

4. Ergebnisse

4.1. Optimierung der Kopplung des Antennapediapeptids mit den Cargo-Peptiden

Um Peptide (Stat6BP, Stat6CP, Biotin-Stat6BP und Stat6BP_(mod.)) in lebende Zellen transportiert zu können, müssen sie zunächst an das als Vektor dienende Antennapediapeptid (AP) gekoppelt werden. Die Verknüpfung der beiden Peptide geschieht über eine Disulfidbrücke, wobei zuerst die Thiol-Gruppe des Antennapediapeptids mit dem milden Reduktionsmittel REDUCTACRYL™ (an eine Matrix gebundenes DTT) reduziert wird. Diese greift dann oxidativ die freie Thiol-Gruppe des Cargo-Peptids an. Um möglichst hohe Ausbeuten bei dieser Reaktion zu erzielen, wird zuerst die Peptidkopplung optimiert.

Dazu wird vor der Kopplung die Konzentration der reaktiven Peptide mit Hilfe von DTNB (siehe 3.2.2.) bestimmt. Der Assay reagiert spezifisch auf freie SH-Gruppen, in Folge der quantitativ verlaufenden Reaktion entsteht das gelblich gefärbte Nitrobenzontanion, dessen Extinktion bei 412 nm gemessen wird. Die Anzahl freier Cysteine und damit die Konzentration an reaktiven Peptiden wird nun durch Vergleich der Extinktionen mit einem Cysteinestandard ermittelt und das Antennapediapeptid mit dem Cargo-Peptid in unterschiedlichen molaren Konzentrationen (Verhältnis Antennapedia- zu Cargo-Peptid von 1 : 0.25 bis 1 : 2.0) zusammengebracht. Die entstandenen Produkte werden dann durch HPLC gereinigt und mittels Tricin-SDS-PAGE untersucht. Die Ausbeute der Kopplungsreaktion wird durch Vergleich mit einem Gel mit Standard Peptidkonzentrationen, sowohl unter reduzierenden, als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen, abgeschätzt.

Aus Abb. 4.1-1 ergibt sich, dass das molare Verhältnis der beiden Addukte zueinander entscheidend für die Ausbeute bei der Kopplung ist. Die höchste Ausbeute wird erreicht, wenn Stat6BP und AP äquimolarer Konzentration (1:1) vorliegen.

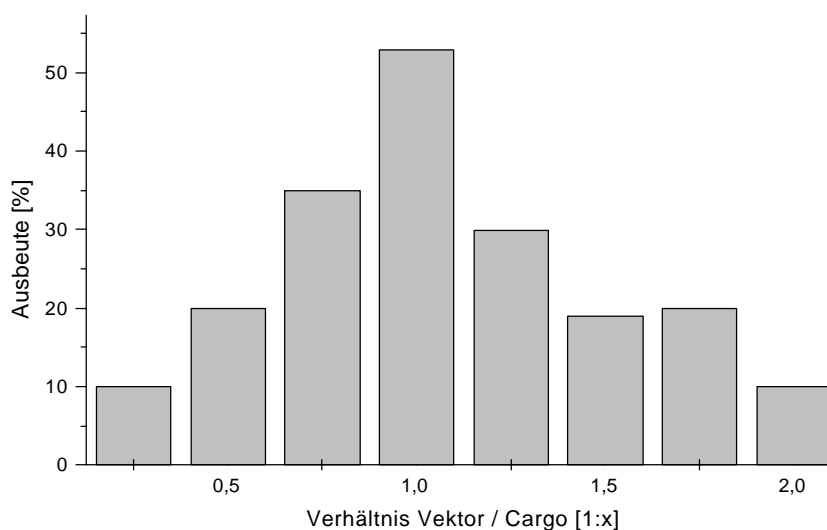


Abb. 4.1-1 Bestimmung der Kopplungsausbeute bei der Kopplung des Antennapediapeptids mit Stat6BP; das AP wird im molaren Verhältnis von 1: 0.25 bis 1 : 2 eingesetzt.

Für Stat6CP, Biotin-Stat6BP und Stat6BP_(mod.) ergeben sich ähnliche Reaktionsverhältnisse. In jedem Fall ist die Kopplungsausbeute beim Verhältnis 1 : 1 am höchsten. Setzt man die Peptide bei der Kopplung in diesem Verhältnis ein, so erhält man eine Ausbeute ≥ 50 %, dies entspricht auch den in der Literatur zu findenden Werten [135].

4.2. Reinigung der Kopplungsansätze

Um die über eine Disulfidbrücke verbundenen Peptide von den verbliebenen Monomeren abzutrennen, werden die Kopplungsansätze durch eine reversed phase HPLC gereinigt. Dabei werden die Peptide über hydrophobe Wechselwirkungen an Kohlenwasserstoffketten des Säulenmaterials gebunden und im Anschluß durch einen Gradienten mit ansteigendem Acetonitrilgehalt eluiert (Abb. 4.2-1A bis 4.2-4A). Die Fraktionen der Hauptpeaks werden mittels Tricin-SDS-PAGE unter nicht reduzierenden (Abb. 4.2-1C bis 4.2-4C) und reduzierenden (Abb. 4.2-1D bis 4.2-4D) Bedingungen auf ihre Reinheit und korrekte Kopplung analysiert.

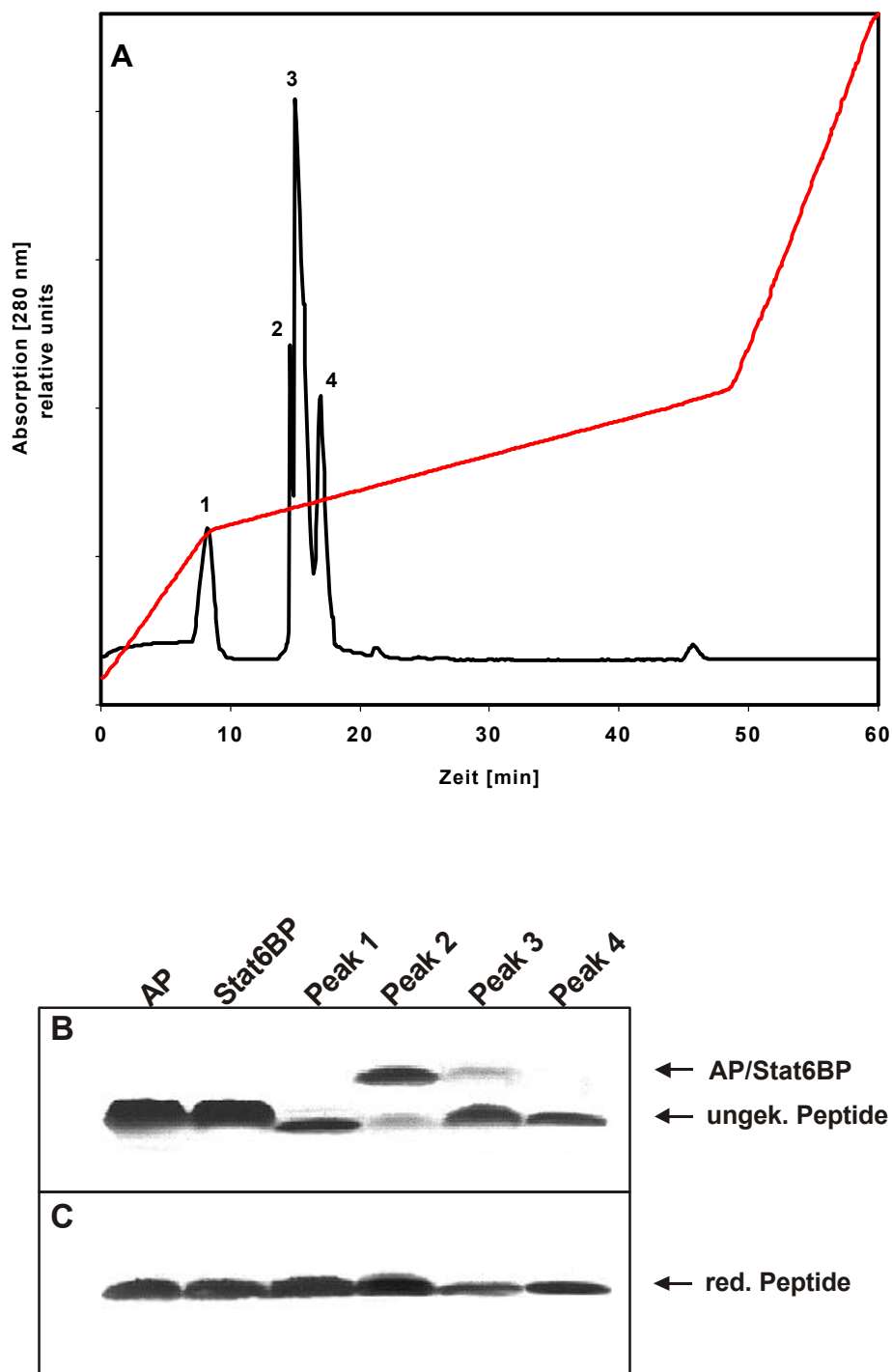


Abb. 4.2-1 Elutionsprofil von AP/Stat6BP einer C18 reversed phase HPLC (A) schwarz: Proteingehalt rot: Acetonitrilgradient; SDS-Tricine-PAGE-Analyse der ungekoppelten Peptide und der HPLC gereinigten und vereinigten Hauptfraktionen des Kopplungsansatzes unter nativen (B) und denaturierenden (C) Bedingungen.

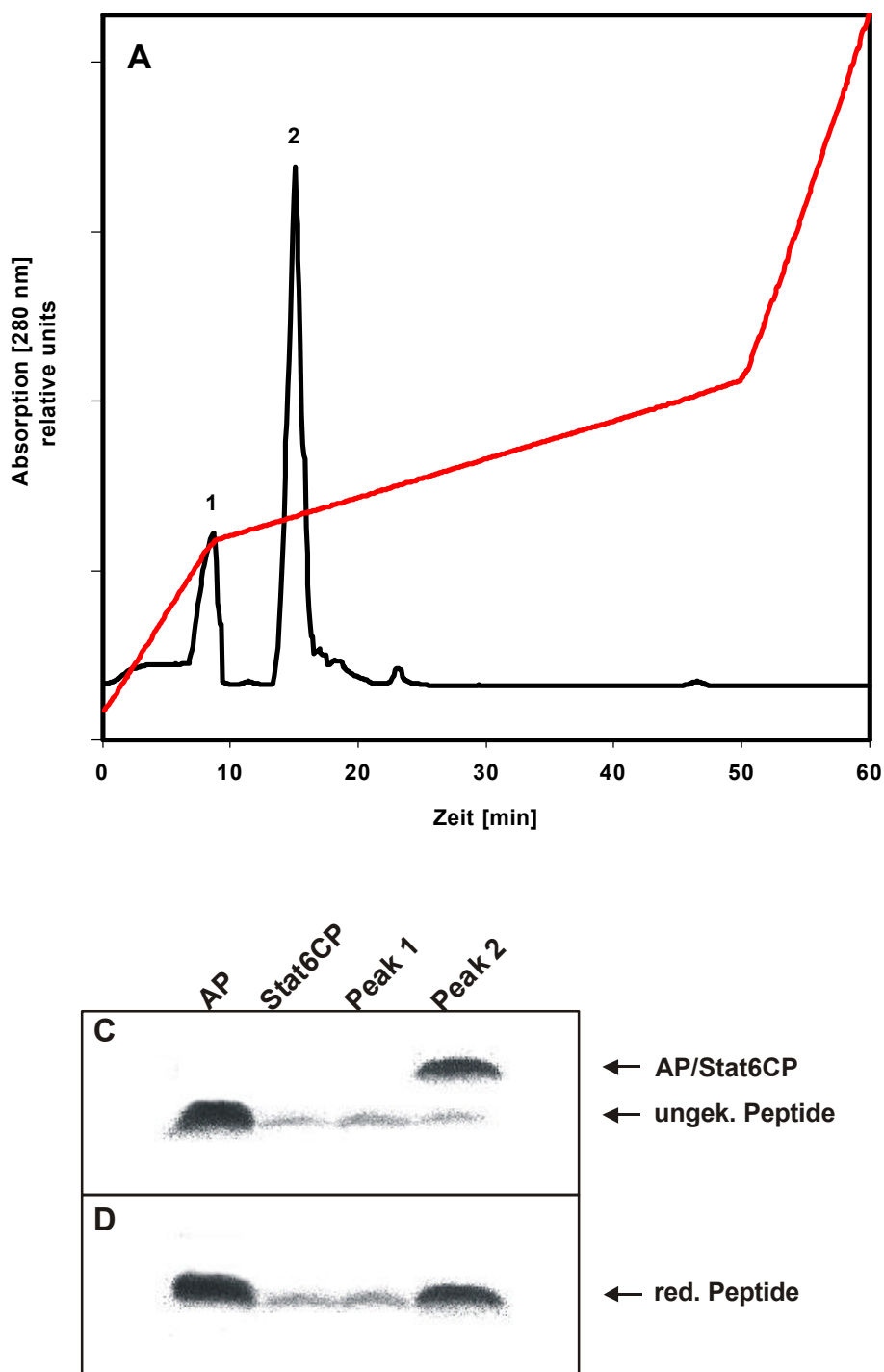


Abb. 4.2-2 Elutionsprofil von AP/Stat6CP einer C18 reversed phase HPLC (A) schwarz: Proteingehalt rot: Acetonitrilgradient; SDS-Tricine-PAGE-Analyse der ungekoppelten Peptide und der HPLC gereinigten und vereinigten Hauptfraktionen des Kopplungsansatzes unter nicht reduzierenden (B) und reduzierenden (C) Bedingungen.

