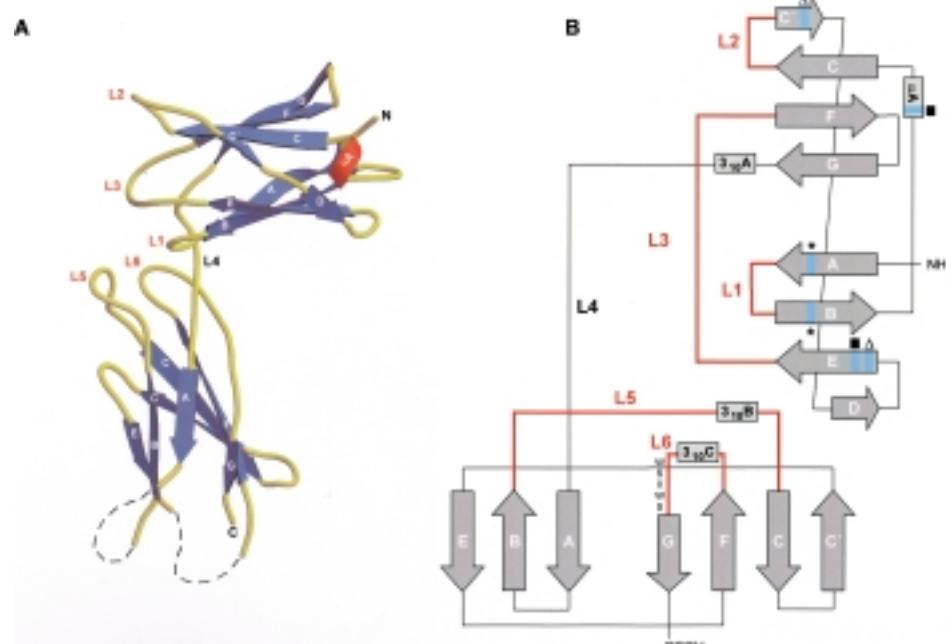


Abbildung 3. Struktur der extrazellulären Domäne von IL-4R α (IL4-BP). A) Ribbon-Darstellung von IL4-BP. α -Helices sind in Rot, β -Stränge in Blau und verbindende Schleifen in Gelb dargestellt. Amino- und Carboxytermini sind mit N bzw. C markiert, die β -Stränge der beiden Domänen des Bindeproteins sind gemäß Lit. [66] bezeichnet und die Markierung der Schleifen, die zum Liganden hin orientiert sind, folgt Lit. [76]. B) Topologisches Diagramm des Aufbaus von IL4-BP. Die beiden Domänen gehören faltungs-topologisch zur Immunglobulin-Superfamilie und ähneln in struktureller Hinsicht dem Fibronectin-Typ-III-Modul.^[79] Sekundärstrukturelemente sind als Pfeile (β -Stränge) und Rechtecke ($\alpha/3_{10}$ -Helices) dargestellt. Die Positionen der sechs Cysteinreste, die zu drei Disulfidbrücken verknüpft sind (Cys⁹-Cys¹⁹, Cys²⁹-Cys⁵⁹, Cys⁴⁹-Cys⁶¹), sind als blaue Streifen angezeigt. Die Position des konservierten WSXWS-Motivs in D2, das Strang β G vorausgeht, ist eingekennzeichnet, und die zur Wechselwirkung mit dem Liganden beitragenden fünf Schleifen (L1–L3, L5 und L6) sind in Rot hervorgehoben.

enthält sechs Cysteinreste, die zu den drei Disulfidbrücken Cys⁹-Cys¹⁹, Cys⁴⁹-Cys⁶¹ und Cys²⁹-Cys⁵⁹ verknüpft sind, von denen die ersten beiden in Klasse-I-CRHs konserviert sind,^[65] während die dritte nur in IL-4R α auftritt. Domäne D2 weist die Fibronectin-Typ-III-Topologie auf („s“-Typ der Immunoglobulinfaltung).^[66] Sie enthält keine Disulfidbrücken und trägt das konservierte Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser-Motiv, das in einer Ausbuchtung vor Strang β G lokalisiert ist (Abbildung 3). Im Bindeprotein sind die beiden Domänen so zueinander orientiert, dass das C-terminale Ende von Domäne D1 und das N-terminale Ende von D2 zum Lösungsmittelraum hin weisen und nicht direkt aufeinander zu (Abbildung 3). Diese Orientierung, die zu einer relativ offenen Gesamtstruktur mit einem Domänen-Domänen-Winkel von ca. 90° und einem kleinen Domänen-Domänen-Interface führt, hat wichtige Konsequenzen für die Ligandenbindung, da so die Schleifen AB_{D1} (als L1 in Abbildung 3 markiert), CC'_{D1} (=L2), EF_{D1} (=L3), BC_{D2} (=L5), C'E_{D2} (nicht markiert in Abbildung 3) und FG_{D2} (=L6) in der Nähe des Verbindungssegmentes angeordnet und weitgehend zum Lösungsmittelraum hin exponiert sind.

4.3. Die Struktur von IL-4

Reifes, humanes IL-4 ist ein monomeres Protein von 129 Aminosäuren, dessen Struktur unabhängig durch NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie aufgeklärt wurde.^[68–71] Das Molekül besteht aus vier bündelförmig angeordneten α -Helices, die in sequentieller Reihenfolge mit A–D bezeichnet werden (Abbildung 4). Sie sind so angeordnet, dass die Helices A und B nach oben und die Helices C und D nach unten zeigen. Diese ungewöhnliche Anordnung wird als „up-up-down-down“-Topologie bezeichnet. Sie führt dazu, dass jede Helix antiparallel zu den beiden benachbarten

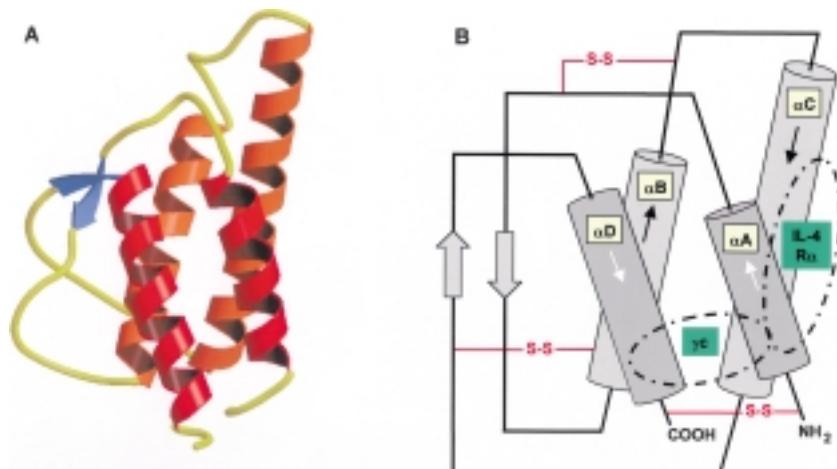


Abbildung 4. Struktur von Interleukin-4. A) Ribbon-Darstellung von IL-4. α -Helices sind in Rot (vorn liegende α -Helices α A und α D) und Orange (hinten liegende α -Helices α B und α C), β -Stränge in Blau und verknüpfende Schleifen in Gelb dargestellt. B) Topologisches Diagramm des Aufbaus von IL-4. Sekundärstrukturelemente sind als Zylinder (Helices) und Pfeile (β -Stränge) dargestellt. Die Positionen der sechs Cysteinreste, die in drei Disulfidbrücken verknüpft sind (Cys³-Cys¹²⁷, Cys²⁴-Cys⁶⁵, Cys⁴⁶-Cys⁹⁹), sind in Rot eingezzeichnet. Die Positionen der Bindungsstellen der beiden Rezeptorketten sind zusätzlich durch gestrichelte Ellipsen angezeigt: das Bindungsepitop der Rezeptor- α -Kette auf der Helix-AC-Fläche und das von γ_c auf der Helix-AD-Fläche.

