

Strukturelle und funktionelle Untersuchungen der Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor im Interleukin-4- und Interleukin-13-System

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Michael Kraich

aus Miltenberg

Würzburg 2008

Eingereicht am:

13.02.2008

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Prof. Dr. Dr. M. J. Müller

1. Gutachter:

Prof. Dr. T. Müller

2. Gutachter:

Prof. Dr. R. Benz

Tag des Promotionskolloquiums:

30.05.2008

Doktorurkunde ausgehändigt am:

1	EINLEITUNG	6
1.1	Interleukin-4 und Interleukin-13	6
1.2	Strukturen von IL-4 und IL-13	8
1.3	Die IL-4- und IL-13-Rezeptoren	9
1.4	Signalwege der IL-4/IL-13-Rezeptoren	11
1.5	Struktur der IL-4- und IL-13-Rezeptorketten	13
1.6	Interaktionsmechanismen und Affinitäten im TypII-IL-4-Rezeptor	16
1.7	Zielsetzung der Arbeit	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Abkürzungen (keine SI-Einheiten)	19
2.2	Materialien	21
2.2.1	Chemikalien und Enzyme	21
2.2.2	Bakterienstämme	21
2.2.3	Vektoren	22
2.2.4	Kulturmedien	23
2.2.5	Oligonukleotide	23
2.3	Expression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i>	27
2.3.1	Transformation von <i>E.coli</i>	27
2.3.2	Stammhaltung	28
2.3.3	Präparative Proteinexpression in TB-Medium	28
2.3.4	Rekombinante Expression und Aufreinigung von IL-4-Varianten	28
2.4	Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen	29
2.4.1	Kultivierung von <i>Sf9</i> - und TriEx TM -Insektenzellen	29
2.4.2	Vitalitätsfärbung und Zelldichtebestimmung	30
2.4.3	Co-Transfektion von <i>Sf9</i> -Zellen mit dem BaculoGold TM -System	30
2.4.4	Co-Transfection von <i>Sf9</i> -Zellen mit dem BacVector TM -System	31
2.4.5	Plaque Assay	31

2.4.6	Virusamplifikation	32
2.4.7	Expression rekombinanter Proteine in <i>Sf9</i> - bzw. TriEx™-Zellen	33
2.4.8	Rekominante Expression der IL-4R α -Ectodomäne und deren Aufreinigung [139]	33
2.4.9	Kultivierung von <i>Drosophila</i> Schneider 2 (S2)-Zellen	34
2.4.10	Transiente Transfektion von S2-Zellen	35
2.4.11	Stabile Transfektion von S2-Zellen	36
2.4.12	Expression rekombinanter Proteine in S2-Zellen	36
2.5	Chromatographische Trennmethoden	37
2.5.1	Metallchelat-Affinitäts-Chromatographie	37
2.5.2	Ionenaustausch-Chromatographie	37
2.5.3	Gelfiltrations-Chromatographie	38
2.5.4	Kalibrierung von Gelfiltrationssäulen	39
2.5.5	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	40
2.5.6	Chromatographie an einer IL-13-Affinitätssäule	40
2.6	Mutagenese von IL-4, IL-13 und IL-13Rα1	42
2.7	Proteinchemische Methoden	43
2.7.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [149]	43
2.7.2	Proteingrößenstandard für SDS-PAGE	44
2.7.3	Färbung von Proteingelen	44
2.7.4	Western Blot	45
2.7.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	46
2.7.6	Biotinylierung von Proteinen	47
2.8	Zytokinaktivitätsassay in TF1-Zellen [151]	47
2.9	Analyse von Protein-Protein-Interaktionen durch die Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)-Technik	48
2.10	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie	49
3	ERGEBNISSE	51
3.1	Rekominante Expression und Aufreinigung von IL-13	51
3.1.1	Klonierung und Expression von IL-13	51
3.1.2	Zellaufschluss und Isolation der IL-13-Inclusion Bodies	52
3.1.3	Solubilisierung der Inclusion Bodies und Rückfaltung des denaturierten IL-13	53
3.1.4	Thrombin-Spaltung des 6xHis-IL-13-Fusionproteins	54

3.1.5	Aufreinigung von IL-13 mittels RP-HPLC	55
3.1.6	Biochemische Charakterisierung des rekombinanten IL-13	55
3.1.7	Biologischer Aktivitätstest des rekombinanten IL-13	57
3.2	Rekombinante Expression und Aufreinigung von IL-13Rα1-ECD	58
3.2.1	Klonierung und Expression von IL-13R α 1-ECD	58
3.2.2	Metallchelat-Affinitäts-Reinigung von IL-13R α 1-ECD	59
3.2.3	Gelfiltrations-Chromatographie von IL-13R α 1-ECD	60
3.3	Interaktionsanalyse mit rekombinatem IL-13 und IL-13Rα1-ECD	61
3.4	Bestimmung der Stöchiometrie des IL-13/IL-13Rα1-Komplexes	63
3.5	Interaktionsanalyse zwischen dem IL-4/IL-4Rα-Komplex und der IL-13Rα1-ECD	66
3.6	Expression und Aufreinigung verkürzter IL-13Rα1-ECD-Formen	67
3.6.1	Klonierung und Expression von IL-13R α 1-CHR und IL-13R α 1-D12	67
3.6.2	Metallchelat-Affinitäts-Reinigung von IL-13R α 1-CHR und IL-13R α 1-D12	68
3.6.3	Gelfiltrations-Chromatographie von IL-13R α 1-CHR und IL-13R α 1-D12	70
3.7	Interaktionsanalyse mit IL-13 und verkürzten IL-13Rα1-ECD-Varianten	71
3.8	Interaktionsanalyse mit verkürzten IL-13Rα1-ECD-Varianten und dem IL-4/IL-4Rα-Komplex	72
3.9	CD-Spektroskopie der verkürzten IL-13Rα1-ECD-Varianten	73
3.10	Mutagenese und Isolation von IL-13Rα1-ECD-Varianten	74
3.11	Interaktionsanalyse der IL-13Rα1-ECD-Muteine mit IL-13	75
3.12	CD-Spektroskopie der IL-13Rα1-ECD-Varianten mit stark verminderter Affinität zu IL-13	79
3.13	Strukturmodell der IL-13Rα1-ECD	81
3.14	IL-13-Mutagenese zur Identifikation von Domäne D1-Interaktionspartnern	84
3.15	Interaktionsanalyse der IL-13Rα1-ECD-Muteine mit IL-4	86
3.16	Strukturmodell des Komplexes aus IL-4 und der IL-13Rα1-ECD	89

3.17	Interaktionsanalyse mit super-agonistischen IL-4-Varianten	91
3.18	Strukturanalyse der IL-4-Superagonisten	92
3.19	Interaktionsanalyse der IL-4-Superagonisten mit IL-4R α -Varianten	96
3.20	Homologiemodelle der Interaktion zwischen IL-4-Superagonisten und IL-4R α -ECD	98
3.21	Einfluss der R85-Seitenkette auf die Interaktion der IL-4-Superagonisten mit IL-4R α	101
3.22	Bestimmung der IL-13-Hauptbindungs determinanten für IL-4R α	103
3.23	Rekombinante Expression und Aufreinigung von IL-13R α 2-ECD	106
3.23.1	Klonierung und Expression von IL-13R α 2-ECD	106
3.23.2	Chromatographische Aufreinigung von IL-13R α 2-ECD aus S2-Zellkulturüberstand	107
3.24	Interaktionsanalysen mit der extrazellulären Domäne von IL-13R α 2	108
3.25	Präparation des binären Komplexes aus IL-13 und IL-13R α 2-ECD	110
4	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	113
4.1	Expressions- und Reinigungsstrategie von IL-13, IL-13R α 1-ECD und IL-13R α 2-ECD	113
4.2	Das funktionelle Bindeepitop der IL-13R α 1-ECD	115
4.3	Strukturmodell der extrazellulären Domäne von IL-13R α 1	119
4.4	Molekularer Interaktionsmechanismus der IL-4-Superagonisten	122
4.5	Sequentieller Bindemechanismus und Aktivierung der IL-4- und IL-13-Rezeptoren	124
4.6	Die Rolle von IL-4 und IL-13 bei allergischem Asthma und mögliche Therapieansätze	128
5	ZUSAMMENFASSUNG	130
6	SUMMARY	132
7	LITERATURVERZEICHNIS	134

8 ANHANG	148
8.1 Schriftenverzeichnis	148
8.2 Danksagung	149
8.3 Lebenslauf	150
8.4 Erklärungen	151

1 Einleitung

1.1 Interleukin-4 und Interleukin-13

Interleukine (IL) sind eine Untergruppe der Zytokine. Sie sind körpereigene Botenstoffe, die die Kommunikation zwischen den Zellen des Immunsystems ermöglichen. Da man zu Beginn ihrer Entdeckung davon ausging, dass sie vorzugsweise von weißen Blutkörperchen, den sog. Leukozyten gebildet werden und vornehmlich Signale zwischen diesen Zellen vermitteln, gab man ihnen den Namen „Interleukin“. Der Begriff setzt sich aus dem lateinischen „inter“ für „zwischen“ und den griechischen Wörtern „leukos“ für „weiß“ und „kinein“ für „bewegen“ zusammen. Mittlerweile ist eine Vielzahl unterschiedlicher Interleukine beschrieben [1]. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-13 (IL-13) und ihren Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen.

IL-4 wurde im Jahr 1982 von Maureen Howard und William Paul erstmals als Cofaktor für die Proliferation von B-Zellen beschrieben [2, 3]. Vier Jahre später gelang es, die cDNA für das humane IL-4 zu klonieren [4]. IL-4 ist ein pleiotropes Zytokin, das hauptsächlich von T-Helferzellen des Typs 2 (Th2-Zellen), basophilen Granulozyten und Mastzellen produziert wird [5-7]. Des Weiteren wurde die Sekretion von IL-4 auch für NK-T-Zellen [8, 9], Th0-Zellen [10], γ/δ T-Zellen [11] und Eosinophilen [12, 13] beschrieben. IL-4 wirkt auf eine Reihe von Zellen als Proliferations- oder Differentiationsstimulus. Bei B-Zellen [2], T-Zellen [14], Thymocyten [15], Endothelzellen [16] und Fibroblasten [17] bewirkt IL-4 als Cofaktor die Zunahme der Proliferation. IL-4 führt als wichtigster Faktor zu der Differenzierung von naiven CD4⁺-T-Zellen zu antigenspezifischen Th2-Zellen [18]. Diese Th2-Zellen exprimieren neben IL-2 noch weitere Th2-spezifische Interleukine, wie z.B. IL-5, IL-10 und IL-13 [19, 20]. Th2-Interleukine besitzen wiederum die Eigenschaft, dass sie die Entwicklung und Proliferation von INF- γ produzierenden Th1-Zellen inhibieren [21, 22]. Eine weitere bedeutende Funktion von IL-4 ist die Induktion eines spezifischen Immunglobulin-Klassenwechsels in B-Zellen. In humanen B-Zellen induziert IL-4 den Immunglobulin-Klassenwechsel zum IgE- und IgG4-Typ [23, 24]. Diese Fähigkeit von IL-4 wurde bereits zuvor in murinen B-Zellen beobachtet, bei denen es einen Wechsel der Immunglobulinklasse zum IgE- und IgG1-Typ auslöst [25, 26]. In B-Zellen und Makrophagen wird durch IL-4 die Expression von MHCII erhöht [27, 28]. Des Weiteren verstärkt IL-4 die Expression des IL-4-Rezeptors in B- und T-Zellen [29] und sorgt für die Steigerung der CD23-Expression in B-Zellen [30]. Durch die Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 auf vaskulären Endothelzellen [31] und von Chemokinen wie Eotaxin-1, -2 und -3 [32-34] ist IL-4 auch an der Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten [35], IgE-produzierenden B-Zellen und Mastzellen [36] in entzündetes Gewebe beteiligt. Aufgrund all der hier beschriebenen Effektorfunktionen und der Tatsache, dass IL-4 zu einer Verstärkung der Th2-Immunantwort führt,

kann gefolgert werden, dass IL-4 eine Schlüsselrolle bei der Entstehung und beim Fortschreiten von allergischen Erkrankungen und Asthma zukommt [37, 38].

IL-13 wurde 1989 noch unter dem Namen P600 erstmals als ein Protein beschrieben, das bevorzugt von aktivierten, murinen Th2-Zellen produziert wird [39]. Etwa drei Jahre später gelang es mehreren Gruppen die cDNA des humanen IL-13 zu klonieren [40-42]. IL-13 wird ähnlich wie IL-4 von einer Vielzahl von Zelltypen produziert. Eine der Hauptquellen von IL-13 stellen aktivierte Th2-Zellen dar. IL-13 wird jedoch außerdem von aktivierten CD4⁺, CD8⁺-T-Zellen, B-Zellen, Mastzellen [43, 44] und NK-T-Zellen [45] produziert. Die Zellen, auf die IL-13 wirkt, und die Funktionen von IL-13 sind vielfältig. IL-13 beeinflusst sowohl hämatopoetische als auch nicht-hämatopoetische Zellen. Auf B-Zellen hat IL-13 einen ähnlichen Einfluss wie IL-4. IL-13 fördert die Proliferation von B-Zellen und induziert ebenfalls den Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgE und IgG4 [46]. Die Expression von CD23 und MHCII in B-Zellen wird ebenfalls durch IL-13 verstärkt [43, 44]. In Monozyten und Makrophagen erhöht IL-13 die Expression vieler Mitglieder der Integrin-Familie [47] und induziert ebenfalls die Expression von MHCII und CD23 [48]. Für Eosinophile wurden auch direkte IL-13-Effekte beschrieben. So hat IL-13 einen Einfluss auf die Aktivierung, das Überleben und die Rekrutierung von Eosinophilen [49-51]. In Endothelzellen induziert IL-13 die Produktion von VCAM-1, was zur Rekrutierung von Eosinophilen führt [52]. In Fibroblasten kann IL-13 die Synthese von TypI-Collagen und damit Fibrose auslösen [53]. Des Weiteren wurden Effekte von IL-13 auf Epithelzellen beschrieben. So wird durch IL-13 die Chemokinexpression verstärkt [54] und die Überexpression von IL-13 löst in Lungenepithelzellen von Mäusen eine Mucus-Hypersekretion aus [55]. All die hier aufgeführten Funktionen von IL-13 fördern Entzündungsreaktionen im Zusammenhang mit allergischen Erkrankungen und führen zu Veränderungen der Lungenepithelien, wie sie bei asthmatischen Erkrankungen auftreten [56]. Im Gegensatz zu IL-4 hat IL-13 allerdings keinen Effekt auf T-Zellen [47]. Daher ist IL-13 für die initiale Differentiation von CD4⁺-Zellen zu Th2-Zellen nicht von Bedeutung, sondern scheint vielmehr eine wichtige Rolle in der Effektorphase von allergischen Entzündungen und Asthma zu spielen.

Da sowohl IL-4 und IL-13 einen sehr starken Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf von allergischen Entzündungen und allergischem Asthma haben, stellen sie hochinteressante Ansatzpunkte für neuartige Therapeutika dar. Um möglicherweise mit spezifischen Antagonisten in die IL-4- und IL-13-Signalwege eingreifen zu können, müssen die molekularen Grundlagen und Mechanismen der Interaktion zwischen IL-4 bzw. IL-13 und ihren Rezeptoren aufgeklärt werden.

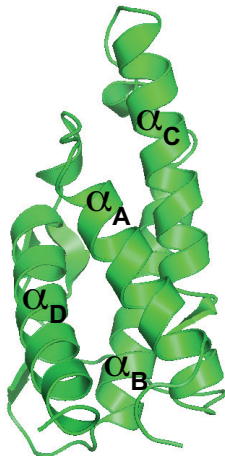
1.2 Strukturen von IL-4 und IL-13

IL-4 und IL-13 gehören beide zur Klasse der TypII-Zytokine [57]. Die reife IL-4-Kette besteht aus 129 Aminosäuren. IL-13 ist dagegen aus 112 Resten aufgebaut. Auf Aminosäureebene besitzen sie eine Sequenzidentität von lediglich 25% [41] (Abb. 1.1A). Ihre Tertiärstrukturen weisen jedoch eine sehr große Ähnlichkeit auf. Die Struktur von IL-4 konnte sowohl durch NMR-Spektroskopie als auch durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden [58-63]. IL-13 konnte bisher noch nicht kristallisiert werden, so dass die bekannte Struktur auf NMR-Untersuchungen beruht [64, 65].

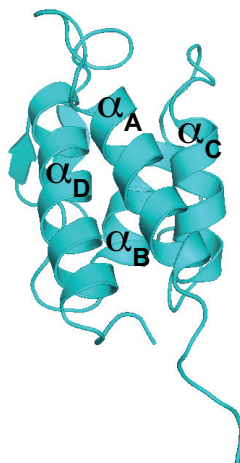
A



B



C



D

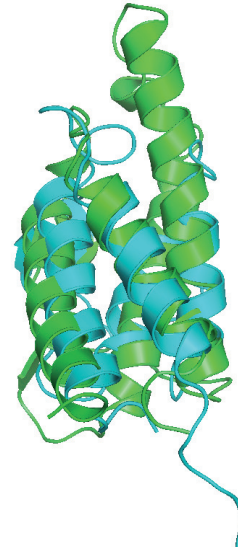


Abbildung 1.1: Sequenz- und Strukturvergleich von IL-4 und IL-13. A: Vergleich der Aminosäuresequenzen von IL-4 und IL-13 mit der Zuordnung von Sekundärstrukturelementen. **B:** Tertiärstruktur von IL-4 in Bänderdarstellung. **C:** Tertiärstruktur von IL-13 in Bänderdarstellung **D:** Strukturvergleich von IL-4 (grün) und IL-13 (blau).

Aufgrund ihrer Faltung werden IL-4 und IL-13 zu den kurzkettingen 4-Helix-Bündel-Zytokinen gezählt, zu denen auch GM-CSF, IL-2, IL-3, IL-5 und IL-7 gehören [66]. Vier α -Helices (α_A , α_B , α_C und α_D) sind antiparallel in einer sog. „up-up-down-down“-Topologie angeordnet. Daher sind Helix A und B sowie Helix C und D über zwei lange Schleifen miteinander verbunden, wohingegen die

Verbindung zwischen Helix B und C durch eine kurze Schleife hergestellt wird. Innerhalb der beiden langen Schleifen ist in beiden Interleukinen, so wie in allen kurzkettigen TypII-Zytokinen, ein kurzes, antiparalleles β -Faltblatt zu finden. Auch wenn sich die allgemeine Faltung von IL-4 und IL-13 sehr ähnelt, gibt es doch gewisse Unterschiede. Am auffälligsten sind der Größenunterschied zwischen den beiden Proteinen und die unterschiedlichen Längen der α -Helices B und C. Entlang der Bündelachse ist IL-4 etwa 12Å länger als IL-13. Diese Differenz ist größtenteils auf die längere α -Helix C zurückzuführen. Während α_C bei IL-4 aus 26 Resten besteht, ist diese α -Helix in IL-13 mit 12 Aminosäuren nur knapp halb so lang. Ähnliche Größenverhältnisse bestehen bei α -Helix B, die in IL-13 zehn Reste und in IL-4 23 Reste lang ist (vgl. Abb. 1.1). Weitere Unterschiede zwischen beiden Strukturen ergeben sich aus der Anzahl und der Position der Disulfidbrücken. Die drei Disulfidbrücken in IL-4 verbinden den N- mit dem C-Terminus (C3-C127), verbrücken die lange Schleife AB mit der kurzen Schleife BC (C24-C64) bzw. α -Helix B mit der Schleife CD (C46-C99). In IL-13 werden dagegen nur zwei Disulfidbrücken ausgebildet. Die erste stellt eine Verbindung zwischen der AB- und der BC-Schleife her (C28-C56). Durch die oxidative Verbrückung der Reste C44 und C70 werden die α -Helices B und C miteinander verbunden.

Aufgrund der vergleichsweise geringen Aminosäuresequenzhomologie zwischen IL-4 und IL-13 erreicht man die beste Strukturüberlagerung, indem man die gemeinsamen Sekundärstrukturelemente aneinander ausrichtet (Abb. 1.1D). Dadurch ergibt sich eine r.m.s.-Abweichung zwischen der IL-4- und IL-13-Hauptkette von nur 1,44Å [65]. Trotz der beschriebenen Unterschiede, korrelieren die ähnlichen biologischen Effekte von IL-4 und IL-13 mit deren hoher struktureller Homologie.

1.3 Die IL-4- und IL-13-Rezeptoren

Die Rezeptorketten, die mit IL-4 bzw. IL-13 interagieren, gehören alle zur Klasse der TypI-Zytokin-Rezeptoren. Diese Rezeptorklasse zeichnet sich durch eine Reihe von Gemeinsamkeiten aus. So besitzen alle zugehörigen Rezeptorketten mindestens eine sog. Zytokin-bindende Homologieregion (CHR) [67]. Diese besteht aus zwei Fibronectin III (FnIII)-Domänen, die jeweils aus ca. 100 Aminosäureresten bestehen und über ein kurzes Verbindungssegment miteinander verknüpft sind. Jede dieser beiden FnIII-Domänen ist aus sieben, antiparallelen β -Faltblättern aufgebaut. In der N-terminalen FnIII-Domäne sind vier konservierte Cysteinreste zu finden. Die C-terminale FnIII-Domäne beinhaltet das hoch konservierte „W-S-X-W-S“-Motiv, in dem das X für eine nicht konservierte, beliebige Aminosäure steht (vgl. Abb. 1.2).

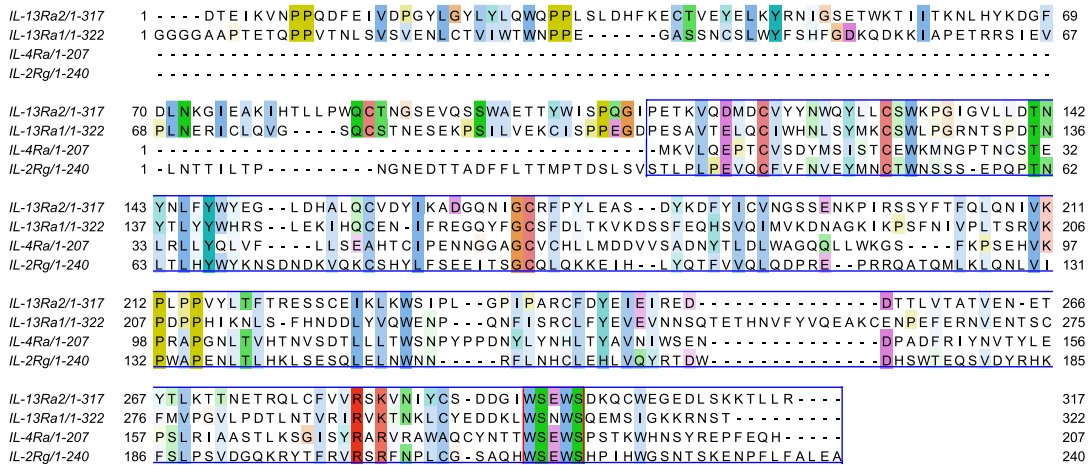


Abbildung 1.2: Aminosäuresequenzvergleich der extrazellulären Domänen der Rezeptorketten, die mit IL-4 bzw. IL-13 interagieren. Die CHR-Domäne ist blau umrandet. Die konservierten Cysteinreste sind zu erkennen. Das hochkonservierte „W-S-X-W-S“-Motiv am C-terminalen Ende ist mit einem roten Rahmen hervorgehoben.

Alle TypI-Zytokin-Rezeptoren besitzen nur eine Transmembrandomäne und keine eigene Kinasedomäne in ihrem intrazellulären Teil. Stattdessen ist in den meisten intrazellulären Domänen von TypI-Zytokin-Rezeptorketten eine sog. Box1-Region zu finden. Dabei handelt es sich um eine Prolin-reiche Region, die für die Bindung von Tyrosinkinase der Janus-Familie (Jak) von Bedeutung sind. Die Kinaseaktivität der rekrutierten Jaks sorgt über nachgeschaltete Signalmoleküle für die Weiterleitung der Signale vom Rezeptor bis in den Zellkern [68].

Insgesamt sind vier verschiedene Rezeptorketten bekannt, die an der Bindung von IL-4 oder IL-13 beteiligt sind. Dabei handelt es sich um IL-4R α , IL-13R α 1, γ _C (bzw. IL-2R γ) und IL-13R α 2. Die Mitglieder des IL-4/IL-13-Rezeptorsystems übertragen ihre Signale durch Bildung von Heterodimeren aus zwei unterschiedlichen Rezeptorketten. Der sog. TypI-IL-4-Rezeptor setzt sich aus IL-4R α und γ _C zusammen [69, 70]. Die γ _C-Kette ist als Co-Rezeptor funktioneller Bestandteil weiterer Interleukinrezeptoren, wie z.B. dem IL-2-, IL-7-, IL-9-, IL-15- oder IL-21-Rezeptor [71, 72]. Die Tatsache, dass γ _C an der Signalweiterleitung mehrerer Zytokine beteiligt ist, erklärt die schwere Immundefizienz (X-SCID: X-Linked Severe Combined Immunodeficiency Disorder) bei Patienten mit Mutationen in γ _C [73]. TypI-Rezeptorkomplexe werden nur von IL-4 verwendet und geformt und sind vorrangig auf hämatopoetischen Zellen zu finden. Mit TypII-Rezeptoren interagieren dagegen sowohl IL-4 als auch IL-13. Bei ihnen handelt es sich um Heterodimere aus den beiden Ketten IL-4R α und IL-13R α 1 [74, 75], die auch von nicht-hämatopoetischen Zelltypen exprimiert werden [69]. Dass IL-4 und IL-13 einen funktionellen TypII-Rezeptorkomplex bilden können, erklärt die sich überlappenden, biologischen Effekt beider Zytokine. Eine weitere IL-13-Rezeptorkette wurde 1996 entdeckt [76, 77]. Die IL-13R α 2-Kette bindet IL-13 mit hoher Affinität. Es gibt jedoch keine Bindung zwischen IL-4 und IL-13R α 2 [78, 79]. IL-13R α 2 wirkt als spezifischer Inhibitor von IL-13-Signalen [80-83]. Die entscheidende Aufgabe der IL-13R α 2-Kette wurde daher in der Bindung von IL-13 gesehen, um IL-13-Signale negativ zu regulieren. Da IL-13R α 2 nur eine sehr kurze intrazelluläre

Domäne besitzt, in der das Box1-Motiv zur Interaktion mit Jaks fehlt, und keine Signalgebungseigenschaften bekannt waren, wurde lange Zeit vermutet, dass die IL-13R α 2-Kette nicht direkt an einer Signalübermittlung beteiligt ist. Die Ergebnisse von Fichtner-Feigel *et al.* zeigen jedoch, dass ein über IL-13R α 2 vermitteltes IL-13-Signal die Produktion von TGF- β induziert, was zur Ausbildung von Fibrose führt [84].

1.4 Signalwege der IL-4/IL-13-Rezeptoren

Die Aktivierung der IL-4- und IL-13-Signalwege erfolgt durch die Liganden-induzierte Heterodimerisierung zweier Rezeptorketten. Durch die Bildung des ternären Komplexes aus Ligand und zwei Rezeptoruntereinheiten kommt es zur Aktivierung von Jaks, die über das Box1-Motiv mit den Rezeptorketten assoziiert sind. Jak1 interagiert mit IL-4R α , Jak3 ist an γ_c gebunden und Tyk2 ist mit IL-13R α 1 assoziiert [85-88]. Die Aktivierung der Jaks führt zur Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste in der zyttoplasmatischen Domäne von IL-4R α , was zur Auslösung mehrerer intrazellulärer Signalkaskaden führt (Abb. 1.3)

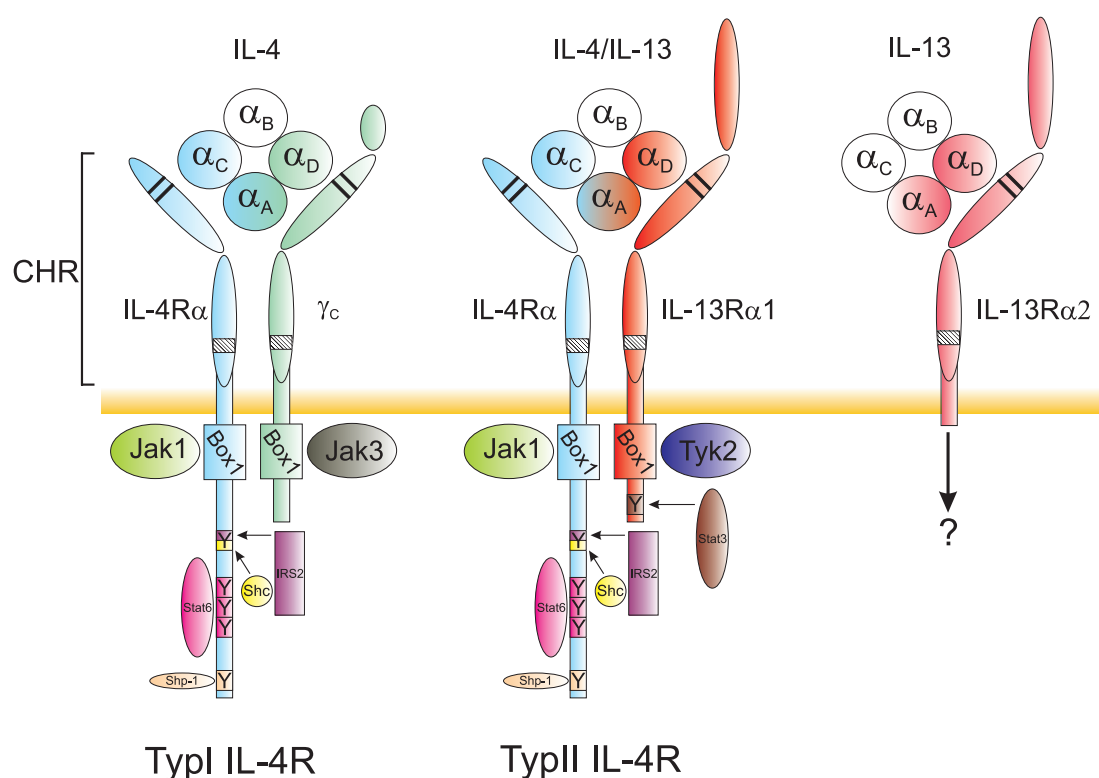


Abbildung 1.3: Aufbau der unterschiedlichen Rezeptorkomplex im IL-4/IL-13-System und deren intrazellulär assoziierte Signalmoleküle. In den extrazellulären Domänen der Rezeptorketten sind die konservierten Disulfidbrücken als schwarze Balken hervorgehoben. Das in den Typ I-Zytokinrezeptoren konservierte „W-S-X-W-S“-Motiv ist als schraffierte Fläche dargestellt.

Durch die Phosphorylierung von Tyr575, Tyr603 und Tyr633 an der IL-4R α -Kette wird eine Bindestelle für Stat6 (signal transducer and activator of transcription 6) gebildet [89, 90]. Das an IL-4R α rekrutierte Stat6 wird an seinem C-Terminus durch die aktivierten Jaks phosphoryliert, was zur Homodimerbildung von Stat6 führt. In phosphorylierter und dimerisierter Form gelangt Stat6 in den Zellkern, wo es die Transkription von IL-4 und IL-13 abhängigen Genen induziert [91-93]. Die Dephosphorylierung von Stat6 im Zellkern sorgt für den Rücktransport ins Zytosol, wo es erneut für die Rekrutierung an den Rezeptor zu Verfügung steht [94].

Der konservierte Tyrosinrest 497 der IL-4R α -Kette ist Teil des sog. Insulin-IL-4-Rezeptor (I4R)-Motivs [95, 96]. An das phosphorylierte I4R-Motiv könne IRS1 (Insulinrezeptorsubstrat 1) bzw. IRS2 binden [97]. Bei der Interaktion mit IL-4R α werden die IRS-Proteine an Tyrosinresten phosphoryliert und damit aktiviert [98]. Danach kommt es zur Interaktion zwischen den Phosphorylierungsstellen von IRS1/2 mit der p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), was in der Aktivierung der katalytischen Untereinheit p110 von PI3K resultiert [99]. Aktive PI3K sorgt für die Synthese von Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat und Phosphatidylinositol-(3,4)-biphosphat als sekundäre Botenstoffe [100, 101]. Nachgeschaltet kommt es über die sekundären Botenstoffe zur Aktivierung weiterer Kinasen, wie z.B. der Protein-Kinase C (PKC) und der Akt-Kinase, die Schlüsselrollen beim Zellwachstum, dem Generieren von Überlebenssignalen und der Regulation der Genexpression in Abhängigkeit von IL-4 und IL-13 spielen [102-104].

Als weiteres Molekül kann auch Shc mit dem phosphorylierten I4R-Motiv am IL-4R α interagieren [105]. Nach Bindung wird Shc am Tyrosinrest 317 phosphoryliert, woran dann Grb2 über seine SH2-Domäne binden kann [106, 107]. Über Grb2 werden die IL-4- und IL-13-Signale mit der Aktivierung von Ras und dem MAP-Kinase-Signalweg verbunden. Auf diese Weise werden zusätzliche Zellproliferationssignale durch aktivierte IL-4- bzw. IL-13-Rezeptoren generiert.

Der fünfte konservierte Tyrosinrest Tyr713 im intrazellulären Teil von IL-4R α befindet sich nahe dem C-Terminus. Tyr713 und die angrenzenden Aminosäurereste bilden ein sog. ITIM (immuno-tyrosin inhibitory motif) [108]. An dieses ITIM-Motiv kann die SH2-Domäne der Tyrosin-Phosphatase Shp-1 binden. Shp-1 ist an der negativen Regulation der IL-4- und IL-13-Signalwege beteiligt [109]. So wird aktiviertes Stat6 durch Shc-1 dephosphoryliert und damit inaktiviert. Das Fehlen von Shp-1 oder eine Mutation des ITIM-Motivs in IL-4R α erhöht die Stat6-Aktivität erheblich, indem die Stat6-Dephosphorylierung vermindert wird [110].

Tyk2 bindet an das Box1-Motiv der IL-13R α 1-Kette und kann sowohl durch IL-4 als auch durch IL-13 aktiviert werden [111]. Die Bindung von Tyk2 an IL-13R α 1 ist von großer Bedeutung für die Aktivierung aller durch IL-13 induzierter Signalwege. Eine murine IL-13R α 1-Kette mit deletierter Box1 ist nicht in der Lage, IL-13-Signale zu vermitteln [112]. Neben der Tyk2-Bindestelle sind in der

intrazellulären Domäne von IL-13R α 1 noch zwei weitere Tyrosinreste (Tyr402, Tyr405) zu finden. Die Sequenz um Tyr405 ist Teil der „Y-X-X-G“-Konsensussequenz für die Bindung und Aktivierung von Stat3. Es konnte auch eine durch IL-4 bzw. IL-13 induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von Stat3 nachgewiesen werden [111, 113]. In Form eines Dimers gelangt Stat3 als Antwort auf einen IL-4- bzw. IL-13-Stimulus in den Zellkern und induziert die Transkription spezifischer Zielgene [114].

1.5 Struktur der IL-4- und IL-13-Rezeptorketten

Eine strukturelle Gemeinsamkeit der extrazellulären Domänen aller mit IL-4 bzw. IL-13 interagierender Rezeptorketten ist das Vorhandensein eines sog. CHR-Motivs (vgl. Abb. 1.3). CHR-Motive sind aus zwei FnIII-Domänen zusammengesetzt. Jede FnIII-Domäne wird von sieben antiparallelen β -Strängen gebildet, die ein 3- und ein 4-strängiges β -Faltblatt ausbilden. Die beiden β -Faltblätter sind in einer β -Sandwich-Struktur zueinander angeordnet [67]. Die Kristallstrukturen der Ligand-Rezeptorkomplexe vom Wachstumshormon (GH), Erythropoietin (EPO), IL-2, IL-4, IL-6 und G-CSF zeigen, dass das Bindeepitop der Rezeptoren für ihre Liganden von den verschiedenen Schleifen zwischen den β -Strängen der CHR-Domäne gebildet wird [115-121]. Die beiden IL-13-spezifischen Rezeptorketten IL-13R α 1 und IL-13R α 2 weisen neben der CHR noch eine weitere N-terminale FnIII-ähnliche Domäne auf (vgl. Abb. 1.2 und 1.3). Auch die Rezeptorketten gp130, IL-5R α und IL-6R α besitzen diese zusätzliche Domäne, die in der Literatur oftmals als Ig-ähnliche Domäne bezeichnet wird. Bei den genannten Rezeptoren ging man lange davon aus, dass die Ligandebindung nur durch das CHR-Motiv vermittelt wird. Allerdings gibt es erste biochemische Hinweise, dass im Falle von gp130, LIFR und IL-5R α die zusätzliche FnIII-Domäne an der Interaktion mit den entsprechenden Liganden beteiligt ist [122-126]. Die Kristallstruktur von LIF (leukemia inhibitory factor) im Komplex mit der LIF-Rezeptorkette zeigt, dass die Interaktionsfläche mit dem Liganden größtenteils von einem β -Faltblatt der Ig-ähnlichen Domäne und zu einem geringeren Teil von der N-terminalen FnIII-Domäne der CHR des Rezeptors gebildet wird [127]. In der Struktur des Komplexes zwischen IL-6, IL-6R α und gp130 sieht man, dass die Ig-ähnliche Domäne mit dem Liganden im gegenüberliegenden Trimer interagiert und auf diese Weise zwei ternäre Rezeptor-Liganden-Komplexe zu einer hexameren Struktur verbindet [120, 128]. Für IL-13R α 1 wurde gezeigt, dass eine Deletion der zusätzlichen FnIII-Domäne zum Verlust der IL-13-Bindung und der Aktivierung des Stat6-Signalweges führt. Der Einfluss der N-terminalen FnIII-Domäne von IL-13R α 1 auf die Affinität zu IL-4 wurde bisher noch nicht untersucht. Es konnte jedoch eine Restaktivität von IL-4 bezüglich der Phosphorylierung von Tyk2 über IL-13R α 1-CHR nachgewiesen werden [129]. Somit scheint die IL-4-Signalübertragung über den TypII-Rezeptor nicht vollständig von einer Interaktion des Liganden mit der Ig-ähnlichen Domäne der IL-13R α 1-ECD abhängig zu sein.

Die N-terminalen Aminosäuren von γ_C , die nicht Teil des CHR-Motivs sind (vgl. Abb. 1.2 und 1.3), haben keinen Einfluss auf die Affinität zu einem vorgeformten IL-4/IL-4R α -ECD-Komplex [130]. Die Interaktion zwischen IL-4 und γ_C beschränkt sich daher auf die klassische CHR-Domäne von γ_C .

Von den vier mit IL-4 bzw. IL-13 interagierenden Rezeptorketten, stehen bisher nur für IL-4R α und für γ_C Kristallstrukturdaten zur Verfügung. Die Struktur der extrazellulären Domäne von IL-4R α konnte im Komplex mit IL-4 aufgeklärt werden [119]. Strukturinformationen über die γ_C -ECD wurden durch die Kristallisation im Komplex mit IL-2, IL-2R α und IL-2R β gewonnen [117, 118].

Die extrazelluläre Domäne von IL-4R α stellt eine prototypische CHR dar (Abb. 1.4). Sie ist aus zwei FnIII-Domänen aufgebaut, die in einer L-Form zueinander angeordnet sind. Jedes FnIII-Modul ist aus zwei gegeneinander verwundenen β -Faltblättern aufgebaut. Das für alle TypI-Zytokinrezeptoren typische „W-S-X-W-S“-Motiv ist in der C-terminalen Domäne lokalisiert. Die Ellbogenregion zwischen den beiden FnIII-Domänen wird von den Schleifen L1, L2, L3, L5 und L6 zwischen den β -Strängen ausgefüllt. Diese Schleifenregionen stellen die Kontaktfläche zu IL-4 her. Auf Seite des Liganden wird das Bindeepitop von Resten der beiden α -Helices A und C gebildet. Am Kontakt sind jeweils 18 Aminosäuren von Ligand und Rezeptor beteiligt. Durch die Bildung des Komplexes werden ca. 800\AA^2 der Oberflächen von IL-4 und der IL-4R α -ECD von der Umgebung abgeschirmt. Die Bindestelle für den Liganden in der Ellbogenregion von IL-4R α weist ein starkes, negatives, elektrostatisches Potential auf, das komplementär zum positiven, elektrostatischen Potential des Interaktionsepitops von IL-4 ist. So sorgt die entgegengesetzte Ladungsverteilung auf den Interaktionsflächen von IL-4 und IL-4R α zu einem starken elektrostatischen Steuerungseffekt („electrostatic steering“ [131-133]) bei Bildung des Komplexes, was die hohe kinetische Assoziationsrate ($k_{\text{on}} = 1,3 \cdot 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) zwischen Ligand und Rezeptorkette erklärt.

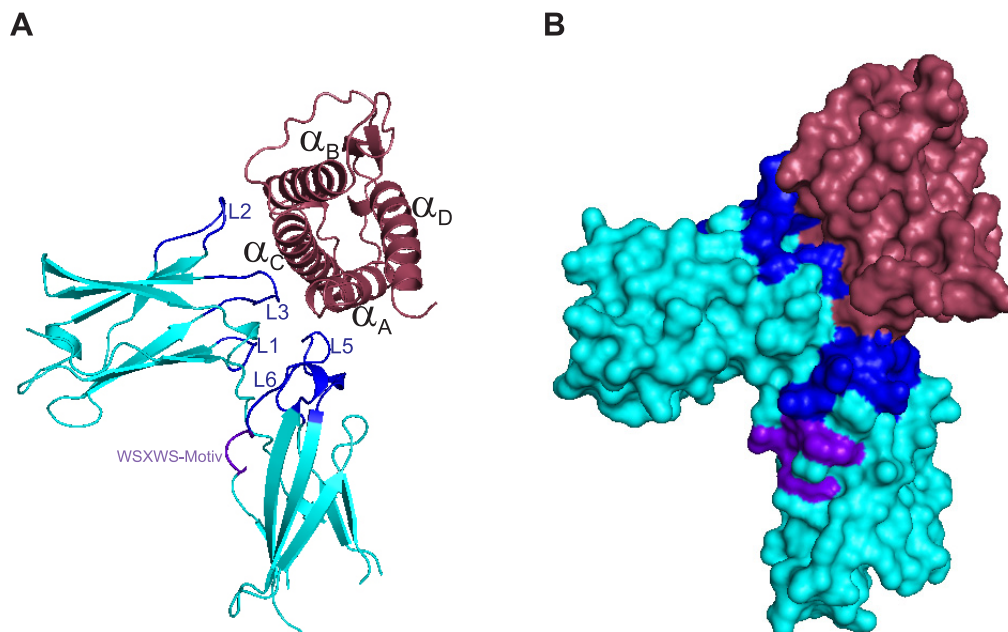


Abbildung 1.4: Struktur des IL-4/IL-4R α -ECD-Komplexes. Der Komplex aus IL-4 (rot) und der extrazellulären Domäne von IL-4R α (cyan/blau) in Bänder- (A) und Oberflächendarstellung (B). Der Aufbau der IL-4R α -Kette aus zwei FnIII-Domänen ist deutlich zu erkennen. Das konservierte „W-S-X-W-S“-Motiv in der C-terminalen FnIII-Domäne ist in lila hervorgehoben. Die mit dem Liganden interagierenden Schleifen (L1, L2, L3, L5 und L6) zwischen den β -Strängen sind blau markiert. Das Bindeepitop von IL-4 für die Interaktion mit IL-4R α wird von den α -Helices A und C gebildet.

Die Struktur von γ_C konnte im Komplex mit IL-2 und den beiden Rezeptorketten IL-2R α und IL-2R β bestimmt werden [117, 118]. Die Faltung von γ_C entspricht der eines klassischen CHR-Motivs aus zwei FnIII-Domänen. Der Winkel zwischen den beiden FnIII-Modulen ist mit ca. 120° jedoch deutlich stumpfer, als es bei IL-4R α (ca. 82°) der Fall ist. Der Kontakt der γ_C -Kette zu den α -Helices A und D von IL-2 wird auch hier von den Schleifen zwischen den β -Strängen im Ellbogenbereich zwischen den FnIII-Domänen hergestellt. Im Gegensatz zum IL-4/IL-4R α -Komplex ist jedoch nicht die gesamte Ellbogenregion durch den Liganden abgedeckt. IL-2 sitzt eher auf der C-terminalen FnIII-Domäne von γ_C und hat weniger Kontakt zu den Verbindungsschleifen der N-terminalen FnIII-Domäne. Insgesamt werden zwischen IL-2 und γ_C nur zwei Wasserstoffbrücken ausgebildet und es gibt auch nur schwache elektrostatische Interaktionen.

Zur IL-2R β -Kette bildet γ_C eine große Kontaktfläche aus. Eine solche Interaktion zwischen zwei extrazellulären TypI-Zytokinrezeptordomänen konnte erstmals im hGH/hGHR-Komplex gezeigt werden [134]. Durch die Interaktion zwischen den C-terminalen FnIII-Domänen von IL-2R β und γ_C werden 1750Å² der Proteinoberfläche verdeckt. Diese Protein-Protein-Interaktionsfläche ist die größte, die bis jetzt in Zytokinrezeptorkomplexen gefunden wurde. Insgesamt werden zwischen γ_C und IL-2R β 14 Wasserstoffbrücken ausgebildet. Das gibt einen Hinweis auf die Bedeutung von Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen bei der kooperativen Bildung von multimeren Ligand-Rezeptor-Komplexen. Eine ähnliche Rezeptor-Rezeptor-Interaktion könnte ebenso im TypI-IL-4-Rezeptor

zwischen γ_C und IL-4R α vorliegen, auch wenn keine nachweisbare Affinität zwischen den extrazellulären Domänen beider Rezeptorketten besteht [135].

1.6 Interaktionsmechanismen und Affinitäten im TypII-IL-4-Rezeptor

Der TypII-IL-4-Rezeptor, der aus den beiden Rezeptorketten IL-4R α und IL-13R α 1 aufgebaut ist, interagiert sowohl mit IL-4 als auch mit IL-13 und wird auch von beiden Zytokinen aktiviert. Die bisher ermittelten Affinitäten zwischen IL-4, IL-13 und den beiden Rezeptoruntereinheiten unterscheiden sich jedoch stark.

Die biologischen Funktionen von IL-4 werden durch einen Zelloberflächenrezeptor vermittelt, der IL-4 mit hoher Spezifität und Affinität ($K_D \approx 50 - 100\text{pM}$) bindet [136]. Für die Bindung von IL-4 an in COS7-Zellen transfizierte IL-4R α konnte eine Dissoziationskonstante K_D von 80pM ermittelt werden [137]. Für die Interaktion zwischen der aufgereinigten, extrazellulären Domäne von IL-4R α und radioaktiv markiertem IL-4 in einem Festphasenassay wurde eine K_D -Wert von 100pM bestimmt [138]. Eine ähnliche Affinität wurde auch durch SPR-Messungen für die Bindung zwischen immobilisierter IL-4R α -ECD und IL-4 ermittelt [139]. Die Übereinstimmung der ermittelten Affinitäten von IL-4 zu isolierter IL-4R α -ECD und für die Bindung von IL-4 an ganze Zellen, legt den Schluss nahe, dass die hochaffine Bindung von IL-4 zu seinen zellulären Rezeptoren nahezu ausschließlich durch die IL-4R α -Untereinheit vermittelt wird. Ein weiterer Hinweis dafür ist auch die Beobachtung, dass die Co-Immobilisierung von IL-13R α 1 und IL-4R α auf einem BIAcore-Sensorchip nicht zu einer messbar höheren Affinität gegenüber IL-4 führt, als bei der Immobilisierung von IL-4R α alleine beobachtet werden kann [140]. Da keine Bindung von IL-4 an CHO-Zellen, die IL-13R α 1 rekombinant exprimieren, nachgewiesen werden kann, es jedoch bei Coexpression von IL-4R α zur Aktivierung der Stat6-Signalkaskade durch IL-4 kommt, muss die IL-13R α 1-Kette vom IL-4/IL-4R α -Komplex in den signalweiterleitenden, ternären Komplex rekrutiert werden [74]. Aus den hier aufgeführten Daten lässt sich auf einen sequentiellen Mechanismus bei der Bildung des signalaktiven Komplexes aus IL-4 und dem TypII-IL-4-Rezeptor schließen. IL-4 interagiert zunächst mit der hochaffinen IL-4R α -Kette. Der so entstandene IL-4/IL-4R α -Komplex rekrutiert anschließend die niederaffine IL-13R α 1-Kette in den heterotrimeren Komplex, wodurch es zur Signalweiterleitung ins Zellinnere kommt.

Für die Bindung von IL-13 an seinen Zelloberflächenrezeptor wurde in COS-3- und A432-Zellen ein K_D -Wert von ca. 300pM ermittelt [141]. Diese hohe Affinität wurde durch IL-13-Bindeexperimente auf mit IL-4R α und IL-13R α 1 transfizierten Zellen ($K_D \approx 30 - 400\text{pM}$) bestätigt [74, 142]. Die Affinität von IL-13 zu den einzelnen Untereinheiten des TypII-IL-4-Rezeptors ist dagegen wesentlich

geringer. Es konnte keine Bindung von IL-13 an mit IL-4R α transfizierte COS-3-Zellen beobachtet werden [141]. Für die Interaktion von IL-13 mit der IL-13R α 1-Kette auf transfizierten CHO-Zellen konnte ein K_D -Wert von 4 – 5nM bestimmt werden [74]. Diese Affinität wurde durch SPR-Experimente *in vitro* bestätigt ($K_D \approx 35$ nM). Sind jedoch sowohl IL-13R α 1 als auch IL-4R α auf einem Sensorchip immobilisiert, so wird IL-13 mit einer deutlich höheren Affinität ($K_D \approx 500$ pM) gebunden [140]. Diese Tatsache lässt auf einen sehr starken kooperativen Effekt bei der Bindung von IL-13 an beide Rezeptoruntereinheiten schließen. Betrachtet man die kinetischen Bindekonstanten für die Interaktion von IL-13 mit nebeneinander immobilisierten IL-4R α und IL-13R α 1, ergeben sich auch für diesen Fall Hinweise auf einen sequentiellen Bindemechanismus. Die kinetische Assoziationsrate ist vergleichbar dem für die Interaktion zwischen IL-13 und IL-13R α 1 erhaltenen Wert, was dafür spricht, dass in einem ersten Schritt IL-13 an die IL-13R α 1-Kette gebunden wird. Die Dissoziation des Liganden wird jedoch durch IL-4R α deutlich verlangsamt, was sich durch die Stabilisierung des IL-13/IL-13R α 1-Komplexes durch IL-4R α erklären lässt [140]. Diese Ergebnisse deuten auf einen schrittweisen Aufbau des signalaktiven IL-13-Rezeptorkomplexes hin. IL-13 bindet zuerst an seine hochaffine Rezeptorkette IL-13R α 1 und rekrutiert anschließend die IL-4R α -Kette zur Stabilisierung und Initiation der Signalweiterleitung in den Komplex.

Obwohl IL-4 und IL-13 für ihre biologischen Funktionen den gleichen Rezeptor, aufgebaut aus IL-4R α und IL-13R α 1, verwenden, so unterscheidet sich doch der Ablauf der Rezeptorkomplexbildung deutlich voneinander. Während IL-4 zuerst an die IL-4R α -Kette bindet, erfolgt im Falle von IL-13 die erste Interaktion mit IL-13R α 1. Dieser Unterschied spiegelt sich auch in den inversen Affinitäten von IL-4 und IL-13 gegenüber den beiden Rezeptorketten wider. IL-4 besitzt eine hohe Affinität zu IL-4R α und eine wesentlich niedrigere Affinität zu IL-13R α 1. IL-13 bindet dagegen mit hoher Affinität an IL-13R α 1 und zeigt keine direkte Interaktion mit IL-4R α .

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Der TypII-IL-4-Rezeptorkomplex stellt ein Beispiel einer limitierten Spezifität für Ligand-Rezeptor-Interaktionen dar, die bei vielen verschiedenen Zytokinen zu finden ist. Die beiden Liganden IL-4 und IL-13 signalisieren über den gleichen Rezeptorkomplex, der aus den Untereinheiten IL-4R α und IL-13R α 1 zusammengesetzt ist. Obwohl der aus der Ligandenbindung resultierende Rezeptorkomplex identisch ist, so gibt es doch einen deutlichen Unterschied im sequentiellen Aufbau des aktiven Signalkomplexes. Während IL-4 zuerst mit hoher Affinität an die IL-4R α -Kette bindet und dann die niederaffine IL-13R α 1-Kette in den Komplex rekrutiert, so ist die Reihenfolge, in der IL-13 Kontakt zu den beiden Rezeptoruntereinheiten aufnimmt, genau umgekehrt. Auch die Affinitäten, welche die Rezeptoruntereinheiten zu den beiden Liganden besitzen, variieren sehr stark. Obwohl die Affinitäten über einen großen Bereich variieren, so zeichnet sich das IL-4/IL-13-Rezeptorsystem dennoch durch hohe Spezifität aus. Die beiden Rezeptorketten IL-4R α und IL-13R α 1 interagieren ausschließlich mit IL-4 bzw. IL-13, aber nicht mit weiteren Zytokinen.

In dieser Arbeit sollte durch funktionelle und strukturelle Untersuchungen versucht werden, mögliche Mechanismen aufzuklären, durch die es möglich wird, Spezifität und Affinität unabhängig voneinander zu generieren. Hierzu mussten zunächst Expressions- und Aufreinigungsstrategien für IL-13 und die extrazelluläre Domäne von IL-13R α 1 entwickelt werden.

Zur Bestimmung des funktionellen Bindeepitops der IL-13R α 1-ECD sollte eine umfassende Mutagenesestudie durchgeführt werden. Dadurch sollte die Beteiligung einzelner Aminosäurereste von IL-13R α 1 an der Interaktion mit IL-13 bzw. IL-4 mit Hilfe der SPR-Technologie aufgeklärt werden. Die so erhaltenen Daten sollten zusammen mit Informationen aus Mutagenesestudien auf Seite der Liganden zum Erstellen eines verlässlichen Strukturmodells der IL-13R α 1-ECD verwendet werden.

Um experimentelle Strukturinformationen von IL-13 im Komplex mit einer IL-13-spezifischen Rezeptorkette zu erhalten, sollte weiterhin versucht werden, binäre Komplexe aus IL-13 und IL-13R α 1 bzw. IL-13R α 2 für die Kristallisation zu präparieren.

Durch die bekannte Röntgenkristallstruktur im Komplex mit IL-4 war der Aufbau des Bindeepitops der extrazellulären Domäne von IL-4R α bereits beschrieben. Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Mechanismen aufzuklären, die es den beiden IL-4-Varianten T13D und F82D ermöglichen, mit höherer Affinität als wildtypisches IL-4 an die IL-4R α -Kette zu binden. Hierzu mussten verschiedene IL-4-Varianten isoliert und deren Bindeeigenschaften gegenüber IL-4R α charakterisiert werden. Weiterhin sollten die Strukturen der superagonistischen und einiger weiteren IL-4-Varianten aufgeklärt werden, um darüber mögliche molekulare Änderungen bei der Interaktion mit IL-4R α aufzudecken.

2 Material und Methoden

2.1 Abkürzungen (keine SI-Einheiten)

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
β -ME	β -Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
CD	Circulardichroismus
cDNA	kodierende DNA
CHR	Zytokin-Homologieregion
Da	Dalton
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECD	extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
γ_c	common γ -chain; IL-2-Rezeptorkette γ
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid
HBS	Hepes-gepufferte Salzlösung
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
IL-13	Interleukin-13
IL-13R α 1	IL-13-Rezeptorkette α 1
IL-13R α 2	IL-13-Rezeptorkette α 2
IL-4	Interleukin-4
IL-4R α	IL-4-Rezeptorkette α
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin

Material und Methoden

K_D	Dissoziationskonstante
k_{on}	Assoziationsgeschwindigkeit
k_{off}	Dissoziationsgeschwindigkeit
LB	Luria Broth
MeOH	Methanol
MOI	multiplicity of infection
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid-tetrazolium
M_w	Molekulargewicht
OD_{600}	optische Dichte bei 600nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pfu	plaque forming units
SPR	Oberflächenplasmonresonanz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RU	resonance units
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sf9	Spodoptera frugiperda (Klon 9)
TB	Terrific Broth
TBS	Tris-gepuffert Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
VA	Virusamplifikation
VT	Volumenteile
wt	wildtypisch

Die Ein- und Dreibuchstabenabkürzungen der Aminosäuren entsprechen den Empfehlungen der IUBAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur. Zur Angabe von Aminosäureaustauschen im Vergleich zum wildtypischen Protein werden die Einbuchstabenabkürzungen verwendet. IL-13-W36A gibt somit einen Aminosäureaustausch in IL-13 an der Position 36 von Phenylalanin zu Alanin an.

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle eingesetzten Chemikalien und Enzyme wurden in der jeweils höchsten Qualität und Reinheitsstufe von den folgenden Firmen bezogen: Amersham-Pharmacia, AppliChem, Beckman-Coulter, Boehringer, Fermentas, Fluka, Gibco, InvivoGen, Merck, NEB Biolabs, Pierce, Roth, Serva, Sigma.