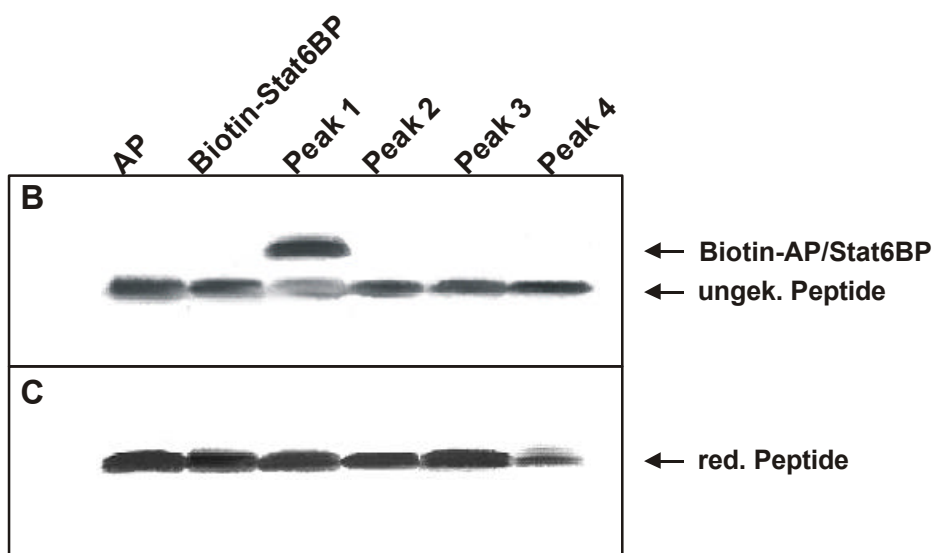
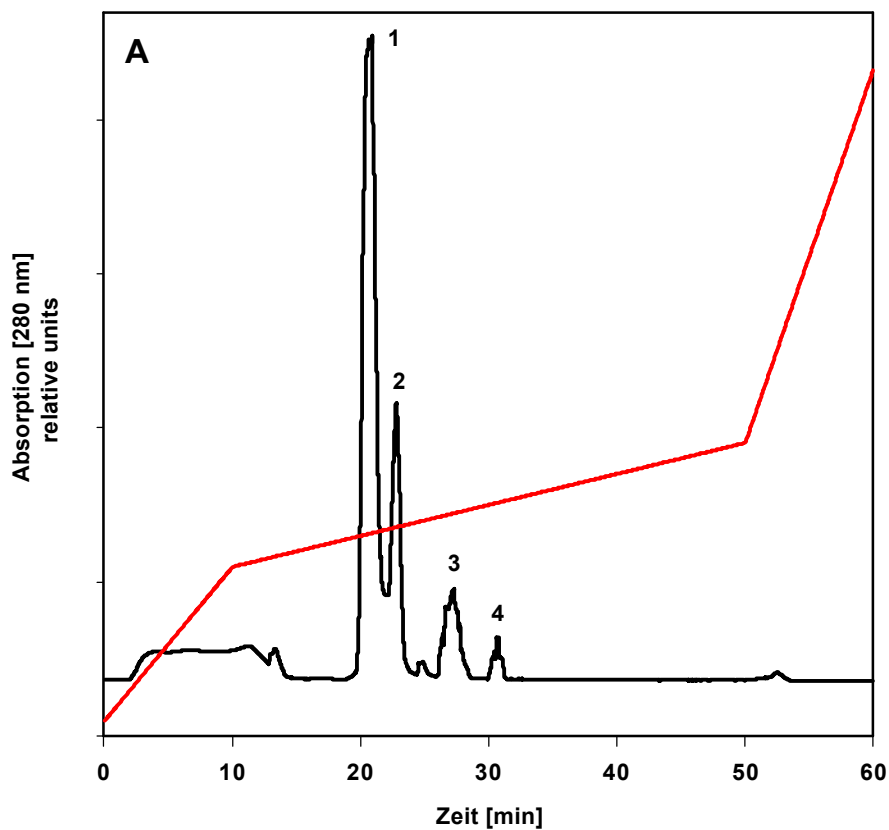


Abb. 4.2-3 Elutionsprofil des biotinylierten AP/Stat6BP von einer C18 reversed phase HPLC (A) schwarz: Proteingehalt rot: Acetonitrilgradient; SDS-Tricine-PAGE-Analyse der ungekoppelten Peptide und der HPLC gereinigten und vereinigten Hauptfraktionen des Kopplungsansatzes unter nicht reduzierenden (B) und reduzierenden (C) Bedingungen.

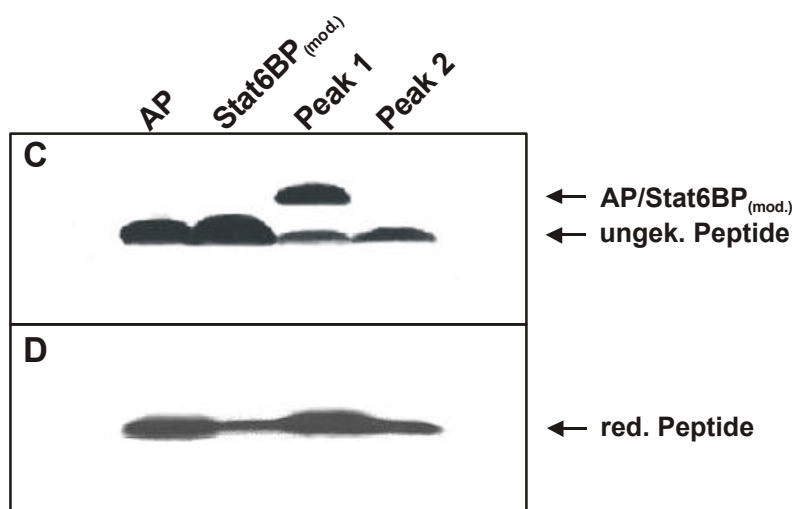
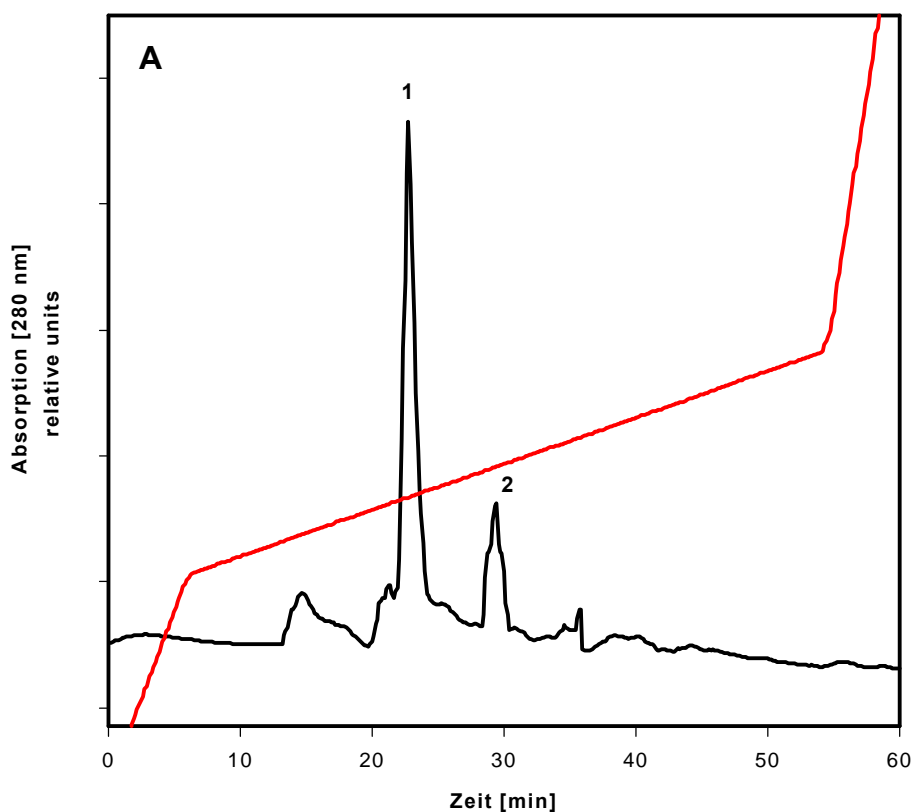


Abb. 4.2-4 Elutionsprofil des AP/Stat6BP_(mod.) von einer C18 reversed phase HPLC (A) schwarz: Proteingehalt rot: Acetonitrilgradient; SDS-Tricine-PAGE-Analyse der ungekoppelten Peptide und der HPLC gereinigten und vereinigten Hauptfraktionen des Kopplungsansatzes unter nicht reduzierenden (B) und reduzierenden (C) Bedingungen.

In den nicht reduzierenden Tricin-SDS-Gelelektrophoresen erkennt man die gekoppelten Peptide als deutliche Banden, die aufgrund ihres höheren Molekulargewichts im Gel weniger weit laufen, als die ungekoppelten. Unter reduzierenden Bedingungen wird die Disulfidbrücke zwischen beiden Peptiden gespalten und die entstandenen Monomere laufen im Gel alle auf der gleichen Höhe. Die Tricin-SDS-PAGE Analyse zeigt ferner, dass die Reinigung des Kopplungsgemisches durch reversed phase HPLC eine weitgehende Abtrennung der monomeren von den verknüpften Peptiden ermöglicht.

4.3. Massenbestimmung der gekoppelten Peptide

Die Analyse der gekoppelten Peptide durch Tricin-SDS-PAGE hat gezeigt, dass eine Kopplung von Peptiden über eine Disulfidbrücke stattgefunden hat, ob aber die richtigen Peptide verbunden wurden (Vektor- und Cargopeptid), muß durch massenspektrometrische Untersuchung der Kopplungsprodukte überprüft werden. Die Masse des AP/Stat6BP wird mit der ESI- (Abb. 4.3-1) und die der AP/Biotin-Stat6BP, AP/Stat6BP und AP/Stat6CP mit der MALDI-Methode (Abb. 4.3-2 bis 4.3-4) bestimmt und zeigt die erwarteten Molekulargewichte der korrekten Kopplungsprodukte. Abweichungen der ersten Nachkommastelle liegen im Bereich der Genauigkeit des MALDI-Gerätes (0.1 ‰). Zusammenfassend sind in Tab. 4-1 die gemessenen Massen den errechneten gegenübergestellt.