Helices orientiert ist und es zwei lange Verbindungssegmente nach den Helices A und C gibt, die jeweils das gesamte Molekül überspannen, sowie ein kurzes Verbindungssegment nach Helix B, das zwei aufeinanderfolgende Helices verbindet. Die beiden langen Verbindungssegmente enthalten darüber hinaus zwei kurze β -Stränge, die ein kleines, antiparalleles β -Faltblatt bilden, das gegen die Helices B und D gepackt ist. Die sechs vorhandenen Cysteinreste sind zu drei Disulfidbrücken miteinander verknüpft, Cys³-Cys¹²⁷, Cys²⁴-Cys⁶⁵ und Cys⁴⁶-Cys⁹⁹. Eine solche Struktur – als Vier-Helix-Bündel bezeichnet – wird auch bei anderen Cytokinen beobachtet. Es können zwei Varianten unterschieden werden: die kurzketigen Vier-Helix-Bündel, zu denen neben IL-4 auch IL-2, -3, -5, -7, -9, -13 und -15 sowie GM-CSF gehören, und die langketigen, zu denen das Wachstumshormon, Prolaktin, G-CSF, Erythropoietin, IL-6, IL-11, Oncostatin M, LIF und CNTF zählen.^[72] Mitglieder der kurzketigen Familie sind durch Kettenlängen von 105 bis 145 Aminosäureresten, kurze α -Helices (ca. 15 Aminosäurereste) und einen Winkel von ca. 35° zwischen den Helixpaaren A/D und B/C charakterisiert, während Mitglieder der langketigen Familie zwischen 160 und 200 Aminosäurereste, lange α -Helices (ca. 25 Aminosäurereste) und eine stärkere Ausrichtung der helicalen Achsen (Winkel von ca. 20° zwischen den Helixpaaren A/D und B/C) aufweisen.

IL-4 hat je eine Bindungsstelle für beide Rezeptorketten. Das Bindungsepitop von IL-4 für die hochaffine Bindung der α -Kette wurde auf der von den Helices α A und α C gebildeten Oberfläche (nachfolgend als „Helix-AC-Fläche“ bezeichnet, vgl. Abbildung 4) lokalisiert,^[64, 73] während das für die Bindung von γ_c verantwortliche Epitop auf der von den Helices α A und α D gebildeten Oberfläche („Helix-AD-Fläche“) lokalisiert wurde.^[73, 74]

Untersuchungen mit IL-4-Mutanten auf Zellen, die den Typ-2-IL-4-Rezeptor tragen, weisen darauf hin, dass auf dem

IL-4-Molekül die Bindungsstellen für IL-13R α 1 und γ_c überlappen.^[75, 76] IL4-BP bindet mit den oben bezeichneten Schleifen an die Helix-AC-Fläche von IL-4, wobei die Quartärstruktur des Komplexes durch annähernd senkrecht zueinander angeordnete Molekühlhauptachsen gekennzeichnet ist. Die bindenden Schleifen von IL4-BP sind dabei leiterförmig übereinander und annähernd kollinear mit den helicalen Achsen der Helices von IL-4 angeordnet (Abbildung 5).

4.4. Der IL-4/IL4-BP-Komplex

Die Struktur des rezeptorgebundenen IL-4 ist der des nicht gebundenen sehr ähnlich, die kristallographische Analyse^[62] zeigt jedoch eine leicht geänderte relative Konformation der Helices von IL-4, wobei die helicalen Achsen der Helices α A und α D eine gegeneinander verkippte Anordnung einnehmen, während die Anordnung

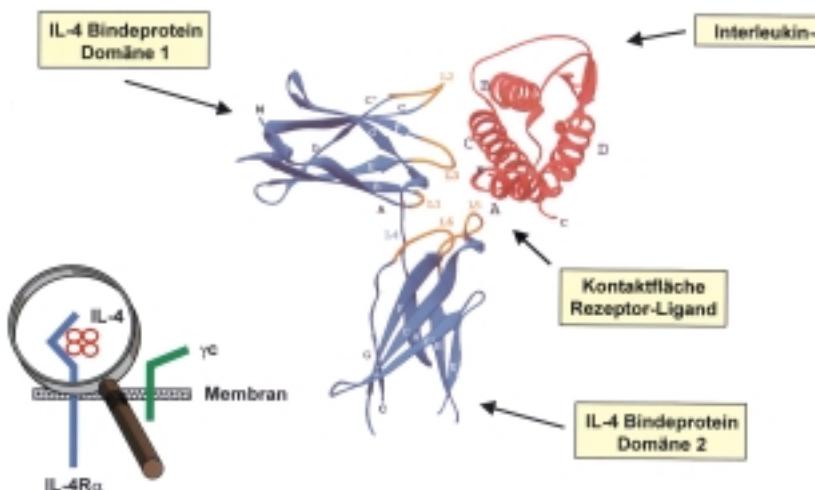


Abbildung 5. Struktur des IL-4/IL4-BP-Komplexes. Ribbon-Darstellung des Komplexes aus IL-4 (rot) und IL4-BP (blau/gelb; vgl. auch kleines Schema). Amino- und Carboxytermini sind mit N bzw. C markiert; die Bezeichnung der Helices und Stränge folgt Lit. [66]. Die fünf Schleifen von IL4-BP, die an Wechselwirkungen mit IL-4 beteiligt sind, sind gelb hervorgehoben und gemäß Lit. [76] bezeichnet. Sie sind stapelförmig in vier Ebenen in der Reihenfolge L2, L3, L1 und L5/L6 von oben nach unten angeordnet. Die Schleife L4, die die beiden Domänen verbindet, wechselwirkt nicht mit IL-4; sie ist jedoch der Vollständigkeit wegen eingezeichnet und blau markiert.

der helicalen Achsen der Helices α B und α C eher gleich bleibt. Die deutlichsten Strukturänderungen finden sich im Bereich des funktionellen Bindungsepitops von γ_c ,^[74] wo verringerte intramolekulare C_{α} - C_{α} -Abstände der determinierenden Aminosäurereste (Thr¹¹, Asn¹⁵, Tyr¹²⁴) gefunden werden: Der Abstand im Paar Ile¹¹-Tyr¹²⁴ schrumpft dabei um 1.0 Å, der im Paar Asn¹⁵-Tyr¹²⁴ um 1.5 Å. Die Konformationsänderung von IL-4 nach Bindung an IL-4R α kann von funktioneller Bedeutung sein, da γ_c freies IL-4 in submikromolarer Konzentration nicht bindet.^[74] Konformationsänderungen in IL-4, die durch Bindung an IL-4R α ausgelöst werden, können deshalb die Voraussetzung für eine Assoziation von γ_c an den binären Komplex und damit für die Signalauslösung sein.

Das strukturelle Bindungsepitop wird von je 18 Aminosäureresten der beiden Bindungspartner gebildet, die über unterschiedliche Sequenzabschnitte verteilt sind. Auffällig sind die ausgeprägte Nichtplanarität und der polare Charakter der komplementären Bindungsflächen (Abbildung 6 A). Zur Bindung beitragende Aminosäureresten von IL-4 sind über drei Helices verteilt und umfassen hauptsächlich polare und geladene Amino-

säuren, während das Rezeptorepitop aus Aminosäureresten von fünf Schleifen aufgebaut ist und eine hydrophobe Mittellinie aufweist, um die Gruppen von Tyr- und Ser- bzw. Asp-Resten platziert sind (Abbildung 6 A). Insgesamt umfasst das strukturelle Bindungsepitop auf jedem Bindepartner eine Oberfläche von ca. 800 Å² (gemessen als Abnahme der lösungsmittelzugänglichen Fläche^[77] bei der Komplexbildung). Die bedeckte Fläche liegt damit in der gleichen Größenordnung wie bei anderen Cytokin/Rezeptor-Wechselwirkungen, etwa bei der topologisch äquivalenten, niederaffinen Wechselwirkung des Wachstumshormons mit seinem Bindeprotein.^[78] Dies zeigt, dass eine hochaffine Wechselwirkung mit einer kleinen Interaktionsfläche erreicht werden kann und dass die Größe der Bindungsfläche und die Bindungsaaffinität nicht direkt voneinander abhängen.