Alle Lösungen wurden in einfach oder doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

2.2.2 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> BL21 Star TM (DE3) (Invitrogen)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B-m_B-) gal dcm rne131</i> (DE3)
<i>Escherichia coli</i> NovaBlue TM (Novagen)	<i>endA1 hsdR17 (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA⁺B⁺ lacI^qZΔM15::Tn10]</i> (Tet ^R)
<i>Escherichia coli</i> Rosetta TM (DE3) (Novagen)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B-m_B-) gal dcm</i> (DE3) pRARE (Cam ^R)

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme

2.2.3 Vektoren

Vektor	Eigenschaften
pET-28b (Novagen)	<i>E.coli</i> -Expressionsvektor; T7/ <i>lac</i> Promotor; Kan ^R ; N- oder C-terminaler 6xHis-Tag; N-terminaler 6xHis-Tag durch Thrombin abspaltbar
pMK-1	Baculovirus-Transfer- und Expressionsvektor zur Expression in <i>Sf9</i> -Insektenzellen; Amp ^R ; gp64-Signalsequenz zur Sekretion ins Medium; N-terminaler 6xHis-Tag durch Thrombin abspaltbar; beruht auf pBAC-3 (Novagen); ursprüngliche BamHI-Schnittstelle wurde zerstört, neue BamHI-Schnittstelle wurde in der Thrombin-Spaltstelle geschaffen
pAcGP67B-10xHis (PharMingen) (modifiziert)	Baculovirus-Transfer- und Expressionsvektor zur Expression in <i>Sf9</i> -Insektenzellen; Amp ^R ; gp67-Signalsequenz zur Sekretion ins Medium; C-terminaler 10xHis-Tag
pQKA	<i>E.coli</i> -Expressionsvektor; T5/ <i>lac</i> Promotor; beruht auf pQE-80L (Qiagen); Amp ^R wurde durch Kan ^R ersetzt
pMTBiP/V5-HisA (Invitrogen)	Expressionsvektor zur Expression in <i>Drosophila</i> S2-Zellen; Amp ^R ; BiP-Signalsequenz zur Sekretion ins Medium; induzierbarer Metallothionein-Promotor; C-terminaler V5-Epitop und 6xHis-Tag

Tabelle 2.2: Verwendete Vektoren

2.2.4 Kulturmedien

LB-Medium [143]:	10g/l Bacto-Trypton, 5g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 10g/l NaCl, mit 2M NaOH auf pH7,5 eingestellt
TB-Medium [143]:	13,3g/l Bacto-Trypton, 26,6g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 4,4ml/l Glycerin, 10% (v/v) 10xPhosphatlösung
10xPhosphatlösung:	0,17M KH ₂ PO ₄ , 0,72M K ₂ HPO ₄
LB-Agar-Platten:	40g/l LB-Agar-Pulver (AppliChem), 0,2% (v/v) 2M NaOH
IPL41-Medium:	27,2g/l IPL41-Pulver (HyClone), 0,35g/l NaHCO ₃ , 2,6g/l NaCl, 4g/l Hefe-Extrakt, mit 2M NaOH auf pH6,2 einstellen, nach dem Lösen der Komponenten wird das Medium steril filtriert; nach der Filtration Zugabe von 1% (v/v) 100xLipid-Mix, vor Gebrauch werden dem Medium noch 5% FCS zugesetzt
S2-Medium:	Schneider's Drosophila Medium (biowest), 10% FCS
S2-Selektionsmedium:	S2-Medium, 25µg/ml Blasticidin
RPMI-1640-Medium [144]:	RPMI 1640 Medium (Invitrogen), 2g/l NaHCO ₃ , 10% FCS
TF1-Kulturmedium:	RPMI-1640-Medium, 2ng/ml GM-CSF

Die Bakterienkultur-Medien und die LB-Agar-Platten werden gegebenenfalls noch mit den Antibiotika Ampicillin, Kanamycin, Tetrazyklin oder Chloramphenicol versetzt. Die Konzentrationen der Antibiotika im Medium entsprechen dabei 50µg/ml Ampicillin, 50µg/ml Kanamycin, 12,5µg/ml Tetrazyklin und 36 µg/ml Chloramphenicol.

Den Medien zur Kultur von eukaryotischen Zellen werden vor der Verwendung noch 100U/ml Penicillin-G und 100µg/ml Streptomycin zugesetzt.

2.2.5 Oligonukleotide

2.2.5.1 Primer zur Mutagenese von IL-13R α 1

E56A-fw:	GAATCCACCC <u>CGGG</u> GAGCCAGC
E56A-rev:	GCTGGCTCC <u>CGGG</u> TGGATTC
D75A-fw:	TTGGCGACAAACA <u>GCTA</u> AGAAAATAGCTCC
D75A-rev:	GGAGCTATTTTCTT <u>AGCT</u> TGTTTGTCGCCAA
E81A-fw:	GAAAATAGCTCCG <u>GCA</u> ACTCGTCGTTC
E81A-rev:	GAACGACGAGT <u>TGCC</u> GAGCTATTTTC
R83A-fw:	GCTCCGGAAACT <u>GCTC</u> GTTCAATAGAAG
R83A-rev:	CTTCTATTGAACG <u>AGCAG</u> TTTCCGGAGC

R84A-fw: TCCGGAAACTCGTGCTTCAATAGAAGTACC
R84A-rev: GGTACTTCTATTGAAGCACGAGTTTCCGGA
E106A-fw: GTGTAGCACCAATGCGAGTGAGAAGCC
E106A-rev: GGCTTCTCACTCGCATTGGTGCTACAC
E108A-fw: CACCAATGAGAGTGCGAAGCCTAGCATT
E108A-rev: AATGCTAGGCTTCGCACTCTCATTGGTG
H137A-fw: CAATGCATTTGGGCCAACCTGAGCTAC
H137A-rev: GTAGCTCAGGTTGGCCCAAATGCATTG
N138A-fw: GCATTTGGCACGCCCTGAGCTACAT
N138A-rev: ATGTAGCTCAGGGCGTGCCAAATGC
L139A-fw: CATTTGGCACAACGCGAGCTACATGAAG
L139A-rev: CTTTCATGTAGCTCGCGTTGTGCCAAATG
S140A-fw: GCACAACCTGGCCTACATGAAGTG
S140A-rev: CACTTCATGTAGGCCAGGTTGTGC
H164A-fw: CTCTCTACTATTGGGCCAGAAGCCTGGAA
H164A-rev: TTCCAGGCTTCTGGCCCAATAGTAGAGAG
R165A-fw: CTACTATTGGCACGCAAGCCTGGAAAA
R165A-rev: TTTTCCAGGCTTGCGTGCCAATAGTAG
S166A-fw: CTATTGGCACAGAGCCCTGGAAAAAATTC
S166A-rev: GAATTTTTTCCAGGGCTCTGTGCCAATAG
L167A-fw: GGCACAGAAGCGCGGAAAAAATTCATC
L167A-rev: GATGAATTTTTTCCCGCTTCTGTGCC
E168A-fw: CACAGAAGCCTGGCAAAAATTCATCAATG
E168A-rev: CATTGATGAATTTTTGCCAGGCTTCTGTG
D188A-fw: TGGTTGTTCCTTTGGCTCTGACCAAAGTG
D188A-rev: CACTTTGGTCAGAGCAAAGGAACAACCA
L189A-fw: GTTCCTTTGATGCGACCAAAGTGAAGG
L189A-rev: CCTTCACTTTGGTTCGCATCAAAGGAAC
T190A-fw: GTTCCTTTGATCTGGCCAAAGTGAAGGATTC
T190A-rev: GAATCCTTCACTTTGGCCAGATCAAAGGAAC
K191A-fw: GATCTGACCGCAGTGAAGGATTCC
K191A-rev: GGAATCCTTCACTGCGGTGTCAGATC
V192A-fw: GATCTGACCAAAGCGAAGGATTCCAG
V192A-rev: CTGGAATCCTTCGCTTTGGTTCAGATC
K193A-fw: CTGACCAAAGTGGCGGATTCCAGTTTT
K193A-rev: AAAACTGGAATCCGCCACTTTGGTTCAG
D194A-fw: CCAAAGTGAAGGCTTCCAGTTTTGAACAAC
D194A-rev: GTTGTTCAAACCTGGAAGCCTTCACTTTGG

S195A-fw: CCAAAGTGAAGGATGCCAGTTTTGAACAAC
S195A-rev: GTTGTTCAAAACTGGCATCCTTCACTTTGG
S196A-fw: GTGAAGGATTCCGCTTTTTGAACAACACAG
S196A-rev: CTGTGTTGTTCAAAAGCGGAATCCTTCAC
F197A-fw: GAAGGATTCCAGTGCTGAACAACACAG
F197A-rev: CTGTGTTGTTCAGCACTGGAATCCTTC
E198A-fw: GATTCCAGTTTTGCACAACACAGTGTCC
E198A-rev: GGACACTGTGTTGIGCAAAACTGGAATC
Q199A-fw: TTCCAGTTTTGAAGCACACAGTGTCCAAAT
Q199A-rev: ATTTGGACACTGTGIGCTTCAAACTGGAA
Q251A-fw: ATGGGAGAATCCAGGCGAATTTTATTAGCAG
Q251A-rev: CTGCTAATAAAATTCGCTGGATTCTCCCAT
N252A-fw: GGAGAATCCACAGGCATTTATTAGCAGATG
N252A-rev: CATCTGCTAATAAATGCCTGTGGATTCTCC
F253A-fw: GAATCCACAGAATGCTATTAGCAGATGCC
F253A-rev: GGCATCTGCTAATAGCATTCTGTGGATTC
I254A-fw: GAATCCACAGAATTTTGCTAGCAGATGCCTA
I254A-rev: TAGGCATCTGCTAGCAAAAATTCTGTGGATT
S255A-fw: CCACAGAATTTTATTGCCAGATGCCTATTTTATG
S255A-rev: CATAAAATAGGCATCTGGCAATAAAATTCTGTGG
R256A-fw: CAGAATTTTATTAGGCATGCCTATTTTATGAAG
R256A-rev: CTTCATAAAATAGGCATGCGCTAATAAAATTCTG
E279A-fw: TTCTACGTCCAAGCGCTAAATGTGAGAA
E279A-rev: TTCTCACATTTAGCCGCTTGGACGTAGAA
E283A-fw: GAGGCTAAATGTGCGAATCCAGAATTTGAG
E283A-rev: CTCAAATTCTGGATTCGCACATTTAGCCTC
E286A-fw: CTAATGTGAGAATCCAGCATTTGAGAGAAATGTG
E286A-rev: CACATTTCTCTCAAATGCTGGATTCTCACATTTAG
E288A-fw: GAGAATCCAGAATTTGCGAGAAATGTGGAGAATAC
E288A-rev: GTATTC TCCACATTTCTCGCAAAATTCTGGATTCTC
R289A-fw: AATCCAGAATTTGAGGCAAATGTGGAGAATAC
R289A-rev: GTATTCTCCACATTTGCCTCAAATTCTGGATT
E292A-fw: TTGAGAGAAATGTGCGAATACATCTTGTTTC
E292A-rev: GAAACAAGATGTATTGCCCACATTTCTCTCAA
T316A-fw: GAATAAGAGTCAAAGCAATAAGTTATGCTATGAG
T316A-rev: CTCATAGCATAACTTATTIGCTTTGACTCTTATTC
N317A-fw: GAATAAGAGTCAAACAGCTAAGTTATGCTATGAG
N317A-rev: CTCATAGCATAACTAGCTGTTTTGACTCTTATTC

K318A-fw: AAGAGTCAAACAAATGCGTTATGCTATGAGGAT
K318A-rev: ATCCTCATAGCATAACGCATTTGTTTTGACTCTT
L319A-fw: GTCAAACAAATAAGGCATGCTATGAGGATG
L319A-rev: CATCCTCATAGCATGCCCTTATTTGTTTTGAC
Y321A-fw: CAAATAAGTTATGCGCTGAGGATGACAAACTC
Y321A-rev: GAGTTTGTATCCTCAGCGCATAACTTATTTG
E322A-fw: TAAGTTATGCTATGCGGATGACAAACTCTGG
E322A-rev: CCAGAGTTTGTATCCCGCATAGCATAACTTA
D323A-fw: TAAGTTATGCTATGAGGCTGACAAACTCTGGAG
D323A-rev: CTCCAGAGTTTGTCAGCCTCATAGCATAACTTA
D324A-fw: GTTATGCTATGAGGATGCCAAACTCTGGAGTA
D324A-rev: TACTCCAGAGTTTGGCATCCTCATAGCATAAC

2.2.5.2 Primer zur Mutagenese von IL-13

E11A-fw: CAGCCCTCAGGGCGCTCATTGAGGAG
E11A-rev: CTCCTCAATGAGCGCCCTGAGGGCTG
M34A-s: AATGGCAGCGCGGTATGGAGCATC
M34A-as: GATGCTCCATACGCGCTGCCATT
W36A-s: GCATGGTAGCGAGCATCAACCTG
W36A-as: CAGGTTGATGCTCGCTACCATGC
R64A-fw: GAGAAGACCCAGGCGATGCTGAGCGG
R64A-rev: CCGCTCAGCATCGCCTGGGTCTTCTC
R87A-s: CTTGCATGTCGCAGACACCAAATCG
R87A-as: CGATTTTGGTGTCTGCGACATGCAAG
T89A-s: GTCCGAGACGCCAAAATCGAGGTG
T89A-as: CACCTCGATTTTGGCGTCTCGGAC

2.2.5.3 Primer zur Mutagenese von IL-4

IL4-R85A_fw: GATTCCTGAAAGGCGCTCGACAGGAAC
IL4-R85A_rev: GTTCCTGTCGAGGCGCTTTCAGGAATC
IL4-F82D-R85A_fw: GAGACCTGAAAGGCGCTCGACAGGAAC
IL4-F82D-R85A_rev: GTTCCTGTCGAGGCGCTTTCAGGTCTC

2.3 Expression rekombinanter Proteine in *E.coli*

2.3.1 Transformation von *E.coli*

Tfbl-Puffer:	30mM Kalium-Acetat, 100mM RbCl, 10mM CaCl ₂ , 50mM MnCl ₂ , 15% (v/v) Glycerin; mit 0,1M Essigsäure auf pH5,8 einstellen
TfbII-Puffer:	10mM MOPS, 75mM CaCl ₂ , 10mM RbCl, 15% (v/v) Glycerin; mit 0,1M NaOH-Lösung auf pH6,5 einstellen
SOC-Medium:	20g/l Bacto-Trypton, 5g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 0,5g/l NaCl; nach dem Autoklavieren werden noch 10mM MgCl ₂ , 10mM MgSO ₄ und 20mM Glucose in Form von sterilen Stammlösungen zugegeben

2.3.1.1 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Transformation von Plasmid-DNS in *E.coli*-Zellen müssen zunächst chemisch kompetente Zellen hergestellt werden. Dazu werden 100ml LB-Medium mit 1ml einer Übernachtskultur des zu transformierenden Stammes angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Wenn die Kultur eine optische Dichte OD₆₀₀ von 0,4 erreicht hat, wird sie für 15min in ein Eisbad gestellt. Dann werden die Bakterienzellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 4°C mit 4400rpm (Eppendorf Centrifuge 5720) abgetrennt. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden in 40ml Tfbl-Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension wird nun für 15min in einem Eisbad inkubiert. Nach erneuter Sedimentation der Zellen (5min; 4400rpm; 4°C; Eppendorf Centrifuge 5720) wird das Pellet in 4ml TfbII-Puffer resuspendiert und nochmals für 15min im Eisbad gekühlt. Dann wird die Zellsuspension in Aliquots zu je 100µl auf Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei -80°C können die kompetenten Zellen bis zur Transformation mit Plasmiden gelagert werden.

2.3.1.2 Transformation kompetenter Zellen

Zu 100µl frisch auf Eis aufgetauten, kompetenten Zellen werden 10 - 20ng der zu transformierenden Plasmid-DNS gegeben. Nach einer Inkubationsphase von 30min im Eisbad folgt ein Hitzeschock für 1min bei 42°C. Dann wird der Transformationsansatz nochmals für ca. 1min auf Eis gestellt. Darauf gibt man 800µl SOC-Medium zu den Zellen und inkubiert die transformierten Zellen für 1 Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator. Zur Selektion von erfolgreich transformierten Zellen, werden 200µl des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.2 Stammhaltung

Transformierte *E.coli*-Bakterienkulturen können bis zu vier Wochen bei 4°C auf Agarplatten gelagert werden. Zu einer dauerhaften Konservierung der Stämme ist es jedoch nötig, Glycerin-Stammkulturen anzulegen. Hierzu impft man 20ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie an und lässt die Kultur bis zu einer optischen Dichte $OD_{600} = 1,5$ bei 37°C auf dem Schüttler wachsen. Dann werden die Zellen durch Zentrifugation (15min, 4400rpm; Eppendorf Centrifuge 5720) geerntet und in 2ml frischem LB-Medium resuspendiert. 1ml dieser Zellsuspension wird mit 1ml Glycerin (87%) versetzt und in einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß bei -20°C gelagert.

2.3.3 Präparative Proteinexpression in TB-Medium

STE-Puffer: 375mM Saccharose, 50mM Tris, 1mM EDTA, pH8,0

Um größere Mengen rekombinanter *E.coli*-Kulturen zu fermentieren und induzieren, werden 6-13 2,5l Schikaneschüttelkolben mit jeweils 800ml TB-Medium im Verhältnis 1:50 aus einer Übernachtskultur angeimpft. Während der Inkubation bei 37°C im Schüttelinkubator (Multitron II, Infors) wird regelmäßig die optische Dichte OD_{600} gemessen. Haben die Kulturen eine OD_{600} von 0,5 erreicht, wird die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von IPTG (1mM im Medium) induziert. Nach weiteren 4 Stunden bei 37°C auf dem Schüttler werden die *E.coli*-Bakterien in der Zentrifuge für 25 min bei 6000rpm und 4°C (Heareus Suprafuge 22, HFA12.500 Rotor) geerntet. Abschließend werden die Zellpellets in 400ml STE-Puffer resuspendiert, vereinigt und erneut mittels Zentrifugation geerntet. Das Feuchtgewicht der fermentierten Bakterien lässt sich nun bestimmen. Bis zur weiteren Aufreinigung des rekombinanten Proteins können die *E.coli*-Zellen bei -20°C gelagert werden.

2.3.4 Rekombinante Expression und Aufreinigung von IL-4-Varianten

STE-Puffer: 375mM Saccharose, 50mM Tris, 1mM EDTA, pH8,0

Tris-Puffer: 100mM Tris, pH8,0

GuHCl-Lösung: 8M Guanidiniumhydrochlorid, 100mM Tris, pH8,0

Zur Expression von IL-4 und IL-4-Varianten wurde die cDNA des reifen Teils von IL-4 zusammen mit der Ribosomenbindstelle in einen modifizierten pQE-80L-Expressionsvektor (Qiagen) kloniert. Das resultierende Plasmid pQKA-IL4 wurde in *E.coli* BL21(DE3)Star-Zellen (Stratagene) transformiert. Die transformierten Zellen werden wie unter 2.3.3 beschrieben kultiviert, induziert und geerntet. Zur Isolation der Inclusion Bodies werden die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen und

abschließend mit STE-Puffer gewaschen. Die erhaltenen InclusionBodies werden im 1,5-fachen (v/w) Volumen Tris-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 7,5-fachen (v/w) Volumen GuHCl-Lösung denaturiert. Nach Zugabe von 0,1% (v/v) β -ME wird die Lösung unter langsamem Rühren bei RT für 2 Stunden inkubiert. Nach dem Abtrennen unlöslicher Bestandteile wird die Lösung langsam unter Rühren in das vierfache Volumen eiskaltes ddH₂O eingetropft. Dieser Rückfaltungsansatz wird weitere 30min bei 4°C gerührt und anschließend gehen das 10-fache Volumen PBS über Nacht bei 4°C dialysiert. Das renaturierte IL-4 wird nun zunächst durch eine Ionenaustausch- (vgl. 2.5.2) und abschließend durch eine HPLC-Chromatographie (vgl. 2.5.4) weiter aufgereinigt.

2.4 Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen

2.4.1 Kultivierung von Sf9- und TriExTM-Insektenzellen

Die Sf9- bzw. TriExTM-Insektenzellenlinie stammt aus Puppenovariengewebe von *Spodoptera frugiperda* [145]. Diese Zellen sind geeignet für eine Infektion mit *Autographa californica* Baculoviren, wodurch es möglich wird, Proteine durch Co-Transfektion eines Baculovirus-Expressionsvektors rekombinant zu exprimieren [146].

2.4.1.1 Kultivierung als Monolayer-Kulturen

Sf9- und TriExTM-Insektenzellen werden in IPL41-Medium in 175cm² Zellkulturflaschen (Greiner) bei 27°C im Brutschrank (Binder) ohne zusätzliche Begasung kultiviert. Unter diesen Bedingungen haben die Zellen eine Verdopplungszeit von 20 bis 24h. Sind die Zellen konfluent, werden sie auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Hierzu wird zuerst das alte Medium mit den darin befindlichen, nicht mehr am Boden haftenden Zellen abgesaugt. Zu den vitalen Zellen am Flaschenboden werden dann 10ml frisches Medium gegeben. Durch Schläge an die Flaschenkante werden die Zellen vom Boden gelöst. Die Zellsuspension wird auf zwei bis fünf neue 175cm² Zellkulturflaschen aufgeteilt, welche dann mit frischem IPL41-Medium bis auf 35ml aufgefüllt werden.

2.4.1.2 Kultivierung als Suspensions-Kultur

Zur vierten und fünften Virusamplifikation (VA) und zur Proteinexpression werden die Insektenzellen in 2,5l Rollerflaschen (Greiner) in Suspension kultiviert. Dazu werden Zellen von sechs konfluenten 175cm² Zellkulturflaschen in jeweils 10ml frischem Medium abgeschlagen und in eine Rollerflasche gegeben. Diese Flasche wird mit Medium auf 80ml aufgefüllt. Nach zwei Tagen Inkubation bei 27°C wird die Flasche auf 200ml mit neuem Medium aufgefüllt. Nach drei weiteren Tagen wird die Zellzahl in der Rollerflasche bestimmt (vgl. 2.4.2) und die Zellkultur auf eine Zellzahl von $1,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit Medium verdünnt. Je nach benötigter Zellmenge können die Zellen nun bereits zur

Proteinexpression oder Virusamplifikation verwendet oder zur weiteren Vermehrung nochmals für drei Tage inkubiert werden. Es ist darauf zu achten, dass nie mehr als 400ml Zellkultur in einer Flasche sind. Größere Volumina müssen gegebenenfalls auf mehrere Flaschen verteilt werden.

2.4.2 Vitalitätsfärbung und Zelldichtebestimmung

Trypanblau-Lösung: 0,5% Trypanblau in PBS

Um die Zahl der lebenden *Sf9*-Zellen pro ml Kulturmedium zu bestimmen, werden diese mit Trypanblau versetzt und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Hierzu werden 20µl Zellsuspension mit 80µl Trypanblau-Lösung versetzt. Nur lebende Zellen mit einer intakten Zellmembran lassen keinen Farbstoff in das Innere und werden somit nicht angefärbt. Nur diese, unter dem Mikroskop hell erscheinenden Zellen werden in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

2.4.3 Co-Transfektion von *Sf9*-Zellen mit dem BaculoGold™-System

Mittels des BaculoGold™-Systems (Pharmingen) werden rekombinante *Autographa californica* Viren durch homologe Rekombination viraler DNS (BaculoGold™-DNS) und eines Baculovirus-Transfer-Vektors (pAcGP67B) entsprechend dem „Baculovirus Expression Vector System Manual“ (Pharmingen) hergestellt.

Lösung A: Grace's Medium mit 10% FCS, pH6,0-6,2

Lösung B: 25mM HEPES pH7,1, 125mM CaCl₂, 140mM NaCl

Zunächst werden pro Co-Transfektion 1ml einer *Sf9*-Insektzellensuspension der Zelldichte $0,8 \cdot 10^6$ Zellen/ml in ein Well einer 6-Well-Platte pipettiert und für eine Stunde bei 27°C im Brutschrank inkubiert, so dass sich die Zellen absetzen und am Boden des Wells anheften. Danach wird das Medium über den Zellen abgesaugt und es werden 0,25ml der Lösung A in das Well gegeben. In einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß werden nun 0,25µg BaculoGold™-DNS mit 1,5µg des rekombinanten Baculovirus-Transfer-Vektors vermischt und für 5min bei RT inkubiert. Das DNS-Gemisch wird nun sorgfältig mit 0,25ml der Lösung B vermischt und dann langsam zu den Zellen und Lösung A ins Well gegeben. Nach 4h bei 27°C im Brutschrank wird der Überstand von den Zellen abgesaugt. Nach zweimaligem Waschen mit 1,5ml frischem Medium werden die Zellen mit 1,5ml Medium überschichtet. Die Platte wird nun mit Parafilm versiegelt und auf einem feuchten Tuch in einer Plastikbox für fünf Tage bei 27°C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wird der rekombinante Viren enthaltende Überstand abgenommen. Zur Kontrolle der Co-Transfektion und um einzelne rekombinante Viren zu isolieren, wird mit dem Überstand ein Plaque Assay (siehe 2.4.5) durchgeführt.

2.4.4 Co-Transfection von Sf9-Zellen mit dem BacVector™-System

Das BacVector™-System dient wie auch das BaculoGold™-System zur Gewinnung rekombinanter *Autographa californica* Viren. In diesem Fall geschieht dies durch homologe Rekombination der viralen „BacVector-2000 oder -3000 Triple Cut Virus DNA“ und des modifizierten pBAC-3-Transfer-Vektors pMK-1. Der Vorteil gegenüber dem BaculoGold™-System liegt in der geringen Größe des Transfer-Vektors. Dadurch wird das Klonieren des Zielgens in den Vektor erleichtert und es wird möglich, Mutationen mittels der QuikChange-Methode (vgl. 2.6) in das Zielgen einzufügen.

Zur Vorbereitung werden pro Co-Transfektion $1,25 \cdot 10^6$ (BacVector-2000) bzw. $6,25 \cdot 10^5$ Sf9-Zellen (BacVector-3000) in 2,5 ml Medium in einem Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Platte wird für mindestens 30min bei 27°C im Brutschrank inkubiert, so dass sich die Insektenzellen am Plattenboden anheften können. Dann werden 50ng der „BacVector Triple Cut DNA“, 250ng der rekombinanten Transfer-Vektor-DNS und 12,5µl IPL41-Medium in einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt. In einem weiteren Eppendorf-Reaktionsgefäß werden 10µl steriles ddH₂O mit 2,5µl „Insect GeneJuice™“-Transfektions-Reagenz gemischt. Zu dieser Lösung werden direkt anschließend die gesamten 12,5µl das DNS/Medium-Gemisches gegeben. Nach sorgfältigem Mischen folgt eine Inkubationszeit von 15min bei RT. In dieser Zeit werden die ausgesäten Zellen zweimal mit je 1ml Medium ohne FCS gewaschen und dann mit 0,5ml Medium ohne FCS überschichtet. Das Transfektions-Gemisch wird nun sorgfältig mit 225µl Medium ohne FCS gemischt und die kompletten 250µl werden dann zu den Zellen in das Well gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 27°C im Brutschrank werden pro Well 3ml Medium mit FCS zugegeben. Die 6-Well-Platte wird jetzt mit Parafilm verschlossen und auf einem feuchten Tuch in einer Plastikbox im Brutschrank bei 27°C für vier bis fünf Tage inkubiert. Nach dieser Zeit wird Überstand mit den rekombinanten Viren abgenommen und durch einen Plaque Assay (vgl. 2.4.5) analysiert.

2.4.5 Plaque Assay

2,7% Agarose-Lösung: 1,35g SeaPlaque™-Agarose (Biozym) werden durch Aufkochen in der Mikrowelle in 50 ml ddH₂O gelöst. Diese Agarose-Lösung kann einige Tage bei 65°C gelagert werden.

Medium: 6,6ml 1,3x Xpress Medium, 0,7ml FCS

MTT-Lösung: 1mg/ml MTT in ddH₂O gelöst und steril filtriert

Der Plaque Assay dient der Isolierung einzelner Viren und zur Bestimmung des Viren-Titers von Zellüberständen der Virusamplifikationen (vgl. 2.4.6).

Zunächst werden 1ml einer Sf9-Zellsuspension der Zelldichte $1,2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in jedes Well eine 6-Well-Platte (Greiner) pipettiert. Nachdem jedem Well nochmals 1ml frisches Medium zugegeben

wurde, wird die Platte für 1h bei 27°C im Brutschrank inkubiert, damit sich die Zellen absetzen und am Boden anheften können. Danach wird das Medium abgesaugt und durch 1ml der Virusverdünnungen ersetzt. Nach einer Co-Transfektion (vgl. 2.2.3 und 2.2.4) werden zur Isolation einzelner Viren Viruslösungen der Verdünnungen 1:10 bis 1:10⁴, nach einer Virusamplifikation zur Bestimmung des Virentiters Lösungen mit einer Virusverdünnung von 1:10⁴ bis 1:10⁸ eingesetzt. Nach Zugabe der Viruslösungen wird die Platte erneut für genau 1h bei 27°C im Brutschrank inkubiert. Dann wird die Viruslösung abgesaugt und die Zellen werden mit 1,5ml Agarose-Medium pro Well überdeckt. Das Agarose-Medium wird kurz vor der Verwendung frisch, durch Zugabe von 3,3ml warmer 2,7% Agarose-Lösung zu 6,6ml Medium, hergestellt. Nach dem Abkühlen und Aushärten der Agarose-Lösung wird die Platte mit Parafilm verschlossen und auf einem feuchten Tuch in einer Plastikbox für 5 Tage bei 27°C inkubiert.

Anschließend wird der Plaque Assay zur Auswertung durch Zugabe von 1ml MTT-Lösung pro Well angefärbt. Die Färbung beruht auf der enzymatischen Umsetzung des MTTs in ein violett erscheinendes Produkt durch lebende Zellen. Virusinfizierte und damit lysierte Zellen werden somit nicht angefärbt und erscheinen als helle Punkte (sog. Plaques) auf einer violetten Zellschicht. Der Titer der eingesetzten Viruslösung wird durch Auszählen der Plaques unter Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors in pfu/ml bestimmt. Will man einzelne Viren für die anschließende Amplifikation isolieren, so pickt man den entsprechenden Plaque mit einer sterilen 100µl-Pipettenspitze durch die Agarose hindurch von der Platte und resuspendiert ihn in 1ml frischem Medium. Diese Viruslösung kann nach einstündiger Inkubation bei 27°C und dem Abtrennen von Agaroseresten durch Zentrifugation (5min bei 1000rpm; Eppendorf Centrifuge 5415D) zur ersten Virusamplifikation (siehe 2.4.6.1) verwendet werden.

2.4.6 Virusamplifikation

2.4.6.1 Virusamplifikation in Monolayer-Kultur

Die erste und zweite Virusamplifikation wird in einer 6-Well-Platte durchgeführt. Dazu werden 1,6·10⁶ Zellen in 1ml Medium pro Well ausgesät und für eine Stunde bei 27°C im Brutschrank inkubiert. Wenn sich die Zellen am Boden angeheftet haben, wird das Medium vorsichtig abgesaugt und durch 1ml des Virusüberstandes ersetzt. Die Platte wird dann mit Parafilm verschlossen und auf einem feuchten Tuch in einer Plastikbox für vier Tage bei 27°C inkubiert. Danach wird der Überstand mit einer sterilen 1ml-Pipette abgenommen und mit aufgenommene Zellen werden durch Zentrifugation (5min bei 1000rpm; Eppendorf Centrifuge 5415D) entfernt. Bis zur weiteren Amplifikation wird der Virusüberstand in einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 4°C im Dunkeln gelagert. Nach der zweiten Virusamplifikation wird der Überstand durch einen Western Blot (siehe 1.4.4) auf die Expression des rekombinanten Proteins getestet.

Die dritte Virusamplifikation wird in einer 175cm² Zellkulturflasche durchgeführt. Zu einer zu ca. 80% konfluenten Insektenzell-Monolayer-Kultur wird 1ml des Virusüberstandes aus der zweiten Virusamplifikation gegeben. Nach vier Tagen bei 27°C im Brutschrank wird der Überstand abgenommen, die Insektenzellen werden durch Zentrifugation für 5min mit 2000rpm (Eppendorf Centrifuge 5720) abgetrennt und der Virusüberstand wird in einem sterilen 50ml-Röhrchen bei 4°C im Dunkeln gelagert. Nach der dritten Virusamplifikation wird der Viren-Titer mittels eines Plaque Assays (vgl. 2.4.5) bestimmt.

2.4.6.2 Virusamplifikation in Suspensionskultur

Die vierte und alle weiteren Virusamplifikationen werden in Suspensionskultur in Rollerflaschen durchgeführt. Hierzu werden maximal 400ml einer Insektenzellsuspension der Zelldichte $1,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml pro Rollerflasche mit 0,1 MOI (Multiplicity Of Infection: Verhältnis Viren zu Zellen) der vorherigen VA infiziert. Nach viertägiger Inkubation wird die Zellsuspension in 50ml-Röhrchen gefüllt und 5min bei 2000rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5720). Der Virusüberstand wird nun in sterilen 50ml-Röhrchen bis zu einer weiteren VA oder einer Virusexpression bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.4.7 Expression rekombinanter Proteine in Sf9- bzw. TriEx™-Zellen

Zur Expression rekombinanter Proteine in Sf9- oder TriEx™-Insektenzellen werden Zellen in Suspensionskultur, die mit frischem IPL41-Medium auf eine Zelldichte von $1,5 \cdot 10^6$ verdünnt wurden, benötigt. Pro Rollerflasche werden nicht mehr als 400ml Insektenzellsuspension mit 5 MOI aus Virusamplifikationen einer Konzentration von mindestens $5 \cdot 10^7$ pfu/ml infiziert. Die infizierten Zellen werden für vier bis fünf Tage im Brutschrank bei 27°C inkubiert. Nach der Expression werden die Insektenzellen durch Zentrifugation für 20 min bei 6000rpm und 4°C (Heareus Suprafuge 22, HFA12.500 Rotor) abgetrennt. Für die weitere Aufreinigung des exprimierten Proteins wird der Überstand sofort nach der Zentrifugation gegen den benötigten Puffer dialysiert (VISKING Typ 36/32, Roth).

2.4.8 Rekominante Expression der IL-4R α -Ectodomäne und deren Aufreinigung [139]

Die extrazelluläre Domäne der IL-4R α -Kette wurde mit Hilfe des BaculoGold™-Systems (Pharmingen) in TriEx™-Insektenzellen exprimiert (vgl. 2.4) und aus dem Kulturüberstand aufgereinigt. Die Isolierung von IL-4R α gliedert sich dabei in zwei Schritten. Zunächst erfolgt die

Reinigung mittels einer Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie (siehe 2.4.1) über den rekombinant angehängten His-Tag. Als finaler Aufreinigungsschritt kommt eine Affinitätschromatographie an einer IL-4-Sepharose-Affinitätssäule zur Anwendung. Die Herstellung der IL-4-Sepharose-Affinitätssäule und die Durchführung der Affinitäts-Chromatographie erfolgt weitestgehend, wie unter 2.5.5 für IL-13 und IL-13R α 2 beschrieben.

2.4.9 Kultivierung von *Drosophila* Schneider 2 (S2)-Zellen

Die S2-Zelllinie stammt aus einer Primärkultur von 20-24h alten *Drosophila melanogaster* Embryonen [147]. S2-Zellen lassen sich zur transienten Expression mit einem rekombinanten Expressionsvektor transfizieren. Um eine stabile Zelllinie zu erhalten, wird parallel zum Expressionsvektor ein Selektionsvektor transformiert.

2.4.9.1 Kultivierung als semi-adherente Monolayer-Kultur

S2-Zellen werden in S2-Medium in 175cm² Zellkulturflaschen (Greiner) bei 27°C im Brutschrank (Binder) ohne zusätzliche CO₂-Begasung kultiviert. Pro Zellkulturflasche liegt das Kulturvolumen zwischen 25ml und 30ml. Die Zelldichte sollte immer zwischen 2·10⁶ und 6·10⁶ Zellen/ml liegen und nie höher als 20·10⁶ Zellen/ml sein. Daher müssen die Zellen alle drei bis vier Tage auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt werden. Hierzu wird zunächst der Teil der S2-Zellen, der sich adherent am Boden der Zellkulturflasche befindet, durch leichtes Schlagen an den Flaschenrand abgelöst. Die Zellsuspension wird nun auf mehrere neue Flaschen verteilt und mit frischem Medium im Verhältnis von 1:4 bis 1:6 aufgefüllt.

2.4.9.2 Kultivierung als Suspensions-Kultur

Zur Expression von rekombinanten Proteinen werden die stabil transfizierten S2-Zellen als Suspensionskultur in 2,5l Rollerflaschen (Greiner) bei 27°C ohne weitere Begasung kultiviert. Dazu werden die Zellen von ca. 15 dicht bewachsenen 175cm² Zellkulturflaschen abgeschlagen und die gesamte Zellsuspension wird in eine 2,5l Rollerflasche überführt. Die Zelldichte dieser Suspension wird bestimmt (siehe 2.4.2) und es wird soviel frisches S2-Medium zugegeben, dass eine Zelldichte von 2,5·10⁶ Zellen/ml erreicht wird. Die Zellen werden so auf weitere Rollerflaschen verteilt, dass das Volumen pro Flasche 350ml nicht überschreitet. Nach fünftägiger Inkubation bei 27°C wird erneut die Zelldichte der Kulturen bestimmt und durch Verdünnung mit frischem S2-Medium auf 4·10⁶ Zellen/ml eingestellt. Wieder sollten sich nicht mehr als 350ml Zellsuspension in jeder Rollerflasche befinden. Die Zellen können jetzt zur Proteinexpression verwendet werden.

2.4.10 Transiente Transfektion von S2-Zellen

2xHBS: 50mM Hepes, pH7,1, 1,5mM Na₂HPO₄, 280mM NaCl

Lyse-Puffer: 50mM Tris-HCl, pH7,8, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40

Zunächst werden S2-Zellen zur Transfektion vorbereitet, indem $3 \cdot 10^6$ Zellen in 3ml S2-Medium in einer 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät werden. Diese Zellen werden über Nacht bei 27°C inkubiert, bis sie eine Dichte von $2 \cdot 10^6$ bis $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml erreicht haben. Dann wird der Transfektionsansatz wie folgt pipettiert:

2M CaCl ₂ :	36µl
rekombinater Expressionsvektor:	9,5µg
steriles ddH ₂ O:	ad 300µl

Dieser Mix wird nun langsam, unter ständigem Schütteln zu 300µl 2xHBS gegeben. Die entstandene Lösung wird vor der eigentlichen Transfektion für 30 - 40min bei RT inkubiert. Nach dieser Zeit wird der Transfektionsmix noch einmal gut gemischt und dann tropfenweise zu den vorbereiteten S2-Zellen gegeben, die nach jedem Tropfen vorsichtig geschwenkt werden. Die Zellkulturplatte wird dann für 16 - 24h bei 27°C inkubiert. Dann wird die Transfektionslösung von den Zellen entfernt und diese werden zweimal mit S2-Medium gewaschen und in frischem Medium in die alte Zellkulturplatte gegeben. Hierzu werden die adherenten Zellen mit einer Pipette vom Boden gespült und in ein 15ml Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation für 3min bei 2500rpm (Eppendorf Centrifuge 5702) wird der Überstand abgegossen und die Zellen werden in frischem S2-Medium resuspendiert. Dieser Waschschrift wird zweimal wiederholt. Nach erneuter Inkubation bei 27°C ÜN wird die Expression des rekombinanten Proteins durch die Zugabe von CuSO₄ (Endkonzentration im Medium: 500µM) oder Cadmiumacetat (Endkonzentration im Medium: 2µM) induziert. 48 Stunden nach Induktion werden die transfizierten S2-Zellen auf die Expression des rekombinanten Proteins getestet. Dazu werden die Zellen mit einer Pipette von Boden der Zellkulturplatte abgespült und 1,5l der Zellsuspension werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen werden durch Zentrifugation für 3min bei 3300rpm (Eppendorf Centrifuge 5415 D) abgetrennt und der Überstand wird abgenommen und in eine weiteres Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Die pelletierten Zellen werden mit PBS gewaschen und anschließend in 50µl Lyse-Puffer resuspendiert und für 10min bei 37°C inkubiert. Nach der Lyse werden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (3min; 13000rpm; Eppendorf Centrifuge 5415 D) abgetrennt und der Überstand wird abgenommen. Der Überstand der Zellyse und das zuvor schon abgenommene Medium werden nun mit Hilfe eines Western Blots (vgl. 2.7.4) auf das Vorhandensein des rekombinanten Proteins hin analysiert.

2.4.11 Stabile Transfektion von S2-Zellen

Die Vorbereitung der S2-Zellen zur stabilen Transfektion erfolgt wie schon unter 2.4.9 beschrieben. Der Transfektionsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

2M CaCl ₂ :	36µl
rekombinanter Expressionsvektor:	9,5µg
Selektionsvektor pCoBlast:	0,5µg
steriles ddH ₂ O:	ad 300µl

Die weitere Transfektion folgt dem gleichen Protokoll wie bei der zuvor beschriebenen transienten Transfektion bis zum Entfernen der Transfektionslösung und dem Waschen der Zellen. Danach werden die Zellen für zwei weitere Tage bei 27°C inkubiert. Dann beginnt die Selektion von transfizierten Zellen. Die S2-Zellen werden durch Zentrifugation abgetrennt und in frischem S2-Selektionsmedium resuspendiert. Das S2-Selektionsmedium wird alle vier bis fünf Tage erneuert, bis die resistenten Zellen beginnen, sich deutlich zu vermehren, was nach etwa zwei Wochen der Fall ist. Dabei wird dasselbe Zellkulturgefäß weiter verwendet. Die erhaltenen, stabil transfizierten Zellen werden nun in S2-Selektionsmedium vermehrt und können in einer 6-Well-Platte durch Induktion mit CuSO₄ oder Cadmiumacetat wie im vorangegangenen Kapitel erläutert auf die Expression des rekombinanten Proteins hin getestet werden. Zum Erhalt der stabilen Zelllinie darf zu ihrer Kultivierung nur das S2-Selektionsmedium verwendet werden.

2.4.12 Expression rekombinanter Proteine in S2-Zellen

Zur Expression eines rekombinanten Proteins wird eine Suspensionkultur der stabil transfizierten Zelllinie mit einer Zelldichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml benötigt. Durch Zugabe von Cadmiumacetat (2µM im Kulturvolumen) wird die Expression des rekombinanten Proteins induziert. Nach vier- bis fünftägiger Inkubation bei 27°C werden die Zellen durch Zentrifugation bei 4°C (20min; 6000rpm; Heareus Suprafuge 22, HFA12.500 Rotor) abgetrennt und der Kulturüberstand mit dem sezernierten, rekombinanten Protein wird zweimal ÜN gegen das zehnfache Volumen PBS dialysiert (VISKING Typ 36/32, Roth). Vor der weiteren chromatographischen Reinigung muss der Zellüberstand noch filtriert (75mm Bottle Top-Filter, Nalgene) werden, um unlösliche Bestandteile zu entfernen.

2.5 Chromatographische Trennmethode

2.5.1 Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie

Auftrags-Puffer: 50mM Na₂PO₄, pH8,3, 0,5M NaCl, 10mM Imidazol
 Elutions-Puffer: 50mM Na₂PO₄, pH8,3, 0,5M NaCl, 300mM Imidazol
 Glassäule: Ø 2,5cm, l = 10cm, Econo Column™ Glassäule (BioRad)

Das Prinzip der Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie beruht auf der spezifischen Bindung von Aminosäuren an Metallionen, die an einer Säulenmatrix immobilisiert sind. Im Falle der hier verwendeten Ni-NTA-Agarose (Qiagen) interagieren die Nickelionen mit den Histidinen des durch rekombinante Expression angehängten 6xHis- bzw. 10xHis-Tags. Durch die Chromatographie an Ni-NTA-Agarose lassen sich somit die in *Sf9*-Zellen exprimierten und ins Zellmedium sezernierten, rekombinanten Proteine von den anderen im Medium befindlichen Proteinen abtrennen. Hierzu werden zu dem gegen Auftrags-Puffer dialysierten Zellüberstand 3ml/l Ni-NTA-Agarose, die zuvor mit Auftrags-Puffer equilibriert wurde, gegeben. Das Gemisch wird nun für mindestens zwei Stunden bei 4°C langsam gerührt. Dann wird der Zellüberstand mit der darin befindlichen Ni-NTA-Agarose nach und nach in eine Glassäule gegeben. Hierbei läuft die Proteinlösung durch und die Ni-NTA-Agarose mit gebundenem rekombinanten Protein bleibt in der Säule zurück. Die Agarose wird dann zweimal mit jeweils 10-fachem Säulenvolumen Auftrags-Puffer gespült, um Proteine, die unspezifisch an die Ni-NTA-Agarose-Matrix binden, auszuwaschen. Abschließend erfolgt die Elution in 5 - 7ml Fraktionen des Elutionspuffers. Der Proteingehalt und der Reinigungsgrad des Säulendurchlaufs, der beiden Waschfraktionen und der Elutionsfraktionen werden durch SDS-PAGE (siehe 2.7.1) analysiert.

Die gebrauchte Ni-NTA-Agarose lässt sich in 20% EtOH lagern und kann nach den Angaben des Herstellers regeneriert und wieder verwendet werden.

2.5.2 Ionenaustausch-Chromatographie

Die chromatographische Auftrennung von Proteinen mit Hilfe eines Salzgradienten bei der Ionenaustausch-Chromatographie beruht auf der Wechselwirkung der Proteine mit dem Säulenmaterial entsprechend ihrer Oberflächenladung, die vom vorliegenden pH-Wert in der Proteinlösung abhängt.

Binde-Puffer: 25 mM Ammonium-Acetat, pH5,0
 Elutionspuffer: 25 mM Ammonium-Acetat, pH5,0, 2M NaCl
 Säule: 1ml HiTrap SP-Sepharose FF (GE Healthcare)
 Chromatographie-System: Äkta Prime (GE Healthcare)

Zur ersten Aufreinigung von IL-4-Varianten nach deren Rückfaltung wird eine Kationenaustausch-Chromatographie an SP-Sepharose FF-Material durchgeführt. Hierzu wird die Rückfaltungslösung durch tropfenweise Zugabe von 4M Ammonium-Acetat-Lösung, auf einen pH-Wert von 5,0 gebracht. Nachdem unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation mit 18000rpm (30min; Heareus Suprafuge; 22.50 Rotor) entfernt wurden, wird die Rückfaltungslösung mit einer Flussrate von 2ml/min auf die mit Binde-Puffer equilibrierte Säule gepumpt. Die beladene Säule wird dann so lange mit Binde-Puffer gespült, bis die gemessene Absorption bei 280nm wieder stabil auf ihren Ausgangswert zurückgegangen ist. Zur Elution wird die Flussrate auf 1ml/min verringert. Es wird ein linearer Gradient von 0% bis 100% Elutionspuffer über ein Laufvolumen von 40ml angewendet. Während der Elution werden Fraktionen mit 1ml Volumen gesammelt. Die Fraktionen, welche eine erhöhte Absorption bei 280nm zeigen, werden mittels SDS-PAGE (siehe 2.7.1) unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert. Fraktionen, die monomeres IL-4 enthalten, werden zur weiteren Aufreinigung vereinigt.

2.5.3 Gelfiltrations-Chromatographie

PBS:	3mM NaH ₂ PO ₄ , 7mM Na ₂ HPO ₄ , pH7,4, 2mM KCl, 120mM NaCl
Tris-Puffer:	10Mm Tris, pH7,4, 150mM NaCl, 3,4mM EDTA
Säule (präparativ):	HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade (Pharmacia)
Säulen (analytisch):	Superdex 75 10/300 GL (Pharmacia); Superose 6 10/300 GL (Pharmacia)
Chromatographie-System:	BioLogic Duoflow (BioRad)

Durch die Gelfiltrations- oder auch Größenausschluss-Chromatographie werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht bzw. nach der Molekülgröße aufgetrennt. Dabei wandern kleinere Teilchen langsamer durch die Säulenmatrix als größere Moleküle.

Zur Aufreinigung von IL-13R α 1-Varianten wird PBS mit einer Flussrate von 1ml/min als Laufpuffer verwendet. Bevor die Probe mit einem Volumen von 1ml über eine Injektionsschleife auf die Säule geladen wird, wurde diese zuvor bis zum Erreichen einer stabilen Basislinie mit PBS equilibriert. Während des Laufes werden Fraktionen zu 1ml gesammelt. Die Peakfraktionen analysiert man mittels SDS-PAGE (siehe 2.6.1) auf das gewünschte Protein und dessen Reinheitsgrad.

Zur Komplexpräparation aus IL-13 und IL-13R α 2 bzw. IL-13R α 1 sowie für analytische Gelfiltrationsläufe wird eine Superdex 75- bzw. eine Superose 6-Säule verwendet. Als Laufpuffer kommt Tris-Puffer mit einer Flussrate von 0,5ml/min zum Einsatz. Die Proben werden mit Hilfe einer 50 μ l bzw. 100 μ l Injektionsschleife auf die zuvor equilibrierte Säule aufgetragen. Während des Laufes werden Fraktionen der Größe 0,5ml gesammelt. Bei der Präparation des IL-13/IL-13R α 2-Komplexes werden Proben der Fraktionen mit erhöhter UV-Absorption durch SDS-PAGE (vgl. 2.7.1) analysiert. Die Fraktionen, die den Komplex enthalten, werden abschließend vereinigt.

2.5.4 Kalibrierung von Gelfiltrationssäulen

Tris-Puffer:	10Mm Tris, pH7,4, 150mM NaCl, 3,4mM EDTA
Standartproteine:	Gel Filtration Calibration Kit – Low Molecular Weight (GE Healthcare)
Säulen (analytisch):	Superdex 75 10/300 GL (Pharmacia); Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare)
Chromatographie-System:	BioLogic Duoflow (BioRad)

Zur Abschätzung der molekularen Massen der aufgereinigten Proteine und zur Abschätzung der stöchiometrischen Zusammensetzung der präparierten Ligand-Rezeptor-Komplexe werden Kalibrierkurven der verwendeten Gelfiltrationssäulen erstellt. Dazu werden folgende Proteine mit bekanntem Molekulargewicht über die zu kalibrierende Säule mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5ml/min und Tris-Puffer als Laufpuffer aufgetrennt: Aprotinin (6,5kDa; 3mg/ml), Ribonuklease A (13,7kDa; 3mg/ml), Carbonic Anhydrase (29kDa; 3mg/ml), Ovalbumin (43kDa; 4mg/ml) und Conalbumin (75kDa; 3mg/ml). Die Berechnung der relativen Elutionsvolumina K_{av} erfolgt anschließend nach folgender Formel:

$$K_{av} = (V_{el} - V_A) / (V_G - V_A)$$

Dabei stellen V_G das Ausschlussvolumen und V_G das geometrische Gesamtvolumen der verwendeten Säule dar. V_{el} ist das Elutionsvolumen des betreffenden Proteins, das anhand der maximalen Absorption bei einer Wellenlänge von 280nm bestimmt wird. Da ein linearer Zusammenhang zwischen den relativen Elutionsvolumen K_{av} und dem dekadischen Logarithmus der molekularen Massen besteht [148], wird für die oben aufgeführten Standardproteine eine lineare Regression der entsprechenden Werte erstellt. Das apparente Molekulargewicht weiterer Proteine bzw. Proteinkomplexe kann anhand der ermittelten K_{av} -Werte und der aus der Kalibrierung erhaltenen linearen Regression bestimmt werden.

2.5.5 Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

TFA-Lösung:	0,1% (v/v) TFA in ddH ₂ O
Elutionslösung:	Acetonitril
Säule (analytisch):	250mm x 4,6mm, VYDAC-214TP, C4; 10µm Porengrösse (MZ Analystechnik)
Säule (präparativ):	250mm x 8mm, VYDAC-214TP, C4; 10µm Porengrösse (MZ Analystechnik)
Chromatographie-System:	BioLogic DuoFlow (BioRad)

Das Prinzip der Auftrennung von Proteingemischen durch die sog. „reversed phase“-HPLC (RP-HPLC) beruht auf unterschiedlich starken hydrophoben Wechselwirkungen verschiedener Proteine mit der C4-Matrix der Säule. Proteine mit nur schwacher Bindung an die Säulenmatrix werden schon bei einer geringeren Acetonitril-Konzentration eluiert, als Proteine mit starken hydrophoben Wechselwirkungen. Aufgrund der hohen Trennschärfe eignet sich die RP-HPLC mit einer analytischen Säule sehr gut zur Untersuchung der Reinheit einer Proteinprobe. Die hier verwendete analytische Säule besitzt eine Bindekapazität von ca. 2mg Protein.

Es lassen sich jedoch auch größere Proteinmengen (z.B. von IL-4 oder IL-13) mittels RP-HPLC aufreinigen. Die verwendete präparative Säule hat eine Bindekapazität von bis zu 40mg Protein.

Die Proteinlösungen werden vor dem Laden auf die Säule mit 0,1% (v/v) TFA versetzt. Das Auftragen der Probe auf die mit TFA-Lösung equilibrierte Säule erfolgt mit einer Flussrate von 0,5ml/min (analytisch) bzw. 1ml/min (präparativ) über eine Injektionsschleife. Anschließend wird die Säule so lange mit TFA-Lösung gespült, bis die UV-Absorption wieder stabil auf dem Niveau der Basislinie verläuft. Die Elution erfolgt durch einen linearen Gradienten von 0% bis 100% Acetonitril über ein Volumen von 30ml (analytisch) bzw. 60ml (präparativ). Während des Gradienten werden Fraktionen von 1ml Volumen gesammelt. Fraktionen, die nach dem Chromatogramm Proteine enthalten, werden mittels SDS-PAGE (vgl. 2.7.1) analysiert. Dazu werden pro Fraktion 20µl Probe in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in der SpeedVac (Bachofer) getrocknet. Der Rückstand wird in 10µl 2xSDS-Probenpuffer gelöst und zur Analyse auf ein Proteingel aufgetragen. Die Fraktionen, die das aufzureinigende Protein in hoher Reinheit enthalten, werden vereinigt und zur weiteren Aufbewahrung lyophilisiert (Christ ALPHA 1-4).

2.5.6 Chromatographie an einer IL-13-Affinitätssäule

Um die korrekt gefaltete und bindeaktive extrazelluläre Domäne der IL-13Ra2-Kette aus dem Zellüberstand von S2-Insektenzellen chromatographisch aufzureinigen, nutzt man deren Bindung an den Liganden IL-13. Hierzu wird IL-13 an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt.

2.5.6.1 Kopplung von IL-13 an CNBr-aktivierte Sepharose

Kopplungs-Puffer:	100mM NaHCO ₃ , pH8,3, 500mM NaCl
Wasch-Puffer:	100mM Tris, pH8,0, 500mM NaCl
Lagerungs-Puffer:	PBS + 5mM Natriumazid
Glassäule:	Ø 1cm, l = 10cm, Econo Column™ Glassäule (BioRad)

Zunächst werden 2g der trockenen CNBr-aktivierten Sepharose (Pharmacia) in 1mM HCl gelöst und für 15min gequollen. Die ca. 6ml des gequollenen Materials werden zunächst mit 400ml 1mM HCl und anschließend mit 150ml Kopplungs-Puffer über einer G3-Glasfritte gewaschen. Dann wird die Sepharose in 25ml Kopplungs-Puffer aufgenommen und in einem 50ml Röhrchen über Nacht bei 4°C auf einem Roller teilweise inaktiviert. Dann werden tropfenweise 10 – 15mg IL-13 in 2ml ddH₂O zum Gel gegeben und der Kopplungsansatz weiterhin bei 4°C auf dem Roller inkubiert. Der Kopplungsverlauf wird stündlich durch die IL-13-Konzentrationsbestimmung im Überstand verfolgt. Nimmt die Konzentration nicht mehr weiter ab, wird das Gelmaterial durch Zentrifugation für 5min bei 1000rpm (Eppendorf Centrifuge 5702) sedimentiert und in 20ml Wasch-Puffer aufgenommen. Die Sepharose wird noch zweimal mit jeweils 20ml Wasch-Puffer gewaschen und dann erneut über Nacht in 25ml Wasch-Puffer bei 4°C auf dem Roller inkubiert. Zum Schluss wird das Säulenmaterial in eine Glassäule gefüllt und mit Lagerungs-Puffer equilibriert.

2.5.6.2 Chromatographie an IL-13-Affinitäts-Sepharose

Auftragspuffer:	PBS
Elutionspuffer:	4M MgCl ₂
Peristaltikpumpe:	2115 Multiperpex (LKB Bromma)
Fraktionssammler:	LKB Frac 100 (Pharmacia)

Vor dem Auftragen des dialysierten S2-Zellkultur-Überstandes auf die vorbereitete IL-13-Affinitätssäule (siehe 2.5.5.1) wird diese mit Auftragspuffer equilibriert. Mit Hilfe der Peristaltikpumpe wird der Zellüberstand mit einer Flussrate von 1,5 ml/min auf die Säule gepumpt. Der Durchlauf wird gesammelt. Nach dem Auftragen wird die Säule mit 150ml Auftragspuffer gespült, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Danach beginnt die Elution mit 4M MgCl₂ bei einer Flussrate von 0,8ml/min. Während der Elution werden Fraktionen zu 2 ml gesammelt und photometrisch auf ihren Proteingehalt analysiert. Die Protein enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und gegen den später benötigten Puffer dialysiert.

Es ist zu beachten, dass die IL-13-Affinitätssäule eine begrenzte Bindekapazität von etwa 2mg IL-13R α 2 hat. Daher sollte der Durchlauf der ersten Affinitätschromatographie erneut auf die Säule aufgetragen werden, um evtl. noch weiteren Rezeptor isolieren zu können.

