

Stat6 vermittelte Genregulation in eukaryontischen Zellen

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

vorgelegt von

Markus Haake

aus

Sundern

Würzburg 2001

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter :

Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

1	Einleitung	8
1.1	<i>Allergische Erkrankungen</i>	8
1.2	<i>Th1 und Th2</i>	9
1.3	<i>Interleukin-4</i>	13
1.4	<i>Interleukin-4-Rezeptor-α</i>	14
1.4.1	Der IL-4 Rezeptor aus IL-4R α und γ c (Typ-1-Rezeptor)	16
1.4.2	Der IL-4 Rezeptor aus IL-4R α und IL-13 α 1 (Typ-2-Rezeptor)	17
1.5	<i>Interleukin-13</i>	17
1.6	<i>Signaltransduktion des IL-4 Rezeptorkomplexes</i>	18
1.6.1	Janus-Kinasen	18
1.6.2	Der IRS-1/2-Signalweg	19
1.6.3	Phospho-Tyrosin-Phosphatasen	21
1.6.4	Stat-Signalwege	23
1.6.5	Stat-Proteine	23
1.6.5.2	DNA-Bindung	27
1.6.5.3	Wechselwirkung von Stats mit anderen Molekülen	29
1.6.6	Negative Regulierung des Jak/Stat-Signalweges	30
1.6.7	IL-4 induzierte Genexpression	30
1.7	<i>IL-4 und die Typ 1-allergische Reaktion</i>	32
2	Material	36
2.1	<i>Chemikalien und Enzyme</i>	38
2.2	<i>Zelllinien</i>	38
2.3	<i>Primärzellen</i>	38
2.4	<i>Wachstumsfaktoren</i>	38
2.5	<i>Antikörper</i>	39
2.6	<i>Oligonukleotide</i>	40
2.6.1	Primer	40
2.6.2	Promotorfragmente zur Kopplung an Magnetobeads	40
2.7	<i>Luciferasevektorplasmide</i>	42
2.8	<i>Peptide</i>	42
3	Methoden	43
3.1	<i>Mikrobiologische Methoden</i>	43
3.1.1	Sterilisieren	43
3.1.2	Kulturmedien	43
3.1.3	Kulturbedingungen	44
3.2	<i>Konservieren von Bakterienkulturen</i>	44
3.2.1	Kurzzeitige Konservierung	44
3.2.2	Langfristige Konservierung	45
3.2.3	Elektrotransformation von E.coli	45
3.2.3.1	Herstellung elektrokompenter Zellen	45

3.2.3.2	Elektrotransformation kompetenter Zellen	45
3.2.4	Chemische Transformation chemisch kompetenter Zellen	46
3.2.4.1	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	46
3.2.4.2	Transformation chemisch kompetenter Zellen	46
3.3	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	47
3.3.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	47
3.3.2	Reinigung, Ausfällen und Trocknen von Nukleinsäuren	47
3.3.3	Präparative Plasmidpräparation zur Transfektion eukaryontischer Zellen	48
3.3.4	Plasmidpräparation zur Sequenzierung	49
3.3.5	RNA Präparation	49
3.3.6	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	50
3.3.7	Agarose-Gelelektrophorese	50
3.3.8	DNA-Größenstandards	51
3.3.9	Amplifikation von DNA (PCR)	52
3.3.10	Sequenzspezifische Mutagenese mit Hilfe der PCR	53
3.3.11	Amplifikation von RNA (RT-PCR)	53
3.3.12	Automatisierte DNA - Sequenzierung	54
3.4	<i>Kultivierung von eukaryontischen Zellen</i>	54
3.4.1	Sterilisation	54
3.4.2	Medium für Zellkulturen	55
3.4.3	Kulturbedingungen	55
3.4.4	Trypsinierung von adherenten Zellen	55
3.4.5	Vitalitätsfärbung von Zellen und Zelldichtebestimmung	56
3.4.6	Kryokonservierung von Zellen	56
3.4.6.1	Anlegen von Stammkulturen	56
3.4.6.2	Auftauen von Stammkulturen	56
3.4.7	Transfektion eukaryontischer Zellen mit Plasmiden	57
3.4.8	Lysieren von Zellen für eine Luciferasemessung	58
3.4.9	Überprüfung von Zellkulturen auf Kontamination mit Mykoplasmen	58
3.5	<i>Proteinchemische Methoden</i>	59
3.5.1	Direkte Konzentrationsbestimmung von Proteinen	59
3.5.2	Proteinbestimmung nach Bradford	59
3.5.3	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen und Peptiden	60
3.5.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	60
3.5.3.2	Nachweis von in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen	61
3.5.3.3	Protein-Größenstandards	63
3.6	<i>Methode zur Charakterisierung von Zellproteinen</i>	63
3.6.1	Zellyse	63
3.6.1.1	Gesamtzellysate für die SDS-Gelelektrophorese	63
3.6.1.2	Kernextrakte	64
3.6.1.3	Zellysate zur Immunpräzipitation	66
3.6.2	Immunpräzipitation	67
3.6.3	Western Blot	67
3.6.4	Amidoschwarz Anfärbung	68
3.6.5	Immunanfärbung und Detektion	68
3.6.5.1	Luminoldetektion	69
3.6.6	Ablösen der Detektionsantikörper von Nitrocellulose-membranen	69
3.7	<i>Magnetkügelchen/Magnetobeads</i>	70

3.7.1	Herstellung von biotinylierten Promotorfragmenten zur Kopplung an Magnetobeads	70
3.7.2	Kopplung von Biotin-Oligos an Streptavidinmagnetkügelchen	71
3.7.3	Isolierung von Transkriptionsfaktoren mit Oligo-Magnetkügelchen	72
4	Ergebnisse	74
4.1	<i>Regulierung des Eotaxin-1- Promotors</i>	74
4.1.1	Stat-6 und NFκB-p50 binden an den Eotaxin-1-Promotor	75
4.1.2	Eotaxin-1-Promotor Reporter-Gen-Analysen	76
4.1.3	Interleukin-4 und TNF-α aktivieren den Eotaxin-1-Promotor in A549 Zellen	76
4.1.4	IL-13 und TNF-α aktivieren den Eotaxin-1-Promotor in A549 Zellen	78
4.1.5	IL-4 und TNF-α aktivieren den Eotaxin-1-Promotor in dermalen Fibroblasten	79
4.1.6	Mutagenese der Konsensussequenzen	80
4.1.6.1	Mutagenese der Konsensus-Sequenzen zerstört den Eotaxin-1-Promotor	81
4.2	<i>Regulierung des MCP-4- Promotors</i>	85
4.2.1	MCP-4-Promotor Reporter-Gen-Analysen	85
4.2.2	Interferon-γ aktiviert den MCP-4-Promotor in A549 Zellen	86
4.2.3	IL-4 aktiviert den MCP-4-Promotor in A549 Zellen nicht	87
4.3	<i>Hemmung von Stat6</i>	88
4.4	<i>Internalisierung von AP/Stat6BP</i>	89
4.5	<i>Hemmung der Stat6 Phosphorylierung</i>	90
4.6	<i>Hemmung der Transkription</i>	92
4.6.1	AP/Stat6BP hemmt einen Stat6-regulierten Promotor	92
4.6.2	AP/Stat6BP hemmt die Basalexpression eines Stat6-regulierten Promoters	93
4.7	<i>Stat6 und der Glucocorticoid-Rezeptor</i>	95
4.7.1	Dexamethason hemmt Stat6 vermittelte Transkription in Ba/F3-4Rγ-5xGAS	95
4.7.2	Einfluß von Dexamethason auf transient transfizierte Stat6 regulierte Promotoren	96
4.7.3	Der Einfluß von Dexamethason auf die Stat6/DNA-Bindung	98
4.8	<i>Stat6/DNA-Wechselwirkung</i>	100
4.8.1	Bestimmung der optimalen Salzkonzentration	101
4.8.2	Stat6Renilla bindet an das Ie-Promoter-Fragment	103
4.8.3	Untersuchung verschiedener Stat6-regulierter Promotoren	104
4.8.4	Stat6-Bindung an verschiedenen Promotoren	105
4.8.5	Proteinfärbung der Eluate	106
4.9	<i>Regulierung des Mucin-2-Promotors</i>	108
4.9.1	Isolierung eines Enhancer-Elementes aus dem Mucin-2-Promotor	109
4.9.2	Klonierung des Fragmentes in Reporter-Genvektoren	109
5	Diskussion	111
5.1	<i>Eotaxin-1-Promotor</i>	111
5.2	<i>Hemmung von Stat6</i>	120
5.3	<i>Stat6 und der Glucocorticoidrezeptor</i>	125

5.4	<i>Stat6/DNA-Wechselwirkung</i>	128
5.5	<i>Regulierung des Mucin-2-Promotors</i>	132
6	Zusammenfassung	135
7	Literaturverzeichnis	137
8	Anhang	167
8.1	<i>Schriftenverzeichnis</i>	167
8.2	<i>Danksagung</i>	169
8.3	<i>Lebenslauf</i>	170
8.4	<i>Erklärung</i>	171

1 Einleitung

Für viele Immunantworten hat sich in den letzten Jahren eine Klassifizierung in zwei Typen als sinnvoll erwiesen. Man unterscheidet dabei zwischen zwei exklusiv auftretenden T-Helferzellen, Th1 und Th2, die an Hand ihres Cytokin-Expressionsmusters definiert wurden. Es stellte sich heraus, daß für die Ausbildung des Th1-Typs die Stat4- und für die des Th2-Typs die Stat6-Aktivierung im Zellinnern ein entscheidendes Merkmal ist. Die Stat6-abhängige Th2 Immunantwort vermittelt zentrale Wirkungen von IL-4 und IL-13, die in der Pathologie atopischer Erkrankungen, wie Allergie, Asthma und atopischer Dermatitis, eine Rolle spielen. Dabei ist Stat6 nicht nur ein Schlüsselfaktor für die Entscheidung in welche der beiden Richtungen sich die T-Helfer-Zellen entwickeln, sondern reguliert auch, im Gegensatz zu Stat4 bei der Th1-Antwort, eine Vielzahl von nachgeordneten aber symptomatisch-pathologisch wichtigen Effekten.

In dieser Arbeit sollte mehr über die Funktion und das Verhalten von Stat6 herausgefunden, Techniken zur Untersuchung dieses Sachverhaltes etabliert, und auch nach Wegen, das Verhalten von Stat6 zu beeinflussen, gesucht werden.

1.1 Allergische Erkrankungen

Die allergischen Erkrankungen Asthma, Heuschnupfen und atopische Dermatitis gehören zu den atopischen Erkrankungen. Atopische Erkrankungen werden durch einen erhöhten IgE-Spiegel im Serum definiert. Seit 1967 Johansen in Schweden und Ishizakas in den Vereinigten Staaten unabhängig voneinander den IgE-Antikörpertyp entdeckten, sind große Fortschritte im Verständnis der zellulären und molekularen Mechanismen von atopischen Erkrankungen gemacht worden. Gleichzeitig mit dieser Entwicklung ist eine ständige Zunahme des Auftretens dieser Erkrankungen weltweit zu verzeichnen, die gerade im Rahmen von zwei großen epidemiologischen Studien (European Community Respiratory Health Survey [1, 2], ISAAC-Studie [3-5]) untersucht wurde.

Allergische Erkrankungen, wie das allergische Kontaktekzem, verlaufen ohne eine Erhöhung des IgE-Spiegel und reagieren mit anderen spezifischen Komponenten des Immunsystems.

Im Zentrum der Entscheidung, ob der Körper ein fremdes Protein als Allergen erkennt und dementsprechend darauf reagiert, steht die Richtung, in die die $CD4^+$ -T-Helfer-Zellen polarisiert werden. Ein Allergen, das in den Körper gelangt ist, sei es durch einen Insektenstich in die Haut oder durch Einatmen über die Schleimhautoberflächen der Lunge, wird von Antigen-präsentierenden-Zellen (antigen presenting cells, APCs), wie dendritischen Zellen oder Makrophagen, aufgenommen und in die Lymphorgane transportiert. Dort, im allgemeinen in Lymphknoten oder der Milz, werden einzelne Peptide, in die das Allergen zerlegt wurde, von den APCs auf MHC-II-Komplexen der zellulären Umgebung präsentiert. Mit den auf MHC-II-Komplexen präsentierten Peptiden wechselwirken $CD4^+$ -T-Helfer-Zellen, die zu den T-Lymphocyten gehören.

T-Lymphocyten entstehen aus Abkömmlingen von Zellen im Knochenmark, die in den Thymus wandern. Im Thymus können sie zu mehreren Typen differenzieren. Linien, deren Rezeptoren mit MHC-II-Rezeptoren wechselwirken, werden zu Helferzellen und Linien, die mit MHC-I-Rezeptoren wechselwirken, werden zu Killerzellen. Außerdem werden im Thymus Zellen aussortiert, deren T-Zell-Rezeptoren auf körpereigene Antigene reagieren. So steht der Immunabwehr eine Vielzahl von $CD4^+$ -Zellen zur Verfügung, wovon jede auf ein spezifisches, aber noch unbekanntes Antigen, reagieren kann. Diese Zellen halten sich vorrangig im lymphatischen System auf. [6]

Auf die $CD4^+$ -T-Helfer-Zellen, denen in der Organisation und Koordinierung der Immunantwort eine besondere Rolle zukommt, soll im folgenden näher eingegangen werden.

1.2 Th1 und Th2

Die meisten Immunantworten, die durch $CD4^+$ -T-Zellen gesteuert werden, können nach den mit ihnen verknüpften Immunreaktionen in zwei polarisierte Typen unterschieden werden. Man kann den einen Typ in erster Näherung als zellvermittelte Immunantwort und den anderen als Antikörper-vermittelte oder

humorale Immunantwort bezeichnen. Die zellvermittelte Immunantwort ist durch Makrophagen, cytotoxische T-Zellen, Produktion von opsonierenden und Komplement aktivierenden Antikörpern, sowie eine von Phagozyten dominierten Entzündungsreaktion gekennzeichnet [7]. Bei der humoralen Immunantwort ist im Gegensatz dazu eine Inhibierung der Phagozyten zu beobachten, eine starke Antikörper-Antwort, wobei IgE-Antikörper eingeschlossen sind, sowie eine Differenzierung und Aktivierung von Eosinophilen [7]. Für den Verlauf einer Erkrankung kann die Wahl mit welcher Antwort der Körper reagiert von entscheidender Bedeutung sein. Betrachtet man zum Beispiel den Verlauf von Lepra, einer durch *Mycobacterium leprae* verursachten Infektionskrankheit der Haut, so bedeutet die Entscheidung für die zellvermittelte Immunantwort die Ausprägung einer abheilenden tuberkuloiden Form, wohingegen die Entscheidung für die antikörpervermittelte Immunantwort zur unkontrollierten Form mit schweren Verstümmelungen führt [8].

Man fand heraus, daß diese Immunantworten auf zwei unterschiedliche Typen CD4⁺-Zellen zurückzuführen sind. Die Existenz von den Th1 und Th2 genannten Zellen wurde zuerst von Tim R. Mosmann in der Maus [9] und später von Sergio Romagnani im Menschen [10] gezeigt. Diese unterschiedlichen Zelltypen wurden durch das Repertoire an Cytokinen definiert, das sie sezernieren.

Cytokine sind kleine sezernierte Glykoproteine, die der Informationsvermittlung zwischen Zellen dienen. Sie wirken meist lokal, können aber auch systemisch agieren. Zu den Cytokinen rechnet man neben den Interleukinen (IL) auch Interferone (IFN), Wachstumsfaktoren, Chemokine, Kolonie-stimulierende-Faktoren (CSF) und Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF). Diese Proteine sind zwar von ihrer Struktur her unterschiedlich, werden aber wegen ihrer vergleichbaren physiologischen Wirkungen zusammengefaßt. Als Th1-Zellen bezeichnet man heute CD4⁺-T-Zellen, die IFN- γ , IL-2 und TNF- β sezernieren (Abb.1), während man man CD4⁺-T-Zellen, die IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13 sezernieren, als Th2-Zellen bezeichnet (Abb.2) [7].

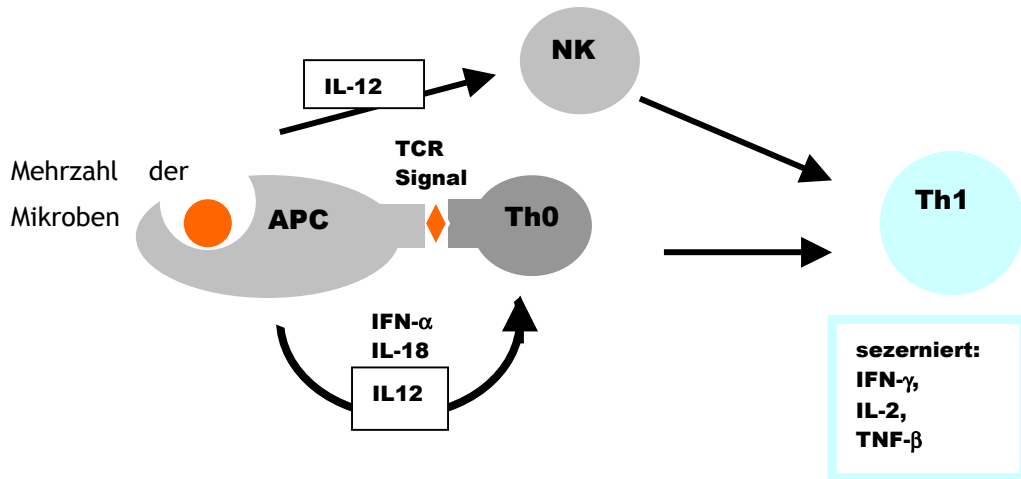


Abb.1 Polarisierung zu Th1-Zellen und beteiligte Cytokine. Definitionen: APC = Antigen-Präsentierende-Zelle, TCR = T-Zell-Rezeptor, NK = Natürliche Killerzelle. Weitere Erläuterungen im Text.

Die Polarisierung zur Th1 oder Th2-Zelle findet zusammen mit der Aktivierung in den lymphatischen Organen statt. Eine aktivierte APC präsentiert auf dem MHC-II Komplex einer naiven sogenannten Th0-Zelle ein Antigen. Passt dieses Antigen zum T-Zellrezeptor (T cell receptor; TCR) wird diese T-Zelle aktiviert. Welcher Th-Typ sich ausbildet, ist offensichtlich von mehreren Faktoren abhängig. Die Interpretationen gehen von einer Vielzahl von Umwelteinflüssen und genetischen Faktoren aus, die bei der Antigenpräsentation zum Tragen kommen. Umweltfaktoren sind die Art, wie das Antigen aufgenommen oder appliziert wurde, die physikalische Form und auch die Dosis des Immunogens.

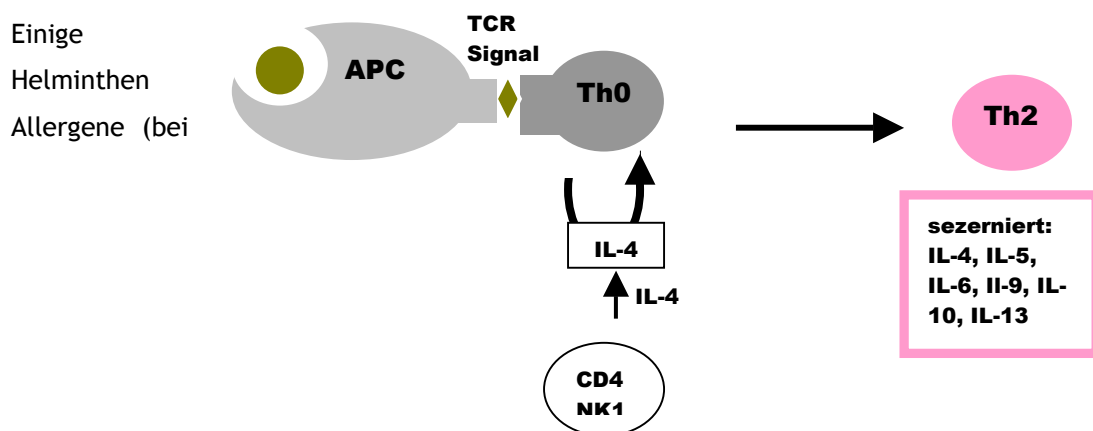


Abb.2 Polarisierung zu Th2-Zellen und beteiligte Cytokine. Definitionen: APC = Antigen-Präsentierende-Zelle, TCR = T-Zell-Rezeptor, NK = Natürliche Killerzelle. Weitere Erläuterungen im Text.

Klassische Th1 auslösende Immunogene sind die meisten Mikroben, wie zum Beispiel *Listeria*. Th2-Immunogene sind Helminthen (Würmer) und unter bestimmten Umständen, Allergene.

Die genetischen Faktoren wirken auf verschiedene an der Entstehung des Phänotyps beteiligte Komponenten. Wichtig ist die Gruppe von Rezeptoren, die die Interaktion APC-CD4⁺-Zelle herstellt, wie zum Beispiel der T-Zell-Rezeptor und auch Corezeptoren.

Corezeptoren der APC, wie B7-1(CD80) und B7-2(CD86), wechselwirken mit entsprechenden Rezeptoren der T-Zelle, wie CD28. Eine die Th2-Polarisierung unterstützende Wechselwirkung ist zum Beispiel die Interaktion von B7-2 und CD28 [11].

Der zweite wichtige durch den Genotyp beeinflusste und für die Spezifität der Polarisierung maßgebliche Einfluß ist das Vorherrschen bestimmter Cytokine bei der Antigenpräsentation.