4.5. Hochauflösende Interaktionsanalyse

Die Analyse der Bindung von IL-4 an den Rezeptor auf ganzen Zellen oder an lösliches IL-4BP ergibt eine Dissoziationskonstante K_d von etwa 100 pm (Abbildung 7). Diese

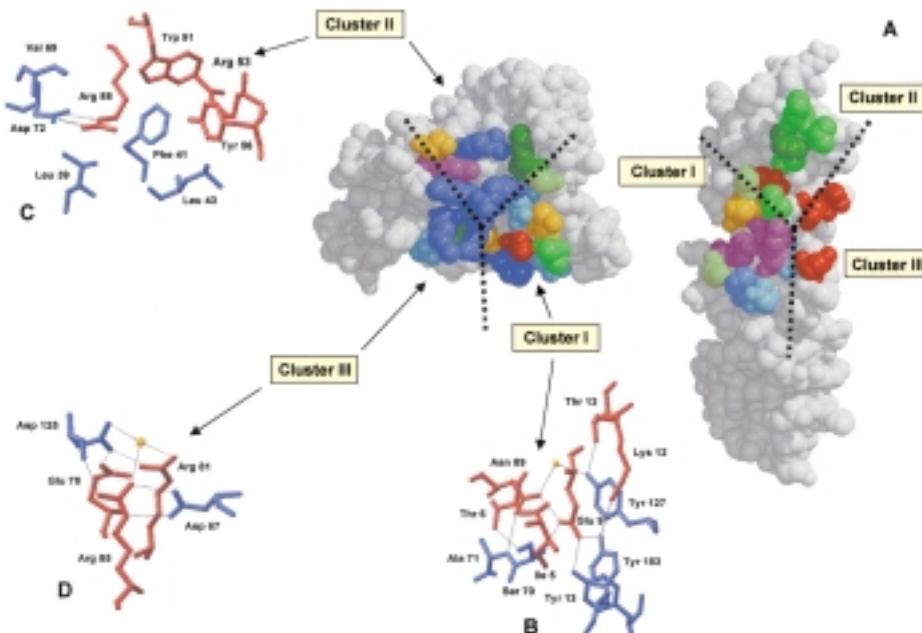


Abbildung 6. Das Strukturepitop des IL-4/IL4-BP-Komplexes. A) „Open-Book“-Darstellung der komplementären strukturellen Epitope von IL-4 (links) und IL4-BP (rechts). Aminosäurereste, die Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand bilden, sind farblich hervorgehoben und gemäß ihrer physikochemischen Eigenschaften kodiert; rot: negativ geladen (Asp, Glu); dunkelblau: positiv geladen (Arg, Lys); hellblau: His; cyan: Gln/Asn; magenta: Tyr; orangefarben: Ser/Thr und grün: hydrophob. B)–D) Detailansichten des IL-4/IL4-BP-Kontaktes. IL-4-Glu⁹ bildet das Zentrum eines Netzes aus Wasserstoffbrückenbindungen und ist umschlossen von hydrophoben Seitenketten („Cluster I“, B). IL-4-Arg⁸⁸ und IL4-BP-Asp⁷² bilden eine zentrale Salzbrücke, die von aromatischen und aliphatischen Gruppen umgeben ist („Cluster II“, C). Elektrostatische Wechselwirkungen dominieren „Cluster III“ (D).

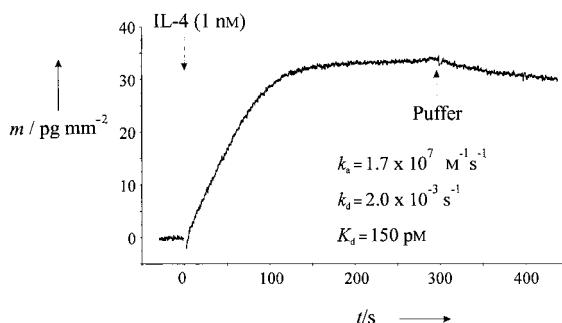


Abbildung 7. Die Bindung von IL-4 an IL4-BP verläuft ungewöhnlich schnell. Der Zerfall des Komplexes ist sehr langsam. Das Sensogramm zeigt die Kinetik der Assoziation von 1 nM IL-4 an IL4-BP, das auf einem Biosensor immobilisiert vorliegt.^[61] In Gegenwart von Puffer allein zerfällt der Komplex mit einer Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ von etwa 6 min. Die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_a) und der Dissoziation des Komplexes (k_d) sind angegeben, ebenso wie die errechnete Dissoziationskonstante K_d .

hohe Affinität ist das Resultat einer schnellen Assoziation ($k_a = 1 - 2 \times 10^7$) und einer sehr langsamen Dissoziation ($k_d = 2 \times 10^{-3}$). Die Verbindung von Mutations- und quantitativer Interaktionsanalyse erlaubt es – mit durchaus unerwarteten Ergebnissen –, den Beitrag jedes Kontaktrestes zur Freien Energie der Bindung abzuschätzen. Dazu wird durch gezielte Mutagenese für jeden einzelnen der Kontaktreste in IL-4 und in IL4-BP eine entsprechende Alanin-substituierte Variante gebildet. Diese Mutation entspricht dem Ersatz einer Aminosäureseitenkette durch eine Methylgruppe. Nach Expression in *E. coli* und anschließender Renaturierung und Reinigung können die meisten Alaninvarianten in >96% Reinheit erhalten werden. Wird nun die Alaninvariante für jeden Kontaktrest in IL-4 und in IL4-BP auf ihre Bindefähigkeit untersucht, so ergibt sich folgendes Bild:

Die Substitution der IL-4-Seitenketten Glu⁹ und Arg⁸⁸ führt zu Affinitätsverlusten (K_d) um den Faktor 300 bis 1000. Dies entspricht einem Verlust der Freien Energie der Bindung ($\Delta\Delta G_0$) um 3–4.5 kcal mol⁻¹. Glu⁹ und Arg⁸⁸ sind offensichtlich die Hauptdeterminanten der Bindung. Fünf weitere Seitenketten (Ile⁵, Thr¹³, Asn⁸⁹, Trp⁹¹ und Arg⁵³) sind Nebendeterminanten, deren Substitution durch Alanin zu Verlusten in der Affinität um den Faktor 3 bis 10 führt ($\Delta\Delta G_0 = 0.4 - 1 \text{ kcal mol}^{-1}$). Die weiteren Kontaktreste von IL-4 tragen nicht direkt zur Bindung bei. Kleine Beiträge zur Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (k_a), im ganzen etwa einen Faktor von 10, tragen zusammen genommen die positiv geladenen Seitenketten von IL-4 bei. Dieser globale Ladungseffekt von etwa sechs positiv geladenen Seitenketten bewirkt offensichtlich eine erste Ausrichtung der komplementär geladenen Proteine bei der Assoziation (elektrostatische Steuerung).^[79]

Die Mutagenese der Rezeptor- α -Kette ergänzt das Energieprofil des IL-4-Bindungsepitops. Die höchsten Affinitätsverluste treten dabei nach Alaninsubstitution von Asp⁷², Tyr¹³ und Tyr¹⁸³ auf. Offensichtlich bindet der negativ geladene Asp⁷²-Rest die Arg⁸⁸-Seitenkette von IL-4 über eine Coulomb-Wechselwirkung. Die Struktur zeigt, dass die Carboxylat- und Guanidinogruppen perfekt ausgerichtet sind. Die Rezeptorreste Tyr¹³ und Tyr¹⁸³ gehen über die phenolischen