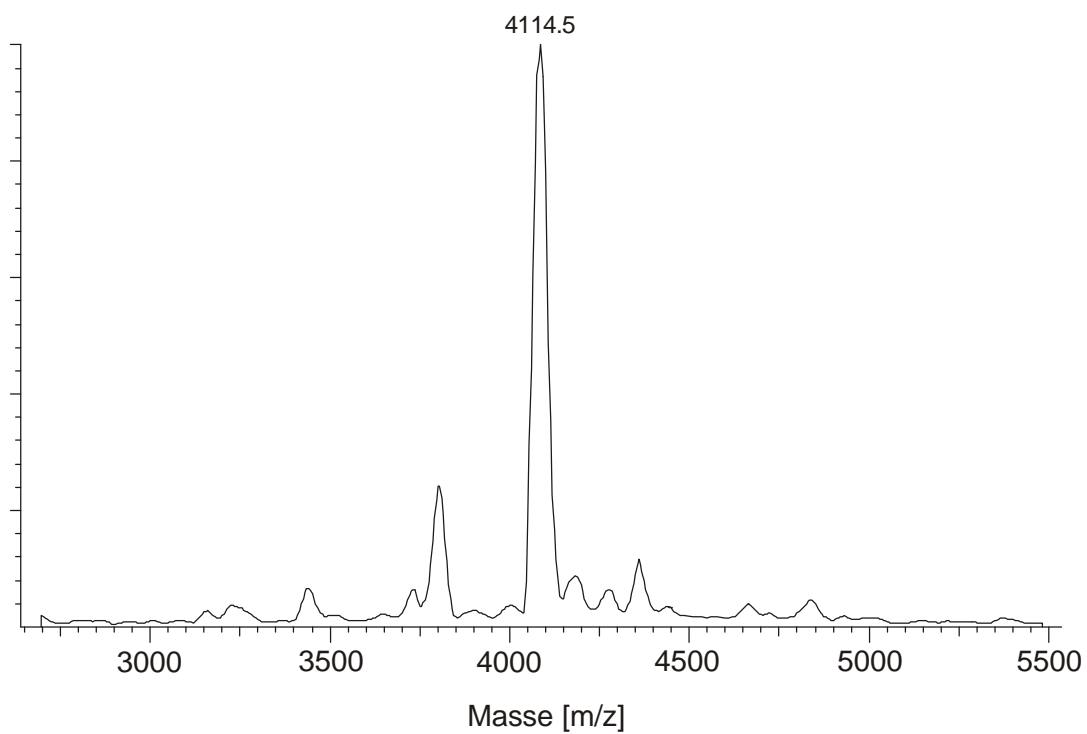


Abb. 4.3-1 Massenbestimmung des AP/Stat6BP durch ESI-TOF

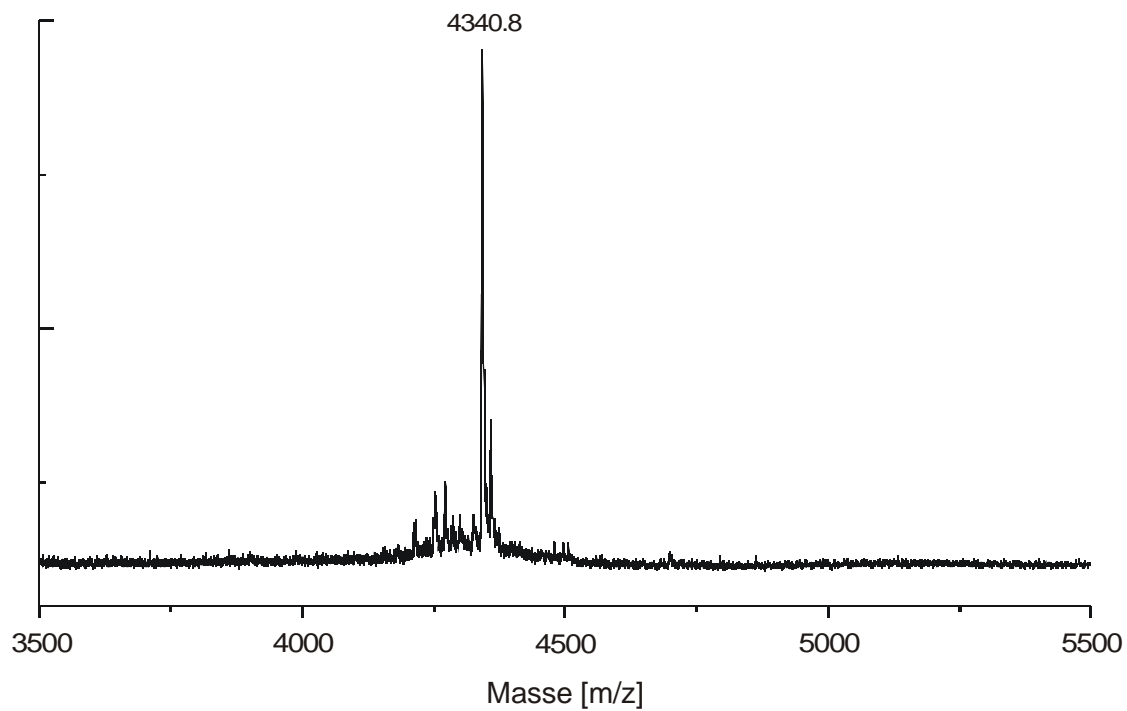


Abb. 4.3-2 Massenbestimmung des AP/Biotin-Stat6BP durch MALDI-TOF

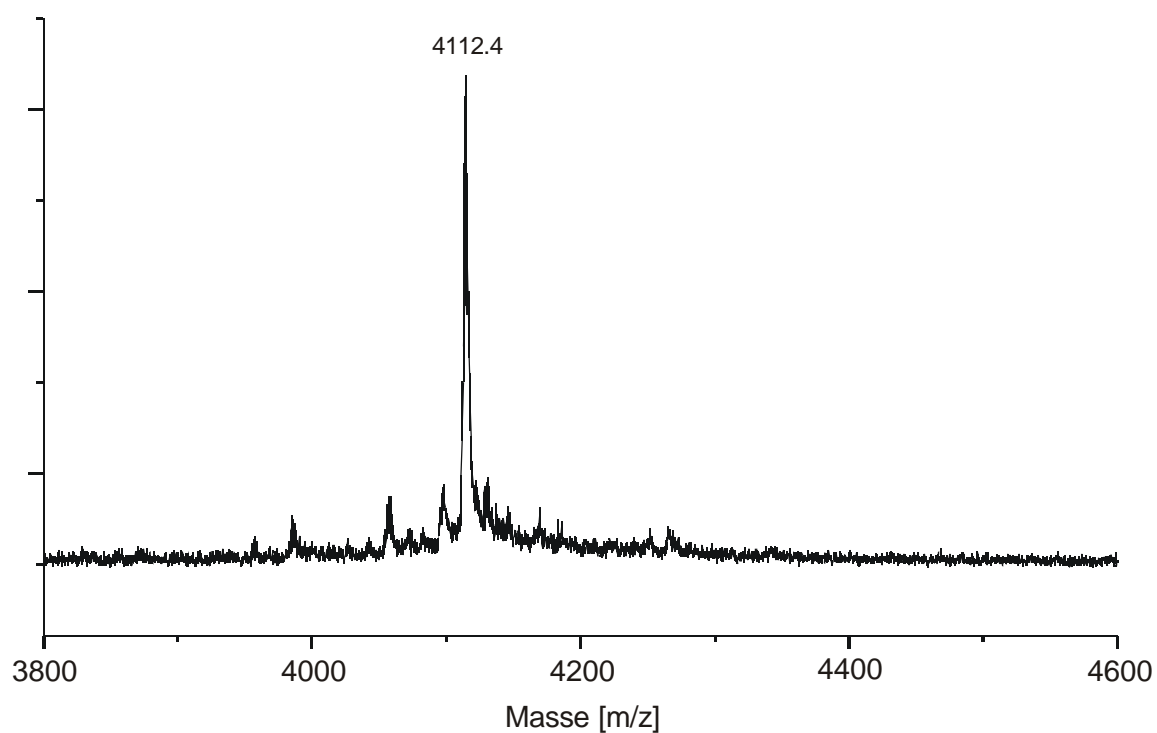


Abb. 4.3-3 Massenbestimmung des AP/Stat6BP_(mod.) durch MALDI-TOF

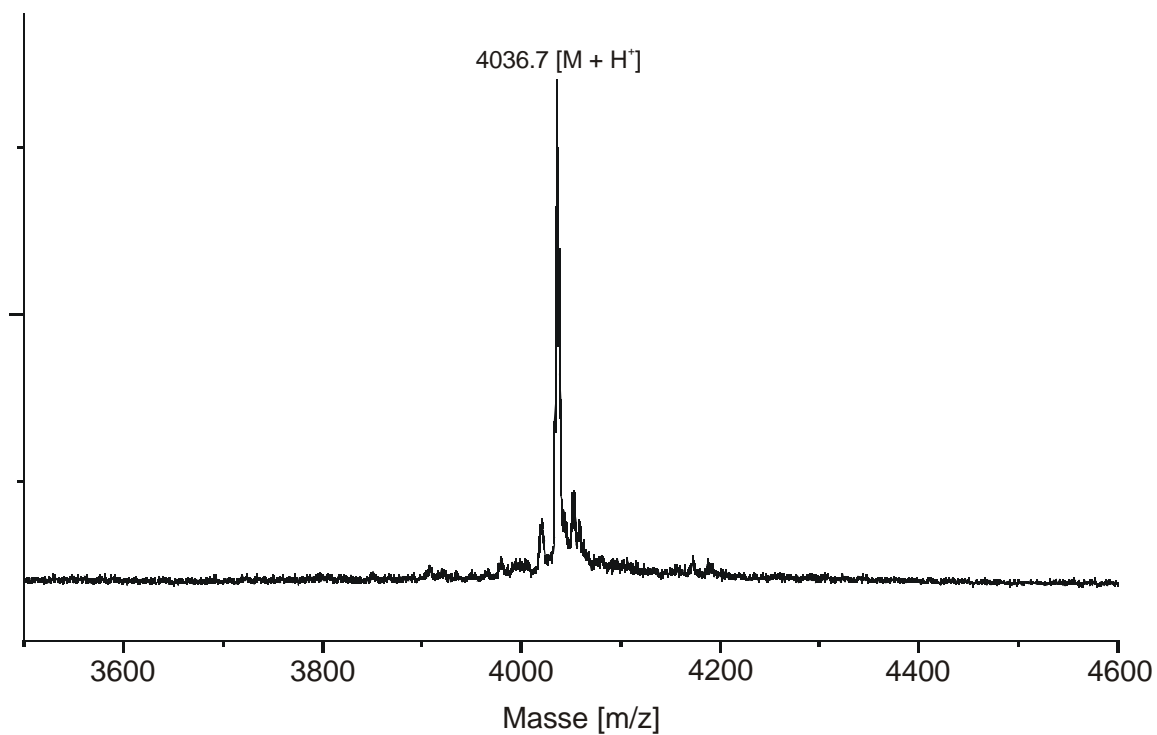


Abb. 4.3-4 Massenbestimmung des AP/Stat6CP durch MALDI-TOF

Peptid	berechnete Masse	gemessene Masse
AP	2349.9	2350.6 [M + H ⁺]
Stat6BP	1766.7	1767.7 [M + H ⁺]
Biotin-Stat6BP	1993.1	1994.0 [M + H ⁺]
Stat6BP _(mod.)	1764.8	1765.5 [M + H ⁺]
Stat6CP	1687.8	1688.8 [M + H ⁺]
AP/Stat6BP	4114.6	4114.5
AP/Biotin-Stat6BP	4341.0	4340.8
AP/Stat6CP	4035.7	4036.7 [M + H ⁺]
AP/Stat6BP _(mod.)	4112.7	4112.4

Tab 4-1 Berechnete und gemessene Molekularmassen der ungekoppelten und gekoppelten Peptide.

4.4. Überprüfung der Phosphorylierung des AP/Stat6BP

Voraussetzung für die Bindung von AP/Stat6BP an die SH2 Domäne von Stat6 ist, dass der Tyrosin-Rest in der Consensus-Sequenz des Stat6BP phosphoryliert ist [77]. Bei längerer Lagerung des Peptids besteht die Gefahr der Dephosphorylierung. Zur Überprüfung, ob das AP/Stat6BP nach ca. dreimonatiger Lagerung in wässriger Lösung noch als Hemmstoff einsetzbar ist, wird eine Pulldown-Immunpräzipitation mit einem anti-Phospho-Tyrosin Antikörper (siehe 3.3.2.1.) durchgeführt. Gelingt es dabei, das Peptid quantitativ aus der Lösung zu entfernen, liegt das Tyrosin noch phosphoryliert vor. Die Analyse der Immunpräzipitation erfolgt durch nicht reduzierende Tricin-SDS-PAGE (Abb 4.4-1 A). Als Kontrolle wird eine Pulldown-Immunpräzipitation mit dem AP/Stat6CP durchgeführt (Abb. 4.4-1 B). Dieses Peptid hat die gleiche Aminosäuresequenz wie AP/Stat6BP, der enthaltene Tyrosinrest ist jedoch nicht phosphoryliert und sollte somit von dem anti-Phosphotyrosin Antikörper nicht präzipitiert werden.

In Spur 1 der Gele ist eine Probe des unbehandelten in Wasser gelösten AP/Stat6BP bzw. AP/Stat6CP aufgetragen. In Spur 2 ist eine Probe gleicher Konzentration derselben Lösungen nach der Immunpräzipitation mit dem anti-

Phospho-Tyrosin Antikörper aufgetragen. Durch den Antikörper wurde soviel phosphoryliertes AP/Stat6BP aus der Lösung entfernt, dass die Nachweisgrenze der Coomassiefärbung unterschritten wird. In Spur 3 ist eine Probe des mit Protein A/G-Agarose gebundenen Immunpräzipitats aufgetragen. Hier ist dann wieder das phosphorylierte AP/Stat6BP nachweisbar, wohingegen kein AP/Stat6CP zu finden ist. Dadurch wird gezeigt, dass der grösste Teil des AP/Stat6BP auch nach längerer Lagerung noch in der phosphorylierten Form vorliegt. Im Gegensatz dazu wird das Kontrollpeptid (AP/Stat6CP) durch die Immunpräzipitation nicht aus der Lösung entfernt.

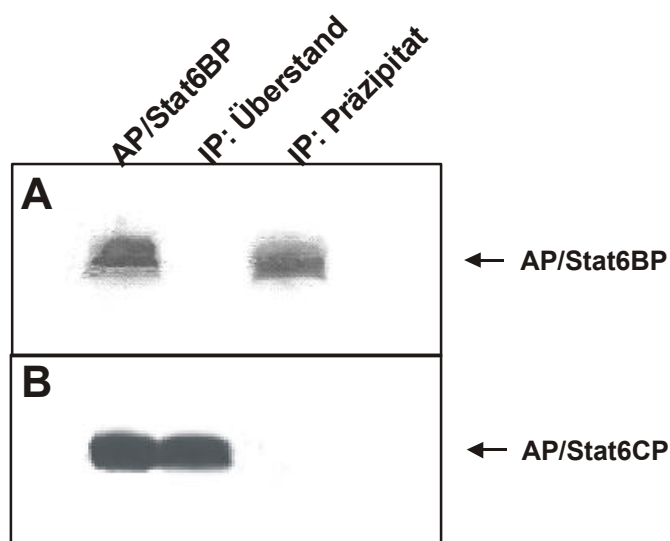


Abb. 4.4-1 nicht reduzierende Tricine-SDS-PAGE der Pulldown-Immünpräzipitation des AP/Stat6BP (A) und des AP/Stat6CP (B)

4.4.1. Überprüfung des AP/Stat6BP_(mod.)

In dem AP/Stat6BP_(mod.) ist der Phosphotyrosinrest durch die hydrolyse stabile Phospho-Tyrosin Analog 4-Phosphonomethyl-L-Phenylalanin ersetzt. Bei diesem Peptid spielt die Dephosphorylierung sowohl bei der Lagerung, als auch durch Phosphatasen keine Rolle [149]. Durch die Pulldown-Immünpräzipitation kann bei dem AP/Stat6BP_(mod.) jedoch überprüft werden, wie ähnlich das Phosphonomethyl-

Phenylalanin Epitop dem Phospho-Tyrosin Epitop ist. Die Immunpräzipitation wird wiederum durch Tricin-SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.4-2).

In Spur 1 des Gels ist eine Probe der unbehandelten AP/Stat6BP_(mod.)-Lösung aufgetragen, in Spur 2 eine Probe des Überstandes nach der Immunpräzipitation und in Spur 3 eine Probe des in nicht reduzierenden Probenpuffer aufgenommenen Immunpräzipitates. Dieses Experiment zeigt, dass der anti-Phospho-Tyrosin Antikörper das modifizierte Phosphotyrosin Epitop zwar erkennt, jedoch nicht in der Lage ist das Analog so vollständig aus der Lösung zu präzipitieren, wie das Peptid mit dem Phospho-Tyrosinrest.

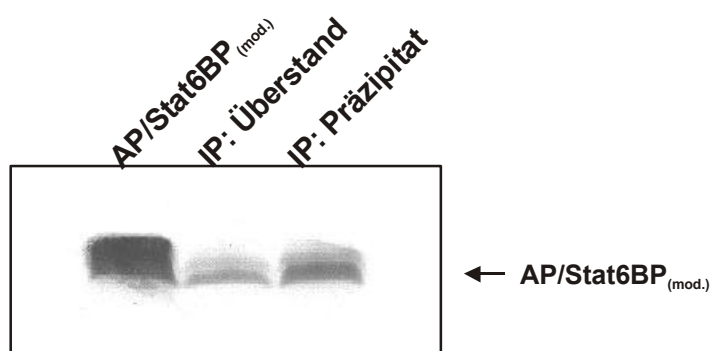


Abb. 4.4-2 nicht reduzierende Tricin-SDS-PAGE der Pulldown-Immunpräzipitation des AP/Stat6BP_(mod.)

4.5. Nachweis der Aufnahme des AP/Stat6BP in lebende Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie

Die Internalisierung des AP/Stat6BP in lebende Zellen läßt sich am besten durch Fluoreszenzmikroskopie zeigen. Für dieses Experiment wird die N-terminal mit Biotin markierte Form des Stat6BP verwendet und mit den adhärent wachsenden Caki-1 Zellen inkubiert (Abb. 4.5-1 A - C). Als Kontrolle wird AP/Biotin-Stat6BP verwendet, das vor der Inkubation mit den Zellen für 20 min bei 37 °C mit 100 mM DTT behandelt wird [148]. Durch Inkubation mit dem milden Reduktionsmittel DTT wird die Disulfidbrücke zwischen dem AP und dem Biotin-Stat6BP gespalten

und das Biotin-Stat6BP sollte nicht mehr in die Zellen transportiert werden können (Abb. 4.5-1 D - F). Anschließend werden die Caki-1 Zellen fixiert und das in die Zellen aufgenommene Biotin-Stat6BP mit Streptavidin-FITC nachgewiesen. In Abb. 4.5-1 A und D sieht man eine Phasenkontrastaufnahme der mit AP/Biotin-Stat6BP (A) und mit der Kontrolle (D) behandelten Zellen. Abb. 4.5-1 B (AP/Biotin-Stat6BP) zeigt die FITC-Fluoreszenz des in die Zellen aufgenommenen Biotin-Stat6BP. Abb. 4.5-1 E zeigt, dass das mit DTT behandelte AP/Stat6BP keine Fluoreszenz in den Zellen zeigt. Abb. 4.5-1 C und F zeigen die Fluoreszenz der Zellkerne nach dem Anfärben mit 0.1 µg/ml Hoechst33342.