Th1-Zellen entstehen erstens bei IL-12 Stimulation, zweitens bei IL-18 oder IFN- α -Stimulation und drittens bei TCR-Ligation und Abwesenheit früher IL-4-Stimulation [12-14]. *In vivo* werden IL-12, IFN- α und IL-18 durch die APC bereitgestellt. Es ist erwähnenswert, daß durch IL-12 auch NK-Zellen aktiviert werden, die wiederum die Wirkung der von der APC ausgeschütteten Cytokine durch Ausschüttung von IFN- γ unterstützen.

Th2-Zellen entstehen durch IL-4 Stimulierung. IL-4 kann in geringen Mengen durch die Th-Zelle selbst sezerniert werden, wenn der Rezeptor CD28 entsprechend stimuliert wurde. In einem autokrinen Mechanismus steigert sich diese IL-4 Synthese dann. Eine weitere Quelle für IL-4 stellen CD4⁺NK.1.1⁺-Zellen dar [15]. Neue Ergebnisse, zeigen, daß es auch eine IL-4 unabhängige Polarisierung in Richtung Th2 gibt, die durch entsprechende DC2 genannte dendritische Zellen als APC möglich ist [16, 17]. Andere IL-4 sezernierenden Zellen, wie Mastzellen [18] und Basophile [19], spielen für die Polarisierung wahrscheinlich keine Rolle, da für die meisten Antigene eine Fc ϵ R-unabhängige IL-4 Produktion nicht gezeigt wurde [7].

Auffällig bei der Betrachtung der T-Helfer-Differenzierung ist, daß im Mittelpunkt der Signalübertragung zwei Stat-Moleküle stehen, die nahezu exklusiv von diesen Signalwegen verwendet werden. Stats, oder Signal Transducers and Activators of Transcription sind Transkriptionsfaktoren, die durch verschiedene Cytokine

aktiviert werden. In der sieben Mitglieder starken Protein-Familie wird nur Stat4 exklusiv durch IL-12 und IFN- α und Stat6 exklusiv durch IL-4 und IL-13 aktiviert. Auf die genaueren Zusammenhänge und die Stat-Proteine wird später eingegangen werden.

Die Polarisierung von CD4⁺-Zellkulturen in eine der beiden Richtungen ist mittlerweile ein etabliertes Verfahren. Es existieren auch murine Zelllinien, die in eine der Richtungen polarisiert sind. Ein Beispiel für eine Th1-Linie ist AE7 und ein Beispiel für eine Th2-Linie ist D10.G4 [20].

Es stellte sich die Frage, ob eine Re- oder Umpolarisierung der Th1/2-Zellen möglich ist. In Zellkulturexperimenten fand man heraus, dass das nur in frühen Kulturen der Fall ist. Nach wiederholter Stimulierung sind sowohl Th1- als auch Th2-Zellen irreversibel polarisiert. Mittlerweile sind mehrere Komponenten der irreversiblen Polarisierung gefunden worden, die sich in den Signalwegen unterhalb von Stat6 und Stat4 befinden. In Th2-Zellen werden durch IL-4 die Transkriptionsfaktoren GATA-3 [21] und c-Maf [22] aktiviert, die die Th2-Polarisierung fördern, aber auch die Th1-Polarisierung aktiv inhibieren. Bei GATA-3 kann die Th1-hindernde Wirkung auf die Inhibierung der Expression des IL-12 β 2-Rezeptors zurückgeführt werden [21]. Die Sezernierung von IL-10 ist ein weiterer Weg über den Th2-Zellen die IL-12 Produktion hemmen [23]. In Th1-Zellen unterdrückt der IL-12-Signalweg GATA-3 und auf diesem Weg die Th2-Polarisierung [21].

1.3 Interleukin-4

Dem Cytokin Interleukin-4 kommt als wichtigstem Cytokin bei der Polarisierung von T-Helfer-Zellen zu Th2-Zellen und, wie später erläutert wird, auch als wichtigem regulatorischen Cytokin von Effektorfunktionen eine Sonderstellung bei der Erläuterung von physiologischen Vorgängen der Allergieentstehung zu.

Das humane IL-4 besitzt ein vom Glykosylierungsgrad abhängiges Molekulargewicht von 15-20 kD. Dabei handelt es sich um ein monomeres Molekül, das aus 129 AS besteht. [24]

Seine dreidimensionale Struktur ist sowohl durch Röntgenstrukturanalyse [25, 26] als auch durch NMR-Spektroskopie [27-29] aufgeklärt worden.

Es gehört zu einer Familie von Cytokinen mit einer konservierten Typ II-Vier-Helix-Bündel-Struktur [30], die auch als Hämatopoietin-Familie [31] bezeichnet wird. Die Topologie von hIL-4 ist durch vier antiparallele α -Helices gekennzeichnet, die durch eine kurze und zwei lange Schleifen (sog. *overhand loops*) zu einer up-up-down-down Konnektivität verbunden sind. Aus Segmenten der die Helices A und B bzw. C und D verbindenden Schleifen wird außerdem noch ein zweisträngiges β -Faltblatt gebildet. Zusammen mit den Interleukinen 2, 3, 5, 7, 9, 13 und 15 und GM-CSF gehört IL-4 zu den kurzkettigen Vier-Helix-Bündel-Cytokinen. Langkettige Vier-Helix-Bündel-Cytokine wie Wachstumshormon (GH), Prolactin (PRL), Erythropoietin (Epo), G-CSF oder IL-6 können neben größeren α -Helices zusätzliche Helices in den Verbindungsschleifen aufweisen, sie besitzen jedoch keine β -Faltblatt Strukturen [32].

1.4 Interleukin-4-Rezeptor- α

IL-4 bindet in nahezu allen getesteten Zellen über hochaffine Rezeptoren, die in niedriger Zahl (wenige Hundert bis wenige Tausend) exprimiert werden [33, 34]. Bei der Aktivierung von $CD4^+$ -T-Zellen durch IL-4 bindet IL-4 zuerst an den IL-4 Rezeptor α (IL-4R α) und dieser dimere Komplex rekrutiert dann die common γ Kette (γ_c) [35, 36]. Dieser Rezeptorkomplex aus IL-4R α und γ_c wird Typ-1-IL-4-Rezeptor genannt. Der Typ-2-IL-4 Rezeptor, von dem später noch die Rede sein wird, kann von T-Zellen nicht gebildet werden, da die hier an Stelle der γ_c rekrutierte IL13R α 1-Kette nicht exprimiert wird [37, 38]. Unter stark artifiziellen Bedingungen gelang es eine IL-4 Signaltransduktion durch Homodimerisierung der IL-4R α herbeizuführen [39-42]. Dieses Phänomen scheint jedoch keine physiologische Bedeutung zu haben [43].

Die α -Kette gehört zur Klasse-I-Cytokinrezeptor Superfamilie (CRSF), die konservierte Sequenzbereiche (cytokin receptor homology (CRH) region) in ihren extrazellulären Domänen aufweisen [44, 45]. Die ca. 200 AS umfassende CRH ist für die Ligandenbindung der Rezeptoren verantwortlich und zeichnet sich durch zwei jeweils 90 Aminosäuren lange Fibronectin-III ähnliche Domänen aus, die aus jeweils sieben antiparallelen β -Faltblattsträngen bestehen. Weitere

Charakteristika der Typ-I-Cytokinrezeptoren sind vier konservierte Cysteinreste in der membrandistalen Hälfte, die durch Disulfidbrücken die dreidimensionale Struktur stabilisieren sowie ein hochkonserviertes WSXWS-Motiv nahe der hydrophoben Transmembranregion [44]. Der endgültige Beweis dafür, daß auch die IL-4 Rezeptor α -Kette zu den Typ-I-Cytokinrezeptoren gehört konnte erstmals durch die Röntgenstrukturanalyse eines 1 : 1 Komplexes aus der Ektodomäne der IL-4 R α -Kette und IL-4 eindeutig belegt (Abb. 3) [46].

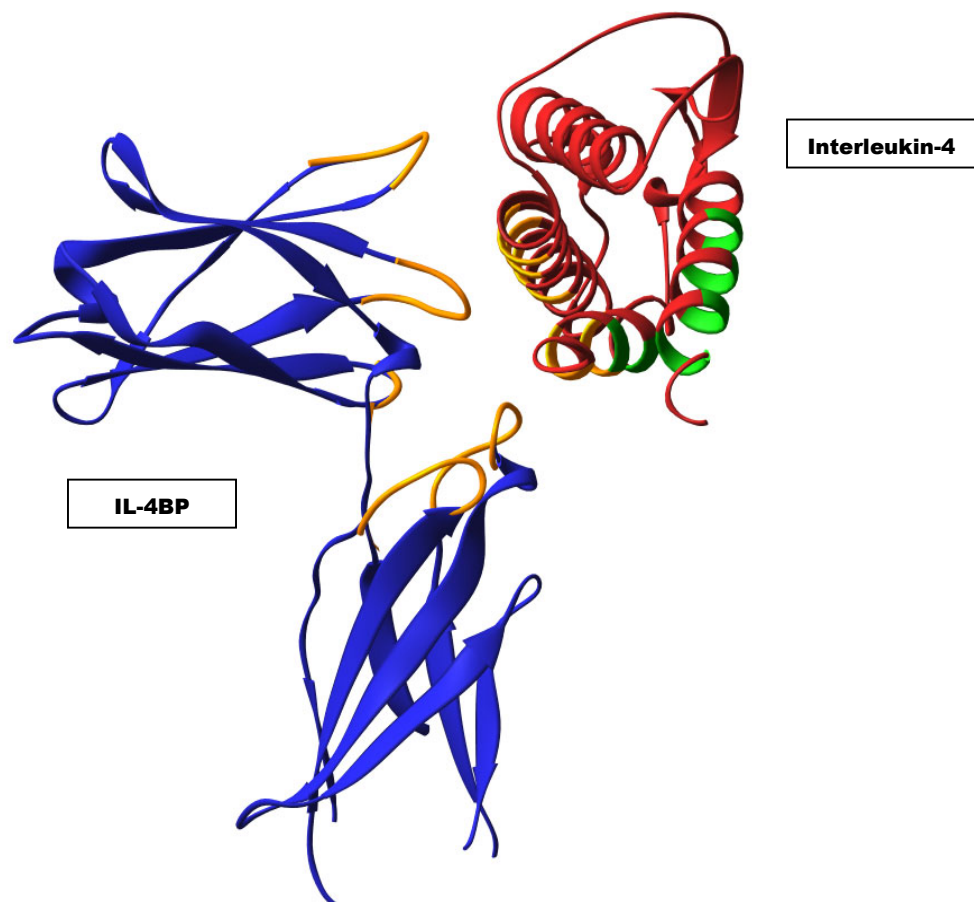


Abb. 3 Strukturmodell eines 1:1 Komplexes des extrazellulären Anteils der IL-4R- Kette(IL-4BP) und IL-4 [46]. Die Rezeptorbindungsepitope von IL-4 sind farblich hervorgehoben: hochaffines Bindungsepitop (site 1) zur Bindung an IL-4R α (orange); niederaffines Bindungsepitop (site 2) zur Bindung der γ_c (grün) Die Abbildung ist [46] entnommen.

Die Struktur des gebundenen IL-4 ist der des nicht gebundenen sehr ähnlich, zeigt jedoch eine leicht geänderte Konformation der Helices von IL-4. Die deutlichsten Strukturänderungen finden sich im Bereich des funktionellen Bindeepitops von γ_c [46].

Die eng verwandten Klasse-II-Rezeptoren weisen ein CRH mit vier unterschiedlichen konservierten Cysteinen, aber kein WSXWS-Motiv auf.

Die cytoplasmatischen Anteile von Proteinen der Cytokinrezeptor-Superfamilie unterscheiden sich sowohl in ihrer Länge als in ihrer Sequenz teilweise beträchtlich, so ist z.B. der cytoplasmatische Anteil der IL-4R α 569 AS lang, der des IL-13R α 2 nur 18 AS. Für einige konservierte cytoplasmatische Bereiche konnte eine Rolle bei der Bindung signalvermittelnder Proteine gezeigt werden [47]. So finden sich bei vielen Typ I Cytokinrezeptoren in Membrannähe prolinreiche und saure Sequenzmotive, die als box 1- und box 2-Motive bezeichnet werden [48, 49].

Der dimere Komplex aus IL-4 und IL-4R α hat eine Dissoziationskonstante von etwa 100 pM, dessen hohe Affinität das Resultat einer schnellen Assoziation ($k_a = 1-2 \times 10^7$) und einer sehr langsamen Dissoziation ($k_d = 2 \times 10^{-3}$) [50, 51] ist.

1.4.1 Der IL-4 Rezeptor aus IL-4R α und γ_c (Typ-1-Rezeptor)

Die Wechselwirkung von IL-4 mit der Rezeptor- α -Kette ist wie oben beschrieben gut verstanden. Sowohl das strukturelle als auch das funktionelle Epitop sind charakterisiert. Weniger klar ist die Wechselwirkung mit der zweiten Kette. IL-4 bindet in Konzentrationen bis 100 nM nicht messbar an γ_c (oder IL-13R α 1). Da IL-4R α bei diesen Konzentrationen bereits gesättigt ist, werden γ_c und IL-13R α 1 als niederaffine Bindungspartner bezeichnet. Den Typ-1-IL-4-Rezeptor aus IL-4R α und γ_c findet man besonders auf T- und B-Lymphocyten, sowie auf Monocyten [52].

Die γ_c -Kette gehört wie die IL-4R α zur Hämatopoietin Rezeptor-Superfamilie und ist neben dem IL-2- und dem IL-4-Rezeptor noch Bestandteil weiterer Cytokin-Rezeptor-Komplexe (IL-7R, IL-9R und IL-15R) [53]. Sie wird deshalb als *common gamma* Untereinheit bezeichnet. Die weite Verwendung der γ_c , deren Gen auf dem X-Chromosom liegt, erklärt auch die X-SCID Immunerkrankung, die auf einer genetische Änderung dieses Gens beruht [53].

Die γ_c -Ektodomäne bindet an den dimeren Komplex mit einer Affinitätskonstante von $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, wobei durch die Bindung IL-4/IL-4R α die Affinität von γ_c gegenüber IL-4 um den Faktor 50 erhöht wird [50]. Das erklärt man sich durch die kleine Konformationsänderung von IL-4 im dimeren Komplex mit IL-4R α . Die

Dissoziationskonstante von 3×10^{-6} M für die Dissoziation aus dem ternären Komplex liegt weit oberhalb der physiologischen Konzentrationen [50]. Dass IL-4 trotzdem physiologisch aktiv ist, führt man auf cytoplasmatische und transmembrane Wechselwirkungen und Membranefekte zurück. Auf Membranen ist die Beweglichkeit auf zwei Dimensionen und möglicherweise durch „Raft“-bildung zusätzlich beschränkt und so die Wahrscheinlichkeit einer signalauslösenden Kollision erhöht [50].

1.4.2 Der IL-4 Rezeptor aus IL-4R α und IL-13 α 1 (Typ-2-Rezeptor)

Neben Zellen, die γ_c funktionsfähig exprimieren, wie B- und T-Lymphozyten, reagieren auch andere Zellen, wie Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen [54-57] oder Zellen von X-SCID Patienten [58] auf IL-4.

Für diesen Weg der Signalübertragung wurde das 406 Aminosäuren lange und 75 kDa schwere IL-13 α 1 als alternative Rezeptorkomponente identifiziert [37, 55, 59-63]. Dieser Komplex wird Typ 2 IL-4 Rezeptor genannt. In nicht hämatopoietischen Zellen ist IL-13R α 1 wahrscheinlich die bevorzugte akzessorische Rezeptoruntereinheit bei der IL-4 Signaltransduktion [64].

1.5 Interleukin-13

Nicht nur IL-4 nutzt den Typ-2-IL-4-Rezeptor zur Signaltransduktion. Auch das wie IL-4 zur Hematopoietin-Strukturfamilie gehörende IL-13 ist dazu in der Lage. Es zeigte sich, daß IL-13, zwar nicht in der T-Helfer-Zell-Polarisierung IL-4 ersetzen kann, in der Aktivierung von Effektorzellen, die unten detailliert erörtert werden, die Wirkungen von IL-4 aber ersetzen kann oder dort sogar das wichtigere Cytokin ist.

Im Gegensatz zu IL-4 rekrutiert IL-13 zuerst IL-13R α 1. IL-13R α 1 bindet IL-13 spezifisch mit einer schwachen Affinität ($K_d = 2-10$ nM), die sich allerdings bei Coexpression mit IL-4R α deutlich erhöht ($K_d = 400$ pM) [60]. Möglicherweise existiert eine weiterer IL-13-Rezeptortyp aus zwei IL-13R α Ketten, wie Daten aus renalen Carcinoma Zelllinien nahelegen [65]. Gegen diese Vermutung spricht allerdings, dass Mäuse ohne IL-4R α -Kette keine IL-13 Aktivität besitzen.

Neben IL-13R α 1 und IL4R α , die auch für die IL-4 Signaltransduktion wichtig sind, bindet IL-13 einen weiteren Rezeptor, ein 354 Aminosäuren langes 70 kD schweres Membranprotein IL13R α 2 [66]. Im Gegensatz zu IL-4 bindet IL-13 IL-13R α 2 mit hoher Affinität ($K_d = 250$ pM), die durch Coexpression von IL-4R α nicht erhöht wird. Die Expression dieser Proteine ist auf IL-13 responsive Zellen beschränkt und wurde in der T-Zelllinie Jurkat nicht detektiert [63, 66].

1.6 Signaltransduktion des IL-4 Rezeptorkomplexes

Wachstumsfaktoren und Cytokine verursachen durch Dimerisierung oder Oligomerisierung von Rezeptoren auf der Zelloberfläche die Aktivierung einer Vielzahl von Signalwegen im Zellinnern. Auf diesem Weg werden komplexe Phänomene wie Zellwachstum, Differenzierung, Migration und Apoptose initiiert, reguliert und auch terminiert. Im Gegensatz zu verschiedenen Wachstumsfaktoren besitzen Cytokinrezeptoren selbst keine enzymatische Aktivität und die Signalübertragung wird durch die Rekrutierung cytoplasmatischer Enzyme vermittelt [31].

IL-4, wie auch IL-13, induzieren die Tyrosin-Phosphorylierung verschiedener Proteine, miteingeschlossen IL-4R α und Moleküle mit den Molekulargewichten 170, 130, 110-120, 100 und 92 kDa [57, 67, 68]. Eine schematische Darstellung des Typ-1-IL-4-Rezeptors und seiner Signalmoleküle zeigt Abb. 4.

1.6.1 Janus-Kinasen

Die wichtigsten an die IL-4 Rezeptorketten assoziierten Kinasen sind aus der Jak-Familie. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie sind zentraler Bestandteil bei der Initiierung der Signalwege der hematopoietischen Rezeptoren [69]. Die vier Vertreter der Jak-Kinasen (Janus Kinasen) (Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2) besitzen eine charakteristische strukturelle Organisation aus 7 JH- (Jak homology) Domänen. Die C-terminale JH1-Domäne hat Kinaseaktivität, die JH2-Domäne ist eine Pseudokinasedomäne. Zusätzlich findet sich in der Mitte eine konservierte DNA-bindende Region, während die Funktionen der weiteren fünf (JH3 bis zur N-terminalen JH7) noch nicht genau aufgeklärt sind. Im Gegensatz zu vielen

anderen cytoplasmatischen Kinasen verfügen die Jaks weder über SH2- oder SH3- (Prolin-bindende) noch über PTB- (Phosphotyrosin-bindende) oder Lipid-bindende PH- (plekstrin homology) Domänen. [69-71]

In den meisten hematopoietischen Zellen kann man nach Stimulierung mit IL-4 die Phosphorylierung und Aktivierung von Jak-1 (130 kDa) [72] und Jak-3 (120 kDa) [73] messen. Jak-1 ist mit der IL-4R α -Kette [72] assoziiert und Jak-3 mit γ_c [74]. In nicht-hematopoietischen Zellen wurde IL-4 abhängig keine Phosphorylierung von Jak-3, aber von Jak-1, Jak-2 und TYK-2 [64, 75] detektiert. Wie IL-4 induziert IL-13 die Tyrosin Phosphorylierung von Jak1, aber im Gegensatz zu IL-4 nicht von Jak-3 in hematopoietischen Zellen [76, 77]. In nicht-hematopoietischen Zellen phosphorylieren IL-13 und IL-4 ohne Beteiligung von γ_c Jak-2 und in geringerem Umfang Tyk-2 [78, 79]. Es ist zu erwarten, dass auf diesen Zellen der Typ II Rezeptor für das Signal verantwortlich und Jak-2 die assoziierte Tyrosin-Kinase ist. In EBV-immortalisierten B-Zellen erhöht IL-4 die Phosphorylierung von Jak-1, Jak-3 und Tyk-2, während IL-13 nur Tyk-2 phosphoryliert [64].

1.6.2 Der IRS-1/2-Signalweg

Das größte an die IL-4R α -Kette gebundene und IL-4 [72, 80] und IL-13 [68, 77, 81] abhängig phosphorylierte Protein ist das 170 kDa schwere IRS-2. Über Mutationsanalyse fand man heraus, dass Jak-1 für die Aktivierung ausreicht [75]. IRS-2 bindet an Tyr-497, das in einem I-4R -(Insulin IL-4-Rezeptor) Motiv liegt, das IL-4R α mit Insulin und IGF-1 Rezeptoren teilt [82].