OH-Gruppen Wasserstoffbrückenbindungen mit IL-4-Glu⁹ ein. Dabei sind auch die Carbonylgruppe der Peptidbindung von Ser⁷⁰ im Rezeptor und als vierter Partner die Carbamidgruppe von Asn⁸⁹ in IL-4 beteiligt. Die Struktur zeigt die perfekte „sp²-Geometrie“ der beteiligten Atome. Es fällt auf, dass Nebendeterminanten im Rezeptor, deren Substitution zu Affinitätsverlusten von einem Faktor von etwa 10 bis 50 führen, hydrophob sind (Tyr¹²⁵, Val⁹⁰, Phe⁴⁵ etc.). Vermutlich führt diese Hülle von hydrophoben Seitenketten („Avocado-Cluster“) zu einer verstärkten Bindung in den polaren Hauptdeterminanten. Der Aufbau dieser Bindungsepitope ist also mosaikartig und überwiegend polar, im Unterschied zu der einzelnen zentralen hydrophoben Wechselwirkung („hot spot of hydrophobic binding energy“), die für die hochaffine Bindung im Wachstumshormon/Rezeptor-Komplex beschrieben worden ist.^[78]

4.6. Der Mechanismus der Protein/Protein-Wechselwirkung: das Drei-Cluster-Modell

Die Kontaktfläche zwischen IL-4 und dem Bindeprotein zeigt einen mosaikförmigen Aufbau mit drei diskreten Gruppen wechselwirkender Aminosäurereste (nachfolgend als „Cluster“ bezeichnet; Abbildung 6 A). Zwei dieser Cluster haben eine „Avocado-Cluster“-Anordnung, also eine auffällig amphipathische Struktur mit einem äußeren Mantel hydrophober Seitenketten, die um einen inneren Kern polarer Gruppen angeordnet sind. Cluster I ist um Glu⁹ von IL-4 aufgebaut, wobei seine Carboxylatgruppe drei Bindungen von den Resten Tyr¹³, Tyr¹⁸³ und Ser⁷⁰ des Bindeproteins akzeptiert (Abbildung 6 A und B). Die geometrisch perfekte Anordnung erscheint durch eine intramolekulare Bindung (zu IL-4-Asn⁸⁹) vororientiert zu sein und wird durch weitere Wechselwirkungen zwischen IL-4-Thr⁶, -Lys¹², -Thr¹³ und -Asn⁸⁹ und IL4-BP-Ser⁷⁰, -Tyr¹⁸³, -Tyr¹²⁷ und -Ala⁷¹ ergänzt. Ein einzelnes Wassermolekül ist im Kontaktbereich eingesperrt und bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen IL-4-Asn⁸⁹ und Rezeptor-Tyr¹²⁷. Umschlossen wird das Netz polarer Wechselwirkungen von aromatischen und aliphatischen Seitenketten: IL-4-Glu⁹ bildet van-der-Waals-Kontakte mit den IL-4-Resten Ile⁵, Lys¹² und Thr¹³ und ist flach gegen die aromatische Seitenkette von IL4-BP-Tyr¹²⁷ gepackt, wobei die Carboxylatgruppe von IL-4-Glu⁹ von den Seitenketten von Tyr¹³, Tyr¹⁸³, Val⁶⁹ und Ala⁷⁰ des Bindeproteins umgeben ist. Cluster II (Abbildung 6 A und C) ist um eine zentrale Salzbrücke zwischen IL-4-Arg⁸⁸ und IL4-BP-Asp⁷² aufgebaut. Guanidino- und Carboxylatgruppe sind in einer Ebene Kante an Kante orientiert und bilden zwei Wasserstoffbrückenbindungen. Asp⁷² liegt fast vollständig vergraben am Boden einer Vertiefung auf der Oberfläche des Bindeproteins, während IL-4-Arg⁸⁸ vollständig aus der Oberfläche von IL-4 herausragt und im Komplex zwischen die Seitenketten von Val⁶⁹ und Phe⁴¹ des Bindeproteins gepackt ist. Abweichend vom bisherigen Aufbauprinzip findet sich bei Cluster III eine vollständig andere Architektur, die von elektrostatischen Wechselwirkungen dominiert wird (Abbildung 6 A und D). Die wechselwirkenden Reste Arg⁸¹, Arg⁸⁵ und Gln⁷⁸ von IL-4 sowie Asp⁶⁶, Asp⁶⁷ und Asp¹²⁵ des Bindeproteins gehen jedoch

keine starken Wechselwirkungen ein, da ihre Bindungsgeometrien deutlich vom Standard-sp²-Typ abweichen.

Insgesamt erhält man aus Struktur-[⁶²] und Mutationsanalyse der IL-4-Kontaktreste[⁶⁴] ein genaues Bild der Wechselwirkung von IL-4 mit der extrazellulären Domäne seiner Rezeptor- α -Kette. Die Hauptdeterminanten der Bindungsaffinität auf der Seite des IL-4 sind die in den Clustern I und II eingebetteten zentralen Reste Glu⁹ und Arg⁸⁸, die für Struktur und Funktion gleichermaßen wichtig sind. Beide Reste zusammen sind für einen Großteil der gesamten Bindungsaffinität verantwortlich. Mutationen von Glu⁹ und Arg⁸⁸ führen zu einem Verlust von Bindungsaffinität um zwei bis drei Größenordnungen. Dagegen führen Mutationen von peripheren Aminosäureresten in Cluster I und II nur zu einem Affinitätsverlust von höchstens einer Größenordnung, was mit ihrer untergeordneten strukturellen Bedeutung übereinstimmt. Dagegen lässt sich aus der Struktur auf eine andere Rolle für Cluster III schließen: Cluster III hat anscheinend nur geringe funktionelle Bedeutung für die Stabilisierung des Komplexes, er scheint aber durch elektrostatische Steuerung[⁷⁹] die außerordentlich schnelle Komplexbildung zu begünstigen. Dementsprechend haben alle Mutationen im Cluster III von IL-4 nur wenig Auswirkung auf die Bindung, sondern beeinflussen einzig die Assoziationsgeschwindigkeit der Mutanten.

4.7. Die Bindung der zweiten Rezeptorkette (γ_c oder IL-13R α 1)

Die hochaffine Wechselwirkung von IL-4 mit der Rezeptor- α -Kette ist wie oben beschrieben gut verstanden. Sowohl das strukturelle Epitop (Kontaktflächen) als auch das funktionelle Epitop (Energieprofil/Landkarte der bindenden Reste) sind charakterisiert. Die mit IL-4 und löslichen Rezeptordomänen erhaltenen kinetischen und thermodynamischen Konstanten der Bindung gleichen den Daten, die mit IL-4 und dem Rezeptor auf ganzen Zellen gemessen worden sind. Dies ist nicht unerwartet, da in beiden Versuchen IL-4 aus der Lösung bindet.

Weniger klar und viel schwerer zu analysieren ist die Wechselwirkung mit der zweiten Kette, welche γ_c oder IL-13R α 1 sein kann. Der zweite Schritt der Aktivierung verläuft beim IL-4-Rezeptor, und nach allem was wir wissen auch bei anderen Cytokinrezeptoren, über die Bindung der zweiten Rezeptorkette an den in der Plasmamembran vorliegenden Komplex aus Ligand und hochaffiner Rezeptorkette. IL-4 bindet in Konzentrationen bis 100 nm nicht messbar an γ_c (oder an IL-13R α 1) auf intakten Zellen, wenn nicht gleichzeitig auch die α -Kette vorhanden ist. IL-4R α ist bei diesen IL-4-Konzentrationen bereits völlig gesättigt ($K_d \approx 100$ pm). Deswegen werden γ_c und IL-13R α 1 als niederaffine Bindungspartner von IL-4 bezeichnet.

