

1. Einleitung.....	5
1.1. Allergie und Asthma	5
1.2. Das Immunsystem.....	6
1.3. IL-4 und die Typ 1-allergische Reaktion	8
1.4. Interleukin-4	10
1.4.1. Struktur von IL-4	10
1.5. Der IL-4 Rezeptorkomplex.....	11
1.5.1. Der IL-4 Rezeptor aus IL-4R α und γ c.....	13
1.5.2. Der IL-4 Rezeptor aus IL-4R α und IL-13 α 1	13
1.5.3. IL-4 Rezeptorbindung.....	14
1.6. Signaltransduktion des IL-4 Rezeptorkomplexes	15
1.6.1. Der IRS-2 Komplex	17
1.6.2. Der Jak/Stat Signalweg	18
1.7. Transport hydrophiler Moleküle in lebende Zellen	19
1.7.1. Transport durch das Antennapediapeptid	22
1.7.2. Internalisierung von Stat6 hemmenden Peptiden durch das Antennapediapeptid.....	24
1.8. Ziel der Arbeit.....	25
 2. Material	 27
2.1. Abkürzungen	27
2.2. Chemikalien und Enzyme	28
2.3. Zelllinien	29
2.4. Wachstumsfaktoren	29
2.5. Antikörper.....	29
2.6. Peptide	30
2.7. Tiermaterial	30
 3. Methoden.....	 31
3.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen	31
3.1.1. Sterilisation	31
3.1.2. Medium für Zellkulturen	31
3.1.3. Kulturbedingungen	32
3.1.4. Zelldichtebestimmung und Vitalitätsfärbung mit Trypanblau.....	32

3.1.5. Kryokonservierung von Zellen.....	33
3.1.5.1. Anlegen von Stammkulturen	33
3.1.5.2. Auftauen von Stammkulturen	33
3.1.6. Isolierung und Stimulierung von humanen Lymphocyten.....	33
3.1.7. Isolierung muriner Milzzellen	34
3.1.8. Proliferationstest mit ³ H Thymidin.....	35
3.1.9. Überprüfung von Zellkulturen auf Kontamination mit Mykoplasmen.....	36
3.2. Proteinchemische Methoden	
3.2.1. Kopplung von Cargo-Peptiden an das Antennapediapeptid.....	36
3.2.1.1. Reduktion von REDUCTACRYL™	37
3.2.1.2. Reduktion der Cargo-Peptide.....	37
3.2.1.3. Kopplung des Antennapediapeptids mit den Cargo-Peptiden....	38
3.2.2. Quantitative Bestimmung freier Thiolgruppen.....	38
3.2.3. Reinigung von Peptiden durch reversed phase HPLC	39
3.2.4. Molekulargewichtsbestimmung von Peptiden durch Massenspektrometrie.....	40
3.2.5. Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Peptiden	40
3.2.5.1. Direkte Konzentrationsbestimmung von Proteinen	40
3.2.5.2. Direkte Konzentrationsbestimmung von Peptiden	40
3.2.5.3. Proteinbestimmung nach Bradford	42
3.2.6. Lyophilisieren und Lagern von Peptiden	42
3.2.7. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen und Peptiden	43
3.2.7.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
3.2.7.2. Proteingrößenstandards	45
3.2.7.3. Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	45
3.2.8. Jodierung von Interleukin-4	47
3.2.9. Crosslinking von Proteinen	49
3.3. Immunologische Methoden	
3.3.1. Zellyse.....	50
3.3.1.1. Gesamtzellysate für die Gelelektrophorese	50
3.3.1.2. Zellysate zur Immunpräzipitation.....	51
3.3.2. Immunpräzipitation	51

3.3.2.1. Pulldown-Immunpräzipitation	52
3.3.3. Western Blot	52
3.3.4. Amidoschwarz Anfärbung.....	53
3.3.5. Immunanfärbung und Detektion	53
3.3.5.1. Luminoldetektion	54
3.3.6. Ablösen der Detektionsantikörper von Nitrocellulosemembranen.	55
3.3.7. Immunfluoreszenzmikroskopie.....	55
3.3.7.1. Herstellung des Mowiol-Einbettmediums.....	56
3.3.8. In vitro-Kinase Assay.....	57
4. Ergebnisse.....	59
4.1. Optimierung der Kopplung des Antennapediapeptids mit den Cargo-Peptiden.....	59
4.2. Reinigung der Kopplungsansätze	60
4.3. Massenbestimmung der gekoppelten Peptide.....	65
4.4. Überprüfung der Phosphorylierung des AP/Stat6BP	68
4.4.1. Überprüfung des AP/Stat6BP _(mod.)	69
4.5. Nachweis der Aufnahme des AP/Stat6BP in lebende Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie	70
4.6. Stat6BP hemmt die Tyrosinphosphorylierung von Stat6	72
4.6.1. Konzentrationskinetik der Stat6BP Hemmung.....	72
4.6.2. Zeitkinetik der Stat6BP Hemmung	74
4.6.3. Der hemmende Effekt von Stat6BP lässt sich durch Natriumpervanadat verlängern.....	75
4.6.4. Hemmung der Stat6 Phosphorylierung in verschiedenen Zelllinien und primären Zellen	77
4.6.4.1. Caki-1 (humanes Nierenkarzinom).....	79
4.6.4.2. HeLa (humanes Cervix-Karzinom).....	80
4.6.4.3. Ba/F3 (murine Prä-B-Zelllinie).....	81
4.6.4.4. Periphere Blut Lymphocyten (PBL)	82
4.6.5. Stat6BP(mod.) hemmt die Phosphorylierung von Stat6 nicht	83
4.6.6. Die Hemmung der Proteasomaktivität beeinflusst die Wirkung von Stat6BP nicht	84
4.7. Stat6BP beeinflusst die Phosphorylierung von Stat5 nicht	86

4.8. Stat6BP hemmt auch die Aktivierung eines Stat6 kontrollierten Reportergens	89
4.9. Proliferationstests	90
4.10. Die IL-4 induzierte Aktivierung der src-Typ Kinasen p56 ^{lck} und p59 ^{fyn}	93
4.10.1. In vitro-Kinase Assay	93
4.11. Radioaktives Crosslinking	96
5. Diskussion	99
5.1. Stat6 als Zielmolekül für die Entwicklung eines Inhibitors	99
5.1.1. Struktur von SH2 Domänen	101
5.1.2. SH2-bindende antagonistische Peptide	101
5.1.3. Wirkung von Stat6BP	103
5.2. Intrazellulärer Transport durch membranpermeable Peptide	105
5.2.1. Antennapedia und ähnliche Homöpeptide	105
5.2.2. Vom HIV Tat-Protein abgeleitete Peptide	106
5.2.3. Synthetische Peptide	107
5.2.4. Transportmechanismus der Peptide	108
5.3. Die Beteiligung der src-Typ Kinasen p56 ^{lck} und p59 ^{fyn} an der Signaltransduktion	109
5.4. Das IL-4 Rezeptor System	111
5.5. Ausblick	113
6. Zusammenfassung	115
7. Summary	116
8. Literaturverzeichnis	117