Ursprünglich war IRS-2 als 4PS (IL-4-induced phosphotyrosine substrate) beschrieben worden [80], wurde aber nach seiner Klonierung aufgrund seiner Sequenzhomologie zu IRS-1, dem wichtigsten Phosphorylierungssubstrat des Insulinrezeptors, umbenannt [83]. Die Vermutung, daß die beiden IRS Proteine sich gegenseitig funktionell ersetzen können, scheint zumindest in einigen Zelltypen falsch zu sein, da IRS-2 knockout Mäuse unabhängig vom Vorhandensein von IRS-1 eine Typ 2 Diabetes entwickeln [84].

Nach der Phosphorylierung dient IRS-1 als cytosolisches Adapter-Protein, das die Anlagerung verschiedener über SH2-Domänen bindende Moleküle ermöglicht.

Im IL-4 Rezeptorsystem wurde die Anlagerung der heterodimeren p85/p110 Lipidkinase Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) nachgewiesen [67, 68, 85]. Durch

die Anlagerung erfolgt eine Konformationsänderung von p85 wodurch die katalytische Untereinheit p110 aktiviert wird. Nach Rekrutierung an die IL-4R α interagiert der PI-3-Kinasekomplex mit der FES Kinase [86].

Die aktivierte Untereinheit phosphoryliert Membranlipide und Ser/Thr-Reste von verschiedenen Proteinen [87, 88]. In B-Zellen wurde IL-4 [89] und in Monozyten IL-13-abhängig [90] ein Anstieg der Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP3)- und intrazellulären Ca²⁺-Ionenkonzentration, gefolgt von intrazellulärer cAMP Anreicherung über Adenylatcyclase, gemessen. Der IL-4 abhängige Signalweg konnte allerdings nicht in murinen B-Zellen gefunden werden [91]. Für eine Aktivierung in humanen Monocyten spricht auch eine IL-4 abhängige Umverteilung der Protein Kinase C (PKC) vom Cytosol in den Nucleus [92].

PI-3 Kinase ist positiv und negativ regulierend in eine Vielzahl von das Zellwachstum steuernde Signalwege involviert. [81, 93].

Für die Hypothese, das IL-4/IL-13 über diesen Signalweg das Zellwachstum reguliert und die Hemmung von Apoptose beeinflusst, spricht, dass durch die Hemmung der PI3K in verschiedenen hämatopoietischen Zelllinien die antiapoptotische Wirkung von IL-4 aufgehoben wird [94].

Allerdings scheinen auch IRS-2 unabhängige Signale zur Proliferation beizutragen, wie Experimente mit IL-4R Mutanten ohne Tyr-497 [82] mit Mutanten, denen der gesamte C-terminale Teil ab AS-Rest 432 fehlt [95], oder die Hemmung IL-4 induzierter Zellproliferation mit verkürzten Stat5-Mutanten zeigen [96].

Obwohl das Grb2/sos Adaptermodul IL-4/IL-13-abhängig vom PI-3-Komplex rekrutiert wird [81], konnte eine direkte IL-4 induzierte Aktivierung des ras-Signalweges und eine damit verbundene Stimulierung der Proliferation durch MAP-Kinasen bisher nur in wenigen Fällen gezeigt werden. In Keratinocyten nicht aber in T-Zellen wurde sowohl eine Phosphorylierung als auch Aktivierung von p42/44 MAP-Kinase und eine Phosphorylierung von Shc gemessen [97]. In einer anderen Arbeit wurde in B-Zellen nach IL-4-Stimulierung Shc-Aktivierung gemessen [98]. In Myoblasten konnte zwar die Shc-unabhängige Grb2/Sos Phosphorylierung, aber nicht die bei Insulin-abhängiger Stimulierung nachgewiesene Aktivierung von MAP-Kinasen, ERKs oder Ras beobachtet werden [99]. Als ein möglicher negativer Regulator des RAS/MAP-Kinase Signalweges wird das IL-4 induzierte Molekül FRIP (interleukin-4 Receptor interacting protein) diskutiert [43]. In vielen hämatopoietischen Zelllinien führt IL-4 Stimulierung dagegen zu keiner messbaren

Aktivierung des ras-Signalweges [68, 97, 100]. Dies läßt sich möglicherweise damit erklären, dass Phosphorylierung von IRS-2 und Assoziation mit Grb2/sos in bestimmten Zelltypen für die IL-4 induzierte Aktivierung von ras und der MAP-Kinasen nicht ausreicht, möglicherweise ist dafür die IL-4 unabhängige Aktivierung weiterer Signalmoleküle, z.B. Shc notwendig [43].

Neben der Phosphorylierung von Shc wurde auch die IL-4 abhängige Phosphorylierung des Adapterproteins Cbl, das mit p85 der PI-3-Kinase interagiert [101] und IL-4/IL-13 abhängig von Lsk, einer Tyrosinkinase, mit Homologie zum C-Terminus der src-Kinase gezeigt [102].

1.6.3 Phospho-Tyrosin-Phosphatasen

Im allgemeinen wird in Signalwegen, in denen Tyrosin-Phosphorylierung einen wichtigen Bestandteil der Signalübertragung darstellt, eine Kontrollfunktion von Phospho-Tyrosin-Phosphatasen ausgeübt. Die SH2-enthaltenden SHP-1 und SHP-2 sowie die SH2-enthaltende Inositol-5-Phosphatase (SHIP) wurden als solche kritische Modulatoren entdeckt [103].

SHP-1/2 binden an *immunoregulatory tyrosine based inhibitory* -Motive (ITIMS) mit ihrer SH2-Domäne. Am C-Terminus der IL-4R α -Kette befindet sich ein ITIM-ähnliches Motiv, an das eine Anlagerung von SHP-1 gezeigt wurde [104] und eine Rolle bei der IL-4/IL-13 abhängigen Signalübertragung spielt [105, 106]. Da SHP-1 wichtig für die Regulierung von Jak1 im IFN- α/β -Signalweg ist [107], könnte es diese Funktion auch im IL-4 Signalweg ausüben.

Während SHP-1/2 die Tyrosin-Phosphorylierung reguliert, scheint SHIP durch Dephosphorylierung von PtdIns(3, 4, 5)P₃ den PI3-Kinaseweg zu hemmen. Es wurde sowohl eine IL-4 abhängige Phosphorylierung von SHIP [108] als auch eine Anlagerung an das ITIM des IL-4R α gezeigt [43].

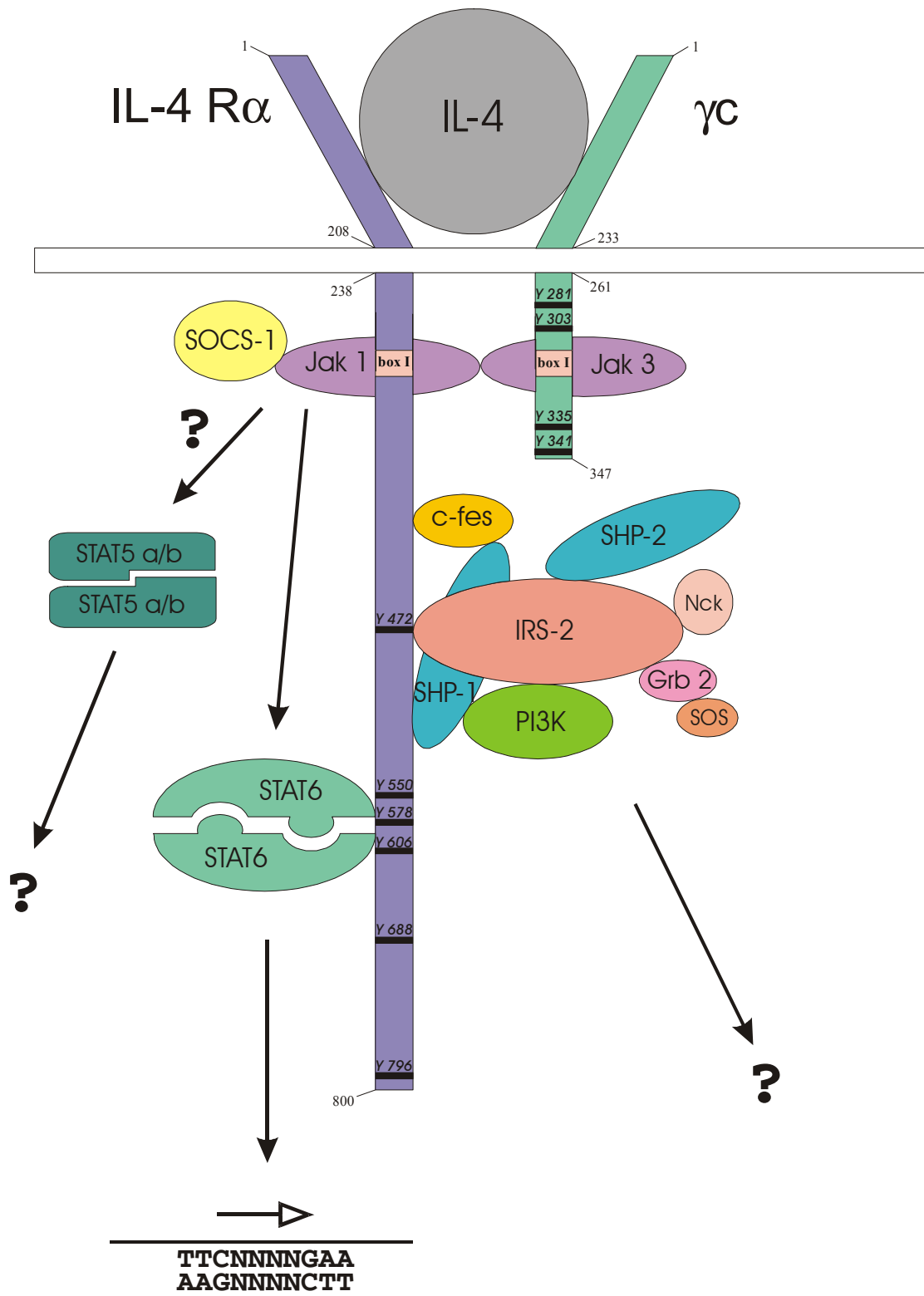


Abb. 4 Modell des aktivierten Typ-IL-4 Rezeptors mit den assoziierten Signalmolekülen.

1.6.4 Stat-Signalwege

Die einzige Signalkaskade im IL-4 System, deren Weiterleitung bis in den Zellkern verfolgt werden kann, ist der Jak/Stat6-Weg.

Nachdem die IL-4R α -Kette an den Resten Y550, Y578 und Y606 durch die Jak-Kinasen phosphoryliert wurde [109-111] assoziieren Stat6-Moleküle über ihre SH2-Domäne und werden anschließend an einem für die Kerntranslokation essentiellen Tyrosin-Rest Y641 phosphoryliert [112]. Diese Phosphorylierung verursacht die Bildung von dimeren Stat6-Komplexen, die in den Kern wandern. Werden Stat6-Moleküle artifiziell ohne Phosphorylierung dimerisiert, findet auch eine Translokation statt [113]. Neben der essentiellen Bedeutung der Tyrosinphosphorylierung scheint auch eine Ser Phosphorylierung eine Rolle zu spielen [114].

Im Kern bindet Stat6 an responsive-Elemente im Promoterbereich verschiedener Gene, die für unterschiedliche Funktionen verantwortlich sind. Ein Teil dieser Gene dient unter anderem der Autoregulation des eigenen Signalweges, in dem sie für Stat- oder Jak-Inhibitoren codieren.

Neben Stat6 wurde eine IL-4 abhängige Aktivierung von Stat5 [115] und eine IL13R α abhängige Aktivierung von Stat3 [116] gezeigt.

Da die Mechanismen der Signalübertragung bei allen Mitgliedern der Stat-Proteinfamilie sehr ähnlich verläuft, und der Vergleich und die Übertragung der Erkenntnisse für die Untersuchung einzelner Mitglieder sehr hilfreich ist, werden die Stats im folgenden detaillierter beschrieben.

1.6.5 Stat-Proteine

Die Familie der Stat-Proteine besteht in Säugern aus sieben Mitgliedern, deren Gene in drei chromosomalen Clustern lokalisiert sind [117]. Die ersten Stat-Proteine (Stat1 und Stat2) wurden bei der Untersuchung eines durch IFN- α und IFN- β induzierten Komplex, der an das ISRE (Interferon- α -stimulated-response-element) des Promotors [118] bindet, nachgewiesen.

Stat-Proteine sind die einzigen Transkriptionsfaktoren mit einer SH2-(src-Homologie-2)-Domäne [109].

SH2-Domänen sind für eine Vielzahl von Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich [119, 120]. Mit Ausnahme der Stat-Transkriptionsfaktoren handelt es sich bei diesen Proteinen allerdings um Enzyme, wie z.B. Src, Lck, Phosphatasen, oder um Adaptormoleküle, wie p85 der PI-3-Kinase, Shc und Grb2 [119].

Die Protein-Protein-Wechselwirkungen bestehen aus einer Phospho-Tyrosin-SH2-Bindung, die durch drei Komponenten gekennzeichnet ist. Erstens bildet das konservierte Grundmotiv GTFLLR, das in den meisten SH2-Domänen enthalten ist, eine eher polare Tasche, in die das Phosphotyrosin gebettet ist. Zweitens interagiert eine β -Faltblattstruktur mit den ersten beiden Aminosäuren direkt C-terminal nach dem Phospho-Tyrosin ($i + 1$ und $i + 2$). Drittens wird der $i + 3$ Rest durch eine zweite, mehr hydrophobe Tasche erkannt. [121]

Nachdem die Jak-Kinasen den Rezeptor Tyrosin-phosphoryliert haben, binden die Stat-Moleküle mit ihrer SH-2-Domäne an diese Tyrosine [122]. Anschließend werden sie an einem C-terminal liegenden Tyrosinrest phosphoryliert, der mit der SH2-Domäne eines zweiten Stats wechselwirkt. Von Stat1 und Stat2, sowie Stat1 und Stat3 sind Heterodimere bekannt, wohingegen von Stat4, Stat5a/b und Stat6, mit Ausnahme des Heterodimers Stat5a und Stat5b, bisher nur Homodimere gefunden wurden. Stat2 signalisiert nicht als Homodimer sondern in einem trimeren Komplex mit Stat1 und p48. In Abb. 5 sind die strukturellen Domänen der einzelnen Stats und der kritische Tyrosinrest (außer bei Stat4, wo er nicht bekannt ist) und Serin-Reste dargestellt. Die Aktivierung von Stat-Proteinen erfolgt, wie für Stat1 und Stat3 gezeigt werden konnte, nicht nur durch Tyrosinphosphorylierungen, sondern auch durch Serin-Phosphorylierung [123], die die Effizienz des Transkriptionskomplexes steigert [124].

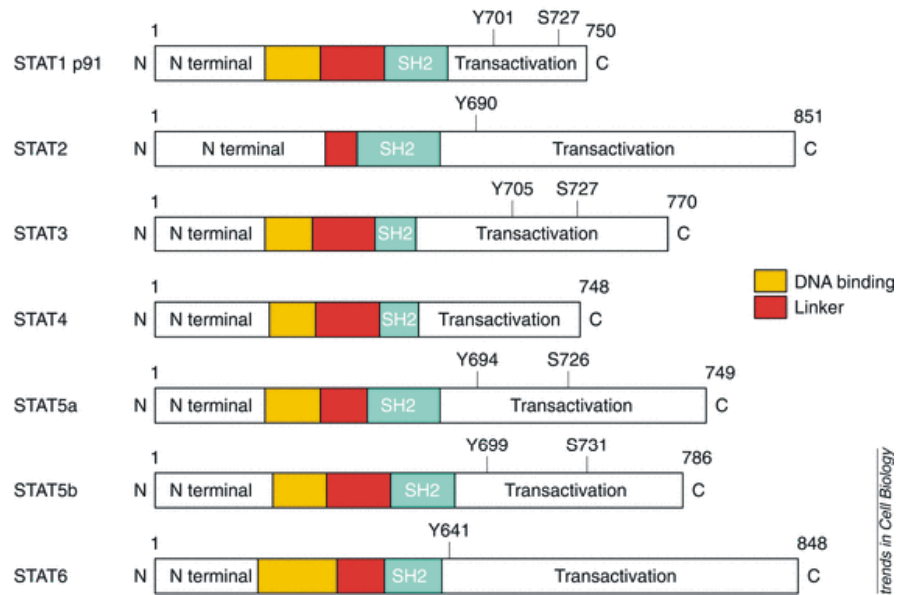


Abb. 5 Strukturelle Domänen der Stat-Domänen. Alle Stats haben eine SH2-Domäne und alle bis auf Stat2 haben eine DNA-Binde-Domäne. Tyrosin Phosphorylierungsstellen gibt es in allen Stats, obwohl der genaue Rest von Stat4 nicht bekannt ist. Bekannte Phosphorylierungsstellen, Tyrosine (Y) und Ser (S), sind eingezeichnet. Die Abbildung ist [125] entnommen.

In Tabelle 1 sind einige wichtige Cytokin-Signalwege mit den entsprechend aktivierten Stats zusammengefasst. Auffällig ist die im Vergleich zu den anderen Stat-Faktoren starke Restriktion von Stat4 und Stat6 auf wenige Rezeptortypen.

Cytokin (Januskinase)	Stat1	Stat2	Stat3	Stat4	Stat5a/b	Stat6	p48*	Lit.
IFN- α (Jak1/Tyk2)	+	+					+	[126]
	+	+						[127]
	++							[128]
				++				[129]
					++			[130]
							++ +	[129]
IFN- β (Jak1/Tyk2)		+						[131]
	+	+					+	[132]
	++ +							[133]
IFN- γ (Jak1/Jak2)	++							[128]
	+	+					+	[132]
	++						+	[134]
IL-2 (Jak1/Jak2/Jak3)			++					[135]
					++			[136]

IL-3 (Jak2)	++		++		++		[137] [137] [137]
IL-4 (Jak1/Jak2/Jak3/Tyk2)			++		++	++	[116] [115] [138, 139]
IL-5 (Jak2)	++		++		++		[140] [141] [141]
IL-6 (Jak1/Jak2/Tyk2)	+ ++		+ ++				[142] [143]
IL-7 (Jak1/Jak3)			++		++		[144] [144]
IL-9 (Jak3)	++		++		++		[145] [145] [145]
IL-10 (Jak1/Tyk2)	++		++		++		[146] [146] [146]
IL-11 (Jak1/Jak2/Tyk2)	+		+				[142]
IL-12 (Jak2/Tyk2)	++		++	++	++		[147] [148] [147]
IL-13 Jak1/Jak2/Tyk2)				++		++	[116] [149]
IL-15 (Jak1/Jak3)			++		++	++	[150] [151] [152]

Tabelle 1 Aktivierung von Stat-Molekülen. Stat-Dimere sind durch ++, Stat-Heteromere- durch + bei den jeweiligen beteiligten Stats gekennzeichnet. * p48, ein Protein der IRF-Familie, ist kein Stat-Molekül, aber im ISGF-3-Komplex mit Stat1 und Stat2 zu einem signalisierenden Komplex verbunden.

1.6.5.1 DNA-Bindung

Stat-Proteine binden an palindromische Sequenzen, ähnlich den GAS-Sequenzen. Obwohl die natürlichen Sequenzen stark variieren, gehorchen sie dem allgemeinen Muster $TT(N)_nGAA$. In den meisten Fällen kann dieses auf das Muster $TTC(N)_nGAA$ reduziert werden. $TTC(N)_2GAA$ bindet Stat3-Homodimere und Stat3-enthaltende-Heterodimere, $TTC(N)_3GAA$ bindet Stat1-Homodimere, Stat3-Homodimere oder Stat3-enthaltende Heterodimere, Stat5-Homodimere und Stat6-Homodimere, $TTC(N)_4GAA$ bindet Stat6-Homodimere. (Tabelle 2) [112, 153, 154] Die Präferenz von Stat1 für $TTC(N)_3GAA$ und von Stat6 für $TTC(N)_4GAA$ wurde von Schindler et al. elegant bestätigt. Von radioaktiv markierten Oligomeren, die 14 zufällige Nucleotide enthielten wurde ein Gelshift-Experiment mit rekombinanten Stat1 bzw. Stat6 durchgeführt. Aus dem Gel wurde die Bande isoliert, die an Stat gebundenes Oligo enthielt, das Oligo über PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert. Es stellte sich heraus, dass von 45 Stat1 bindenden Fragmenten 45 das $(N)_3$ -Element enthielten, wobei von diesen 8 eine einzelne Mutation im TTC-Palindrom aufwiesen. Von 42 Stat6-bindenden Fragmenten enthielten 38 das $(N)_4$ -Element und 10 hatten eine einzelne Mutation im Palindrom. [109] Dieser Ansatz wurde kürzlich von Eheret et al. zu einer genaueren Analyse der DNA-Bindenspezifität von Stat1, Stat5 und Stat6 weiterverfolgt [154].

Sequenz	Stat1	Stat3	Stat4	Stat5a/b	Stat6
$TTC(N)_2GAA$	+	+ ++			
$TTC(N)_3GAA$	++ +	++ +	++	++	++
$TTC(N)_4GAA$					++

Tabelle 2 Bindungsaffinität von DNA-Elementen mit der Sequenz $TTC(N)_nGAA$ für verschiedene Stat-Dimere und Heterodimere. Stat-Dimere sind durch ++, Stat-Heteromere- durch + bei den jeweiligen beteiligten Stats gekennzeichnet.

Mittlerweile sind auch die Kristallstrukturen von an DNA gebundenem Tyrosin-phosphoryliertem Stat1 [155] und Stat3 β [156] beschrieben. Da eine hohe Sequenz-Homologie zum N-Terminus von Stat4 [157] besteht, können fehlende Daten zur N-terminalen Domäne des Stat1-Protein, aus der Struktur von Stat4

extrapoliert werden, wie es Chatterjee-Kishore et al. gemacht haben [125] (Abb. 6).