Mit löslichen Ektodomänen der α - und γ_c -Kette lässt sich die Bildung des ternären Komplexes in Gegenwart von IL-4 auf einem Biosensor nachweisen (Abbildung 7). Die γ_c -Ektodomäne bindet an den Komplex aus IL-4 und immobilisierten IL4-BP mit einer Affinitätskonstante von $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Die Affinität zwischen IL-4 allein und γ_c -Ektodomäne ist nur

um den Faktor 50 niedriger. Die erhöhte Affinität zum IL-4/IL4-BP-Komplex könnte von einer kleinen Konformationsänderung des IL-4 im Komplex herrühren oder von sehr schwachen Wechselwirkungen zwischen den beiden Ektodomänen.

Die Dissoziationskonstante von 3.5 μM für die Dissoziation der γ_c -Ektodomäne aus dem ternären Komplex liegt weit oberhalb der physiologischen IL-4-Konzentrationen, aber trotzdem ist IL-4 bereits bei subnanomolaren Konzentrationen biologisch aktiv. Es muss also eine IL-4-abhängige Dimerisierung und Transaktivierung der Ketten stattfinden. Dafür gibt es mehrere Möglichkeiten.

Die direkten Wechselwirkungen zwischen den Ektodomänen von α und γ_c sind offensichtlich nur gering und bereits in der K_d von 5 μM berücksichtigt, doch könnten direkte Bindungen zwischen den Rezeptorketten in den cytoplasmatischen oder Transmembrandomänen auftreten. IL-4 wäre dann nur der notwendige Auslöser einer solchen Rezeptor-Rezeptor-Bindung. In hochexprimierenden Zellsystemen sind mit anderen Rezeptoren ligandenunabhängige Rezeptoraktivitäten zu beobachten, die auf direkte Bindungen zwischen den Rezeptorketten hinweisen. Die Expressionsspiegel der IL-4-Rezeptorketten sind meist niedrig, doch kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine zusätzliche Erhöhung der Konzentration in Membranmikrodomänen, wie den „rafts“, stattfindet.^[80]

Zwischen Membranproteinen ist die Wahrscheinlichkeit für eine produktive Kollision wesentlich größer als zwischen gelösten Molekülen. Eine Dichte von 1000 Rezeptor- α -Ketten auf einer Zelle mit einer Oberfläche von 100 μm^2 entspricht bei homogener Verteilung molekularen Abständen, wie sie in einer 50 nm Lösung vorliegen. Durch die Rezeptorbindung wird die Konzentration von IL-4 daher um Größenordnungen erhöht. Wegen der eingeschränkten Freiheitsgrade der Diffusion, besonders der Rotation, werden produktive Zusammenstöße häufiger. Aufgrund dieser Membraneffekte kann die niedrige Affinität der Bindung des Liganden an die zweite Kette durchaus für eine Rezeptordimerisierung in der Membran ausreichen.

4.8. Von der Theorie zur Praxis: IL-4-Rezeptor-Antagonisten

Die hochaffine Bindung an die α -Kette ist wie beschrieben fast für die gesamte Rezeptoraffinität verantwortlich. Offensichtlich gibt es nur eine geringe Wechselwirkung zwischen den beiden Rezeptorketten, sonst würde die γ_c -Affinität deutlich mehr zur IL-4-Bindung an den gesamten Rezeptor beitragen. Da die benötigte Wechselwirkung zwischen IL-4 und γ_c nur schwach ist, reicht es nicht aus, die beteiligten Reste durch die neutrale Aminosäure Alanin zu ersetzen. Entsprechende Varianten behalten immer noch eine deutliche Agonistenaktivität. In das γ_c -Bindungsepitop von IL-4 müssen daher effektiv abstoßende Reste eingefügt werden, um vollständige Antagonisten zu erhalten.

Durch Alaninsubstitutionen in IL-4 wurden Ile¹¹, Asn¹⁵ und vor allem Tyr¹²⁴ als Hauptdeterminanten der γ_c -Bindung identifiziert. Obwohl die zugehörigen Alaninvarianten um

den Faktor 5 bis 100 weniger stark an die γ_c -Ektodomäne binden, ist ihre biologische Aktivität nur wenig beeinträchtigt. Die Maximalantwort ist höchstens auf die Hälfte verringert und der ED_{50} -Wert, die Dosis bei der eine Zielzelle halbmaximal stimuliert wird, ist unverändert. Durch Substitution von Tyr¹²⁴ mit verschiedenen Aminosäureresten wird eine Reihe partieller Agonisten erhalten, auf die Zellen unterschiedlich gut reagieren (Abbildung 8). Die einzelnen Va-

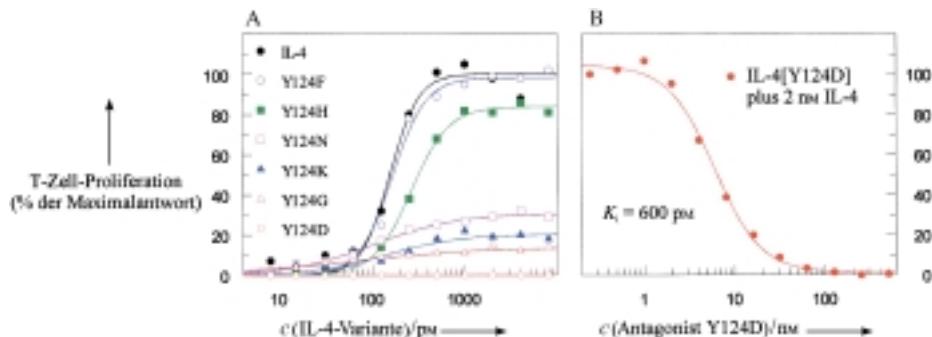


Abbildung 8. IL-4-Mutantenproteine sind partielle Agonisten oder sogar Antagonisten, wenn das niedrige Bindungsepitop für γ_c oder IL-13R $\alpha 1$ gestört oder gänzlich blockiert ist.^[73] A) Der Austausch von IL-4-Tyr¹²⁴ gegen Phe, His, Asn, Lys, Gly oder Asp führt zu Varianten mit unterschiedlich hoher partieller Agonistenaktivität. Der ED_{50} -Wert bleibt im Vergleich zu dem von IL-4 nahezu unverändert. B) Die Variante mit dem Austausch Tyr¹²⁴ gegen Asp hemmt in einem T-Zell-Proliferationstest IL-4 kompetitiv mit einer Hemmkonstante K_i von 600 pm.^[73]

riantnen weisen zwischen 0,5 und 90 % der Aktivität des Wildtyps auf, aber keine davon ist wirklich vollständig inaktiv. Erst durch eine doppelte Substitution von Arg¹²¹ und Tyr¹²⁴ durch zwei Aspartatreste wurde eine vollständig inaktive IL-4-Variante erhalten.^[81] Die K_d -Werte für die Bindung an die α -Kette und die IC_{50} -Werte sind gegenüber dem Wildtyp um den Faktor 2 bis 3 auf 200–300 pm erhöht. Aspartatreste im Bindungsepitop von IL-4 verhindern aufgrund elektrostatischer Abstoßung die Assoziation der γ_c -Kette und damit die Dimerisierung der Rezeptorketten.

Das IL-4-Bindungsepitop für IL-13 $\alpha 1$ ist noch nicht bestimmt. Versuche mit unterschiedlichen IL-4-Varianten auf Zellen, die entweder Typ-1- oder Typ-2-Rezeptoren verwenden, zeigen jedoch, dass die Bindungsepitope von IL-13R $\alpha 1$ und γ_c überlappen.^[75, 76] Die Abstoßungsepitope sind jedoch etwas verschieden, sodass selektive Agonisten gebildet werden können. Die IL-4-Varianten Y124E oder Y124D sind gegenüber γ_c kaum aktiv, wohl aber gegenüber IL-13R $\alpha 1$. Umgekehrt sind die Varianten R121D oder R121E noch aktiv gegenüber γ_c , aber nahezu inaktiv gegenüber IL-13R $\alpha 1$.