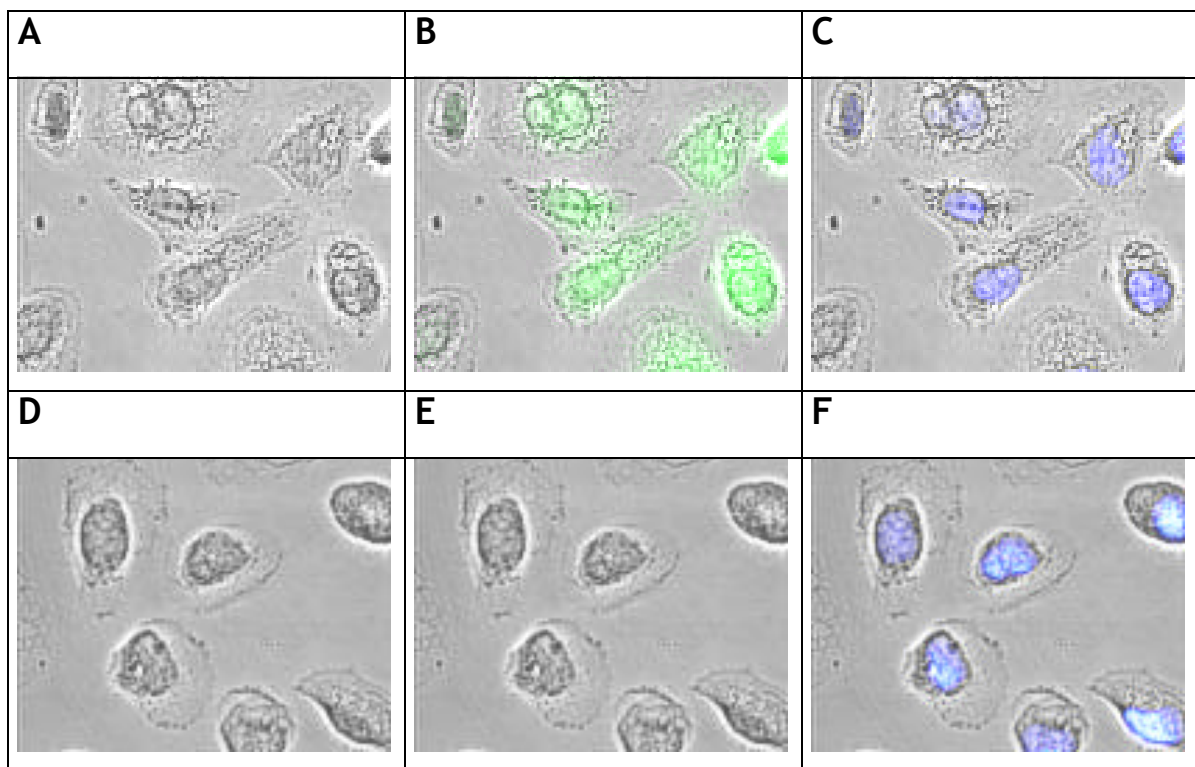


Abb. 4.5-1 Internalisierung von Biotin-Stat6BP gekoppelt (A-C) oder ungekoppelt (D-F) mit dem AP in Caki-1 Zellen; 63-fache Vergrößerung.

Wie Abb. 4.5-1 B zeigt lässt sich das AP/Biotin-Stat6BP im gesamten Cytoplasma und im Kern der Zellen nachweisen. Aus der Literatur ist bekannt, dass das AP sehr schnell sowohl in das Cytoplasma, als auch in den Kern wandert [114]. Erst

die Substitution von drei Aminosäuren der AP-Sequenz durch Proline führte dazu, dass das AP zwar noch in das Cytoplasma aufgenommen wird, jedoch nur noch sehr viel schwächer in den Nucleus [115]. Die anfänglich geäußerte Vermutung, dass sich das AP bevorzugt im Zellkern akkumuliert [114], scheint jedoch auf ein Präparationsartefakt zurückzuführen zu sein [116].

Behandelt man das mit AP gekoppelte Biotin-Stat6BP mit DTT, wird es nicht mehr in die Zellen aufgenommen (Abb. 4.5-1 E), wodurch bewiesen wird, dass das ungekoppelte Biotin-Stat6BP von sich aus nicht die Fähigkeit hat in lebende Zellen transportiert zu werden.

4.6. Stat6BP hemmt die IL-4 induzierte Tyrosinphosphorylierung von Stat6

4.6.1. Konzentrationskinetik der Stat6BP Hemmung

Nachdem sichergestellt ist, dass das Stat6BP durch Kopplung an das Antennapediaptid in lebende Zellen geschleust werden kann, soll im nächsten Schritt der Einfluss des Stat6BP auf die Stat6 vermittelte IL-4 Signaltransduktion untersucht werden. Dazu wird die humane Zelllinie RAMOS (Non-Hodgkin B-Zell Lymphom) 20 min in einer log₂ Verdünnung mit unterschiedlichen Konzentrationen (von 0.156 µM bis 10 µM) AP/Stat6BP behandelt und anschließend mit 80 pM hIL-4 stimuliert (Abb. 4.6-1 A). Als Kontrolle wird das nichtphosphorylierte AP/Stat6CP verwendet (Abb. 4.6-2 A). Die Zellen werden dann lysiert und mit einem anti-Stat6 Antikörper präzipitiert. Die Immunkomplexe werden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und anschließend mit einem anti-PhosphoStat6 Antikörper detektiert. Um sicherzustellen, dass gleiche Proteinmengen für die Gelelektrophorese eingesetzt wurden, wird der anti-PhosphoStat6 Antikörper von der Blotmembran entfernt und der Blot anschließend mit einem anti-Stat6 Antikörper erneut detektiert (Abb. 4.6-1 B; Abb. 4.6-2 B).

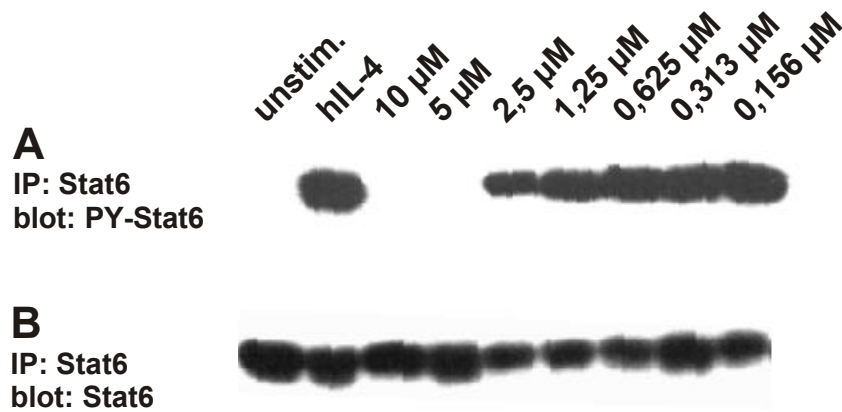


Abb. 4.6-1 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat6 in RAMOS Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von AP/Stat6BP; Detektion des Blots mit anti-PhosphoStat6 (A) und mit anti-Stat6 (B)

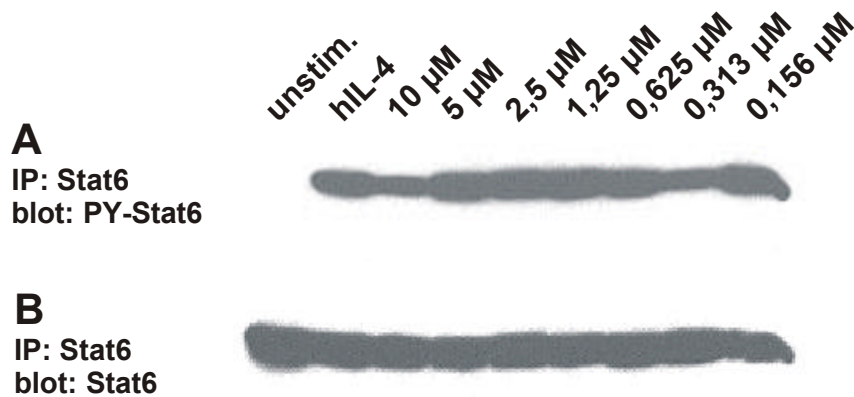


Abb. 4.6-2 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat6 in RAMOS Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von AP/Stat6CP; Detektion des Blots mit anti-PhosphoStat6 (A) und mit anti-Stat6 (B)

In Abb. 4.6-1 und 4.6-2 sind jeweils in Spur 2 die Immunpräzipitate von Zellen, die nicht mit Peptiden behandelt, jedoch mit IL-4 stimuliert wurden aufgetragen, während in Spur 1 die Immunpräzipitate unbehandelter und unstimulierter Zellen aufgetragen wurden. Durch die Behandlung mit AP/Stat6BP in Konzentrationen von 10 und 5 μ M wird die durch IL-4 ausgelöste Tyrosinphosphorylierung von Stat6 vollständig gehemmt. Geringere Konzentrationen (\leq 2.5 μ M) von AP/Stat6BP inhibieren die Tyrosin-

phosphorylierung nur partiell. Bei Konzentrationen $\leq 0.313 \mu\text{M}$ ist schließlich kein hemmender Effekt des Stat6BP auf die durch IL-4 induzierte Tyrosinphosphorylierung mehr zu beobachten. Wie Abb. 4.6-2 zeigt, kann das Kontrollpeptid die IL-4 induzierte Phosphorylierung von Stat6 nicht hemmen.

4.6.2. Zeitkinetik der Stat6BP Hemmung

RAMOS Zellen werden jeweils für unterschiedliche Zeiten mit $10\mu\text{M}$ AP/Stat6BP inkubiert und anschließend für 10 min mit 6.7 nM hIL-4 stimuliert und nach der Lyse mit einem anti-Stat6 Antikörper immunpräzipitiert (Abb. 4.6-3 A). Als Kontrolle wird ein Experiment unter gleichen Bedingungen mit dem AP/Stat6CP durchgeführt (Abb. 4.6-4 A). Der Nachweis des zeitlichen Ablaufs der Abnahme bzw. der Zunahme der Stat6-Phosphorylierung erfolgt nach elektrophoretischer Auftrennung und Westernblot mit Hilfe eines anti-PhosphoStat6 Antikörpers. Nach dem Ablösen des ersten Detektionsantikörpers wird die Nitrocellulosemembran mit einem anti-Stat6 Antikörper detektiert (Abb. 4.6-3 B und Abb. 4.6-4 B). In Spur 1 von Abb. 4.6-3 und Abb. 4.6-4 sind die Immunpräzipitate von unbehandelten unstimulierten Zellen und in Spur 2 die von unbehandelten IL-4 stimulierten Zellen aufgetragen.

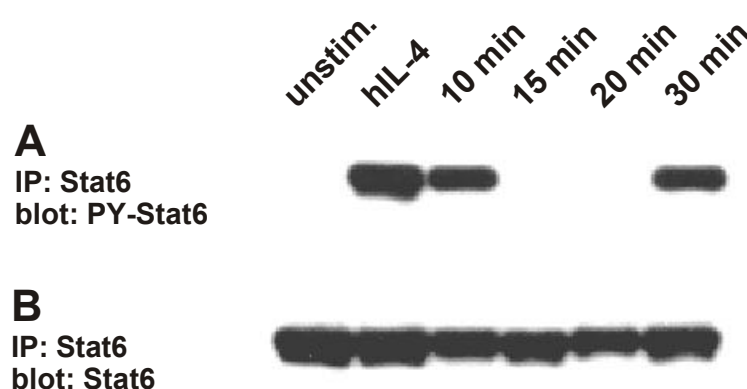


Abb. 4.6-3 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat6 in RAMOS Zellen nach unterschiedlich langer Behandlung mit AP/Stat6BP; Detektion des Blots mit anti-Phospho-Stat6 (A) und anti-Stat6 (B)

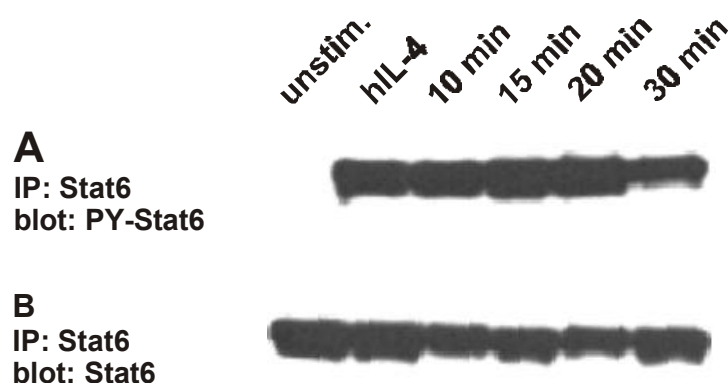


Abb. 4.6-4 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat6 in RAMOS Zellen nach unterschiedlich langer Behandlung mit AP/Stat6CP; Detektion des Blots mit anti-Phospho-Stat6 (A) und anti-Stat6 (B)

Die Tyrosinphosphorylierung von Stat6 wird durch Vorinkubation für 15 und 20 min mit AP/Stat6BP vollständig gehemmt, aber schon nach 30 min findet sich eine Phosphorylierung, die nahezu dem Niveau von unbehandelten Zellen entspricht. Das Kontrollpeptid zeigt erwartungsgemäß keinerlei Einfluss auf die Phosphorylierung von Stat6. Die Behandlung von RAMOS Zellen mit AP/Stat6BP führt also zu einer transienten Hemmung der Stat6-Phosphorylierung.

4.6.3. Der hemmende Effekt von Stat6BP läßt sich durch Natriumpervanadat verlängern

Eine mögliche Ursache für das relativ kurze Zeitfenster, in dem die Phosphorylierung des Stat6 Proteins durch das Stat6BP gehemmt wird, könnte die Aktivität zellulärer Phosphatasen sein. Diese könnten das in die Zelle transportierte Stat6BP relativ schnell dephosphorylieren und somit als Hemmstoff unbrauchbar machen. Um diese Hypothese zu überprüfen wird zeitgleich mit dem AP/Stat6BP ein membranpermeabler Phosphataseinhibitor zu den Zellen gegeben. Natriumorthovanadat ist ein sehr potenter Tyrosinphosphataseinhibitor. Damit er durch intakte Zellmembranen diffundieren und auch in lebenden Zellen wirken

kann, muß er zuerst zu Natriumpervanadat oxidiert werden [150]. Dazu werden 5 mM Na_3VO_4 in Inkubationspuffer (30 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl, 4 mM KCl, 0.8 mM MgSO_4 und 10 mM Glukose) gelöst, so daß man eine klare farblose Lösung erhält. Durch Zugabe von 1 mM H_2O_2 für 15 min bei 22 °C wird die Oxidationsreaktion gestartet und anschließend mit 200 µg/ml Catalase gestoppt. RAMOS Zellen werden mit 1 mM Natriumpervanadat-Lösung inkubiert. 30 min später werden die Zellen für 5, 10, 20, 30, 45, 60 und 90 min mit 10 µM AP/Stat6BP behandelt, danach für 10 min mit 6.7 nM hIL-4 stimuliert und dann lysiert. Im Anschluß daran erfolgt eine Immunpräzipitation mit einem spezifischen Antikörper gegen Stat6, der nachfolgend durchgeführte Westernblot wird mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Stat6 detektiert (Abb. 4.6-5A). Als Kontrolle werden RAMOS Zellen mit 1 mM Natriumpervanadat und 10 µM AP/Stat6CP entsprechend behandelt (Abb. 4.6-6A). Um die gleichmäßige Beladung des Gels sicherzustellen wird der Detektionsantikörper abgelöst und der Westernblot mit einem anti-Stat6 Antikörper ein zweites Mal detektiert (Abb. 4.6-5B und 4.6-6B). In Spur 1 des Blots ist wieder das Immunpräzipitat von unbehandelten unstimulierten Zellen und in Spur 2 das Immunpräzipitat von unbehandelten IL-4 stimulierten Zellen aufgetragen.