2.6 Mutagenese von IL-4, IL-13 und IL-13R α 1

Mutationen wurden nach der QuikChange (Stratagene) Methode in die proteincodierenden Bereiche von IL-4, IL-13 und IL-13R α 1 im jeweiligen Expressionsplasmid eingefügt. Hierzu benötigt man zwei synthetische Oligonukleotidprimer, welche die gewünschte Mutation enthalten und komplementär zueinander sind. Die Primer lagern sich somit an die gleiche Sequenz auf den komplementären Strängen des Plasmids an. Die beabsichtigte Mutation sollte sich in der Mitte der Oligonukleotide befinden und von 10 bis 15 Basen der korrekten Sequenz auf beiden Seiten flankiert sein. Falls möglich sollten die Primer am 3'-Ende mit einer oder mehreren Guanin- oder Cytosin-Basen enden. Mit diesen beiden Primern und dem Plasmid als Ausgangs-DNA wird nun eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit folgendem Ansatz (Tabelle 2.3) und Temperaturprogramm (Tabelle 2.4) durchgeführt:

Ausgangs-DNA:	40ng
Primer 1 (10 pmol/ μ l):	2 μ l
Primer 2 (10 pmol/ μ l):	2 μ l
dNTPs (10mM):	5 μ l
10x <i>Pfu</i> -Puffer:	5 μ l
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase:	1 μ l
ddH ₂ O:	ad 50 μ l

Tabelle 2.3: PCR-Ansatz zur Mutagenese mittels QuikChange Methode

Erste Denaturierung	95 °C	3min	} 24x
Zugabe der <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase			
Denaturierung	95 °C	1min	
Annealing	52 °C	1min	
Extension	72 °C	11min	
Abschließende Extension	72 °C	11min	
	4°C	∞ min	

Tabelle 2.4: PCR-Temperaturprogramm zur Mutagenese mittels QuikChange-Methode

Die Verlängerung der Primer durch die *Pfu*-DNA-Polymerase führt zu zirkulären, aber gebrochenen DNA-Strängen. Nach der durchgeführten PCR-Reaktion wird der Reaktionsansatz mit 1 μ l *DpnI*-Endonuklease versetzt und für 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die *DpnI*-Endonuklease ist spezifisch für methylierte DNA und verdaut somit die Ausgangs-DNA im PCR-Ansatz, nicht jedoch die neu synthetisierte DNA, welche die Mutation enthält. Nach dem Restriktionsverdau werden 3 μ l des Mutagenese-Ansatzes in chemisch-kompetente NovaBlue-*E.coli*-Zellen transformiert. In den transformierten NovaBlue-*E.coli*-Zellen werden die gebrochenen DNA-Einzelstränge ligiert, so dass ein intaktes Plasmid entsteht, das von den Bakterien repliziert werden kann. Von mehreren erhaltenen

Transformanten wird dann die Plasmid-DNA isoliert und durch DNA-Sequenzierung auf die gewünschte Mutation hin untersucht. Das so erhaltene Plasmid kann nun zur Gewinnung der Proteinvariante eingesetzt werden.

2.7 Proteinchemische Methoden

2.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [149]

Rotiphorese Gel 40 (29:1):	40% Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 29:1
4x Upper Tris:	0,5M Tris pH6,8; 0,4% SDS
4x Lower Tris:	1,5M Tris pH8,8; 0,4% SDS
SDS-Laufpuffer:	25mM Tris pH8,6; 0,19M Glycin, 0,15% SDS
2x SDS-Probenpuffer:	63mM Tris pH8,6; 2% SDS, 20% Glycerin (87%), 2% Bromphenolblau (BPB), für reduzierende Bedingungen wird 2% β -Mercaptoethanol (β -ME) zugesetzt.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird mit Hilfe des „Mini-PROTEAN Electrophoresis Systems“ der Firma BioRad Laboratories durchgeführt. Das Gel wird entsprechend der in Tabelle 2.5 aufgeführten Zusammensetzung hergestellt. Das Rezept ist ausreichend für zwei 12-prozentige Gele der Dicke 0,75mm. Zunächst wird das Trenngel zwischen die gereinigten und eingespannten Glasplatten gegossen und zur Polymerisation mit Wasser überschichtet. Danach wird das Sammelgel darauf gegeben und der Kamm für die Probenaschen hineingesteckt. Nach vollständiger Polymerisation wird das Gel in die Gelkammer eingesetzt und diese mit SDS-Laufpuffer gefüllt.

	Sammelgel	Trenngel
Rotiphorese Gel 40 (29:1)	0,5ml	3,0ml
4x Upper Tris:	1,25ml	
4x Lower Tris		2,5ml
ddH ₂ O	3,2ml	2,5ml
Glycerin (87%)		2,0ml
TEMED	18 μ l	20 μ l
APS 40% (w/v)	18 μ l	20 μ l

Tabelle 2.5: Herstellung von Sammel- und Trenngel für die SDS-PAGE

Die Proteinproben werden 1:1 mit 2x SDS-Probenpuffer gemischt und bei 95°C im Heizblock für 5min denaturiert. Die maximale Auftragsmenge pro Probenasche ist 20 μ l. Nach der Fokussierung der Proteine im Sammelgel erfolgt die anschließende Auftrennung im Trenngel bei 330V. Die Elektrophorese wird beendet, wenn die sichtbare BPB-Front das untere Ende des Gels erreicht.

2.7.2 Proteingrößenstandard für SDS-PAGE

Die Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen erfolgt durch den Vergleich mit einem Proteingemisch mit bekannter Zusammensetzung und bekannter Konzentration der einzelnen Bestandteile. Die Komponenten und deren Konzentration sind in der Tabelle 2.6 aufgeführt. Je nach angewandter Färbemethode werden 0,5 – 5 μl des Größenstandards pro Gel verwendet.

Protein	M_w [kDa]	Konzentration [$\mu\text{g}/5\mu\text{l}$]
Phosphorylase b	97,0	0,67
Albumin	66,0	0,83
Ovalbumin	45,0	1,47
Carbon Anhydrase	30,0	0,83
Trypsin Inhibitor	20,1	0,80
Lactalbumin	14,4	1,16

Tabelle 2.6: Proteinmolekulargewichtsstandard für SDS-PAGE

2.7.3 Färbung von Proteingelen

2.7.3.1 Coomassie-Färbung

Färber 10g Coomassie Brilliant Blue R250, 1,6l Methanol, 0,4l Eisessig, 2l H_2O

Entfärber 0,1l Eisessig, 0,1l 2-Propanol, 0,8l H_2O

Nach Ende der Elektrophorese wird das Gel für 20 min in Färber gelegt. Ist das Gel vollständig blau gefärbt, wird es in Entfärber gegeben. Dieser wird nach Bedarf mehrfach erneuert, bis das Gel soweit entfärbt ist, dass die Proteinbanden deutlich zu sehen sind. Die untere Nachweisgrenze der Coomassie-Färbung liegt bei 1,0-0,1 μg Protein pro Bande.

2.7.3.2 Silber-Färbung

Lösung 1: 60ml 50% (v/v) Aceton in H_2O , 1,5ml 50% (w/v) Trichloressigsäure (TCA) in H_2O ,
25 μl 37% Formaldehyd

Lösung 2: 60ml 50% (v/v) Aceton in H_2O

Lösung 3: 0,1ml 10%(w/v) Natriumthiosulfat-pentahydrat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) in 60ml H_2O

Lösung 4: 0,8ml 20%(w/v) Silbernitrat (AgNO_3), 0,6ml 37% Formaldehyd, in 60ml H_2O

Lösung 5: 1,2g Natriumcarbonat (Na_2CO_3), 25 μl 37% Formaldehyd, 25 μl 10%(w/v)
 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, in 60ml H_2O

Das Proteingel wird nach der Elektrophorese mit Handschuhen aus der Elektrophoreseapparatur entnommen und für 5min in eine Glasschale mit Lösung 1 gelegt. Danach wird das Gel dreimal kurz mit Wasser gespült und anschließend für 5min in Wasser belassen. Nach erneutem Spülen mit Wasser wird das Gel 5min in Lösung 2 inkubiert. Nach 1 min in Lösung 3 wird das Gel wieder mit Wasser gespült und verbleibt für 8min in Lösung 4. Anschließend erfolgt nach kurzem Spülen mit Wasser der eigentlich Färbeschritt in Lösung 5. Unter leichtem Schütteln der Färbeschale wird die Intensitätszunahme der angefärbten Proteinbanden beobachtet. Haben die Proteinbanden eine ausreichende Intensität erreicht, wird die Entwicklung durch Zugabe von 250ml 1%-iger Essigsäure abgestoppt. Durch die Silber-Färbung können geringere Proteinmengen im Vergleich zur Coomassie-Färbung nachgewiesen werden. Die untere Nachweisgrenze ist proteinabhängig und liegt in der Regel zwischen 0,1ng und 1,0ng.

2.7.4 Western Blot

Nitrocellulose-Membran:	Protran, 0,45µm (Whatman)
Blotlaufpuffer:	24mM Tris, 200mM Glycin in 20% (v/v) Methanol
TBS:	10mM Tris, pH7,9, 150mM NaCl
Blockpuffer:	2% (w/v) Magermilchpulver in TBS
Luminollösung:	22,5mg Luminol in 0,5ml DMSO lösen und mit 100mM Tris, pH8,5 auf 50ml auffüllen; Lösung bei 4°C im Dunkeln lagern
Enhancerlösung:	90mM p-Cumarsäure in DMSO; Lösung bei 4°C lagern
Inkubationslösung A:	5ml Luminollösung, 22µl Enhancerlösung
Inkubationslösung B:	5ml 100mM Tris, pH8,5, 3µl H ₂ O ₂ (30%)
Primärer Antikörper:	200µg/ml HisTag Monoclonal Antibody (Novagen)
Sekundärer Antikörper:	Anti-Mouse IgG (H&L) HRP-linked Antibody (Cell Signaling); Konzentration wie vom Hersteller angegeben

Beim Western Blot werden durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteingemische vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und dort durch die Interaktion mit spezifischen Antikörpern detektiert. Hier wurde als spezifischer, primärer Antikörper ein Antikörper gegen den rekombinant an die Proteine angefügten His-Tag verwendet. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran erfolgt mit Hilfe einer MiniV 8•10 Blot-Kammer (LifeTechnologies), die mit Blotlaufpuffer gefüllt ist, für 30min bei 170V. Danach werden noch freie Proteinbindungsstellen auf der Membran für 10min in einer Schüttelkammer mit 10ml Blockpuffer abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit jeweils 7ml TBS für 5min auf dem Schüttler erfolgt die Inkubation mit dem primären Antikörper. Der Antikörper wird hierzu im Volumenverhältnis 1:2000 in Blockpuffer verdünnt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgt entweder für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Die Membran wird dann erneut dreimal für je 5min mit 7ml TBS

gewaschen, bevor die Inkubation mit dem sekundären Antikörper folgt. Der sekundäre Antikörper wird hierzu im Volumenverhältnis 1:7000 in 7ml Blockpuffer verdünnt. Die Inkubation erfolgt dann für 1h bei RT auf dem Schüttler. Anschließend ist die Membran wie zuvor dreimal mit TBS zu waschen. Zur Detektion von immunoreaktiven Proteinbanden werden in der Dunkelkammer 5ml der Inkubationslösung A und 5ml der Inkubationslösung B auf die Membran gegeben und gemischt. Nach 5min lässt man die Membran kurz abtropfen und legt einen Röntgenfilm (Konica A3) in einer Autoradiographiemappe auf die Membran. Durch die Meerettichperoxidase (HRP)/H₂O₂-katalysierte Oxidation des Luminols kommt es zum Auftreten von Chemilumineszenz, die den Film an den entsprechenden Stellen schwärzt. Die benötigte Belichtungszeit variiert in Abhängigkeit von der Menge an detektiertem Protein, sollte aber in der Regel zwischen drei und zehn Minuten liegen. Nach der Belichtung wird der Film in der Entwicklermaschine entwickelt. Bei Verwendung dieses Verfahrens liegt die untere Nachweisgrenze für Proteine mit His-Tag bei 2ng pro Bande.

2.7.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen auf photometrische Weise wird ein UV-Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich von 250nm bis 320nm (Evolution 300 UV-Visible Spectrophotometer, Thermo) aufgenommen. Die Proteinkonzentration c [mol/l] kann nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz näherungsweise wie folgt berechnet werden:

$$c = A_{280}/(\epsilon_{280} \cdot d)$$

Dabei gibt A_{280} die Absorption bei 280nm, ϵ_{280} den Extinktionskoeffizienten des Proteins bei 280nm [$M^{-1}cm^{-1}$] und d die konstante Schichtdicke der verwendeten Küvette von 1cm an.

Der Extinktionskoeffizient ϵ_{280} von Proteinen ist abhängig von der Anzahl der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein, da diese als Chromophor wirkenden [150]. Die molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} und die molaren Massen M_w aller in der Arbeit verwendeten Proteine wurden mit Hilfe des ExpASy-ProtParamTools (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) berechnet und sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Protein	Molare Masse M [g/mol]	Extinktionskoeffizient ϵ_{280} [M ⁻¹ cm ⁻¹]
6xHis-IL-13	14639	7210
IL-13	12757	7210
IL-13R α 1	38381	65150
IL-13R α 1-D12	24460	42440
IL-13R α 1-CHR	28212	46910
IL-4	15095	8610
IL-4R α	23905	66930

Tabelle 2.7: Molare Massen und Extinktionskoeffizienten

2.7.6 Biotinylierung von Proteinen

Biotin-Lösung: 2mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) in H₂O; nur frisch zu verwenden!

PBS: 3mM NaH₂PO₄, 7mM Na₂HPO₄, pH7,4, 2mM KCl, 120mM NaCl

Zur Biotinylierung liegen die aufgereinigten Proteine in einer Konzentration von 0,5-1,0mg/ml in PBS gelöst vor. Mindestens 100 μ l dieser Proteinlösung wird Biotin-Lösung in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:2 zwischen Protein und Biotin zugegeben. Der Biotinylierungsansatz wird nun für 2h auf Eis inkubiert. Nach dieser Zeit wird freies Biotin durch dreimaliges Verdünnen auf 4ml mit PBS und anschließendem Konzentrieren auf 50 μ l durch Ultrafiltration (Amicon Ultra-4, 5000MWCO, Millipore) abgetrennt. Abschließend wird die Konzentration des biotinylierten Proteins photometrisch bestimmt und die Lösung in Aliquots zu 10 μ l bei -20°C gelagert.

2.8 Zytokinaktivitätsassay in TF1-Zellen [151]

Thymidin-Mix: 62,5 μ l [³H-Methyl]-Thymidin (1 μ Ci/ μ l), 10 μ l Thymidin (15mM), 2,5ml RPMI 1640-Medium; Menge ist ausreichend für zwei 96-Well-Platten

TF1-Zellen werden in 75cm² Zellkulturflaschen (Greiner) bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% im Brutschrank in Suspension kultiviert. Zum Wachstum benötigen sie TF1-Kulturmedium. Unter diesen Bedingungen haben die TF1-Zellen eine Verdopplungszeit von 20h bis 24h. Ist kein GM-CSF im Medium vorhanden, hängt die Vermehrung der TF1-Zellen von der Konzentration der Faktoren IL-4 bzw. IL-13 ab. Die Proliferation der TF1-Zellen kann über den Einbau von ³H-Thymidin in die DNS sich teilender Zellen verfolgt werden.

Zur Vorbereitung werden die kultivierten TF1-Zellen am Tag vor dem Beginn des Aktivitätstests in Verhältnis 1:1 mit frischem TF1-Kulturmedium verdünnt. Vor dem Test wird die Zellzahl der TF1-Kultur bestimmt und pro später benötigten 96-Well-Platte werden 2 Mio Zellen zweimal mit jeweils

10ml RPMI 1640-Medium gewaschen. Dann werden die Zellen in 10 ml RPMI 1640-Medium resuspendiert und in einer 75cm² Zellkulturflasche für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit werden zum Test der biologischen Aktivität von rekombinant hergestelltem IL-4 bzw. IL-13 log3-Verdünnungen in 100µl RPMI 1640-Medium des jeweiligen Cytokins in einer 96-Well-Platte vorgelegt. Als Kontrolle werden in jeweils vier Wells 100 µl RPMI 1640-Medium ohne Cytokin und 100µl TF1-Kulturmedium gegeben. Zu diesen Proteinlösungen gibt man nach der vierstündigen Inkubation jeweils 100µl der TF1-Zellsuspension. Das entspricht 2·10⁴ Zellen pro Well. Die Platten werden für 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach den ersten 48 Stunden setzt man pro Well 10µl frischen Thymidin-Mix zu. Nach den drei Tagen werden die Zellen mit einem Zellerntegerät (Scatron 7020 Semiautomatic Cell Harvester) auf Filtermatten geerntet. Nach dem Trocknen für eine Stunde bei 50°C werden die Matten in einem β-Zerfall-Zähler (Raytest RITA-3200) analysiert. Der EC₅₀-Wert wird durch die Cytokin-Konzentration gegeben, die zu der halbmaximalen Proliferation der TF1-Zellen führt.

2.9 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen durch die Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)-Technik

System: Biosensor BIAcore 2000™ (Pharmacia Biosensor)
Chip: Sensor Chip CM5 (research grade) (Biacore)
HBS150-Puffer: 10mM Hepes, pH7,4, 150mM NaCl, 3,4mM EDTA, 0,005% (v/v) Surfactant P20
HBS300-Puffer: 10mM Hepes, pH7,4, 300mM NaCl, 3,4mM EDTA, 0,005% (v/v) Surfactant P20

Durch die Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR, „surface plasmon resonance“-)Technik lassen sich Protein-Protein-Interaktionen an einer Chipoberfläche in Echtzeit beobachten und anschließend auswerten. Ein an den Sensorchip gekoppeltes Protein wird mit einer Lösung eines interagierenden Proteins perfundiert. Kommt es zu einer Bindung zwischen den beiden Proteinen, so detektiert das BIAcore-Gerät die Massenzunahme an der Chipoberfläche durch die Änderung des Brechungsindex. Die Änderung des Brechungsindex und damit die Massenänderung an der Chipoberfläche im Zeitverlauf wird in einem sog. Sensorgramm dargestellt. Als Einheit für die Massenänderung werden hierbei sog. „resonance units“ (RU) verwendet. Die Änderung um 1RU entspricht dabei etwa einer Massenänderung von 1pg/mm². Ein Messzyklus am BIAcore-Gerät ist in drei typische Phasen unterteilt: Zuerst die Assoziationsphase, anschließend die Plateauphase in der sich Assoziation und Dissoziation im Gleichgewicht befinden (sog. Equilibrium-Bindung) und abschließend die Dissoziationsphase. Aus der Assoziations- und Dissoziationsphase lassen sich mit Hilfe des Computerprogramms BIAevaluation 2.0 (Biacore) die kinetische Assoziationsrate k_{on} und die kinetische Dissoziationsrate k_{off} bestimmen. Aus diesen beiden kinetischen Konstanten lässt sich die apparente Dissoziationskonstante K_D der Interaktion berechnen ($K_D = k_{off}/k_{on}$). Ist es aufgrund eines sehr hohen k_{off} - (>10⁻²s⁻¹) oder k_{on} -Wertes (>5·10⁶M⁻¹s⁻¹) nicht möglich, diese zu bestimmen, so

kann die K_D durch die konzentrationsabhängige Gleichgewichtsbindung (R_{eq}) des Analyten bestimmt werden. Unter der Annahme eines Langmuir'schen Modells einer 1:1 Interaktion kann der K_D -Wert nach der Gleichung $R_{eq} = R_{max} \cdot C / (K_D + C)$ berechnet werden, wobei R_{max} den Messwert bei Erreichen der maximalen Bindekapazität der Chipoberfläche und C die Konzentration des Analyten angibt.

Zum Koppeln von Proteinen an den Sensorchip, werden diese zunächst biotinyliert (siehe 2.7.6). Durch die Interaktion zwischen Biotin und dem mit Streptavidin gesättigten CM5-Sensorchip können die biotinylierten Proteine kontrolliert und in gewünschter Dichte auf der Chipoberfläche immobilisiert werden. Zwischen zwei Messzyklen wird der Chip jeweils durch zweiminütiges Spülen mit 4M $MgCl_2$ -Lösung regeneriert. Alle Messungen werden durch die Subtraktion eines Kontrollsensorgramms, das in der nur mit Streptavidin beschichteten Flusszelle 1 parallel aufgezeichnet wurde, korrigiert, um den Einfluss von unspezifischen Wechselwirkungen zwischen dem Analyten und der Chipmatrix zu minimieren.

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen IL-4- und IL-4R α -Varianten werden jeweils 50 - 120RU der biotinylierten Rezeptorkette auf dem Chip immobilisiert. Die Messungen werden mit einer Fließgeschwindigkeit von 50 μ l/min in HBS150-Puffer bei 25°C durchgeführt.

Für alle anderen Messungen wird HBS300-Puffer mit einer Fließgeschwindigkeit von 10 μ l/min verwendet. Von den biotinylierten IL-13-Rezeptor-Ectodomänen wurden zur Interaktionsanalyse jeweils 500-700RU pro Flusszelle immobilisiert.

2.10 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie stellt eine einfache Methode zur Untersuchung der allgemeinen Konformation, des Faltungszustands und der Stabilität von Proteinen dar. Um die korrekte Faltung und Ausbildung der Sekundärstrukturelemente von Proteinvarianten zu analysieren, werden ihre CD-Spektren mit denen des Wildtypproteins verglichen. Die CD-Spektren werden bei einer Temperatur von 20°C in einer Quartzküvette mit 1mm Schichtdicke aufgenommen. Beim verwendeten Gerät handelt es sich um ein Jasco J-810 Spektropolarimeter mit thermostatierten Küvette. Die Proteine lagen zur Messung in 10mM Hepes, pH7,4, in einer Konzentration von 100 μ g/ml vor. Die Spektren liegen in einem Wellenlängenbereich von 198 – 250nm und sind der Durchschnitt aus fünf nacheinander gemessenen Spektren. Jedes Spektrum wird durch die Subtraktion eines Leerwertspektrums, das durch die Messung des reinen Puffers erhalten wurde, korrigiert.

Um die thermische Stabilität von Proteinen zu untersuchen, wird am CD-Spektrophotometer die charakteristische Schmelzkurve bzw. Entfaltungskurve des Proteins generiert. Dazu wird die Änderung der molaren Elliptizität und damit die Entfaltung des Proteins bei einer Wellenlänge von 225nm bei steigender Temperatur analysiert. Im Temperaturbereich zwischen 20°C und 96°C wird nach jeder Erhöhung der Küvettemperatur um 2°C (Heizrate: 1°C/min) ein CD-Spektrum aufgenommen. Bei der Wellenlänge 225nm ist die größte Änderung der Elliptizität zwischen der Messung bei 20°C und der Messung bei 96°C zu beobachten. Daher werden die gemessenen

Elliptizitätswerte bei 225nm gegen die Temperatur aufgetragen. Dadurch erhält man die Denaturierungskurve des Proteins und kann daraus die spezifisch Denaturierungstemperatur T_{50} ermitteln.

3 Ergebnisse

3.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung von IL-13

3.1.1 Klonierung und Expression von IL-13

Zur Expression von IL-13 in *E.coli* wurde die codierende Sequenz der reifen IL-13-Kette (vgl. Swiss-Prot entry P35225) zwischen die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* des Expressionsvektors pET-28b(+) (Novagen) kloniert. Im erhaltenen Expressionsplasmid pET-28b[IL-13] schließt sich die IL-13 codierende Sequenz an einen Hexahistidin-Tag und eine Thrombinschnittstelle an (vgl. Abb. 3.1). Zur Expression wurde das Plasmid in *E.coli* RosettaTM(DE3)-Zellen transformiert.

Die präparative Expression von IL-13 mit N-terminalem His-Tag (6xHis-IL-13) erfolgte in TB-Medium, wie unter 2.3.3 beschrieben. Pro Liter eingesetztem TB-Medium konnten Bakterienzellen mit einem Feuchtgewicht von ca. 3g geerntet werden. Vor der Expressionsinduktion durch Zugabe von 1mM IPTG und vor dem Ernten der Kulturen wurden jeweils Proben aus den Kolben entnommen und das Lysat der Zellen mittels SDS-PAGE analysiert. Vier Stunden nach Beginn der Induktion wurde eine deutliche Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 15kDa sichtbar (vgl. Abb. 3.1). Diese Bande entspricht dem rekombinant exprimierten Fusionsprotein 6xHis-IL-13.

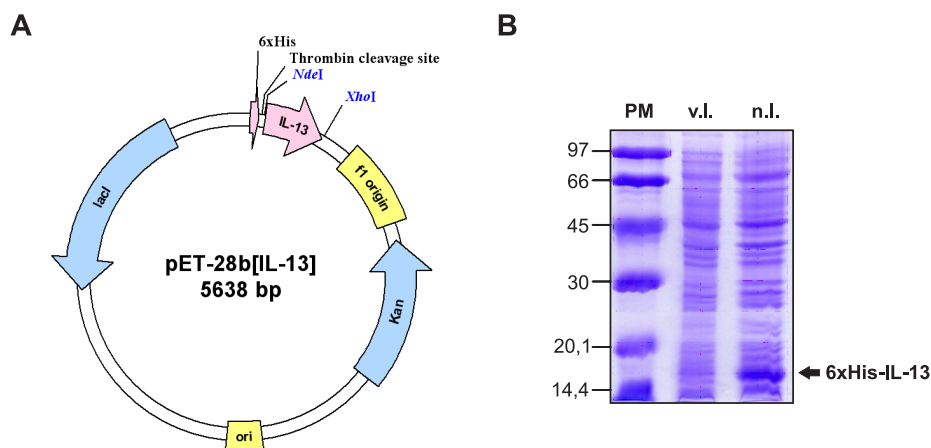


Abbildung 3.1: **A:** Expressionsvektor pET-28b[IL-13]. Zwischen die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* wurde die Sequenz der reifen Kette von IL-13 eingefügt. IL-13 wird als Fusionsprotein mit einem durch Thrombin abspaltbaren, N-terminalen Hexahistidin-Tag exprimiert. **B:** SDS-PAGE zur Kontrolle der 6xHis-IL-13-Induktion: Zellysate vor Induktion (v.l.) und 4h nach Induktion (n.l.).

3.1.2 Zellaufschluss und Isolation der IL-13-Inclusion Bodies

Das überexprimierte 6xHis-IL-13 Protein wird von den *E.coli*-Bakterienzellen in unlöslicher Form als Einschlusskörpern (sog. Inclusion Bodies) im Zytoplasma abgelegt. Zur Isolation und Aufreinigung dieser Einschlusskörper wurden jeweils bis zu 20g Zellen in 100ml STE-Puffer mit 1% (v/v) β -ME gelöst und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurde die Zellsuspension in einer eisgekühlten Rosettenzelle für 5min mit einer Leistung von 300W beschallt. Nach dem Beschallen wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert (25min; 11500rpm; GSA-Rotor; Sorval Zentrifuge), der erhaltene Überstand verworfen und das Pellet in STE-Puffer mit 1% β -ME resuspendiert. Der Zellaufschluss mit Ultraschall und das Sedimentieren und Resuspendieren der Inclusion Bodies wurde insgesamt noch zweimal wiederholt. Danach wurden die Inclusion Bodies durch mehrere Waschschrte weiter gereinigt. Bei jedem Waschschrte wurden die Einschlusskörper in 100ml des entsprechenden Waschpuffers resuspendiert und anschließend durch Zentrifugation (25min; 11500rpm; GSA-Rotor; Sorval Zentrifuge) sedimentiert. Die ersten beiden Waschschrte wurden mit PBS-Puffer, dem 1% (v/v) TritonX-100 zugesetzt war, durchgeführt. Der dritte Waschschrte erfolgte in PBS-Puffer mit 4M Harnstoff, bevor abschließend nochmals STE-Puffer verwendet wurde. Nach dem letzten Zentrifugationsschrte wurden Proben vom Überstand und den isolierten Inclusion Bodies genommen und mittels SDS-PAGE analysiert. In Abb. 3.2 ist deutlich zu erkennen, dass sich nach dem ausgiebigen Waschen der Einschlusskörper kaum noch Proteine im Überstand befanden und dass das 6xHis-IL-13-Fusionsprotein in der unlöslichen Fraktion stark angereichert wurde. Pro Gramm eingesetzter Bakterienfeuchtmasse konnten etwa 0,1g Inclusion Bodies isoliert werden.

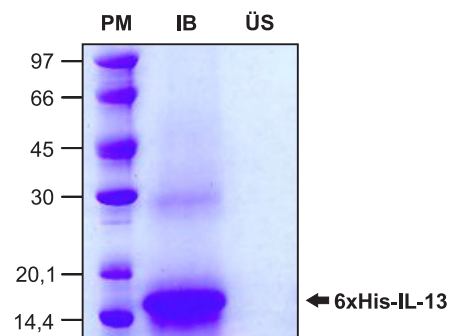


Abbildung 3.2: SDS-PAGE-Analyse der isolierten 6xHis-IL-13-Einschlusskörper: In der unlöslichen Fraktion (IB) ist das 6xHis-IL-13-Fusionsprotein stark angereichert. Im Überstand (ÜS) sind dagegen keine Proteine nachweisbar.

3.1.3 Solubilisierung der Inclusion Bodies und Rückfaltung des denaturierten IL-13

Um biologisch aktives IL-13 zu erhalten, wurden die Inclusion Bodies solubilisiert und die denaturierten Proteine schrittweise in ihre native Konformation zurück gefaltet. Die Zusammensetzung der hierzu verwendeten Lösungen ist in Tabelle 3.1 angegeben:

Denaturierungspuffer I:	50mM Tris, pH9,0, 5mM EDTA
DenaturierungspufferII:	8M GuHCl, 50mM Tris, pH9,0, 5mM EDTA
Renaturierungspuffer I:	3M GuHCL, 1M Glycin, 100mM NaCl, 50mM Tris, pH8,5, 1mM oxidiertes Gluthation
Renaturierungspuffer II:	1M Glycin, 100mM NaCl. 50mM Tris, pH8,5
Renaturierungspuffer III:	PBS, pH7,4

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der benötigten Puffer zur Rückfaltung von IL-13

Zunächst wurden die Inclusion Bodies in 1,5 VT (v/w) Denaturierungspuffer I resuspendiert. Durch Zugabe von 7,5 VT (v/w) Denaturierungspuffer II und 20 mM DTT wurden die Einschlusskörper in Lösung gebracht und das 6xHis-IL-13-Fusionsprotein unter langsamem Rühren für zwei Stunden bei RT vollständig denaturiert. Es folgte eine Zentrifugation mit 11000rpm für 25min (Rotor HFA22.50, Heareus Suprafuge) um unlösliche Verunreinigungen zu entfernen. Der Überstand wurde dann langsam, unter ständigem Rühren in das 100-fache Volumen des Renaturierungspuffers I eingetropft. Nach einer einstündigen Inkubation des Rückfaltungsansatzes bei RT unter langsamem Rühren, wurde dieser in Dialyseschläuche (Spectrapore 3,5kDa MWCO, Roth) gefüllt und zweimal für mindestens 12 Stunden bei 4°C jeweils gegen das 10-fache Volumen des Renaturierungspuffers II dialysiert. Abschließend wurde der Renaturierungsansatz wiederum zweimal für jeweils mindestens 12 Stunden bei 4°C gegen das 10-fache Volumen des Renaturierungspuffers III dialysiert. Vor der weiteren Aufreinigung des renaturierten Proteins wurden ausgefallene Bestandteile durch Filtration (75mm Bottle Top-Filter, Nalgene) entfernt. Durch Ultrafiltration (Vivaflow 200, Vivascience) wurde die Proteinlösung nun auf 10% des Ausgangsvolumens aufkonzentriert. Ausfallendes Protein wurde durch Filtration entfernt. Vom Rückfaltungsansatz wurden vor und nach der Konzentrierung Proben für eine SDS-PAGE-Analyse entnommen. Man kann deutlich erkennen (Abb. 3.3), dass sich nach der Rückfaltung fast ausschließlich monomeres 6xHis-IL-13-Fusionsprotein in der Lösung befindet und ein Großteil der in den Inclusion Bodies vorhandenen, verunreinigenden Proteine während der Renaturierung ausgefallen sind und durch Filtration entfernt werden konnten.

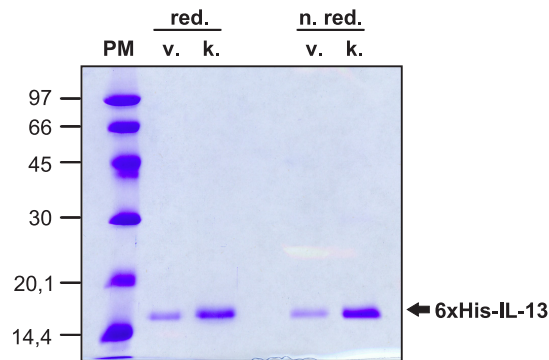


Abbildung 3.3: SDS-PAGE-Analyse der IL-13-Rückfaltung. Sowohl vor (v.) als auch nach (k.) dem Aufkonzentrieren des Rückfaltungsansatzes befindet sich nahezu ausschließlich 6xHis-IL-13-Protein in der Lösung. Verunreinigende Proteine sind ausgefallen und wurden durch Filtration entfernt. Die Proben unter nicht-reduzierenden Bedingungen (n. red.) zeigen, dass sich keine Disulfid-verbrückten IL-13-Multimere in der Lösung befinden.

3.1.4 Thrombin-Spaltung des 6xHis-IL-13-Fusionproteins

Um den N-terminalen Hexahistidin-Tag vom 6xHis-IL-13-Fusionprotein zu entfernen, wurde das Protein mit der Protease Thrombin versetzt, die den His-Tag spezifisch an ihrer Erkennungsequenz am N-Terminus von IL-13 abspalten sollte. Pro Milligramm des Fusionproteins wurden dem filtrierten Rückfaltungsansatz 1U Thrombin zugesetzt. Nach der Inkubation des Ansatzes über Nacht bei RT wurde die Reaktion mittels SDS-PAGE überprüft. Wie in Abb. 3.4 zu sehen wurde der Hexahistidin-Tag mit hoher Effizienz vom Fusionsprotein abgespalten. Die Bande des daraus resultierenden IL-13 befindet sich unterhalb der 14,4kDa-Markerbande, was dem erwarteten Molekulargewicht von 12,8kDa entspricht. Der Thrombinverdau wurde durch Zugabe von 1µl Protease-Inhibitor-Cocktail-Set III (Calbiochem) pro 1ml Proteinlösung gestoppt, bevor das Thrombin und der abgespaltene His-Tag durch eine abschließende Chromatographie entfernt wurden.

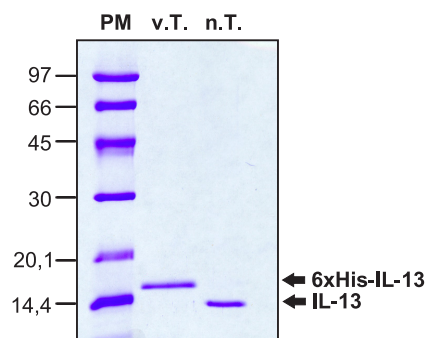


Abbildung 3.4: SDS-PAGE-Analyse des Thrombin-Verdaus von 6xHis-IL-13. Beim Vergleich der Proben von vor (v.T.) und nach (n.T.) der Inkubation mit Thrombin ist eine deutliche Massenabnahme des detektierten Proteins festzustellen. Diese Massenabnahme entspricht der Änderung des Molekulargewichts von 14,6kDa auf 12,8kDa durch die Abspaltung des Hexahistidin-Tags. Die Abspaltung verlief sehr effizient, da in der Probe nach der Thrombin-Inkubation (n.T.) kein ungespaltenes 6xHis-IL-13-Fusionsprotein nachweisbar ist.

3.1.5 Aufreinigung von IL-13 mittels RP-HPLC

Die abschließende Reinigung des rekombinanten IL-13 erfolgt durch RP-HPLC an einer präparativen C4-Säule wie unter 2.5.4 beschrieben. Da pro Lauf nicht mehr als 5ml Proteinlösung auf die Säule aufgetragen werden sollen, mußten je nach Größe des Rückfaltungsansatzes mehrere Chromatographien durchgeführt werden oder die Proteinlösung musste zuvor weiter aufkonzentriert werden. Nach dem Auftragen der Probe erfolgte die Elution mit einem linearen Gradienten von 0% auf 100% Acetonitril über einen Zeitraum von 60 Minuten. Wie in Abb. 3.5 zu sehen, eluierte IL-13 als höchster Peak bei einem Acetonitrilanteil von ca. 72%. Die SDS-PAGE-Analyse der Elutionsfraktionen zeigte den hohen Reinheitsgrad des isolierten IL-13. Im mit Coomassie gefärbten SDS-Gel sind keine weiteren, verunreinigenden Proteine sichtbar.

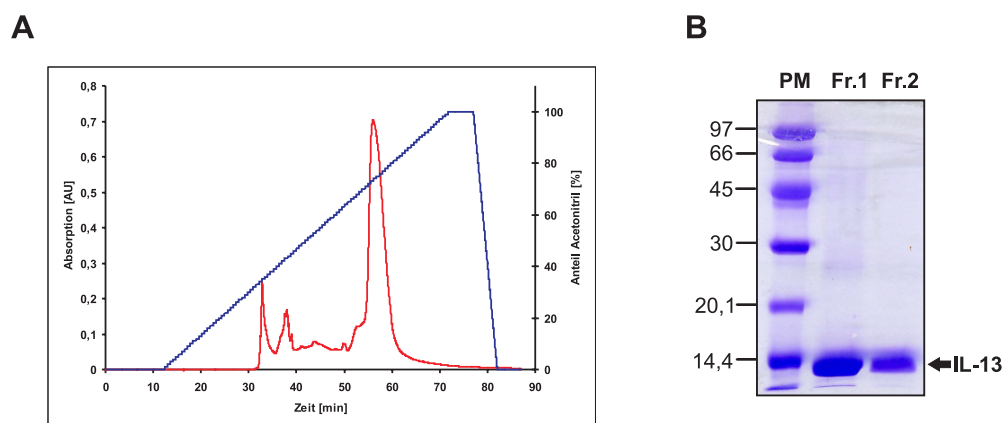


Abbildung 3.5: Aufreinigung von rekombinatem IL-13 durch RP-HPLC. A: Präparativer RP-HPLC-Lauf als letzter Aufreinigungsschritt von IL-13. IL-13 eluiert im höchsten Peak bei einem Acetonitril-Anteil von ca. 72%. B: SDS-PAGE-Analyse der beiden IL-13-Hauptfraktionen. Die Proben aus den beiden Fraktionen mit der höchsten UV-Absorption (Fr.1 und Fr.2) zeigen den hohen Reinheitsgrad des isolierten IL-13.

Die Hauptfraktionen mehrerer RP-HPLC-Läufe wurden vereinigt. Das Protein wurde gefriergetrocknet und konnte so bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert werden. Die Ausbeute an reinem IL-13 lag bei der Durchführung des beschriebenen Verfahrens bei ca. 5mg/l TB-Medium.

3.1.6 Biochemische Charakterisierung des rekombinanten IL-13

Die Reinheit und Homogenität des aufgereinigten IL-13 wurde durch einen analytischen RP-HPLC-Lauf mit 100µg Protein und eine SDS-PAGE-Analyse mit Silberfärbung überprüft. Das Protein eluierte als einzelner Peak von der analytischen C4-Säule (Abb. 3.6A). Auf dem silbergefärbten Proteingel wurde nochmals deutlich, dass IL-13 bis zu einem Reinheitsgrad von >97% aufgereinigt werden konnte (Abb. 3.6B).

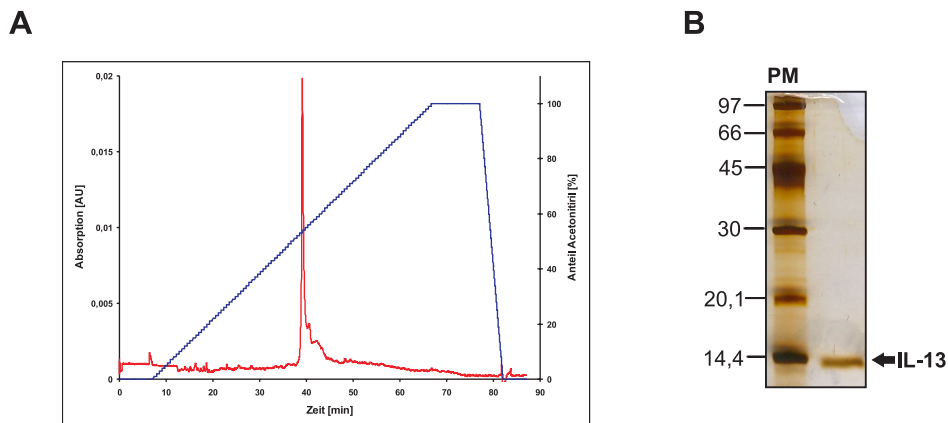


Abbildung 3.6: Analytischer RP-HPLC-Lauf und silbergefärbtes Proteingel des aufgereinigten IL-13. **A:** 100µg des rekombinanten IL-13 eluieren als einzelner Peak von einer analytischen C4-Säule. **B:** Silbergefärbtes Proteingel zeigt keine sichtbaren Verunreinigungen im aufgereinigten IL-13. Der Reinheitsgrad ist daher >97%.

Des Weiteren wurde das in *E.coli* rekombinant exprimierte IL-13 massenspektrometrisch analysiert. Die Rohdaten dieser Messung sind in Abb. 3.7 dargestellt. Sie zeigen sechs Signale, die dem rekombinanten IL-13 in 9- bis 14-facher Protonierung zugeordnet werden konnten. Nach Dekonvolution ergab sich ein Peak der molaren Masse von 12753,764Da. Dieses ermittelte Molekulargewicht entspricht der aus der atomaren Zusammensetzung und der theoretischen Isotopenverteilung berechneten molaren Masse von 12753.549Da ($C_{563}H_{907}N_{158}O_{158}S_8$ (+1); 2 Disulfidbrücken) sehr genau. Dadurch wurde die vollständige Expression des IL-13-Konstrukts, die korrekte Abspaltung des N-terminalen His-Tags und die Ausbildung von zwei Disulfidbrücken bestätigt.

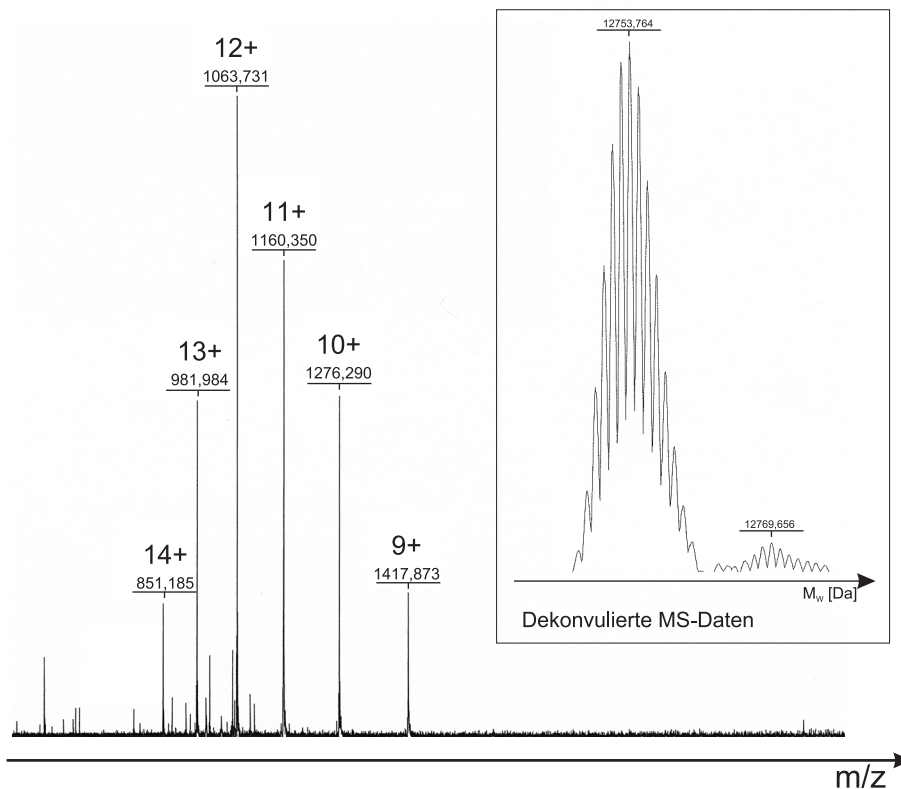


Abbildung 3.7: Massenspektroskopische Untersuchung des rekombinanten IL-13. Gezeigt sind die Rohdaten der massenspektroskopischen Analyse von IL-13 und die dekonvolvierten Daten mit dem korrespondierenden Molekulargewicht.

3.1.7 Biologischer Aktivitätstest des rekombinanten IL-13

Das hochreine, rekombinante IL-13 wurde in einem TF-1-Zell-Proliferationsassay (vgl. 2.8) auf seine biologische Aktivität hin getestet. Dazu wurden jeweils $2 \cdot 10^4$ Zellen mit unterschiedlichen IL-13-Konzentrationen im Medium für 72 Stunden kultiviert. Die getesteten IL-13-Konzentrationen lagen dabei zwischen $1,5 \mu\text{M}$ und $0,3 \text{pM}$. Für die letzten 24 Stunden wurde den Ansätzen [^3H -Methyl]-Thymidin zugesetzt, das während der Replikation in die neu synthetisierte DNS, der sich teilenden TF-1-Zellen eingebaut wurde. Die in die Zellen eingebaute Radioaktivität ist daher ein Maß für die Vermehrung der Zellen. Nach dem Ernten der Zellen und der Bestimmung der eingebauten Radioaktivität konnte eine Dosis-Wirkungskurve für das rekombinante IL-13 aufgestellt werden. Aus dieser Kurve lies sich die IL-13-Konzentration bestimmen, bei der die Proliferation ihren halbmaximalen Wert erreicht. Der bestimmte EC_{50} -Wert für das rekombinante IL-13 beträgt $6,6 \text{nM}$. Durch den TF-1-Proliferationsassay konnte die biologische Aktivität und somit auch die erfolgreiche Rückfaltung des rekombinanten IL-13 gezeigt werden.

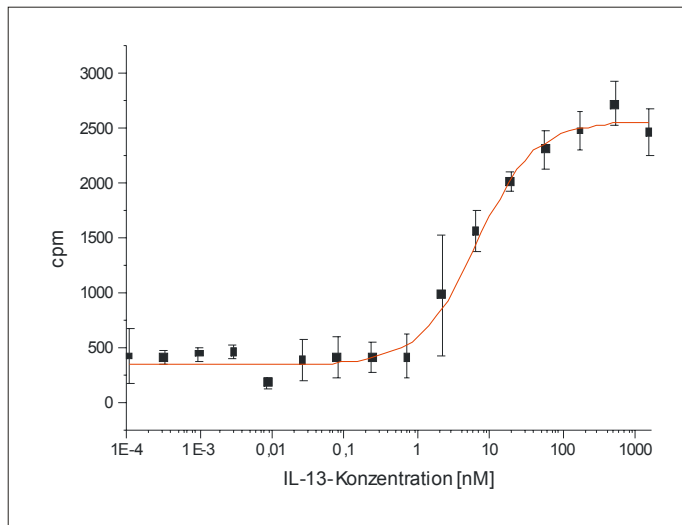


Abbildung 3.8: Proliferation der TF-1-Zellen in Anhängigkeit von rekombinantem IL-13. Aus der Dosis-Wirkungskurve lässt sich für das aus *E.coli* rekombinant gewonnene IL-13 ein EC₅₀-Wert von 6,6nM bestimmen.

3.2 Rekombinante Expression und Aufreinigung von IL-13R α 1-ECD

3.2.1 Klonierung und Expression von IL-13R α 1-ECD

Zur Expression der extrazellulären Domäne von der IL-13R α 1-Kette in *Sf9*-Insektenzellen, wurde die korrespondierende Sequenz (vgl. Swiss-Prot entry P78552) über die BamHI-Restriktionsstelle in den *Sf9*-Expressionsvektor pAcGP67B+10xHis (Pharmingen) ligiert. Das daraus resultierende Plasmid pAcGP67B+10xHis[IL-13Ra1-ECD] (Abb. 3.9A) wurde, wie unter 2.4.3 beschrieben, mit dem BaculoGoldTM-System in *Sf9*-Insektenzellen cotransfiziert. Für die spätere Expression von mutierten IL-13Ra1-ECD-Varianten wurde die codierende Sequenz ebenfalls in den Expressionsvektor pMK-1 kloniert, da sich dieser Vektor aufgrund einer Größe von nur ca. 5500bp zur Mutagenese nach dem QuikChange-Protokoll (vgl. 2.6) einsetzen lässt. Dazu wurden die Restriktionserkennungstellen BamHI und XhoI verwendet. Das Plasmid pMK-1[IL-13Ra1-ECD] (Abb. 3.9B) wurde dann mit dem BacVectorTM-System (vgl. 2.4.4) in *Sf9*-Insektenzellen cotransfiziert. Die Expression und Sekretion der IL-13R α 1-ECD wurde nach der 2. VA durch einen Western Blot mit α -His-Tag-Antikörper überprüft (Abb. 3.9C) und konnten für beide Konstrukte bestätigt werden.

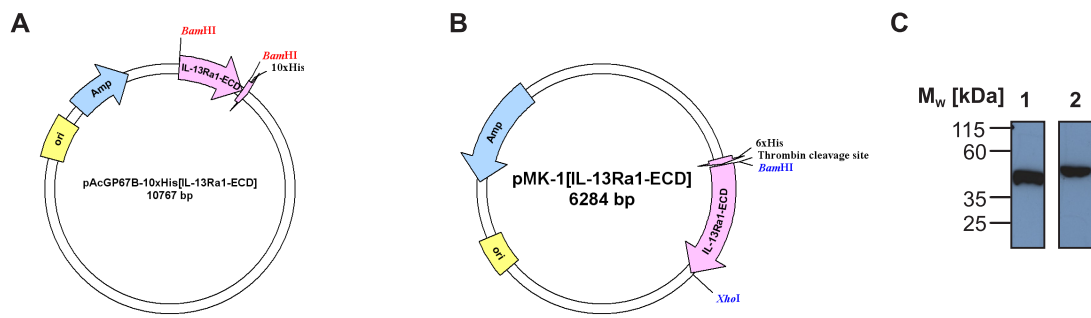


Abbildung 3.9: **A:** Expressionsvektor pAcGP67B+10xHis[IL-13Rα1-ECD] **B:** Expressionsvektor pMK-1[IL-13Rα1-ECD] **C:** Western Blot-Analyse der Expression und Sekretion von IL-13Rα1-ECD aus den Plasmiden pAcGP67B+10xHis[IL-13Rα1-ECD] (1) bzw. pMK-1[IL-13Rα1-ECD] (2)

Die Durchführung der präparativen Expression erfolgte für beide Konstrukte in gleicher Weise, wie unter 2.4.7 beschrieben. Die Insektenzellen wurden mit 5 MOI aus einem Virenstock der vierten oder fünften VA infiziert. Nach fünftägiger Inkubation bei 27°C im Brutschrank, wurden die Insektenzellen durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und der Überstand wurde für die weitere Aufreinigung der IL-13Rα1-ECD gegen den Auftrags-Puffer für die Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie (vgl. 2.5.1) dialysiert.

3.2.2 Metallchelate-Affinitäts-Reinigung von IL-13Rα1-ECD

Die Aufreinigung von IL-13Rα1-ECD aus dem Kulturüberstand mit Hilfe der Ni-NTA-Agarose war aufgrund der Bindung des rekombinant angefügten 6xHis- bzw. 10xHis-Tags an die Nickelionen möglich. Je Liter Kulturüberstand wurden 3ml des Ni-NTA-Agarose-Materials zugegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 4°C wurde der Zellüberstand eine BioRad-Glassäule gegeben und dadurch die Ni-NTA-Agarose mit gebundener IL-13Rα1-ECD abgetrennt. Das Säulenmaterial wurde nun zweimal mit je 50ml Auftrags-Puffer gewaschen, bevor das gebundene Protein mit Elutions-Puffer eluiert wurde. Während der Elution wurden Fraktionen zu je 7ml gesammelt. Der Durchlauf, die beiden Waschfraktionen und die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE-Analyse auf ihren Proteingehalt untersucht (Abb. 3.10).

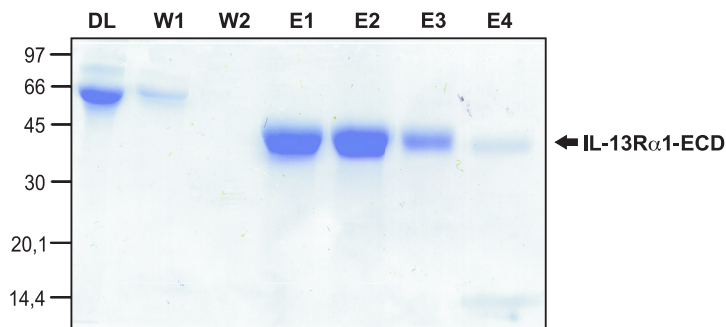


Abbildung 3.10: SDS-PAGE-Analyse der Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie zur Reinigung von IL-13R α 1-ECD. Im Durchlauf (DL) und in den beiden Waschfraktionen (W1, W2) ist kein IL-13R α 1-ECD nachzuweisen. IL-13R α 1-ECD lässt sich ohne erkennbare Verunreinigungen von der Ni-NTA-Agarose eluieren (E1-E4)

Die IL-13R α 1-ECD-Kette konnte durch die Metallchelate-Affinitätschromatographie sehr gut aus dem *Sf9*-Insektenzellkulturüberstand isoliert und aufgereinigt werden. Im Durchlauf und in den beiden Waschfraktionen ließ sich kein IL-13R α 1-ECD nachweisen. Der größte Teil der exprimierten und ins Medium sekretierten Rezeptorketten hat also eine stabile Bindung an das Ni-NTA-Material ausgebildet, die sich auch beim gründlichen Auswaschen der ungebundenen, verunreinigenden Proteine nicht löst. Durch die Elution mit 300nM Imidazol im Puffer konnte IL-13R α 1-ECD in hoher Reinheit gewonnen werden. Zur weiteren Aufreinigung wurden die Elutionsfraktionen mit dem höchsten IL-13R α 1-ECD-Gehalt vereinigt und gegen PBS-Puffer dialysiert.

3.2.3 Gelfiltrations-Chromatographie von IL-13R α 1-ECD

Den letzten Reinigungsschritt zur Isolation von rekombinantem IL-13R α 1-ECD stellte eine Gelfiltrations-Chromatographie dar. Hierzu musste das zuvor gegen PBS dialysierte Protein mit Hilfe eines Zentrifugen-Konzentrators (Amicon Ultra-4, 5000MWCO, Millipore) auf ein Volumen von 1ml eingengt werden. Die Gelfiltration wurde, wie unter 2.5.3 beschrieben, mit einer Superdex 200-Säule (Pharmacia) durchgeführt. Das Elutionsprofil der IL-13R α 1-ECD-Kette ist in folgender Abbildung dargestellt.

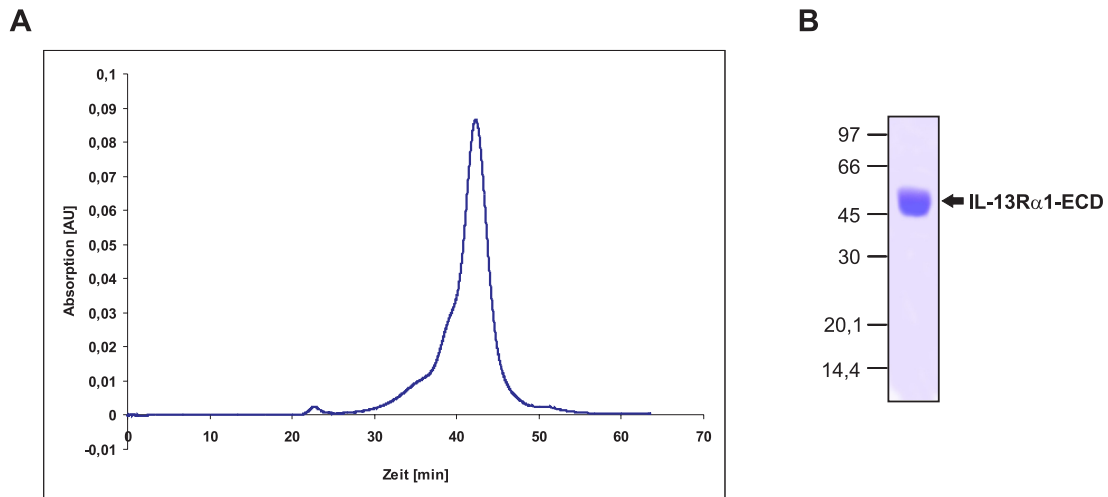


Abbildung 3.11: Gelfiltration von IL-13R α 1-ECD **A:** Elutionsprofil der IL-13R α 1-ECD von einer HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade-Säule (Pharmacia) bei einer Flussgeschwindigkeit von 1ml/min. **B:** SDS-PAGE-Analyse der vereinigten Peakfraktionen nach der Gelfiltration von IL-13R α 1-ECD

Die IL-13R α 1-ECD eluierte nach 42,5 min von der präparativen Gelfiltrationssäule (Abb. 3.11A). Die zentralen Fraktionen des Peaks wurden vereinigt. Die SDS-PAGE-Analyse der vereinigten Fraktionen (Abb. 3.11B) zeigt, dass IL-13R α 1-ECD durch das beschriebene Verfahren exprimiert und bis zu einem sehr hohen Grad aufgereinigt werden konnte. Die sichtbare Bande für IL-13R α 1-ECD auf dem Proteingel ist jedoch sehr unscharf. Der Grund hierfür liegt im wahrscheinlich heterogenen Glykosylierungsgrad des Proteins. Die extrazelluläre Domäne der IL-13R α 1-Kette weist insgesamt zehn potenzielle N-Glykosylierungsstellen auf, die wahrscheinlich in unterschiedlichem Ausmaß von den *Sf9*-Insektenzellen zum Anhängen von Oligosaccharidketten verwendet werden. Bei der Expression in TriExTM-*Sf9*-Insektenzellen (Novagen) konnten Ausbeuten von 0,8 - 1,5mg aufgereinigter IL-13R α 1-ECD pro Liter eingesetzter Expressionskultur erzielt werden.