5. Prähinische und klinische Anwendungen von IL-4-Antagonisten

Antagonistische IL-4-Mutanten, vor allem der komplett Antagonist R121D/Y124D, zeigen in einer Reihe von Zellkultursystemen ihr Potential als Hemmstoffe. Diese Varianten verhindern zelluläre Reaktionen auf IL-4 und IL-13, wie etwa die Phosphorylierung von Signalübertragungsproteinen, die Regulation der Genexpression und die cytokinabhlängige Zellproliferation. Diese Versuche etablierten auch die Spezi-

fität der Varianten als Hemmstoffe, da andere Cytokine nicht beeinträchtigt sind.

Für den Schritt ins Mausmodell musste eine analoge Variante von Maus-IL-4 hergestellt werden, da IL-4 von Maus und Mensch jeweils speziespezifisch sind. Diese Variante von Maus-IL-4, Q116D/Y119D, ist *in vitro* ein kompletter Antagonist für murines IL-4 und IL-13.^[82] Die Applikation *in vivo* verhindert bei einem Mausmodell der

Allergie gegen ein Proteinantigen die Entwicklung allergischer Parameter.^[39] Bei gleichzeitiger Verabreichung von Antigen und IL-4-Antagonist entwickeln die Mäuse keine messbaren Spiegel von spezifischen Antikörpern der Isotypen IgE und IgG1, die beide in der Maus mit allergischen Reaktionen assoziiert sind. Die intradermale oder intravenöse Gabe des Antigens bleibt ohne jede Symptomatik, obwohl alle nicht mit dem IL-4-Antagonisten behandelten Tiere starke allergische Reaktionen bis hin zu einem tödlichen Schock entwickeln. Der Maus-IL-4-Antagonist Q116D/Y119D schützt also die Tiere vor

der Entwicklung einer Allergie. Zurzeit wird untersucht, inwieweit die Hemmung von IL-4R α auch bereits etablierte Allergien unterdrücken kann.

Für die Anwendung von IL-4-Antagonisten bei Asthma wurden Affen (*Macaca fascicularis*) getestet, bei denen die menschliche Variante verwendet werden kann.^[83] Auch in diesem Fall verhindert der Antagonist, wenn er vor der Sensibilisierung gegeben wird, die Entwicklung von Krankheitssymptomen. In diesem Fall konnte auch bereits eine therapeutische Wirkung nachgewiesen werden. In asthmatischen Tieren führte die Applikation von IL-4-Antagonisten zu einer Verringerung der bronchialen Hyperreaktivität und zu einer geringeren Einwanderung von Eosinophilen in die Atemwege. Weder in diesen Versuchen, noch in den oben angesprochenen Mausstudien wurden Toxizitäten oder andere schädliche Nebeneffekte der IL-4-Varianten beobachtet.

Die günstig verlaufenden Tests *in vitro* und *in vivo*, vor allem die therapeutischen Effekte im Asthmaaffenmodell, haben dazu geführt, dass der IL-4-Antagonist R121D/Y124D seit Frühjahr 1999 in einer von der Bayer AG durchgeföhrten klinischen Studie der Phase 1 erstmals am Menschen getestet wird. Ergebnisse aus diesen Untersuchungen liegen zurzeit noch nicht vor.

6. IL-4-Antagonisten: Paradigma oder Glücksfall?

Cytokinrezeptoren werden durch Homo- oder Heterodimerisierung von Rezeptorketten in der Plasmamembran aktiviert. Einige Rezeptoren wie z.B. der IL-2- oder der IL-6-Rezeptor verwenden eine dritte Kette um die Affinität der Ligandenbindung zu erhöhen. Bei homodimeren wie bei

heterodimeren Rezeptoren bindet der Ligand in einem ersten Schritt über eine hochaffine Wechselwirkung an die erste Kette, bevor sich in einem zweiten Schritt die niederaffine Kette anlagert. Die Frage liegt nahe, ob sich dem Beispiel der IL-4-Rezeptorantagonisten folgend hemmende Varianten für jeden Cytokinrezeptor bilden lassen, indem man das niederaffine Epitop im Liganden durch Mutationen blockiert.

Wahrscheinlich ist dies nicht so. Für entsprechende antagonistische Varianten anderer Cytokine – auch in strukturell sehr ähnlichen Systemen – lassen sich Probleme mit der Bindungsaffinität vorhersagen. Die meisten Cytokinrezeptoren binden ihre Liganden mit $K_d = 100\text{--}500 \mu\text{M}$. Diese Gesamtaffinität des Rezeptorkomplexes wird jedoch nur selten wie beim IL-4-Rezeptor fast ausschließlich durch die hochaffine Kette bereitgestellt. In der Regel bindet die hochaffine Kette bis zu 100fach schwächer als der Gesamtrezeptor. Erst durch Assoziation mit der niederaffinen Kette wird die volle Bindungsstärke erreicht. Dies kann sogar innerhalb der Rezeptorfamilien variieren, die gemeinsame Rezeptorketten verwenden ($\text{gp}130, \gamma_c$ oder β_c).

GM-CSF bindet an seine α -Kette mit $K_d = 2\text{--}12 \text{ nm}$, IL-3 bindet seine mit $K_d = 20\text{--}100 \text{ nm}$ und IL-5 an seine mit $K_d = 1.2\text{--}2 \text{ nm}$. Durch Anlagerung der allen drei Rezeptoren gemeinsamen β_c -Kette wird für alle drei Liganden die Affinität auf 100–500 pm erhöht. Der K_d -Wert nimmt bei IL-5 also nur um den Faktor 3, bei GM-CSF um den Faktor 100 und bei IL-3 um fast 1000 zu. Vermutlich kommt dieser Anstieg bei GM-CSF und IL-5 durch direkte Wechselwirkung der jeweiligen α -Kette mit β_c zustande, wobei die Kopplung unterschiedlich stark ist.

Ähnliche Unterschiede finden sich in der γ_c -Familie. So konnten für IL-2 bisher noch keine brauchbaren Antagonisten hergestellt werden, weil die Bindungsaffinität von IL-2 für IL-2R β und sogar die für einen Komplex aus IL-2R β und γ_c unbefriedigend gering ist. Da eine antagonistische Variante auch nur eine entsprechend geringe Bindungsaffinität haben kann, ist sie gegenüber dem viel stärker bindenden Wildtyp als Hemmstoff wenig effektiv. Eine mögliche Lösung für dieses Dilemma bietet die Herstellung von Superagonisten, deren Affinität für die erste Kette erhöht ist. Bei der Mutagenese mehrerer Cytokine (hGH, IL-6, IL-4) sind Varianten gefunden worden, die stärker als der Wildtyp an ihre hochaffine Kette binden. Eine Kombination aus superagonistischen und antagonistischen Mutationen könnte doch noch eine Übertragung des Hemmprinzips auf andere Cytokine erlauben.

7. Zukunftsperspektive: Miniproteine, Peptidomimetika, niedermolekulare Liganden

Ein rationaler Ansatz für die Bildung von IL-4-Miniproteinen geht von den bekannten Bindungsepitopen aus. Das hochaffine Bindungsepitop von IL-4 für die α -Kette liegt auf zwei antiparallelen α -Helices. Durch Übertragung der bindenden Reste von IL-4 auf die parallelen α -Helices eines Leucinzipppers (Gal4) wurden synthetische Peptide erhalten, die mit einem K_d -Wert im mikromolaren Bereich an die α -Kette binden.^[84]

Pharmakologisch wären kleine Mimetika für IL-4 wünschenswert, die IL-4R α hochaffin binden und wirksam mit IL-4 und IL-13 konkurrieren. Die Herstellung solcher synthetischen Analoga scheint im Prinzip möglich zu sein. Verschiedene Ansätze haben bereits zur Entwicklung von kleinen, chemisch synthetisierbaren Liganden für andere Cytokinrezeptoren geführt. Aus Peptidbanken sind dimere Peptidomimetika für Erythropoietin und Thrombopoietin identifiziert worden. Diese Peptide aus etwa 20 Aminosäuren dimerisieren über Disulfidbrücken. Sie weisen agonistische Aktivität bis in den nanomolaren Bereich auf. Durch High-Throughput-Screening wurden agonistische Liganden für G-CSF entdeckt. Diese Ergebnisse zeigen, dass relativ kleine und trotzdem hochaffine Liganden für die großen, vergleichsweise flachen Kontaktflächen der Cytokinrezeptoren hergestellt werden können.