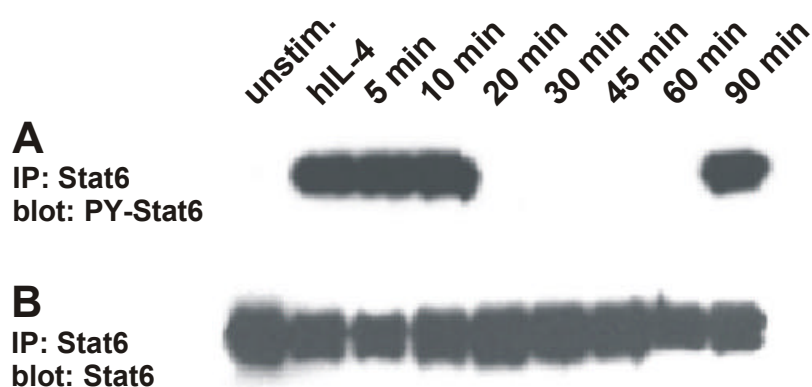


Abb. 4.6-5 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat6 in RAMOS Zellen nach Behandlung mit 1 mM Natriumpervanadat und AP/Stat6BP; Detektion des Blots mit anti-Phospho-Stat6 (A) und anti-Stat6 (B)

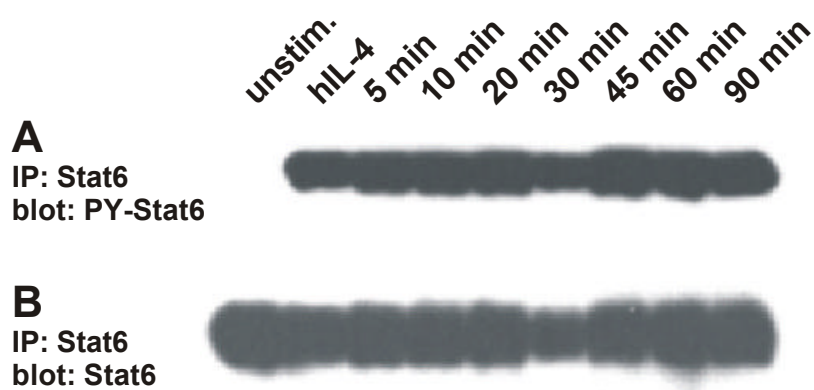


Abb. 4.6-6 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat6 in RAMOS Zellen nach Behandlung mit 1 mM Natriumpervanadat und AP/Stat6CP; Detektion des Blots mit anti-Phospho-Stat6 (A) und anti-Stat6 (B)

Durch die gleichzeitige Behandlung mit Stat6BP und dem Phosphataseinhibitor Natriumpervanadat verlängert sich die Hemmung der Phosphorylierung von Stat6 in RAMOS Zellen um 60 min, so dass phosphoryliertes Stat6 erst wieder nach 90 min nachgewiesen werden kann. AP/Stat6CP zeigte wiederum keinen Einfluß auf die Stat6-Phosphorylierung.

4.6.4. Hemmung der Stat6 Phosphorylierung in verschiedenen Zelllinien und primären Zellen

Um auszuschließen, dass das Hemmuster von Stat6BP und besonders die transiente Hemmung ein Artefakt der Zelllinie RAMOS ist, etwa durch eine besonders hohe Phosphataseaktivität, werden weitere Zelllinien auf die Hemmung der Stat6-Phosphorylierung durch Stat6BP untersucht. Zelllinien haben dabei den Vorteil, dass sie in großen Mengen kultiviert werden können und keine Unterschiede zwischen einzelnen Spendern berücksichtigt werden müssen. Andererseits unterliegen Zelllinien aber einer genetischen Drift, so dass Zellen in verschiedenen Labors auch unterschiedliche Charakteristika zeigen können. Es ist also problematisch sich bei der Untersuchung eines Hemmstoffes ausschließlich

auf permanente Linien zu beschränken. Aus diesem Grund werden zusätzlich primäre Lymphocyten (PBL) als Referenzsystem verwendet.

Dieses Immunpräzipitationsexperiment wird mit den nachfolgend aufgeführten verschiedenen Zelltypen unter gleichen Bedingungen durchgeführt (4.6.4.1 bis 4.6.4.4). Dazu werden die jeweiligen Zellen mit 1 mM Natriumpervanadat-Lösung (siehe 4.7.) vorinkubiert. 30 min später werden die Zellen für 5, 10, 20, 30, 45, 60 und 90 min mit 10 μ M AP/Stat6BP, mit 10 μ M AP/Stat6CP oder ohne Peptide (Spur 1 und Spur 2) inkubiert, danach für 10 min mit 6.7 nM hIL-4 stimuliert oder unstimuliert belassen (Spur 1) und dann lysiert. Im Anschluß daran erfolgt eine Immunpräzipitation mit einem spezifischen Antikörper gegen Stat6, der nachfolgend durchgeführte Westernblot wird mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Stat6 detektiert. Um die gleichmäßige Beladung des Gels sicherzustellen wird der Detektionsantikörper abgelöst und der Westernblot mit einem anti-Stat6 Antikörper ein zweites Mal detektiert.

Stat6BP zeigt in allen verwendeten Zelllinien und den PBL ein ähnliches Hemmuster, wobei der Eintritt der Hemmung in einigen Zelllinien nach etwa 20 min Vorinkubation mit AP/Stat6BP zu beobachten ist (RAMOS, Ba/F3). In anderen Zelllinien (Caki-1, HeLa) und den PBL kann man schon nach 5 bis 10 min Inkubation mit AP/Stat6BP einen Rückgang der Stat6-Phosphorylierung beobachten, in jedem Fall aber findet man erst nach 20 min eine vollständige Hemmung der Phosphorylierung von Stat6. Ähnlich verhält es sich mit dem Wiederauftreten von Phospho-Stat6: Bei RAMOS, Ba/F3 und PBL findet sich nach 90 min Behandlung mit AP/Stat6BP wieder phosphoryliertes Stat6, während sich bei Caki-1 und HeLa Zellen schon nach 60 min Vorinkubation wieder erstes phosphoryliertes Stat6 nachweisen läßt.

4.6.4.1. Caki-1 (humanes Nierenkarzinom)

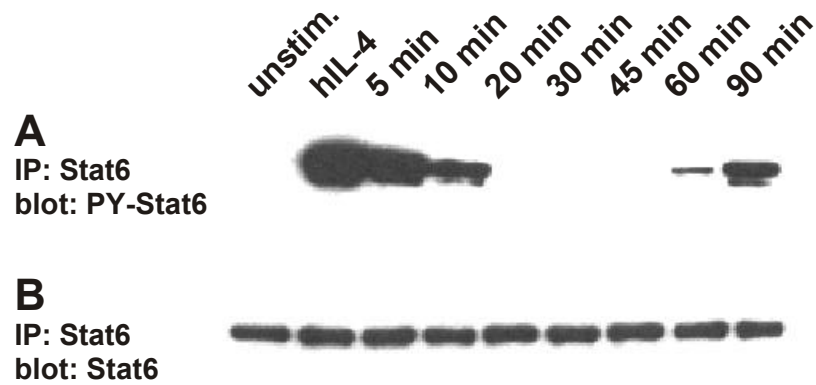


Abb. 4.6-7 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat6 in Caki-1 Zellen nach Behandlung mit 1 mM Natriumpervanadat und AP/Stat6BP; Detektion des Blots mit anti-Phospho-Stat6 (A) und anti-Stat6 (B)

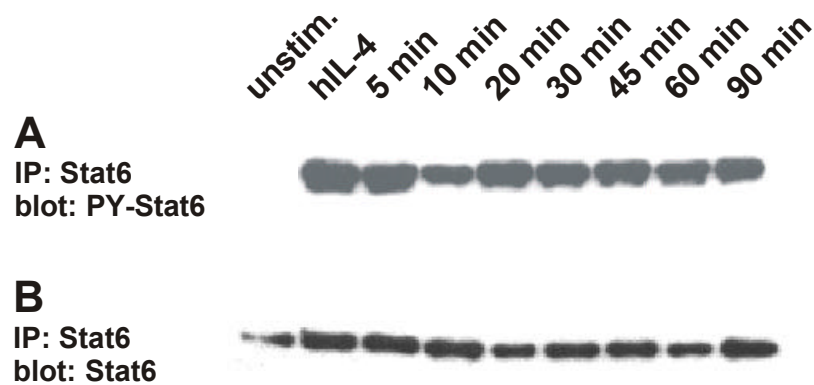


Abbildung 4.6-8 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat6 in Caki-1 Zellen nach Behandlung mit 1 mM Natriumpervanadat und AP/Stat6CP; Detektion des Blots mit anti-Phospho-Stat6 (A) und anti-Stat6 (B)

4.6.4.2. HeLa (humanes Cervix-Karzinom)

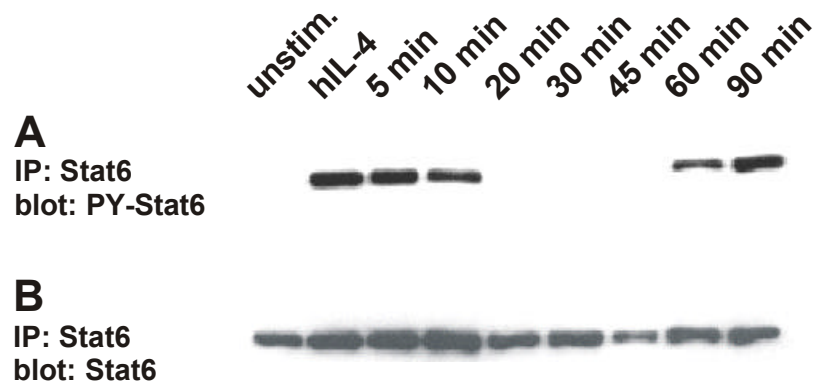


Abb. 4.6-9 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat6 in HeLa Zellen nach Behandlung mit 1 mM Natriumpervanadat und AP/Stat6BP; Detektion des Blots mit anti-Phospho-Stat6 (A) und anti-Stat6 (B)

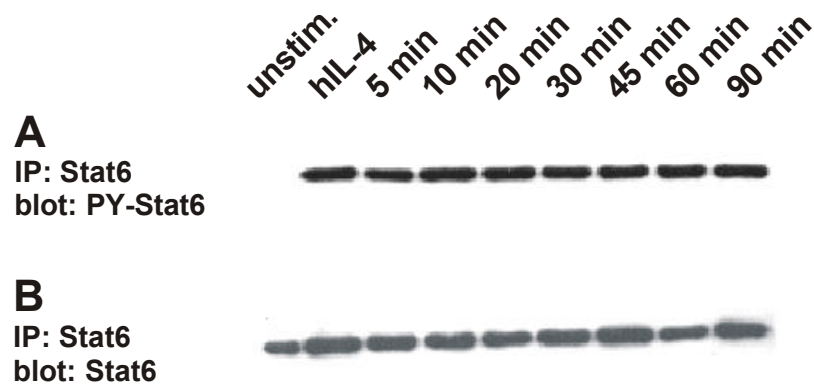


Abb. 4.6-10 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat6 in HeLa Zellen nach Behandlung mit 1 mM Natriumpervanadat und AP/Stat6CP; Detektion des Blots mit anti-Phospho-Stat6 (A) und anti-Stat6 (B)

4.6.4.3. Ba/F3 (murine Prä-B-Zelline)

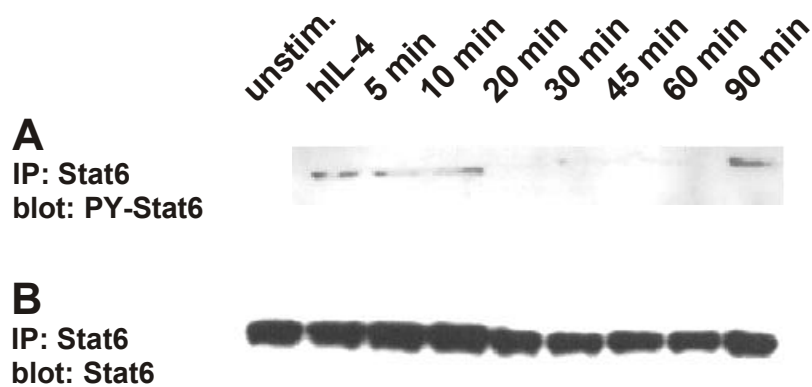


Abb. 4.6-11 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat6 in Ba/F3 Zellen nach Behandlung mit 1 mM Natriumpervanadat und AP/Stat6BP; Detektion des Blots mit anti-Phospho-Stat6 (A) und anti-Stat6 (B)

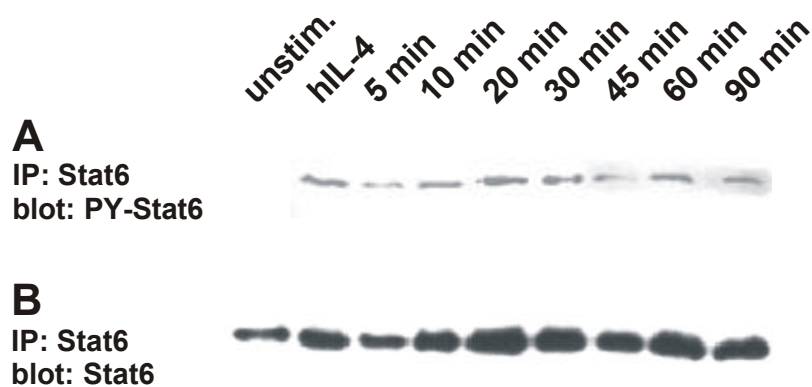


Abb. 4.6-12 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat6 in Ba/F3 Zellen nach Behandlung mit 1 mM Natriumpervanadat und AP/Stat6BP; Detektion des Blots mit anti-Phospho-Stat6 (A) und anti-Stat6 (B)

4.6.4.4. Periphere Blut Lymphocyten (PBL)

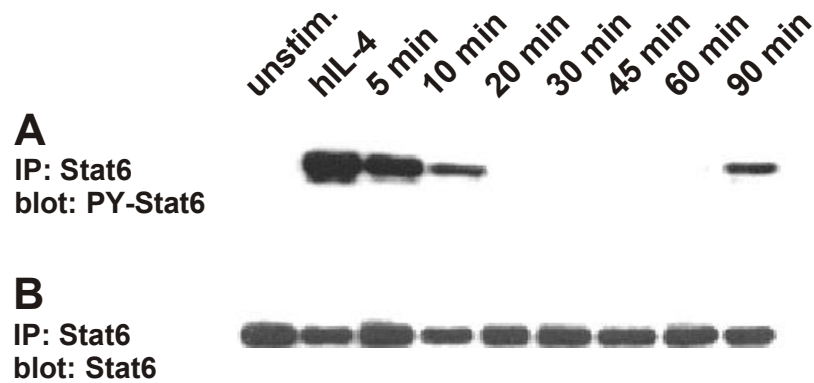


Abbildung 4.6-13 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat6 in PBL nach Behandlung mit 1 mM Natriumpervanadat und AP/Stat6BP; Detektion des Blots mit anti-Phospho-Stat6 (A) und anti-Stat6 (B)