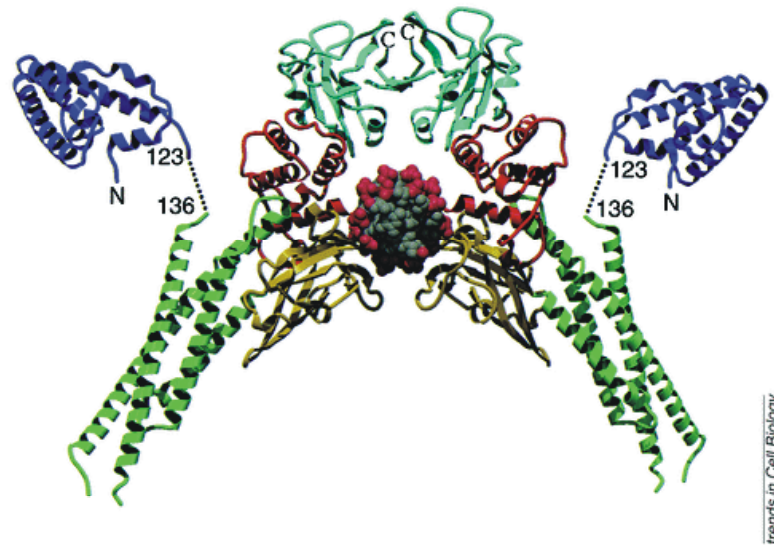


Abb. 6 Zusammengesetztes Diagramm der Strukturen der Stat4-N-terminalen Region [157] und der C-terminalen Region des Stat3 β -Dimers an DNA [156] gebunden. Die Stat4 N-terminale Region ist so orientiert, dass der C-terminale Rest 123 nahe dem N-terminalen Rest 136 des Stat3-Dimers ist und die artifizielle Verbindung ist durch eine gepunktete Linie verdeutlicht. Die coiled-coil Domäne von Stat3 β ist grün, die DNA bindende Domäne gelb, die helicale Verbindungsdomäne rot und die SH2-Domäne hellblau. Die DNA ist grau, mit roten Phosphat-Gruppen. Die Abbildung ist [125] entommen.

Eine zweizählige Symmetrie-Achse verläuft durch das Zentrum der DNA. Jedes Monomer bindet an eine Hälfte der palindromischen Bindungsstelle. Möglicherweise beeinflusst die SH2-Region von Stat1 die DNA-Bindung, da sich ihr Phosphat-bindender Loop in der Nähe eines Segmentes der DNA-bindenden Region befindet. Zwischen der N-terminalen Region des Stat-Proteins und der DNA sind nur wenige direkte Kontaktstellen. Setzt man die Strukturen der N-terminalen Region von Stat4 und die DNA-gebundene Struktur von Stat3 β zusammen, wie es Chatterjee-Kishore et al. gemacht haben, erkennt man, dass diese Seitenketten für Protein-Protein-Wechselwirkungen zur Verfügung stehen [125]. Für die Wechselwirkung von Stats mit anderen Transkriptionsfaktoren zur Bildung eines transkriptionell aktiven Komplex gibt es viele Beispiele, auf die später eingegangen wird. Die Spezifität der DNA-Bindung von Stat1 wird möglicherweise durch solche Wechselwirkungen festgelegt [155]. Stat1-Homodimere können an benachbarte GAS-Bindestellen niedriger Affinität binden, indem sie tetramere Komplexe bilden [158].

1.6.5.2 Wechselwirkung von Stats mit anderen Molekülen

Neben den Wechselwirkungen untereinander sind mittlerweile eine Vielzahl von anderen Molekülen bekannt, mit denen Stat-Moleküle interagieren.

Wie oben erwähnt bilden Stat1 und Stat2 mit dem Protein p48 den Komplex ISGF3 (interferon- stimulated gene factor 3), der ohne DNA-Bindung nicht stabil assoziiert. Die Reste 150-250 aus der coiled-coil Region, besonders der Rest R161, sind für die Stat1-p48 Wechselwirkung besonders wichtig. [159]

Stat1 bindet USF-1, ein Mitglied der „β-helix-loop-helix- zipper“-Familie, an der GAS/E-box(USF-1-Consensus-Stelle) des IFN-induzierbaren Promotors IV [160].

Das ICAM-1-Gen besitzt eine GAS-Box neben einer SP1-Stelle und zur vollständigen Aktivierung ist die Besetzung beider Stellen durch Stat1 bzw. SP1 notwendig. Coimmunpräzipitationen und DNA-Protein-Crosslinking zeigen das Stat1 und SP1 in einem Komplex an die DNA binden und die Transkription aktivieren [161]. Das HSP-90-Gen wird durch einen Komplex aus Stat1 mit HSF-1 aktiviert [162].

Eine wichtige Wechselwirkung ist die von Stat- mit NF-κB-Faktoren. Obwohl die Kooperation auch von Stat-1 und NF-κB in unterschiedlichen Promotoren gezeigt wurde [163, 164], konnte eine direkte Wechselwirkung durch Coimmunpräzipitation nur für Stat6 nachgewiesen werden [165].

Stat5 [166], Stat1 [167] und Stat3 [168] binden an den Glucocorticoidrezeptor.

Die Expression der meisten Gene wird nicht nur durch Stimulus-abhängig aktivierte Transkriptionsfaktoren gesteuert, sondern ist auch von Coaktivatoren abhängig, die zum Beispiel die Rekrutierung der basalen Transkriptionsmaschinerie erleichtern. Stat-Protein-Wechselwirkungen mit einer Reihe dieser Faktoren sind bekannt.

So wurden die direkten Wechselwirkungen von CBP/p300 für Stat1 [169, 170], Stat2 [126], Stat5 [171] und Stat6 [172] von Stat1 und Stat3 mit TFIID bei der Analyse des c-fos-Promotors gezeigt [173]. Der zu den Transkriptionsfaktoren der *CAAT/enhancer-binding protein*(C/EBP)-Familie gehörende Faktor C/EBPβ bindet Stat6 [174], ebenso wie der Faktor IRF-4 [175].

Auch Wechselwirkungen mit Proteinen, die nicht zu den Transkriptionsfaktoren gehören, können die Wirkung durch Hilfe bei der Kerntranslokation oder Verstärkung der Coaktivatorbindung verbessern.

MCM5, ein Mitglied der mini-chromosom-maintenance(MCM)-Familie, die in die DNA-Replikation involviert ist, bindet Stat1 an S727. Durch Phosphorylierung dieses Restes wird die Bindung erhöht und die Kernkonzentration von MCM5 wird durch Stat1-Aktivierung erhöht [176]. S727 wurde auch als kritischer Rest für die Wechselwirkung mit dem Kerbsmarker BRCA1 festgestellt [177]. Alle Stats mit Ausnahme von Stat2 binden das c-Myc bindende Protein Nmi [178]. Ein Komplex aus CrkL- und Stat5 wandert IFN α abhängig in den Kern und bindet an die DNA [179]. Ausserdem existiert ein Proteinkomplex aus Stat3 und c-Jun [180].

1.6.6 Negative Regulierung des Jak/Stat-Signalweges

Mittlerweile sind verschiedene Proteine bekannt deren Cytokin-abhängige Expression zur Inhibierung des Jak/Stat-Signalweges desselben oder eines anderen Cytokins führt. Die regulatorischen Komponenten sind eine Reihe von ähnlichen SH2-Domänen Proteinen. Diese Moleküle heissen CIS (Cytokine-induced SH2), SOCS-1,2,3 (Suppressors of cytokine signalling), JAB (Jak binding) oder SSI-1 (Stat-induced Stat-inhibitor) und werden innerhalb einer Stunde nach Cytokin-Stimulierung exprimiert [181-183]. IL-4 erhöht die CIS [181] und SOCS-3-Expression und in geringerem Ausmass von SOCS-1 [184] und SOCS-2 [181]. SSI-1 wurde von IL-4 in der CT.4s Zelllinie induziert [182] und hemmt Stat3. Der Mechanismus ist Gegenstand genauerer Untersuchungen, die darauf hindeuten, dass es sich bei diesen Molekülen um Jak-Inhibitoren handelt.

1.6.7 IL-4 induzierte Genexpression

Die Induktion verschiedener Gene durch IL-4 ist mittlerweile gezeigt worden. Neben der Differenzierung von Th-Zellen, codieren sie auch für Effektorfunktionen von Th2-Immunantworten. Die meisten bekannten IL-4 induzierten Gene sind direkt oder indirekt Stat6-reguliert. In Tabelle 3 sind verschiedene Gene, mit Angabe der IL-4 (und oft auch IL-13) abhängigen positiven oder negativen Regulierung, die mögliche Beteiligung von Stat6 und die entsprechenden Literaturverweise zusammengefaßt.

Gen	Expression	Stat6	Lit
Aminopeptidase N	+		[185]
Arginase1	+	+	[186]
β -Casein	+	+	[187]
c- ϵ -sterile Transcript	+	+	[188, 189] [190]
c- γ -1	+	+	[191]
c- γ -3	+	+	[192]
Cis-1	+		[181]
c-maf	+	+	[113]
Eotaxin-1	+	+	[193] [194, 195]
E-selectin	-	+	[196]
FISP	+	+	[20]
Fc ϵ RII(CD23)	+	+	[138]
Fc γ RI	-	+	[149]
GATA-3	+	+	[113]
HSP90	+		[197]
ICAM-1	+		[198]
IL-1Ra	+	+	[199]
IL-4	+	+	[200]
IL-4R α	+	+	[201]
INOS	-		[202]
IP-10	-		[203, 204]
IRF-1	-	+	[205]
ISG-54	-		[204]
LFA-1	+		[198]
12/15-Lipoxygenase	+	+	[206]
Lymphotoxin- α	+	+	[207]
MCP-4	+		[208]
MHCII	+		[209]
MIG	-	+	[210]
Muc2/5	+		[211]
p-Selectin	+	+	[212]
p27kip1b	-	+	[213]
SOCS-1,2,3	+		[181]
SSI-1	+		[182]
VCAM-1	+		[214]

Tabelle 3 Übersicht der IL-4 induzierten Gene. Induktion/Unterdrückung der Expression (+/-), Beteiligung von Stat6 und Literaturstelle sind angegeben.

1.7 IL-4 und die Typ 1-allergische Reaktion

Nachdem eine CD4⁺-T-Zelle zur Antigen-spezifischen Th2-Zelle polarisiert ist, steuert sie über Wechselwirkung mit anderen Zellen, sogenannten Effektorzellen die Th2 spezifische Immunantwort (Abb. 7). IL-4 spielt bei der allergischen Reaktion vor allem in der Sensibilisierungsphase eine entscheidende Rolle, da es bei der anfänglichen Differenzierung zu Th2 Zellen nicht durch IL-13 ersetzbar ist [52]. In der Effektorphase der Allergie scheint jedoch IL-13 zu dominieren, da es über längere Zeit und in größeren Mengen produziert wird als IL-4 [215-218].

Ein für den Organismus harmloses fremdes Peptid, wird von der körpereigenen Immunabwehr als schädlich erkannt und mit den Waffen, die zur Bekämpfung von Parasiten dienen, angegriffen [219].

Wird der Th2-Zelle von einer B-Zelle das passende Antigen präsentiert, sezerniert sie IL-4/IL-13. Neben weiteren Wechselwirkungen zwischen beiden Zellen ist die CD40L (CD145) Wechselwirkung mit dem CD40-Rezeptor der B-Zelle besonders wichtig [220]. Durch die Aktivierung entwickelt sich die B-Zelle zur Gedächtniszelle (memory cell) oder Plasmazelle.

Gedächtniszellen sind langlebige, funktionell ruhende immunkompetente Zellen, die dem Immunsystem bei wiederholtem Kontakt mit dem Antigen eine schnelle Immunantwort ermöglichen (booster-Effekt). Plasmazellen sind als Antikörperproduzenten die Träger der humoralen Immunantwort.

Durch Stimulation mit IL-4 oder IL-13 [221] und CD40L findet ein sogenannter Antikörperklassenwechsel („class switching“) [222], statt. Die auf IgM und IgD-Antikörper eingestellte Antikörperproduktion wird auf IgE und IgG4 [223] (in der Maus IgE und IgG1 [224]) umgestellt und die Antikörper werden in grossen Mengen produziert.

IL-4 und IL-13 aktivieren über den Jak/Stat6-Signalweg zusammen mit CD40L den I ϵ Promotor, was zur Bildung von ϵ RNA Transkripten führt [225]. ϵ RNA Transkripte werden auch sterile Transkripte genannt, da sie nicht translatiert werden. Die Transkripte bilden RNA-DNA-Hybride und führen zu einem speziellen Spleissvorgang. Hierbei wird die variable für die Antigen erkennende Domäne kodierende DNA mit der für den konstanten Bereich von IgE-Antikörpern codierenden DNA verbunden. Die zwischen den verbundenen Teilen liegenden

Exons anderer konstanter Regionen werden ausgeschnitten und abgebaut [226] [227].

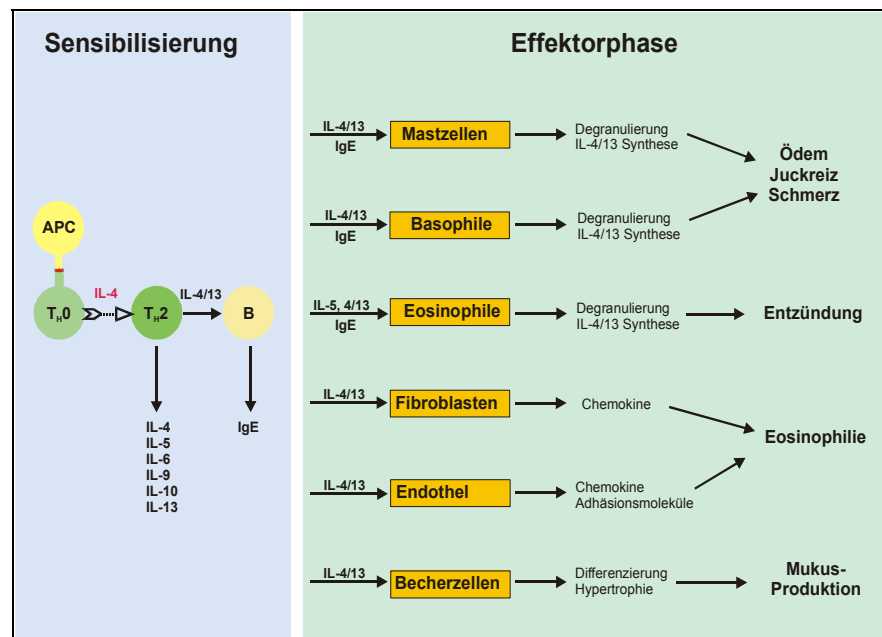


Abb. 7 Schematische Darstellung von Sensibilisierungs- und Effektorphase der allergischen Soforttyp-Reaktion.

Für die Bindung von IgE-Antikörpern exprimieren verschiedene Effektorzellen zwei Rezeptoren, den hoch-affinen IgE-Rezeptor FcεRI und den niedrig affinen IgE-Rezeptor FcεRII (CD23). Im Menschen wurde auch eine Wechselwirkung mit den Rezeptoren FcγRII und FcγRIII nachgewiesen, die aber eine untergeordnete Rolle spielt [228].

FcεRI befinden sich als Oberflächenrezeptor auf den Granulocysten, Eosinophilen [229], Basophilen [230] und Mastzellen [231, 232], und FcεRII befindet sich auf Eosinophilen, Monozyten [233], Phagocysten [234], Mastzellen [232] und B-Lymphozyten [235].

Die Aktivierung der Granulocysten erfolgt durch Verbindung (cross-linking) mehrerer FcεRI-Rezeptoren durch das multivalente, jetzt als Allergen erkannte, Antigen. Im Zellinnern führt die initiierte Signalübertragung zur Aktivierung verschiedener Effektorfunktionen. Bei der Entleerung der Granula werden vorgebildete Mediatoren und neu synthetisierte Lipidmediatoren ausgeschüttet. Granulocysten sind auch eine wichtige Quelle für Cytokine und können möglicherweise unabhängig von T-Zellen B-Zellen aktivieren.

Die Funktion des niedrig affinen Rezeptors ist noch nicht genau geklärt. Wahrscheinlich dient er zur Antigenpräsentation, aber auch zur Regulierung der IgE-Synthese [236, 237].

Mastzellen sind langlebige im Gewebe angesiedelte Granulocyten, die für die sofortige Reaktion auf das Antigen verantwortlich sind. Die Granula sind reich an Histamin und Heparin-Sulfat, aber auch Proteasen und Leukotriene sind enthalten. Da Histamin schnell abgebaut wird, ist seine Wirkung lokal begrenzt. Histamin führt zur Dialatation kleinerer Gefäße und ist so für die Rötung und Quaddelbildung der Haut verantwortlich. Weitere Konsequenzen der Histaminausschüttung sind Kontraktion der Bronchien, und - verursacht durch Wirkung auf die Nervenendigungen - Schmerz und Juckreiz.

Basophile sind kurzlebige Granulocyten, die im Blut zirkulieren. Der Granulainhalt entspricht im wesentlichen dem der Mastzellen. Basophile wandern zu den Stellen an denen das Antigen erkannt wurde und sind mit den Eosinophilen wichtige Mediatoren der Spät-Phasen-Reaktion, die einige Stunden nach der ersten Reaktion auftritt.

Eosinophile sind Granulocyten, die unter normalen Umständen nicht in nennenswerter Anzahl im Blut vorkommen. Bei Th2-induzierten Entzündungsreaktionen ist das anders. Das vermehrte Auftreten von Eosinophilen im Blut wird als Eosinophilie bezeichnet. Im gesunden Menschen befindet sich die Mehrzahl der Eosinophilen im Gastrointestinaltrakt, wo sie wichtig für die Verteidigung bei Eintritt einer Infektion mit helminthischen Parasiten sind. Eosinophile besitzen verschiedene Eosinophil-spezifischer Proteine in ihren cytoplasmatischen Granula, wie MBP (Major Basic Protein), ECP (Eosinophil cationic protein), ENP (Eosinophil derived neurotoxic protein) und EPO (eosinophil peroxidase). MBP ist toxisch für helminthische Parasiten, aber auch toxisch für Tumorzellen und Wirtzellen. ENP und EPO wirken bakterizid, helminthizid und cytotoxisch, ENP besitzt Ribonucleaseaktivität. Zusätzlich sezernieren Eosinophile Lipidmediatoren, wie Leukotriene, die potente Stimulatoren für die Kontraktion der weichen Muskulatur, Vasoaktivität und Schleimsekretion sind. Bei allergischem Asthma führt man die Gewebeerstörung und Lungendysfunktion im wesentlichen auf die Eosinophilie zurück und auch in anderen atopischen Erkrankungen, wie atopischer Dermatitis kommt ihr eine zentrale Funktion zu. Für die Aktivierung von Eosinophilen sind IL-5 und Eotaxin von besonderer Bedeutung. IL-5 ist

besonders wichtig für die Differenzierung und Austritt aus dem Knochenmark [238]. Eotaxin dient zuerst systemisch (in Kombination mit IL-5) [239] zur Aktivierung und Mobilisierung von Eosinophilen aus dem Knochenmark, dann führt es durch Chemotaxis [240, 241] und Induktion von Adhäsionsmolekülen zur Lokalisation am Entzündungsherd [242-244] und schließlich stimuliert es dort die Entleerung der Granula [245]. [229, 246]

Von essentieller Bedeutung für die Wirkung von Eosinophilen und Basophilen sind also die Cytokine, die sie zum Entzündungsort rekrutieren, die Chemokine, und die Adhäsionsmoleküle, die eine Anlagerung und schließlich ein Eindringen ins Gewebe ermöglichen. Zur Sezernierung von Chemokinen und zur Expression von Adhäsionsmolekülen sind verschiedene Zellen, wie Endothel- und Epithelzellen oder Fibroblasten und auch Keratinozyten in der Lage.

Die bei vielen atopischen Erkrankungen und auch bei der Bekämpfung helminthischer Parasiten beobachtbare erhöhte Schleimproduktion dient wahrscheinlich der Expulsion von Fremdkörpern oder Fremdorganismen. IL-4 und IL-13 induzieren die Differenzierung von Epithelzellen in Schleim-absondernde Becherzellen (goblet cells) und die Produktion von Mucinen und Mucus-Glykokonjugaten [211]. Mucine sind hochglykolsylierte Proteine mit Cysteinreichen-Termini. In sekretorischen Granula ist die negativ geladene Oberfläche der Mucine durch Calciumionen neutralisiert. Durch Exocytose werden die Calciumionen entfernt, die negativen Ladungen stoßen sich ab und es kommt zur Hydratation, die eine schnelle und mehr als hundertfache Oberflächenvergrößerung zur Folge hat.