3.3 Interaktionsanalyse mit rekombinatem IL-13 und IL-13R α 1-ECD

Um die native und funktionelle Faltung und die Bindeaktivität der aus dem *Sf9*-Insektenzellkulturüberstands isolierten IL-13R α 1-ECD zu überprüfen, sollte die Bindung von IL-13 an die auf einem Sensorchip immobilisierten Rezeptorketten mittels SPR analysiert werden. Hierzu wurden zunächst 200 μ g der gereinigten IL-13R α 1-ECD biotinyliert (vgl. 2.7.6). Von dem biotinylierten Rezeptor wurden dann ca. 800RU in einer Flusszelle eines mit Streptavidin beladenen CM5-Sensorchips immobilisiert. Zur Messung wurde HBS300 als Laufpuffer verwendet. Die Flussrate betrug 10 μ l/min. IL-13 wurde in sechs Konzentrationen zwischen 20nM und 180nM als löslicher Analyt eingesetzt. Die erhaltenen Sensorgramme sind in Abb. 3.12 dargestellt.

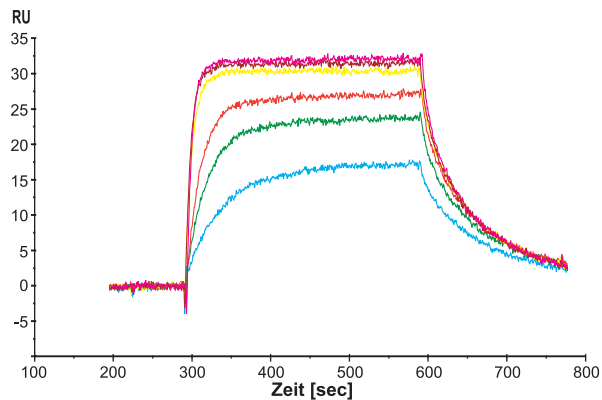


Abbildung 3.12: BIAcore-Analyse der Interaktion zwischen IL-13 und IL-13R α 1-ECD. Es wurden ca. 800RU der biotinylierten IL-13R α 1-ECD auf dem Sensorchip immobilisiert. Die Interaktion wurde mit rekombinantem IL-13 als Analyt in sechs unterschiedlichen Konzentrationen (20, 40, 60, 100, 140, 180nM) analysiert. Die Auswertung der Kurven ergab folgende Konstanten: $k_{on} = 7,7 \cdot 10^5 M^{-1} sec^{-1}$, $k_{off} = 1,8 \cdot 10^{-2} sec^{-1}$, $K_D = 25nM$.

Die Sensorgramme wurden, wie unter 2.9 beschrieben, ausgewertet. Für die Bindung zwischen IL-13 und der IL-13R α 1-ECD konnte eine Dissoziationskonstante K_D von ca. 25nM ermittelt werden. Die kinetischen Bindungskonstante k_{on} und k_{off} ergaben sich zu $7,7 \cdot 10^5 M^{-1} sec^{-1}$ bzw. $1,8 \cdot 10^{-2} sec^{-1}$. Auffällig an den erhaltenen Sensorgrammen ist allerdings, dass bei der Verwendung von saturierenden IL-13-Konzentrationen nur maximal 35RU IL-13 an die Chipoberfläche binden. Da ca. 800RU der IL-13R α 1-ECD immobilisiert wurden, sollten theoretisch etwa 200RU IL-13 an den Chip binden können. Offensichtlich wird bei einem bedeutenden Teil der Rezeptor-ECDs die Bindeaktivität bei der Biotinylierung und der Immobilisierung auf dem Sensorchip zerstört, da die gleiche Beobachtung auch bei der Verwendung von zuvor durch Affinitätschromatographie (vgl. 2.5.6) gereinigter IL-13R α 1-ECD gemacht wurde.

Die erhaltenen Bindekonstanten stimmen sehr gut mit dem zuvor veröffentlichten K_D -Wert von 38nM für die Bindung von IL-13R α 1-ECD-Fc-Fusionsprotein an immobilisiertes IL-13 überein. Der Einsatz von Fc-Fusionsproteinen als Analyt resultierte in keinem nachweisbaren Aviditätseffekt auf die Interaktion. Bei der Verwendung von immobilisiertem IL-13R α 1-ECD-Fc-Fusionsprotein und IL-13 als löslichem Analyt konnte ein nahezu identischer K_D -Wert von 34nM ermittelt werden [140]. Damit wurde gezeigt, dass IL-13R α 1-ECD von *Sf9*-Insektenzellen in korrekt gefalteter und damit bindeaktiver Form in den Zellkulturüberstand sekretiert wird. Es war somit möglich, die Affinität zwischen IL-13 und IL-13R α 1 und die Kinetik der Interaktion *in vitro* mittels der SPR-Technologie detailliert zu untersuchen.

3.4 Bestimmung der Stöchiometrie des IL-13/IL-13R α 1-Komplexes

Um festzustellen, welche stöchiometrische Zusammensetzung der IL-13/IL-13R α 1-ECD-Komplex aufweist, wurde das apparente Molekulargewicht der einzelnen Komponenten und des binären Komplexes durch analytische Gelfiltrationschromatographie auf einer kalibrierten Superose 6-Säule (Pharmacia) bestimmt. Die Kalibrierung wurde wie unter 2.5.4 beschrieben mit dem „LMW Gel Filtration Calibration Kit“ der Firma GE Healthcare durchgeführt. Das Elutionsprofil der Standardproteine ist in Abb. 3.13B dargestellt. Aus der Kalibrierkurve (Abb. 3.13C) errechnet sich durch lineare Regression folgender Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht M_w und dem relativen Elutionsvolumen K_{av} : $K_{av} = -0,0228 \cdot \ln(M_w) + 0,1253$

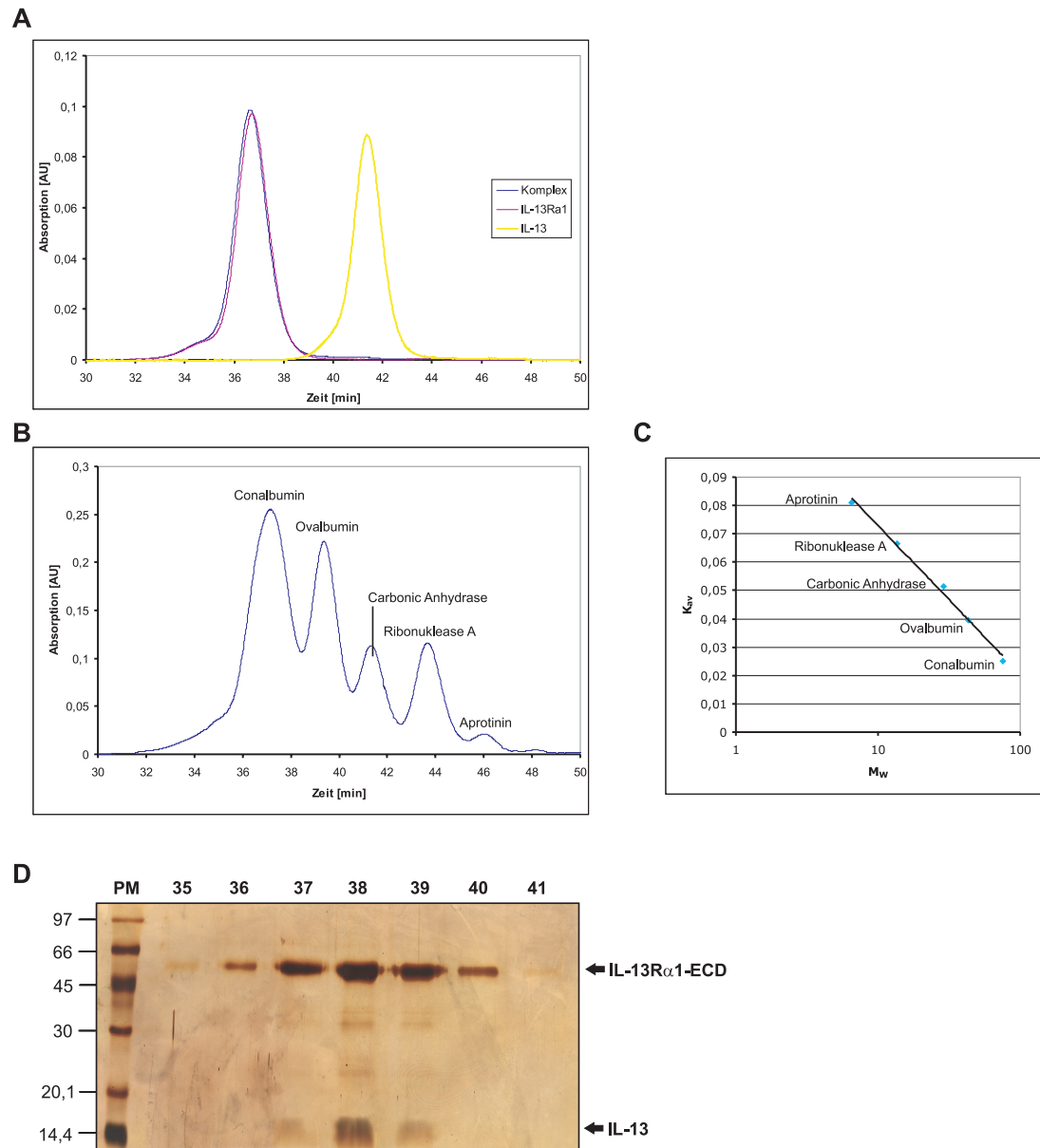


Abbildung 3.13: Analytische Präparation des IL-13/IL-13R α 1-ECD-Komplexes zur Bestimmung der stöchiometrischen Zusammensetzung. A: Chromatogramme der Gelfiltration von 30nmol IL-13 (gelb), 5nmol IL-13R α 1-ECD (magenta) und der Präparation des binären Komplexes aus 6nmol IL-13 und 5nmol IL-13R α 1-ECD (blau). Die leichte Verschiebung des Elutionszeitpunktes der Komplexpräparation im Vergleich zur IL-13R α 1-ECD deutet auf eine stabile Ausbildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes hin. **B:** Chromatogramm der Gelfiltration eines Gemisches von Standardproteinen zur Kalibrierung der Superose 6 10/300 GL-Säule (Pharmacia) **C:** Kalibrierkurve der Superose 6 10/300 GL-Säule (Pharmacia) **D:** SDS-PAGE-Analyse der Peakfraktionen (35-42) aus der Gelfiltration der IL-13/IL-13R α 1-ECD-Komplexpräparation.

Zur Präparation des Komplexes wurden 5nmol IL-13R α 1-ECD mit 6nmol IL-13 in 10mM Tris, pH7,4, 150mM NaCl, 3,4mM EDTA miteinander gemischt. Der Ligand wurde in 20%-igem molaren Überschuss eingesetzt, um sicherzustellen, dass jedes Rezeptormolekül einen Komplex ausbilden kann. Nach der Inkubation des Proteingemisches für 20 Minuten bei RT wurde die Lösung mit einem Volumen von 100 μ l auf eine analytische Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Durchführung der Gelfiltration erfolgte, wie unter 2.5.3 beschrieben, unter Einsatz einer Superose 6 10/300 GL-Säule

(Pharmacia). In Abbildung 3.13A sind neben dem Elutionsprofil der Komplexpräparation (blau) zum Vergleich auch die Chromatogramme der Einzelkomponenten IL-13 (gelb) und IL-13R α 1-ECD (magenta) dargestellt. Der Komplex eluiert geringfügig früher als die IL-13R α 1-ECD alleine. Das und die durch die SDS-PAGE-Analyse nachgewiesene Coelution von IL-13 mit der Rezeptor-ECD (Abb. 3.13D) zeigen, dass sich zwischen IL-13 und der IL-13R α 1-ECD ein stabiler Komplex ausbildet. Durch Anwendung des aus der Kalibrierung erhaltenen Abhängigkeit des relativen Elutionsvolumens K_{av} vom Molekulargewicht M_w konnten die in der folgenden Tabelle angegebenen apparenten molekularen Massen ermittelt werden.

Probe	apparentes Molekulargewicht [kDa]
IL-13	25,4
IL-13R α 1-ECD	91,2
IL-13/IL-13R α 1-ECD-Komplex	93,8
IL-4	20,4

Tabelle 3.2: Durch Gelfiltration bestimmte, apparente molekulare Massen.

Die in Tabelle 3.2 wiedergegebenen, durch Gelfiltration bestimmten, molekularen Massen sind deutlich größer als die auf ihrer Aminosäurezusammensetzung beruhenden theoretischen Molekulargewichte. Da es sich jedoch bei der IL-13R α 1-ECD und IL-13, im Gegensatz zu den zur Kalibrierung verwendeten Standardproteinen, nicht um annähernd, ideal sphärisch gefaltete Proteine handelt, sind Abweichungen zu erwarten. Das Laufverhalten von Proteinen in der Gelfiltration hängt hauptsächlich von ihrem hydrodynamischen Radius ab, so dass für nicht ideal sphärische Partikel ein höheres, apparentes Molekulargewicht bestimmt wird. Dass IL-13 nicht in Form eines Dimers vorliegt, was man aufgrund des durch die Gelfiltration ermittelten Molekulargewichts vermuten könnte, wird durch die Beobachtung bekräftigt, dass für IL-4 ein ähnliches, apparentes Molekulargewicht bestimmt wurde (vgl. Tabelle 3.2) und es keinerlei experimentellen Hinweise darauf gibt, dass IL-4 ein Dimer bildet. Auch die durch NMR-Analysen bestimmte Struktur von IL-13 macht deutlich, dass IL-13 in Lösung als Monomer vorliegt [64, 65]. Der geringe Unterschied zwischen den beobachteten molekularen Massen von IL-13R α 1-ECD und dem Komplex aus IL-13 und IL-13R α 1-ECD zeigt, dass der Komplex aus einem IL-13- und einem IL-13R α 1-ECD-Molekül aufgebaut ist. Das spricht gegen das in der Literatur vorgeschlagene Modell, nach dem die IL-13R α 1-ECD mit ihrer CHR an IL-13 bindet und mit der zusätzlichen FnIII-ähnlichen Domäne Kontakt zu einem weiteren, bereits an eine zweite IL-13R α 1-ECD gebundenen IL-13-Molekül aufnimmt [129]. Das würde zu einem Komplex aus jeweils zwei IL-13- und zwei IL-13R α 1-ECD-Molekülen führen, welcher in der Gelfiltration deutlich früher als IL-13R α 1-ECD alleine eluieren sollte.

3.5 Interaktionsanalyse zwischen dem IL-4/IL-4R α -Komplex und der IL-13R α 1-ECD

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die aus *Sf9*-Zellen gereinigte IL-13R α 1-ECD von einem Komplex aus IL-4 und IL-4R α -ECD in einen ternären Komplex rekrutiert werden kann und welche Affinität die in diesem Fall niederaffine Rezeptorkette zum bereits gebildeten IL-4/IL-4R α -Komplex besitzt. Hierzu wurden ca. 250RU biotinylierte IL-4R α -ECD auf einem Sensorchip immobilisiert. Als Laufpuffer wurde HBS150 mit einer Fließgeschwindigkeit von 10 μ l/min verwendet. Die Bindestellen dieser Rezeptoren wurden zunächst mit 100nM IL-4 im Laufpuffer gesättigt. Dann wurde zusätzlich zum IL-4 noch IL-13R α 1-ECD in unterschiedlichen Konzentrationen (2,5-10 μ M) über die Chipoberfläche gespült. Die IL-13R α 1-ECD konnte nun an die zuvor gebildeten Komplexe aus immobilisierter IL-4R α -ECD und IL-4 binden. Die erhaltenen Sensorgramme sind in der folgenden Abbildung 3.14 dargestellt.

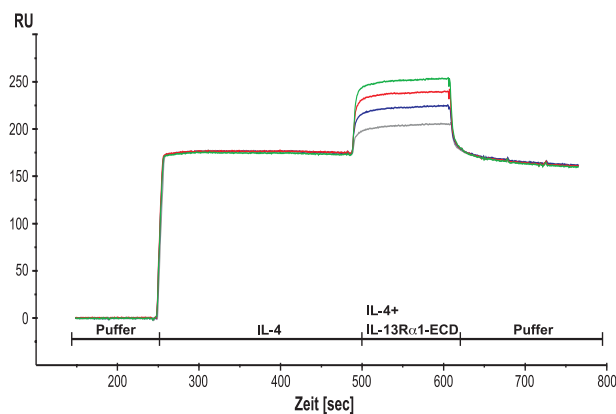


Abbildung 3.14: BIAcore-Analyse der Interaktion zwischen IL-13R α 1-ECD und einem Komplex aus IL-4 und IL-4R α . Auf dem Chip immobilisierte IL-4R α -ECD wurde mit IL-4 (100nM) gesättigt. Die Bindung von IL-13R α 1-ECD an den IL-4/IL-4R α -Komplex wurde dann mit unterschiedlichen IL-13R α 1-ECD-Konzentrationen (2,5, 5,0, 7,5 und 10 μ M) untersucht. Aus der Gleichgewichtsbindung ließ sich ein K_D -Wert von ca. 1 μ M für die Interaktion zwischen IL-13R α 1-ECD und dem IL-4/IL-4R α -Komplex ermitteln.

Es war eine deutliche, konzentrationsabhängige Bindung der IL-13R α 1-ECD an den auf der Chipoberfläche vorgeformten Komplex aus IL-4 und IL-4R α zu erkennen. Aus der konzentrationsabhängigen Gleichgewichtsbindung konnte ein K_D -Wert von ca. 1 μ M für die Interaktion zwischen IL-13R α 1-ECD und dem IL-4/IL-4R α -Komplex ermittelt werden. Dieser Wert liegt im gleichen Größenbereich wie die Affinität der zweiten niederaffinen Rezeptorkette γ_C für IL-4. Für die Bindung der humanen γ_C -Kette, die ebenfalls in *Sf9*-Zellen exprimiert wurde, an den IL-4/IL-4R α -Komplex wurde in einem ähnlichen BIAcore-Experiment ein K_D -Wert von 4 μ M bestimmt [130]. Somit konnte auch die Bindeaktivität der rekombinant exprimierten IL-13R α 1-ECD zum zweiten bekannten Liganden IL-4 gezeigt werden.

3.6 Expression und Aufreinigung verkürzter IL-13R α 1-ECD-Formen

3.6.1 Klonierung und Expression von IL-13R α 1-CHR und IL-13R α 1-D12

Es sollte untersucht werden, ob für die Bindung von IL-13 die klassische CHR der IL-13R α 1-Kette ausreichend ist oder ob auch die zusätzliche N-terminale FnIII-Domäne an der Interaktion mit dem Liganden beteiligt ist. Dazu wurden zwei verkürzte Formen der IL-13R α 1-ECD exprimiert und aufgereinigt. Die Variante IL-13R α 1-CHR besteht nur aus der mittleren und der C-terminalen FnIII-ähnlichen Domäne. Bei IL-13R α 1-D12 wurde dagegen die C-terminale FnIII-ähnliche Domäne deletiert. Zur Bestimmung der Grenzen zwischen den einzelnen Domänen wurde ein Sequenzalignment zwischen den extrazellulären Domänen von IL-13R α 1, IL-5R α und IL-4R α durchgeführt (Abb. 3.15). Da die Struktur von IL-4R α bekannt ist, konnten aus dem Alignment auf die Bereiche zwischen den drei FnIII-ähnlichen Domänen von IL-13R α 1-ECD geschlossen werden. Die Stellen, an denen die Deletionen durchgeführt wurden, sind in Abb. 3.15 eingezeichnet.

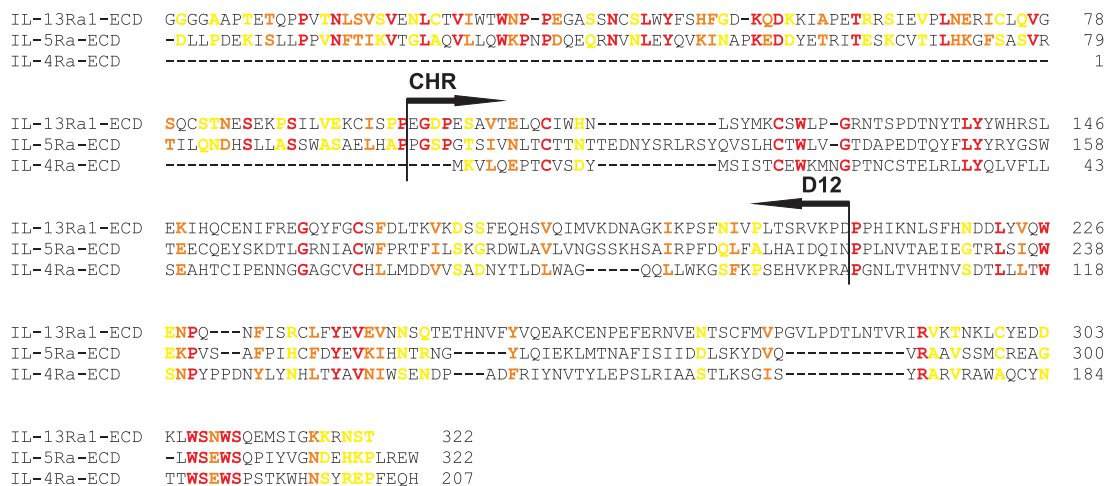


Abbildung 3.15: Sequenzalignment der extrazellulären Domänen von IL-13R α 1, IL-5R α und IL-4R α . Die Übergänge zwischen den drei FnIII-ähnlichen Domänen sind gekennzeichnet. Es ist deutlich zu erkennen, dass die dritte N-terminale Domäne nur bei der IL-13R α 1-ECD und der IL-5R α -ECD vorhanden ist. Die IL-4R α -ECD hingegen besteht nur aus dem sog. CHR-Motiv.

Die entsprechenden Bereiche der DNA-Sequenz wurden mit komplementären Primern aus dem Expressionsplasmid der kompletten IL-13R α 1-ECD durch eine PCR amplifiziert und über die angefügten BamHI-Restriktionsstellen in den Vektor pAcGP67B+10xHis (Pharmlingen) ligiert. Die resultierenden Plasmide pAcGP67B-10xHis[IL-13Ra1-CHR] und pAcGP67B-10xHis[IL-13Ra1-D12] sind in Abb. 3.16 dargestellt. Die beiden Expressionsplasmide der verkürzten IL-13R α 1-ECD wurden, wie unter 2.4.3 beschrieben, mit Hilfe des BaculoGoldTM-Systems in *Sf9*-Insektenzellen cotransfiziert.

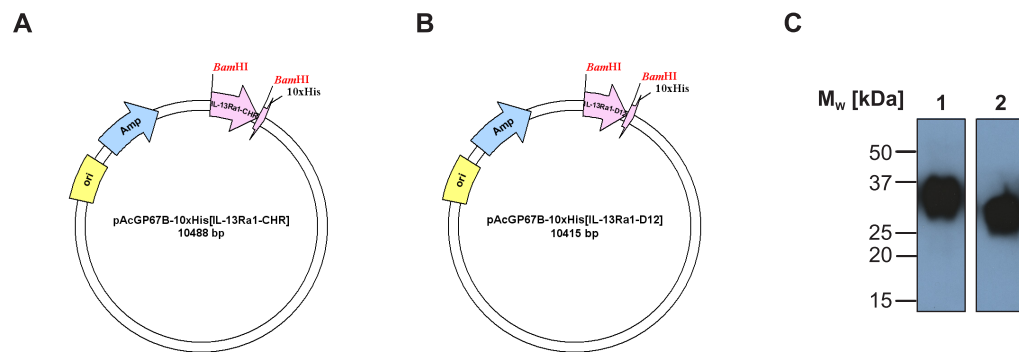


Abbildung 3.16: **A:** Expressionsvektor pAcGP67B-10xHis[IL-13Ra1-CHR] **B:** pAcGP67B-10xHis[IL-13Ra1-D12] **C:** Western Blot-Analyse der Expression und Sekretion von IL-13R α 1-CHR (1) bzw. IL-13R α 1-D12 (2)

Die präparative Expression vom IL-13R α 1-CHR und IL-13R α 1-D12 wurde durchgeführt, wie unter 3.2.1 für IL-13R α 1-ECD beschrieben.

3.6.2 Metallchelate-Affinitäts-Reinigung von IL-13R α 1-CHR und IL-13R α 1-D12

Als erster Reinigungsschritt von IL-13R α 1-CHR und IL-13R α 1-D12 aus dem jeweiligen Insektenzellkulturüberstand wurde, wie auch bei der Aufreinigung der IL-13R α 1-ECD, die Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie an Ni-NTA-Agarose (Qiagen) eingesetzt. Die Durchführung verlief, wie für die vollständige ECD beschrieben. Die SDS-PAGE-Analyse des Durchlaufs, der Wasch- und der Elutionsfraktionen ist in Abb. 3.17 wiedergegeben.

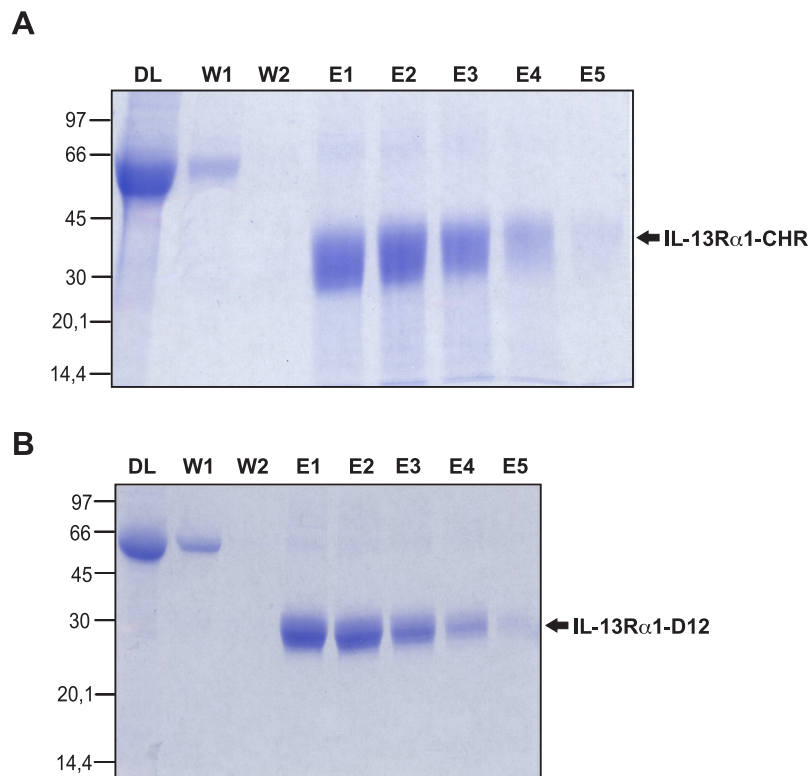


Abbildung 3.17: SDS-PAGE-Analyse der Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie zur Reinigung von IL-13R α 1-CHR (A) und IL-13R α 1-D12 (B). Es ist in beiden Fällen zu sehen, dass die verkürzten IL-13R α 1-ECD-Varianten über ihren 10xHis-Tag stabil an das Säulenmaterial binden, da sie im Durchlauf (DL) und in den beiden Waschfraktionen (W1, W2) nicht nachzuweisen waren. Sowohl IL-13R α 1-CHR als auch IL-13R α 1-D12 konnten ohne sichtbare Verunreinigungen von der Ni-NTA-Agarose eluiert werden (E1-E4).

Durch die Chromatographie an Ni-NTA-Agarose ließen sich die beiden verkürzten Formen der extrazellulären Domäne von IL-13R α 1 sehr gut aus den Überständen der Insektenzellkulturen isolieren. Die rekombinant exprimierten und sekretierten Proteine banden über ihren 10xHis-Tag stabil an das Säulenmaterial, so dass Verunreinigungen ausgewaschen werden konnten und es gelang, IL-13R α 1-CHR bzw. -D12 in reiner Form zu eluieren. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt und für die folgende Gelfiltrationschromatographie gegen PBS dialysiert.

3.6.3 Gelfiltrations-Chromatographie von IL-13R α 1-CHR und IL-13R α 1-D12

Zum Abschluss der Aufreinigung von IL-13R α 1-CHR und -D12 wurde eine Gelfiltrations-Chromatographie durchgeführt. Der Ablauf erfolgte wie unter 2.5.3 beschrieben und analog zur Durchführung bei der Reinigung von IL-13R α 1-ECD (vgl. 3.2.3). Die folgende Abbildung zeigt die Elutionsprofile der Trunktationsvarianten IL-13R α 1-CHR (Abb. 3.18A) und IL-13R α 1-D12 (Abb. 3.18B) von der Superdex 200-Säule (Pharmacia).

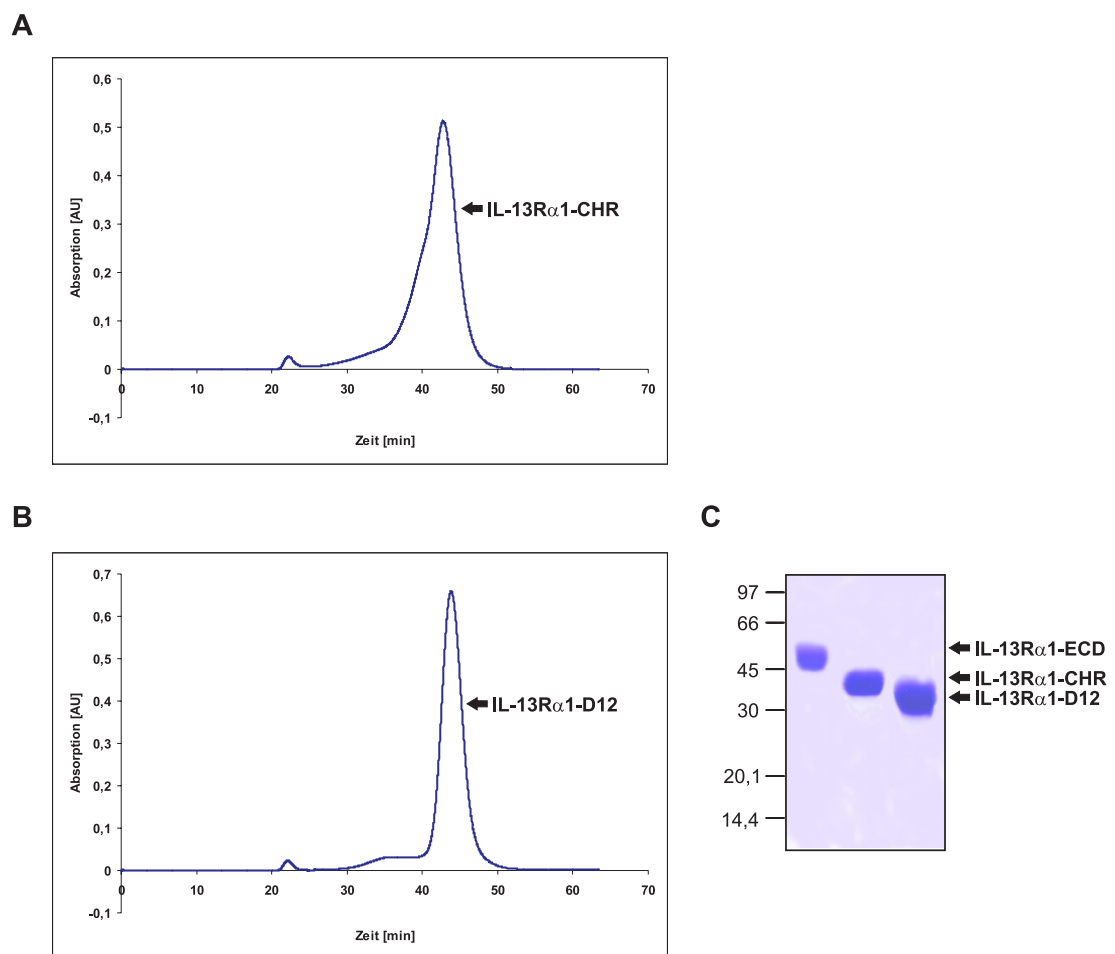


Abbildung 3.18: Gelfiltrationschromatographie der verkürzten IL-13R α 1-ECD-Varianten. Elutionsprofile von IL-13R α 1-CHR (A) und IL-13R α 1-D12 (B) von einer HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade-Säule (Pharmacia) bei einer Flussgeschwindigkeit von 1ml/min. C: SDS-PAGE-Analyse der gereinigten Rezeptorvarianten IL-13R α 1-CHR und -D12 im Vergleich zur IL-13R α 1-ECD

IL-13R α 1-CHR eluierte nach 43,2min (Abb. 3.18A) von der präparativen Gelfiltrationssäule. Der Elutionspeak weist auf der linken Seite eine deutliche Schulter auf, welche durch IL-13R α 1-CHR mit einem höheren Glykosilierungsgrad oder durch Proteinaggregate verursacht werden kann. Der Elutionszeitpunkt von IL-13R α 1-D12 lag dagegen bei 44,2min. Die zentralen Fraktionen der Peaks

wurden vereinigt und mittels SDS-PAGE analysiert. Sowohl IL-13R α 1-CHR als auch IL-13R α 1-D12 ließen sich in *Sf9*-Insektenzellen exprimieren und konnten bis zu einem hohen Grad gereinigt werden. Die unscharfen Bande auf dem SDS-Gel (Abb. 3.18C) deuteten erneut auf eine inhomogene Glykosylierung durch die *Sf9*-Zellen hin. Insgesamt konnten 4-5mg IL-13R α 1-CHR bzw. 3-4mg IL-13R α 1-D12 pro Liter TriEx-Zellkultur gewonnen werden.

3.7 Interaktionsanalyse mit IL-13 und verkürzten IL-13R α 1-ECD-Varianten

Nach der Aufreinigung der verkürzten IL-13R α 1-ECD-Varianten sollte deren Fähigkeit zur Interaktion und Bindung des Liganden IL-13 mit Hilfe der SPR-Technologie untersucht werden. Hierzu wurden jeweils 200 μ g von IL-13R α 1-CHR und IL-13R α 1-D12, wie unter 2.7.6 beschrieben, biotinyliert. Von den biotinylierten Rezeptorvarianten wurden je ca. 800RU auf einem Kanal eines mit Streptavidin beschichteten CM5-Sensorchips (Pharmacia) immobilisiert. Als Kontrolle wurden in einer dritten Flusszelle 800RU der vollständigen IL-13R α 1-ECD immobilisiert. Zur Messung wurde HBS300 als Laufpuffer mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 μ l/min verwendet.

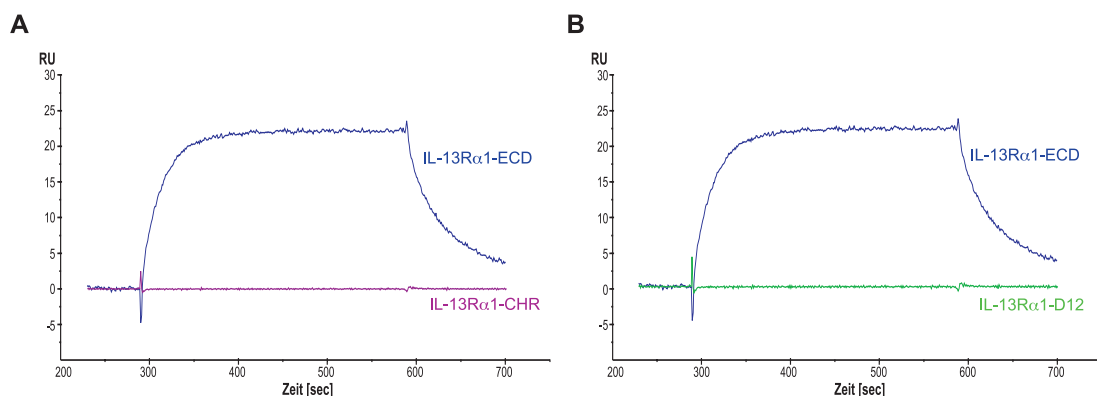


Abbildung 3.19: Interaktionsanalyse der verkürzten IL-13R α 1-ECD-Varianten mit IL-13. A: Sensorgramm der Bindung von IL-13 (360nM) an immobilisierte IL-13R α 1-CHR (A) und an immobilisierte IL-13R α 1-D12 (B) im Vergleich zu IL-13R α 1-ECD.

In Abb. 3.19 sind die erhaltenen Sensorgramme für die Interaktion der verkürzten IL-13R α 1-ECD-Varianten mit IL-13 wiedergegeben. Bei der verwendeten IL-13-Konzentration von 360nM lässt sich weder an IL-13R α 1-CHR (Abb. 3.19A) noch an IL-13R α 1-D12 (Abb. 3.19B) eine Bindung erkennen. Im Kontrollkanal dagegen kommt es zur Interaktion zwischen immobilisierter IL-13R α 1-ECD und IL-13. Auch bei höheren IL-13-Konzentrationen bis zu 4 μ M konnte keine spezifische Bindung an IL-13R α 1-CHR oder -D12 beobachtet werden. Daraus kann geschlossen werden, dass im Falle der IL-13R α 1-Kette das klassische CHR-Motiv nicht ausreichend für die Bindung des IL-13-Liganden ist. Vielmehr ist die N-terminale FnIII-Domäne für die Bindung von IL-13 von großer Bedeutung. Auch die C-terminale FnIII-Domäne ist an der hochaffinen Bindung von IL-13 beteiligt, was durch die

BIAcore-Experimente mit IL-13R α 1-D12 (Abb. 3.19B) gezeigt werden konnte. Das Epitop der IL-13R α 1-Kette für die Interaktion mit IL-13 muss sich daher aus Teilen der N- und C-terminalen FnIII-Domäne zusammensetzen. Ob auch die mittlere FnIII-Domäne direkt an der Interaktion mit IL-13 beteiligt ist, konnte durch die Experimente mit den verkürzten IL-13R α 1-ECD-Varianten nicht gezeigt werden. Sie ist aber sicherlich zum Erhalt des korrekten Abstands und der richtigen Orientierung der N- und C-terminalen FnIII-Domänen zueinander von entscheidender Bedeutung.

3.8 Interaktionsanalyse mit verkürzten IL-13R α 1-ECD-Varianten und dem IL-4/IL-4R α -Komplex

Nach der Beobachtung, dass die klassische CHR-Domäne der IL-13R α 1-Kette nicht ausreichend zur Bindung von IL-13 ist, sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden, ob die N-terminale FnIII-Domäne auch für die Interaktion mit IL-4 von Bedeutung ist. Hierzu wurden die Bindung der IL-13R α 1-CHR an einen vorgeformten Komplex aus IL-4 und IL-4R α -ECD gemessen. Wie bereits unter 3.5 beschrieben wurde biotinylierte IL-4R α -ECD auf einem mit Streptavidin beschichteten CM5-Sensorchip immobilisiert und die IL-4-Bindestellen wurden mit IL-4 abgesättigt. Dann wurde zusätzlich IL-13R α 1-CHR (10 μ M) bzw. IL-13R α 1-ECD (10 μ M) über die Chipoberfläche perfundiert, um die Bindung der IL-13R α 1-Varianten an den IL-4/IL-4R α -Komplex zu messen. Die erhaltenen Sensorgramme sind in Abb. 3.20 dargestellt.

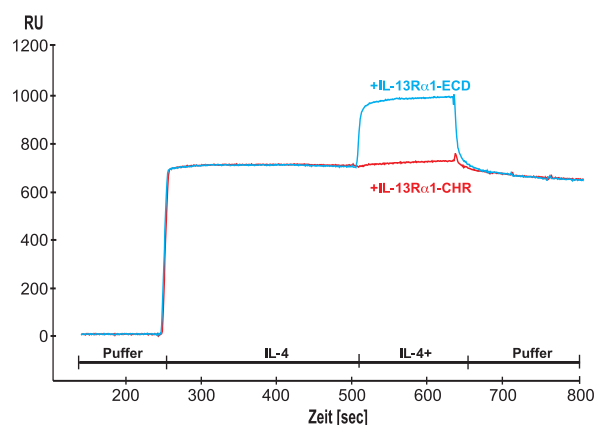


Abbildung 3.20: Interaktionsanalyse von IL-13R α 1-CHR mit dem Komplex aus IL-4 und IL-4R α . Immobilisierte IL-4R α -ECD wurde zunächst mit IL-4 (100nM) gesättigt. Anschließend wurde die Bindung von IL-13R α 1-CHR (10 μ M) an den IL-4/IL-4R α -Komplex im Vergleich zu IL-13R α 1-ECD (10 μ M) analysiert.

Es ist deutlich zu erkennen, dass bei IL-13R α 1-CHR in einer Konzentration von 10 μ M im Gegensatz zu IL-13R α 1-ECD keine Bindung an den IL-4/IL-4R α -Komplex beobachtet werden konnte (Abb. 3.20). Somit scheint die N-terminale FnIII-Domäne der IL-13R α 1-Kette ebenfalls essentiell für die Interaktion mit IL-4 zu sein. Wie schon für den Liganden IL-13 beobachtet ist auch an der Interaktion

mit IL-4 die gesamte extrazelluläre Domäne von IL-13R α 1 beteiligt. Dies stellt einen Unterschied zu der zweiten niederaffinen Rezeptorkette γ_C für IL-4 dar. Die γ_C -Kette besitzt neben der CHR-Domäne nur einen kurzen N-terminalen Teil, der jedoch keine komplette FnIII-Domäne darstellt. Die Affinität zu IL-4 wird durch die Deletion dieses N-terminalen Bereichs nicht beeinflusst [130]. Das Bindeepitop von γ_C für IL-4 setzt sich daher nur aus Bereichen der CHR zusammen. Im Falle von IL-13R α 1 sind an der Interaktion mit IL-4 dagegen Teile der zusätzlichen N-terminalen FnIII-Domäne beteiligt.

3.9 CD-Spektroskopie der verkürzten IL-13R α 1-ECD-Varianten

Um auszuschließen, dass der Verlust der Affinität zu IL-13 und IL-4 auf eine falsche Faltung der aus *Sf9*-Zellen sekretierten, verkürzten IL-13R α 1-ECD-Varianten zurückzuführen ist, wurden die gereinigten Proteine mittels CD-Spektroskopie analysiert (vgl. 2.10). Dadurch sollten die Ausbildung der Sekundärstrukturelemente und die thermische Stabilität der Proteine untersucht werden. Die dabei erhaltenen CD-Spektren von IL-13R α 1-CHR und -D12 sind in Abbildung 3.21 im Vergleich zum CD-Spektrum von IL-13R α 1-ECD dargestellt.

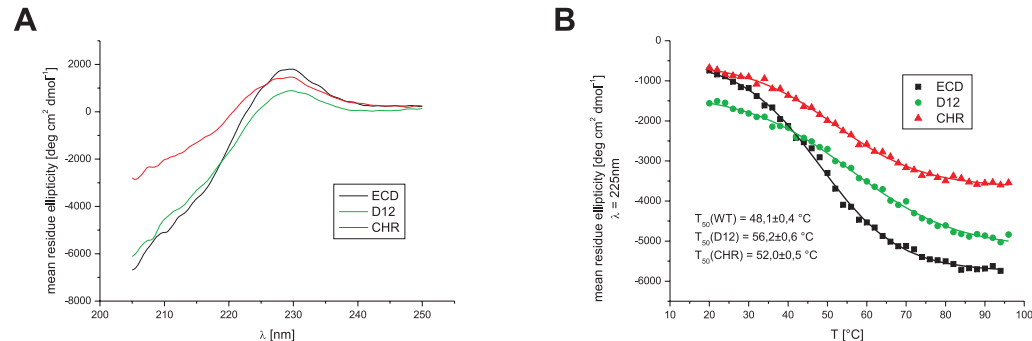


Abbildung 3.21: CD-Spektroskopie der verkürzten IL-13R α 1-ECD-Varianten **A:** CD-Spektren von IL-13R α 1-ECD, -CHR, und -D12 im Wellenlängenbereich 205-250nm bei 20°C **B:** Thermische Denaturierungskurven von IL-13R α 1-ECD, -CHR und -D12 im Temperaturbereich 20-96°C bei einer Wellenlänge von 225nm.

Die Kurvenverläufe der CD-Spektren von IL-13R α 1-ECD, -CHR und -D12 sind sich sehr ähnlich, jedoch nicht identisch (Abb. 3.21A). Sich exakt überlagernde CD-Spektren sind bei der Unterschiedlichkeit und Größe der Deletionen im Vergleich zur IL-13R α 1-ECD aber auch nicht zu erwarten. Vor allem besitzen die verkürzten Rezeptorvarianten eine unterschiedliche Anzahl von aromatischen Aminosäureseitenketten, die den stärksten Einfluss auf die Absorption der Proteine haben, was die Vergleichbarkeit der CD-Spektren weiter erschwert. Die Kurven deuten aber stark darauf hin, dass in den nicht bindeaktiven Varianten IL-13R α 1-CHR und -D12

Sekundärstrukturelemente in gleicher Weise wie bei der kompletten IL-13R α 1-ECD ausgebildet sind. Nach der Messung der CD-Spektren konnte damit ausgeschlossen werden, dass IL-13R α 1-CHR und -D12 in un- bzw. falsch gefalteter Form von den *Sf9*-Insektenzellen sezerniert und aus dem Kulturüberstand isoliert wurde.

Weiterhin sollte die Stabilität der verkürzten IL-13R α 1-ECD-Varianten untersucht werden. Hierzu wurden thermische Denaturierungskurven und spezifische Denaturierungstemperaturen der Proteine ermittelt. Zur Messung der Denaturierungskurven, wurden die Proteine in der Küvette des CD-Spektrophotometers durch Erhitzen von 20°C auf 96°C bei einer Heizrate von 1°C/min thermisch denaturiert. Nach jeder Erwärmung um 2°C wurde ein CD-Spektrum gemessen und die erhaltene mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest bei der Wellenlänge von 225nm gegen die entsprechende Temperatur aufgetragen. Aus den so erhaltenen Denaturierungskurven (Abb. 3.21B) konnte der charakteristische, thermische Denaturierungspunkt T_{50} der Proteine ermittelt werden. Für IL-13R α 1-ECD ergab sich die Denaturierungstemperatur zu 48,1°C. Als T_{50} -Werte für IL-13R α 1-CHR bzw. -D12 ergaben sich 56,2°C bzw. 52,0°C. Damit wiesen die verkürzten IL-13R α 1-ECD-Formen sogar eine etwas höhere thermische Stabilität auf als die komplette IL-13R α 1-ECD. Damit konnte auch ausgeschlossen werden, dass der Verlust der Bindung zu IL-4 und IL-13 auf die Instabilität der gereinigten IL-13R α 1-ECD-Trunkationen zurückzuführen ist.

Die CD-spektroskopischen Untersuchungen zeigten, dass die gereinigten, verkürzten IL-13R α 1-ECD-Formen in nativ gefalteter Form und ohne verringerte thermische Stabilität vorlagen. Daher ist der Verlust der Bindeaktivität gegenüber IL-13 und IL-4 auf das Fehlen bedeutender Teile des Bindeepitops in den beiden verkürzten Varianten IL-13R α 1-CHR und -D12 zurückzuführen.

3.10 Mutagenese und Isolation von IL-13R α 1-ECD-Varianten

Es wurden insgesamt 48 IL-13R α 1-ECD-Varianten, bei denen einzelne Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht waren, exprimiert und aufgereinigt. Mit ihrer Hilfe sollte der Aufbau des funktionellen Bindeepitops der IL-13R α 1-ECD bestimmt werden. Die Positionen der Mutationen wurden in möglichen Schleifen-Regionen der IL-13R α 1-CHR gewählt, da aus den Kristallstrukturen anderer Ligand-Rezeptor-Komplexe der Klasse-I-Zytokinrezeptoren, wie z.B. IL-4R α [119] und dem Erythropoietin-Rezeptor [116], bekannt war, dass das Ligandbindeepitop aus den Aminosäureresten dieser Regionen aufgebaut ist. Die potentiellen Schleifen-Regionen A1 bis B3 wurden durch ein Vergleich der IL-13R α 1-Sequenz mit anderen Klasse-I-Zytokinrezeptoren, deren Struktur bekannt ist, ermittelt. Sie sind in Abb. 3.21 gekennzeichnet. Da nach den Interaktionsanalysen mit den verkürzten IL-13R α 1-Formen bekannt war, dass auch Teile der N-terminalen FnIII-Domäne D1 an der Bindung von IL-4 und IL-13 beteiligt sind, wurden weiterhin sieben geladene Aminosäuren in der D1-Domäne gegen Alanin getauscht, um deren Beitrag zur Ligandeninteraktion zu untersuchen. Auch diese Reste sind in Abb. 3.22 in Fettschrift hervorgehoben.

aus zwölf unabhängigen Sensorgrammen bestimmt und die Mittelwerte daraus berechnet. War es aufgrund einer zu schnellen Bindekinetik nicht möglich die kinetische Assoziations- oder Dissoziationskonstante zu bestimmen, wurde der K_D -Wert aus der konzentrationsabhängigen Gleichgewichtsbindung von IL-13 ermittelt. Die erhaltenen Bindungskonstanten für alle IL-13R α 1-ECD-Varianten sind in der folgenden Abbildung wiedergegeben.

Domäne	Loop	Variante	relative k_{on}	relative k_{off}	relative K_D
		IL13R α 1-ECD (wt)	1,0 ($7,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	1,0 ($1,8 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$)	1,0 ($25 \times 10^{-9} \text{ M}$)
D1		E56A	0,4	0,8	2,1
		D75A	0,3	0,9	3,4
		E81A	0,6	1,2	2,0
		R83A	0,2	1,7	12,9
		R84A	n.b.	n.b.	n.b.
		E106A	0,2	2,0	8,9
		E108A	0,5	3,3	6,5
D2	A1	H137A	0,6	3,3	5,8
		N138A	0,5	1,7	3,6
		L139A	n.d.	n.d.	11,1
		S140A	0,7	1,0	1,3
	A2	H164A	0,4	1,9	4,5
		R165A	0,4	1,1	2,6
		S166A	0,4	1,3	3,0
		L167A	0,7	1,6	2,3
		E168A	0,9	0,9	0,9
	A3	D188A	0,4	1,3	2,9
		L189A	0,2	1,0	3,1
		T190A	0,6	1,0	2,0
		K191A	0,9	0,9	1,0
		V192A	0,8	0,9	1,2
		K193A	0,5	1,3	2,7
		D194A	0,8	0,9	1,1
		S195A	0,6	1,2	1,7
		S196A	0,3	1,1	3,1
		F197A	0,4	1,8	4,3
		E198A	0,7	1,6	2,3
Q199A	0,5	1,4	2,7		
D3	B1	Q251A	0,4	1,2	2,7
		N252A	0,9	0,9	1,0
		F253A	n.d.	n.d.	192,8
		I254A	0,3	0,6	1,7
		S255A	0,3	0,7	2,3
		R256A	0,3	0,9	2,8
	B2	E279A	0,3	1,3	5,2
		E283A	0,4	1,2	3,0
		E286A	0,3	1,5	4,3
		E288A	0,4	1,0	2,6
		R289A	0,4	1,1	3,2
		E292A	0,3	1,2	3,7
	B3	T316A	1,1	1,0	0,9
		N317A	n.d.	n.d.	16,2
		K318A	0,8	0,7	0,8
		L319A	n.d.	n.d.	24,1
		Y321A	n.d.	n.d.	150,2
		E322A	0,2	1,4	5,4
		D323A	n.d.	n.d.	9,6
		D324A	0,2	1,5	8,0

Verhältnis der K_D -Werte (Variante/WT)	<2	2-5	5-10	10-100	>100

n.d.: nicht bestimmbar
n.b.: keine Bindung zu beobachten

Abbildung 3.23: Bindungsanalyse der IL-13R α 1-ECD-Varianten mit IL-13. In der Tabelle sind die relativen Änderungen der Bindungskonstanten für die Interaktion mit IL-13 der Rezeptorvarianten in Bezug auf die Bindungskonstanten der wildtypischen IL-13R α 1-ECD dargestellt.

Die Substitution der Aminosäuren in den Schleifen A2 und A3 durch Alanin resultierte in keinem signifikanten Verlust von Affinität zu IL-13. Keine dieser Varianten zeigt eine mehr als 5-fache Zunahme des K_D -Wertes. Daher kann angenommen werden, dass Schleife A2 und A3 der mittleren FnIII-ähnlichen Domäne D2 keinen Teil des IL-13-Bindeepitops darstellen und nicht signifikant an der Interaktion mit dem Liganden beteiligt sind. Dagegen führen die Mutationen H137A und L139A in Schleife A1 zu einem stärkeren Affinitätsverlust. Die bestimmten K_D -Werte sind für H137A sechsmal und für L139A elfmal höher als beim Wildtyp. In beiden Fällen lässt sich der Affinitätsverlust größtenteils auf einen höheren k_{off} -Wert zurückführen. Die kinetische Dissoziationskonstante von H137A ist dreimal schneller verglichen mit derjenigen der wildtypischen IL-13R α 1-ECD. Bei L139A konnte k_{off} nicht bestimmt werden, da der Wert höher als $0,1\text{s}^{-1}$ war. In Schleife B2 wurden nur geladene Aminosäurereste durch Alanin ersetzt. Der Effekt dieser Mutationen auf die IL-13-Interaktion war nicht sehr stark. Die Affinität zu IL-13 verringert sich um den Faktor 3 bis 5. Die höheren K_D -Werte beruhen hier auf einer verringerten Assoziationsgeschwindigkeit. Das lässt sich durch den Verlust einer Oberflächenladung erklären, da es dadurch zu einer Verringerung des Effekts der elektrostatischen Lenkung („electrostatic steering“ [131-133]) des Liganden zur Bindestelle kommt. Daraus resultiert eine langsamere Assoziation des Liganden an den Rezeptor. Aufgrund der geringen Effekte auf die IL-13-Bindung, welche die Mutationen in B2 zeigen, kann geschlossen werden, dass auch dieser Bereich nicht an der direkten Interaktion mit dem Liganden beteiligt ist. Als eine Hauptbindungs determinante wurde hingegen Phe253 in Schleife B1 identifiziert. Die IL-13R α 1-ECD-Variante F253A zeigte eine 200-fach geringere Affinität zu IL-13 als der Wildtyp. Der Austausch der benachbarten Reste in Schleife B1 hatte allerdings nur geringe Affinitätsänderungen zur Folge. Als weiterer Rest mit großer Bedeutung für die IL-13-Bindung wurde Tyr321 ermittelt. Der für die Variante Y321A gemessene K_D -Wert betrug $3,7\mu\text{M}$ und war damit um einen Faktor von 150 höher als bei der wildtypischen ECD. Die beiden Varianten N317A und L319A wiesen ebenfalls einen deutlichen Verlust an Affinität zu IL-13 auf. Die K_D -Werte waren 16- bzw. 24-fach erhöht. Der Austausch der drei geladenen Aminosäuren Glu322, Asp323 und Asp324, die auch Teil von B3 sind, führte zu einem 5- bis 10-fachen Affinitätsverlust. Diese Ergebnisse sind deutliche Hinweise dafür, dass Schleife B3 Bestandteil des funktionellen Bindeepitops von IL-13R α 1 ist und Tyr321 darin die Rolle einer Hauptbindungs determinante spielt. Die Mutation der Reste Glu56, Asp75 und Glu81 in der N-terminalen FnIII-ähnlichen Domäne D1 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die IL-13-Bindung. Für die Affinität der Varianten E106A und E108A zu IL-13 wurde ein 6- bis 9-fach höherer K_D -Wert ermittelt. Wurde Arg83 gegen Alanin ausgetauscht erhöhte sich die Dissoziationskonstante um den Faktor 13. Die Substitution von Arg84 mit Alanin resultierte im stärksten Affinitätsverlust aller untersuchten IL-13R α 1-ECD-Mutante. Bis zu einer getesteten IL-13-Konzentration von $4\mu\text{M}$ konnte mit der SPR-Technologie keine spezifische Bindung zwischen R84A und IL-13 nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass der K_D -Wert durch den Aminosäureaustausch mindestens bis in den hohen mikromolaren Bereich angestiegen ist. Das Arginin an Position 84 ist unverzichtbar für die Bindung zwischen der IL-13R α 1-Kette und IL-13. Fehlt dieses Arginin lässt

sich keine Interaktion mehr zwischen der Rezeptorkette und dem Liganden beobachten. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit der Tatsache überein, dass keine Bindung zwischen IL-13 und der verkürzten Rezeptorvariante IL-13R α 1-CHR nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Aminosäurereste Arg84, Phe253 und Tyr321 als Hauptbindungs determinanten der IL-13R α 1-ECD für die Interaktion mit IL-13 ermittelt werden konnten. Diese Reste befinden sich in den FnIII-ähnlichen Domänen D1 und D3 des extrazellulären Teils von IL-13R α 1. Daher muss das Liganden-Bindeepitop aus Teilen von D1 und D3 zusammengesetzt sein, worauf auch schon die Interaktionsanalysen mit den beiden verkürzten Rezeptorformen IL-13R α 1-CHR und -D12 hingedeutet haben.