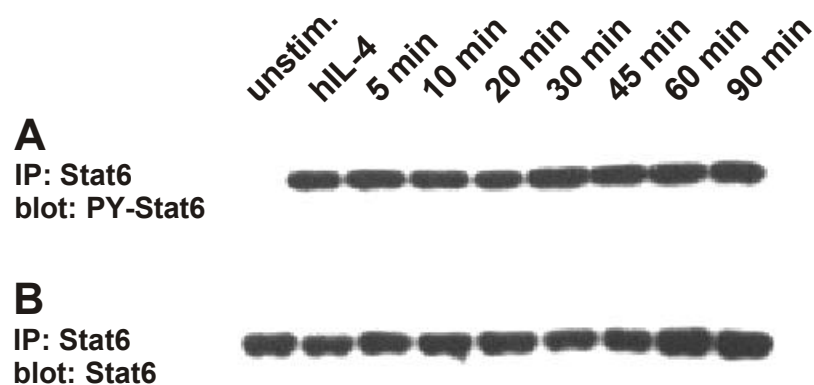


Abb. 4.6-14 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat6 in PBL nach Behandlung mit 1 mM Natriumpervanadat und AP/Stat6BP; Detektion des Blots mit anti-Phospho-Stat6 (A) und anti-Stat6 (B)

4.6.5. Stat6BP_(mod.) hemmt die Phosphorylierung von Stat6 nicht

Da sich die hemmende Wirkung von Stat6BP durch gleichzeitige Behandlung der Zielzellen mit dem Phosphataseinhibitor Natriumpervanadat erheblich verlängern läßt, ist es naheliegend, dass intrazelluläre Phosphatasen eine wesentliche, wenn nicht die entscheidende Rolle bei der Aufhebung der Hemmwirkung von Stat6BP spielen. Eine Schwachstelle des Inhibitors ist also der labile Phosphotyrosin-Rest. Für das folgende Experiment wird deshalb eine Variante von Stat6BP (Stat6BP_(mod.)) eingesetzt, bei der der Phosphotyrosinrest durch das Struktur analog 4-Phosphonomethyl-L-Phenylalanin ersetzt ist [149]. Bei diesem Analog ist der Phosphatrest nicht wie im Phosphotyrosin über ein Sauerstoffatom mit dem Benzylrest des Tyrosins verbunden, sondern über eine Methylgruppe. Diese Modifikation macht den Phosphatrest resistent gegen die Hydrolyse durch Phosphatasen [149].

Für das Immunpräzipitationsexperiment werden RAMOS Zellen für 5, 10, 20, 30, 45, 60 und 90 min mit 100 µM AP/Stat6BP_(mod.) oder ohne Peptid (Spur 1 und Spur 2) inkubiert, danach für 10 min mit 6.7 nM hIL-4 stimuliert oder unstimuliert belassen (Spur 1) und dann lysiert. Anschließend erfolgt eine Immunpräzipitation mit einem spezifischen Antikörper gegen Stat6, der nachfolgend durchgeführte Westernblot wird mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Stat6 detektiert. Um die gleichmäßige Beladung des Gels sicherzustellen wird der Detektionsantikörper abgelöst und der Westernblot mit einem anti-Stat6 Antikörper ein zweites Mal detektiert.

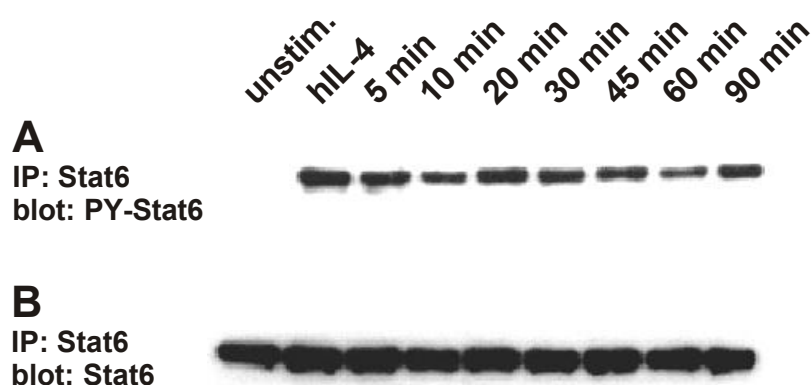


Abb. 4.6-15 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat6 in RAMOS Zellen nach Behandlung mit AP/Stat6BP_(mod.); Detektion des Blots mit anti-Phospho-Stat6 (A) und anti-Stat6 (B)

Es zeigt sich, dass durch die Modifikation die hemmende Eigenschaft des Stat6BP vollständig aufgehoben wird. Offenbar kann das Stat6BP_(mod.) nicht oder nur sehr schwach an die SH2-Domäne von Stat6 binden.

4.6.6. Die Hemmung der Proteasomaktivität beeinflusst die Wirkung von Stat6BP nicht

Als weitere Ursache für die relativ kurze inhibitorische Wirkung von Stat6BP kommt die Proteasomenaktivität in den Zielzellen in Betracht. In die Zelle gelangtes Stat6BP könnte an den Proteasomen verdaut und als Hemmstoff unbrauchbar werden. Zur Überprüfung dieser These werden RAMOS Zellen 30 min vor der Zugabe von AP/Stat6BP bzw. AP/Stat6CP mit 70 μ M Lactacystin, einem Proteasominhibitor [151] und 1 mM Natriumpervanadat inkubiert. Die Zellen werden dann für unterschiedlich lange Zeiten mit 10 μ M AP/Stat6BP, 10 μ M AP/Stat6CP oder ohne Peptid (Spur 1 und Spur 2) inkubiert, danach für 10 min mit 6.7 nM hIL-4 stimuliert oder unstimuliert belassen (Spur 1) und dann lysiert. Anschließend erfolgt eine Immunpräzipitation mit einem spezifischen Antikörper gegen Stat6, der nachfolgend durchgeführte Westernblot wird mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Stat6 detektiert. Um die gleichmäßige

Beladung des Gels sicherzustellen wird der Detektionsantikörper abgelöst und der Westernblot mit einem anti-Stat6 Antikörper ein zweites Mal detektiert.

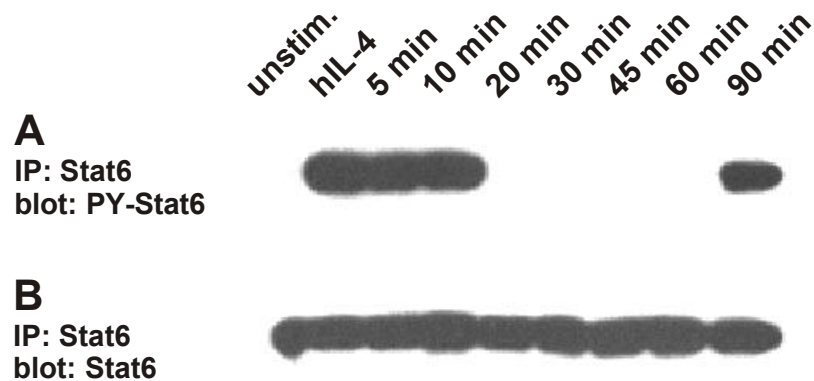


Abb. 4.6-16 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat6 in RAMOS Zellen nach Behandlung mit 70 μ M Lactacystin, 1 mM Natriumpervanadat und AP/Stat6BP; Detektion des Blots mit anti-Phospho-Stat6 (A) und anti-Stat6 (B)

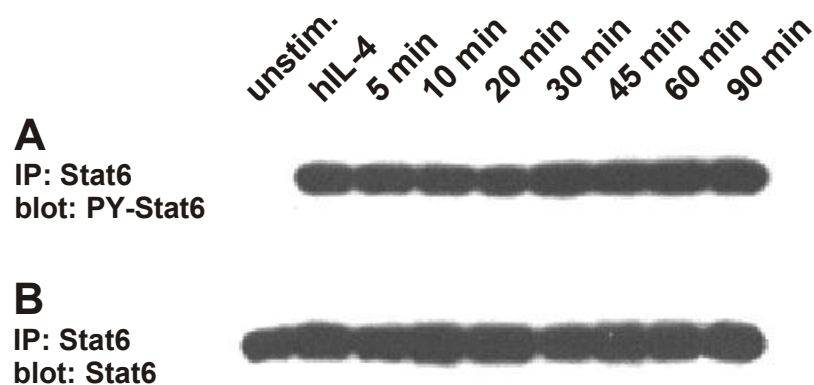


Abb. 4.6-17 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat6 in RAMOS Zellen nach Behandlung mit 70 μ M Lactacystin, 1 mM Natriumpervanadat und AP/Stat6CP; Detektion des Blots mit anti-Phospho-Stat6 (A) und anti-Stat6 (B)

Dieses Experiment zeigt, dass die Hemmung der Proteasomaktivität die Charakteristik der Stat6 Hemmung nicht beeinflusst (Vgl. Abb. 4.6-5 und 4.6-6).

Das Phosphorylierungsmuster von Stat6 bleibt im Vergleich zu Zellen, die nicht mit Lactacystin behandelt wurden, unverändert.

4.7. Stat6BP beeinflusst die Phosphorylierung von Stat5 nicht

Neben Stat6 aktiviert IL-4 noch andere Stat Proteine, u.a. Stat5 [76,152]. Anhand der Phosphorylierung von Stat5 nach Behandlung mit AP/Stat6BP und anschließender Stimulierung mit IL-4 oder IL-3 soll nun überprüft werden, ob das Stat6BP mit anderen nah verwandten SH2-Domänen kreuzreagiert, oder ob die Stat6BP Sequenz bevorzugt an die SH2-Domäne von Stat6 bindet und somit spezifisch die Phosphorylierung von Stat6 hemmt. Dazu werden Ramos Zellen wiederum von 10 bis 90 min in Anwesenheit von 1 mM Natriumpervanadat mit dem AP/Stat6BP behandelt. Im Anschluß daran werden die Zellen entweder mit 67 nM IL-4 oder mit 6.7 nM IL-3 für 10 min stimuliert, lysiert und mit einem Antikörper gegen Stat5 immunpräzipitiert. Als Kontrollpeptid wird das AP/Stat6CP unter gleichen Bedingungen verwendet. Die im Anschluß durchgeführten Westernblot Experimente werden mit einem anti-pTyr Antikörper detektiert und nach dessen Ablösung von der Blotmembran wird diese mit einem anti-Stat5 Antikörper erneut detektiert.

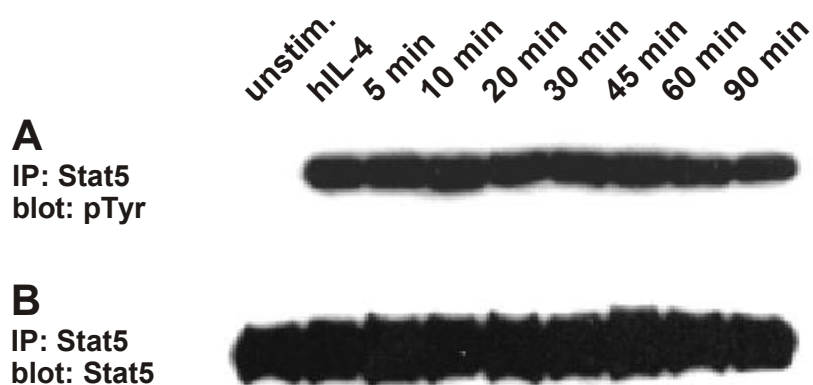


Abb. 4.7-1 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat5 in RAMOS Zellen nach Behandlung mit AP/Stat6BP in Anwesenheit von 1 mM Natriumpervanadat und anschließender Stimulation mit IL-4; Detektion des Blots mit anti-pTyr (A) und anti-Stat5 (B)

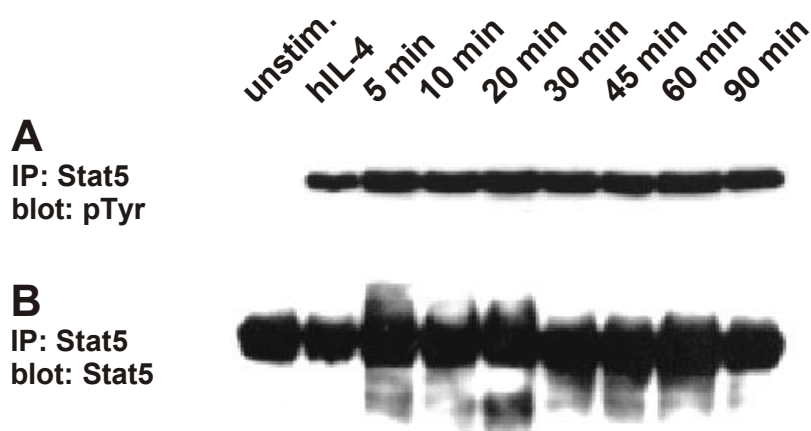


Abb. 4.7-2 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat5 in RAMOS Zellen nach Behandlung mit AP/Stat6CP in Anwesenheit von 1 mM Natriumpervanadat und anschließender Stimulation mit IL-4; Detektion des Blots mit anti-pTyr (A) und anti-Stat5 (B)

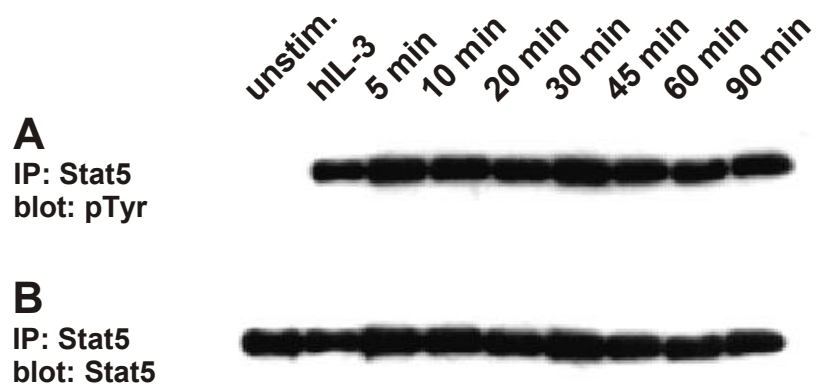


Abb. 4.7-3 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat5 in RAMOS Zellen nach Behandlung mit AP/Stat6BP in Anwesenheit von 1 mM Natriumpervanadat und anschließender Stimulation mit IL-3; Detektion des Blots mit anti-pTyr (A) und anti-Stat5 (B)