2 Material

(außer SI-Einheiten)

Abb.	Abbildung	h	menschlich
APS	Ammoniumperoxodisulfat	HMS	hochmolekularer
AP	Antennapediapeptid		Größenstandard
AMP	Ampicilin	IC ₅₀	Konzentration, die zu 50 %
ATP	Adenosintriphosphat		inhibiert
b	Basen	Ig	Immunoglobulin
bp	Basenpaare	IL	Interleukin
BPB	Bromphenolblau	IL-4R	Interleukin-4 Rezeptor
BSA	Rinderserumalbumin	IFN	Interferon
C _i	Curie	IP	Immunpräzipitation
CD	Cluster of Differentiation	IRS-1/2	Insulin Rezeptorsubstrat
cDNA	zur mRNA komplementäre	Jak	Janus Kinase
	DNA	k	kilo (10 ³)
C/EBP	CAAT Enhancer Binding	K _d	Dissoziationskonstante
	Protein	K _i	Hemmkonstante
cpm	counts per minute	l	Liter
Da	Dalton	log	dekadischer Logarithmus
DMSO	Dimethylsulfoxid	LB	Luria Broth
DNA	Desoxyribonukleinsäure	LMS	niedermolekularer
dNTP	2'-desoxy-Nukleosid-		Größenstandard
	triphosphat	Lsg.	Lösung
dsDNA	doppelsträngige DNA	M	molar
DTT	Dithiothreitol	m	milli (10 ⁻³)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	mAb	monoklonaler Antikörper
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat	MAP	Mitogen-aktivierte
ELISA	Enzyme-linked-immuno-		Proteinkinase
	sorbent assay	max.	maximal
EtBr	Ethidiumbromid	min	Minuten
EtOH	Ethanol	m	murin
F	Farad (Kapazitätseinheit)	M _r	relative Molekülmasse
FCS	fötales Kälberserum	mRNA	Messenger-RNA
γC	common gamma Kette	μ	mikro (10 ⁻⁶)
h	Stunden	n	nano (10 ⁻⁹)
³ H	Tritium	NC	Nitrocellulose

NK	Natürliche Killerzellen	TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
nm	Nanometer		
OD _x	Optische Dichte x nm	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
pico	pico (10 ⁻¹²)		
PAA	Polyacrylamid	Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
pAb	polyklonaler Antikörper		
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	U	Units (Einheit der Enzymaktivität)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	UV	Ultraviolett
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung	ü.N.	über Nacht
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase	ÜNK	Übernachtkultur
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid	V	Volt
pTyr	Phosphotyrosin	VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsionsprotein-1
POD	Peroxidase	Vol.	Volumen
Qy	murine IL-4 Variante; Q116/Y119	W	Watt
4PS	IL-4 induziertes Phosphorylierungssubstrat	Ω	Ohm
R	Rezeptor		
RFP	Kulturmedium für höhere Zellen (RPMI 1640, FCS und Antibiotika)		
RLA	Relative Luciferase Aktivität		
RNA	Ribonucleinsäure		
rpm	Umdrehungen pro Minute		
RT	Raumtemperatur		
RT-PCR	PCR mit reverser Transkriptase		
SD	Standardabweichung		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
SH2	<i>src</i> -Homologie 2 Domäne		
SH3	<i>src</i> -Homologie 3 Domäne		
ssDNA	Einzelstrang DNA		
Stat	Signalvermittler und Aktivator von Transkription		
Stat6-BP	Stat6-bindendes Peptid		
Stat6-CP	Stat6-Konrollpeptid		
TB	Terrific Broth		
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung		

2.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Enzyme wurden von den Firmen Alexis, Amersham-Buchler, Biolabs, Biorad, Boehringer, Calbiochem, Difco, Fermentas, Gibco-BRL, Gerbu, Merck, Pharmacia, Promega, Roche, Roth, Serva und Sigma in den höchsten Reinheitsstufen bezogen. Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser, z.T. in Millipore-Qualität, angesetzt.

2.2 Zelllinien

A549	humane Lungenkarzinomzellen (ATCC#CCL-185)
BA/F3	mIL-3 abhängige murine prä-B-Zelllinie
Hek293	humane Nierenzelle
RAMOS	humane non-Hodgkin B-Zelllinie (ATCC#CRL-1923)

2.3 Primärzellen

Fibroblasten dermale Vorhautfibroblasten

2.4 Wachstumsfaktoren

Humanes IL-3 und IL-4 wurde in *E.coli* exprimiert und wie beschrieben gereinigt.

Murines IL-3 wurde in Form eines Zellüberstandes von X63Ag 8-653 BPV Zellen gewonnen und eingesetzt.

Humanes IFN γ , humanes IL-13 und humanes TNF α wurden über PeproTech bezogen.

2.5 Antikörper

Antikörper	Westernblot	Hersteller	Typ, Herkunft, Kopplung	Epitop, Zielmolekül
Anti-mouse-IgG-POD	30 ng/ml	Santa Cruz	pAb, Ziege, POD-gekoppelt	Maus IgG
Anti-rabbit-IgG-POD	30 ng/ml	Santa Cruz	pAb, Ziege, POD-gekoppelt	Kaninchen IgG
Phospho-Stat6	1:1000	Cell Signaling	pAb, Kaninchen,	Phospho-Stat6 (Tyr641)
RC20	0,6 µg/ml	Transduction Laboratories	Modif. PY20, POD-gekoppelt	Phosphotyrosin

Affinitätsmaterial	Präzipitation	Hersteller	Bindung
Protein A/G Plus Agarose	30 µl/ml	Santa Cruz	Kaninchen und Ziege pAb, verschie. Maus und Ratte mAb
Dynabeads M280 Streptavidin	6 mg/ml	Dynal	biotinylierte Oligonucleotide
MagMicrobeads	x mg/ml	Miltenyi	biotinylierte Oligonucleotide

Antikörper	Präzipitation	Westernblot	Hersteller	Typ, Herkunft, Kopplung	Epitop, Zielmolekül
Bcl-6		5 µl/ml	Santa Cruz	pAb, Kaninchen,	Bcl-6, Maus, Ratte, Mensch
CBP/p300		5 µl/ml	Santa Cruz	pAb, Kaninchen,	CBP/p300 Maus, Ratte, Mensch
C/EBPβ		8 µl/ml	Santa Cruz	pAb, Kaninchen	C/EBPβ, Mensch, Maus, Ratte
GR	10 µl/ml	0,5 µl/ml	Santa Cruz	pAb, Kaninchen	GRα/β, Mensch

					Mensch
P50		8 µl/ml	Santa Cruz	pAb, Kaninchen	p50/105, Mensch, Maus, Ratte
P65		0,5 µl/ml	Santa Cruz	pAb, Kaninchen	p65, Mensch, Maus, Ratte
PU.1		8 µl/ml	Santa Cruz	pAb, Kaninchen	PU.1 Mensch, Maus, Ratte
Stat6		0,5 µl/ml	Santa Cruz	pAb, Kaninchen	Stat6 Mensch, Ratte, Maus

2.6 Oligonukleotide

2.6.1 Primer

- 1a β -Actin_s: 5' -GTGATGGTGGGCATGGGTCA-3'
- 1b β -Actin_{as}: 5' -TTAATGTCACGCACGATTTCCC-3'
- 2a CD23_s: 5' -GTCCATGGGACCTGATTCAAGACC-3'
- 2b CD23_{as}: 5' -CTCATCTGGAGAGGGTGCTGTTGG-3'
- 3 EoM1_{as}: 5' -GGGAGATTCCAGGGCTCCTTTGCCGATGCG-3'
- 4 EoM1_s: 5' -CGCATGGGCAAGGCAGCCCTGGAATCTCCC-3'
- 5 EoM2_{as}: 5' -AGGGAGCAGACAGTGTCCCAGATTCCAGGGAAGC-3'
- 6 EoM2_s: 5' -GCTTCCCTGGAATCTGGGACACTGTCTGCTCCCT-3'
- 7 HB19: 5' -CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA-3'
- 8 HB27: 5' -CTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCA-3'
- 9a MUC_s: 5' -GCCAGTCGACAAGAAGACTATGAACCTTTCCTTTG-3'
- 9b MUC_{as}: 5' -GCCTCTAGATCTTTTAAGTGTATTACCTT-3'
- 10a MUC_{ns}: 5' -CCAAAGATTTAAGAAAGAAGTATG-3'
- 10b MUC_{nas}: 5' -ACTGCCGCTGCCTTTATAGATA-3'

2.6.2 Promotorfragmente zur Kopplung an Magnetobeads

1. I ϵ -Promoter sense/antisense [247]:

418 5' -GATCCCCGCTGTTGCTCAATCGACTTCCCAAGAACAGAGAGAAAAGGGAACCTTC-3'
5' -GATCGAAGTTCCTTTTCTCTCTGTTCTTGGGAAGTCGATTGAGCAACAGCGGG-3'

2. Eotaxin-Promoter sense/antisense [248]:

2403 5' -GATCGACCCCGCATGGGCAAAGCTTCCCTGGAATCTCCCACACTGTCTGCTCC-3'

5' -GATCGGAGCAGACAGTGTGGGAGATTCCAGGGAAGCCTTTGCCCATGCGGGGTC-3'

3. IL-1ra-Promoter sense/antisense [249]:

1413 5' -GATCTGGTTTTCCATTGTGCTCTTCTTCCCAGGAACTCAATGAAGGGGAAAATAGA-3'
5' -GATCTCTATTTCCCCTTCATTGAGTTCTTGGGAAGAAGAGCACAAATGGAAACCA-3'

4. E-Selectin-Promoter sense/antisense [250]:

275 5' -GATCAATTTTAAGCATCGTGGATATTCCCAGGAAAGTTTTTGGATGCCATTGGG-3'
5' -GATCCCCAATGGCATCCAAAAACTTTCCCAGGAATATCCACGATGCTTAAAAATT-3'

5. h15-Lipoxygenase-Promoter sense/antisense [251]:

2497 5' -GATCTGAAAGTACCGGGTAAGACTTTCTCTGAGAAACCGGAGGTGAACTAGGGTT-3'
5' -GATCAACCCTAGTTCACCTCCGGTTTTCTCAGGAAAGTCTTACCCGGTACTTTCA-3'

6. mL-4-receptor-Promoter sense/antisense [188]:

595 5' -GATCCAGATCCATGCCTCAGCTTCTTCATCTGAAAAGGGATAGTTGCGCATGAC-3'
5' -GATCGTCATGCGCAACTATCCCTTTTCAGATGAAGAAGCTGAGGCATGGATCTG-3'

7. hIL-4-Promoter sense/antisense [252]:

117 5' -GATCCATTTTCTCTATTGGTCTGATTTTCACAGGAACATTTTACCTGTTTGTGAGG-3'
5' -GATCCCTCACAAACAGGTAAAATGTTCTGTGAAATCAGACCAATAGGAAAATG-3'

8. CD23b-Promoter sense/antisense [233]:

116 5' -GATCCTCTGGGAAAGAGGGTGAATTTCTAAGAAAGGGACTGGTGTGAGTAAGG-3'
5' -GATCCCTTACTCACACCAGTCCCTTTCTTAGAAATTCACCCCTCTTTCCAGAG-3'

9. hIRF-1-Promoter sense/antisense [253]:

1171 5' -GATCTAGCTCTACAACAGCCTGATTTCCCCGAAAATGACGGCACGCAGCCGGCC-3'
5' -GATCGGCCGGCTGCGTGCCGTCATTTTCGGGGAAAATCAGGCTGTTGTAGAGCTA-3'

10. FcγRI-Promoter sense/antisense [254]:

264 5' -GATCTTCAAGGATTTGAGATGTATTTCCCAGAAAAGGAACATGATGAAAATGG-3'
5' -GATCCATTTTTCATCATGTTCTTTCTGGGAAAATACATCTCAAATCCTTGAA-3'

11. Competitor

5' -GATCGTCTGTCTGAGGTGTCTGTCTGAGGTGTCTGTCTGAGGTGTCTGTCTGA-3'
5' -GATCTCAGACAGACACCTCAGACAGACACCTCAGACAGACACCTCAGACAGAC-5'

12. rat β-casein "Stat-6" [187]:

5' -GATCTGTTTAAATGTCCCCAGAATTTCTTGGGAAAGAAAATAGAAAGAAACCAT-3'
5' -GATCATGGTTTCTTTCTATTTTCTTTCCCAAGAAATCTGGGGGACATTAACA-3'

13. rat β-casein "Stat-5" [187]:

5' -GATCCATTTTCTAATCATGTGAACTTCTTGGAAATTAAGGAACTTTTGAATATC-3'
5' -GATCGATATTCAAAAGTTCTTAAATTCCAAGAAAGTTCACATGATTAGAAAATG-3'

14. hum β -casein "Stat6" [187]:

5' -GATCAGCACTAACAACCTGCTTAGGTTTCACATGAAACTGTGGCCTTTGTGAAGCC-3'
5' -GATCGGCTTCACAAAGGCCACAGTTTCATGTGAACCTAAGCAGTTGTTAGTGCT-3'

15. hum β -casein "Stat-6" [187]:

5' -GATCGTTATAATGATGCCAGAAATTTCTGGGGATATGTAATAGGCAGAAATCAT-3'
5' -GATCATGATTTCTGCCTATTACATATCCCCAGAAATTTCTGGGCATCATTATAAC-3'

16. hum β -casein "Stat-5" [187]:

5' -GATCCATTTTCTAATCATGTGGACTTCTTGGAAATTAAGCTCGCTATTGATCT-3'
5' -GATCAGATCAATAGCGAGCTTTAATTCCAAGAAGTCCACATGATTAGAAAATG-3'

2.7 Luciferasevektorplasmide

[255]

pTKLuc

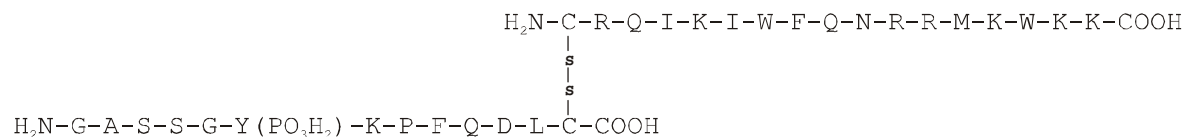
pTataLuc+

pLuc+

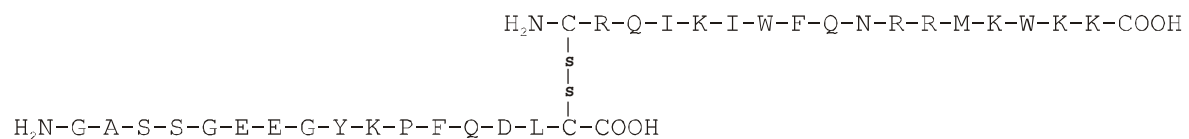
2.8 Peptide

Peptide wurden HPLC gereinigt von der Firma Interaktiva im Synthesemasstab von 10 mg und einer Reinheit > 80% bezogen, die korrekte Aminosäurezusammensetzung wurde mit MalDI-MS überprüft. Die Kopplung wurde von Dr. Sascha Stolzenberger im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt.

AP/Stat6BP :



AP/Stat6CP :



3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Sterilisieren

Glasgefäße, Pipetten und weitere Glasartikel für die Kultur von Bakterien werden für 6 h bei 180°C im Heißluftschrank sterilisiert (Heraeus Trockenschrank Typ ST 5060). Pufferlösungen, Medien und Kunststoffgefäße werden für 20 min bei 121°C und 1.1 bar autoklaviert (Sterico Vapoklav Dampfsterilisator). Lösungen thermolabiler Substanzen werden über Spritzenfilter (DynaGard, 0.22 µm Porendurchmesser) steril filtriert.

3.1.2 Kulturmedien

LB-Medium [256]: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Yeast Extrakt, 10 g/l NaCl pH 7.5 mit 0.1 N NaOH einstellen.

TB-Medium [256]: 13.3 g/l Bacto-Trypton, 26.6 g/l Bacto-Yeast Extrakt, 4.4 ml/l Glycerin zu 720 ml sterilem TB-Medium werden 80 ml sterile 10x Phosphat-Lösung gegeben.

10 x Phosphat-Lösung [256]: 0.17 M KH_2PO_4 , 0.72 M K_2HPO_4

5 x ENB-Medium [256]: 40 g/l Nutrient Broth, 25 g/l Bacto-Pepton, 7.5 g/l KH_2PO_4 , 17.5 g/l NaH_2PO_4 , 25 g/l NaCl.

SOB-Medium [257]: 20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto Yeast Extrakt, 0.59 g/l NaCl, 0.85 g/l KCl vor Verwendung des Mediums wird 1 Vol. % 1 M MgCl_2 /1M MgSO_4 zugesetzt.

SOC-Medium [257]: SOB-Medium + 1 Vol. % 2M Glucose

ENB-Platten: 15 g Agar werden in 800 ml Wasser autoklaviert. Nachdem der Agar auf etwa 40°C abgekühlt ist, werden 200 ml 5 x ENB-Medium, 2.5 ml 2 M Glukose, 0.5 ml 10 mg/ml Thiamin und Antibiotika zugesetzt, gemischt und in Petrischalen verteilt. Nach Erstarren des Agars werden die Platten noch einen Tag bei RT getrocknet und anschließend bei 4°C gelagert.

Den Kulturmedien werden abhängig von Bakterienstamm und Plasmid Antibiotika zugesetzt. Die Antibiotika werden aus einer Stammlösung verdünnt. Antibiotika Stammlösungen für Ampicillin (50 mg/ml in H₂O) werden 1:500, für Kanamycin (10 mg/ml in H₂O) 1:200, für Tetracyclin HCl (5 mg/ml in 80% Ethanol) 1:100 mit Kulturmedium verdünnt eingesetzt.

3.1.3 Kulturbedingungen

E.coli werden in LB - oder TB -Medien mit oder ohne Antibiotikum bei 30°C oder 37°C unter Schütteln (200 rpm, Braun Certomat R) angezogen.

Aus einer Glycerin-Stammkultur wird ein Ausstrich auf einer Agar-Platte angelegt und dieser bei 30°C oder 37°C über Nacht inkubiert. Mit einer Kolonie dieser Platte werden 2 ml Medium angeimpft. Nach ca 8 - 15 h können mit dieser Vorkultur größere Kulturen angeimpft werden.

3.2 Konservieren von Bakterienkulturen

3.2.1 Kurzzeitige Konservierung

Die Bakterienkultur wird mit einem Glasstab auf einer Kulturplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. In dieser Form kann der Bakterienstamm für bis zu sechs Wochen bei 4°C gelagert werden.

3.2.2 Langfristige Konservierung

50 ml einer E.coli-Kultur in LB-Medium (mit oder ohne Antibiotikum), die bis zu einer OD550 von 1.5 - 1.7 (LKB Novaspec) gewachsen ist, werden bei 1600 x g (Heraeus-Baktifuge: 3000 rpm, 10 min) sedimentiert. Das Zellpellet wird vorsichtig in 2 ml LB-Medium aufgenommen, mit 2 ml Glycerin (87%, sterilisiert) in sterilen 5 ml Glasröhrchen vermischt und bei -20°C aufbewahrt.

3.2.3 Elektrotransformation von E.coli

[257]

3.2.3.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

In einem 2l Erlenmeyer-Kolben wird 1l LB Medium mit 10 ml einer frischen ÜNK des zu transformierenden Stammes angeimpft. Man läßt die Kultur je nach Stamm auf einem Schüttler bei 200 rpm und 37°C bis zu einer OD600 von 0.5 - 1.0 heranwachsen.

Die weitere Behandlung der Bakterien muß bei 4°C durchgeführt werden. Sie werden zunächst 30 min auf Eis abgekühlt. Es folgen einige Waschschrirte, wobei das LB-Kulturmedium gegen eine 10%ige kalte, sterile Glycerinlösung ausgetauscht und die Bakteriensuspension nach und nach auf ca. 4 ml eingeengt wird. Dazu wird die abgekühlte LB-Kultur jeweils bei 3300 x g 10 min zentrifugiert und das Sediment jeweils anschließend in 1 l, bzw. 0.5 l, 20 ml und schließlich in 2 - 4 ml 10 % Glycerin/Wasser (v/v) vorsichtig resuspendiert. Die E.coli werden dann in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in 40 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3.2.3.2 Elektrotransformation kompetenter Zellen

Die für die Transformation vorbereiteten Zellen werden aufgetaut, mit 0.1 - 0.2 µg DNA (in TE Puffer oder Wasser) versetzt und bei 0°C für etwa 1 min stehengelassen. Die Mischung der E.coli-Zellen mit der DNA wird in eine 0.2 cm Elektroporationsküvette überführt und einem Puls mit einer Zeitkonstante von 4,5 bis 5 msec, bei einer Feldstärke von 12,5 kV/cm ausgesetzt (Biorad Gene Pulser™):

2500 V; 25 μ F und 200 μ s. Danach werden die transfizierten E.coli sofort in 1 ml SOC suspendiert und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen 1 h bei 37°C und 225 rpm (Braun Certomat) inkubiert. Unterschiedliche Volumina (50 - 200 μ l) werden zur Selektion auf antibiotikahaltigen ENB- Platten ausplattiert und 12 - 18 Stunden bei 37°C inkubiert, bis klar abgegrenzte Bakterienkolonien zu erkennen sind.

3.2.4 Chemische Transformation chemisch kompetenter Zellen

[258]

TSS-Medium [258]: 85% LB-Medium, 10 % PEG 8000, 5 % DMSO, 50 mM MgCl₂ pH6.5

3.2.4.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Ein Aliquot Zellen wird über Nacht bei 37°C in 5 ml LB-Medium geschüttelt. Anschließend überführt man 1 ml der Kultur in eine frische, sterile 500 ml Flasche die 100 ml LB-Medium enthält und lässt die Zellen bei 37°C wachsen bis nach ungefähr 2-3 Stunden eine OD₆₀₀ von 0.5 (0.05) erreicht wird. Bei OD₆₀₀=0.5 wird die Kulturflasche für 20 min im Eis gekühlt und die Zellen werden bei 1200 x g für 5 min bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 10 ml eiskaltem TSS resuspendiert und in 100 μ l Aliquots bei -80°C gelagert.