3.12 CD-Spektroskopie der IL-13R α 1-ECD-Varianten mit stark verminderter Affinität zu IL-13

Von den IL-13R α 1-ECD-Varianten R84A, F253A und Y321A wurden CD-Spektren aufgenommen (vgl. 2.10). Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass der Verlust der Affinität zu IL-13 auf eine falsche Proteinfaltung zurückzuführen ist. Die Ausbildung der Sekundärstrukturelemente sollte mit der wildtypischen IL-13R α 1-ECD verglichen werden. Die erhaltenen CD-Spektren sind in Abb. 3.24A dargestellt.

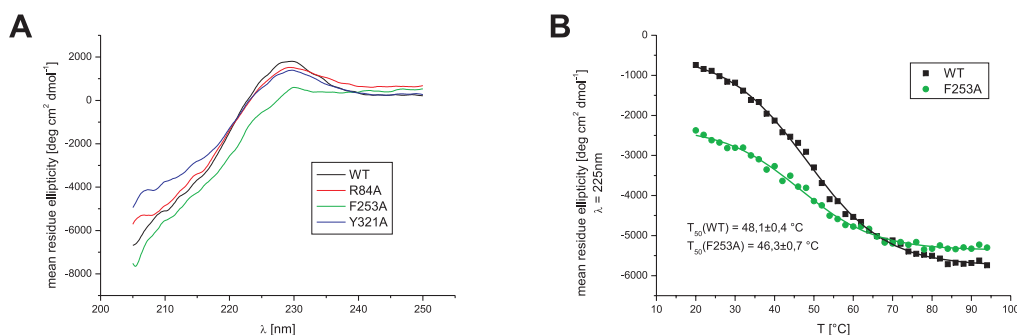


Abbildung 3.24 CD-Spektroskopie der IL-13R α 1-ECD-Varianten mit stark verminderter IL-13-Affinität
A: CD-Spektren von IL-13R α 1-ECD, -R84A, F253A und -Y321A im Wellenlängenbereich 205-250nm bei 20°C
B: Thermische Schmelzkurven von IL-13R α 1-ECD und -F253A im Temperaturbereich 20-96°C bei einer Wellenlänge von 225nm.

Die aufgenommenen CD-Spektren der Varianten R84A und Y321A zeigen bis auf leichte Abweichungen den gleichen Verlauf wie das Spektrum der wildtypischen IL-13R α 1-ECD. Daher ist davon auszugehen, dass diese beiden Muteine in gleicher Weise wie das Wildtypprotein gefaltet sind. Der starke Affinitätsverlust zu IL-13 liegt damit im funktionellen Austausch der Reste Arg84 bzw. Tyr321 zu Alanin und nicht in einer falschen dreidimensionalen Faltung begründet. Das CD-Spektrum der Variante F253A weicht am stärksten vom Wildtypspektrum ab. Dieser Unterschied war jedoch

auch zu erwarten, da mit Phe253 eine aromatische Seitenkette entfernt wurde, was einen starken Einfluss auf die Absorption des Proteins im UV-Bereich hat. Da der Verlauf des CD-Spektrums von F253A dennoch große Ähnlichkeit zu den anderen, gemessenen Spektren hat, kann davon ausgegangen werden, dass die Sekundärstrukturmerkmale korrekt ausgebildet sind. Zusätzlich wurde noch die thermische Stabilität der F253A-Variante überprüft. Dazu wurde wie unter 2.10 beschrieben die Schmelzkurve des Proteins (Abb. 3.24B) aufgenommen. Die spezifische Denaturierungstemperatur T_{50} von F253A ergab sich zu 46,3°C und war damit nahezu identisch mit dem T_{50} -Wert der wildtypischen IL-13R α 1-ECD. Die CD-spektroskopischen Untersuchungen der IL-13R α 1-ECD-Varianten mit stark verminderter Affinität zu IL-13 zeigten somit, dass dieser Effekt nicht auf eine inkorrekte Proteinfaltung oder verringerte Stabilität zurückzuführen ist, sondern durch den Verlust einer der drei Hauptbindungs determinanten Arg84, Phe253 oder Tyr321 verursacht wird.

3.13 Strukturmodell der IL-13R α 1-ECD

Mit Hilfe der aus den Interaktionsanalysen zwischen IL-13 und den IL-13R α 1-ECD-Varianten gewonnenen Informationen zum Bindeepitop und aufbauend auf veröffentlichten Kristallstrukturen verwandter Rezeptoren wurde ein Strukturmodell der IL-13R α 1-ECD erstellt.

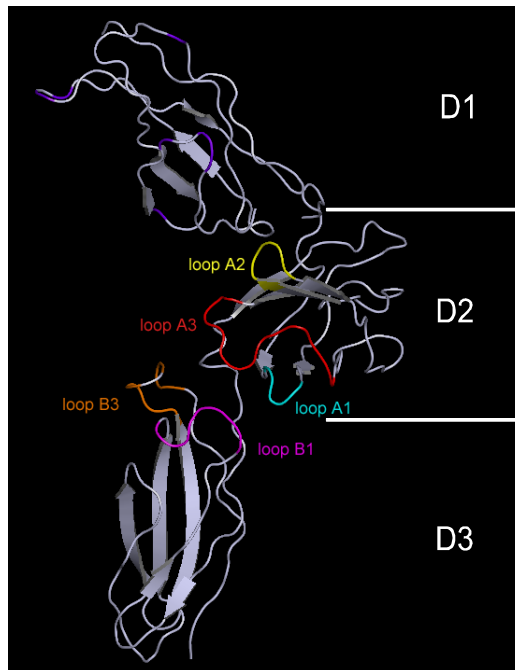


Abbildung 3.25: Strukturmodell der IL-13R α 1-ECD. Die Unterteilung der ECD in drei FnIII-ähnliche Domänen D1-D3 ist deutlich zu erkennen. Die Loop-Bereiche in denen die Aminosäureaustausche zu Alanin durchgeführt wurden, sind farblich hervorgehoben. Die mutierten, geladenen Aminosäuren in Domäne D1 sind lila abgesetzt.

Im Modell (Abb. 3.24) ist die Unterteilung der IL-13R α 1-ECD in drei einzelne FnIII-ähnliche Domänen D1, D2 und D3 zu erkennen. D2 und D3 zeigen eine klassische CHR-Faltung wie sie aus den experimentellen Strukturen von IL-4R α [119], IL-2R β und γ_c [118] bekannt ist. Bei den genannten Rezeptorketten befindet sich die Ligandenbindestelle im Übergangsbereich zwischen den beiden FnIII-ähnlichen Domänen. In diesem Bereich befinden sich auch die durch die Mutagenese untersuchten Schleifen-Bereiche A1-B3. Die zusätzliche FnIII-ähnliche Domäne D1 ist in Richtung der potentiellen IL-13-Bindestelle orientiert, da nach den Interaktionsanalysen mit den verkürzten IL-13R α 1-ECD-Varianten davon auszugehen war, dass D1 an der Ligandenbindung beteiligt ist. Darin unterscheidet sich das Strukturmodell der IL-13R α 1-ECD von den Kristallstrukturen von IL-6R α und gp130. Die N-terminal an die CHR anschließende Domäne der IL-6R α -ECD weist von der Ligandenbindestelle weg [152]. Eine ähnliche Situation findet man bei gp130. Dort zeigt die D1-Domäne ebenfalls von der CHR weg und geht Kontakte mit einem zweiten IL-6-Liganden und einer

IL-6R α -Kette ein [128]. Dadurch kommt es zur Bildung eines hexameren Komplexes aus jeweils zwei gp130- und IL-6R α -Rezeptorketten und zwei IL-6-Liganden.

Zur Lokalisation der Interaktionsfläche mit IL-13 wurden die zu Alanin ausgetauschten Reste entsprechend ihres Einflusses auf die Affinität zu IL-13 im Strukturmodell farblich markiert (Abb. 3.26).

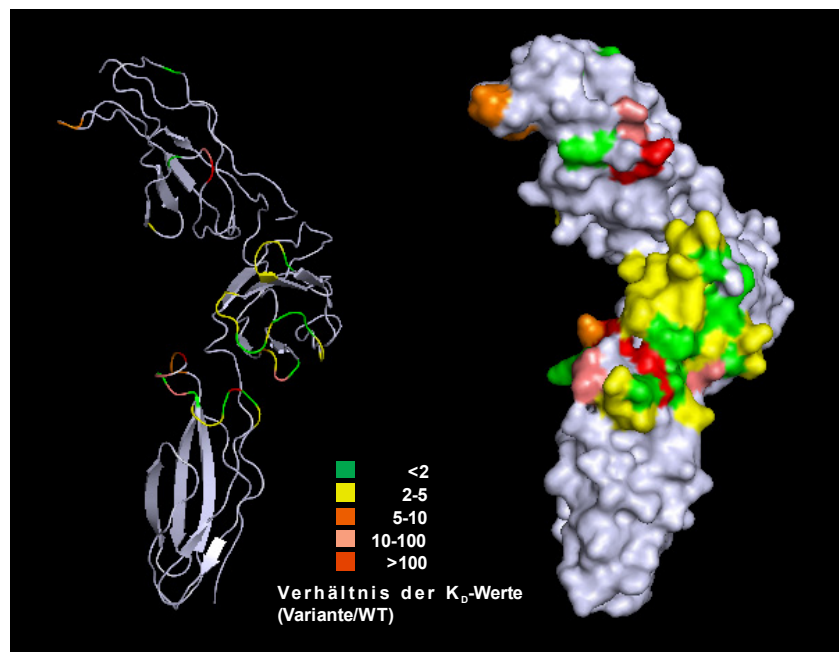


Abbildung 3.26: Einfluss der Alanin-Substitutionen auf die Affinität zu IL-13 im Strukturmodell der IL-13R α 1-ECD. Modellstruktur von IL-13R α 1-ECD in der Banddarstellung (links) und als raumfüllende Darstellung (rechts). Die mutierten Reste sind entsprechend ihres Effektes auf die Affinität zu IL-13 farblich markiert.

In der raumfüllenden Darstellung ist gut zu erkennen, dass nahezu die komplette Oberfläche im Bereich zwischen den Domänen D2 und D3 durch die Mutagenesestudie abgedeckt wurde. Bis auf den Rest Leu139 befinden sich alle Aminosäuren, deren Austausch zu Alanin zu einem Anstieg des K_D -Wertes um mehr als das zehnfache führte, in Domäne D1 oder D3. An der Interaktion mit dem Liganden scheint die Domäne D2 der IL-13R α 1-ECD daher nur in sehr geringem Maße beteiligt zu sein. Die Reste Phe253, Asn317, Leu319 und Tyr321 der Domäne D3, deren Austausch zum größten Affinitätsverlust gegenüber IL-13 führte, befinden sich in räumlicher Nähe zueinander im oberen Bereich von D3 und bilden zusammen einen Teil der Interaktionsfläche zu IL-13. Die an der IL-13-Bindung beteiligten Aminosäurereste in Domäne D1 sind auf der, der CHR zugewendeten Seite lokalisiert, wo sie einen weiteren Teil des IL-13-Bindeepitops bilden.

Um die Relevanz des aufgestellten Strukturmodells der extrazellulären Domäne von IL-13R α 1 weiter zu überprüfen, wurde versucht, den Ligand IL-13, in zur Rezeptorkette gebundenem Zustand, in das Modell mit aufzunehmen. Dafür wurde die NMR-Struktur von IL-13 verwendet [64, 65]. Es sollte gezeigt werden, ob die durch Mutagenesestudien ermittelte Bindedeterminanten von IL-13 in Kontakt

mit den potentiellen Bindestellen des IL-13R α 1-ECD-Strukturmodells treten können. Die Aminosäuren Glu16, Lys90, Ile91, Glu92, Lys105 und Arg109 von IL-13 wurden in anderen Studien als wichtige Reste für die Interaktion mit der IL-13R α 1-Kette identifiziert [153, 154]. Diese Reste sind in Abbildung 3.26 in Stäbchenform dargestellt. Auf der Seite der IL-13R α 1-ECD sind die Reste hervorgehoben, deren Austausch mit Alanin die Affinität zu IL-13 mindestens um den Faktor 5 verringert.

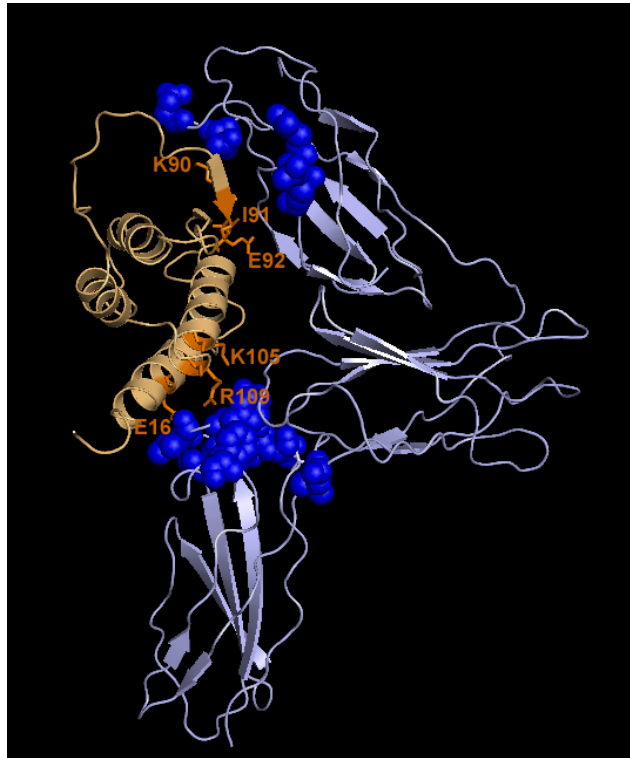


Abbildung 3.27: Strukturmodell des Komplexes aus IL-13 und der IL-13R α 1-ECD. Möglicher Aufbau des Komplexes aus IL-13 (gelb) und der IL-13R α 1-ECD (blau). Die bekannten Bindedeterminanten von IL-13 (E16, K90, I91, E92, K105 und R109) sind in Stäbchenform dargestellt. Die in dieser Arbeit identifizierten Bindedeterminanten auf Seite der IL-13R α 1-ECD sind in Kugeldarstellung hervorgehoben.

In Abbildung 3.27 wird deutlich, wie gut sich das IL-13R α 1-ECD-Strukturmodell, die Ergebnisse der Interaktionsanalyse mit den IL-13R α 1-Alanin-Varianten und die bekannte Struktur von IL-13 in Übereinstimmung bringen lassen. Der Ligand sitzt mit α -Helix D und α -Helix A auf dem oberen Teil der Domäne D3 in der CHR der Rezeptorkette. Die Domäne D1 ist zum Liganden hin orientiert und fixiert diesen von oben. Die IL-13-Reste Glu16, Lys105 und Arg109 bilden die möglichen Interaktionspartner für die an der Ligandenbindung beteiligten Reste der Domäne D3. Die IL-13-Reste Lys90, Ile91 und Glu92 sind Teil des β -Faltblattes am N-terminalen Ende der α -Helix D. Die Seitenketten dieser Aminosäuren sind im Strukturmodell des Komplexes zur Domäne D1 der IL-13R α 1-ECD hin orientiert. Mögliche Interaktionspartner auf der Rezeptorkette sind Arg83 und Arg84.

Das Strukturmodell des IL-13/IL-13R α 1-Komplexes steht somit in guter Übereinstimmung zu den experimentellen Befunden der Interaktionsanalysen mit den IL-13R α 1-Alanin-Mutanten. Die Domäne D1 ist maßgeblich an der Bindung von IL-13 beteiligt und ein weiterer großer Teil des Bindeepitops wird von Domäne D3 mit den Hauptbindeterminanten Phe253 und Tyr321 gebildet.

3.14 IL-13-Mutagenese zur Identifikation von Domäne D1-Interaktionspartnern

Mit Hilfe des Strukturmodells des IL-13/IL-13R α 1-Komplexes wurde nun versucht, bisher unbekannte Bindedeterminanten von IL-13 zu identifizieren, die an der Wechselwirkung mit der Domäne D1 der IL-13R α 1-ECD beteiligt sind. Aufgrund der Seitenkettenorientierung von Met34, Trp36 und Thr89 (vgl. Abb. 3.28) wurden diese Reste als mögliche Interaktionspartner der Domäne D1 für eine Mutagenesestudie ausgewählt.

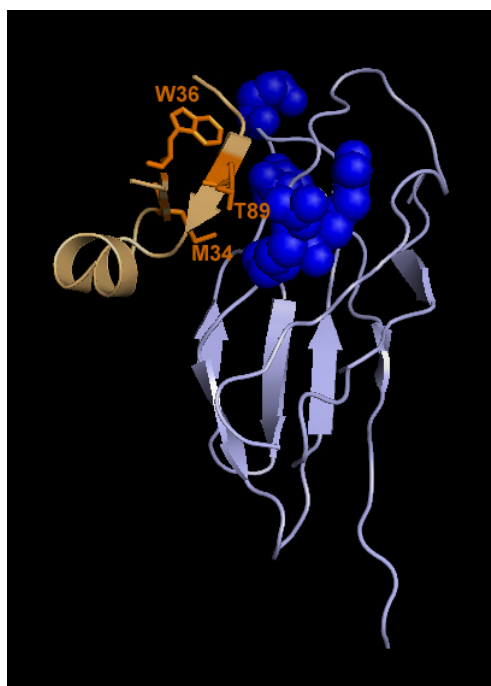


Abbildung 3.28: Ausschnitt des IL-13/IL-13R α 1-Strukturmodells. Die IL-13-Reste M34, W36 und T89 (orange) sind mögliche Interaktionspartner der D1-Domäne (blau) von IL-13R α 1.

Die genannten Reste wurden gegen Alanin ausgetauscht, um ihre Beteiligung an der Interaktion mit IL-13R α 1-ECD durch BIAcore-Messungen zu überprüfen. Die Mutationen wurden mit der QuikChange-Methode (Stratagen) wie unter 2.6 beschrieben in das Expressionsplasmid pET-28b[IL-13] eingefügt. Die verwendeten Mutageneseprimer sind in Abschnitt 2.2.5.2 aufgeführt. Die Expression und Aufreinigung erfolgte auf die gleiche Art und Weise wie für das wildtypische IL-13 unter 3.1 ausgeführt. Es wurde jedoch auf die Abspaltung des N-terminalen 6xHis-Tags durch

Thrombin verzichtet, da Experimente zeigten, dass 6xHis-Tag keinen Einfluss auf die Bindung an die IL-13R α 1-ECD hat. Wie auf dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel in Abbildung 3.29 zu sehen ist, konnten die drei IL-13-Varianten M34A, W36A und T89A bis zu einem sehr hohen Grad aufgereinigt werden. Die Ausbeuten pro Liter eingesetztem TB-Medium lagen zwischen 3,5mg und 6mg.

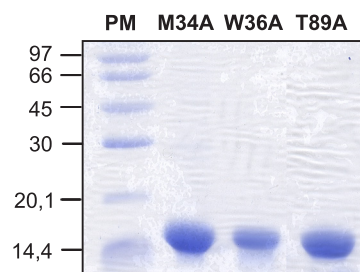


Abbildung 3.29: SDS-PAGE-Analyse der gereinigten IL-13-Varianten M34A, W36A und T89A. Alle IL-13-Varianten konnten soweit aufgereinigt werden, dass keine Verunreinigungen im Coomassie-gefärbten Gel nachgewiesen werden konnten.

Um den korrekten Aminosäureaustausch in den gereinigten IL-13-Varianten zu überprüfen, wurde deren Molekulargewicht massenspektroskopisch ermittelt. Die erhaltenen Massen sind in Tabelle 3.3 im Vergleich zu den theoretisch ermittelten Werten angegeben.

IL-13-Variante	M_W [Da]	$M_{W \text{ theoretisch}}$ [Da]
M34A	14443,377	14444,721
W36A	14388,776	14388,338
T89A	14473,878	14474,372

Tabelle 3.3: Massenspektrometrische Analyse der IL-13-Varianten

Bei allen aufgereinigten IL-13-Varianten entsprach das experimentell ermittelte Molekulargewicht dem theoretischen Wert. Damit war sichergestellt, dass die IL-13-Varianten mit den gewünschten Aminosäuresubstitutionen exprimiert wurden.

Nun wurde getestet, ob die IL-13-Seitenketten Met34, Trp36 und Thr89 wirklich, wie anhand des IL-13/IL-13R α 1-Komplexmodells vermutet, an der Bindung an die IL-13R α 1-ECD und der Interaktion mit der Domäne D1 beteiligt sind. Dazu wurden erneut SPR-Untersuchungen durchgeführt. Es wurden ca. 700RU der biotinylierten IL-13R α 1-ECD auf einem mit Streptavidin-beschichteten CM5-Sensorchip immobilisiert. Zur Bestimmung der Affinität der IL-13-Varianten aus der konzentrationsabhängigen Gleichgewichtsbindung, wurden die Liganden in Konzentrationen von 40nM bis 3,6 μ M als Analyt in HBS300-Puffer über die wildtypische IL-13R α 1-ECD gespült. Die dabei erhaltenen K_D -Werte sind in Tabelle 3.4 aufgeführt.

IL-13-Variante	K _D [nM]	relative K _D (Variante/WT)
WT	32	1
M34A	523	16,3
W36A	314	9,8
T89A	51	1,6

Tabelle 3.4: Interaktionsanalyse von IL-13-Varianten mit IL-13R α 1-ECD. In der Tabelle sind die, durch die konzentrationsabhängige Gleichgewichtsbindung ermittelten K_D-Werte für die Interaktion zwischen den IL-13-Varianten und immobilisierter IL-13R α 1-ECD angegeben. In der rechten Spalte sind die relativen Affinitätsänderungen der IL-13-Varianten im Bezug auf die K_D mit wildtypischem IL-13 aufgeführt.

Der Austausch von Thr89 zu Alanin führte nicht zu einer signifikanten Abnahme der Affinität von IL-13 zur IL-13R α 1-ECD. Die Varianten M34A und W36A zeigten dagegen einen 16- bzw. 10-fach höheren K_D-Wert für die Interaktion mit der IL-13R α 1-Rezeptorkette als der wildtypische IL-13-Ligand (Tabelle 3.4). Mit den Resten Met34 und Trp36 konnten somit zwei neue Hauptbindeterminanten von IL-13 identifiziert werden, die an der Interaktion mit der Domäne D1 der IL-13R α 1-ECD beteiligt sind. Damit konnte die Ergebnisse der Experimente mit den unterschiedlichen IL-13R α 1-Varianten und das darauf aufbauende IL-13/IL-13R α 1-ECD-Strukturmodell nochmals bestätigt werden. Das CHR-Motiv des IL-13R α 1-Rezeptors ist für die Bindung von IL-13 nicht ausreichend. Die N-terminale FnIII-ähnliche Domäne ist von unverzichtbarer Bedeutung für die hochaffine Interaktion mit IL-13 und bildet einen großen Teil des Ligandenbindeepitops.

3.15 Interaktionsanalyse der IL-13R α 1-ECD-Muteine mit IL-4

Um zu untersuchen, ob sich das Epitop für die Bindung von IL-4 auf der IL-13R α 1-ECD von dem für IL-13 unterscheidet, wurde die Affinität aller isolierten Alaninsubstitutionsvarianten von IL-13R α 1-ECD zu IL-4 bestimmt. Diese Interaktionsanalysen wurden wieder mit der SPR-Technologie durchgeführt. Wie auch bei der Interaktionsanalyse mit IL-13 wurden die IL-13R α 1-ECD-Varianten auf der Sensorchipoberfläche immobilisiert. Als Analyt wurde ein Komplex aus IL-4R α -ECD und der superagonistischen IL-4-Variante F82D in Konzentrationen von 1 μ M bis 9 μ M eingesetzt. Dieser Komplex wurde durch Mischen von äquimolaren Mengen der IL-4R α -ECD und von IL-4-F82D hergestellt. Da die Affinität von IL-4-F82D zur IL-4R α -ECD bei ca. 30 pM liegt und die Interaktion eine kinetische Dissoziationsrate k_{off} von $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ aufweist, wurde davon ausgegangen, dass die Dissoziation der IL-4-Varianten von IL-4R α im Vergleich zur Interaktion des Komplexes mit der immobilisierten IL-13R α 1-ECD vernachlässigt werden kann. Die aufgenommenen Sensorgramme für die Bindung des IL-4-F82D/IL-4R α -Komplexes an immobilisierte IL-13R α 1-ECD sind in Abbildung 3.30 dargestellt.

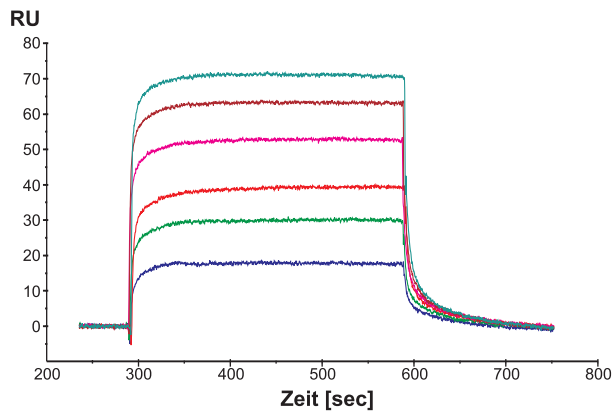


Abbildung 3.30: BIAcore-Analyse der Interaktion zwischen IL-13R α 1-ECD und einem Komplex aus IL-4-F82D und IL-4R α -ECD. Auf dem Chip wurden ca. 700RU der biotinylierten IL-13R α 1-ECD immobilisiert. Die Bindung des IL-4-F82D/IL-4R α -Komplexes an die IL-13R α 1-ECD wurde mit unterschiedlichen Komplex-Konzentrationen (1, 2, 3, 5, 7 und 9 μ M) untersucht. Aus der Gleichgewichtsbindung ließ sich ein K_D -Wert von ca. 7,5 μ M für die Interaktion zwischen IL-13R α 1-ECD und dem IL-4/IL-4R α -Komplex ermitteln.

Es konnte eine deutliche, konzentrationsabhängige und spezifische Bindung des vorgeformten IL-4-F82D/IL-4R α -ECD-Komplexes an die immobilisierte IL-13R α 1-ECD beobachtet werden. Aus der Konzentrationsabhängigkeit der Gleichgewichtsbindung konnte für die beschriebene Interaktion ein K_D -Wert von ca. 7,5 μ M ermittelt werden. Die mit dem beschriebenen Versuchsprotokoll erhaltenen Affinitäten entsprechen nicht den tatsächlich in einer biologischen Membran auftretenden Werten. Der Vergleich der gemessenen Affinitäten der verschiedenen Alanin-Varianten mit dem Wert der wildtypischen IL-13R α 1-ECD, gibt jedoch einen Hinweis auf den Einfluss einzelner Aminosäurereste auf die Interaktion mit IL-4. Die erhaltenen K_D -Werte für die Interaktion mit dem IL-4-F82D/IL-4R α -ECD-Komplex der einzelnen IL-13R α 1-ECD-Varianten und deren relative Affinitätsänderung im Vergleich zur wildtypischen Rezeptor-ECD sind in der folgenden Abbildung 3.31 wiedergegeben.

Domäne	Loop	Variante	relative K_D
		IL13R α 1-ECD (wt)	1,0 ($7,5 \times 10^{-6}$ M)
D1		E56A	0,8
		D75A	1,1
		E81A	0,8
		R83A	0,5
		R84A	n.b.
		E106A	0,6
		E108A	0,9
D2	A1	H137A	3,9
		N138A	4,4
		L139A	n.b.
		S140A	1,5
	A2	H164A	2,4
		R165A	1,0
		S166A	1,6
		L167A	1,1
		E168A	0,8
	A3	D188A	1,2
		L189A	2,0
		T190A	1,4
		K191A	0,9
		V192A	0,6
		K193A	0,7
		D194A	0,7
		S195A	1,3
		S196A	1,2
		F197A	1,8
E198A	1,2		
Q199A	0,7		
D3	B1	Q251A	0,9
		N252A	1,0
		F253A	n.b.
		I254A	1,3
		S255A	1,0
		R256A	0,8
	B2	E279A	0,9
		E283A	1,4
		E286A	1,4
		E288A	1,6
		R289A	1,5
		E292A	1,8
	B3	T316A	0,6
		N317A	n.b.
		K318A	1,7
		L319A	n.b.
		Y321A	n.b.
		E322A	0,4
		D323A	1,0
D324A		2,0	

Verhältnis der K_D -Werte		
(Variante/WT)	<5	∞

n.b.: keine Bindung zu beobachten

Abbildung 3.31: Bindungsanalyse der IL-13R α 1-ECD-Varianten mit IL-4. In der Tabelle sind die relativen Änderungen der Bindungskonstanten für die Interaktion mit dem IL-4-F82D/IL-4R α -Komplex der Rezeptorvarianten in Bezug auf die Bindungskonstanten der wildtypischen IL-13R α 1-ECD dargestellt.

Eine Substitution der Aminosäuren in Schleife A2 und A3 durch Alanin führte zu keiner signifikanten Abnahme der Affinität zu IL-4. Da keine der Varianten eine mehr als zweifache Erhöhung des K_D -Wertes zeigte, kann angenommen werden, dass die Aminosäurereste in Schleife A2 und A3 der Domäne D2 weder direkt an der Bindung von IL-4, noch an der Interaktion mit IL-13 beteiligt sind. Die Mutation L139A in Schleife A1 führte dagegen zum vollständigen Verlust der Bindung zum IL-4-F82D/IL-4R α -ECD-Komplex. Im Falle der Interaktion mit IL-13 zeigte die Variante L139A eine ca. 11-fache Reduktion der Affinität. Keinen Einfluss auf die Bindeeigenschaften zu IL-4 hatte der Austausch der Aminosäuren in Schleife B2. Für die IL-13R α 1-ECD-Varianten N317A, L319A und Y321A in Schleife B3 konnte keine Bindung an IL-4 nachgewiesen werden. Diese Varianten zeigten bereits für die Interaktion mit IL-13 einen 16- bis 150-fachen Affinitätsverlust und Tyr321 wurde als eine der drei Hauptbindungs determinanten für IL-13 identifiziert. Das Ersetzen von Phe253 in der IL-13R α 1-ECD durch Alanin resultierte auch im Verlust der nachweisbaren Bindung des IL-4-F82D/IL-4R α -Komplexes. Der Rest Phe253 war, wie Tyr321 bereits zuvor, als sehr wichtige Determinante für die Interaktion mit IL-13 bestimmt worden. Bei den Substitutionsvarianten der IL-13R α 1-ECD die Reste der Domäne D1 betrafen, zeigte nur R84A einen signifikanten Effekt auf die IL-4-Bindung. Es konnte für R84A keine Bindung an den IL-4-F82D/IL-4R α -ECD-Komplex beobachtet werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass für alle IL-13R α 1-Varianten mit Ausnahme von R83A, die einen mehr als 10-fachen Affinitätsverlust zu IL-13 zeigten, keinerlei Bindung an den Komplex aus IL-4-F82D und IL-4R α -ECD nachgewiesen werden konnte. Die K_D -Werte der Interaktion dieser Varianten mit IL-4 müssen sich daher im Vergleich zu wildtypischer IL-13R α 1-ECD in den hohen mikromolaren Bereich verschoben haben. Daraus kann gefolgert werden, dass die Bindeepitope der IL-13R α 1-Kette für IL-4 und IL-13 nicht völlig unterschiedlich sind, sondern vielmehr strukturell und auch energetisch ähnliche Wechselwirkungen ausbilden. Dadurch, dass für die R84A-Variante und die IL-13R α 1-CHR keine Bindung von IL-4 beobachtet werden konnte, lässt sich schließen, dass die Domäne D1 des extrazellulären Teils von IL-13R α 1 ebenso wie im Falle von IL-13 von großer Bedeutung für die Ligandenbindung ist.

3.16 Strukturmodell des Komplexes aus IL-4 und der IL-13R α 1-ECD

Es sollte nun überprüft werden, ob sich die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen den IL-13R α 1-ECD-Varianten und IL-4 mit dem IL-13R α 1-ECD-Strukturmodell und bereits bekannten Bindungsdeterminanten von IL-4 in Einklang bringen lassen. Da die Struktur von IL-4 [58-61, 119] eine große Homologie zu der IL-13-Struktur aufweist, war es möglich, durch das Ersetzen von IL-13 im IL-13/IL-13R α 1-Strukturmodell durch IL-4 ein Modell des IL-4/IL-13R α 1-ECD-Komplexes zu erhalten (Abb. 3.32). Durch Mutagenesestudien sind die an der Bindung der niederaffinen

Rezeptorkette beteiligten Reste der sog. „site 2“ von IL-4 bekannt. Es handelt sich dabei um die Aminosäuren Ile11, Arg121, Tyr124 und Ser125 [130, 155], die im Modell in Stäbchenform dargestellt sind. Bei der IL-13R α 1-ECD sind die Aminosäuren hervorgehoben, deren Austausch zu Alanin zu einem Verlust der nachweisbaren Bindung an IL-4 führte.

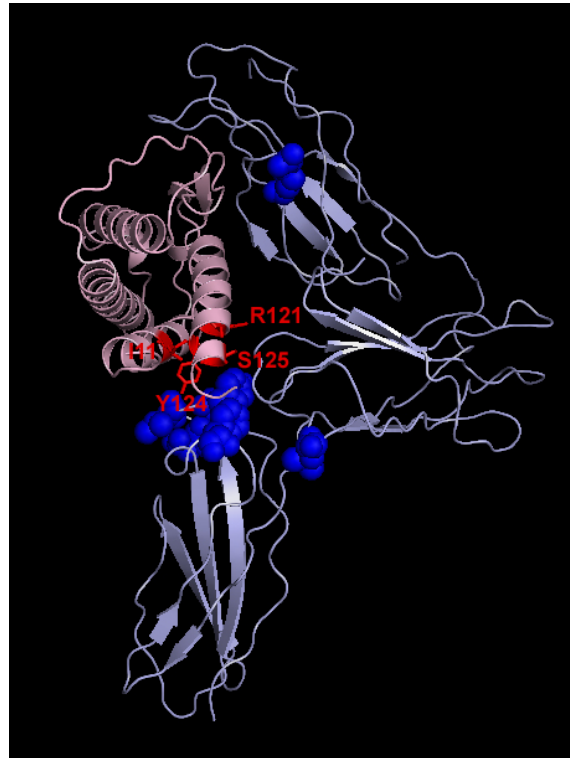


Abbildung 3.32: Strukturmodell des Komplexes aus IL-4 und der IL-13R α 1-ECD. Möglicher Aufbau des Komplexes aus IL-4 (rot) und der IL-13R α 1-ECD (blau). Die bekannten Bindedeterminanten von IL-4 (I11, R121, Y124 und S125) sind in Stäbchenform dargestellt. Die in dieser Arbeit identifizierte Bindedeterminanten auf Seite der IL-13R α 1-ECD sind in Kugeldarstellung hervorgehoben.

Abbildung 3.32 zeigt deutlich, dass sich die Ergebnisse der Mutagenese- und Interaktionsstudien sehr gut mit dem Strukturmodell decken. Ile11, Arg121, Tyr124 und Ser125 liegen den an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäuren der Domäne D3 von IL-13R α 1 direkt gegenüber. Die α -Helices A und D von IL-4 interagieren mit der CHR von IL-13R α 1 in ähnlicher Weise wie auch für γ_C angenommen [130]. Die Beteiligung der N-terminale Domäne der CHR an der IL-4-Bindung scheint jedoch bei der IL-13R α 1-ECD im Vergleich mit γ_C deutlich geringer zu sein. Stattdessen bildet IL-4 Kontakte zur Domäne D1 der IL-13R α 1-Kette aus, die in der γ_C -Kette nicht vorhanden ist. Die Aminosäuren, die das Bindeepitop für die D1-Domäne bilden, wurden jedoch noch nicht identifiziert. Das Strukturmodell legt nahe, dass es sich dabei evtl. um Reste im β -Faltblatt von IL-4, wie z.B. Asn105, Gln106 oder Ser107 handelt.

3.17 Interaktionsanalyse mit super-agonistischen

IL-4-Varianten

Nach den zuvor beschriebenen Untersuchungen zur Wechselwirkung der beiden Interleukine IL-4 und IL-13 mit der IL-13R α 1-Kette, sollte im Folgenden die Interaktion der Liganden mit der zweiten Untereinheit des IL-4-Typ-II-Rezeptors, der IL-4R α -Kette beschrieben werden.

Durch Mutagenesestudien wurden zwei IL-4-Varianten bekannt, die eine höhere Affinität zu IL-4R α aufwiesen als wildtypisches IL-4 [156]. Dabei handelt es sich um die Varianten IL4-T13D und IL4-F82D. Das kinetische Bindeverhalten dieser super-agonistischen IL-4-Formen zur IL-4R α -ECD wurde durch BIAcore-Interaktionsexperimente analysiert. Dazu wurden zwischen 50RU und 120RU einer biotinylierten IL-4R α -ECD auf einem mit Streptavidin beschichteten CM5-Sensorchip immobilisiert. Die IL-4-Varianten wurden in sechs unterschiedlichen Konzentrationen (2 – 20nM) als Analyt eingesetzt. Die erhaltenen Bindekonstanten sind in Tabelle 3.5 wiedergegeben.

IL-4-Variante	$k_{on} \times 10^{-7} [s^{-1}M^{-1}]$	$k_{off} \times 10^3 [s^{-1}]$	$K_D [nM]$	relative K_D (Variante/WT)
WT	1,32	1,26	0,10	1,0
T13D	1,27	0,46	0,04	0,4
F82D	1,61	0,46	0,03	0,3
T13D-F82D	1,19	1,40	0,12	1,2

Tabelle 3.5: Interaktionsanalyse super-agonistischer IL-4-Varianten mit IL-4R α -ECD. Die kinetischen Bindekonstanten k_{on} und k_{off} sind Mittelwerte aus 18 unabhängigen Messungen mit sechs unterschiedlichen Analytkonzentrationen (2 - 20nM). In der rechten Spalte sind die relativen Affinitätsänderungen der IL-4-Varianten im Bezug auf die K_D mit wildtypischem IL-4 aufgeführt.

Die gemessene Affinität von IL4-T13D und IL4-F82D zur IL-4R α -ECD betrug 0,04nM bzw. 0,03nM (Tabelle 3.5). Diese Werte sind etwa zwei- bis dreimal niedriger als für die Interaktion von wildtypischem IL-4 mit der IL-4R α -Kette bestimmt. Die Affinitätszunahme lässt sich in beiden Fällen nahezu ausschließlich auf eine reduzierte kinetische Dissoziationsrate k_{off} zurückführen. Der k_{off} -Wert für die Dissoziation des IL-4 von der immobilisierten IL-4R α -ECD wurde zu ca. $1,3 \cdot 10^{-3} s^{-1}$ bestimmt und ist somit etwa zwei- bis dreimal schneller als für IL4-T13D und -F82D (vgl. Tabelle 3.5; Abb. 3.33A). Die kinetischen Assoziationsraten k_{on} wurden durch die Mutationen T13D und F82D jedoch nicht beeinflusst (Tabelle 3.5). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die, für die IL-4 – IL-4R α -Interaktion beobachteten elektrostatischen Lenkungseffekte („electrostatic steering“ [131-133]), durch das Einfügen eines sauren Aminosäurerestes in α -Helix C von IL-4 nicht verändert wurden. Aufgrund der Tatsache, dass die höhere Affinität hauptsächlich auf einer Änderung der Dissoziation beruht, kann man schließen, dass das Ersetzen von Thr13 bzw. Phe82 durch Asparaginsäure zu einer Stabilisierung des IL-4/IL-4R α -Komplexes führt. Das deutete auf die Ausbildung zusätzlicher nicht-kovalenter Wechselwirkungen zwischen den IL-4-Superagonisten und der IL-4R α -ECD hin.

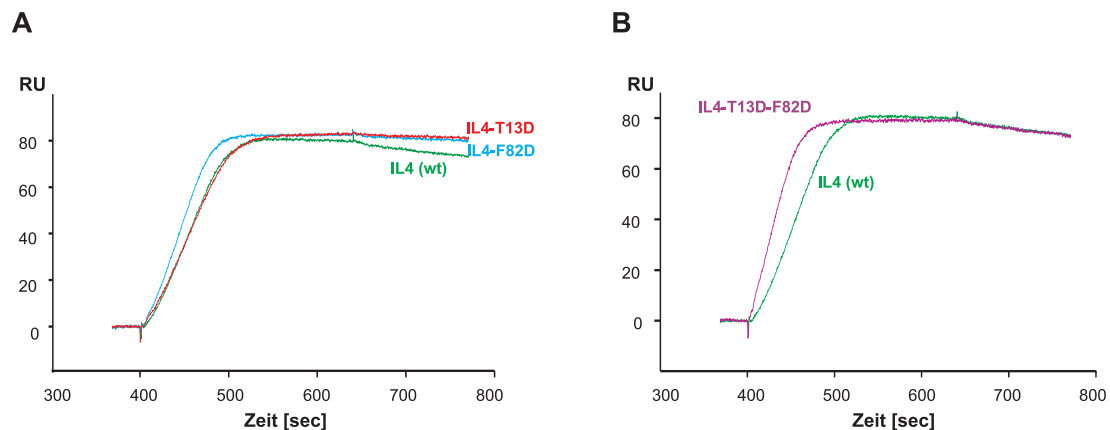


Abbildung 3.33: BIAcore-Analyse der super-agonistischen IL-4-Varianten. Die in den Sensorgrammen angegebenen IL-4-Varianten wurden in einer Konzentration von 10nM über immobilisierte IL-4R α -ECD gespült. **A:** Im Vergleich zum wildtypischen IL-4 zeigen die Varianten T13D und F82D eine höhere Affinität zur IL-4R α -ECD aufgrund einer etwa dreimal langsameren Dissoziation. **B:** Die IL-4-Variante T13D-F82D zeigt dagegen eine wildtypische kinetische Dissoziationsrate k_{off} .

Um zu überprüfen, ob sich die Effekt der beiden IL-4-Mutationen T13D und F82D möglicherweise addieren lassen, wurde die Doppelvariante IL4-T13D-F82D kloniert und exprimiert. Entgegen den Erwartungen zeigte diese Variante in BIAcore-Experimenten keine höhere Affinität zu IL-4R α als die Varianten IL4-T13D bzw. -F82D. Der K_D -Wert der Doppelvariante T13D-F82D lag mit 0,12nM vielmehr auf dem Niveau von wildtypischem IL-4 (Tabelle 3.5). Besonders die kinetische Dissoziationsrate k_{off} von IL4-T13D-F82D weist wildtypischen Charakter auf (Abb. 3.33B). Diese Ergebnisse zeigten, dass die beiden Aminosäureaustausche T13D und F82D in IL-4 nicht auf kooperative Weise wirken. Vielmehr heben sich die thermodynamischen Stabilisierungseffekte der Einzelmutationen in der IL-4-Doppelvariante T13D-F82D gegenseitig auf. Ein Grund hierfür liegt möglicherweise darin, dass beide IL-4-Superagonisten den gleichen Bindemechanismus benutzen.

3.18 Strukturanalyse der IL-4-Superagonisten

Um einen detaillierten Einblick in den molekularen Mechanismus zu gewinnen, durch den die Aminosäureaustausche T13D und F82D in IL-4 zu der Stabilisation des Ligand-Rezeptor-Komplexes führen, wurden hochaufgelöste Röntgenkristallstrukturen der IL-4-Varianten T13D, F82D und T13D-F82D ermittelt. Durch mehrere Ammoniumsulfat-Präzipitationsschritte im Anschluss an die unter 2.3.4 beschriebene Reinigungsprozedur konnten die IL-4-Varianten in so hoher Reinheit und Homogenität gewonnen werden (vgl. Abb. 3.33), dass es möglich war, große (ca. 1,2 x 0,3 x 0,3mm), bis zu einer hohen Auflösung streuende Kristalle zu erhalten. Zur Ammoniumsulfat-Präzipitation wurden den IL-4-Lösungen (Proteinkonzentration 10-15mg/ml) $(NH_4)_2SO_4$ zu einer Endkonzentration von 1,2M zugesetzt. Die ausgefallenen Verunreinigungen wurden durch Zentrifugation entfernt. Zum erhaltenen Überstand wurde weiteres $(NH_4)_2SO_4$ bis zu einer Gesamtkonzentration von 2,5M zugegeben und das Gemisch wurde für 15min auf Eis inkubiert. Danach wurde das präzipitierte IL-4

durch Zentrifugation sedimentiert und zweimal mit 2,5M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung gewaschen. Zum Schluss wurde das Proteinpellet in 1,2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung, pH7,0, gelöst.

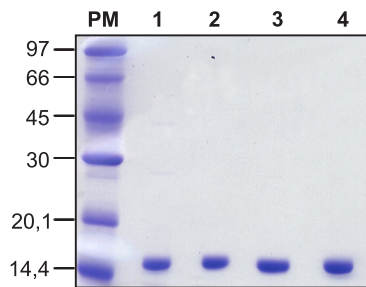


Abbildung 3.34: SDS-PAGE-Analyse der zur Kristallisation verwendeten IL-4-Varianten. Auf dem Gel ist der hohe Reinheitsgrad der zur Kristallstrukturbestimmung eingesetzten Proteinpräparationen der IL-4-Varianten WT (1), T13D (2), F82D (3) und T13D-F82D (4) zu erkennen.

Optimale Kristallisationsbedingungen für die IL-4-Varianten wurden in 2,2M Ammoniumsulfat, 0,1M Natriumacetat, pH5,2 und 25% Glycerin bei einer Proteinkonzentration von 12mg/ml gefunden. Die Strukturen der IL-4-Varianten T13D (max. Auflösung 1,65Å), F82D (max. Auflösung 1,7Å) und T13D-F82D (max. Auflösung 1,8Å) wurden auf Grundlage der Struktur des wildtypischen IL-4 (max. Auflösung 1,8Å) verfeinert. Da alle Kristalle unter identischen Bedingungen gewonnen werden konnten, war ein detaillierter Vergleich der einzelnen Strukturen möglich. Die Grundstruktur von IL-4 aus vier α -Helices in „up-up-down-down“-Anordnung und einem kleinen antiparallelen β -Faltblatt bleibt bei allen IL-4-Varianten erhalten. Die r.m.s.-Abweichung der Proteinhauptkette ist in allen Fällen kleiner als 0,5Å. Die einzigen Unterschiede zwischen der wildtypischen IL-4-Struktur (Abb. 3.35A) und den Varianten T13D, F82D und T13D-F82D (Abb. 3.35B-D) sind in der nahen Umgebung der Mutationen zu finden.

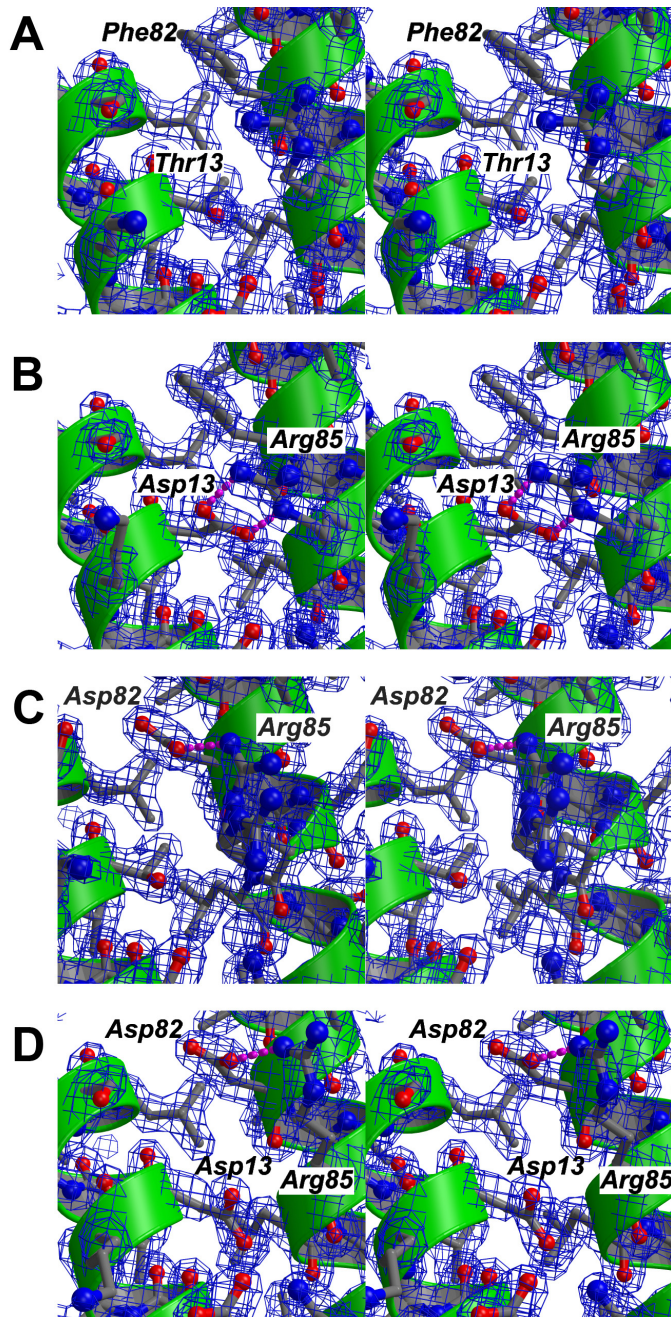


Abbildung 3.35: Ausschnitt aus den Kristallstrukturen der IL-4-Varianten im Bereich um die Reste T13 und F82. Die einzelnen Ausschnitte sind jeweils als Stereobild dargestellt. Die Elektronendichte ist auf einer Stufe von $1,5\sigma$ wiedergegeben. **A:** Struktur des wildtypischen IL-4 in der Umgebung von Thr13 und Phe82. **B:** Der Austausch von Thr13 zu Asparaginsäure hat eine Änderung der Seitenkettenkonformation von Arg85 zur Folge. Es kommt zu der Ausbildung von zwei Wasserstoffbrücken zwischen der Carboxygruppe von Asp13 und der Guanidiniumgruppe von Arg85. **C:** Die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen Asp82 und Arg85 führt zu einer unterschiedlichen Seitenkettenkonformation von Arg85 verglichen mit Wildtyp. Es sind allerdings zwei unterschiedliche Orientierungen von Arg85 zu sehen. In der zweiten Konformation ist die Arg85-Seitenkette der Lösemittelumgebung zugewandt. **D:** Bei der Doppelvariante T13D-F82D befinden sich die Seitenketten in ähnlicher Orientierung wie im Falle der F82D-Variante (C). Für Arg85 kann jedoch nur die Konformation mit der Wasserstoffbrücke zu Asp82 beobachtet werden.

In der Variante T13D befindet sich die neu eingefügte Asparaginsäure an Position 13 in der Mitte der α -Helix A und ihre Seitenkette ist zur α -Helix C hin orientiert (Abb. 3.35B). Beide Sauerstoffe der Asp13-Carboxygruppe bilden Wasserstoffbrücken zu Arg85 in α -Helix C. Dadurch kommt es zu einer Fixierung der Arg85-Seitenkette. Die Ebenen, die von der Asp13-Carboxylgruppe und der Arg85-Guanidiniumgruppe gebildet werden, weichen nur um 14° voneinander ab. Die Längen der beiden Wasserstoffbrücken betragen $2,7\text{\AA}$ bzw. $2,8\text{\AA}$. Damit sind die geometrischen Parameter und die Länge der Wasserstoffbrücken nahe an den Idealwerten. Im wildtypischen IL-4 ist die Hydroxylgruppe von Thr13 dagegen an einer Wasserstoffbrücke mit dem Hauptkettencarbonyl von Glu9 beteiligt. Die Arg85-Seitenkette zeigt nach außen in die Lösungsumgebung und ist über eine wasservermittelte Wasserstoffbrücke an der OH-Gruppe von Thr13 fixiert. Die Änderung der Seitenkettenkonformation von Arg85 in der T13D-Variante wird besonders deutlich, wenn man einen Blick auf den Seitenkettentorsionswinkel wirft. Der χ_1 -Torsionswinkel von Arg85 ist sowohl für WT (174°) als auch für T13D (176°) in trans-Konformation. Torsionswinkel χ_2 nimmt im wildtypischen IL-4 einen Wert von 160° leicht abweichend von einer trans-Stellung ein. In der Variante T13D beträgt χ_2 von Arg85 176° , was der trans-Konformation entspricht. Beim Torsionswinkel χ_3 unterscheiden sich WT und T13D jedoch deutlich um 115° . Beim WT beträgt χ_3 58° in (-)-gauche-Konformation und bei der T13D-Variante -57° in (+)-gauche-Konformation. Die Temperaturfaktoren der Arg85-Seitenkettenatome befinden sich in der T13D- und der wildtypischen IL-4-Variante in der gleichen Größenordnung. Für die Seitenkette vom C_β -Atom ab haben sie beim WT einen Wert von durchschnittlich 23\AA^2 und bei T13D von 20\AA^2 . Diese Temperaturfaktoren sind nahe an den auftretenden Werten von Atomen im hydrophoben Kernbereich der Proteine (durchschnittlich 15\AA^2). Aus diesem Grund kann die Arg85-Seitenkette in beiden Fällen als starr angesehen werden.

Die Struktur der superagonistischen IL-4-Variante F82D im Bereich des Aminosäureaustausches (Abb. 3.34C) zeigt die folgenden Abweichungen und Besonderheiten im Vergleich zur wildtypischen Struktur. Die Seitenkettenkonformation von Asp82 bezüglich der χ_1 - und χ_2 -Torsionswinkel ist identisch mit der Konformation von Phe82 im wildtypischen Protein. Die Orientierung der Arg85-Seitenkette unterscheidet sich dagegen von der in WT und T13D gefundenen Konformationen. Die hochaufgelöste Kristallstruktur der F82D-Variante zeigt zwei unterschiedliche Ausrichtungen der Arg85-Seitenkette. In einer Konformation ist Arg85 zur Lösungsumgebung hin orientiert und bildet keinerlei Wasserstoffbrücken zu Asp82 aus. Im zweiten Fall interagiert Arg85 dagegen über eine schwache Wasserstoffbrücke mit der Carboxygruppe des Restes Asp82. Da die Distanz zwischen der Arg85-Aminogruppe und der Asp82-Carboxygruppe mit $3,2\text{\AA}$ jedoch nahe an der Ausschlussentfernung für Wasserstoffbrücken ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Arg85-Seitenkette in diesem Fall weniger stark fixiert ist, als in der T13D-Variante. Des Weiteren sind die Temperaturfaktoren der Arg85-Seitenkettenatome im Vergleich zu starren Haupt- oder Seitenkettenatomen des Proteins erhöht. Auch daraus lässt sich schließen, dass die Stabilisierung einer bestimmten Seitenkettenkonformation von Arg85 nicht so rigide, wie in der T13D-Variante ist.

Auch bei der T13D-F82D-Doppelvariante von IL-4 nimmt Arg85 eine andere Seitenkettenorientierung ein als im wildtypischen IL-4 (Abb. 3.35D). Die Kristallstruktur zeigt nur eine mögliche Seitenkettenkonformation von Arg85, in der die Arg85-Guanidiniumgruppe eine Wasserstoffbrücke zur Carboxygruppe von Asp82 ausbildet. Obwohl auch Asp13 als möglicher Partner für eine Wasserstoffbrückenbindung zur Verfügung stände, findet man die Arg85-Seitenkette nicht in der für IL4-T13D beschriebenen Konformation. Weiterhin sind auch bei T13D-F82D erhöhte Temperaturfaktoren der Arg85-Seitenkettenatome im Vergleich zu den Hauptkettenatomen festzustellen, was wiederum darauf hindeutet, dass die Fixierung von Arg85 weniger stark ist wie in der IL-4-Variante T13D. Auch wenn nur eine einzige Arg85-Seitenkettenkonformation in der T13D-F82D-Doppelmutanten zu finden ist, so könnte der Affinitätsverlust der Doppelmutante zu IL-4R α im Vergleich zu den beiden IL-4-Superagonisten T13D und F82D dennoch auf einer möglichen Konkurrenz zwischen zwei Seitenkettenorientierungen von Arg85 beruhen.

3.19 Interaktionsanalyse der IL-4-Superagonisten mit IL-4R α -Varianten

Die Interaktionsanalysen mit den superagonistischen IL-4-Varianten (vgl. 3.17) gibt Hinweise darauf, dass die Affinitätszunahme zur IL-4R α -ECD auf die Ausbildung zusätzlicher Interaktionen zwischen dem Liganden und der Rezeptorkette zurückzuführen sind. Nun sollte versucht werden herauszufinden, ob diese zusätzlichen Interaktionen direkt von den neu eingefügten Seitenketten Asp13 bzw. Asp 82 ausgehen oder ein indirekter Mechanismus involviert ist. Hierzu wurden BIAcore-Bindungsstudien mit den IL-4-Superagonisten und verschiedenen IL-4R α -Varianten, bei denen mögliche Bindepartner von Asp13 bzw. Asp82 ausgetauscht waren, durchgeführt. Dabei kamen vier IL-4R α -Varianten zu Einsatz, bei denen sich die Position der mutierten Reste im Ligandenbindeepitop voneinander unterschied. Dabei diente die IL-4R α -Variante Y13T als Kontrolle, da sich die Hydroxygruppe von Tyr13 mit einem Abstand von 10Å weit entfernt von den Resten Asp13 bzw. Asp82 der beiden IL-4-Superagonisten befindet. Daher sollte der Effekt des Aminosäureaustausches Y13T in der IL-4R α -ECD auf die Affinität bei wildtypischem IL-4 und den beiden Varianten T13D bzw. F82D die gleiche Größenordnung besitzen, was auch der Fall war. Die Affinität von wildtypischem IL-4 zu IL-4R α -Y13T ist um das zwanzigfache geringer als zum wildtypischen Rezeptor (Tab. 3.6). Im Falle der IL-4-Superagonisten nimmt die Affinität zu IL-4R α -Y13T um ähnliche Faktoren, nämlich Faktor 33 für T13D bzw. Faktor 19 für F82D verglichen mit IL-4R α -WT ab.