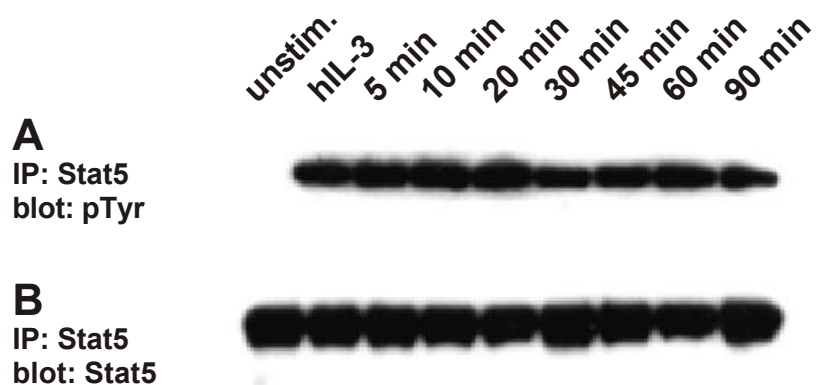


Abb. 4.7-4 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat5 in RAMOS Zellen nach Behandlung mit AP/Stat6CP in Anwesenheit von 1 mM Natriumpervanadat und anschließender Stimulation mit IL-3; Detektion des Blots mit anti-pTyr (A) und anti-Stat5 (B)

Man erkennt, daß Stat6BP die Phosphorylierung von Stat5 sowohl nach Stimulierung mit IL-4, als auch nach Stimulierung mit IL-3 nicht beeinflusst. Die

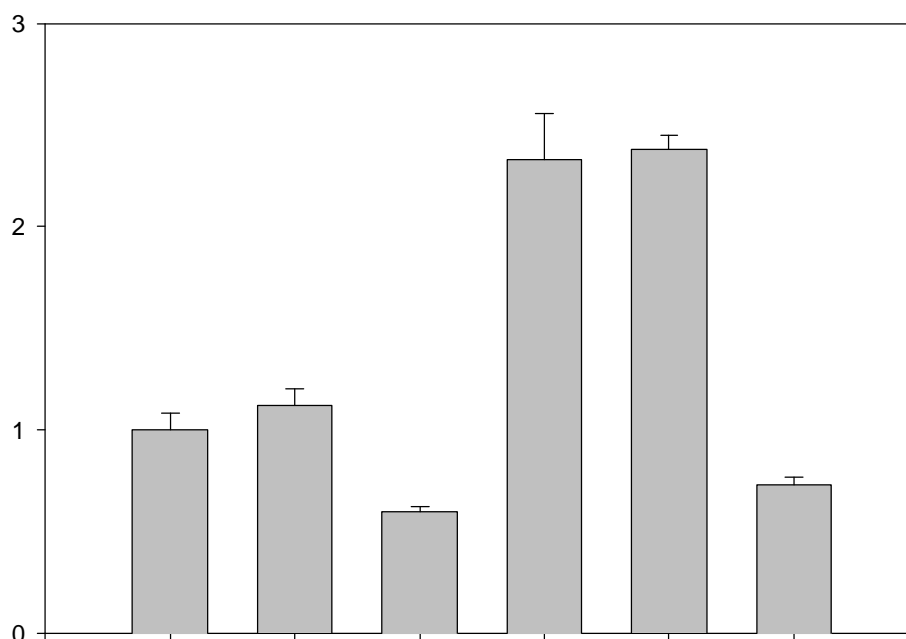
durch Stat6BP hervorgerufene Hemmung ist also Stat6 spezifisch, eine Bindung an die eng verwandte SH2-Domäne von Stat5 findet nicht statt.

4.8. Stat6BP hemmt auch die Aktivierung eines Stat6 kontrollierten Reportergens

Die Versuche zur Hemmung der Transkriptionsaktivität von Stat6 wurden von Herrn Dipl. Chem. Markus Haake durchgeführt.

Hierzu wurden Ba/F3 Zellen verwendet, die stabil mit der humanen IL-4R α und der humanen common γ (γ_c) Rezeptoruntereinheit [153], sowie einem Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle eines Stat6 aktivierbaren Promotors transfiziert sind [154]. Die Zellen werden dann für 20 min mit 10 μ M AP/Stat6BP, mit 10 μ M AP oder ohne Peptide (-) vorinkubiert und anschließend für 2 h mit oder ohne 10 ng/ml hIL-4 inkubiert und danach lysiert. Abschließend wird dann die Expression des Reportergens über Lichtemission gemessen (Abb. 4.8-1).

Man erkennt, dass AP/Stat6BP in IL-4 stimulierten Zellen die Reporterexpression deutlich hemmt. Sogar in unstimulierten Zellen wird die Aktivität des Reportergens unter den basalen Wert gesenkt. Dies legt nahe, dass unabhängig von IL-4 Stimulation eine geringe, permanente Aktivität von Stat6 vorhanden ist. Ungekoppeltes Antennapediapeptid hat weder in IL-4 stimulierten, noch in unstimulierten Zellen einen Einfluß auf die Expression des Reportergens.



IL-4	-	-	-	+	+	+
AP	-	+	-	-	+	-
AP/Stat6BP	-	-	+	-	-	+

Abb. 4.8-1 AP/Stat6BP hemmt die Aktivität eines Stat6 kontrollierten Reportergens

4.9. Proliferationstests

Aus der Literatur ist bekannt, dass IL-4 in vielen verschiedenen Zelltypen transient Proliferation induzieren kann [4]. Um die Auswirkungen von Stat6BP auf die Teilung von Zellen zu untersuchen, werden mit peripheren T-Zellen Proliferationsexperimente durchgeführt.

Zuerst wird jedoch in einem Proliferationstest die IL-4 Dosis für die maximale Zellteilung ermittelt. Dazu werden die PBL mit unterschiedlichen Mengen an IL-4 versetzt und nach drei Tagen die Proliferationsrate durch Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt.

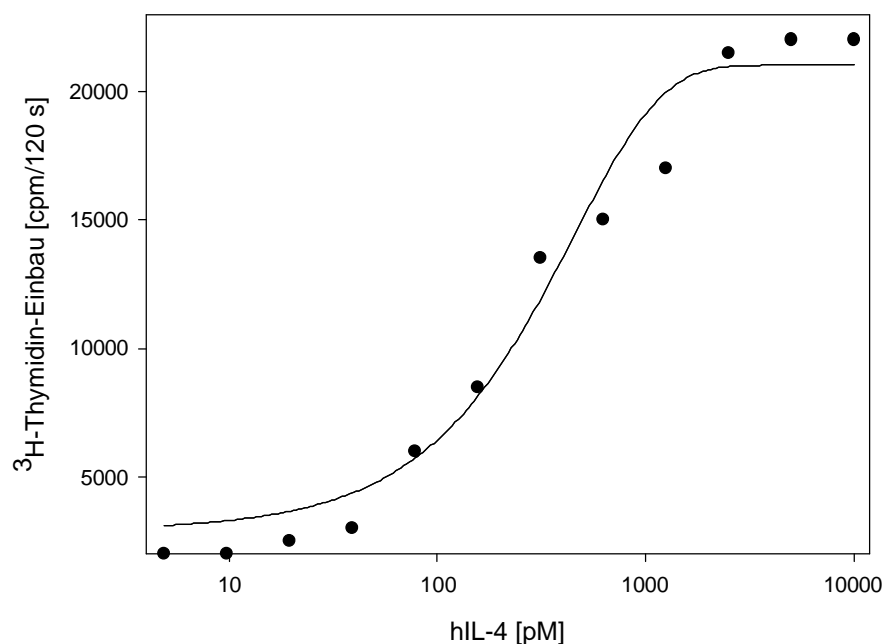


Abb. 4.9-1 IL-4 induzierte Proliferation von PBL in Abhängigkeit von der IL-4 Konzentration

Es zeigt sich, dass die Stimulierung von primären T-Zellen mit IL-4 zu einem dosiabhängig gesteigerten Einbau von Thymidin führt. Die halbmaximale Stimulationsdosis (EC50) für IL-4 beträgt dabei etwa 250 pM .

Für den Hemmversuch werden mit Phytohämagglutinin (PHA) aktivierte T-Zellen in Anwesenheit von 1 mM Natriumpervanadat und einer Verdünnungsreihe von AP/Stat6BP verwendet. Als Positivkontrolle dient Jak3-Inhibitor, eine Substanz, die in der Literatur als starker Inhibitor der Janus-Kinase 3 beschrieben ist [155] und somit die Signaltransduktion des IL-4 Rezeptors in T-Zellen vollständig unterbindet.

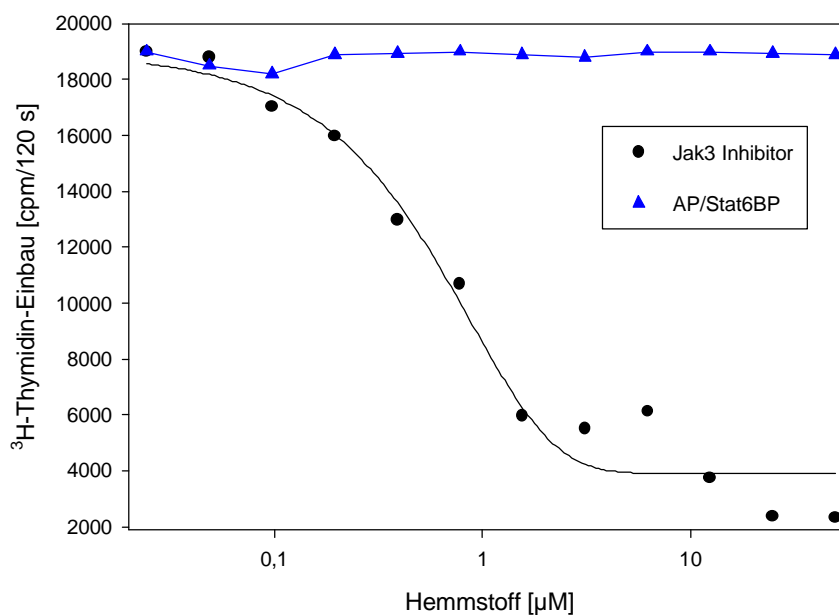


Abb. 4.9-2 AP/Stat6BP inhibiert die IL-4 induzierte Proliferation in T-Zellen nicht

Aus Abb. 4.9-2 ergibt sich, dass das AP/Stat6BP keinerlei Einfluss auf die Proliferation nimmt, während sie sich durch den Jak3-Inhibitor wirkungsvoll hemmen lässt.

Das Stat6BP keinen Einfluss auf die Proliferation entspricht den Erwartungen, da einerseits die Stat6 vermittelte Signaltransduktion überwiegend zelldifferenzierende Funktion hat [4] und andererseits die Stat6BP induzierte Hemmung voraussichtlich in einem zu kleinen Zeitfenster stattfindet, um Auswirkungen auf Zellteilungsprozesse zu haben.

4.10. Die IL-4 induzierte Aktivierung der *src*-Typ Kinasen p56^{lck} und p59^{fyn}

Einige Cytokine darunter auch IL-2, IL-3, IL-5 und IL-7 stimulieren die Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung von Kinasen der *Src*-Familie [156]. Die *src*-Typ Kinasen sind aus drei Domänen aufgebaut: Einer Kinasedomäne mit enzymatischer Aktivität, einer *Src* homology 2 (SH2) Domäne zur Bindung an phosphoryliertes Tyrosin, sowie einer *Src* homology 3 (SH3) Domäne zur Bindung kurzer prolinreicher Aminosäuresequenzen [157]. Im Falle von IL-4 konnte die Aktivierung der *Src*-Typ Kinasen p56^{lck} und p59^{fyn} nach Stimulierung mit IL-4 in T-Zellen durch Nachweis verstärkter Autophosphorylierung beider Kinasen gezeigt werden [71,72]. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass mit Fusionsproteinen aus Glutathion-S-Transferase (GST) und den SH2-Domänen aus p56^{lck} bzw. p59^{fyn} in IL-4 stimulierten Zellen phosphorylierte Proteine präzipitiert werden können [158]. Durch die Kopräzipitation von IL-4R α mit p56^{lck}-SH2- jedoch nicht mit p59^{fyn}-SH2-Fusionsproteinen konnte außerdem eine Assoziation von p56^{lck} mit dem IL-4 Rezeptorsystem nachgewiesen werden [159].

4.10.1. In vitro-Kinase Assay

Um die Aktivierung der *Src*-Typ Kinasen p56^{lck} und p59^{fyn} in T-Zellen nach der Stimulierung näher zu untersuchen, wird ein in-vitro Kinase Assay verwendet. Dadurch ist es möglich sowohl die Zunahme der Autophosphorylierung der Kinasen, als auch die Phosphorylierung eines exogenen Substrats (Enolase) zu überwachen.

Die Aktivierung von p56^{lck} und p59^{fyn} wird in primären T-Zellen und den humanen T-Zelllinien Jurkat und MOLT-4 untersucht. Als weitere interessante Zelllinie zur Untersuchung der *Src*-Kinasen wird die Jurkat-Mutante J.CaM1.6 verwendet. Diese Zelllinie wurde aus Jurkat-Zellen durch Behandlung mit Ethylmethansulfonat und anschließender Selektion auf einen nicht signalfähigen T-Zell-Rezeptor gewonnen. Ihr fehlen die p56^{lck}-Kinaseaktivität und das Exon 7 in der p56^{lck} mRNA.

PBL, Jurkat, MOLT-4 und Jurkat J.CaM1.6 Zellen werden mit hIL-4 (10 min, 100 ng/ml) stimuliert oder als Negativkontrolle unstimuliert belassen und mit polyklonalen Seren gegen p56^{lck} bzw. p59^{fyn} präzipitiert. Die Immunkomplexe werden dann dreimal mit RIPA- und zweimal mit frisch angesetzttem Kinase-Puffer gewaschen und sofort für 10 min bei 30 °C einem Kinaseassay unterzogen. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer werden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt, das Gel getrocknet und mit dem Phosphorimager detektiert.