3.2.4.2 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Die für die Transformation vorbereiteten Zellen werden aufgetaut, mit 0.1 - 0.2 μ g DNA (in TE Puffer oder Wasser) versetzt und bei 0°C für etwa 30 min gekühlt. Anschließend werden sie im Wasserbad oder Heizblock für genau 90 s auf genau 42°C erwärmt. Nachdem die Zellen 5 min bei 0°C gekühlt wurden, werden sie für 30-45 min bei 37°C in SOC-Medium kultiviert und 10-100 μ l direkt auf entsprechenden Platten ausgestrichen oder nachdem sie abzentrifugiert und in 10-100 μ l LB-Medium aufgenommen wurden komplett aufgetragen. Die Konzentrierung ist nach Ligationen durchzuführen, da hier der Anteil an Transformanden relativ gering ist. Die Platten inkubieren dann 12 - 18 Stunden bei 37°C bis klar abgegrenzte Bakterienkolonien zu erkennen sind.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Bei größeren DNA-Mengen kann die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren spektralphotometrisch durch Aufnahme eines Absorptionsspektrums bei 240 - 320 nm bzw. die A260 erfolgen (Kontron Uvikon 930 Spektrophotometer). Bei einer Extinktion von 1 und einer Schichtdicke von 1 cm kann die DNA-Konzentration über folgende Beziehungen ermittelt werden:

Nukleinsäuren	Konzentration
dsDNA:	50 µg/ml
ssDNA:	33 µg/ml
ssRNA:	40 µg/ml
Oligonukleotide:	20 µg/ml

Bei geringen DNA-Mengen wird die Konzentration der Nukleotide über eine analytische Agarose-Gelelektrophorese eines Aliquots bestimmt. Bei DNA-Mengen unter 200 ng ist die durch Ethidiumbromid verursachte Fluoreszenz der DNA-Banden direkt proportional zur Menge an DNA. Ein Vergleich der gefärbten, fluoreszierenden Banden mit einem Standard bekannter Konzentration läßt eine Abschätzung der DNA-Menge zu.

3.3.2 Reinigung, Ausfällen und Trocknen von Nukleinsäuren

Die zu reinigende Nukleinsäure-Lösung wird im Verhältnis 1:1 mit wassergesättigtem und mit 2% 2.5 M Tris pH 8.2 gepuffertem Phenol geschüttelt. Nach 2 min wird mit 1/2 Vol. Chloroform / Isoamylalkohol (24 : 1) vermischt und 5 min bei 20000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen. Um Phenolreste zu entfernen wird die Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol wiederholt.

Hnadelt es sich bei der zu reinigenden Nukleinsäure um RNA, so verwendet man meist "saures Phenol", das nur in Wasser äquilibriert wurde. In diesem sauren

Phenol lösen sich eventuell auftretende Kontaminationen von DNA besser, so dass ein zusätzlicher Reinigungseffekt auftritt. Zu der Nukleinsäure-Lösung wird 1/10 Vol. 2 M NaOAc pH 5.52, dann das 2.5-fache Volumen an EtOH zugemischt und die Nukleinsäure 15 min auf Eis ausgefällt. Die Fällungstemperatur kann nach Art und Menge von -80 °C bis Raumtemperatur variieren. Anschließend wird 15 bis 30 min bei 20000 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das weiße Pellet wird mit einer geeigneten Menge 70 % EtOH gewaschen und kurz im Exsiccator oder in einer Speed Vac getrocknet. Die getrocknete Nukleinsäure wird in TE- Puffer oder in H₂O gelöst.

Zur Entfernung kurzer ssDNA-Fragmente und von Nukleotiden aus DNA Präparationen kann mit NH₄OAc umgefällt werden. Die DNA Lösung wird hierzu auf eine Salzkonzentration von 2.5 M NH₄OAc gebracht und 15 min mit eiskaltem EtOH gefällt. Nach Zentrifugation, Waschen mit 70 % EtOH und Trocknen löst man in H₂O und wiederholt dieses Verfahren ein weiteres Mal.

In vielen Fällen kann die Fällung der Nukleinsäure auch durch Zugabe von 0,5 bis 1 Volumenanteil Isopropanol erfolgen. Allerdings wird NaCl leichter mitgefällt und das schwer flüchtigere Isopropanol muss sorgfältig entfernt werden. Geringe DNA/RNA-Präzitationsmengen (<10 µg/ml) lassen sich mit Hilfe von Carriern, wie tRNA, Glykogen oder linearem Polyacrylamid ausfällen.

3.3.3 Präparative Plasmidpräparation zur Transfektion eukaryontischer Zellen

Die Plasmide zur Transfektion in eukaryontische Zellen wurden mit einem Plasmidreinigungssystem der Firma Quiagen aufgereinigt. Bei diesem Verfahren wird die DNA über Ionenaustauschsäulen isoliert und durch Waschschrte von Verunreinigungen wie RNA, Kohlenhydraten, Proteinen und kleinen Metaboliten befreit. Die Qualität und Quantität der Plasmid-DNA wird über Agarosegelelektrophorese und photometrisch bestimmt. Die Plasmid-DNA sollte zum überwiegenden Teil in der "supercoiled Form" vorliegen und die Ratio A₂₆₀/A₂₈₀ zwischen 1,6 und 1,8 liegen.

3.3.4 Plasmidpräparation zur Sequenzierung

[259]

Mit einem Bakterienklon aus einer 2 ml Vorkultur oder aus einer Glycerinkultur wird eine 5 ml TB-Kultur in einem Erlenmeyerkolben oder Propylenröhrchen angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Kultur darf nicht mehr als 1/4 des Gesamtvolumen des Gefäßes einnehmen, so dass genügend Luftzufuhr gewährleistet ist. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß werden bis zu 4,5 ml einer Kultur in mehreren Zentrifugalschritten zu einem Bakterienpellet vereinigt, das anschließend in 200 µl GTE-Puffer durch auf und ab pipetieren resuspendiert wird. Durch Zugabe von 200 µl 0,2 N NaOH/1% SDS und vorsichtiges Mischen durch Inversion des Gefäßes und Inkubation für genau 5 min auf Eis werden die Zellen lysiert. Die Lyse wird durch Zugabe von 300 µl 4.0 M Kaliumacetat, pH 4.8, mischen und 5 min Inkubation auf Eis abgebrochen. Durch 10 min Zentrifugation bei RT werden Zelltrümmer abgetrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die verunreinigende RNA wird durch 20 min Verdau mit Rnase A in einer finalen Konzentration von 20 µg/ml bei 37°C entfernt. Nach dem Verdau wird der Überstand zweimal mit Chloroform extrahiert. Dieser Schritt ist wichtig um gute Sequenzierdaten zu erhalten. Die DNA wird durch Zugabe eines Äquivalentes 100 % Isopropanol und sofortige 10 min Zentrifugation bei RT ausgefällt. Das Pellet wird mit 500 µl entionisiertem H₂O gewaschen und 3 min unter Vakuum getrocknet. Es wird in 32 µl entionisiertem H₂O gelöst und präzipitiert indem zuerst 8.0 µl 4M NaCl und dann 40µl autoklaviertes 13% PEG8000 zugegeben werden. Nach Durchmischung und 20 min Inkubation auf Eis wird die DNA 15 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das meist nicht mehr sichtbare Pellet wird mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, nach vorsichtigem Absaugen des Ethanols 3 min unter Vakuum getrocknet und in 20 µl entionisiertem Wasser gelöst.

3.3.5 RNA Präparation

Gesamt-RNA wurde aus eukaryontischen Zellen mit Hilfe eines RNA-Isolierungssystems der Firma Quiagen gewonnen. Bei der Arbeit mit RNA sind ständig Handschuhe zu benutzen und es ist darauf zu achten, daß die Proben nicht mit kleinsten Spuren von Körperflüssigkeit in Kontakt kommen, da die vorhandenen

RNasen die RNA degradieren würden. Qualität und Quantität wird durch spektrometrische Messung und analytische Agarosegel-Elektrophorese bestimmt.

3.3.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Analytische Spaltungen mit 100 - 500 µg DNA in 10 - 20 µl Ansätzen werden unter von den Herstellern empfohlenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Das Ansatzvolumen präparativer Spaltungen richtet sich nach der eingesetzten DNA-Menge und nach dem Volumenanteil der Enzymstandardlösung, die normalerweise 50 % Glycerin enthält. Der Glyceringehalt des Verdauansatzes sollte weniger als 10 % betragen. Je nach Beschaffenheit der DNA und je nach Anzahl der Schnittstellen, wird mit 1-5 U pro Mikrogramm DNA für zwei bis sechs Stunden bei 37°C gespalten. Eine Unit (Enzymeinheit) ist in der Lage, in einer Stunde 1 µg DNA zu spalten. Der Verdau wird durch Zugabe von 1/4 Vol. 5 x Stop-Puffer (15 % Ficoll, 0.5 % SDS, 50 mM EDTA, 0.5 % BPB, 0.5 % XB in 5 x Tris- Acetatpuffer) und 5 min Erhitzen bei 65°C gestoppt. Die Vollständigkeit der Spaltung wird durch Agarose-Gelelektrophorese eines Aliquots überprüft.

3.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Laufpuffer: 40 mM Tris-Acetat
20 mM NaOAc
1 mM EDTA

EtBr: 5 mg/ml

Die Agarosekonzentration des Gels richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Nukleinsäure [256]:

Größe einer linearen DNA in kbp	Konzentration der Agarose in %
5 - 60	0.3
1 - 20	0.6
0.8 - 10	0.7

0.4 - 7	1.0
0.2 - 4	1.5
0.1 - 3	2.0

Die Agarose wird mit Laufpuffer aufgekocht und mit EtBr (0.5 mg/ml) versetzt. Ein entsprechendes Volumen wird in eine horizontale Gelform gegossen, wobei ein eingesetzter Kamm die Anzahl und die Größe der Geltaschen bestimmt. Die mit 5xStop-Puffer versetzten Proben werden in die Geltaschen gefüllt. Die Auftrennung erfolgt in einer mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer bei maximal 150 mA. Die elektrisch negativ geladenen Nukleinsäure-Fragmente laufen dabei unter der angelegten Spannung zur Anode und werden über ihre je nach Größe der Fragmente unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten aufgetrennt.

Die wegen des zwischen die Nukleotide eingelagerten EtBr unter UV-Licht fluoreszierenden Banden können fotografiert werden. Die Zuordnung der verschiedenen Banden erfolgt durch Vergleich mit DNA-Fragmenten definierter Größe.

3.3.8 DNA-Größenstandards

Folgende DNA-Molekulargewichtsmarker wurden verwendet:

(In Klammern nach den Angaben über die Fragmentlängen: Gewichtsanteil in %)

HMS: 1/bp (λ-Phagen-DNA mit HindIII geschnitten)	LMS: 1/bp
23130 (43)	1608 (21)
9416 (19)	1201 (16)
6682 (14)	999 (13)
4361 (9)	711 (9)
2322 (5)	567 (7.5)
2027 (4)	517 (6.8)
564 (1)	396 (5)
125 (1)	360 (8.6)

	222/219/214 (5.0)
	132/120/112 (6.0)
	75/65/30/27

3.3.9 Amplifikation von DNA (PCR)

Zur Amplifikation von DNA wird die Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) verwendet [260]. Um die Fehlerrate beim Amplifizieren der DNA zu minimieren, wurde bei präparativen Ansätzen Pfu-Polymerase (Promega) verwendet. Durch die 3'→5'-Exonuklease-Aktivität gewährleistet sie eine sehr hohe Genauigkeit. Bei analytischen Ansätzen wurde mit Taq-Polymerase gearbeitet.

PCR-Ansatz:

1 µl sense primer (12,5 µM)
 1 µl antisense primer (12,5 µM)
 2 µl genomische DNA oder 1-2 µg Plasmid
 5 µl 10 x Reaktionspuffer mit oder ohne MgCl₂
 3 µl MgCl₂ (25 mM)
 2 µl dNTPs (10 mM)
 1,25 U Polymerase
 ad 50 µl H₂O
 50 µl

PCR-Programme:

	nested PCR MUC	PCR MUC	PCR EoM1 _{s/as} /EoM2 _{s/as} /HBn	PCR cDNA
1. Denaturierung	5 min 94 °C	5 min 94 °C	5 min 95 °C	5 min 95 °C
2. Denaturierung	1 min 94 °C	1 min 94 °C	1 min 95 °C	1 min 95 °C
3. Hybridisierung*	1 min 53 °C	1 min 53 °C	1 min 55 °C	1 min 56 °C
4. Verlängerung	2 min 72 °C	2 min 72 °C	2 min 72 °C	2 min 72 °C
Zyklen-Zahl	33	33	25	30
5. Auffüllreaktion	5 min 72 °C	5 min 72 °C	8 min 72 °C	5 min 72 °C
6. Kühlung	∞ 4 °C	∞ 4 °C	∞ 4 °C	∞ 4 °C

* Die Primer wurden unter Berücksichtigung einiger Grundregeln ausgesucht[261] [260]. Die Hybridisierungstemperatur für die Primer ist basenabhängig und wurde mit Hilfe eines Oligorechners [262] bestimmt.

3.3.10 Sequenzspezifische Mutagenese mit Hilfe der PCR

Bei der sequenzspezifischen Mutagenese dient ein Plasmid mit dem zu mutierenden DNA-Fragment als Matrize. Es werden ein sense- Primer (ps) und ein antisense-Primer (pas) ausgewählt, die das zu mutierende Fragment einrahmen und zwei Primer sense (pMs) und antisense(pMas), die die Mutation enthalten, aber 5' und 3' der Mutation zur Matrize komplementär sind. Die Sequenz zwischen ps/pMas und zwischen ps/pMas muss Restriktionsschnittstellen enthalten, die später eine Ligation in das Plasmid ermöglichen. Zuerst werden zwei PCRs durchgeführt bei denen das Plasmid als Matrize dient und unterschiedliche Primerkombinationen verwendet werden. Eine PCR mit dem Primerpaar ps/pMas und eine PCR mit dem Primerpaar pas/pMas. Anschließend werden aus beiden Ansätze äquimolare Mengen des amplifizierten Fragmentes vereinigt und eine PCR ohne Primer durchgeführt. Das amplifizierte Fragment enthält die Mutation und Restriktionsschnittstellen, die eine Einklonierung in einen Vektor ermöglichen.

3.3.11 Amplifikation von RNA (RT-PCR)

Für die Amplifikation ist es notwendig, die RNA zunächst in DNA umzuschreiben, da die Ausgangs-RNA sich nicht als direkte Matrize für eine DNA-Polymerase eignet. Hierfür werden reverse Transkriptasen (RTasen) benutzt, die eine zur RNA komplementäre DNA, die cDNA, synthetisieren. Die Gesamtreaktion aus reverser Transkription (RT) und Amplifikation der cDNA wird als RT-PCR bezeichnet.

4 µg RNA werden mit 0,5 µg Oligo(dT)₁₅Primer (Promega) in einem Gesamtvolumen von bis zu 20 µl 5 min auf 70 °C erhitzt und dann auf Eis schnell abgekühlt. Zu dem Ansatz werden 1,25 µl dNTPs (10 µM), 0,6 µl RNasin (ca. 1U/µl Reaktionslösung) und 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase, Rnase H Minus, Punkt Mutante (Promega) zugegeben. Der Reaktionsansatz inkubiert für eine Stunde bei 42 °C und wird anschliessend für 3 min bei 95 °C inaktiviert. Bei allen Arbeiten muss auf Sauberkeit geachtet werden und müssen Rnase freie Loesungen und Geräte

verwendet werden. Die weitere Amplifikation der cDNA ist unter Amplifikation von DNA beschrieben.

3.3.12 Automatisierte DNA - Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von Herrn W. Hädelt an einem DNA-Sequenzer der Firma Applied Biosystems (Modell 373A) durchgeführt.

Diese Didesoxy-Sequenzierung nach Sanger beruht auf dem basenspezifischen Abbruch der DNA-Kettenverlängerung durch den statistischen Einbau von Farbstoffgekoppelten ddNTPs in die von den Primern her wachsende Kette. Es werden dazu vier voneinander getrennte Reaktionen durchgeführt, die alle Template, Primer und dNTPs, aber jeweils verschiedene kettenabbrechende ddNTPs enthalten. Durch den statistischen Einbau der ddNTPs in die sich verlängernden Fragmente kommt es zu einem Kettenabbruch. Nach Abschluß der Polymerase-Reaktion werden die Produkte vereinigt, mit EtOH ausgefällt und in Formamid / 50 mM EDTA pH 8.0 (5 : 1) aufgenommen. Die Reaktionsprodukte werden dann auf einem 7 % Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die in Argon-Laser-Licht unterschiedlich fluoreszierenden DNA-Fragmente werden detektiert und nach Rechnungen mit den Molekulargewichten der Fragmente die Basensequenz bestimmt.

3.4 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

3.4.1 Sterilisation

Die Lösungen thermolabiler Stoffe und Kulturmedien werden sterilfiltriert (0.22 µm Filter), andere Lösungen werden autoklaviert (20 min / 120° C / 1 bar Überdruck).

Alle Glasgeräte (Mediumflaschen und Pipetten) werden vor Gebrauch 6 h bei 180° C im Heißluftschrank sterilisiert.

3.4.2 Medium für Zellkulturen

RPMI 1640 wird nach Angaben des Herstellers mit Millipore-Wasser (deionisiertes Wasser, hochgereinigt über ein Millipore-Q-System) angesetzt, sterilfiltriert (Membranfilter-Sandwich von 0.4 µm und 0.2 µm) und bei 4°C gelagert. Routinemäßig wird auf Mycoplasmen-Kontamination getestet.

RFP: RPMI 1640 (Fertigpulver)

2.2 g / l NaCl

10% FCS (inaktiviert: 30 min 56°C)

100 U / ml Penicillin, 100 µg / ml Streptomycin (wird vor Gebrauch des Mediums zugesetzt)

3.4.3 Kulturbedingungen

Zur Kultivierung der Zellen in bis zu 300 ml Kulturmedium werden sterile Plastik-Kulturflaschen verwendet. In Versuchen mit geringen Volumina (3 bzw. 8 ml), kommen 24- bzw. Napf-Kulturplatten zum Einsatz. Die Inkubation aller verwendeten Zelllinien erfolgt in Brutschränken (Haereus) bei 37°C, 100 % relative Feuchte und 5 % CO₂.

Alle verwendeten Suspensionszellen wurden in RFP-Medium mit 5 x 10⁴ bis 5 x 10⁵ Zellen / ml kultiviert.

Die Ba/F-3-Stat6 Linie ist mL-3 abhängig und wurde daher mit 5 % X63Ag 8-653 BPV (mL-3) Zellüberstand versetzt [263].

3.4.4 Trypsinierung von adherenten Zellen

Adherente Zellen wachsen nur, wenn sie an den Boden des Kulturgefäßes angewachsen sind. Um die Zellen zu zählen oder auch für die Elektroporation müssen die Zellen vom Boden abgelöst und vereinzelt werden. Zum Ablösen der Zellen wird zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen werden mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von soviel 1xTrypsin (0,05% (w/v) Trypsin) oder 1xTrypsin-EDTA (0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA) dass die Zelloberfläche gerade

bedeckt ist und 5 min Inkubation im Brutschrank werden die Zellen abgelöst. Zur Unterstützung der Ablösung schlägt man mehr oder weniger heftig mit der Handfläche vor die Seite der Kulturflasche. Sind die Zellen abgelöst, werden sie in Medium mit FCS resuspendiert. Durch das FCS wird das Trypsin deaktiviert.

3.4.5 Vitalitätsfärbung von Zellen und Zelldichtebestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Zellsuspension erfolgt durch Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer. Die Zellsuspension wird im Verhältnis 1:1 mit einer Trypanblaulösung (0,5 %, in physiologischer Kochsalzlösung) gemischt, für zwei min stehengelassen und anschließend unter dem Mikroskop analysiert. Trypanblau ist ein sog. Vitalfarbstoff, der intakte Cytoplasmamembranen nicht passieren kann und somit nur tote Zellen anfärbt.

3.4.6 Kryokonservierung von Zellen

3.4.6.1 Anlegen von Stammkulturen

RFP

Einfriermedium 10% DMSO in RFP

Kryoröhrchen Nunc-Gefrierbehälter mit Schraubverschluß (1 ml)

Die Zellen werden auf eine Dichte von $1 - 2 \times 10^7$ Zellen pro ml RPMI 1640 eingestellt und auf Eis weiterbehandelt. 700 µl der Zellsuspension (70 %) werden mit 200 µl (20 %) FCS in ein 1.8 ml-Einfrierröhrchen pipettiert. Nach dem Zumischen von 100 µl (10 %) DMSO wird zunächst auf -80°C über Nacht abgekühlt. Erst dann dürfen die Kulturen bei -140°C im Stickstofftank gelagert werden.

3.4.6.2 Auftauen von Stammkulturen

Um die toxische Wirkung von DMSO auf die Zellen zu minimieren, muß beim Auftauen zügig gearbeitet werden. Die Zellen werden hierzu im 37°C Wasserbad kurz angetaut, sofort in 50 ml RPMI 1640 verdünnt und sedimentiert (200 x g, 8

min). Nach einmaligem Waschen werden die Zellen in einem der Zellzahl entsprechenden Volumen RFP kultiviert.