	IL-4			IL4-T13D		
IL-4R α -Variante	$k_{on} \times 10^{-7}$ [s ⁻¹ M ⁻¹]	$k_{off} \times 10^3$ [s ⁻¹]	K_D [nM]	$k_{on} \times 10^{-7}$ [s ⁻¹ M ⁻¹]	$k_{off} \times 10^3$ [s ⁻¹]	K_D [nM]
WT	1,79	1,62	0,09	1,24	0,25	0,02
Y13T	1,55	23,5	1,76	1,03	5,38	0,66
D67A	0,80	36,5	5,60	0,52	1,82	0,38
D125A	0,89	6,46	0,77	0,79	0,65	0,08
Y127F	1,17	1,99	0,20	0,96	0,91	0,09

	IL4-F82D			IL4-T13D-F82D		
IL-4R α -Variante	$k_{on} \times 10^{-7}$ [s ⁻¹ M ⁻¹]	$k_{off} \times 10^3$ [s ⁻¹]	K_D [nM]	$k_{on} \times 10^{-7}$ [s ⁻¹ M ⁻¹]	$k_{off} \times 10^3$ [s ⁻¹]	K_D [nM]
WT	1,56	0,48	0,04	1,06	1,44	0,14
Y13T	1,20	8,64	0,76	0,68	31,8	4,22
D67A	0,68	8,82	1,37	0,52	8,56	1,67
D125A	0,99	2,02	0,21	0,55	1,34	0,24
Y127F	1,12	1,08	0,10	0,40	27,4	6,15

Tabelle 3.6: Interaktionsanalyse der superagonistischen IL-4-Proteine mit immobilisierten IL-4R α -ECD-Varianten. Die kinetischen Bindekonstanten k_{on} und k_{off} sind Mittelwerte aus 12 unabhängigen Messungen mit sechs unterschiedlichen Analytkonzentrationen.

Die drei anderen IL-4R α -ECD-Varianten haben ihren Aminosäureaustausch entweder nahe zu den Interaktionsstellen der ausgetauschten IL-4-Reste Thr13 bzw. Phe82 oder wechselwirken im wildtypischen IL-4/IL-4R α -Komplex direkt mit den beiden genannten Aminosäuren.

So formt die Asp67-Carboxygruppe von IL-4R α zwei parallele Wasserstoffbrücken mit der Arg85-Guanidiniumgruppe von IL-4, weshalb ein Austausch von Asp67 zu Alanin die Affinität zu IL-4 um etwa das sechzigfache verringert. Im Vergleich dazu erhöht sich der K_D -Wert der Interaktion zwischen der Rezeptorvariante D67A zu IL4-T13D bzw. -F82D nur um die Faktoren 19 bzw. 34.

Der IL-4R α -Rest Asp125 bildet im Komplex mit wildtypischem IL-4 je eine Wasserstoffbrücke zur Aminogruppe der IL4-Gln78-Seitenkette und der Guanidiniumgruppe von IL4-Arg81 aus. Diese beiden Bindungen gehen durch die Mutation von Asp125 zu Alanin in der IL-4R α -ECD verloren. Daher zeigt die Rezeptorvariante D125A eine achtfach geringere Affinität zu IL-4 als die wildtypische ECD. Der Affinitätsverlust der IL-4-Superagonisten T13D bzw. F82D zu IL-4R α -D125A lag mit fünf- bzw. achtfach im gleichen Größenordnungsbereich wie im Falle von IL-4.

Der Austausch von Tyr127 zu Phenylalanin im IL-4R α reduziert die Affinität zu IL-4 nur um die Hälfte. Bei der wildtypischen IL-4R α -ECD steht die Hydroxygruppe von Tyr127 über eine Wasserstoffbrücke in Kontakt mit dem IL-4-Rest Thr13. Der K_D -Wert der Interaktion zwischen der

Rezeptorvariante Y127F und IL4-T13D bzw. -F82D steigt im Vergleich zu IL-4R α -WT nur um das viereinhalb- bzw. zweieinhalbfache an.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass keine der getesteten IL-4R α -Varianten zu einem starken, kooperativen Affinitätsverlust gegenüber einer der beiden IL-4-Superagonisten verglichen mit wildtypischem IL-4 führt. Daraus lässt sich folgern, dass die vermuteten zusätzlichen Interaktionen zwischen den IL-4-Varianten T13D bzw. F82D und IL-4R α nicht direkt von den Resten Asp13 bzw. Asp82 zu einem der vier in den IL-4R α -Varianten mutierten Aminosäuren ausgebildet werden. Der größte Unterschied in den Affinitätseffekten zwischen IL-4 und einer der beiden superagonistischen IL-4-Varianten war für die Rezeptorvariante D67A zu beobachten. Der Affinitätsverlust für die Bindung von IL4-T13D an IL-4R α -D67A war ca. dreimal größer als im Falle von wildtypischem IL-4. Da der IL-4R α -Rest Asp67 eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem IL-4-Rest Arg85 eingeht, liegt der Schluss nahe, dass die Seitenkette Arg85 an den Unterschieden in der Interaktion zwischen IL-4 und IL4-T13D mit dem Rezeptor beteiligt ist. Es ist daher möglich, dass die Unterschiede in der Seitenkettenkonformation von Arg85 in den Strukturen der freien Liganden IL-4, IL4-T13D und -F82D (vgl. 3.18) auch im Komplex mit der IL-4R α -ECD zu finden sind und sich im Bindeverhalten widerspiegeln.

3.20 Homologiemodelle der Interaktion zwischen IL-4-Superagonisten und IL-4R α -ECD

Da es bisher nicht gelungen ist, Kristalle der Komplexe aus IL-4R α -ECD und den beiden superagonistischen IL-4-Varianten zur Röntgenstrukturbestimmung zu erhalten, wurde versucht, ein Modell der Interaktion zwischen IL4-T13D bzw. -F82D und der IL-4R α -Kette zu erstellen. Aufbauend auf die bekannte Struktur des IL-4/IL-4R α -Komplexes [119] sollten dadurch mögliche Mechanismen beschrieben werden, die zu der erhöhten Affinität der IL-4-Superagonisten im Vergleich zum wildtypischen IL-4 gegenüber der IL-4R α -ECD führen könnten. Dazu wurde die Struktur des gebundenen IL-4 im Komplex mit IL-4R α durch die Kristallstrukturen der freien IL-4-Varianten T13D und F82D ersetzt. Für das IL4-T13D/IL-4R α -Komplexmodell wurden statt der Koordinaten der ursprünglichen Seitenketten Thr13 und Arg85 die Koordinaten von Asp13 und Arg85 aus der IL4-T13D-Kristallstruktur verwendet. Um das IL4-F82D/IL-4R α -Modell zu erhalten, wurden ebenfalls die Koordinaten der Reste Asp82 und Arg85 aus der IL4-F82D-Struktur an Stelle der Koordinaten der Reste Phe82 und Arg85 im wildtypischen IL-4 eingesetzt. Durch dieses Verfahren kam es nicht zu unerlaubten van-der-Waals-Kontakten im Liganden-Rezeptor-Interaktionsepitop und auch die Packung der an der Interaktion beteiligten Seitenketten war nicht negativ beeinflusst.

Aus der Komplexstruktur von IL-4R α -ECD mit gebundenem IL-4 ist bekannt, dass sich die Rezeptor-Liganden-Kontaktfläche aus drei unabhängig voneinander agierenden Interaktionsclustern besteht

[119]. Wasserstoffbrückenbindungen treten nur innerhalb eines bestimmten Clusters auf und erstrecken sich nie in eines der anderen Cluster. Die beiden Hauptbindungs determinanten von IL-4 Glu9 und Arg88 befinden sich in Cluster I bzw. Cluster II und steuern zusammen 80% der gesamten Bindeenergie bei (Abb. 3.36A) [157].

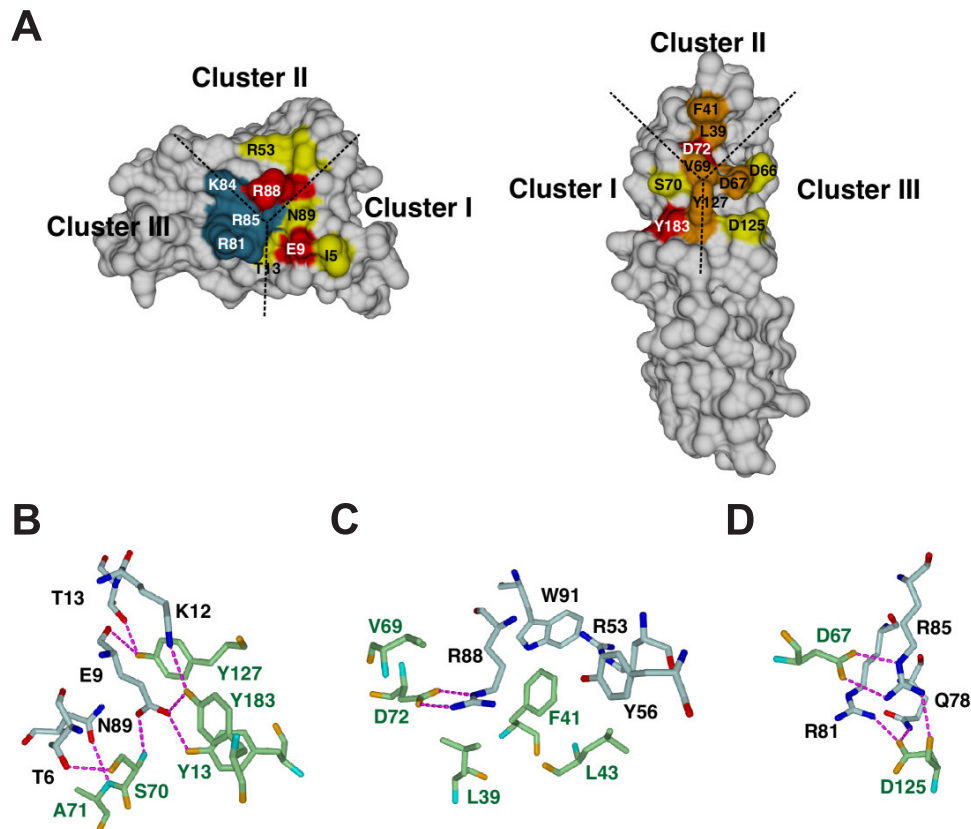


Abbildung 3.36: Drei voneinander unabhängige Cluster bilden das IL-4/IL-4R α -Bindeepitop. **A:** Die drei Cluster I – III generieren Bindeenergie unabhängig voneinander. Wasserstoffbrücken erstrecken sich ausschließlich innerhalb des gleichen Clusters. Die Farbgebung der einzelnen Aminosäuren gibt deren Beitrag zur freien Bindeenergie an (rot: $\Delta G \geq 3,5 \text{ kcal mol}^{-1}$; orange: $3,5 \text{ kcal mol}^{-1} > \Delta G \geq 1,7 \text{ kcal mol}^{-1}$; gelb: $1,7 \text{ kcal mol}^{-1} > \Delta G \geq 0,5 \text{ kcal mol}^{-1}$; dunkel-grau: $0,5 \text{ kcal mol}^{-1} > \Delta G \geq 0 \text{ kcal mol}^{-1}$). **B:** Zentrale Seitenkette im Cluster I ist die IL-4-Hauptbindungs determinante Glu9. Diese interagiert über mehrere Wasserstoffbrücken mit dem Rezeptor. **C:** Cluster II ist um die zweite IL-4-Hauptbindungs determinante Arg88 lokalisiert. Über Arg88 formt IL-4 eine doppelte Salzbrücke zum IL-4R α -Rest Asp72. **D:** In Cluster III bilden die positiv geladenen IL-4-Reste Arg81 und Arg85 ein Wasserstoffbrückennetzwerk zu den negativ geladenen Seitenketten Asp67 und Asp125 des Rezeptors aus. Diese Interaktionen tragen jedoch nur in geringem Maße zur Gesamtbindeenergie bei.

Dabei bildet Glu9 im Cluster I mehrere Wasserstoffbrücken zu den IL-4R α -Resten Tyr13, Ser70 und Tyr183 aus (Abb. 3.36B). Die andere IL-4-Hauptbindungs determinante Arg88 interagiert im Cluster II über eine zweizählige Salzbrücke mit Asp72 auf Seite des Rezeptors (Abb. 3.36C). Das Cluster III wird von den IL-4-Resten Arg81 und Arg85 und den Aminosäuren Asp66, Asp67 und Asp125 der IL-4R α -Kette gebildet. Zwischen den positiv geladenen Resten auf der IL-4-Seite und den negativ geladenen Seitenketten auf dem Rezeptor kommt es zur Ausbildung eines

Wasserstoffbrückennetzwerks (Abb. 3.36D). Die Aminosäuren von Cluster III tragen aber kaum zur Affinität zwischen Ligand und Rezeptor bei. Das konnte durch Mutagenese- und BIAcore-Untersuchungen gezeigt werden [157].

Die aus dem Homologiemodell erhaltene Struktur für den IL4-T13D/IL-4R α -Komplex (Abb. 3.37B) zeigt die Ausbildung einer zweizähligen Wasserstoffbrücke zwischen der Guanidiniumgruppe von Arg85 mit der Hauptkettencarbonylgruppe des Rezeptorrestes Asp125. Weiterhin ist die Seitenkettenkonformation von Arg85 im IL-4-T13D/IL-4R α -Komplex möglicherweise durch eine zweizählige Salzbrücke zum Ligandenrest Asp13 fixiert. Diese Stabilisierung von Arg85 ist im wildtypischen Ligand-Rezeptor-Komplex nicht zu beobachten (Abb. 3.37A). Durch die zusätzlichen internen Wasserstoffbrücken kommt es schon vor der Bindung zwischen Ligand und Rezeptor zu einer Fixierung der Arg85-Seitenkette. Daher kommt es bei der Komplexbildung von IL4-T13D mit der IL-4R α -ECD nicht zu einem Entropieverlust bezüglich der Seitenkettenkonformation von Arg85. Im Falle des wildtypischen IL-4 wird der Rest Arg85 erst während der Bindung des Liganden in seiner Orientierung fixiert, was einen negativen Entropieeffekt auf die Interaktion zur Folge hat. Daher wird durch die Entropieabnahme aufgrund der Fixierung der Arg85-Seitenkette die gleichzeitig durch die Bildung von Wasserstoffbrücken freiwerdende Energie neutralisiert.

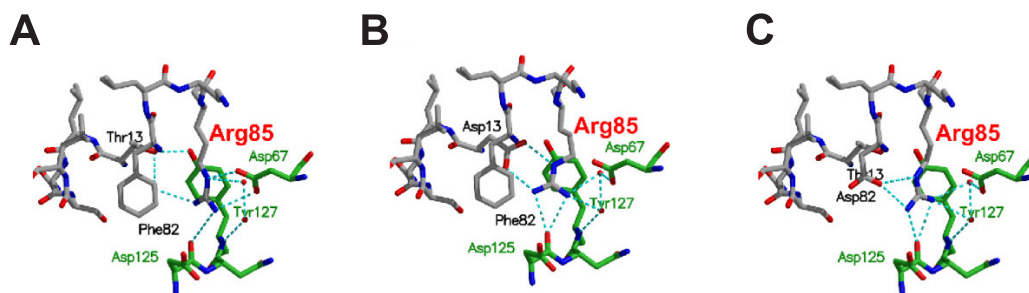


Abbildung 3.37: Wasserstoffbrückennetzwerk in den Komplexstrukturmodellen der IL-4-Superagonisten. **A:** Cluster III der Interaktionsfläche von IL-4 (grau) und IL-4R α (grün). Arg85 besitzt Wasserstoffbrückenbindungen zu den Rezeptorseitenketten Asp67 und Asp125. **B:** Strukturmodell von Cluster III des IL4-T13D/IL-4R α -Komplexes. Intramolekulare Wasserstoffbrücken zu Asp13 fixieren Arg85 so, dass neue intermolekulare Wasserstoffbrücken zum Rezeptorrest Asp125 geschlossen werden können. **C:** Strukturmodell von Cluster III des IL4-F82D/IL-4R α -Komplexes. Arg85 wird durch eine zweizählige intramolekulare Salzbrücke zu Asp82 fixiert, was zu der Entstehung zusätzlicher Interaktionen mit dem Asp125-Rest von IL-4R α führt.

Mit Hilfe des IL4-F82D/IL-4R α -Strukturmodells (Abb. 3.37C) kann für den IL-4-Superagonisten F82D auf einen ähnlichen Interaktionsmechanismus wie im Falle von IL4-T13D geschlossen werden. Die Carboxygruppe von Asp82 bildet hier eine zweizählige, intramolekulare Salzbrücke zur Guanidiniungruppe von Arg85 aus. Dadurch wird die Konformation der Arg85-Seitenkette genauso wie im IL4-T13D/IL-4R α -Komplex im Bindeinterface stabilisiert. Ebenso werden wie im Falle von IL4-T13D zwei Wasserstoffbrücken zur Hauptkettencarbonylgruppe des IL-4R α -Restes Asp125 gebildet.

Damit ist festzuhalten, dass die Aminosäureaustausche in den superagonistischen IL-4-Varianten T13D und F82D zu einer identischen Änderung der Seitenkettenorientierung von Arg85 führen. Die veränderte Konformation von Arg85 hat im Weiteren eine zusätzliche Interaktion mit dem Rezeptor und damit eine Komplexstabilisation zur Folge, wie sie bei den IL-4-Superagonisten zu beobachten ist. Die Tatsache, dass die zusätzliche Interaktion der beiden IL-4-Varianten T13D und F82D mit der IL-4R α -ECD auf die gleiche Weise, indirekt über den Arg85-Rest vermittelt wird, ist auch eine Erklärung für die Beobachtung, dass bei der IL-4-Doppelmutante T13D-F82D zu keiner weiteren Affinitätszunahme gegenüber der IL-4R α -Kette kommt.

3.21 Einfluss der R85-Seitenkette auf die Interaktion der IL-4-Superagonisten mit IL-4R α

Um den oben beschriebene indirekten Interaktionsmechanismus der IL-4-Superagonisten T13D und F82D zu überprüfen, wurde der Rest Arg85 in IL-4 und den superagonistischen Varianten gegen Alanin ausgetauscht. Der Effekt dieser Mutation auf die Interaktion mit der IL-4R α -ECD wurde erneut durch BIAcore-Analysen untersucht. Wenn Arg85 wirklich an der Ausbildung zusätzlicher Interaktionen mit dem Rezeptor beteiligt ist, dann würde man erwarten, dass der Affinitätsverlust in Folge der R85A-Mutation bei den IL-4-Superagonisten aufgrund von kooperativen Effekten stärker ausfällt als beim wildtypischen IL-4. Die bei der SPR-Analyse erhaltenen Bindekonstanten der verschiedenen R85A-Varianten sind in Tabelle 3.7 wiedergegeben.

IL-4-Variante	$k_{on} \times 10^{-7} [s^{-1}M^{-1}]$	$k_{off} \times 10^3 [s^{-1}]$	$K_D [nM]$	relative K_D (Variante/WT)
WT	1,32	1,26	0,10	1,0
R85A	0,46	1,58	0,47	4,7
T13D-R85A	0,58	1,38	0,26	2,6
F82D-R85A	0,42	4,10	1,08	10,8
T13D-F82D-R85A	0,30	1,44	0,51	5,1

Tabelle 3.7: Interaktionsanalyse super-agonistischer IL-4-Varianten mit zusätzlicher R85A-Mutation mit IL-4R α -ECD. Die angegebenen, kinetischen Bindekonstanten k_{on} und k_{off} sind Mittelwerte aus 18 unabhängigen Messungen mit sechs unterschiedlichen Analytkonzentrationen (2 - 20nM). In der rechten Spalte sind die relativen Affinitätsänderungen der IL-4-Varianten im Bezug auf die K_D mit wildtypischem IL-4 aufgeführt.

Der Austausch von Arg85 zu Alanin führt beim wildtypischen IL-4 nur zu einem geringen Affinitätsverlust gegenüber der IL-4R α -ECD. Der K_D -Wert erhöht sich lediglich um das etwa fünffache (vgl. Tabelle 3.7). Das stimmt mit den Ergebnissen überein, die zeigen, dass die Cluster III-Interaktionen nur einen sehr geringen Beitrag zur Gesamtbindeenergie liefern [157]. Gerade bei den k_{off} -Konstanten ist kaum ein Unterschied zwischen IL4-WT und -R85A zu erkennen, was eine klarer Hinweis darauf ist, dass die von Arg85 ausgebildeten Wasserstoffbrücken keinen stabilisierenden Einfluss auf den Ligand-Rezeptor-Komplex haben.

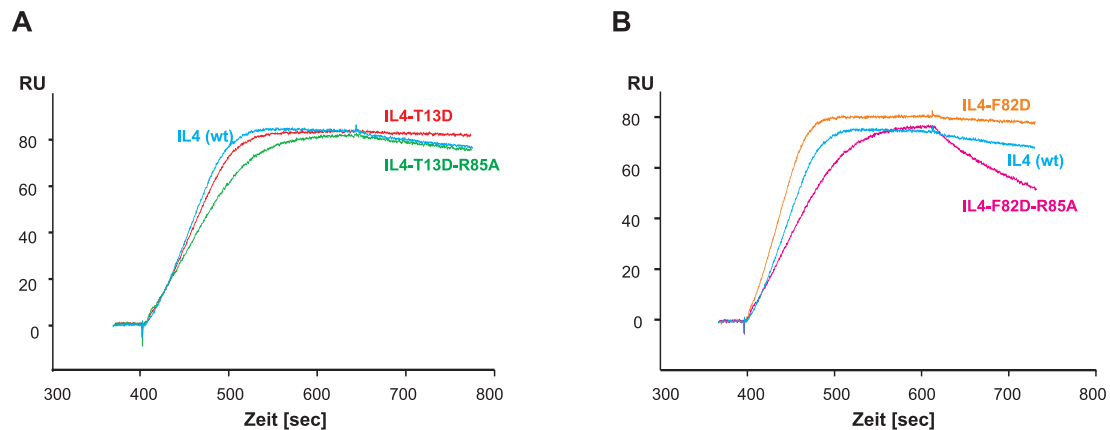


Abbildung 3.38: BIAcore-Analyse der super-agonistischen IL-4-Varianten mit zusätzlicher R85A-Mutation. Die in den Sensorgrammen angegebenen IL-4-Varianten wurden in einer Konzentration von 10nM über immobilisierte IL-4R α -ECD gespült. **A:** Die IL4-Variante T13D-R85A (grün) zeigt die gleiche Dissoziationskinetik wie wildtypisches IL-4 (blau). Die Interaktion des IL-4-Superagonisten T13D (rot) mit einem niedrigeren k_{off} -Wert ist als Vergleich mit dargestellt. **B:** Die IL-4-Variante F82D-R85A (magenta) zeigt ebenfalls eine schnellere Dissoziationskinetik als der korrespondierende IL-4-Superagonist F82D (orange). Allerdings ist der k_{off} -Wert sogar höher als bei wildtypischem IL-4 (blau).

Die zusätzliche R85A-Mutation führt bei IL4-T13D dagegen zu einem sechs- bis siebenfachen Affinitätsverlust und die kinetische Dissoziationsrate k_{off} steigt auf das Niveau von wildtypischem IL-4 (Abb. 3.38A). Das ist ein deutlicher Hinweis auf die Richtigkeit des zuvor beschriebenen Mechanismus, bei dem die R85-Seitenkette in den superagonistischen IL-4-Varianten an der Erhöhung der Affinität zu IL-4R α beteiligt ist. Der Effekt der R85A-Mutation ist bei IL4-F82D sogar noch stärker. Der K_D -Wert erhöht sich von 0,03nM auf 1,08nM. Dieser Affinitätsverlust ist zu einem großen Teil auf eine neunmal schnellere Dissoziation der IL4-Variante F82D-R85A im Vergleich zu IL4-F82D zurückzuführen. Da die im Vergleich zu wildtypischem IL-4 verringerte Dissoziationsrate das Hauptmerkmal der superagonistischen IL-4-Varianten ist, bestätigt der durch die zusätzliche R85A-Mutation verursachte Anstieg der k_{off} -Werte bei beiden IL-4-Superagonisten, den vorgeschlagenen Mechanismus, wonach zusätzliche Interaktionen zu IL-4R α durch den IL-4-Rest Arg85 und nicht direkt durch Asp13 bzw. Asp82 ausgebildet werden. Um auszuschließen, dass es durch den Austausch der Arg85-Seitenkette zu weiteren Strukturänderungen in den IL-4-Varianten gekommen ist, die evtl. die Ursache für den beobachteten Affinitäts- bzw. Komplexstabilitätsverlust sind, wurden die Kristallstrukturen der IL-4-Varianten R85A, T13D-R85A und F82D-R85A aufgeklärt. Dabei konnten keine strukturellen Unterschiede in der Umgebung der Reste Thr13 bzw. Asp13, Phe82 bzw. Asp82 oder Arg85 gefunden werden.

3.22 Bestimmung der IL-13-Hauptbindungs determinanten für IL-4R α

Im Folgenden sollte die Interaktion zwischen IL-13 und der IL-4R α -Kette genauer charakterisiert werden. Im Fall von IL-13 stellt IL-4R α die niederaffine Kette dar, die nach der Bindung von IL-13 an IL-13R α 1 in den Komplex rekrutiert wird. In BIAcore-Experimenten wurde versucht, die direkte Bindung von IL-13 an die auf dem Sensorchip immobilisierte IL-4R α -ECD zu messen. Es konnte jedoch bis zu IL-13-Konzentrationen von 10 μ M keine spezifische Interaktion mit IL-4R α detektiert werden. Daher muss die Dissoziationskonstante dieser Interaktion größer als 100 μ M sein. Die Tatsache, dass IL-13 nicht direkt an die IL-4R α -Kette bindet, wurde auch schon durch Bindeexperimente auf ganzen Zellen gezeigt [141].

Um die Interaktion zwischen IL-13 und der IL-4R α -Kette zu untersuchen, musste somit ein anderer experimenteller Aufbau gewählt werden. Es wurde in ähnlicher Weise verfahren, wie für die Interaktionsanalyse zwischen dem IL-4/IL-4R α -Komplex und der IL-13R α 1-ECD unter 3.4 beschrieben ist. Hierzu wurden ca. 600RU der biotinylierten IL-13R α 1-ECD auf einem Sensorchip immobilisiert. Die Bindestellen dieser Rezeptoren wurde zunächst mit 1 μ M IL-13 in HBS150-Puffer gesättigt. Anschließend wurde zusätzlich zum IL-13 noch IL-4R α -ECD in Konzentrationen zwischen 1 μ M und 10 μ M über die Chipoberfläche gespült. So konnte eine Bindung von IL-4R α -ECD an den vorgeformten, binären Komplex aus IL-13 und IL-13R α 1 beobachtet werden. Die erhaltenen Sensorgramme sind in Abb. 3.39 wiedergegeben.

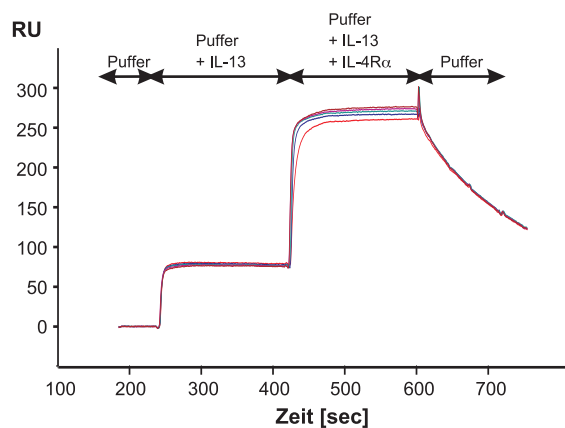


Abbildung 3.39: BIAcore-Analyse der Interaktion zwischen IL-4R α -ECD und dem IL-13/IL-13R α 1-Komplex. Auf dem Chip immobilisierte IL-13R α 1-ECD wurde mit IL-13 (1 μ M) gesättigt. Die Bindung von IL-4R α -ECD an den IL-13/IL-13R α 1-Komplex wurde dann mit unterschiedlichen IL-4R α -ECD-Konzentrationen (1,0, 2,5, 5,0, 7,5 und 10 μ M) untersucht. Aus der Gleichgewichtsbindung ließ sich ein K_D -Wert von ca. 150nM für die Interaktion zwischen IL-4R α -ECD und dem IL-13/IL-13R α 1-Komplex ermitteln.

Die spezifische, konzentrationsabhängige Bindung der IL-4R α -ECD an den IL-13/IL-13R α 1-Komplex ist in den gezeigten BIAcore-Kurven zu erkennen. Aus der Konzentrationsabhängigkeit der

Gleichgewichtsbindung, konnte ein K_D -Wert von ca. 150nM für die Interaktion zwischen IL-4R α und dem bestehenden Komplex aus IL-13 und der IL-13R α 1-ECD bestimmt werden. Dieser Wert ist ausgesprochen niedrig, wenn man ihn mit der ermittelten Affinität der IL-13R α 1-ECD zum IL-4/IL-4R α -Komplex ($K_D = 1\mu\text{M}$) vergleicht. Während der Affinitätsunterschied von IL-4 alleine ($K_D = 2,5\mu\text{M}$) oder an IL-4R α -ECD gebunden ($K_D = 1\mu\text{M}$) zur IL-13R α 1-ECD sehr gering ist, stellt sich das im Falle von IL-13 deutlich anders dar. Für freies IL-13 konnte keine Bindung an die IL-4R α -Kette beobachtet werden. Ist IL-13 jedoch bereits an seine hochaffine Rezeptorkette IL-13R α 1 gebunden, kommt es zu einer Interaktion mit der niederaffinen Rezeptorkette IL-4R α mit einer Dissoziationskonstante von 150nM. Daran lässt sich erkennen, dass die Bindung von IL-4R α an den IL-13/IL-13R α 1-Komplex einen stark kooperativen Charakter besitzt. Ursache für diesen kooperativen Effekt ist möglicherweise eine große Interaktionsfläche zwischen den beiden Rezeptorketten. Da in BIAcore-Experimenten jedoch keine direkte Interaktion zwischen den beiden extrazellulären Domänen von IL-13R α 1 und IL-4R α festgestellt werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass sich das funktionelle Bindeepitop für IL-4R α evtl. erst bei der Interaktion zwischen IL-13 und IL-13R α 1 durch Konformationsänderungen ausbildet.

Ein Strukturvergleich der beiden Interleukine IL-4 und IL-13 zeigt, dass sie beiden Hauptbindeterminanten Glu9 und Arg88 von IL-4 für die Interaktion mit IL-4R α in IL-13 strukturell konserviert sind. Die IL-4-Reste Glu9 und Arg88 entsprechen den IL-13-Resten Glu11 und Arg64 wenn man die Strukturen von IL-4 und IL-13 überlagert (Abb. 3.40).

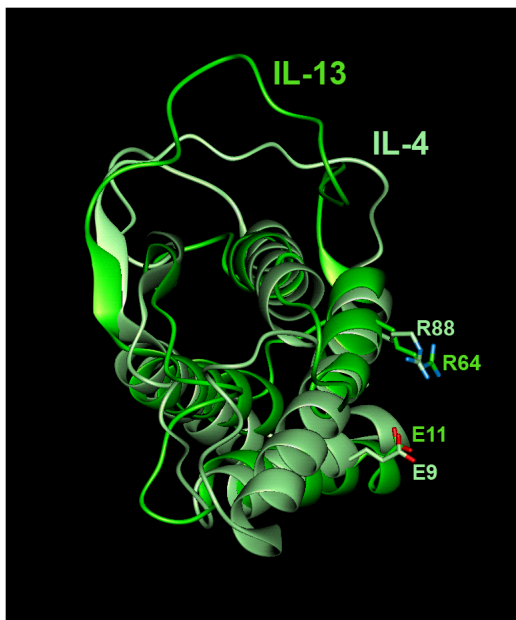


Abbildung 3.40: Strukturvergleich zwischen IL-4 und IL-13. Die beiden Hauptdeterminanten E9 und R88 von IL-4 für die Bindung an IL-4R α sind in IL-13 strukturell konserviert. Die Reste E11 und R64 von IL-13 befinden sich an den gleichen Positionen wie E9 und R88 im Falle von IL-4.

Um den Einfluss der konservierten Reste Glu11 und Arg64 auf die Interaktion zwischen IL-13 und der IL-4R α -Kette zu untersuchen, wurden die IL-13-Varianten E11A und R64A kloniert und exprimiert. Diese IL-13-Varianten wurden bezüglich ihrer Affinität zu den beiden Rezeptorketten IL-13R α 1 und IL-4R α mittels SPR analysiert. Die Interaktion zur IL-13R α 1-ECD wurde durch die Mutationen E11A bzw. R64A verglichen mit wildtypischem IL-13 nicht verändert. Die Untersuchung der Interaktion zwischen den IL-13-Varianten und der IL-4R α -ECD konnte, wie zuvor erklärt, nur im Komplex mit IL-13R α 1 erfolgen. Die relativen Effekte der Aminosäureaustausche E11A und R64A auf die Affinität zu IL-4R α sind in der folgenden Tabelle 3.8 im Vergleich mit den korrespondierenden IL-4-Varianten [157] angegeben.

Interleukinvariante	relative K_D (Variante/WT)
IL4-E9A	n.b.
IL13-E11A	200
IL4-R88A	500
IL13-R64A	1300

Tabelle 3.8: Interaktionsanalyse von IL-4- und IL-13-Varianten mit IL-4R α . Angegeben sind die relativen Affinitätsänderungen der IL-4- bzw. IL-13-Varianten zu IL-4R α im Vergleich zur wildtypischen Form des jeweiligen Interleukins. (n.b.: keine Bindung zu beobachten)

Für den Komplex aus IL13-E11A und IL-13R α 1 konnte für die Interaktion mit IL-4R α ein K_D -Wert von 35 μ M ermittelt werden. Die Analyse der Bindung zwischen dem IL13-R64A/IL-13R α 1-Komplex und der IL-4R α -ECD ergab eine Dissoziationskonstante von 200 μ M. Diese Werte entsprechen einem 200-fachen bzw. 1300-fachen Affinitätsverlust von IL13-E11A bzw. -R64A gegenüber der IL-4R α -Kette verglichen mit wildtypischem IL-13. Die beiden Hauptbindungs determinanten sind somit in IL-13 konserviert und an der Interaktion mit IL-4R α beteiligt, obwohl die Affinität von IL-13 zu IL-4R α tausendmal geringer ist als die von IL-4. Die Bedeutung der beiden Bindungs determinanten ist in IL-4 und IL-13 jedoch umgekehrt (vgl. Tabelle 3.8). Während die Mutation von Glu9 zu Alanin in IL-4 den stärksten Effekt auf die IL-4R α -Affinität zeigt, ist es in IL-13 der Aminosäureaustausch R64A.

3.23 Rekombinante Expression und Aufreinigung von IL-13R α 2-ECD

3.23.1 Klonierung und Expression von IL-13R α 2-ECD

Es wurde versucht, die extrazelluläre Domäne der IL-13R α 2-Kette in *Drosophila* S2-Zellen zu exprimieren, da die Versuche, zu einer Expression der IL-13R α 2-ECD in *Sf9*-Insektenzellen wie im Falle der IL-13R α 1-ECD zu kommen, nicht erfolgreich waren. Die Sequenz der IL-13R α 2-ECD (vgl. Swiss-Prot entry Q14627) wurde über die BglIII- und die XbaI-Restriktionsstelle in den *Drosophila*-Expressionsvektor pMTBiP/V5-HisA (Invitrogen) ligiert. Daraus entstand das Plasmid pMTBiP[IL-13Ra2-ECD] (Abb. 3.41A). Dieses Plasmid wurde, wie unter 2.4.10 beschrieben, in S2-Zellen transfiziert, um eine stabile Zelllinie zu erhalten. Die Expression und Sekretion der IL-13R α 2-ECD wurde nach einer Probeinduktion durch einen Western Blot mit α -His-Tag-Antikörper überprüft. Dabei konnte sezernierte IL-13R α 2-ECD im Kulturüberstand nachgewiesen werden (Abb. 3.41B).

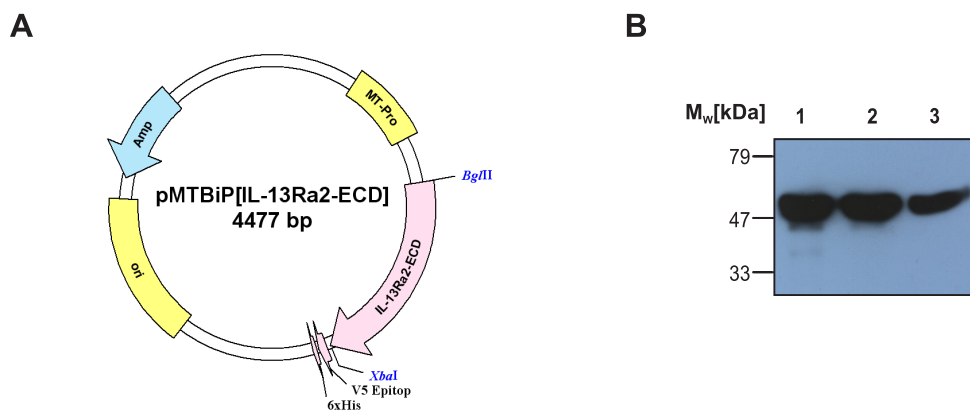


Abbildung 3.41: **A:** Expressionsvektor pMTBiP[IL-13Ra2-ECD] **B:** Western Blot-Analyse der Expression und Sekretion von IL-13R α 2-ECD bei Verwendung unterschiedlicher Cadmium-Acetat-Konzentrationen zu Induktion (2 μ M (1), 5 μ M (2), 10 μ M (3)).

Wie in Abbildung 3.41B zu sehen ist, erreichte man unter den getesteten Induktionsbedingungen die beste Expression und Sekretion beim Einsatz von 2 μ M Cadmium-Acetat. Die präparative Expression wurde durchgeführt, wie unter Gliederungspunkt 2.4.11 beschrieben.

3.23.2 Chromatographische Aufreinigung von IL-13R α 2-ECD aus S2-Zellkulturüberstand

Um die bindeaktive extrazelluläre Domäne der IL-13R α 2-Kette aus dem Kulturüberstand der stabil transfizierten S2-Zellen zu isolieren, wurde eine IL-13-Affinitätschromatographie durchgeführt. Der genaue Ablauf dieses Chromatographieschrittes und die Herstellung einer IL-13-Affinitätssäule ist in Kapitel 2.5.5 beschrieben. Nach der Dialyse der vereinigten Elutionsfraktionen gegen 10mM Tris, pH7,4, 150mM NaCl, 3,4mM EDTA konnten durch die IL-13-Affinitätschromatographie ca. 1,8mg IL-13R α 2-ECD pro Liter eingesetzter S2-Zellkultur gewonnen werden.

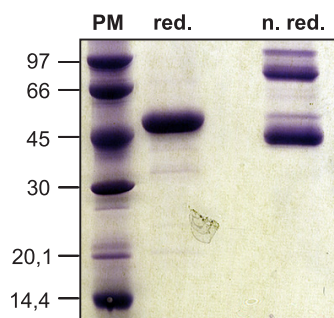


Abbildung 3.42: SDS-PAGE-Analyse der IL-13-Affinitätschromatographie von IL-13R α 2-ECD. Die extrazelluläre Domäne von IL-13R α 2 konnte aufgrund ihrer Affinität zu IL-13 bis zu einem hohen Grad aufgereinigt werden. Allerdings zeigt die Probe unter nicht-reduzierenden Bedingungen (n. red.), dass ein großer Anteil der IL-13R α 2-ECD als Disulfid-verbrückte Multimere vorlag.

In Abbildung 3.42 ist deutlich zu erkennen, dass die IL-13R α 2-ECD in sehr reiner Form von der IL-13-Affinitätssäule eluiert werden konnte. Allerdings werden in der nicht reduzierten Probe Disulfid-verbrückte Dimere der IL-13R α 2-ECD sichtbar. Da diese Dimere durch die IL-13-Affinitätschromatographie nicht abgetrennt werden konnten, muss davon ausgegangen werden, dass sie ebenso wie die monomere Form Bindeaktivität gegenüber IL-13 besitzen.

Da es in der Literatur bisher keine Hinweise darauf gibt, dass der IL-13R α 2-Rezeptor oder ein anderer TypI-Zytokin-Rezeptor *in vivo* als Disulfid-verbrückter Dimer vorliegt, wurden die Multimere von den IL-13R α 2-ECD-Monomeren abgetrennt. Dazu wurde eine Gelfiltrationschromatographie mit einer präparativen HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade-Säule (Pharmacia) durchgeführt (vgl. 2.5.3). Wie in Abb. 3.43A zu sehen, eluierte IL-13R α 2-ECD nach 41,5min von der präparativen Gelfiltrationssäule. Es wurden nur die zentralen Fraktionen des Peaks vereinigt, um die in der, dem Peak vorgelagerten Schulter eluierenden Multimere von den Monomeren abzutrennen. Die SDS-PAGE-Analyse der so erhaltenen Proteinlösung, zeigt, dass die zuvor unter nicht-reduzierenden Bedingungen detektierbaren Multimere zum größten Teil durch den Gelfiltrationsschritt entfernt werden konnten (Abb. 3.43B). Es konnte somit IL-13R α 2-ECD in *Drosophila* S2-Zellen exprimiert und bis zu einem hohen Grad aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt werden. Im Vergleich zur IL-

IL-13R α 1-ECD (Abb. 3.11) erzeugt die extrazelluläre Domäne von IL-13R α 2 wesentlich schärfere Banden auf dem SDS-Gel. Grund hierfür ist die Tatsache, dass IL-13R α 2-ECD lediglich über vier, statt zehn mögliche Glykosylierungsstellen verfügt und die Unterschiede im Glykosylierungsgrad weniger groß sind. Die Ausbeute an aufgereinigter IL-13R α 2-ECD lag im Bereich von 0,6 – 0,8mg pro Liter eingesetzter Expressionskultur.

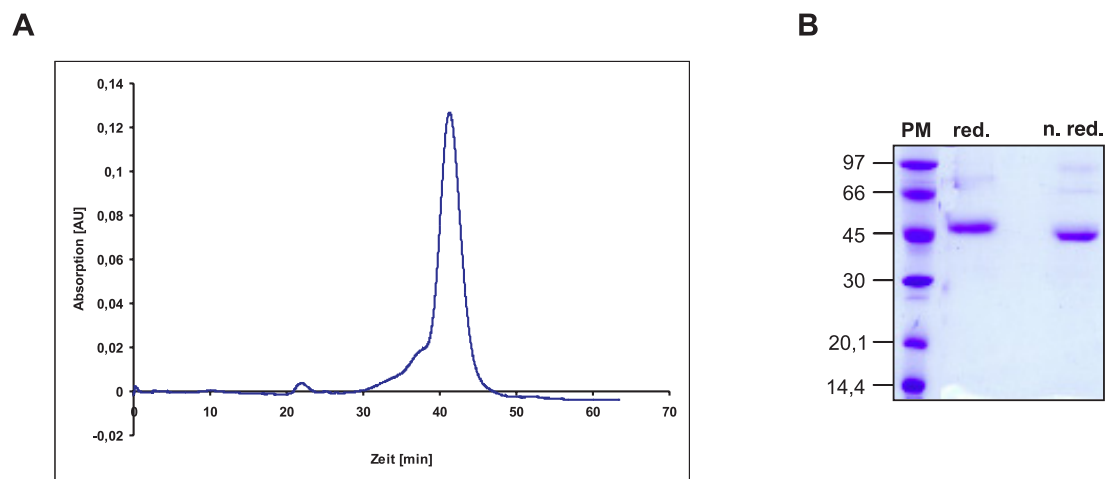


Abbildung 3.43: Gelfiltrationschromatographie zur Aufreinigung von IL-13R α 2-ECD. A: Elutionsprofil der IL-13R α 2-ECD von einer HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade-Säule (Pharmacia) bei einer Flussgeschwindigkeit von 1ml/min. B: SDS-PAGE-Analyse der vereinigten Peakfraktionen nach der Gelfiltration von IL-13R α 2-ECD in reduzierter (red.) und nicht-reduzierter Form (n. red.).

3.24 Interaktionsanalysen mit der extrazellulären Domäne von IL-13R α 2

Durch das Verfahren, die IL-13R α 2-ECD über eine IL-13-Affinitätschromatographie aus dem S2-Zellkulturüberstand zu isolieren, war bereits gezeigt, dass das exprimierte und sezernierte, rekombinante Protein Bindeaktivität gegenüber IL-13 besitzt. Diese Interaktion sollte nun durch BIAcore-Experimente genauer charakterisiert werden. Dafür wurden 100 μ g der gereinigten IL-13R α 2-ECD biotinyliert (vgl. 2.7.6) und davon ca. 400RU in einer Flusszelle eines mit Streptavidin beladenen CM5-Sensorchips immobilisiert. Zu Vergleichszwecken war in eine weitere Flusszelle des Sensorchips mit IL-13R α 1-ECD beladen. Bei IL-13-Konzentrationen von 40 – 360nM in HBS300-Puffer und einer Flussrate von 10 μ l/min konnte nun die Interaktion von IL-13 mit den beiden Rezeptorketten IL-13R α 1 und IL-13R α 2 vergleichend untersucht werden. In Abbildung 3.43A ist der Unterschied zwischen beiden Interaktionen deutlich zu erkennen. Der Komplex aus IL-13 und IL-13R α 2-ECD ist um vieles stabiler als der entsprechende Komplex mit der IL-13R α 1-ECD. Es konnte nahezu keine Dissoziation des Liganden von der IL-13R α 2-ECD beobachtet werden. Da IL-13 fast irreversibel an die IL-13R α 2-Kette bindet, war es durch Messungen im angegebenen IL-13-

Konzentrationsbereich weder möglich, die kinetischen Raten der Interaktion, noch die Dissoziationskonstante K_D aus der Gleichgewichtsbindung zu bestimmen. Um dennoch Informationen über die Konstanten der IL-13/IL-13R α 2-ECD-Interaktion zu erhalten, wurden BIAcore-Experimente bei einer erhöhten Flussrate von 50 μ l/min und mit IL-13-Konzentrationen von 0,2 – 2,0 nM auf einer nur mit 200 RU IL-13R α 2-ECD beladener Flusszelle durchgeführt. Bei diesen Versuchen konnte für die Bindung von IL-13 an IL-13R α 2-ECD ein K_D -Wert von ca. 49 pM ermittelt werden. Die kinetischen Bindekonstanten k_{on} und k_{off} ergaben sich zu $8,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bzw. $4,3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Damit besitzt IL-13 eine etwa 500- bis 800-fach höhere Affinität zur IL-13R α 2- als zur IL-13R α 1-Kette.

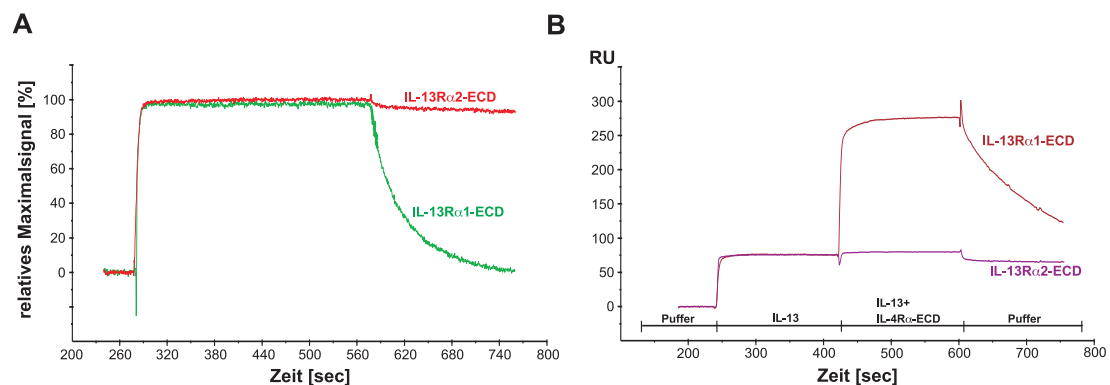


Abbildung 3.44: Interaktionsanalysen mit der rekombinant exprimierten IL-13R α 2-ECD. **A:** Bindung von IL-13 (360 nM) an immobilisierte IL-13R α 2-ECD im Vergleich zur IL-13R α 1-ECD. Der Komplex aus IL-13 und IL-13R α 2-ECD ist so stabil, dass nahezu keine Dissoziation des Liganden vom Rezeptor beobachtet werden kann. **B:** Auf dem Chip immobilisierte IL-13R α 1- bzw. IL-13R α 2-ECD wurde mit IL-13 (1 μ M) abgesättigt. Dann wurde getestet, inwiefern IL-4R α -ECD (10 μ M) mit den vorgeformten, binären Komplexen interagiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass IL-4R α -ECD nicht an den IL-13/IL-13R α 2-ECD-Komplex bindet.

In einem weiteren SPR-Experiment mit immobilisierter IL-13R α 2-ECD sollte untersucht werden, inwiefern die gegenüber IL-13 niederaffine IL-4R α -ECD an einen vorgeformten Komplex aus IL-13 und IL-13R α 2-ECD binden kann. Dazu wurde immobilisierte IL-13R α 2-ECD zunächst mit 1 μ M IL-13 abgesättigt und dann zusätzlich mit IL-4R α -ECD in steigenden Konzentrationen überspült. Bis hin zu einer Konzentration von 10 μ M konnte keine spezifische Bindung von IL-4R α -ECD an den IL-13/IL-13R α 2-ECD-Komplex beobachtet werden (Abb. 3.44B). Der starke, kooperative Effekt, der dazu führt, dass die IL-4R α -ECD an den IL-13/IL-13R α 1-Komplex mit einer Affinität von 150 nM bindet, obwohl es zu keiner messbaren Interaktion zwischen IL-4R α und IL-13 alleine kommt, scheint beim IL-13/IL-13R α 2-Komplex nicht gegeben zu sein. Mögliche Erklärungen dafür sind, dass das Bindeepitop für die IL-4R α -Kette im IL-13/IL-13R α 2-ECD-Komplex nicht ausgebildet wird oder, dass die mögliche Interaktionsfläche zwischen IL-13 und der IL-4R α -ECD durch die gebundene IL-13R α 2-ECD verdeckt bzw. unzugänglich gemacht wird. Daher werden durch die IL-13R α 2-Kette ausschließlich von IL-13 vermittelte Signale inhibiert. Da die IL-13R α 2-Kette nicht an IL-4 bindet [75, 76] und der IL-13/IL-13R α 2-Komplex weder die IL-4R α - noch die IL-13R α 1-Kette [153] in

einen ternären Komplex rekrutieren kann, wird die Signalweiterleitung von IL-4 über den Typ-II-Rezeptor durch IL-13R α 2 nicht beeinflusst.

3.25 Präparation des binären Komplexes aus IL-13 und IL-13R α 2-ECD

Aufgrund seiner hohen Stabilität sollte sich der binäre IL-13/IL-13R α 2-ECD-Komplex gut für die Kristallisation und eine anschließende Röntgenstrukturanalyse eignen. Daher sollte aus den isolierten Einzelkomponenten IL-13 und IL-13R α 2-ECD ein Komplex gebildet und aufgereinigt werden. Die Präparation des Rezeptor-Liganden-Komplexes wurde zunächst in analytischem Maßstab durchgeführt. Hierzu wurden 2nmol IL-13R α 2-ECD mit 2,4nmol IL-13 in 10mM Tris, pH7,4, 150mM NaCl, 3,4mM EDTA gemischt. Der Ligand wurde in 20%-igem molarem Überschuss eingesetzt, um sicherzustellen, dass es zu einer vollständigen Komplexbildung der IL-13R α 2-ECD kommt. Nach 20-minütiger Inkubation des Gemisches bei Raumtemperatur wurde die Lösung durch Ultrafiltration (Amicon Ultra-4, 5000MWCO, Millipore) bis zu einem Volumen von 50 μ l aufkonzentriert. Diese Komplex-Lösung wurde dann auf eine analytische Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Durchführung der Gelfiltration wurde wie unter 2.5.3 beschrieben, mit einer Superdex 75 10/300 GL-Säule (Pharmacia) durchgeführt. In Abb. 3.45 sind neben dem Elutionsprofil des binären Komplexes (blau) noch die Chromatogramme der beiden Einzelkomponenten IL-13 (rot) und IL-13R α 2-ECD (grün) zum Vergleich dargestellt. Die Tatsache, dass der Komplex etwas früher eluiert als die Rezeptor-ECD alleine und kein deutlicher Peak von freiem IL-13 im Chromatogramm zu erkennen ist, deutet auf eine stabile Komplexbildung zwischen IL-13 und IL-13R α 2-ECD hin.

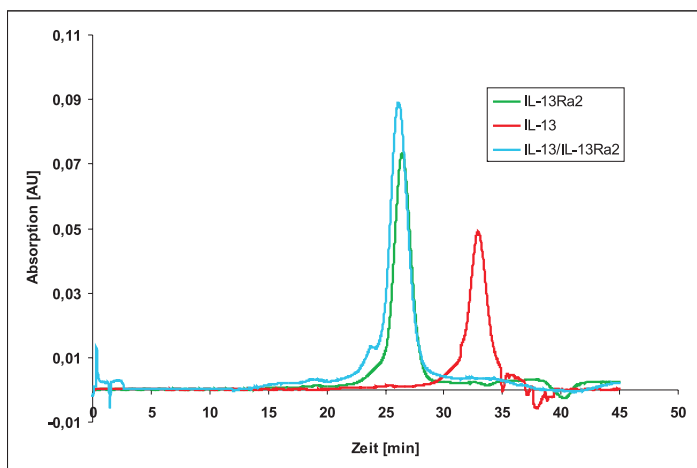
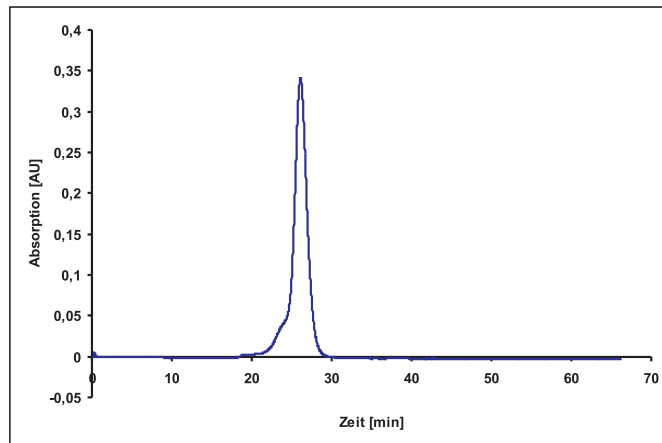


Abbildung 3.45: Analytische Präparation des IL-13/IL-13R α 2-ECD-Komplexes. Chromatogramme der Gelfiltration von 8nmol IL-13 (rot), 2nmol IL-13R α 2-ECD (grün) und der Präparation des binären Komplexes aus 2,4nmol IL-13 und 2nmol IL-13R α 2-ECD (blau). Die leichte Verschiebung des Elutionszeitpunkts der Komplexpräparation (26,3min) im Vergleich zur IL-13R α 2-ECD (26,6min) deutet auf die stabile Ausbildung des binären Komplexes zwischen IL-13 und IL-13R α 2-ECD hin.

Durch den Einsatz größere Mengen der Einzelkomponenten zur Komplexpräparation konnte Ausgangsmaterial für erste Kristallisationsversuche gewonnen werden. Wie zuvor beschrieben wurden 15nmol IL-13R α 2-ECD mit 18nmol IL-13 gemischt und nach der Inkubationszeit von 20 Minuten bei RT zu einem Volumen von 100 μ l aufkonzentriert. Die erhaltene Komplex-Lösung wurde wie weiter oben beschrieben auf eine analytische Gelfiltrationssäule aufgetragen.

A



B

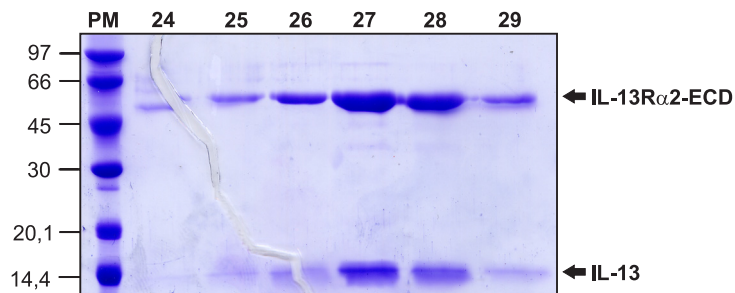


Abbildung 3.46: Präparation des IL-13/IL-13R α 2-ECD-Komplexes. **A:** Elutionsprofil des binären Komplexes aus 15nmol IL-13R α 2-ECD und 18nmol IL-13 von einer analytischen Superdex 75 10/300 GL-Säule (Pharmacia). **B:** SDS-PAGE-Analyse der Peakfraktionen (24-29) aus der Gelfiltration der IL-13/IL-13R α 2-ECD-Komplexpräparation.