Für die Zukunft ergibt sich ein weiterer möglicher Ansatz für eine strukturbasierte Ligandenentwicklung aus der Struktur des IL-4/IL4-BP-Kontaktes. Der modulartige Aufbau aus zwei unabhängigen Bindungsgruppen („Avocado-Cluster“ I und II) legt die Idee nahe, zuerst Liganden für jeweils einen der beiden Cluster zu finden und diese dann zu einem hochaffinen Liganden zu verbinden.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Die Entwicklung einer antagonistischen IL-4-Variante zeigt, dass die Idee der „emasculated hormones“ erfolgreich auf Proteinormone angewandt werden kann. Ausschlaggebend für den Erfolg war gleichermaßen die Strukturaufklärung der Bindungsoberfläche und das Verständnis des Mechanismus der Rezeptoraktivierung. Unklar ist noch, wie weit sich die im IL-4-System erzielten Ergebnisse auf strukturell ähnliche Hormon/Rezeptor-Systeme übertragen lassen. Die starke Wechselwirkung zwischen IL-4R α und seinem Liganden, die unabhängig von anderen Bindungspartnern ist, ist für Cytokine ungewöhnlich. Bei Ligand/Rezeptor-Paaren mit geringerer Bindungsstärke wäre es vielleicht möglich, Varianten herzustellen, die wie Superagonisten stärker an den Rezeptor binden, aber wie Antagonisten keine Signalübertragung mehr auslösen. Es ist also keineswegs ausgeschlossen, dass sich die Entwicklung von antagonistischen Proteinliganden nach dem Modell von IL-4 auf andere Proteinormone übertragen lässt.

Eingegangen am 21. Januar 2000 [A 389]

- [1] J. Black, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 910–919; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 886–894.
- [2] C.-H. Heldin, *Cell* **1995**, *80*, 213–223.
- [3] T. Taniguchi, *Science* **1995**, *268*, 251–255.
- [4] V. Casolara, S. N. Georas, Z. Song, S. J. Ono, *Curr. Opin. Immunol.* **1996**, *8*, 796–803.
- [5] G. Marone, *Immunol. Today* **1998**, *19*, 5–9.
- [6] E. Maggi, *Immunotechnology* **1998**, *3*, 233–244.
- [7] D. Y. M. Leung, *Mol. Genet. Metab.* **1998**, *63*, 157–167.
- [8] K. Nelms, A. D. Keegan, J. Zamorano, J. J. Ryan, W. E. Paul, *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, *17*, 701–738.
- [9] S. Romagnani, *Immunol. Today* **1997**, *18*, 263–266.
- [10] M. Worm, B. M. Henz, *J. Mol. Med.* **1997**, *75*, 440–447.