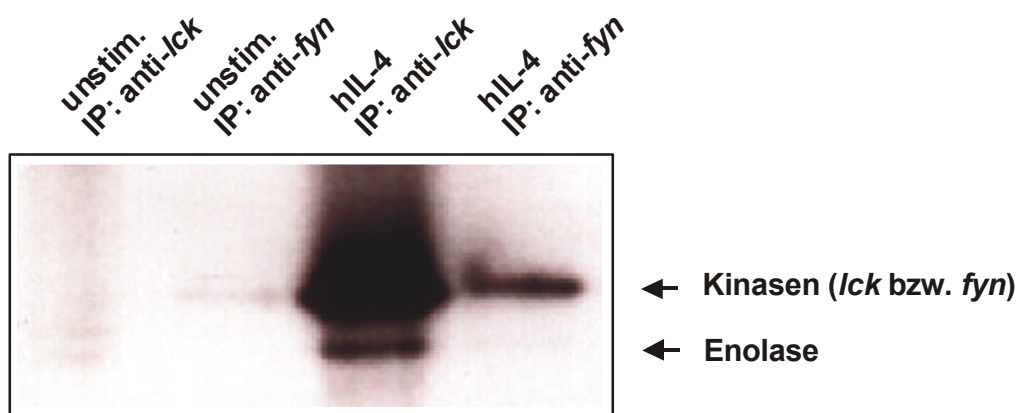


Abb. 4.10-1 *In vitro* Kinase Aktivität der Src-Kinasen lck und fyn in PBL

In primären T-Zellen führt die Stimulierung mit IL-4 zu einer starken Aktivierung von p56^{lck}, was sich durch Autophosphorylierung der Kinase und der Phosphorylierung des Substrats Enolase zeigen läßt. p59^{fyn} wird ebenfalls, wenn auch viel schwächer, autophosphoryliert. Es läßt sich jedoch keine Phosphorylierung der Enolase nachweisen (Abb. 4.10-1).

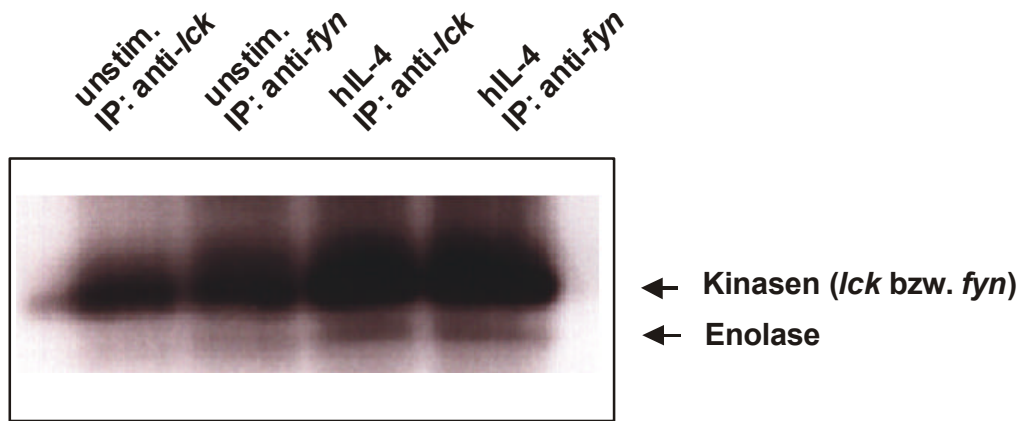


Abb. 4.10-2 *In vitro* Kinase Aktivität der Src-Kinasen *lck* und *fyn* in MOLT-4 Zellen

In MOLT-4 Zellen liegen schon im unstimulierten Zustand sowohl $p56^{lck}$, als auch $p59^{fyn}$ autophosphoryliert vor. Die Behandlung mit IL-4 führt zu einer Verdopplung der *in vitro* Autophosphorylierung von $p56^{lck}$ und $p59^{fyn}$, das Kinasesubstrat Enolase wird erst in stimulierten Zellen deutlich erkennbar phosphoryliert (Abb. 4.10-2).

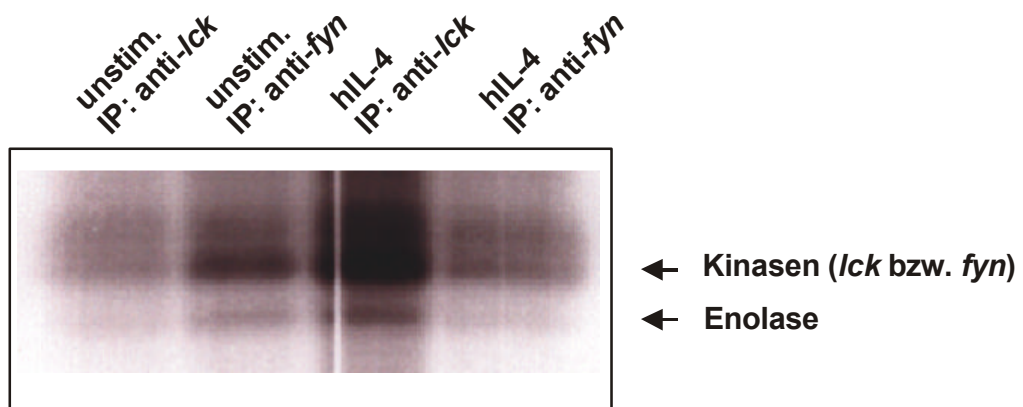


Abb. 4.10-3 *In vitro* Kinase Aktivität der Src-Kinasen *lck* und *fyn* in Jurkat Zellen

In Jurkat Zellen findet sich im unstimulierten Zustand $p59^{fyn}$ in leicht aktivierten Zustand, wobei auch Enolase erkennbar umgesetzt wird. Nach Stimulierung mit IL-4 wird $p56^{lck}$ stark aktiviert, wohingegen die Aktivität von $p59^{fyn}$ zurückgeht (Abb 4.10-3).

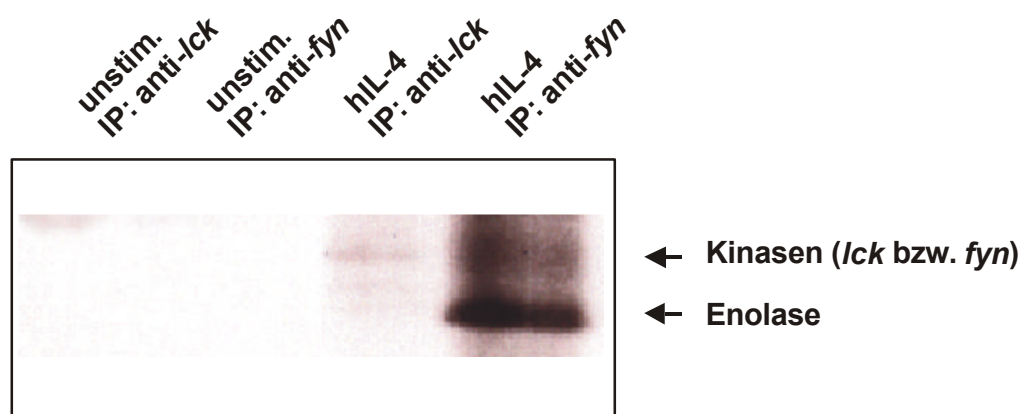


Abb. 4.10-4 *In vitro* Kinase Aktivität der Src-Kinasen Ick und fyn in Jurkat J.CaM1.6 Zellen

In der $p56^{\text{lck}}$ defizienten Jurkat Mutante J.CaM1.6 ist im unstimulierten Zustand keine Aktivität der Src-Kinasen $p56^{\text{lck}}$ und $p59^{\text{fyn}}$ erkennbar. Werden die Zellen mit IL-4 behandelt wird $p59^{\text{fyn}}$ aktiviert, die durch Autophosphorylierung und starke Phosphorylierung von Enolase nachweisbar ist. Erwartungsgemäß kann $p56^{\text{lck}}$ in dieser Zelllinie nicht aktiviert werden (Abb. 4.10-4).

4.11. Radioaktives Crosslinking

Ein radioaktives Crosslinking mit kovalent bindenden Agentien erlaubt es, Assoziationen zwischen Proteinen nachzuweisen. Im IL-4/IL-13 System lassen sich mit radioaktiv markiertem IL-4 bzw. IL-13 die Rezeptoren auf Zellen nachweisen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die unterschiedlichen Bindungspartner der Interleukine auf Milzzellen von Balb/c Mäusen im Vergleich zu IL-4R α knockout Mäusen untersucht werden.

Für die radioaktive Markierung werden 10 μg mL-4, mL-4 Variante Q116D/Y119D (QY) oder mL-13 mit 0.5 mCi Na^{125}I in Anwesenheit von Iodogen als Katalysator inkubiert. In einer Oxidationsreaktion wird I^- zu I^+ oxidiert, dieses greift nun elektrophil den Benzylrest von Tyrosinen an und substituiert dort ein Proton in ortho-Stellung. Die Iodierung der Proteine wird anschließend durch 12 %

Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Detektion am Phosphormager überprüft.

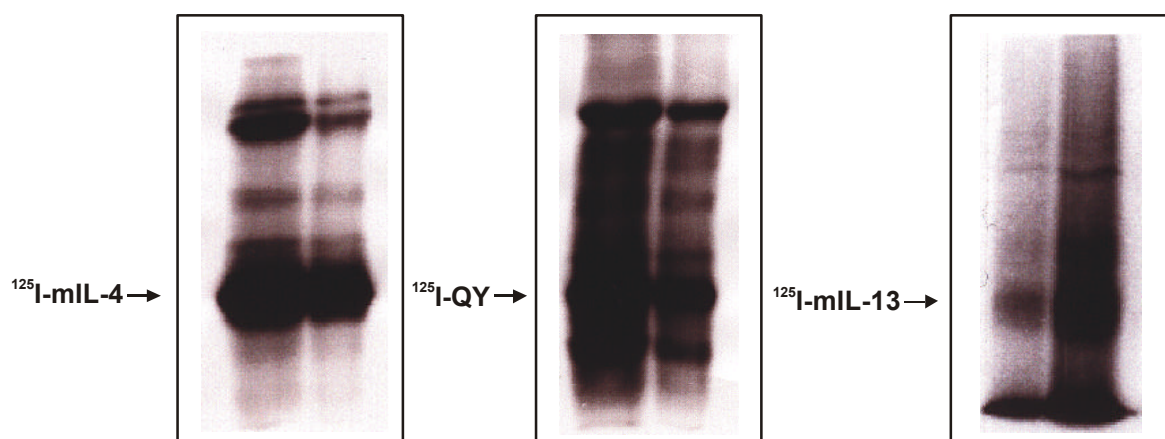


Abb. 4.11-1 SDS-Gelelektrophorese von $^{125}\text{I-mIL-4}$, $^{125}\text{I-mQY}$ und $^{125}\text{I-mIL-13}$

Der verwendete Crosslinker Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS^3) ist ein homobifunktioneller Ester mit zwei reaktiven Gruppen, die durch eine Kohlenstoffkette als Spacer getrennt sind und Proteine über Lysinreste verbinden. Die markierten Proteine werden zusammen mit intakten Milzzellen aus Balb/c-Mäusen oder aus IL-4R α knockout (IL-4R $\alpha^{-/-}$) Balb/c-Mäusen bei 4 °C inkubiert, um die rezeptorvermittelte Internalisierung zu unterdrücken. Die Milzzellen werden danach sofort mit einer Lösung des Crosslinkers versetzt, nach 20 min mit PBS gewaschen und dann lysiert. Die Proben werden schließlich mit SDS-Probenpuffer vermischt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des Phosphormagers nachgewiesen.

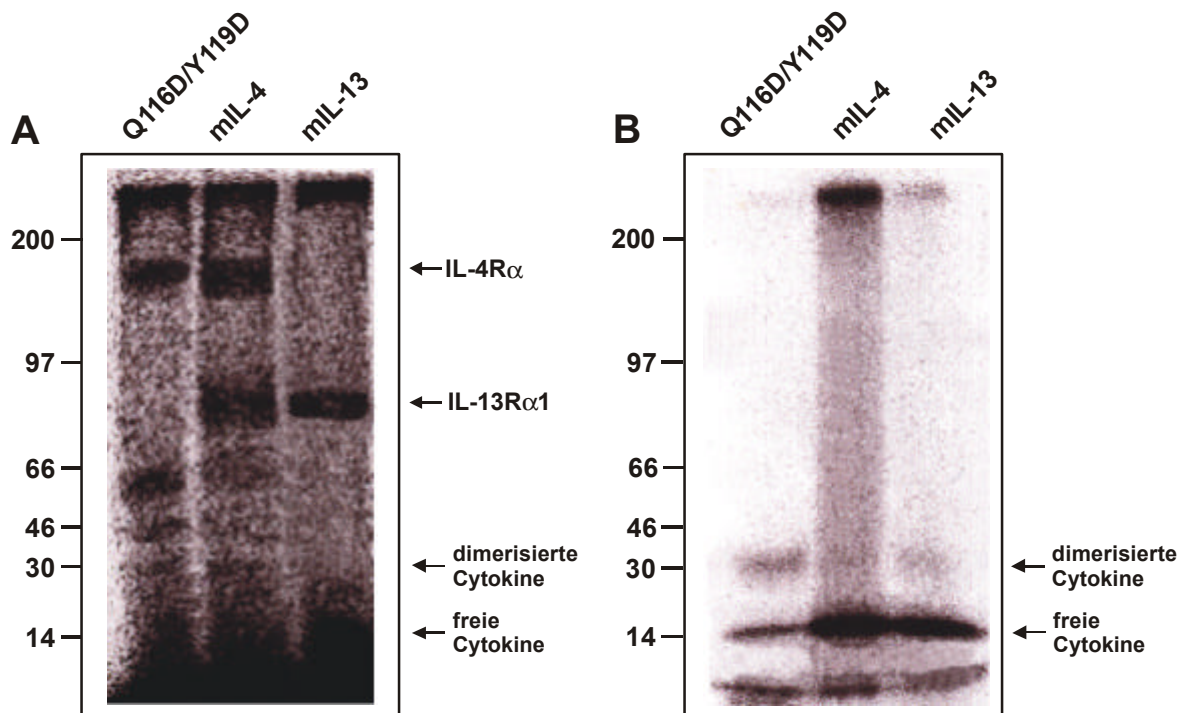


Abb. 4.11-2 Crosslinking von ^{125}I -IL-4, ^{125}I -QY und ^{125}I -IL-13 an seine Rezeptorkomponenten auf Milzzellen aus Balb/c- (A) und IL-4R knockout Balb/c-Mäusen

Die Autoradiographie des Gels von Balb/c Milzzellen (Abb. 4.11-2 A) zeigt die radiomarkierten Cytokine (IL-4, QY und IL-13), sowie deren Komplexe mit Rezeptorproteinen. Der IL-4R α ist bei Behandlung der Zellen mit mIL-4 und der IL-4 Variante QY deutlich in Form eines Komplexes detektierbar, dieser besteht aus den jodierten Cytokinen und dem kovalent gebundenem Rezeptor. mIL-4 und mIL-13 sind ferner im Komplex mit dem IL-13R α 1 nachweisbar. Auf dem Gel kann man die freien Interleukine als Monomer und als durch den Crosslinker verbundene Dimere erkennen. Bei den Milzzellen der IL-4R α ^{-/-} Mäuse finden sich nach dem Crosslinking lediglich die radioaktiv markierten Cytokine in monomerer und dimerer Form, eine Bindung an Rezeptorkomponenten ist mit keinem der verwendeten Cytokine zu erkennen.