Der binäre Komplex aus IL-13 und IL-13R α 2-ECD eluiert wie zuvor bei der analytischen Komplexpräparation nach 26,3min von der Gelfiltrationssäule (Abb. 3.46A). Dass es zu der Ausbildung des binären Komplexes gekommen war, konnte durch eine SDS-PAGE-Analyse der Peakfraktionen gezeigt werden (Abb. 3.46B). In den Fraktionen 25 bis 29 konnten sowohl der Ligand IL-13 als auch der Rezeptor IL-13R α 2-ECD nachgewiesen werden. Bei dieser Präparation konnten insgesamt 500 μ g des IL-13/IL-13R α 2-ECD-Komplexes isoliert werden. Damit lag die Komplexausbeute bei ca. 65% bezogen auf die Menge an eingesetzten Einzelkomponenten. Die Fraktionen 26 bis 29 wurden vereinigt, konzentriert und konnten für erste Kristallisationsversuche eingesetzt werden. Bisher konnten jedoch noch keine Kristalle des binären IL-13/IL-13R α 2-

Komplexes gewonnen werden. Für eine erfolgreiche Kristallisation des Komplexes muss evtl. die Konzentration des eingesetzten Komplexes erhöht werden, da er aufgrund der Glykosylierungen an der IL-13R α 2-ECD eine sehr hohe Löslichkeit besitzt. Möglicherweise wäre es für die Kristallbildung auch förderlich, wenn flexible Proteinbereiche, wie z.B. der C-terminale V5-6xHis-Tag an der IL-13R α 2-ECD entfernt würden.

4 Diskussion der Ergebnisse

4.1 Expressions- und Reinigungsstrategie von IL-13, IL-13R α 1-ECD und IL-13R α 2-ECD

Die Interaktion der IL-13R α 1-Kette mit den beiden Liganden IL-4 und IL-13 sollte detailliert untersucht werden. Dazu mussten zunächst Expressions- und Aufreinigungsstrategien für IL-13 und die extrazelluläre Domäne von IL-13R α 1 erarbeitet werden. Für die Gewinnung der anderen am IL-4/IL-13-Rezeptor-Liganden-System beteiligten Proteine konnte auf bereits etablierte Protokolle zurückgegriffen werden [130, 139, 155].

Eine starke Expression von IL-13 in *E.coli* ist nur zu erreichen, wenn IL-13 mit einem N-terminalen Fusionsteil versehen wird. Eine Überexpression des reifen Teils von IL-13 ist in *E.coli* nicht möglich. Als Fusionsprotein mit GST oder MBP lässt sich IL-13 dagegen in großen Mengen rekombinant exprimieren. Es gelang jedoch nicht, die IL-13-Fusionsproteine in löslicher und nativ gefalteter Form zu exprimieren. Da für eine erfolgreiche Rückfaltung der Fusionsanteil von IL-13 so gering wie möglich sein sollte, wurde pET-28b (Invitrogen) als Expressionsvektor gewählt. IL-13 wird so mit einem N-terminalen 6xHis-Tag exprimiert, der sich durch proteolytischen Verdau mit Thrombin vom eigentlichen reifen Teil von IL-13 abspalten lässt. Der 6xHis-Tag wird zur späteren Aufreinigung von IL-13 jedoch nicht benutzt. Er erhöht allerdings die Expressionsrate erheblich. Ein möglicher Grund dafür, dass sich IL-13 ohne zusätzlichen N-terminalen Teil in *E.coli* nicht überexprimieren lässt, könnte die Ausbildung von stabilen Sekundärstrukturen am 5'-Ende der IL-13- codierenden mRNA sein, wodurch der Start der Translation verhindert wird.

Einen weiteren kritischen Punkt bei der Gewinnung von rekombinantem IL-13 stellt die Isolation und Aufreinigung der Einschlusskörper dar. Durch mehrere Waschschrte mit Detergenz- und Harnstoffhaltigen Puffern konnten verunreinigende, mit den Inclusion Bodies assoziierte Proteine größtenteils entfernt werden (vgl. Abb. 3.2). Der hohe Reinheitsgrad der IL-13-Inclusion Bodies führt dazu, dass bereits nach der Rückfaltung keine löslichen Verunreinigungen nachweisbar sind (vgl. Abb. 3.3) und zur finalen Aufreinigung von IL-13 nur ein einziger Chromatographieschritt nach der Thrombin-Spaltung nötig ist. Durch eine RP-HPLC wird das Thrombin und die abgespaltenen 6xHis-Tags von IL-13 abgetrennt. Das beschriebene Rückfaltungsverfahren mit der schrittweisen Absenkung der Guanidiniumhydrochlorid-Konzentration entstand aus der Kombination und Optimierung zweier zuvor veröffentlichter Protokolle [65, 158]. Durch die Verbesserung des Verfahrens konnte die Ausbeute an hochreinem IL-13 von 1mg auf 5mg pro Liter eingesetztem TB-Medium gesteigert werden. Die biologische Aktivität des in *E.coli* exprimierten und rückgefalteten IL-13 konnte durch Proliferationstests mit TF-1-Zellen nachgewiesen werden, wobei ein EC₅₀-Wert von 2 - 7nM bestimmt wurde (vgl. Abb. 3.8).

Die Expression von bindeaktiver IL-13R α 1-ECD konnte in *Sf9*-Insektenzellen erreicht werden. Die Vorteile dieses eukaryotischen Expressionssystems liegen darin, dass keine Rückfaltung des Proteins nötig ist und durch die posttranslationale Glykosylierung die Stabilität und Löslichkeit des exprimierten Proteins erhöht wird. Aufgrund des heterogenen Glykosylierungsmusters sind in *Sf9*-Zellen exprimierte Proteine allerdings weniger gut zur Kristallisation und Strukturanalyse geeignet.

Zur Expression der extrazellulären Domäne von IL-13R α 1 in *Sf9*-Insektenzellen wurden zwei unterschiedliche, kommerziell erhältliche Systeme verwendet. Die Ausbeuten an gereinigter Rezeptor-ECD lagen sowohl bei der Verwendung des BaculoGoldTM-Systems (Pharmingen) als auch beim Einsatz des BacVectorTM-Systems (Invitrogen) zwischen 0,8mg und 1,5mg pro Liter eingesetzter *Sf9*-Suspensionszellkultur (vgl. 3.2). Der Vorteil des BacVectorTM-Systems (Invitrogen) liegt in der deutlich geringeren Größe des verwendeten Transfervektors pMK-1. Da dieser nur ca. 5500bp groß ist, war es möglich, Punktmutationen durch zyklische Mutagenese in den IL-13R α 1-ECD-codierenden Bereich einzufügen.

Die Versuche, die extrazelluläre Domäne der IL-13R α 1-Kette in *E.coli* zu exprimieren, scheiterten daran, dass keine geeigneten Rückfaltungsbedingungen gefunden werden konnten. Bei allen getesteten Bedingungen kam es während der Rückfaltung fast ausschließlich zur Bildung von Disulfid-verbrückten Multimeren. Die extrazelluläre Domäne der IL-13R α 1-Kette weist dreizehn Cystein-Reste auf. Die ungerade Anzahl an Cysteinen hat zur Folge, dass immer ein Cystein-Rest ungepaart bleibt und es somit zur Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken kommen kann. Solche intermolekularen Disulfidbrücken führen zur Bildung von Multimeren und verhindern die native Rückfaltung des Proteins.

Im Gegensatz zur extrazellulären Domäne von IL-13R α 1 konnte in *Sf9*-Insektenzellen keine Expression und Sekretion der extrazellulären Domäne von IL-13R α 2 erreicht werden. Zur erfolgreichen Expression von IL-13R α 2-ECD wurden *Drosophila* S2-Zellen verwendet. Die Menge an in das Medium sezerniertem, rekombinantem Protein war hierbei vergleichbar mit dem *Sf9*-Insektenzellsystem. Es war allerdings nicht möglich, die mit einem N-terminalen 6xHis-Tag versehene IL-13R α 2-ECD durch eine Metallchelataffinitätschromatographie aus dem Zellkulturüberstand zu isolieren. Trotz Dialyse des Kulturüberstands gegen Auftrags-Puffer kam es zu keiner quantitativen Bindung der IL-13R α 2-ECD an die Ni-NTA-Agarose. Da dieses Phänomen auch für andere in S2-Zellen exprimierte Proteine beobachtet wurde, muss sich im S2-Zellkulturüberstand ein Faktor befinden, der die Interaktion zwischen Ni-NTA-Agarose und 6xHis-Tag inhibiert und sich nicht durch Dialyse entfernen lässt. Daher wurde der dialysierte Zellkulturüberstand direkt auf eine IL-13-Affinitätssäule aufgetragen, wodurch bindeaktive, extrazelluläre Domäne von IL-13R α 2 isoliert werden konnte (vgl. 3.23.2). Zur Abtrennung von Multimeren wurde abschließend eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt. Durch dieses Verfahren konnten zwischen 0,6mg und 0,8mg IL-13R α 2-ECD pro Liter S2-Zellkultur gewonnen werden.

4.2 Das funktionelle Bindeepitop der IL-13R α 1-ECD

Das Epitop von IL-13 für die Interaktion mit der IL-13R α 1-Kette wurde durch Mutagenesestudien bereits sehr gut beschrieben [153, 154, 159] und wurde größtenteils auf der α -Helix D lokalisiert. Es gab bisher jedoch nur wenige Informationen zum Aufbau des Bindeepitops der extrazellulären Domäne von IL-13R α 1 und zu den an der Interaktion mit IL-13 beteiligten Aminosäureresten. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, durch eine umfangreiche Mutagenesestudie das funktionelle Bindeepitop der IL-13R α 1-ECD zu bestimmen, indem der Einfluss einzelner Aminosäuren auf die Interaktion mit IL-13 *in vitro* durch BIAcore-Experimente analysiert wurde.

Für die Bindung von IL-13 an immobilisierte IL-13R α 1-ECD konnte ein K_D -Wert von 25nM ermittelt werden. Diese Affinität steht in guter Übereinstimmung mit den zuvor durch andere Gruppen bestimmte K_D -Werten von 35nM in SPR-Analysen [140] bzw. ca. 5nM auf mit IL-13R α 1 transfizierten CHO-Zellen [74]. Mit verkürzte Varianten der IL-13R α 1-ECD, bei denen entweder die N- oder die C-terminale FnIII-Domäne deletiert waren, sollte untersucht werden, ob die zusätzliche N-terminale FnIII-Domäne, die neben dem für Klasse-I-Zytokinrezeptoren typischen CHR-Motiv die extrazelluläre Domäne von IL-13R α 1 bildet, an der Interaktion mit dem Liganden beteiligt ist. Bei den Interaktionsstudien mit diesen verkürzten IL-13R α 1-Varianten war keine Bindung von IL-13 nachweisbar (vgl. 3.7). Daraus lässt sich schließen, dass das klassische CHR-Motiv von IL-13R α 1, anders als z.B. im Fall von IL-4R α oder γ_C , nicht ausreichend für eine effektive Bindung von IL-13 ist. Sowohl von der N- als auch von der C-terminalen FnIII-Domäne werden unverzichtbare Teile des Ligandenbindeepitops zur Verfügung gestellt. Übereinstimmend mit diesen *in vitro*-Ergebnissen wurde bereits in einer anderen Studie gezeigt, dass die Deletion der N-terminalen FnIII-Domäne zum Verlust der Bindung von radioaktiv-markiertem IL-13 an stabil transfizierte, humane B-Zellen führt und die IL-13-Signaltransduktion inhibiert [129]. Auch für weitere Klasse-I-Zytokinrezeptoren wie gp130 [122, 123], G-CSFR [160, 161], LIFR [124, 125] und IL-5R α [126] konnte eine bedeutende Rolle der zusätzlichen FnIII-Domäne für die Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung nachgewiesen werden, so dass IL-13R α 1 jetzt in die Gruppe von Rezeptoren eingegliedert werden kann, bei denen die Ligandenbindung nicht vom CHR-Motiv alleine vermittelt wird.

Zur Identifikation einzelner, an der Bindung von IL-13 beteiligter Aminosäuren der extrazellulären Domäne von IL-13R α 1, wurden insgesamt 41 Reste aus den, die β -Stränge verbindenden Schleifen des CHR-Motivs und sieben geladene Reste in der N-terminalen FnIII-Domäne einzeln gegen Alanin ausgetauscht (vgl. Abb. 3.22). Jede dieser 48 Alanin-Varianten konnte in *Sf9*-Insektenzellen exprimiert und aus dem Kulturüberstand isoliert werden. Insgesamt sieben der untersuchten Alanin-Varianten zeigten in BIAcore-Experimenten eine mehr als zehnfach geringere Affinität zu IL-13 als die wildtypische IL-13R α 1-ECD (vgl. Abb. 3.23). Für die Varianten R83A, N317A und L319A wurden K_D -Werte bestimmt, die zwischen 10- und 25-mal höher waren als beim wildtypischen Protein. Einen deutlich stärkeren Effekt auf die Interaktion mit IL-13 hatte jedoch der Austausch von Arg84, Phe253 bzw. Tyr321 gegen Alanin. Die Varianten F253A und Y321A binden IL-13 mit 150-

bzw. 200-fach geringeren Affinität als die nicht mutierte extrazelluläre Domäne von IL-13R α 1. Die Mutation R84A führte sogar zu einem kompletten Verlust der nachweisbaren Interaktion mit IL-13. Somit konnten mit Arg84, Phe253 und Tyr321 drei Hauptbindungs determinanten für IL-13 auf dem extrazellulären Teil der IL-13R α 1-Kette identifiziert werden. Die Bedeutung von Leu319 und Tyr321 für die Interaktion mit IL-13 und die Signalaktivierung war bereits in mit mutierten IL-13R α 1-Varianten stabil transfizierten Zellen gezeigt worden [129]. Die Reste Arg83 und Arg84 sind beide in der zusätzlichen N-terminalen FnIII-Domäne der Rezeptorkette zu finden. Der Effekt ihres Austausches zu Alanin auf die IL-13-Interaktion bestätigt erneut die Beteiligung und die große Bedeutung der N-terminalen FnIII-Domäne bei der Komplexbildung mit IL-13. Vergleicht man die Sequenzen der IL-13R α 1-Kette in unterschiedlichen Spezies, so stellt man fest, dass die Hauptbindeterminanten stark konserviert sind (Abb. 4.1).

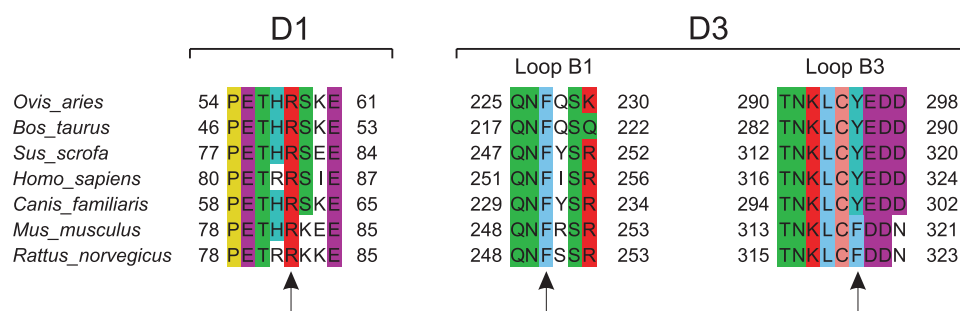


Abbildung 4.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen in der Umgebung der Hauptbindungs determinanten von IL-13R α 1 in verschiedenen Spezies. Die für die humane IL-13R α 1-Kette bestimmten Hauptbindungs determinanten Arg84, Phe253 und Tyr321 sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Lediglich Tyr321 ist bei der Maus und der Ratte durch ein Phenylalanin ersetzt, was einen Hinweis auf die Art der Interaktion gibt, über die Tyr321 einen bedeutenden Teil der Bindenergie zwischen IL-13 und IL-13R α 1 generiert. Da IL-13 keine Speziespezifität gegenüber der humanen oder der murinen IL-13R α 1-Kette besitzt, d.h. humanes IL-13 interagiert in gleicher Weise mit Rezeptorketten beider Spezies [162], kann angenommen werden, dass der Beitrag von Tyr321 zur Gesamtbindeenergie auf hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Liganden und nicht auf möglichen polaren Interaktionen der Hydroxygruppe beruht. Wäre Tyr321 an der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu IL-13 beteiligt, so sollte die Affinität zu muriner IL-13R α 1-ECD deutlich geringer sein, da dort Tyr321 durch einen Phenylalaninrest ersetzt ist, der diese Wasserstoffbrücken aufgrund der fehlenden Hydroxygruppe nicht bilden kann.

Die Ergebnisse der Mutagenesestudie weisen darauf hin, dass die Interaktion zwischen IL-13 und dem CHR-Motiv der IL-13R α 1-Kette größtenteils auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht. Von den Aminosäureresten in der CHR-Domäne, die an der Interaktion mit IL-13 beteiligt sind, besitzen die drei mit dem größten Einfluss auf die Affinität zum Liganden, darunter auch zwei der drei Hauptbindungs determinanten, (Phe253, Tyr321 und Leu319, vgl. Abb. 3.23) hydrophoben Charakter. Auch bei anderen Klasse-I-Zytokinrezeptoren wurden ähnliche, hydrophobe Reste, die in bzw. nahe

an der Ellbogenregion der jeweiligen CHR-Domäne lokalisiert sind, als wichtige Bindungs determinanten identifiziert. So wird die Bindung zum Liganden z.B. bei gp130 vom Rest Phe169 [163], beim hGH-Rezeptor von Trp104 und Trp169 [164] und bei der β_C -Kette von Tyr365 und Tyr421 dominiert [165-167].

Die Tatsache, dass nur bei insgesamt drei Resten der Alaninaustausch zu einem Verlust der Affinität zu IL-13 um einen Faktor von mehr als 100 führt, zeigt, dass die Interaktionsfläche für die Bindung von IL-13 nicht homogen ist. Weniger als die Hälfte der durchgeführten Mutationen in der IL-13 α 1-ECD führte zu einer signifikanten Abnahme der Affinität zu IL-13 und ein Großteil davon resultierte nur in bis zu 10-fach erhöhten K_D -Werten. Nur wenige Reste innerhalb der Interaktionsfläche generieren einen bedeutenden Teil der Bindeenergie, während viele andere nur geringfügig zur Affinität beitragen. Daher können die drei Hauptbindungs determinanten der IL-13 α 1-ECD als sog. „hot spots“ bezeichnet werden, wie sie von Cunningham und Wells [164, 168] beschrieben wurden.

Zur Bestimmung des funktionelle Bindeepitops für die Interaktion mit IL-4 wurden alle IL-13 α 1-Varianten auch hinsichtlich ihrer Interaktion mit IL-4 getestet. Zunächst wurde untersucht, ob an der Bindung von IL-4 die gesamte extrazelluläre Domäne von IL-13 α 1 beteiligt ist, oder ob das CHR-Motiv ausreichend ist. IL-13 α 1-ECD bindet in BIAcore-Experimenten mit einer Affinität von ca. 1 μ M an einen vorgeformten Komplex aus IL-4 und IL-4 α (vgl. 3.5). Die verkürzte Rezeptorvariante IL-13 α 1-CHR zeigt dagegen keine spezifische Interaktion mit dem IL-4/IL-4 α -Komplex (vgl. 3.8). Das bedeutet, dass genauso wie im Falle von IL-13 die N-terminale FnIII-Domäne von IL-13 α 1 einen essentiellen Bestandteil des Bindeepitops für IL-4 darstellt. Im Falle von γ_C , der zweiten niederaffinen Rezeptorkette für IL-4, ist diese zusätzliche FnIII-Domäne nicht vorhanden. Die klassische CHR-Domäne von γ_C ist ausreichend, um eine ähnlich hohe Affinität zum IL-4/IL-4 α -Komplex ($K_D \approx 4 \mu$ M) aufzubauen, wie IL-13 α 1-ECD [130].

Bei Experimenten mit stabil transfizierten, humanen B-Zellen wurde jedoch eine durch IL-4 ausgelöste Signalaktivität der IL-13 α 1-CHR-Domäne, d.h. die Phosphorylierung von Tyk2, gezeigt [129], die der Beobachtung widerspricht, dass IL-13 α 1-CHR von dem gebildeten binären Komplex aus IL-4 und IL-4 α nicht in einen ternären Komplex rekrutiert werden kann. Möglicherweise ist die Restaffinität, welche die IL-13 α 1-CHR-Domäne gegenüber dem IL-4/IL-4 α -Komplex besitzt noch groß genug, dass es auf der Zellmembran zur Bildung von signalaktiven Rezeptor-Liganden-Komplexen kommt. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Interaktionsstudien liegt jeweils ein Interaktionspartner frei in Lösung vor. Bei Untersuchungen auf transfizierten Zellen sind dagegen beide Rezeptorketten in der Membran immobilisiert, wodurch sie in ihren möglichen Bewegungen auf zwei Dimensionen beschränkt werden. Daher reicht möglicherweise bereits eine geringere Affinität aus, um eine effektive Interaktion und damit Signalaktivierung zu erreichen [169]. Bei den in dieser Arbeit beschriebenen BIAcore-Experimenten wurden nur die Ektodomänen der Rezeptorketten verwendet. Eine mögliche Beteiligung der Transmembran- oder intrazellulären Domänen bei der

Rezeptoraktivierung *in vivo*, die den Affinitätsverlust der extrazellulären Domäne kompensiert, kann somit nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren ist zu bedenken, dass es in den transfizierten Zellen zu einer Überexpression der verkürzten IL-13R α 1-Kette kommt. Im Vergleich zur endogen exprimierten IL-4R α -Kette liegt die exogen, hinter einem CMV-Promotor exprimierte IL-13R α 1-CHR-Kette in einem starken Überschuss auf der Zelloberfläche vor, so dass die sehr hohe, lokale Konzentration der verkürzten IL-13R α 1-Kette trotz der sehr niedrigen Affinität zur Bildung von signalaktiven Ligand-Rezeptorkomplexen führen kann.

Zu einer detaillierten Charakterisierung des Bindeepitops auf der extrazellulären Domäne von IL-13R α 1 für die Interaktion mit IL-4 wurde die Affinität der 48 hergestellten Alanin-Varianten zum IL-4/IL-4R α -Komplex bestimmt. Dabei zeigten die meisten Varianten keine signifikante Abnahme der Affinität gegenüber dem binären Komplex aus IL-4 und IL-4R α . Bei sechs Aminosäureresten führte der Austausch zu Alanin jedoch zum Verlust der nachweisbaren Bindung zum IL-4/IL-4R α -ECD-Komplex. Dabei handelt es sich um die IL-13R α 1-ECD-Varianten R84A, L139A, F253A, N317A, L319A und Y321A (vgl. Abb. 3.31). Diese IL-13R α 1-ECD-Muteine zeigten auch den größten Affinitätsverlust gegenüber IL-13 (vgl. Abb.3.23). Somit sind die Aminosäurereste, die an der Interaktion mit IL-13 beteiligt sind, auch von großer Bedeutung für die Bindung an den IL-4/IL-4R α -Komplex. Die Bindeepitope der IL-13R α 1-Kette für die beiden Liganden IL-4 und IL-13 weisen daher eine hohe Ähnlichkeit zueinander auf und überlappen in einem großen Bereich. Die Tatsache, dass die Mutation R84A dazu führt, dass IL-13R α 1-ECD nicht mehr an den IL-4/IL-4R α -Komplex bindet, bestätigt die Schlussfolgerung aus der Interaktionsuntersuchung mit der isolierten IL-13R α 1-CHR-Domäne, wonach die N-terminale FnIII-Domäne direkt an der Interaktion mit IL-4 beteiligt ist. Die Aminosäuren Phe253, Asn317 und Leu319 von IL-13R α 1 sind als Phe156, Asn206 und Leu208 in γ_C , der zweiten, niederaffin an IL-4 bindenden Rezeptorkette, konserviert (vgl. Abb.1.2). Der Rest Leu208 der γ_C -Kette wurde bereits als wichtige Bindungsdeterminante für IL-4 identifiziert [130]. Die Mutation L208A führt zu einem mehr als 40-fachen Anstieg des K_D -Wertes für die Interaktion zwischen γ_C und dem Komplex aus IL-4 und IL-4R α -ECD. In den Kristallstrukturen des quartären IL-2-Ligand-Rezeptorkomplexes ist deutlich zu erkennen, dass der γ_C -Rest Leu208 jedoch nicht nur in Kontakt zum Liganden IL-2 steht, sondern auch mit der IL-2R β -Kette interagiert [117, 118]. Daher kann auch für den Rest Leu319 der IL-13R α 1-Kette eine gleichzeitige Interaktion mit IL-4 bzw. IL-13 und der extrazellulären Domäne von IL-4R α vermutet werden. Die beiden konservierten Aminosäuren Phe156 und Asn206 wurden in der schon zuvor zitierten Mutagenesestudie von Zhang *et al.* [130] nicht auf ihre Beteiligung an der Interaktion mit IL-4 hin untersucht, so dass keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob diese Reste auch in γ_C an der Bindung von IL-4 beteiligt sind. In den Kristallstrukturen der IL-2-Ligand-Rezeptorkomplexe sind Phe156 und Asn206 jedoch nicht Bestandteil der Kontaktfläche zwischen γ_C und IL-2 [117, 118].

Die IL-13R α 1-Reste Leu139 und Tyr321 sind in der γ_C -Kette dagegen nicht konserviert. An Stelle von Leu129 ist in γ_C ein Valin zu finden, dessen Mutation zu Alanin keinen signifikanten Effekt auf

die Interaktion zum IL-4/IL-4R α -Komplex hat. Die Position von Tyr321 wird in der γ_C -Kette von Gly210 eingenommen. Der Austausch von Gly210 zu Alanin führt zu einer viermal geringeren Affinität der γ_C gegenüber IL-4/IL-4R α -ECD, was auf darauf hindeutet, dass Gly210 Teil der Interaktionsfläche ist, jedoch keine Hauptbindungs determinante darstellt [130].

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die wichtigsten Determinanten von IL-13R α 1 für die Bindung zu IL-13 auch an der Interaktion mit dem IL-4/IL-4R α -Komplex beteiligt sind. Ein Teil dieser Aminosäurereste sind auch in γ_C , der zweiten mit IL-4 interagierenden, niederaffinen Rezeptorketten, konserviert und an der Interaktion mit IL-4 beteiligt.

4.3 Strukturmodell der extrazellulären Domäne von IL-13R α 1

Unter Berücksichtigung der aus der Interaktionsanalyse zwischen IL-13 und den verschiedenen IL-13R α 1-Varianten gewonnenen Informationen zum funktionellen Bindeepitop und unter zu Hilfenahme veröffentlichter Kristallstrukturen verwandter Rezeptoren wurde ein Strukturmodell der IL-13R α 1-ECD erstellt (vgl. Abb. 3.25). Die beiden C-terminalen FnIII-Domänen entsprechen dabei der Faltung und Anordnung zueinander, wie sie aus den Kristallstrukturen von IL-4R α [119], IL-2R β und γ_C [117, 118] für ein klassisches CHR-Motiv bekannt ist. Die N-terminale FnIII-Domäne ist zur vermuteten Ligandenbindestelle im Ellbogenbereich der CHR-Domäne hin orientiert. Diese Ausrichtung ergibt sich aus den BIAcore-Untersuchungen mit der verkürzten Variante IL-13R α 1-CHR, bei denen gezeigt werden konnte, dass die N-terminale Domäne für die Interaktion mit IL-13 bzw. IL-4 essentiell ist und somit unmittelbaren Kontakt zum Liganden besitzen muss. Weitere Hinweise auf die Faltung und Orientierung der N-terminalen FnIII-Domäne gibt die Röntgenkristallstruktur des Komplexes aus IL-5 und der IL-5R α -ECD (E. Patiño; bisher nicht veröffentlicht). Die extrazelluläre Domäne der IL-5R α -Kette weist die höchste Homologie der Aminosäuresequenz aller bekannter Typ-I-Zytokinrezeptoren zur IL-13R α 1- und IL-13R α 2-Kette auf. Der Homologiegrad zwischen den extrazellulären Domänen von IL-13R α 1 und IL-5R beträgt 44%, was auf eine ähnliche dreidimensionale Faltung schließen lässt. In der Komplexstruktur von IL-5 und IL-5R α -ECD interagiert der Ligand sowohl mit Aminosäureresten der Schleifenregionen im Ellbogenbereich der CHR-Domäne, als auch mit der zusätzlichen FnIII-Domäne. Diese Domäne ist zurück zu IL-5 hin orientiert und fixiert den Liganden von oben, so dass die drei FnIII-Domänen in einer Art Zick-Zack-Muster angeordnet sind. Diese Rezeptorarchitektur wurde in das Strukturmodell der IL-13R α 1-ECD übernommen. Damit weicht die Ausrichtung der N-terminalen FnIII-Domäne im Strukturmodell von IL-13R α 1 von der in anderen Zytokinrezeptorketten, deren Struktur bekannt ist, wie z.B. IL-6R α oder gp130, ab. Bei den beiden genannten Rezeptorketten wäre eine Orientierung der N-terminalen Domäne zum Liganden hin jedoch auch nicht möglich, da das Verbindungssegment zwischen der CHR und der zusätzlichen FnIII-Domäne kürzer als bei IL-5R α oder IL-13R α 1 ist, und somit eine Ausrichtung zurück zur Ligandenbindestelle aus sterischen Gründen nicht erklärbar wäre.

Im Falle von IL-6R α zeigt die sich N-terminal an das CHR-Motiv anschließende Domäne von der Ligandenbinderegion im Ellbogenbereich der CHR-Domäne weg [152] und ist nicht an der Interaktion mit IL-6 beteiligt. Eine vergleichbare Anordnung der N-terminalen FnIII-Domäne und des CHR-Motivs wurde auch für gp130 beschrieben. Im Komplex mit IL-6 und der extrazellulären Domäne von IL-6R α zeigt sich jedoch, dass gp130 zwei unterschiedliche Kontaktflächen zu IL-6 besitzt [128]. Die erste Interaktionsfläche wird von der CHR-Domäne gebildet, während die zweite in der N-terminalen FnIII-Domäne zu finden ist. Beide Kontaktflächen interagieren jedoch nicht mit dem gleichen, sondern mit zwei verschiedenen IL-6-Molekülen. IL-6 bindet zuerst an die spezifische IL-6R α -Kette. In diesen binären Komplex wird anschließend gp130 rekrutiert. Die Interaktion zwischen gp130 und dem IL-6/IL-6R α -Komplex wird dabei vom CHR-Motiv der gp130-Kette vermittelt. In einem letzten Schritt kommt es zur Interaktion zweier IL-6/IL-6R α /gp130-Komplexe, welche durch die Bindung der N-terminalen FnIII-Domäne von gp130 mit dem IL-6-Molekül im anderen ternären Ligand-Rezeptorkomplexes vermittelt wird, wodurch der signalaktive Ligand-Rezeptorkomplex entsteht. Der komplette, signalweiterleitende, hexamere Komplex ist somit aus jeweils zwei IL-6R α - und gp130-Rezeptorketten und zwei IL-6-Liganden aufgebaut. Ein ähnlicher, hexamerer Aufbau des IL-13/IL-13R α 1/IL-4R α -Komplexes, bei dem die N-terminale FnIII-Domäne von IL-13R α 1 an ein zweites IL-13-Molekül bindet, wurde in der Literatur bereits vorgeschlagen [129]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente geben jedoch keinen Hinweis auf einen derartigen Interaktionsmechanismus zwischen IL-13 und IL-13R α 1-ECD. Die analytische Gelfiltration des Komplexes aus IL-13 und IL-13R α 1-ECD deutet nicht darauf hin, dass sich ein Homodimer aus zwei binären IL-13/IL-13R α 1-Komplexen bildet (vgl. 3.4). Des Weiteren dürfte aufgrund des beschriebenen, sequentiellen Mechanismus bei der Bildung eines hetero-hexameren Komplexes die Deletion der D1 von IL-13R α 1 nicht zu einem kompletten Verlust der Bindung von IL-13 führen, wie in den BIAcore-Untersuchungen gezeigt (vgl. 3.7). Vielmehr müsste ein Großteil der Affinität erhalten bleiben, damit IL-13 überhaupt in einem ersten Schritt an IL-13R α 1 binden kann, bevor es anschließend zur Rekrutierung der IL-4R α -Kette und der Ausbildung eines hexameren Gesamtkomplexes kommen kann.

Um die Richtigkeit des IL-13R α 1-ECD-Strukturmodells weiter zu überprüfen, wurde versucht, zusammen mit der bekannten Struktur von IL-13 ein Modell des binären Komplexes aus IL-13 und der IL-13R α 1-ECD aufzustellen. Dies gelang unter Berücksichtigung und in Anlehnung an die Struktur des IL-5/IL-5R α -Komplexes. In Abbildung 3.27 ist zu erkennen, dass das Modell des IL-13/IL-13R α 1-Komplexes in guter Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erhaltenen Mutagenesedaten der IL-13R α 1-ECD steht. Die an der Ligandenbindung beteiligten Reste in der CHR-Domäne von IL-13R α 1 befinden sich in räumlicher Nähe zu α -Helices A und D von IL-13. Auf diesen beiden Helices wurden die Aminosäurereste Glu16, Lys105 und Arg109 bereits zuvor in funktionellen Mutagenesestudien als wichtige Determinanten für die Interaktion mit der IL-13R α 1-Kette beschrieben [153, 154]. Die Mutation der genannten Positionen führt zum Verlust der

proliferativen Wirkung von IL-13 auf TF-1-Zellen. Im hier gezeigten Strukturmodell wird deutlich, dass diese Reste in der Kontaktfläche mit der CHR-Domäne von IL-13R α 1 liegen und direkt an der Bindung zur Rezeptorkette beteiligt sind. Ihr Austausch führt zu einem Affinitätsverlust gegenüber der IL-13R α 1-Kette, so dass es nicht zur Ausbildung signalaktiver Ligand-Rezeptorkomplexe auf der Zelloberfläche kommen kann.

Als weitere Aminosäurereste von IL-13, deren Mutation zur Verminderung der biologischen Aktivität führt, wurden Lys90, Ile91 und Glu92 beschrieben [153]. Da sich diese Aminosäuren jedoch in großer räumlicher Entfernung zu den Bindedeterminanten in α -Helices A und D von IL-13 liegen, wurde vermutet, dass sie nicht direkt mit dem IL-13R α 1-Rezeptor interagieren, sondern dass sie eine wichtige, strukturelle Rolle in IL-13 spielen. Lys90 und Ile91 sind beide Teil des, der α -Helix D vorgelagerten β -Strangs. Es wurde daher vorgeschlagen, dass Mutationen im β -Faltblatt zu einer Änderung der Ausrichtung von α -Helices A und D zueinander führen, wodurch das Bindeepitop zu IL-13R α 1 zerstört wird. Das in dieser Arbeit beschriebene Strukturmodell (vgl. Abb. 3.27) deutet jedoch darauf hin, dass Lys90, Ile91 und Glu92 doch direkt an der Bindung zur IL-13R α 1-ECD beteiligt sind. Sie stellen mögliche Interaktionspartner für die N-terminale FnIII-Domäne der IL-13R α 1-Rezeptorkette dar. Durch die Mutagenese weiterer, räumlich benachbarter Aminosäuren in IL-13, wurde versucht, zusätzliche Reste zu identifizieren, die mit der D1-Domäne von IL-13R α 1 interagieren (vgl. 3.14). Die IL-13-Varianten M34A und W36A zeigen eine zwischen 10- bis 20-fach verminderte Affinität gegenüber der extrazellulären Domäne von IL-13R α 1 im Vergleich zu wildtypischem IL-13. Aufgrund ihrer Position auf IL-13 stellen die beiden Aminosäuren Met34 und Trp36 daher, neben Lys90, Ile91 und Glu92, wahrscheinlich Interaktionspartner der N-terminalen FnIII-Domäne von IL-13R α 1-ECD dar.

Das in dieser Arbeit beschriebene Strukturmodell des IL-13/IL-13R α 1-ECD-Komplexes wird somit durch alle Mutagenese- und Interaktionsdaten von IL-13 und IL-13R α 1 sowie der IL-5/IL-5R α -Komplexstruktur gestützt.

Durch den Austausch von IL-13 im IL-13/IL-13R α 1-Strukturmodell gegen IL-4 konnte ein Modell des binären Komplexes aus IL-4 und der IL-13R α 1-ECD gewonnen werden (vgl. 3.16). Auch dieses Strukturmodell befindet sich in guter Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit gewonnenen Mutagenesedaten von IL-13R α 1 und bereits zuvor identifizierten Bindedeterminanten auf der Seite von IL-4. Den IL-4-Resten Ile11, Arg121, Tyr124 und Ser125 wurde in der Literatur eine Rolle bei der Interaktion von IL-4 mit den niederaffinen Rezeptorketten γ_C oder IL-13R α 1 und der Signalaktivierung zugeschrieben [130, 155]. Diese Aminosäuren sind im Strukturmodell auf den α -Helices A und D von IL-4 direkt gegenüber den in IL-13R α 1-ECD identifizierten Bindedeterminanten Phe253, Asn317, Leu319 und Tyr321 lokalisiert und sind damit wahrscheinliche Interaktionspartner des IL-13R α 1-CHR-Motivs. Des Weiteren interagiert die N-terminale FnIII-Domäne von IL-13R α 1 in ähnlicher Weise mit IL-4 wie auch für IL-13 angenommen. Bisher gibt es jedoch noch keine

experimentellen Hinweise darauf, welche Aminosäuren von IL-4 mit der D1-Domäne in Kontakt stehen. Mögliche Kandidaten dafür sind, wie auch bei IL-13, die Reste im β -Faltblatt.

4.4 Molekularer Interaktionsmechanismus der IL-4-Superagonisten

Durch funktionelle und strukturelle Untersuchungen wurde versucht, den molekularen Mechanismus aufzudecken, der es den IL-4-Varianten T13D und F82D ermöglicht, mit höherer Affinität an die IL-4R α -Kette zu binden als der wildtypische Ligand. Die Affinitätszunahme beruht zum größten Teil auf einer geringeren, kinetischen Dissoziationsrate k_{off} was deutlich macht, dass die Mutationen T13D und F82D in IL-4 zu einer Stabilisierung des binären IL-4/IL-4R α -Komplexes führen (vgl. 3.17). Durch die gleichzeitige Einführung beider Mutationen in IL-4 konnte jedoch kein additiver oder kooperativer Effekt auf die Affinität zur extrazellulären Domäne von IL-4R α beobachtet werden. Stattdessen verhält sich IL4-T13D-F82D in Interaktionsanalysen wie wildtypisches IL-4. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der Affinitätseffekt beider Mutationen auf einem ähnlichen Mechanismus beruht und es bei der Doppelvariante zu einer Kompetition um diesen Mechanismus kommt.

Bestimmt man die Kristallstrukturen der superagonistischen IL-4-Varianten, so stellt man fest, dass die Gesamtstrukturen der IL-4-Varianten mit der des wildtypischen Proteins identisch sind. Nur in der direkten, lokalen Umgebung der Mutationen gibt es signifikante Abweichungen von der Wildtyp-Struktur. In den beiden IL-4-Varianten T13D und F82D ist jeweils eine Änderung der Seitenkettenkonformation des Restes Arg85 zu erkennen. Im Falle von T13D interagiert Arg85 über eine doppelte Salzbrücke mit Asp13 und bei F82D bildet Arg85 eine Wasserstoffbrücke zu Asp82 aus. Im Vergleich zu wildtypischem IL-4 kommt es daher in beiden Fällen zu einer Fixierung der Arg85-Seitenkette (vgl. 3.18).

Durch Interaktionsstudien mit IL-4R α -Varianten konnte gezeigt werden, dass die neu eingefügten Reste Asp13 bzw. Asp82 in den IL-4-Superagonisten nicht direkt an der Ausbildung von zusätzlichen, Komplex-stabilisierenden Interaktionen zur extrazellulären Domäne von IL-4R α beteiligt sind. Der größte Affinitätsunterschied zwischen superagonistischem und wildtypischem IL-4 wurde bei der IL-4R α -Variante D67A beobachtet (vgl. 3.19). Das ist ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von Arg85 an der Affinitätssteigerung gegenüber der IL-4R α -Kette, da Arg85 von IL-4 in der Komplexstruktur von IL-4 und IL-4R α eine Wasserstoffbrückenbindung zu D67A auf Seite der IL-4R α -Kette eingeht [119], die durch die geänderte Arg85-Seitenkettenorientierung in IL4-T13D bzw. -F82D zerstört würde.

Da es nicht gelang, die Kristallstrukturen der superagonistischen IL-4-Varianten im Komplex mit IL-4R α -ECD zu gewinnen, wurde versucht, durch das Erstellen von Strukturmodellen dieser Komplexe einen Einblick in die molekulare Interaktion von IL4-T13D und -F82D mit dem IL-4R α -Rezeptor zu erhalten. Dazu wurden die Strukturunterschiede, die bei den superagonistischen Varianten in ungebundener Form im Vergleich zu wildtypischem IL-4 festgestellt worden waren, auf die

Komplexstruktur von IL-4/IL-4R α übertragen. In beiden Fällen wird die Arg85-Seitenkette von IL-4 durch intramolekulare, zweizählige Salzbrücken zum eingefügten Aspartat (Asp13 bzw. Asp82) schon vor der Bindung an den Rezeptor in einer alternativen Konformation fixiert. Dadurch kommt es zur Ausbildung von zusätzlichen intermolekularen Wasserstoffbrücken zwischen dem IL-4-Rest Arg85 und dem IL-4R α -Rest Asp125, die zur Stabilisierung des Ligand-Rezeptorkomplexes und damit zur Erhöhung der Affinität führen (vgl. 3.20). Da beide superagonistischen IL-4-Varianten über den gleichen, indirekten Mechanismus zusätzliche, affinitätssteigernde Interaktionen mit dem Rezeptor gewinnen, ist bei der Kombination beider Variationen keine weitere Erhöhung der Affinität möglich. Die Richtigkeit des vorgeschlagenen, über Arg85 vermittelten Mechanismus konnte abschließend durch Interaktionsstudien mit IL-4-Varianten, bei denen Arg85 durch Alanin ersetzt war, bestätigt werden. Tauscht man bei IL4-T13D bzw. -F82D zusätzlich Arg85 gegen Alanin, so verlieren diese Varianten ihr superagonistisches Bindeverhalten gegenüber IL-4R α -ECD und zeigen wildtypische Dissoziationsraten (vgl. 3.21). Somit konnte gezeigt werden, dass der IL-4-Rest Arg85 an der Steigerung der Affinität zur IL-4R α -Kette beteiligt ist. Die Mutationen T13D bzw. F82D führen zu einer vergleichbaren Konformationsänderung der Arg85-Seitenkette, wodurch diese dann in der Lage ist, zusätzliche Wechselwirkungen zum Rezeptor auszubilden.

Diese zusätzlichen Interaktionen der IL-4-Superagonisten mit der IL-4R α -Kette sind im sog. Cluster III der Interaktionsfläche zu finden. Die Reste in diesem Bereich des mosaikartig aufgebauten Bindeepitops, tragen bei wildtypischem IL-4 nur in einem sehr geringen Maße zur Affinität zwischen Ligand und Rezeptor bei [157]. Im Falle der superagonistischen IL-4-Varianten wird durch zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb von Cluster III freie Bindeenergie erzeugt, d.h. im Gegensatz zur Bindung von wildtypischem IL-4 tragen alle drei Cluster einen signifikanten Teil zur Affinität bei.

Der modulare Aufbau des Interaktionsepitops stellt einen Mechanismus dar, der es ermöglicht, Spezifität und Affinität unabhängig voneinander zu generieren. Abhängig davon, wie viele der möglichen Interaktionscluster bzw. „binding hot spots“ in energetisch optimaler Weise für die Bindung benutzt werden, variiert die auftretende Affinität. Bei der Interaktion von wildtypischem IL-4 mit der IL-4R α -Kette sind zwei Cluster an der Bildung von freier Bindeenergie beteiligt, wohingegen Cluster III nur geringfügig zur Affinität beiträgt. Wird, wie im Falle der IL-4-Superagonisten, auch das dritte Cluster zur Erzeugung von zusätzlicher Bindeenergie herangezogen, so lässt sich die Affinität um Faktor 2 – 3 erhöhen. Bei der Interaktion von IL-4R α mit dem binären IL-13/IL-13R α 1-Komplex werden die in IL-13 konservierten „hot spots“ Glu11 und Arg64 verwendet (vgl. 3.22). In IL-13 gibt es jedoch keinen, dem Cluster III in IL-4 entsprechenden Bereich. Daher können bei der Interaktion zwischen IL-13 und IL-4R α -ECD nur zwei Interaktionscluster zur Generierung freier Bindeenergie beitragen, was sich in einer deutlich geringeren Affinität widerspiegelt. Der Einsatz einer unterschiedlichen Anzahl von Interaktionsclustern ermöglicht es der IL-4R α -Kette die Affinität über einen großen Bereich (30pM für IL4-F82D bis 150nM für IL-13/IL-13R α 1) zu variieren, ohne dabei Spezifität einzubüßen. Die Spezifität der extrazellulären Domäne von IL-4R α kann als hoch

bezeichnet werden, da sie ausschließlich mit IL-4 oder IL-13 interagiert. Möglicherweise sind Interaktionscluster, die nicht signifikant zur freien Bindeenergie und somit zur Affinität beitragen, dennoch von großer Bedeutung für die Spezifität der Interaktion.

Ein Beispiel für einen ähnlichen Mechanismus zur Variation der Affinität über einen großen Bereich bei gleichzeitiger Wahrung der Spezifität ist für die Interaktion zwischen Colicinendonukleasen (E-DNase) und ihren spezifischen Immunity-Proteinen beschrieben [170-172]. Bei den E-Colicin-DNasen (E2, E7, E8 und E9) handelt es sich um eine Gruppe von bakteriellen Toxinen, die mikrobielle Zielzellen töten, indem sie deren chromosomale DNA zerstören [173]. Um die Degradation der eigenen DNA zu verhindern, werden von den E-Colicin-DNase produzierenden Stämmen sog. Immunity-Proteine (Im2, Im7, Im8 und Im9) exprimiert, die durch Bindung an ihre spezifische E-DNase deren Aktivität inhibieren [174]. Alle vier E-DNasen können einen Komplex mit jedem der vier Immunity-Proteine ausbilden, so dass insgesamt 16 unterschiedliche Komplexe auftreten können. Dabei variieren die Affinitäten zwischen E-DNase und Immunity-Protein im Bereich von 10^{-4} bis 10^{-15} M. Dennoch wird eine hohe Spezifität erreicht, da zusammengehörende E-DNase-Immunity-Protein-Paare eine 10^6 - bis 10^{10} -mal höhere Affinität zueinander besitzen als nicht zusammengehörende Paare. Zwei Bindeepitope bzw. „hot spots“ befinden sich bei den Immunity-Proteinen auf zwei verschiedenen α -Helices nahe beieinander. Konservierte Reste in α -Helix III vermitteln die Bindung aller Immunity-Proteine mit der E-DNase und sorgen für eine Basisaffinität. Der zweite „hot spot“ auf α -Helix II besteht aus Resten, welche die Spezifität bestimmen, indem sie zusätzliche Affinität zur passenden E-DNase generieren und den Komplex stabilisieren. Bei Interaktionen zwischen nicht zusammengehörenden E-DNase-Immunity-Protein-Paaren trägt das Spezifitätsepitop entweder nicht zur Gesamtaffinität bei oder destabilisiert sogar den Komplex. Abhängig davon, ob beide Bindeepitope an der Generierung freier Bindenergie beteiligt sind, kommt es zu hohen oder niedrigen Affinitäten. Diese Situation ist mit dem Einfluss und der Rolle der einzelnen Cluster im modularen IL-4/IL-4R α -Interaktionsepitop vergleichbar. Je nachdem, wie viele drei Cluster in optimaler Weise in die Generierung von freier Bindenergie mit einbezogen werden, lässt sich die Affinität zum Liganden über einen weiten Bereich skalieren.

4.5 Sequentieller Bindemechanismus und Aktivierung der IL-4- und IL-13-Rezeptoren

Die durchgeführten *in vitro*-Interaktionsexperimente mit aufgereinigten Liganden und extrazellulären Rezeptordomänen unterstützen das Modell eines sequentiellen Bindemechanismus zur Aktivierung des IL-4/IL-13-Rezeptorkomplexes. IL-4 bindet in einem ersten Schritt mit hoher Affinität an die IL-4R α -Kette ($K_D \approx 0,1$ nM) und wird dadurch an die Zellmembran rekrutiert. Anschließend wird die niederaffine Rezeptorkette IL-13R α 1 (oder γ_c) in den signalaktiven ternären Komplex geholt (Abb. 4.2A). Im Falle von IL-13 ist die Reihenfolge der Interaktion mit den beiden Rezeptoruntereinheiten

genau umgekehrt. Zuerst bindet IL-13 an die IL-13R α 1-Kette ($K_D \approx 25\text{nM}$), um dann die für IL-13 niederaffine IL-4R α -Kette in den Komplex zu rekrutieren, wodurch es zur Aktivierung des Rezeptors kommt (Abb. 4.2B).

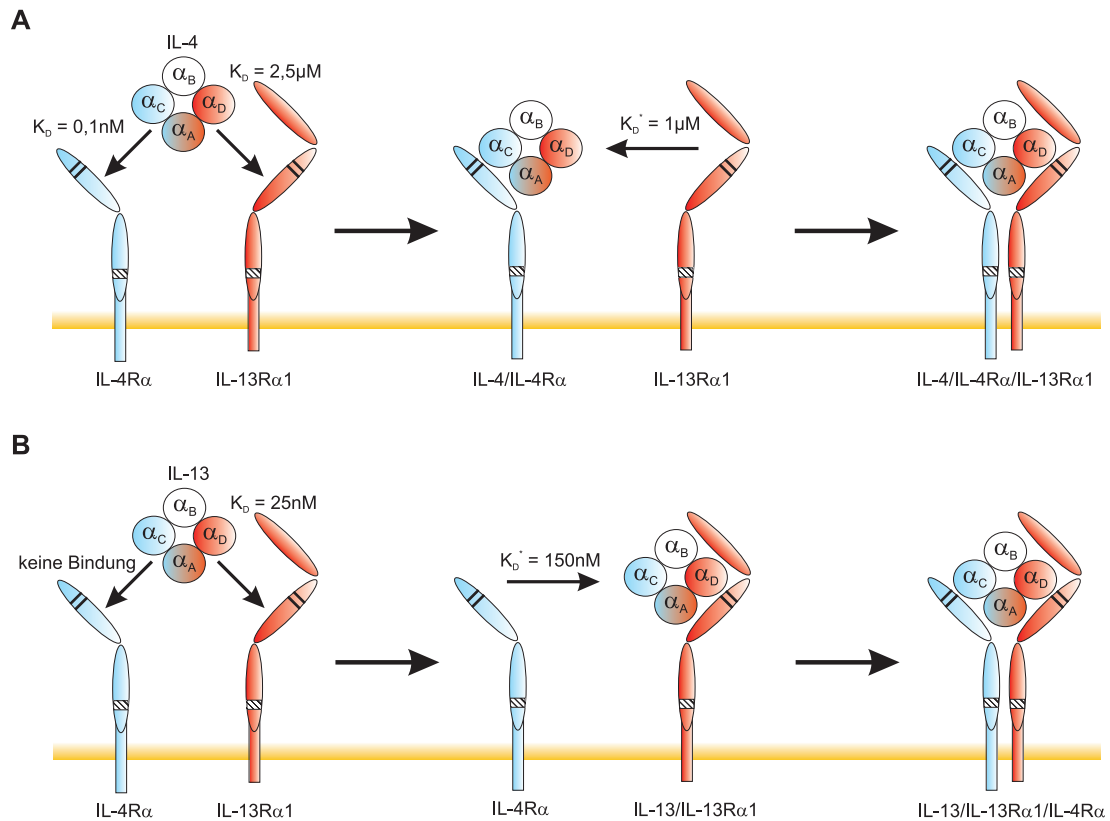


Abbildung 4.2: Sequentieller Bindemechanismus im IL-4/IL-13-Rezeptor-Liganden-System. A: IL-4 bindet zuerst an seine hochaffine Rezeptorkette IL-4R α . In einem zweiten Schritt wird die IL-13R α 1-Kette in den Komplex rekrutiert, wodurch es zur Aktivierung des Rezeptors kommt. **B:** Im Falle von IL-13 ist die Reihenfolge, in der der signalaktive Rezeptorkomplex aufgebaut wird, umgekehrt. IL-13 bindet zunächst an die IL-13R α 1-Kette, bevor die niederaffine IL-4R α -Kette in den ternären Gesamtkomplex rekrutiert wird. Die mit K_D^* gekennzeichneten Affinitäten wurden für die Interaktion von löslichen Rezeptor-ECDs mit immobilisierten, binären Ligand-Rezeptorkomplexen bestimmt. Die Werte spiegeln daher nicht die tatsächlichen Affinitäten in einer zweidimensionalen Zellmembran wider.

Auffallend sind die Unterschiede zwischen IL-4 und IL-13 bei der Interaktion mit der jeweils niederaffinen Rezeptoruntereinheit. Die Affinität von IL-13R α 1 zu IL-4 ($K_D \approx 2,5\mu\text{M}$) ist nur geringfügig niedriger, als die zum binären IL-4/IL-4R α -Komplex ($K_D \approx 1\mu\text{M}$). Die IL-13R α 1-Kette trägt damit nur in sehr geringem Maße zur Gesamtaffinität des Rezeptorkomplexes gegenüber IL-4 bei und hat keinen stabilisierenden Einfluss auf den IL-4/IL-4R α -Komplex [140, 175].

Ein anderes Bild ergibt sich für den Liganden IL-13. Während die Affinität der IL-4R α -Kette zu IL-13 unterhalb der Nachweisgrenze liegt, konnte für die Interaktion zwischen der IL-4R α -ECD und dem IL-13/IL-13R α 1-Komplex ein K_D -Wert von ca. 150nM bestimmt werden. Ein derartig starker, kooperativer Effekt für die Bindung von IL-13 an den Gesamtrezeptor wurde bereits auf transfizierten

Zellen beobachtet. Werden CHO-Zellen zusätzlich zu IL-13R α 1 mit IL-4R α transfiziert, so verringert sich der beobachtete K_D -Wert für die Bindung von IL-13 von ca. 5nM auf ca. 40pM [74]. Durch die kooperative Bindung erreicht IL-13 zum TypII-IL-4-Rezeptor *in vivo* eine ähnlich hohe Affinität im pikomolaren Bereich wie IL-4 [136]. Im Falle von IL-4 wird die Affinität zum Rezeptor jedoch nahezu ausschließlich von der IL-4R α -Kette bestimmt und kooperative Effekte spielen keine Rolle. Auch in SPR-Experimenten konnte eine Stabilisierung des IL-13/IL-13R α 1-Komplexes durch IL-4R α -ECD gezeigt werden [175]. Die in dieser Arbeit bestimmten Affinitäten zwischen löslichen, extrazellulären Rezeptordomänen und auf der Chipoberfläche immobilisierten binären Ligand-Rezeptorkomplexen spiegeln zwar nicht die tatsächlichen Gegebenheiten auf einer zweidimensionalen Zellmembran wieder, sie geben jedoch Hinweise auf den Aufbau extrazellulärer Interaktionsflächen zwischen Liganden und Rezeptoruntereinheiten. So spricht die beobachtete, starke Kooperativität bei der Interaktion zwischen IL-4R α -ECD und IL-13 dafür, dass sich das strukturelle Bindeepitop aus Oberflächenbereichen von IL-13 und der IL-13R α 1 zusammensetzt, d.h. dass es eine Interaktionsfläche zwischen den beiden extrazellulären Domänen von IL-4R α und IL-13R α 1 geben muss. Ein ähnlicher Mechanismus ist im IL-2-Ligand-Rezeptorsystem zu finden. Während isolierte γ_C -ECD weder Bindung zu IL-2 noch zu IL-2R β zeigt, so wurde für die Interaktion zwischen der γ_C -Kette und dem binären IL-2/IL-2R β -ECD-Komplex ein K_D -Wert von 1,5nM bestimmt [176]. In den später veröffentlichten Kristallstrukturen von IL-2 im Komplex mit seinen α -, β - und γ_C -Rezeptoruntereinheiten [117, 118] ist deutlich zu erkennen, dass γ_C an ein zusammengesetztes Bindeepitop aus IL-2 und der IL-2R β -Kette bindet. Dabei ist die Interaktionsfläche zwischen IL-2 und γ_C mit 970Å² deutlich kleiner als die Kontaktfläche zwischen den beiden Rezeptoruntereinheiten (1640Å²). Da es, wie auch im IL-4/IL-13-System, keine messbare Affinität zwischen den beiden extrazellulären Rezeptordomänen gibt, kann davon ausgegangen werden, dass die Bindung des Liganden in der extrazellulären Domäne der hochaffinen Rezeptorkette zu Konformationsänderungen führt, welche dem binären Ligand-Rezeptorkomplex die Interaktion mit der niederaffinen Rezeptorkette ermöglichen. Im Falle des IL-2-Systems tragen die direkten Interaktionen zwischen γ_C und IL-2R β nicht nur zur Affinität, sondern auch in bedeutendem Maße zur Spezifität der Interaktion bei. Möglicherweise ist das auch beim IL-13-Rezeptor der Fall. Die IL-4R α -Kette kann nur mit IL-13 und IL-13R α 1 einen ternären Komplex ausbilden. Es kommt jedoch zu keiner Interaktion mit einem binären Komplex aus IL-13 und IL-13R α 2. Diese Spezifität der IL-4R α -Kette wird wahrscheinlich ebenfalls von direkten Interaktionen zwischen den extrazellulären Domänen der Rezeptoren bestimmt. Ein aus Ligand und Rezeptorkette zusammengesetztes Bindeepitop zur Rekrutierung der zweiten Rezeptoruntereinheit stellt auch einen möglichen, regulatorischen Mechanismus dar, um eine Ligand-unabhängige Interaktion zweier Rezeptoruntereinheiten und damit deren gegenseitige Aktivierung über die intrazellulären Signaldomänen zu verhindern. Die Aktivierung der Rezeptoren zur intrazellulären Signalweiterleitung darf jedoch nicht allein mit der durch den Liganden vermittelten, räumlichen Zusammenführung der beiden Rezeptoruntereinheiten gleichgesetzt werden. So konnte

gezeigt werden, dass der EPO-Rezeptor bereits unabhängig vom Liganden als nicht signalaktiver Dimer auf der Zelloberfläche vorliegt [177]. Durch die Bindung von EPO an den Rezeptor wird eine Scheren-ähnliche Konformationsänderung der Rezeptorketten induziert, welche die intrazellulären Domänen der beiden Untereinheiten in Kontakt zueinander bringt und den Rezeptorkomplex dadurch aktiviert [178]. Des Weiteren wurde in Studien mit EPO-Rezeptor-dimerisierenden Peptiden gezeigt, dass die Stärke des intrazellulären Signals von der relativen Orientierung der dimerisierten, extrazellulären EPO-Rezeptordomänen zueinander abhängt [179, 180]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die räumliche Nähe der Rezeptoruntereinheiten zueinander notwendig, jedoch nicht hinreichend für deren Aktivierung ist. Vielmehr müssen die intrazellulären Kinasedomänen durch eine vom Liganden vermittelte Konformationsänderung in die richtige Orientierung zueinander gebracht werden. Es muss auch im IL-4/IL-13-System einen regulativen Mechanismus geben, der es der Zelle erlaubt, zwischen Rezeptorkomplexen zu unterscheiden, die in Folge einer Ligandenbindung oder durch zufällige Kollision entstanden sind, da es sonst bei hohen, lokalen Rezeptorkonzentrationen auf der Zelloberfläche leicht zu Ligand-unabhängiger Signalaktivität kommen könnte. Die IL-4R α -Kette konnte in mehreren Arbeiten in sog. „lipid rafts“ lokalisiert werden [181-183]. In diesen Membranmikrodomänen können hohe lokale Rezeptorkonzentrationen auftreten, die Ligand-unabhängige Kollisionen zwischen Rezeptorketten sehr wahrscheinlich machen. Von Weidemann *et al.* [184] wird daher ein Modell vorgeschlagen, in dem die IL-4R α -Kette ohne gebundenen Liganden in einer inaktiven Konformation („off-state“) vorliegt, in der die Transphosphorylierung und damit Transaktivierung einer zweiten Rezeptorkette nicht möglich ist. Bindet dagegen IL-4 an die IL-4R α -Kette wird eine Konformationsänderung der Rezeptorkette induziert („on-state“), so dass es zur Bildung eines aktiven Signalkomplexes kommen kann. Einen weiteren Faktor, der von großer Bedeutung für die Signalaktivität eines gebildeten Rezeptorkomplexes ist, stellt die Lebensdauer des Komplexes dar. Beim hGH-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass, wenn die Halbwertszeit der Bindung von hGH an den hGH-Rezeptor durch Mutationen unter den Wert von einer Minute gesenkt wird, die intrazelluläre Signalstärke proportional abnimmt [185]. Indem ein gebundener Ligand die Lebensdauer eines Rezeptorkomplexes im Vergleich zu durch zufällige Kollision entstanden Komplexen erhöht, wird eine Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade erst ermöglicht.