- [11] L. B. Bacharier, H. Jabara, R. S. Geha, *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1998**, *115*, 257–269.
- [12] R. M. Nacleiro, F. Baroody, *J. Allergy Clin. Immunol.* **1998**, *101*, S345–351.
- [13] S. C. Bischoff, G. Sellge, A. Lorentz, W. Sebald, R. Raab, M. P. Manns, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8080–8085.
- [14] A. C. Redrup, B. P. Howard, D. W. MacGlashan, A. Kagey-Sobotka, L. M. Lichtenstein, J. T. Schroeder, *J. Immunol.* **1998**, *160*, 1957–1964.
- [15] M. Bracke, G. R. Dubois, K. Bolt, P. L. B. Bruijnzeel, J.-P. Vaerman, J.-W. J. Lammers, L. Koenderman, *J. Immunol.* **1997**, *159*, 1459–1465.
- [16] K. Dabbagh, K. Takeyama, H.-M. Lee, I. F. Ueki, J. A. Lausier, J. A. Nadel, *J. Immunol.* **1999**, *162*, 6233–6237.
- [17] L. Cohn, R. J. Homer, H. MacLeod, M. Mohrs, F. Brombacher, K. Bottomly, *J. Immunol.* **1999**, *162*, 6178–6183.
- [18] B. Schnyder, S. Lugli, N. Feng, H. Etter, R. A. Lutz, B. Ryffel, K. Sugamura, H. Wunderli-Allenspach, R. Moser, *Blood* **1996**, *87*, 4286–4295.
- [19] M. Mochizuki, J. Bartels, A. I. Mallet, E. Christophers, J.-M. Schröder, *J. Immunol.* **1998**, *160*, 60–68.
- [20] P. Chomarat, J. Banchereau, *Int. Rev. Immunol.* **1998**, *17*, 1–52.
- [21] G. Grünig, M. Warnock, A. E. Wakil, R. Venkaya, F. Brombacher, D. M. Rennick, D. Sheppard, M. Mohrs, D. D. Donaldson, R. M. Locksley, D. B. Corry, *Science* **1998**, *282*, 2261–2263.
- [22] M. Wills-Karp, J. Luyimbazi, X. Xu, B. Schofield, T. Y. Neben, C. L. Karp, D. D. Donaldson, *Science* **1998**, *282*, 2258–2261.
- [23] L. Li, Y. Xia, A. Nguyen, Y. H. Lai, L. Feng, T. R. Mosmann, D. Lo, *J. Immunol.* **1999**, *162*, 2477–2487.
- [24] Z. Zhu, R. J. Homer, Z. Wang, Q. Chen, G. P. Geba, J. Wang, Y. Zhang, J. A. Elias, *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 779–788.
- [25] N. Noben-Trauth, L. D. Shultz, F. Brombacher, J. F. Urban, Jr., H. Gu, W. E. Paul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10838–10843.
- [26] J. F. Urban, Jr., N. Noben-Trauth, D. D. Donaldson, K. B. Madden, S. C. Morris, M. Collins, F. D. Finkelman, *Immunity* **1998**, *8*, 255–264.
- [27] M. Barner, M. Mohrs, F. Brombacher, M. Kopf, *Curr. Biol.* **1998**, *8*, 669–672.
- [28] M. Mohrs, B. Ledermann, G. Köhler, A. Dorfmüller, A. Gessner, F. Brombacher, *J. Immunol.* **1999**, *162*, 7302–7308.
- [29] B. Mosley, M. P. Beckmann, C. J. March, R. L. Idzerda, S. D. Gimpel, T. VandenBos, D. Friend, A. Alpert, D. Anderson, J. Jackson, J. M. Wignall, C. Smith, B. Gallis, J. E. Sims, D. Urdal, M. B. Widmer, D. Cosman, L. S. Park, *Cell* **1989**, *59*, 335–348.
- [30] J. P. Galizzi, B. Castle, O. Djossou, N. Harada, H. Cabrillat, S. A. Yahia, R. Barrett, M. Howard, J. Banchereau, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 439–444.
- [31] R. I. Idzerda, C. J. March, B. Mosley, S. D. Lyman, T. Vanden Bos, S. D. Gimpel, W. S. Din, K. H. Grabstein, M. B. Widmer, L. S. Park, D. Cosman, M. P. Beckmann, *J. Exp. Med.* **1990**, *171*, 861–873.
- [32] M. Kondo, T. Takeshita, N. Ishii, M. Nakamura, S. Watanabe, K. I. Arai, K. Sugamura, *Science* **1993**, *262*, 1874–1877.
- [33] S. M. Russell, A. D. Keegan, N. Harada, Y. Nakamura, M. Noguchi, P. Leland, M. C. Friedman, A. Miyajima, R. K. Puri, W. E. Paul, W. J. Leonard, *Science* **1993**, *262*, 1880–1883.
- [34] D. J. Hilton, J.-G. Zhang, D. Metcalf, W. S. Alexander, N. A. Nicola, T. A. Willson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 497–501.
- [35] M. J. Aman, N. Tayebi, N. I. Obiri, R. K. Puri, W. S. Modi, W. J. Leonard, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 29265–29270.
- [36] B. Miloux, P. Laurent, O. Bonnin, J. Lupker, D. Caput, N. Vita, P. Ferrara, *FEBS Lett.* **1997**, *401*, 163–166.
- [37] J.-F. Gauchat, E. Schlagenhauf, N.-P. Feng, R. Moser, M. Yamage, P. Jeannin, S. Alouani, G. Elson, L. D. Notarangelo, T. Wells, H.-P. Eugster, J.-Y. Bonnefoy, *Eur. J. Immunol.* **1997**, *27*, 971–978.
- [38] A. Duschl, W. Sebald, *Eur. Cytokine Netw.* **1996**, *7*, 37–49.
- [39] S. M. Grunewald, A. Werthmann, B. Schnarr, C. E. Klein, E. B. Bröcker, M. Mohrs, F. Brombacher, W. Sebald, A. Duschl, *J. Immunol.* **1998**, *160*, 4004–4009.
- [40] R. I. Tepper, D. A. Levinson, B. Z. Stanger, J. Campos-Torres, A. K. Abbas, P. Leder, *Cell* **1990**, *62*, 457–467.
- [41] H. J. Burstein, R. I. Tepper, P. Leder, A. K. Abbas, *J. Immunol.* **1991**, *147*, 2950–2956.
- [42] J. A. Rankin, D. E. Picarella, G. P. Geba, U.-A. Temann, B. Prasad, B. DiCosmo, A. Tarallo, B. Stripp, J. Whitsett, R. A. Flavell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 7821–7825.
- [43] K. J. Erb, B. Rüger, M. von Brevern, B. Ryffel, A. Schimpl, K. Rivett, *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 329–339.
- [44] H.-Z. Shi, J.-M. Deng, H. Xu, Z.-X. Nong, C.-Q. Xiao, Z.-M. Liu, S.-M. Qin, H.-X. Jiang, G.-N. Liu, Y.-Q. Chen, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1998**, *157*, 1818–1821.
- [45] K. Sugamura, H. Asao, M. Kondo, N. Tanaka, N. Ishii, K. Ohbo, M. Nakamura, T. Takshita, *Annu. Rev. Immunol.* **1996**, *14*, 179–205.
- [46] M. Noguchi, H. Yi, H. M. Rosenblatt, A. H. Filipovich, S. Adelstein, W. S. Modi, O. W. McBride, W. J. Leonard, *Cell* **1993**, *73*, 147–157.
- [47] J. P. DiSanto, F. Rieux-Laucaut, A. Dautry-Varsat, A. Fischer, G. De Saint Basile, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 9466–9470.
- [48] J. M. Puck, *Immunol. Today* **1996**, *17*, 507–511.
- [49] A. D. Keegan, K. Nelms, M. White, L. M. Wang, J. H. Pierce, W. E. Paul, *Cell* **1994**, *76*, 811–820.
- [50] J. J. Ryan, L. J. McReynolds, A. Keegan, L.-H. Wang, E. Garfein, W. E. Paul, *Immunity* **1996**, *4*, 123–132.
- [51] M. Kubo, J. Ransom, D. Webb, Y. Hashimoto, T. Tada, T. Nakayama, *EMBO J.* **1997**, *16*, 4007–4020.
- [52] S. Delphin, J. Stavnezer, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1995**, *764*, 123–135.
- [53] D. Z. Wang, A. Cherrington, B. Famakin-Mosuro, M. Boothby, *Int. Immunol.* **1996**, *8*, 977–989.
- [54] J. Ezernieks, B. Schnarr, K. Metz, A. Duschl, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *240*, 667–673.
- [55] H.-J. Park, E.-Y. So, C.-E. Lee, *Mol. Immunol.* **1998**, *35*, 239–247.
- [56] S. B. Tinnell, S. M. Jacobs-Helber, E. Sterneck, S. T. Sawyer, D. H. Conrad, *Int. Immunol.* **1998**, *10*, 1529–1538.
- [57] Y. Ohmori, M. F. Smith Jr., T. A. Hamilton, *J. Immunol.* **1996**, *157*, 2058–2065.
- [58] J. E. Darnell, Jr., *Science* **1997**, *277*, 1630–1635.
- [59] W. J. Leonard, J. J. O'Shea, *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, *16*, 293–322.
- [60] R. C. Hoffman, B. J. Castner, M. Gerhart, M. G. Gibson, B. D. Rasmussen, C. J. March, J. Weatherbee, M. Tsang, A. Gustchina, C. Schlak-Hibi, L. Reshetnikova, A. Wlodawer, *Protein Sci.* **1995**, *4*, 382–386.
- [61] B.-J. Shen, T. Hage, W. Sebald, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *240*, 252–261.
- [62] T. Hage, W. Sebald, P. Reinemer, *Cell* **1999**, *97*, 271–281.
- [63] T. Hage, P. Reinemer, W. Sebald, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *258*, 831–836.
- [64] Y. Wang, B.-J. Shen, W. Sebald, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 1657–1662.
- [65] J. F. Bazan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 6934–6938.
- [66] P. Bork, L. Holm, C. Sander, *J. Mol. Biol.* **1994**, *242*, 309–320.
- [67] D. J. Leahy, W. A. Hendrickson, I. Aukhil, H. P. Erickson, *Science* **1992**, *258*, 987–991.
- [68] R. Powers, D. S. Garrett, C. J. March, E. A. Frieden, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Science* **1992**, *256*, 1673–1677.
- [69] L. J. Smith, C. Redfield, J. Boyd, G. M. Lawrence, R. G. Edwards, R. A. Smith, C. M. Dobson, *J. Mol. Biol.* **1992**, *224*, 899–904.
- [70] M. R. Walter, W. J. Cook, B. G. Zhao, R. P. Cameron, S. E. Ealick, R. L. Walter, P. Reichert, T. L. Nagabhushan, P. P. Trotta, C. E. Bugg, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 20371–20376.
- [71] A. Wlodawer, A. Pavlovsky, A. Gustchina, *FEBS Lett.* **1992**, *309*, 59–64.
- [72] S. R. Sprang, J. F. Bazan, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 815–827.
- [73] N. Kruse, B. J. Shen, S. Arnold, H. P. Tony, T. Müller, W. Sebald, *EMBO J.* **1993**, *12*, 5121–5129.
- [74] F. Letzelter, Y. Wang, W. Sebald, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *257*, 11–20.
- [75] B. Schnarr, J. Ezernieks, W. Sebald, A. Duschl, *Int. Immunol.* **1997**, *9*, 861–868.
- [76] A. B. Shanafelt, C. P. Forte, J. J. Kasper, L. Sanchez-Pescador, M. Wetzel, R. Gundel, J. M. Greve, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9454–9458.
- [77] B. Lee, F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* **1971**, *55*, 379–400.
- [78] A. M. De Vos, M. Ultsch, A. A. Kossiakoff, *Science* **1992**, *255*, 306–312.
- [79] E. Demchuk, T. Mueller, H. Oschkinat, W. Sebald, R. Wade, *Protein Sci.* **1994**, *3*, 920–935.
- [80] T. V. Kurzchalia, R. G. Parton, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1999**, *11*, 424–431.
- [81] H.-P. Tony, B.-J. Shen, P. Reusch, W. Sebald, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *225*, 659–665.
- [82] S. M. Grunewald, S. Kunzmann, B. Schnarr, J. Ezernieks, W. Sebald, A. Duschl, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 1480–1483.
- [83] R. Gundel, P. Harris, D. Lindell, N. Fitch, G. Wetzel, A. Shanafelt, D. Hoerlein, W. Sebald, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [84] H. Domingues, D. Cregut, W. Sebald, H. Oschkinat, L. Serrano, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 652–656.