3.4.7 Transfektion eukaryontischer Zellen mit Plasmiden

Die Zellen wurden durch Elektroporation mit einem Easyject™- Elektroporator der Firma Eurogentec mit der Promoter/Reporter-Gen DNA transfiziert. Um die Aktivität der DNA-Konstrukte zu vergleichen werden die Experimente allgemein wie folgt angesetzt:

Die Zellen werden einen Tag vor der Transfektion unter optimalen Kulturbedingungen gehalten, so daß sie sich kurz vor der Transfektion noch vermehren. Zur Transfektion werden Zellen wahlweise nach Ablösen durch Trypsinierung (adherente Zellen) oder (Suspensionszellen) direkt vereinigt und einmal mit RPMI 1640 gewaschen und in RPMI mit 5 % FCS auf eine Konzentration von $1-2 \times 10^7$ /ml gebracht. 350 µl dieser Zellsuspension werden dann mit 30 µg des zu transfizierenden Plasmids vermischt (Menge kann variieren) und in Elektroporationsküvetten (4 mm) 10 min inkubiert. Die Elektroporationsparameter sind von der zu elektroporierenden Zellsorte abhängig. In dieser Arbeit wurde bei einem Widerstand von 1200 µF bei Fibroblasten eine Spannung von 190 V, bei A549 Zellen von 210 V und bei Ramos von 230 V verwendet. Nach dem die Zellen elektroporiert wurden, werden sie sehr zügig mit 700 µl RFP aus der Küvette gewaschen und in ein 50 ml Propylen-Röhrchen mit Kulturmedium überführt. Besteht der Assay aus mehreren Elektroporationen mit einem Plasmid werden diese vereinigt. Anschließend inkubiert man die frisch transfizierten Zellen für 20 min im Brutschrank, zentrifugiert die Zellen ab, nimmt sie in einer entsprechenden Menge Medium auf und verteilt sie auf die Kulturgefäße in denen sie stimuliert werden sollen. Ramos werden in 15 ml Propylenröhrchen (1 Elpo, 1 Röhrchen, 1 Assaypunkt), A549 in 6-well-Platten (1 Elpo, 2 Platten, 12 Assaypunkte) und Fibroblasten in 6-well-Platten (1 Elpo, 3 Platten, 18 Assaypunkte) überführt. Nachdem sie über Nacht oder für einige Stunden im Brutschrank kultiviert wurden, können sie mit Cytokinen stimuliert werden.

3.4.8 Lysieren von Zellen für eine Luciferasemessung

Mit Luciferasereporterplasmiden transfizierte adherente Zellen werden nach der Stimulation mit PBS gewaschen, durch Zugabe von Luciferaselysispuffer (25 mM Tris-phosphat, 2 mM DTT, 2 mM 1,2-diaminocyclohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure, 10% Glycerin, 1% Triton(r) X-100; Promega), Einfrieren bei -20°C und anschließendes Wippen für 15 min bei RT lysiert. (200 µl für 1 well einer 6-well-Platte). Die Lysate werden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

Transfizierte Suspensionszellen werden abzentrifugiert mit PBS gewaschen, abzentrifugiert, in Lysispuffer aufgenommen (50 µl bei Ramos) und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nachdem sie gevortext wurden, werden sie bei -20°C eingefroren, aufgetaut und 15 min bei RT geschüttelt.

Die Lysate werden durch Zentrifugation von den Zelltrümmern und der DNA befreit. Aus dem Überstand wird von jedem Lysat eine in einem Vorversuch aus einem einzelnen Lysat zu ermittelnde Menge in Messplatten für Luciferasemessung übertragen (ca. 5-50 µl). Bei der Messung in einem Luminometer der Firma Berthold werden automatisch 200 µl LUC-Assay-Substrat-Mix (20 mM Tricine-KOH, 0.1 mM EDTA, 8 mM MgCl₂, 33.3 mM DTT, 270 µM ATP, 400 µM Luciferin; Promega Luciferase Assay Substrate) in die Probe injiziert. Das firefly-Luciferase-Enzym katalysiert eine Reaktion bei der in Gegenwart von Sauerstoff und Mg²⁺ unter Verbrauch von d-Luciferin und ATP Licht emittiert wird. Die Gesamtmenge an Licht in einem bestimmten Zeitintervall ist proportional der Luciferase-Aktivität in der Probe. In einigen Fällen ist es sinnvoll die Proben auf ein konstitutiv aktives Renilla-Reporterplasmid zu normieren. Hierbei wird zusätzlich ein zweites ähnliches Enzym, die Renilla-Luciferase, mit einem spezifischen Substrat verwendet, das vor der firefly-Luciferase-Messung deaktiviert wird (Promega Dual Luciferase System).

3.4.9 Überprüfung von Zellkulturen auf Kontamination mit Mykoplasmen

Zelllinien in Kultur werden regelmässig unter Verwendung des Mycoplasma PCR ELISA Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers auf Kontamination mit Mycoplasmen überprüft.

3.5 Proteinchemische Methoden

3.5.1 Direkte Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Proteinkonzentrationen werden photometrisch im Bereich von 250 - 320 nm an einem Spektralphotometer bestimmt (Kontron Uvikon 930 Spectrophotometer). Eine Extinktion von 1 bei 280 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht einer Proteinkonzentration von ca. 1 mg / ml.

3.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

[264]

Diese Proteinbestimmung beruht auf Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen

Färbe-Reagenz: 0.1 mg/ml Coomassie Brilliant Blue G250 (entspricht 0.07 mg/ml Coomassie Brilliant Blue G)

4.8 % (v/v) EtOH

8.5 % (v/v) Phosphorsäure

Der Farbstoff (10 mg) wird in EtOH gelöst, mit Phosphorsäure versetzt (10 ml) und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Nach Filtration über einen Faltenfilter wird die Lösung bei 4°C gelagert.

Die Proteinkonzentrationen werden photometrisch durch Messung der OD₅₉₅ (ELISA-Reader) bestimmt. Die Messung wird in einer 96 Napfplatte durchgeführt. Von jeder Probe wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die ersten drei Näpfe werden leer gelassen, da sie als Leerwert zum Eichen des ELISA-Readers dienen. In die nachfolgenden Näpfe werden jeweils 3 x 2 µl einer BSA-Konzentrationsreihe (0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35 µg/µl) pipetiert. Anschliessend werden 3 x 2 µl eines verdünnten Aliquots der zu bestimmenden Proteinlösung bzw. des Proteinextraktes vorgelegt und in jeden Napf 200 µl Färbelösung pipetiert, gemischt und nach 2 min innerhalb von 5 min gemessen. Die Probenkonzentrationen können durch Extrapolation aus einer mit BSA-Standards erstellten Eichkurve ermittelt werden.

3.5.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen und Peptiden

3.5.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

[265]

AA/BAA:	30 % Acrylamid 0.8 % N,N'-Methylenbisacrylamid Lösung nach Filtration bei 4 °C lagern
4 × Lower-Tris:	1.5 M Tris-HCl pH 8.8 0.4 % SDS
4 × Upper-Tris:	0.5 M Tris-HCl pH 6.8 0.4 % SDS
TEMED, 40 % APS, 87 % Glycerin	
SDS-Pobenpuffer:	62.5 mM Tris/HCl pH 6.8 2 % SDS 20 % Glycerin (87 %) 1 ‰ BPB (für reduzierenden Probenpuffer wird 5 % β-Mercaptoethanol zugegeben); (kann aus 2-4x verdünnten Stammlösungen verdünnt werden)

In denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen werden Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgt in dem Vertikal-Gelelektrophorese System Mini-V 8.10 (Gibco BRL). Für ein SDS-Gel (Schichtdicke 0.75 mm) werden folgende Lösungen benötigt:

	Sammelgel	7.5 % Trenngel	9 % Trenngel
AA/BAA	0.5 ml	1.25 ml	1.5 ml
4 × Lower Tris		1.25 ml	1.25 ml
4 × Upper-Tris	1.25 ml		
H₂O	3.2 ml	1.5 ml	1.25 ml
87 % Glycerin		1 ml	1 ml
TEMED	12 µl	4.5 µl	5.5 µl
40 % APS	12 µl	4.5 µl	5.5 µl

Tab. 3-1 Pipettierschema für denaturierende SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli

Die Proteinproben werden vor dem Auftragen in einem geeigneten Verhältnis mit SDS-Probenpuffer gemischt und zur vollständigen Denaturierung und Reduktion der Proteine 5 min bei 95 °C inkubiert. Zur Fokussierung der Banden läßt man die Proteine bei 100 V ins Sammelgel einlaufen und erhöht, nachdem die Proteine ins Trenngel eingelaufen sind, die Spannung auf 150 V.

Nach Abschluß des Laufs wird das Gel mit Coomassie oder Silber gefärbt oder die Proteine werden zur Immundetektion auf Nitrocellulosemembran geblottet.

3.5.3.2 Nachweis von in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen

Die Proteine können direkt im Gel angefärbt werden. Es wurden Coomassie- und Silberfärbung verwendet.

Coomassie-Färbelösung: 0.25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 in
Entfärbelösung

Entfärbelösung: 1 Vol. Essigsäure (100 %)

1 Vol. Methanol

8 Vol. H₂O

Die Coomassie-Färbung ist ein sehr einfaches und schnelles Verfahren zur Detektion von Proteinen bis zu einer Konzentration von 100 ng bis 1 µg. Nach Abschluß des Laufs wird das Gel 30 min in Coomassie Färbelösung geschwenkt und anschließend der überschüssige Farbstoff mit Entfärbelösung entfernt.

Ein sensitiveres aber aufwendigeres Verfahren ist die Silberfärbung. Diese Methode beruht nicht auf der Bindung eines Farbstoffes sondern auf der Initiierung einer RedOx-Reaktion. Einige Silberionen werden von den Proteinen gebunden und durch Reduktion in Silberkeimlinge umgewandelt, initiiert von den funktionellen Gruppen und den Peptidbindungen. Anschliessend werden durch ein starkes Reduktionsmittel alle Silberionen in metallisches Silber umgewandelt. Da die Reduktion an den Silberkeimlingen am schnellsten abläuft, kann durch rechtzeitigen Abbruch der Reaktion eine selektive Ablagerung von Silber an den Stellen erreicht werden, wo sich Proteine im Gel befinden. Mit der Silberfärbung können bis zu 50 ng Protein nachgewiesen werden.

50% (v/v) Aceton in Wasser

50% (w/v) Trichloressigsäure in Wasser (im Glasgefäss aufbewahren)

20% (w/v) Silbernitrat in Wasser (dunkel aufbewahren, nicht zu lange verwenden)

10% (w/v) Natriumthiosulfatpentahydrat in Wasser

1% (w/v) Essigsäure

37% (w/w) Formaldehyd

Lsg 1: 30 ml 50% Aceton, 0,75 ml 50% Trichloressigsäure, 12,5 µl Formaldehyd

Lsg 2: 50% Aceton

Lsg 3: 100 µl 10% Natriumthiosulfat in 30 ml Wasser

Lsg 4: 0,4 ml Silbernitrat, 0,3 ml Formaldehyd, 30 ml Wasser

Lsg 5: 0,6 g Natriumcarbonat, 12,5 µl Formaldehyd, 25 µl Natriumthiosulfat, 60ml Wasser

Lsg 6: 1% Essigsäure

Das Gel wird nach dem Lauf 5 min in Lsg 1 gewippt. Anschliessend wird es 3 x 5 s , 1 x 5 min und noch mal 3 x 5 s mit Wasser gewaschen. Nach 5 min Wippen in Lsg 2 wird das Gel 1 min in Lösung 3 geschwenkt, 3 x 5 s mit Wasser gewaschen und 8 min in Lösung 4 auf der Wippe inkubiert. Nachdem 5 x 5 s mit Wasser gewaschen wurde, wird Lösung 5 zugegeben und sobald Banden bräunlich erscheinen die Reaktion mit Lsg 6 gestoppt. Es muß beachtet werden das die Reaktion auch nach Zugabe von Lsg 6 noch kurze Zeit weiterläuft und das Gel noch nachdunkelt.

Mit Coomassie oder Silber angefärbte Gele werden zur Aufbewahrung getrocknet, d.h. das Gel wird 1 h in einer 30 %igen Methanol-Lösung geschüttelt und anschließend zwischen zwei Cellophanfolien in einem Spannrahmen getrocknet.

3.5.3.3 Protein-Größenstandards

Protein	Molekulargewicht		
	LM-Standard	HM-Standard	SDS 7B-Standard
Myosin		200 000 Da	
α_2 -Macroglobulin			180 000 Da
β -Galactosidase		116 000 Da	116 000 Da
Phosphorylase B	94 000 Da	94 000 Da	
Fructose-6-phosphatKinase			84 000 Da
Ovotransferrin		78 000 Da	
Albumin	67 000 Da		
PyruvatKinase			58 000 Da
GlutamatDehydrogenase		56 000 Da	
Fumarase			48 500 Da
Ovalbumin	43 000 Da	43 000 Da	
LactatDehydrogenase			36 500 Da
Carboanhydrase	30 000 Da		
TriosephosphatIsomerase			26 600 Da
Trypsin-Inhibitor	20 100 Da		
Lactalbumin	14 400 Da		

Tab. 3-2 Größenstandards für Proteingele

3.6 Methode zur Charakterisierung von Zellproteinen

3.6.1 Zellyse

3.6.1.1 Gesamtzelllysate für die SDS-Gelelektrophorese

2 × SDS-Probenpuffer: 100 mM Tris-HCl, pH 6.8
 4 % SDS
 52 mM DTT
 20 % Glycerin
 0.1 % BPB

Benzonase (Merck)

Die Zellen werden in RFP mit oder ohne Wachstumsfaktoren inkubiert, pelletiert und in 2 × SDS-Probenpuffer aufgenommen (max. 1×10^8 Zellen/ml) resuspendiert. Nach Zugabe von 1 - 3 % Benzonase werden die Proben 15 min bei RT geschüttelt

und im Anschluß daran 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Proben können dann bei -20 °C kurzzeitig gelagert werden oder sofort durch SDS-Gelelektrophorese und Western Blot weiter analysiert werden.

3.6.1.2 Kernextrakte

3.6.1.2.1 Inhibitoren

Inhibitor	Endkonzentration
Aprotinin	2 µg/ml
Leupeptin	50 µg/ml
PMSF	170 µg/ml
Protease Inhibitor Cocktail (Boehringer Mannheim)	Entsprechend Herstellerangaben

Inhibitor	Endkonzentration
Natriumorthovanadat	180 µg/ml
Aprotinin	2 µg/ml
PMSF	170 µg/ml

3.6.1.2.2 Grobe Kernextrakte

Puffer A : 10 mM HEPES (pH 7.9)
 1.5 mM MgCl₂
 10 mM KCl

1 x TGED : 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)
 1mM EDTA
 10 % (v/v) glycerol
 0.01% (v/v) Triton X-100
 x mM NaCl
 (entsprechend konzentriert 2 x TGED)

Niedrig-Salz-Lysispuffer: 20 mM HEPES
 20% Glycerin
 50 mM KCl
 1 mM EDTA
 100 mM NaCl

Ein Zellpellet von $1,5-3 \times 10^7$ Zellen wird in der fünffachen Volumenmenge Puffer A mit frisch zugesetzten Protease- und Phosphatase-Inhibitoren aufgenommen und gevortext. Nach 15-20 min Inkubation auf Eis werden die Zellen wieder heftig gevortext und bei $25000 \times g$ 20min bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in der fünffachen Menge Niedrigsalzlysispuffer oder TGED-Puffer mit zugesetzten Protease- und Phosphatase-Inhibitoren aufgenommen, resuspendiert und je viermal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und gevortext.

3.6.1.2.3 Kernextrakte und zelluläre Extrakte nach Dignam [266]

Puffer B: 0.3 M HEPES (pH 7.9)

1.4 M KCl

0.03 M MgCl_2

Puffer C: 20 mM HEPES (pH 7.9)

25 % Glycerin

0.42 M NaCl

1.5 mM MgCl_2

0.2 mM EDTA

Puffer D: 20 mM HEPES (pH 7.9)

20 % Glycerin

0.1 M KCl

0.2 mM EDTA

$2-3 \times 10^7$ Zellen werden in 5 Volumina kaltem PBS-Puffer gewaschen und die Zellsuspension in 2 ml Propylen-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen werden bei $1000 \times g$ 10 min bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in fünf Volumina Puffer A mit frisch zugesetzten Protease- und Phosphatase-Inhibitoren aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Zentrifugation, Verwerfen des Überstandes und Aufnahme in Puffer A werden wiederholt. Das Pellet wird heftig gevortext, wobei die Zellyse über Trypanblaufärbung unter dem Mikroskop überprüft wird. Wenn in die Mehrzahl der

Zellen Trypanblau eindringen kann, wird wieder bei 1000 x g 10 min bei einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert und der Überstand als zelluläre Fraktion in 2 ml Propylen-Reaktionsgefässen aufgehoben. Das Zellkern-Pellet wird bei 25000 x g 20 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand mit der zellulären Fraktion vereinigt. Die zelluläre Fraktion wird mit 0,11 Volumina Puffer B vereinigt und durch Zentrifugation (25000 x g 20 min 4 °C) von festen Bestandteilen befreit. Durch Dialyse oder Zentrifugationssäulen (Eppendorf) kann der Puffer gegen einen geeigneten Puffer, zum Beispiel Puffer D oder TGED ausgetauscht werden.

Das Pellet aus den Zellkernen wird entweder wie unter 3.6.1.2.2 über Gefrieren-/Auftauen lysiert oder in 2,5 ml Puffer C mit frisch zugesetzten Inhibitoren aufgenommen und heftig gevortext. Anschliessend rotiert man die Zellkernsuspension für 30 min bei 4 °C. Nach einer Zentrifugation bei 25000 x g 20 min bei 4 °C wird der Überstand, der Kernextrakt, in ein 1,5 ml Propylen Reaktionsgefäß überführt. Durch Dialyse oder Zentrifugationssäulen (Eppendorf) wird der Puffer gegen einen geeigneten Puffer, zum Beispiel Puffer D oder TGED ausgetauscht.

3.6.1.3 Zelllysate zur Immunpräzipitation

NP-40 Lysispuffer: 25 mM Tris, pH 7.5
 140 mM NaCl
 1 mM EDTA
 0.5 % Nonidet P-40
 1 mM Na₃VO₄

Dem milden Lysispuffer [267] wird kurz vor Verwendung noch Complete[®] Protease Inhibitor Cocktail (Roche) zugegeben. Hierbei werden die Angaben des Herstellers beachtet.

Die Zellen werden die angegebenen Zeiten in RFP mit oder ohne Wachstumsfaktoren im Brutschrank bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert, pelletiert und in eiskaltem Lysispuffer (max. 1 × 10⁸ Zellen/ml) aufgenommen. Die Zelllysate können bei -80 °C für maximal 6 Monate bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden.

3.6.2 Immunpräzipitation

Waschpuffer: 100 mM Tris-HCl, pH 8.0
0.5 M LiCl

SDS-Probenpuffer

Die Aufarbeitung der Lysate und die Immunpräzipitation erfolgen bei 4 °C. Alle Zellysate werden ca. 30 min unter kontinuierlicher Rotation inkubiert, danach werden die unlöslichen Bestandteile bei 10000 × g (15 min) abzentrifugiert. Die klaren Überstände werden wiederum unter Rotieren mit den Präzipitationsantikörpern inkubiert (2 - 14 h, 4 °C) und die Immunkomplexe für 1 h mit Protein A/G-Sepharose (Santa Cruz) gebunden.

Die Immunpräzipitate werden danach zweimal mit Lysispuffer und zweimal mit Waschpuffer gewaschen, in SDS-Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95 °C inkubiert und dann mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese und Westernblot weiter untersucht.

3.6.3 Western Blot

Blot Puffer: 25 mM Tris-HCl, pH 8.3
192 mM Glycin
20 % (v/v) Methanol

Beim Western Blot wird das gesamte Bandenmuster eines Proteingels auf Nitrocellulosefolie (Schleicher & Schüll BA 85) übertragen. Die Nitrocellulosefolie wird mindestens 10 min in Blot Puffer äquilibriert und anschließend zusammen mit dem Polyacrylamidgel zwischen zwei Whatman-Filtern in die Blot Kammer eingespannt, deren Tank mit Blot Puffer gefüllt ist. Es dürfen hierbei keine Luftblasen zwischen Gel und Nitrocellulose auftreten. Der Transfer erfolgt von der Kathode zur Anode bei 160 V für 70 min.

Nach dem Transfer wird das Sandwich entnommen; das Gel kann zur Kontrolle, ob der Transfer quantitativ erfolgte, mit Coomassie Blue nachgefärbt werden. Die

Proteine auf der Membran können danach auf verschiedene Weise nachgewiesen werden.

3.6.4 Amidoschwarz Anfärbung

Färbelösung:	0.1 % (w/v) Amidoschwarz in 50 % Methanol 10 % Essigsäure (100 %) 40 % H ₂ O
Entfärber:	10 % Essigsäure (100 %) 10 % Methanol 80 % H ₂ O

Zum Nachweis aller Proteine auf der Nitrocellulose-Membran kann eine Anfärbung mit Amidoschwarz vorgenommen werden. Die Nitrocellulose-Folie wird für 10 min in der Färbelösung geschwenkt und anschließend nicht gebundenes Amidoschwarz durch Schwenken im Entfärber herausgewaschen. Die gefärbten Membranen werden entweder mit Wasser gewaschen und getrocknet oder in Folie eingeschweisst. So behandelte Membranen können keiner anderen Färbung mehr unterzogen werden.