Durch die bisher in der Literatur beschriebenen Aktivierungsmechanismen bei Zytokinrezeptoren lässt sich jedoch nicht die, für die IL-13R α 2-Kette beobachtete Signalaktivität erklären. Man ging lange davon aus, dass die IL-13R α 2-Kette keine Signalaktivität besitzt, da sie nur einen sehr kurzen zytoplasmatischen Teil aus 17 Aminosäuren besitzt, der keine Kinasedomäne enthält und auch nicht mit JAKs oder STATs assoziiert ist [77, 81, 186]. Da bisher auch keine Interaktion mit anderen Rezeptorketten gezeigt werden konnte, ging man davon aus, dass die IL-13R α 2-Kette als negativer Regulator von IL-13-Signalen wirkt, indem sie IL-13 mit höherer Affinität als die IL-13R α 1-Kette bindet. Eine derartige Inhibierung von IL-13-Signalen konnte auch in Tiermodellen demonstriert werden [187-189]. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass IL-13R α 2 wahrscheinlich selbst an der Weiterleitung von Signalen ins Zellinnere beteiligt ist. IL-13-Signale, die von der IL-13R α 2-Kette

in die Zelle vermittelt werden, induzieren die Produktion von TGF- β , wodurch es im Mausmodell verstärkt zur Ausbildung von Fibrose kommt [84, 190]. Der Mechanismus, über den es zur Aktivierung von IL-13R α 2 kommt, ist bisher jedoch noch völlig unklar. Möglicherweise kommt es durch die Bindung von IL-13 zu einer Konformationsänderung im zytoplasmatischen Teil der IL-13R α 2, wodurch eine Bindestelle für ein bisher nicht identifiziertes Protein geschaffen oder auch zerstört wird, das einen regulatorischen Einfluss auf die Expression von TGF- β besitzt. Weitere mögliche Mechanismen der IL-13R α 2-Signalaktivität stellen die Ligand-vermittelte Rezeptorendozytose oder die Assoziation mit einer weiteren, bisher nicht identifizierten Rezeptorkette dar.

4.6 Die Rolle von IL-4 und IL-13 bei allergischem Asthma und mögliche Therapieansätze

Die beiden Zytokine IL-4 und IL-13 lösen in responsiven Zellen ähnliche Antworten aus. Viele dieser Zellreaktionen stehen in Verbindung mit Krankheiten, wie Allergie und Asthma. Dennoch gibt es Unterschiede in den von beiden Interleukinen ausgelösten Effekten. Während IL-4 eine bedeutendere Rolle bei der Regulierung der T_H2-Zell-Entwicklung spielt, besitzt IL-13 eine höhere Aktivität bei der Regulation und Auslösung von Atemwegsüberempfindlichkeit, Atemwegshyperreaktivität (AHR), übermäßiger Schleimproduktion und T_H2-artigen Entzündungen in der asthmatischen Lunge [69, 191, 192]. So sorgt IL-4 für die initiale Verlagerung der Immunantwort in Richtung der T_H2-abhängigen allergischen Reaktionen, wohingegen IL-13 von zentraler Bedeutung in der Effektorphase von allergischen Entzündungen und Asthma ist [56, 193-195]. Da in Mausmodellen für allergisches Asthma gezeigt werden konnte, dass durch die spezifische Inhibition von IL-13 durch lösliche IL-13R α 2-ECD die übermäßige Schleimproduktion und AHR in der Lunge rückgängig gemacht werden können [196], sind IL-4, IL-13 und ihre Signalwege als viel versprechende Ziele für die Entwicklung therapeutischer Stoffe gegen Asthma erkannt worden. Zur Inhibition von durch IL-4 bzw. IL-13 vermittelten Signalen können lösliche, extrazelluläre Rezeptordomänen verwendet werden. Lösliche IL-4R α -ECD konnte bereits erfolgreich zur Therapie bei Patienten mit leichter, andauernder Asthmaerkrankung in einer klinischen Phase I/II-Studie eingesetzt werden [197]. Aufgrund der Tatsache, dass IL-4R α -ECD jedoch nur an IL-4 mit hoher Affinität und nicht an IL-13 bindet, können mit diesem Ansatz ausschließlich durch IL-4 ausgelöste Effekte inhibiert werden. Die IL-13-Signale bleiben unbeeinflusst [175]. Der Einsatz von löslicher IL-13R α 2-ECD führt dagegen zu einer spezifischen Inhibition der IL-13-Signale. Aufgrund der sehr hohen Affinität von IL-13 zur IL-13R α 2-ECD ($K_D \approx 50$ pM; vgl. 3.24) im Vergleich zur IL-13R α 1-Kette ($K_D \approx 25$ nM; vgl. 3.3), wird die Bindung des Liganden an den Zelloberflächenrezeptor und dessen Aktivierung verhindert, indem die lösliche IL-13R α 2-ECD den Liganden abfängt. In diesem Fall werden jedoch nur IL-13-, nicht jedoch IL-4-Signale inhibiert. Um den Nachteil zu umgehen, dass einzelne Rezeptoruntereinheiten unterschiedlich hohe Affinitäten zu den beiden Zytokinen haben und damit jeweils nur IL-4 oder IL-

IL-13 spezifisch inhibieren können, wurden sog. „cytokine traps“ entwickelt. Dabei handelt es sich um chimäre Proteine aus zwei Rezeptoruntereinheiten. Ein chimärer Inhibitor, der aus der IL-4R α - und der IL-13R α 1-ECD aufgebaut ist, bindet sowohl IL-4, als auch IL-13 mit hoher Affinität und verhindert somit effektiv die Aktivierung von IL-4- und IL-13-Zelloberflächenrezeptoren [198].

Neben löslichen Rezeptordomänen können auch signalinaktive Ligandenvarianten als Antagonisten eingesetzt werden. So wirkt die Variante IL13-E13K als spezifischer Inhibitor von IL-13-Signalen [159, 199]. IL13-E13K bindet in zellbasierenden Untersuchungen mit vier- bis achtfach höherer Affinität an den IL-13-Rezeptor, zeigt keine eigene Signalaktivität und inhibiert die Aktivität von wildtypischem IL-13, indem es die Rekrutierung der IL-4R α -Kette verhindert. IL13-E13K wirkt zum Teil auch als Inhibitor von IL-4-Signalen. Durch die Blockade von IL-13R α 1-Ketten können Signale, die IL-4 über den TypII-IL-4-Rezeptor vermittelt, effektiv inhibiert werden. Keinen Einfluss hat der auf IL-13-basierende Antagonist allerdings auf Signale durch den TypI-IL-4-Rezeptor, der auf T-Zellen der einzige IL-4-Rezeptor ist und auf B-Zellen neben dem TypII-IL-4-Rezeptor zu finden ist [200]. Warum IL13-E13K jedoch mit höherer Affinität an den Zelloberflächenrezeptor bindet als wildtypisches IL-13 lässt sich nicht erklären. Die Mutation E13K verhindert die Interaktion mit der IL-4R α -Kette und hat keinen Einfluss auf die Bindung zur IL-13R α 1-Kette. Daher wäre zu erwarten, dass es zu einem Verlust des kooperativen Effekts [74] bei der Interaktion des Liganden mit dem Rezeptor kommt und damit die Affinität verringert wird.

Auch die IL-4-Variante R121D-Y124D besitzt antagonistische Wirkung [201, 202]. IL4-R121D-Y124D bindet an die IL-4R α -Kette, verhindert jedoch die Bildung von signalaktiven Rezeptorkomplexen, indem sowohl die Rekrutierung von γ_c , als auch von IL-13R α 1 inhibiert wird. Da die IL-4R α -Kette ebenfalls an der IL-13-Signaltransduktion beteiligt ist, werden durch IL4-R121D-Y124D auch von IL-13 vermittelte Signale inhibiert [175].

Die inhibitorische Wirkung dieser oder ähnlicher IL-4-Varianten lässt sich möglicherweise noch verstärken, indem man sie mit den in dieser Arbeit beschriebenen Aminosäureaustauschen in den superagonistischen IL-4-Varianten kombiniert [203, 204]. Durch die erhöhte Affinität zur IL-4R α -Kette käme es evtl. zu einer effektiveren Konkurrenz von wildtypischem IL-4 und damit auch zu einer effektiveren Signalinhibition.

Die im Laufe dieser Arbeit gewonnenen, detaillierten Informationen zum molekularen Interaktionsmechanismus der IL-4R α -Kette mit ihren Liganden ermöglicht in Zukunft evtl. das Design von neuen und hochspezifischen IL-4- und IL-13-Inhibitoren zur Therapie von allergischen Entzündungen. Die Tatsache, dass sich die Epitope auf den beiden Rezeptorketten IL-4R α und IL-13R α 1 für die Bindung von IL-4 und IL-13 sehr ähnlich und die Hauptbindeterminanten zum Teil sogar identisch sind, legt die Möglichkeit nahe, durch die Blockade eines relativ kleinen Bereichs auf den Rezeptor-ECDs gleichzeitig die Bindung von IL-4 und IL-13 zu verhindern. So könnte ein niedermolekularer Inhibitor, der besonders aus pharmakologischer Sicht Vorteile gegenüber Protein-basierenden Inhibitoren besäße, die Signaltransduktion von IL-4 und IL-13 effektiv verhindern.

5 Zusammenfassung

Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-13 (IL-13) sind bedeutende Regulatorproteine des Immunsystems. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und dem Verlauf von allergischen Erkrankungen, wie z.B. Asthma. Um ihre Signale in die Zielzelle zu transduzieren, kann von beiden Zytokinen der gleiche Zelloberflächenrezeptor verwendet werden, wodurch sich die überlappenden, biologischen Funktionen erklären lassen. Dieser gemeinsam genutzte Rezeptor ist aus den beiden Untereinheiten IL-4R α und IL-13R α 1 aufgebaut. Da IL-4 und IL-13 auf Aminosäureebene nur etwa 25% Sequenzidentität besitzen und stark unterschiedliche Affinitäten zu den beiden Rezeptorketten besitzen, stellt sich die Frage, durch welchen molekularen Erkennungsmechanismus, die Affinität und die Spezifität der Ligand-Rezeptor-Interaktion unabhängig voneinander reguliert werden kann.

In dieser Arbeit gelang es, rekombinante Expressions- und Aufreinigungsstrategien für IL-13 und die extrazellulären Domänen der Rezeptorketten IL-13R α 1 und IL-13R α 2 zu entwickeln. Dadurch war es möglich, eine breite Mutations-/Interaktionsanalyse der IL-13R α 1-Kette durchzuführen. Es konnte gezeigt werden, dass die N-terminale FnIII-ähnliche Domäne von IL-13R α 1 sowohl an der Bindung von IL-13 als auch an der Interaktion mit IL-4 beteiligt ist. Im funktionellen Bindeepitop der IL-13R α 1-Kette wurden die Aminosäurereste Arg84, Phe253 und Tyr321 als Hauptbindungs determinanten für die Interaktion mit IL-13 identifiziert. Durch die Interaktionsstudien der IL-13R α 1-Varianten mit IL-4 wurde gezeigt, dass diese Hauptbindungs determinanten auch für die niederaffine Bindung von IL-4 von größter Bedeutung sind. Die funktionellen Bindeepitope für IL-4 und IL-13 auf der IL-13R α 1-Kette sind nahezu identisch und überlappen in einem großen Bereich.

Aufgrund der Ergebnisse aus der Mutagenesestudie war es möglich, ein Strukturmodell der extrazellulären Domäne der IL-13R α 1-Kette zu erstellen. Darin wird eine neuartige Orientierung der N-terminalen FnIII-Domäne und deren Beteiligung an der Ligandeninteraktion dargestellt. Mit Hilfe des Strukturmodells gelang es, neue Aminosäurereste auf der Oberfläche von IL-13 zu identifizieren, die an der Bindung zu IL-13R α 1 beteiligt sind, was die Relevanz des Strukturmodells weiter unterstreicht.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde versucht, den molekularen Mechanismus aufzuklären, durch den es den superagonistischen IL-4-Varianten T13D und F82D gelingt, mit dreifach höherer Affinität an die IL-4R α -Kette zu binden, als wildtypischer Ligand. Durch strukturelle und funktionelle Untersuchungen wurde gezeigt, dass der Affinitätssteigerung ein indirekter Mechanismus zugrunde liegt, bei dem eine Konformationsänderung und die Fixierung der Arg85-Seitenkette von IL-4 zur Ausbildung von zusätzlichen Ligand-Rezeptor-Interaktionen führt. Das Bindeepitop zwischen IL-4 und der IL-4R α -Kette besitzt eine modulare Architektur aus drei unabhängig voneinander agierenden Interaktionsclustern. Bei der Interaktion von wildtypischem IL-4 mit IL-4R α tragen nur zwei dieser Cluster in signifikanter Weise zur freien Bindeenergie bei. Im Falle der

superagonistischen IL-4-Varianten ist jedoch auch das dritte Cluster an der Generierung von zusätzlicher, freier Bindeenergie beteiligt, wodurch die Affinität zwischen Ligand und Rezeptor erhöht wird. Damit stellt der modulare Aufbau der Interaktionsfläche zwischen IL-4 und der IL-4R α -Kette möglicherweise einen Mechanismus dar, über den Proteine die Affinität von Wechselwirkungen über einen großen Bereich variieren können, ohne dabei Spezifität einzubüßen.

Da IL-4 und IL-13 als interessante Zielmoleküle für die Therapie von allergischen und asthmatischen Erkrankungen erkannt worden sind, können die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Informationen über den Bindemechanismus und die Einblicke in den molekularen Charakter der Interaktion zwischen den beiden Zytokinen und ihren spezifischen Rezeptorketten dabei helfen, neuartige und hoch spezifische, inhibitorische Moleküle zu entwickeln.

6 Summary

Interleukin-4 (IL-4) and Interleukin-13 (IL-13) are important regulatory proteins of the immune system. They play a key role in the development and the progression of allergic diseases like asthma. For signal transduction into the target cell, both cytokines can use an identical cell surface receptor, which is an explanation for many overlapping biological functions of IL-4 and IL-13. This common receptor consists of the two subunits IL-4R α and IL-13R α 1. Because IL-4 and IL-13 share only 25% sequence identity on the amino acid sequence level and because they show very different affinities to the two receptor chains, the question has to be raised, by which molecular recognition mechanism it is possible to regulate affinity and specificity of the ligand-receptor-interaction independently.

In the course of this work recombinant expression and purification strategies for IL-13 and the extracellular domains of IL-13R α 1 and IL-13R α 2 were established. Therefore it was possible to perform a broad mutagenesis and interaction analysis of the IL-13R α 1 chain. It was shown, that the N-terminal FnIII-like domain of IL-13R α 1 participates in the binding of IL-13 as well as in the interaction with IL-4. As part of the functional epitope the amino acid residues Arg84, Phe253 and Tyr321 were identified to be main binding determinants for the interaction with IL-13. By carrying out interaction studies with IL-4 it could be demonstrated, that the same residues are also from great importance for the low affinity binding of IL-4. The functional epitopes for the binding of IL-4 and IL-13 are almost identical and are overlapping in a large area.

Due to the results of the mutagenesis study it was possible to generate a structural model of the extracellular domain of the IL-13R α 1 chain. A key feature of this model is the novel orientation of the N-terminal FnIII-like domain and its involvement in ligand binding. According to the modelled structure new residues in IL-13 could be identified, that participate in the interaction with the IL-13R α 1. This further underlines the relevance of the shown structural model of the extracellular domain of the IL-13R α 1 chain.

In a different part of this work it was tried to elucidate the molecular mechanism, which enables the super-agonistic IL-4 variants T13D and F82D bind IL-4R α with three times higher affinity than wild-type IL-4. With the help of structural and functional analysis it could be shown, that an indirect mechanism leads to the gain of affinity. A conformational change in and the fixation of the Arg85 side chain in IL-4 result in the formation of additional interactions between ligand and receptor. The binding interface between IL-4 and IL-4R α exhibits a modular architecture consisting of three independently acting interaction clusters. For the binding of wild-type IL-4 to the IL-4R α chain only two of the three clusters contribute a significant amount to the overall free binding energy. In the case of the super-agonistic IL-4 variants all three interaction clusters are used to generate additional free binding energy and to increase the affinity between ligand and receptor. Therefore the modular design of the IL-4/IL-4R α interaction interface probably represents a mechanism, which enables proteins to alter the affinity of interactions over a broad range without losing specificity.

Because IL-4 and IL-13 were discovered as promising targets for the therapy of allergic and asthmatic diseases, the acquired information about the binding mechanism and the molecular characteristics of the interaction between the cytokines IL-4 and IL-13 and their specific receptor chains may help to design novel and highly specific inhibitory molecules.

7 Literaturverzeichnis

1. *The Cytokine Handbook*. 4. ed, ed. T. Angus and M. Lotze. Vol. 1-2. 2003, Amsterdam: Academic Press. 1572.
2. Howard, M., et al., *Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2*. J Exp Med, 1982. **155**(3): p. 914-23.
3. Howard, M. and W.E. Paul, *Interleukins for B lymphocytes*. Lymphokine Res, 1982. **1**(1): p. 1-4.
4. Yokota, T., et al., *Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(16): p. 5894-8.
5. Bradding, P., et al., *Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells*. J Exp Med, 1992. **176**(5): p. 1381-6.
6. Redrup, A.C., et al., *Differential regulation of IL-4 and IL-13 secretion by human basophils: their relationship to histamine release in mixed leukocyte cultures*. J Immunol, 1998. **160**(4): p. 1957-64.
7. Seder, R.A. and W.E. Paul, *Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 635-73.
8. Chen, H. and W.E. Paul, *Cultured NK1.1+ CD4+ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1*. J Immunol, 1997. **159**(5): p. 2240-9.
9. Ho, I.C., et al., *Marking IL-4-producing cells by knock-in of the IL-4 gene*. Int. Immunol., 1999. **11**(2): p. 243-247.
10. Mosmann, T.R. and S. Sad, *The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more*. Immunol Today, 1996. **17**(3): p. 138-46.
11. Ferrick, D.A., et al., *Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo*. Nature, 1995. **373**(6511): p. 255-7.
12. Nakajima, H., G.J. Gleich, and H. Kita, *Constitutive production of IL-4 and IL-10 and stimulated production of IL-8 by normal peripheral blood eosinophils*. J Immunol, 1996. **156**(12): p. 4859-66.
13. Nonaka, M., et al., *Distinct immunohistochemical localization of IL-4 in human inflamed airway tissues. IL-4 is localized to eosinophils in vivo and is released by peripheral blood eosinophils*. J Immunol, 1995. **155**(6): p. 3234-44.

14. Hu-Li, J., et al., *B cell stimulatory factor 1 (interleukin 4) is a potent costimulant for normal resting T lymphocytes*. J Exp Med, 1987. **165**(1): p. 157-72.
15. Barcena, A., et al., *Interplay between IL-2 and IL-4 in human thymocyte differentiation: antagonism or agonism*. Int Immunol, 1991. **3**(5): p. 419-25.
16. Toi, M., A.L. Harris, and R. Bicknell, *Interleukin-4 is a potent mitogen for capillary endothelium*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **174**(3): p. 1287-93.
17. Monroe, J.G., et al., *Lymphokine regulation of inflammatory processes: interleukin-4 stimulates fibroblast proliferation*. Clin Immunol Immunopathol, 1988. **49**(2): p. 292-8.
18. Paul, W.E. and R.A. Seder, *Lymphocyte responses and cytokines*. Cell, 1994. **76**(2): p. 241-51.
19. Hsieh, C.S., et al., *Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): p. 6065-9.
20. Seder, R.A., et al., *The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice*. J Exp Med, 1992. **176**(4): p. 1091-8.
21. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
22. Robinson, D.S., et al., *Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma*. N Engl J Med, 1992. **326**(5): p. 298-304.
23. Bacharier, L.B., H. Jabara, and R.S. Geha, *Molecular mechanisms of immunoglobulin E regulation*. Int Arch Allergy Immunol, 1998. **115**(4): p. 257-69.
24. Worm, M. and B.M. Henz, *Molecular regulation of human IgE synthesis*. J Mol Med, 1997. **75**(6): p. 440-7.
25. Coffman, R.L., et al., *B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells*. J Immunol, 1986. **136**(12): p. 4538-41.
26. Vitetta, E.S., et al., *Serological, biochemical, and functional identity of B cell-stimulatory factor 1 and B cell differentiation factor for IgG1*. J Exp Med, 1985. **162**(5): p. 1726-31.
27. Crawford, R.M., et al., *B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) activates macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens*. J Immunol, 1987. **139**(1): p. 135-41.
28. Noelle, R., et al., *Increased expression of Ia antigens on resting B cells: an additional role for B-cell growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(19): p. 6149-53.

29. Ohara, J. and W.E. Paul, *Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(21): p. 8221-5.
30. Defrance, T., et al., *Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes*. J Exp Med, 1987. **165**(6): p. 1459-67.
31. Thornhill, M.H., et al., *Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and -independent binding mechanisms*. J Immunol, 1991. **146**(2): p. 592-8.
32. Hoeck, J. and M. Woisetschlager, *STAT6 mediates eotaxin-1 expression in IL-4 or TNF-alpha-induced fibroblasts*. J Immunol, 2001. **166**(7): p. 4507-15.
33. Mochizuki, M., et al., *IL-4 induces eotaxin: a possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth infection and atopy*. J Immunol, 1998. **160**(1): p. 60-8.
34. Zimmermann, N., et al., *Murine eotaxin-2: a constitutive eosinophil chemokine induced by allergen challenge and IL-4 overexpression*. J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5839-46.
35. Hara, T., K. Yamada, and H. Tachibana, *Basophilic differentiation of the human leukemia cell line KU812 upon treatment with interleukin-4*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **247**(3): p. 542-8.
36. Bischoff, S.C., et al., *IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 8080-5.
37. Maggi, E., *The TH1/TH2 paradigm in allergy*. Immunotechnology, 1998. **3**(4): p. 233-44.
38. Ngoc, P.L., et al., *Cytokines, allergy, and asthma*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2005. **5**(2): p. 161-6.
39. Brown, K.D., et al., *A family of small inducible proteins secreted by leukocytes are members of a new superfamily that includes leukocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors, and indicators of various activation processes*. J Immunol, 1989. **142**(2): p. 679-87.
40. McKenzie, A.N., et al., *Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3735-9.
41. Minty, A., et al., *Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses*. Nature, 1993. **362**(6417): p. 248-50.
42. Morgan, J.G., et al., *The selective isolation of novel cDNAs encoded by the regions surrounding the human interleukin 4 and 5 genes*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(19): p. 5173-9.

43. de Waal Malefyt, R., et al., *Differential regulation of IL-13 and IL-4 production by human CD8+ and CD4+ Th0, Th1 and Th2 T cell clones and EBV-transformed B cells*. Int Immunol, 1995. **7**(9): p. 1405-16.
44. de Vries, J.E., *Molecular and biological characteristics of interleukin-13*. Chem Immunol, 1996. **63**: p. 204-18.
45. Hoshino, T., et al., *IL-13 production by NK cells: IL-13-producing NK and T cells are present in vivo in the absence of IFN-gamma*. J Immunol, 1999. **162**(1): p. 51-9.
46. Punnonen, J., et al., *Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3730-4.
47. Zurawski, G. and J.E. de Vries, *Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells*. Immunol Today, 1994. **15**(1): p. 19-26.
48. de Vries, J.E., *The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **102**(2): p. 165-9.
49. Horie, S., et al., *Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis*. Intern Med, 1997. **36**(3): p. 179-85.
50. Luttmann, W., et al., *Activation of human eosinophils by IL-13. Induction of CD69 surface antigen, its relationship to messenger RNA expression, and promotion of cellular viability*. J Immunol, 1996. **157**(4): p. 1678-83.
51. Pope, S.M., et al., *IL-13 induces eosinophil recruitment into the lung by an IL-5- and eotaxin-dependent mechanism*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(4): p. 594-601.
52. Bochner, B.S., et al., *IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells*. J Immunol, 1995. **154**(2): p. 799-803.
53. Chiamonte, M.G., et al., *An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response*. J Clin Invest, 1999. **104**(6): p. 777-85.
54. Li, L., et al., *Effects of Th2 cytokines on chemokine expression in the lung: IL-13 potently induces eotaxin expression by airway epithelial cells*. J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2477-87.
55. Webb, D.C., et al., *Integrated signals between IL-13, IL-4, and IL-5 regulate airways hyperreactivity*. J Immunol, 2000. **165**(1): p. 108-13.
56. Wills-Karp, M. and M. Chiamonte, *Interleukin-13 in asthma*. Curr Opin Pulm Med, 2003. **9**(1): p. 21-7.
57. McKenzie, A.N.J. and G. Zurawski, *Guidebook to Cytokines and Their Receptors*, ed. N.A. Nicola. 1994, Oxford, U.K.: Oxford Univ. Press.

58. Powers, R., et al., *Three-dimensional solution structure of human interleukin-4 by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy*. Science, 1992. **256**(5064): p. 1673-7.
59. Smith, L.J., et al., *Human interleukin 4. The solution structure of a four-helix bundle protein*. J Mol Biol, 1992. **224**(4): p. 899-904.
60. Walter, M.R., et al., *Crystal structure of recombinant human interleukin-4*. J Biol Chem, 1992. **267**(28): p. 20371-6.
61. Wlodawer, A., A. Pavlovsky, and A. Gustchina, *Crystal structure of human recombinant interleukin-4 at 2.25 Å resolution*. FEBS Lett, 1992. **309**(1): p. 59-64.
62. Muller, T., et al., *Aspects of receptor binding and signalling of interleukin-4 investigated by site-directed mutagenesis and NMR spectroscopy*. J Mol Biol, 1994. **237**(4): p. 423-36.
63. Muller, T., F. Oehlenschlaeger, and M. Buehner, *Human interleukin-4 and variant R88Q: phasing X-ray diffraction data by molecular replacement using X-ray and nuclear magnetic resonance models*. J Mol Biol, 1995. **247**(2): p. 360-72.
64. Eisenmesser, E.Z., et al., *Solution structure of interleukin-13 and insights into receptor engagement*. J Mol Biol, 2001. **310**(1): p. 231-41.
65. Moy, F.J., et al., *Solution structure of human IL-13 and implication for receptor binding*. J Mol Biol, 2001. **310**(1): p. 219-30.
66. Sprang, S.R. and J. Fernando Bazan, *Cytokine structural taxonomy and mechanisms of receptor engagement : Current opinion in structural biology 1993, 3:815-827*. Current Opinion in Structural Biology, 1993. **3**(6): p. 815-827.
67. Bazan, J.F., *Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(18): p. 6934-8.
68. Leonard, W.J. and J.X. Lin, *Cytokine receptor signaling pathways*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(5): p. 877-88.
69. Nelms, K., et al., *The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 701-38.
70. Russell, S.M., et al., *Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor*. Science, 1993. **262**(5141): p. 1880-3.
71. Kishimoto, T., T. Taga, and S. Akira, *Cytokine signal transduction*. Cell, 1994. **76**(2): p. 253-62.
72. Sugamura, K., et al., *The common gamma-chain for multiple cytokine receptors*. Adv Immunol, 1995. **59**: p. 225-77.

73. Noguchi, M., et al., *Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans*. Cell, 1993. **73**(1): p. 147-57.
74. Miloux, B., et al., *Cloning of the human IL-13R alpha1 chain and reconstitution with the IL4R alpha of a functional IL-4/IL-13 receptor complex*. FEBS Lett, 1997. **401**(2-3): p. 163-6.
75. Gauchat, J.F., et al., *A novel 4-kb interleukin-13 receptor alpha mRNA expressed in human B, T, and endothelial cells encoding an alternate type-II interleukin-4/interleukin-13 receptor*. Eur J Immunol, 1997. **27**(4): p. 971-8.
76. Caput, D., et al., *Cloning and characterization of a specific interleukin (IL)-13 binding protein structurally related to the IL-5 receptor alpha chain*. J Biol Chem, 1996. **271**(28): p. 16921-6.
77. Zhang, J.G., et al., *Identification, purification, and characterization of a soluble interleukin (IL)-13-binding protein. Evidence that it is distinct from the cloned IL-13 receptor and IL-4 receptor alpha-chains*. J Biol Chem, 1997. **272**(14): p. 9474-80.
78. Debinski, W., et al., *Receptor for interleukin (IL) 13 does not interact with IL4 but receptor for IL4 interacts with IL13 on human glioma cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(37): p. 22428-33.
79. Murata, T., J. Taguchi, and R.K. Puri, *Interleukin-13 receptor alpha' but not alpha chain: a functional component of interleukin-4 receptors*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3884-91.
80. Feng, N., et al., *The interleukin-4/interleukin-13 receptor of human synovial fibroblasts: overexpression of the nonsignaling interleukin-13 receptor alpha2*. Lab Invest, 1998. **78**(5): p. 591-602.
81. Kawakami, K., et al., *The interleukin-13 receptor alpha2 chain: an essential component for binding and internalization but not for interleukin-13-induced signal transduction through the STAT6 pathway*. Blood, 2001. **97**(9): p. 2673-9.
82. Daines, M.O. and G.K. Hershey, *A novel mechanism by which interferon-gamma can regulate interleukin (IL)-13 responses. Evidence for intracellular stores of IL-13 receptor alpha -2 and their rapid mobilization by interferon-gamma*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 10387-93.
83. Wood, N., et al., *Enhanced Interleukin (IL)-13 Responses in Mice Lacking IL-13 Receptor {alpha} 2*. 2003. p. 703-709.
84. Fichtner-Feigl, S., et al., *IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis*. Nat Med, 2006. **12**(1): p. 99-106.
85. Yin, T., M.L. Tsang, and Y.C. Yang, *JAK1 kinase forms complexes with interleukin-4 receptor and 4PS/insulin receptor substrate-1-like protein and is activated by interleukin-4 and interleukin-9 in T lymphocytes*. J Biol Chem, 1994. **269**(43): p. 26614-7.
86. Russell, S.M., et al., *Interaction of IL-2R beta and gamma c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID*. Science, 1994. **266**(5187): p. 1042-5.

87. Miyazaki, T., et al., *Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits*. Science, 1994. **266**(5187): p. 1045-7.
88. Welham, M.J., et al., *Interleukin-13 signal transduction in lymphohemopoietic cells. Similarities and differences in signal transduction with interleukin-4 and insulin*. J Biol Chem, 1995. **270**(20): p. 12286-96.
89. Ryan, J.J., et al., *Characterization of a mobile Stat6 activation motif in the human IL-4 receptor*. J Immunol, 1998. **161**(4): p. 1811-21.
90. Hou, J., et al., *An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat*. Science, 1994. **265**(5179): p. 1701-6.
91. Mikita, T., et al., *Mutational analysis of the STAT6 SH2 domain*. J Biol Chem, 1998. **273**(28): p. 17634-42.
92. Mikita, T., et al., *Requirements for interleukin-4-induced gene expression and functional characterization of Stat6*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(10): p. 5811-20.
93. Kotanides, H. and N.C. Reich, *Requirement of tyrosine phosphorylation for rapid activation of a DNA binding factor by IL-4*. Science, 1993. **262**(5137): p. 1265-7.
94. Andrews, R.P., et al., *Analysis of the life cycle of stat6. Continuous cycling of STAT6 is required for IL-4 signaling*. J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 36563-9.
95. Wang, H.Y., W.E. Paul, and A.D. Keegan, *IL-4 function can be transferred to the IL-2 receptor by tyrosine containing sequences found in the IL-4 receptor alpha chain*. Immunity, 1996. **4**(2): p. 113-21.
96. Keegan, A.D., et al., *An IL-4 receptor region containing an insulin receptor motif is important for IL-4-mediated IRS-1 phosphorylation and cell growth*. Cell, 1994. **76**(5): p. 811-20.
97. Sun, X.J., et al., *Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling*. Nature, 1995. **377**(6545): p. 173-7.
98. Jiang, H., M.B. Harris, and P. Rothman, *IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(6 Pt 1): p. 1063-70.
99. Dhand, R., et al., *PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity*. Embo J, 1994. **13**(3): p. 522-33.
100. Toker, A. and L.C. Cantley, *Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase*. Nature, 1997. **387**(6634): p. 673-6.
101. Stephens, L.R., T.R. Jackson, and P.T. Hawkins, *Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system?* Biochim Biophys Acta, 1993. **1179**(1): p. 27-75.

102. Franke, T.F., D.R. Kaplan, and L.C. Cantley, *PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis*. Cell, 1997. **88**(4): p. 435-7.
103. Franke, T.F., et al., *Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate*. Science, 1997. **275**(5300): p. 665-8.
104. Zamorano, J., et al., *IL-4 protects cells from apoptosis via the insulin receptor substrate pathway and a second independent signaling pathway*. J Immunol, 1996. **157**(11): p. 4926-34.
105. Wolf, G., et al., *PTB domains of IRS-1 and Shc have distinct but overlapping binding specificities*. J Biol Chem, 1995. **270**(46): p. 27407-10.
106. Rozakis-Adcock, M., et al., *Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases*. Nature, 1992. **360**(6405): p. 689-92.
107. Salcini, A.E., et al., *Formation of Shc-Grb2 complexes is necessary to induce neoplastic transformation by overexpression of Shc proteins*. Oncogene, 1994. **9**(10): p. 2827-36.
108. Giallourakis, C., et al., *Positive regulation of interleukin-4-mediated proliferation by the SH2-containing inositol-5'-phosphatase*. J Biol Chem, 2000. **275**(38): p. 29275-82.
109. Kashiwada, M., et al., *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif of the IL-4 receptor associates with SH2-containing phosphatases and regulates IL-4-induced proliferation*. J Immunol, 2001. **167**(11): p. 6382-7.
110. Hanson, E.M., et al., *Regulation of the dephosphorylation of Stat6. Participation of Tyr-713 in the interleukin-4 receptor alpha, the tyrosine phosphatase SHP-1, and the proteasome*. J Biol Chem, 2003. **278**(6): p. 3903-11.
111. Orchansky, P.L., et al., *Characterization of the Cytoplasmic Domain of Interleukin-13 Receptor-alpha*. J. Biol. Chem., 1999. **274**(30): p. 20818-20825.
112. Orchansky, P.L., et al., *An interleukin (IL)-13 receptor lacking the cytoplasmic domain fails to transduce IL-13-induced signals and inhibits responses to IL-4*. J Biol Chem, 1997. **272**(36): p. 22940-7.
113. Umeshita-Suyama, R., et al., *Characterization of IL-4 and IL-13 signals dependent on the human IL-13 receptor alpha chain 1: redundancy of requirement of tyrosine residue for STAT3 activation*. Int Immunol, 2000. **12**(11): p. 1499-509.
114. Roy, B., et al., *IL-13 signal transduction in human monocytes: phosphorylation of receptor components, association with Jaks, and phosphorylation/activation of Stats*. 2002. p. 580-589.
115. Somers, W., et al., *The X-ray structure of a growth hormone-prolactin receptor complex*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 478-81.

116. Syed, R.S., et al., *Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation*. Nature, 1998. **395**(6701): p. 511-6.
117. Wang, X., M. Rickert, and K.C. Garcia, *Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gamma receptors*. Science, 2005. **310**(5751): p. 1159-63.
118. Stauber, D.J., et al., *Crystal structure of the IL-2 signaling complex: Paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor*. PNAS, 2006. **103**(8): p. 2788-2793.
119. Hage, T., W. Sebald, and P. Reinemer, *Crystal structure of the interleukin-4/receptor alpha chain complex reveals a mosaic binding interface*. Cell, 1999. **97**(2): p. 271-81.
120. Chow, D., et al., *Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex*. Science, 2001. **291**(5511): p. 2150-5.
121. Aritomi, M., et al., *Atomic structure of the GCSF-receptor complex showing a new cytokine-receptor recognition scheme*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 713-7.
122. Kurth, I., et al., *Activation of the signal transducer glycoprotein 130 by both IL-6 and IL-11 requires two distinct binding epitopes*. J Immunol, 1999. **162**(3): p. 1480-7.
123. Hammacher, A., et al., *The immunoglobulin-like module of gp130 is required for signaling by interleukin-6, but not by leukemia inhibitory factor*. J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22701-7.
124. Bitard, J., et al., *Mutations in the immunoglobulin-like domain of gp190, the leukemia inhibitory factor (LIF) receptor, increase or decrease its affinity for LIF*. J Biol Chem, 2003. **278**(18): p. 16253-61.
125. Plun-Favreau, H., et al., *Leukemia inhibitory factor (LIF), cardiotrophin-1, and oncostatin M share structural binding determinants in the immunoglobulin-like domain of LIF receptor*. J Biol Chem, 2003. **278**(29): p. 27169-79.
126. Ishino, T., et al., *Kinetic interaction analysis of human interleukin 5 receptor alpha mutants reveals a unique binding topology and charge distribution for cytokine recognition*. J Biol Chem, 2004. **279**(10): p. 9547-56.
127. Huyton, T., et al., *An unusual cytokine:Ig-domain interaction revealed in the crystal structure of leukemia inhibitory factor (LIF) in complex with the LIF receptor*. 2007. **104**(31): p. 12737-12742.
128. Boulanger, M.J., et al., *Hexameric Structure and Assembly of the Interleukin-6/IL-6 {alpha}-Receptor/gp130 Complex*. 2003. **300**(5628): p. 2101-2104.
129. Arima, K., et al., *Characterization of the interaction between interleukin-13 and interleukin-13 receptors*. J Biol Chem, 2005. **280**(26): p. 24915-22.
130. Zhang, J.L., M. Buehner, and W. Sebald, *Functional epitope of common gamma chain for interleukin-4 binding*. Eur J Biochem, 2002. **269**(5): p. 1490-9.

131. Northrup, S.H. and H.P. Erickson, *Kinetics of protein-protein association explained by Brownian dynamics computer simulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(8): p. 3338-42.
132. Ripoll, D.R., et al., *An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(11): p. 5128-32.
133. Wade, R.C., et al., *Gating of the active site of triose phosphate isomerase: Brownian dynamics simulations of flexible peptide loops in the enzyme*. Biophys J, 1993. **64**(1): p. 9-15.
134. de Vos, A.M., M. Ultsch, and A.A. Kossiakoff, *Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex*. Science, 1992. **255**(5042): p. 306-12.
135. Letzelter, F., Y. Wang, and W. Sebald, *The interleukin-4 site-2 epitope determining binding of the common receptor gamma chain*. Eur J Biochem, 1998. **257**(1): p. 11-20.
136. Harada, N., M. Howard, and A. Miyajima, *IL-4: Structure and Function*, ed. H. Spits. 1992, Boca Raton, FL: CRC Press. 33-54.
137. Galizzi, J.P., et al., *Molecular cloning of a cDNA encoding the human interleukin 4 receptor*. Int Immunol, 1990. **2**(7): p. 669-75.
138. Kruse, N., et al., *Two distinct functional sites of human interleukin 4 are identified by variants impaired in either receptor binding or receptor activation*. Embo J, 1993. **12**(13): p. 5121-9.
139. Shen, B.J., T. Hage, and W. Sebald, *Global and local determinants for the kinetics of interleukin-4/interleukin-4 receptor alpha chain interaction. A biosensor study employing recombinant interleukin-4-binding protein*. Eur J Biochem, 1996. **240**(1): p. 252-61.
140. Andrews, A.L., et al., *Kinetic analysis of the interleukin-13 receptor complex*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46073-8.
141. Vita, N., et al., *Characterization and comparison of the interleukin 13 receptor with the interleukin 4 receptor on several cell types*. J Biol Chem, 1995. **270**(8): p. 3512-7.
142. Aman, M.J., et al., *cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor alpha chain*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 29265-70.
143. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, eds. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2 ed. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY.
144. Moore, G.E., R.E. Gerner, and H.A. Franklin, *Culture of normal human leukocytes*. Jama, 1967. **199**(8): p. 519-24.
145. Vaughn, J.L., et al., *The establishment of two cell lines from the insect Spodoptera frugiperda (Lepidoptera; Noctuidae)*. In Vitro, 1977. **13**(4): p. 213-7.

146. Smith, G.E., et al., *Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(24): p. 8404-8.
147. Schneider, I., *Cell lines derived from late embryonic stages of Drosophila melanogaster*. J Embryol Exp Morphol, 1972. **27**(2): p. 353-65.
148. Deutscher, M.P., *Guide to protein purification*, ed. M.P. Deutscher. 1990, San Diego: San Diego Accademic Press, Inc.
149. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
150. Gill, S.C. and P.H. von Hippel, *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*. Anal Biochem, 1989. **182**(2): p. 319-26.
151. Kitamura, T., et al., *Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin*. J Cell Physiol, 1989. **140**(2): p. 323-34.
152. Varghese, J.N., et al., *Structure of the extracellular domains of the human interleukin-6 receptor alpha -chain*. 2002. **99**(25): p. 15959-15964.
153. Madhankumar, A.B., A. Mintz, and W. Debinski, *Alanine-scanning mutagenesis of alpha-helix D segment of interleukin-13 reveals new functionally important residues of the cytokine*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 43194-205.
154. Thompson, J.P. and W. Debinski, *Mutants of interleukin 13 with altered reactivity toward interleukin 13 receptors*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 29944-50.
155. Kruse, N., H.P. Tony, and W. Sebald, *Conversion of human interleukin-4 into a high affinity antagonist by a single amino acid replacement*. Embo J, 1992. **11**(9): p. 3237-44.
156. Wang, Y., B.J. Shen, and W. Sebald, *A mixed-charge pair in human interleukin 4 dominates high-affinity interaction with the receptor alpha chain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1657-62.
157. Zhang, J.L., et al., *The high-affinity interaction of human IL-4 and the receptor alpha chain is constituted by two independent binding clusters*. J Mol Biol, 2002. **315**(3): p. 399-407.
158. Eisenmesser, E.Z., et al., *Expression, purification, refolding, and characterization of recombinant human interleukin-13: utilization of intracellular processing*. Protein Expr Purif, 2000. **20**(2): p. 186-95.
159. Oshima, Y., B.H. Joshi, and R.K. Puri, *Conversion of interleukin-13 into a high affinity agonist by a single amino acid substitution*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14375-80.
160. Fukunaga, R., et al., *Functional domains of the granulocyte colony-stimulating factor receptor*. Embo J, 1991. **10**(10): p. 2855-65.

161. Layton, J.E., et al., *Identification of ligand-binding site III on the immunoglobulin-like domain of the granulocyte colony-stimulating factor receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36779-87.
162. Andrews, R., et al., *Reconstitution of a functional human type II IL-4/IL-13 receptor in mouse B cells: demonstration of species specificity*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 1716-22.
163. Horsten, U., et al., *Molecular modeling-guided mutagenesis of the extracellular part of gp130 leads to the identification of contact sites in the interleukin-6 (IL-6).IL-6 receptor.gp130 complex*. J Biol Chem, 1997. **272**(38): p. 23748-57.
164. Clackson, T. and J.A. Wells, *A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface*. Science, 1995. **267**(5196): p. 383-6.
165. Haman, A., et al., *Molecular determinants of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor complex assembly*. J Biol Chem, 1999. **274**(48): p. 34155-63.
166. Woodcock, J.M., et al., *A single tyrosine residue in the membrane-proximal domain of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin (IL)-3, and IL-5 receptor common beta-chain is necessary and sufficient for high affinity binding and signaling by all three ligands*. J Biol Chem, 1996. **271**(42): p. 25999-6006.
167. Woodcock, J.M., et al., *Three residues in the common beta chain of the human GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors are essential for GM-CSF and IL-5 but not IL-3 high affinity binding and interact with Glu21 of GM-CSF*. Embo J, 1994. **13**(21): p. 5176-85.
168. Cunningham, B.C. and J.A. Wells, *Comparison of a structural and a functional epitope*. J Mol Biol, 1993. **234**(3): p. 554-63.
169. Berg, O.G. and P.H. von Hippel, *Diffusion-controlled macromolecular interactions*. Annu Rev Biophys Biophys Chem, 1985. **14**: p. 131-60.
170. Keeble, A.H., et al., *Calorimetric dissection of colicin DNase--immunity protein complex specificity*. Biochemistry, 2006. **45**(10): p. 3243-54.
171. Li, W., et al., *Dual recognition and the role of specificity-determining residues in colicin E9 DNase-immunity protein interactions*. Biochemistry, 1998. **37**(34): p. 11771-9.
172. Li, W., et al., *Highly discriminating protein-protein interaction specificities in the context of a conserved binding energy hotspot*. J Mol Biol, 2004. **337**(3): p. 743-59.
173. Pommer, A.J., et al., *Mechanism and cleavage specificity of the H-N-H endonuclease colicin E9*. J Mol Biol, 2001. **314**(4): p. 735-49.
174. Kleantous, C., et al., *Immunity proteins and their specificity for endonuclease colicins: telling right from wrong in protein-protein recognition*. Mol Microbiol, 1998. **28**(2): p. 227-33.

175. Andrews, A.L., et al., *IL-4 receptor alpha is an important modulator of IL-4 and IL-13 receptor binding: implications for the development of therapeutic targets*. J Immunol, 2006. **176**(12): p. 7456-61.
176. Rickert, M., et al., *Compensatory energetic mechanisms mediating the assembly of signaling complexes between interleukin-2 and its alpha, beta, and gamma(c) receptors*. J Mol Biol, 2004. **339**(5): p. 1115-28.
177. Livnah, O., et al., *Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation*. Science, 1999. **283**(5404): p. 987-90.
178. Remy, I., I.A. Wilson, and S.W. Michnick, *Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change*. Science, 1999. **283**(5404): p. 990-3.
179. Ballinger, M.D. and J.A. Wells, *Will any dimer do?* Nat Struct Biol, 1998. **5**(11): p. 938-40.
180. Livnah, O., et al., *An antagonist peptide-EPO receptor complex suggests that receptor dimerization is not sufficient for activation*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(11): p. 993-1004.
181. Goebel, J., et al., *Differential localization of IL-2- and -15 receptor chains in membrane rafts of human T cells*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(1): p. 199-206.
182. Marmor, M.D. and M. Julius, *Role for lipid rafts in regulating interleukin-2 receptor signaling*. Blood, 2001. **98**(5): p. 1489-97.
183. Rao, R., et al., *Lipid rafts in cytokine signaling*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(2-3): p. 103-10.
184. Weidemann, T., et al., *Beyond dimerization: a membrane-dependent activation model for interleukin-4 receptor-mediated signalling*. J Mol Biol, 2007. **366**(5): p. 1365-73.
185. Pearce, K.H., Jr., et al., *Growth hormone binding affinity for its receptor surpasses the requirements for cellular activity*. Biochemistry, 1999. **38**(1): p. 81-9.
186. Donaldson, D.D., et al., *The murine IL-13 receptor alpha 2: molecular cloning, characterization, and comparison with murine IL-13 receptor alpha 1*. J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2317-24.
187. Wood, N., et al., *Enhanced interleukin (IL)-13 responses in mice lacking IL-13 receptor alpha 2*. J Exp Med, 2003. **197**(6): p. 703-9.
188. Mentink-Kane, M.M., et al., *IL-13 receptor alpha 2 down-modulates granulomatous inflammation and prolongs host survival in schistosomiasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(2): p. 586-90.
189. Mentink-Kane, M.M. and T.A. Wynn, *Opposing roles for IL-13 and IL-13 receptor alpha 2 in health and disease*. Immunol Rev, 2004. **202**: p. 191-202.

190. Fichtner-Feigl, S., et al., *Induction of IL-13 Triggers TGF-beta1-Dependent Tissue Fibrosis in Chronic 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid Colitis*. 2007. **178**(9): p. 5859-5870.
191. Pernis, A.B. and P.B. Rothman, *JAK-STAT signaling in asthma*. J Clin Invest, 2002. **109**(10): p. 1279-83.
192. Wynn, T.A., *IL-13 effector functions*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 425-56.
193. Wills-Karp, M., et al., *Interleukin-13: central mediator of allergic asthma*. Science, 1998. **282**(5397): p. 2258-61.
194. Corry, D.B., *IL-13 in allergy: home at last*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(6): p. 610-4.
195. Izuhara, K., et al., *Recent advances in understanding how interleukin 13 signals are involved in the pathogenesis of bronchial asthma*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2000. **48**(6): p. 505-12.
196. Grunig, G., et al., *Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma*. Science, 1998. **282**(5397): p. 2261-3.
197. Borish, L.C., et al., *Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(6): p. 963-70.
198. Economides, A.N., et al., *Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action*. Nat Med, 2003. **9**(1): p. 47-52.
199. Oshima, Y. and R.K. Puri, *Characterization of a powerful high affinity antagonist that inhibits biological activities of human interleukin-13*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 15185-91.
200. Kioi, M., K. Kawakami, and R.K. Puri, *Mechanism of action of interleukin-13 antagonist (IL-13E13K) in cells expressing various types of IL-4R*. Cell Immunol, 2004. **229**(1): p. 41-51.
201. Grunewald, S.M., et al., *An antagonistic IL-4 mutant prevents type I allergy in the mouse: inhibition of the IL-4/IL-13 receptor system completely abrogates humoral immune response to allergen and development of allergic symptoms in vivo*. J Immunol, 1998. **160**(8): p. 4004-9.
202. Tony, H.P., et al., *Design of human interleukin-4 antagonists inhibiting interleukin-4-dependent and interleukin-13-dependent responses in T-cells and B-cells with high efficiency*. Eur J Biochem, 1994. **225**(2): p. 659-65.
203. Shanafelt, A.B., et al., *An immune cell-selective interleukin 4 agonist*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9454-8.
204. Shanafelt, A.B.G., Jeffrey M. ; Gundel, Robert, *T-cell selective interleukin-4 agonists*. 1999, Bayer Corporation (Berkeley, CA): USA.

8 Anhang

8.1 Schriftenverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden bzw. werden veröffentlicht:

Kraich, M., Klein, M., Patiño, E., Harrer, H., Nickel, J., Sebald, W., Mueller, T. D., *A modular interface of IL-4 allows for scalable affinity without affecting specificity for the IL-4 receptor*. BMC Biol, 2006. **4**: p. 13.

Knackmuss, S., Krause, S., Engel, K., Reusch, U., Virchow, J. C., Mueller, T., Kraich, M., Little, M., Luttmann, W., Friedrich, K., *Specific inhibition of interleukin-13 activity by a recombinant human single-chain immunoglobulin domain directed against the IL-13 receptor alpha1 chain*. Biol Chem, 2007. **388**(3): p. 325-30.

Patiño, E., Kraich, M., Kotsch, A., Saremba S., Paschke, A., Sebald, W., Mueller, T. D., *Crystal structure of murine Interleukin-5*. Int. J. Mol. Sci., 2007. Manuskript in Revision.

Kraich, M., Nickel, J., Gottermeier, M., Sebald, W., Mueller, T. D., *Characterisation of the functional epitope of Interleukin-13 receptor α -1 for Interleukin-13 and Interleukin-4 interaction*. 2008. Manuskript in Vorbereitung.

8.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Müller, der mir diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglichte. Sein großzügige Unterstützung, die stete Diskussionsbereitschaft, sein großes Interesse an meiner Arbeit und sein persönliches Engagement waren für mich Motivation und Hilfe zugleich. Der Enthusiasmus und der Optimismus, mit denen er an wissenschaftliche Fragestellungen herangeht, waren ansteckend und sorgten auch bei mir für die Begeisterung, die nötig war, um dieses Projekt zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen. Nochmals vielen Dank!

Herrn Prof. Dr. Roland Benz danke ich für seine Funktion als zweiter Gutachter und die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät für Biologie.

Besonders möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Walter Sebald bedanken, dass er mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchzuführen.

Bei Herrn Dr. Joachim Nickel möchte ich mich für seine Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreude bedanken. Ohne seine Unterstützung bei der Durchführung der „BIERAcore“-Experimente wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an Maïke Gottermeier, die mich in die Geheimnisse der Proteinbiochemie eingeweiht hat und mir immer eine große Hilfe bei vielerlei Problemen des Laboralltags war. Ihr freundschaftlicher Umgang und ihre unvergleichliche Art sorgten für viel Spaß während und auch außerhalb der Arbeitszeit.

Edwin Patiño, Alexander Kotzsch, Stefan Saremba und Stella Weidauer danke ich für die vielen großen und kleinen Hilfestellungen, die tolle Zusammenarbeit und die sehr angenehme Atmosphäre in unserer Arbeitsgruppe.

Des Weiteren danke ich allen Kolleginnen und Kollegen aus der Physiologischen Chemie II für die erhaltene Unterstützung und die angenehme Zusammenarbeit.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinen Eltern, die mich in all meinen Plänen unterstützt haben, für ihren liebevollen Beistand während meiner Ausbildung und den Rückhalt, den sie mir immer geben.

Der größte Dank geht an meine Freundin Brita für ihre verständnisvolle Unterstützung, ihre Geduld mit mir und die unzähligen Aufmunterungen, wenn es mal wieder nicht so lief, wie ich es mir gewünscht hätte. Vielen herzlichen Dank!

8.3 Lebenslauf

Zur Person

- Michael Kraich
- Geboren am 12.03.1976 in Miltenberg
- Familienstand: ledig, keine Kinder

Schulbildung

1982 – 1986 Volksschule Wörth, Wörth am Main
1986 – 1995 Hermann-Staudinger-Gymnasium, Erlenbach
06/95 Allgemeine Hochschulreife

Wehr-/Zivildienst

08/95 – 08/96 Zivildienst beim Verein Lebenshilfe e. V., Elsenfeld

Hochschulausbildung

1997 – 2003 Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart
12/99 Diplom-Vorprüfung
10/01 – 12/01 Studienarbeit am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart
Thema der Studienarbeit:
„Vergleichende Untersuchungen zum biologischen Abbau von LCKWs durch verschiedene Bakterien“
07/02 – 06/03 Diplomarbeit am Institut für industrielle Genetik, Universität Stuttgart, bei Prof. Dr. Wolfgang Seufert
Thema der Diplomarbeit:
„Untersuchungen zur Funktion zyklinabhängiger Kinasen im Zellteilungszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*“
06/03 Diplom „Technische Biologie“
seit 07/03 Dissertation an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften (Biozentrum), Lehrstuhl für Physiologische Chemie II
Thema der Dissertation:
„Strukturelle und funktionelle Untersuchungen der Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor im Interleukin-4- und Interleukin-13-System“

Anstellungen

07/03 – 07/07 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, Lehrstuhl für Physiologische Chemie II.
seit 08/07 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, Julius-von-Sachs-Institut, Lehrstuhl für Botanik I

8.4 Erklärungen

Erklärungen gemäß §4 Absatz 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom 15. März 1999

Ich erkläre ehrenwörtlich, die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt zu haben und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

Ich erkläre des Weiteren, daß die vorliegende Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich erkläre weiterhin, daß ich früher keine akademischen Grade erworben habe oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den 13.02.2008

Michael Kraich