3.6.5 Immunanfärbung und Detektion

TBST:	100 mM Tris-HCl, pH 7.5 100 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 0.05 % (v/v) Tween 20
Block Puffer A:	TBST 5 % (w/v) Milchpulver
Block Puffer B:	TBST 3 % (w/v) BSA
Primärantikörper:	0.1 - 5 µg/ml in Block Puffer A oder B
Sekundärantikörper:	1:200 - 1:20000 in Block Puffer A

Die Western Blot Membran wird 1 bis 2 h auf einem Schüttler bei RT in Block Puffer A geblockt. Nach Entfernen dieses Puffers wird die Primärantikörper-Lösung auf die Membran gegeben und 2 h bei RT inkubiert. Richtet sich der Erstantikörper gegen Phospho-Tyrosinreste wird er in Block Puffer B angesetzt, in allen anderen Fällen in Block Puffer A. Der Blot wird dann dreimal mit TBST gewaschen. Wird der Peroxidase gekoppelte Primärantikörper verwendet, wird die Nitrocellulose-Membran jetzt detektiert. Im Falle eines ungekoppelten primären Antikörpers wird noch 1 h mit der Sekundärantikörper-Lösung inkubiert, dann wiederum 3×5 min mit TBST gewaschen und detektiert.

3.6.5.1 Luminoldetektion

Luminol-Lösung: 100 mM Tris-HCl, pH 8.5
2.5 mM Luminol
1 % (v/v) DMSO
50 mM p-Cumarsäure als Enhancer
H₂O₂-Lösung: 100 mM Tris-HCl, pH 8.5
0.5 % (v/v) 30 %ige H₂O₂

Die Blot-Membran wird 1 - 2 min in einem 1 : 1 Gemisch aus Luminol-Lösung und H₂O₂-Lösung geschwenkt. Im Anschluß daran läßt man die Membran kurz abtropfen, trocknet diese kurz auf Filterpapier und legt die Nitrocellulose zwischen Klarsichtfolie. In einer Autoradiographie-Kassette werden die Filme je nach Lumineszenz-Intensität zwischen 1 s und 1 h belichtet.

3.6.6 Ablösen der Detektionsantikörper von Nitrocellulose-membranen

Strip-Puffer A: 100 mM Glycin; pH 2.9
Strip-Puffer B: 62.5 mM Tris-HCl; pH 8.5
100 mM β -Mercaptoethanol
2 % SDS

Zum Entfernen des anti-Phosphotyrosin Antikörpers RC-20 und des anti-PhosphoStat6 Antikörpers werden die Membranen für 20 min bei RT in Strip-Puffer A inkubiert und anschließend dreimal 5 min mit TBST gewaschen.

Alle anderen benutzten Antikörper werden mit Strip-Puffer B innerhalb von 25 min bei 55 °C abgelöst. Die Blotmembran wird dann fünfmal für 5 min mit TBST gewaschen, um das SDS möglichst vollständig zu entfernen.

Die Nitrocellulosemembranen können jetzt erneut geblockt und detektiert werden.

3.7 Magnetkügelchen/Magnetobeads

[268-270]

3.7.1 Herstellung von biotinylierten Promotorfragmenten zur Kopplung an Magnetobeads

PNK

ATP

Phenol/Tris/IAA

EtOH (100%/70%)

NaOAc 3M

Ligase

Klenow

Biotin-14dATP (0.4 mM, Gibco)

1mM dNTPs without ATP

Puffer B_{mb}: 50 mM NaOAc pH 7.5, 1M NaCl

10 M NH₄OAc

1mg/ml Glykogen

Promotorfragmente, die als Oligomere an Magnetkügelchen gebunden werden sollen, lässt man zuerst einzelsträngig in sense und antisense Richtung synthetisieren (Interaktiva). Damit die Sequenz fehlerfrei synthetisiert werden kann, darf sie nicht zu lang sein, was mit dem Hersteller abgeklärt werden sollte. Im allgemeinen ist eine Länge von 50 bp eine sinnvolle Länge. An die 5'-Enden wird die Basenfolge „GATC“ zugefügt, so dass die doppelsträngigen Fragmente aneinander ligiert werden können.

25 µl Oligos (100 pmol/µl), jeweils ein Ansatz sense und ein Ansatz antisense, werden mit 3.5 µl H₂O, 2 µl 10 mM ATP, 3.6 µl 10 x PNK-Puffer und 2 µl PNK (10U/µl) eine Stunde auf 37°C erwärmt. Anschliessend werden beide Ansätze vereinigt, 5 min auf 95 °C erhitzt und im Heizblock auf Raumtemperatur abgekühlt. Nachdem mit 70 µl Phenol/Tris, 2x mit 65 µl Chloroform/Isoamylalkohol

ausgeschüttelt worden ist, wird mit 730 μ l Ethanol/NaOAc ausgefällt und mit 100 μ l Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet, die phosphorylierten doppelsträngigen Oligos, werden in H₂O aufgenommen und in einem Reaktionsansatz von 90 μ l mit DNA-Ligase(5U) über Nacht in einem Temperaturgradienten von 12 bis 17 °C auf bis zu 1 kb aufligiert. Die Aufligierung wird durch Auftrag von 1 μ l auf ein Agarosegel kontrolliert. Es wird wieder mit Phenol/Chloroform/IAA ausgeschüttelt und gefällt. Das DNA-Pellet, die auf 1 kb aufligierten phosphorylierten doppelsträngigen Oligos, werden in 10 μ l H₂O aufgenommen, mit 20 μ l Biotin-dATP (0.4M, Gibco), 20 μ l dNTPs ohne ATPs (1mM), 16 U Klenow in 10 x Klenowpuffer in 90 min bei 15 °C biotinyliert. Wieder wird mit Phenol/Tris/Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt und zweimal mit 600 μ l Ethanol, 40 μ l Ammoniumacetat (10 mM), 4 μ l Glykogen (1mg/ml) ausgefällt und schliesslich in 250 μ l Puffer B_{mb} aufgenommen.

3.7.2 Kopplung von Biotin-Oligos an Streptavidinmagnetkügelchen

Bei der Kopplung der Biotin-Oligos an Magnetkügelchen verfährt man unterschiedlich, je nachdem, ob man ein System ohne(z.B. M-280 Dynal) oder mit Säulen verwendet (z.B. Microbeads Miltenyi).

Bei der Kopplung ohne Säulen werden 200 μ l Magnetkügelchen (10 mg/ml) in ein 1.5 ml Propylenreaktionsgefäss überführt. Das Gefäss wird in den Magnetständer gestellt und abgewartet bis die braunen Kügelchen sich an der dem Magneten zugewandten Seite abgesetzt haben. Jetzt wird die Flüssigkeit vorsichtig abgenommen und die Kügelchen werden ausserhalb des Magnetständers durch sorgfältiges resuspendieren in 200 μ l Puffer B_{mb} aufgenommen. Durch zweimaliges Wiederholen werden die Kügelchen gewaschen.

Nachdem Puffer B_{mb} zum zweiten Mal abgenommen wurde, nimmt man die Kügelchen in 500 μ l Kupplungslösung auf. Die Kupplungslösung setzt sich aus 100 μ l Biotin-Oligos und 400 μ l Puffer B_{mb} zusammen, deren DNA Konzentration photometrisch über die Absorption bei 260 nm (A_{260}) bestimmt worden ist. Durch 15 bis 30 min Inkubation bei RT werden die oligos an die Kügelchen gekoppelt. Die Kupplung wird durch Bestimmung der A_{260} überprüft. Es sollten ungefähr 10 μ g DNA gebunden werden. Nach Abschluss der Bindereaktion werden die Kügelchen im Aufbewahrungspuffer (Puffer A_{mb} oder TGED) gewaschen und bei 4°C im Dunklen gelagert.

Bei kleinen Magnetkügelchen wird das Magnetfeld durch einen Metallmantel in einer Säule so verstärkt, dass es ausreicht um die Kügelchen zu binden. Die Säule wird zuerst durch Waschen mit Äquilibrationspuffer im Magnetständer eingestellt. Dann werden die Mikrokügelchen auf die Säule aufgetragen. Nachdem die Flüssigkeit abgelaufen ist, wird die Säule in ein 1.5 ml Reaktionsgefäss ausserhalb des Magnetständers gestellt und die Kügelchen werden mit Kupplungslösung ausgewaschen. Die Kügelchen werden 15 min bei RT rotiert. Die Kügelchen werden auf die Säule im Magnetständer aufgetragen. Durch Bestimmung der A_{260} der Kupplungslösung vor der Inkubation und des Durchlaufes wird die Kupplungsreaktion kontrolliert. Anschliessend werden die Kügelchen im Aufbewahrungspuffer (Puffer A_{mb} oder TGED) gewaschen und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

3.7.3 Isolierung von Transkriptionsfaktoren mit Oligo-Magnetkügelchen

500 µl Oligo-Magnetkügelchen in Aufbewahrungspuffer werden in einem 1.5 ml Reaktionsgefäss resuspendiert und in den Magnetständer gestellt. Nachdem sich die Kügelchen abgesetzt haben, werden sie in 700 µl TGED 25 mM NaCl mit 8 mg BSA aufgenommen und 30 min bei 4 °C rotiert. Mit Hilfe des Magnetfeldes werden die Kügelchen dann wieder fixiert, die Flüssigkeit abgenommen und die Kügelchen in Flüssigkeit aufgenommen. Nach zweimaligen Waschen werden sie in Reaktionslösung aufgenommen. Die Reaktionslösung besteht aus 800 µg Protein Kernextrakt in Reaktionspuffer. Reaktionspuffer ist TGED x nM NaCl oder Niedrigsalzlysispuffer. Die Oligokügelchen werden 1 h in der Reaktionslösung bei 4 °C rotiert. Mit Hilfe des Magnetständers werden die Kügelchen anschliessend 3 x mit Waschpuffer gewaschen, wobei bei einem Waschvorgang das Reaktionsgefäss gegen ein neues ausgetauscht wird. Die Effektivität des Waschvorganges kann, falls notwendig, durch Beimengung von DNA-Fragmenten ohne Transkriptionsfaktor-Konsensussequenzen erhöht werden. Anschliessend werden die Kügelchen in Elutionspuffer (TGED 1M NaCl, Puffer B_{mb}) resuspendiert und 30 min bei 4 °C rotiert. Mit Hilfe des Magnetfeldes werden die Kügelchen schliesslich fixiert und das Eluat mit SDS-Probenpuffer 5 min bei 95 °C aufgeköcht und mit SDS-PAGE/Immunoblot oder SDS-PAGE/Silberfärbung weiteranalysiert. Die Kügelchen werden 2 x in Elutionspuffer und 2 x in Aufbewahrungspuffer gewaschen und können wieder bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt werden.

Die Verwendung von Mikrokügelchen folgt dem gleichen Prinzip, der Ablauf muss lediglich der Verwendung von Säulen angepasst werden.

4 Ergebnisse

4.1 Regulierung des Eotaxin-1- Promotors

Eosinophile spielen eine zentrale Rolle bei der Immunpathologie allergischer Erkrankungen. Einer der stärksten IL-4 regulierten Rekrutierungsfaktoren für Eosinophile ist das CC-Chemokin Eotaxin-1. Betrachtet man die Sequenz des Eotaxin-1-Promotors [248], so fällt in der Nähe des Transkriptionsstarts eine Stat6-Consensus-Sequenz auf, die mit einer NFκB-Consensus-Sequenz überlappt (Abb. 8). Dieser Teil des Promotors sollte näher untersucht werden.

```
2161 TTTCCCCGAC TACAGGTGTT TCATTTCAAC TCATCCCCTA GGCCTTGGT TTTCTTGCTC
2221 TCTTCCCCCA CTACAGATGT TTAAC TTCAT TTCATAACCA CATATTCCCC TCCTTTTCCA
2281 AGGCAAGATC CAGATGGATT AAAAATTGTA CCAAGTCCCT CCTACTAGTC TTGCCTCTCT
2341 TCTGTTCTGC TTGACTTCCT AGGATCTGGA ATCTGGTCAG CAATCAGGAA TCCCTTCATC
2401 GTGACCCCGC ATGGGCAAAG GCTTCCCTGG AATCTCCCAC ACTGTCTGCT CCCTATAAAA
2461 GGCAGGCAGA TGGGCCAGAG GAGCAGAGAG GCTGAG
```

Stat6 NFκB

Abb. 8 Ausschnitt aus der Sequenz des Eotaxin-1-Promotors. Der Teil der Sequenz, der für die Reporter-genexperimente verwendet wurde, ist grau unterlegt. Die Konsensus-Sequenzen für Stat6 und NFκB sind durch Einrahmungen markiert.

Die Experimente wurden in dermalen Fibroblasten und A549 Zellen durchgeführt. Die beiden Zelltypen sind erstens beispielhaft aus einem Gewebe, das bei allergischen Erkrankungen unterschiedlicher Ausprägung betroffen ist. A549 Zellen sind Epithelzellen aus der Lunge (Asthma) und dermale Fibroblasten sind aus der Haut (atopische Dermatitis). Zweitens handelt es sich bei den Fibroblasten im Gegensatz zu den A549 Zellen um eine Primärzelle, so dass durch die Transformation bei Zelllinien möglicherweise entstandene Effekte in diesem Fall ausgeschlossen werden können. Außerdem ist bekannt, daß sowohl Lungenepithelzellen, als auch Fibroblasten Eotaxin segregieren.

4.1.1 Stat-6 und NFκB-p65 binden an den Eotaxin-1-Promotor

Um nachzuweisen, ob IL-4 aktiviertes Stat6 und TNF-α aktivierte NFκB-Faktoren (p50/p65) an den Eotaxin-1-Promoter binden können, wurden Experimente mit an Magnetkügelchen gekoppelter Eotaxin-1-Promoter-DNA durchgeführt (Abb. 9). Magnetkügelchen-Experimente werden in einem späteren Kapitel genauer beschrieben.

Die Kügelchen wurden mit verschiedenen Kernextrakten aus Fibroblasten oder A549-Zellen inkubiert. Die Zellen waren vor der Extraktpräparation entweder unstimuliert, mit IL-4, TNF-α oder beiden Faktoren stimuliert worden. Nachdem durch mehrere Waschschrte leicht bindende Proteine entfernt worden waren, wurden die noch gebundenen Proteine, potentielle Transkriptionsfaktoren, durch Elution mit einem Hochsalzpuffern eluiert. Die Eluate wurden mit SDS-PAGE/Immunoblot-Analyse auf Stat6, NFκB-p50 und NFκB-p65 untersucht. Die Funktion der Antikörper wurde an Zellextrakten überprüft (nicht gezeigtes Experiment).

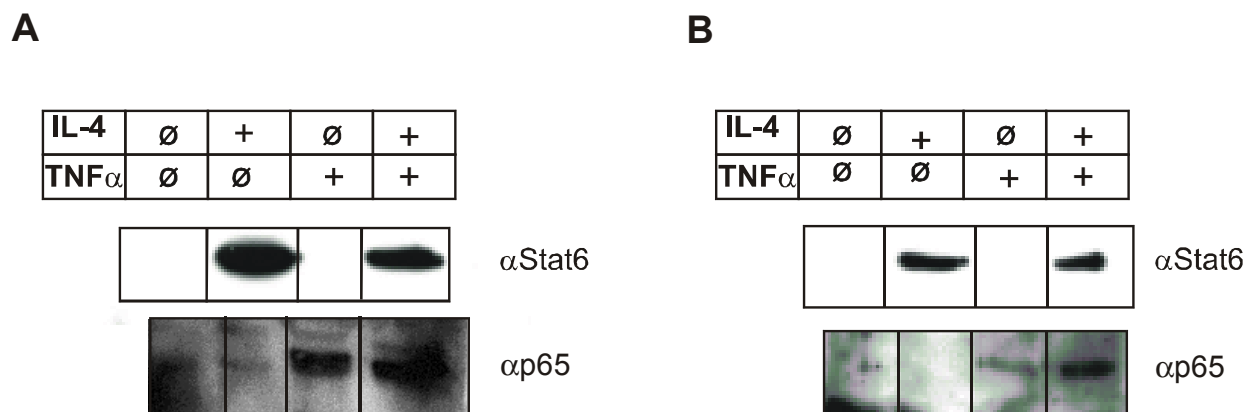


Abb. 9 Bindung von Stat6 und NFκB-p65 an den Eotaxin-1-Promotor. Bindende Proteine wurden mit Hilfe von Eotaxin-1-Promotor-DNA-Magnetkügelchen aus Kernextrakten isoliert. Die Kernextrakte wurden aus (A) A549 und (B) dermalen Fibroblasten gewonnen. Die Zellen waren 30 min mit oder ohne IL-4 und/oder TNF-α in einer Konzentration von 10 ng/ml inkubiert worden. Die Proteine wurden mit SDS/PAGE-Immunoblot-Analyse nachgewiesen.

In unstimulierten Kernextrakten von A549 Zellen oder dermalen Fibroblasten konnte keine Wechselwirkung der untersuchten Faktoren mit der Eotaxin-1-Promotor-DNA festgestellt werden. Aus IL-4 stimulierten Kernextrakten band

Stat6 an die Promotor-DNA. Die Bindung von NF κ B-p65, nicht aber NF κ B-p50, konnte aus TNF- α stimulierten Zellen nachgewiesen werden. Waren die Zellen mit beiden Cytokinen stimuliert worden, wurden Stat6 und NF κ B-p65 detektiert.

4.1.2 Eotaxin-1-Promotor Reportergen-Analysen

Da IL-4 aktiviertes Stat6 und TNF- α aktiviertes p65 an die Eotaxin-1-Promotor-DNA binden, war die nächste Fragestellung, ob sie auch eine Genregulation ermöglichen. Die faktorabhängige Genregulation wurde mit Reportergenassays untersucht. Ein 125 bp (Abb. 8) Element aus dem Eotaxin-1-Promoter wurde in zwei unterschiedliche Reporterplasmide kloniert (Dissertation Herbert Hein, Universität Kiel) (Abb. 10). EoTATALuc+ enthält einen TATAbox-Minimalpromoter, während es sich bei EoLuc+ um das entsprechende promoterlose Reporterplasmid handelt.

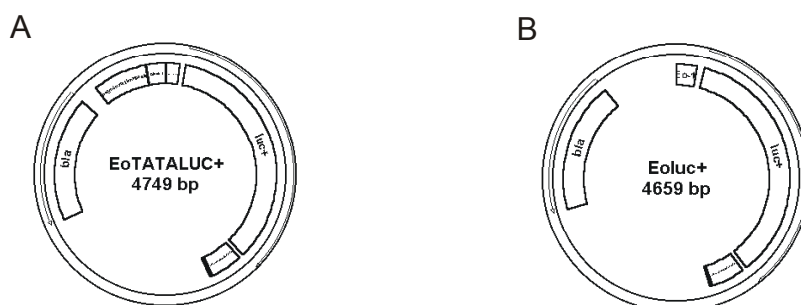


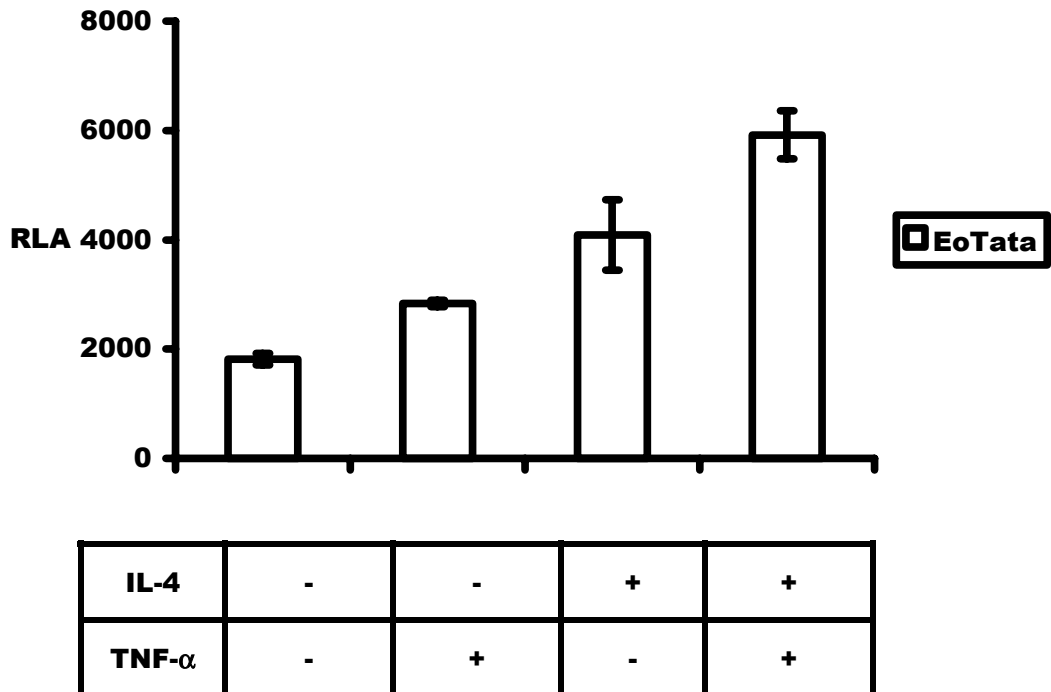
Abb. 10 Reporterplasmide (A) EoTataLuc+ und (B) EoLuc+. Ein 125 bp Fragment des Eotaxin-1-Promotors wurde in die Reporterplasmide pTataLuc+ und pLuc+ [255] kloniert.

4.1.3 Interleukin-4 und TNF- α aktivieren den Eotaxin-1-Promotor in A549 Zellen

Durch Elektroporation wurden die Plasmide in A549 Zellen transfiziert und die Zellen nach 12 h ohne oder mit 10 ng/ml Konzentrationen IL-4 und/oder TNF- α für 6h stimuliert

Abb. 11). Die Reporterogenaktivität wurde im Luminometer gemessen und ist als Relative Luciferase Aktivität (RLA) angegeben.

A



B

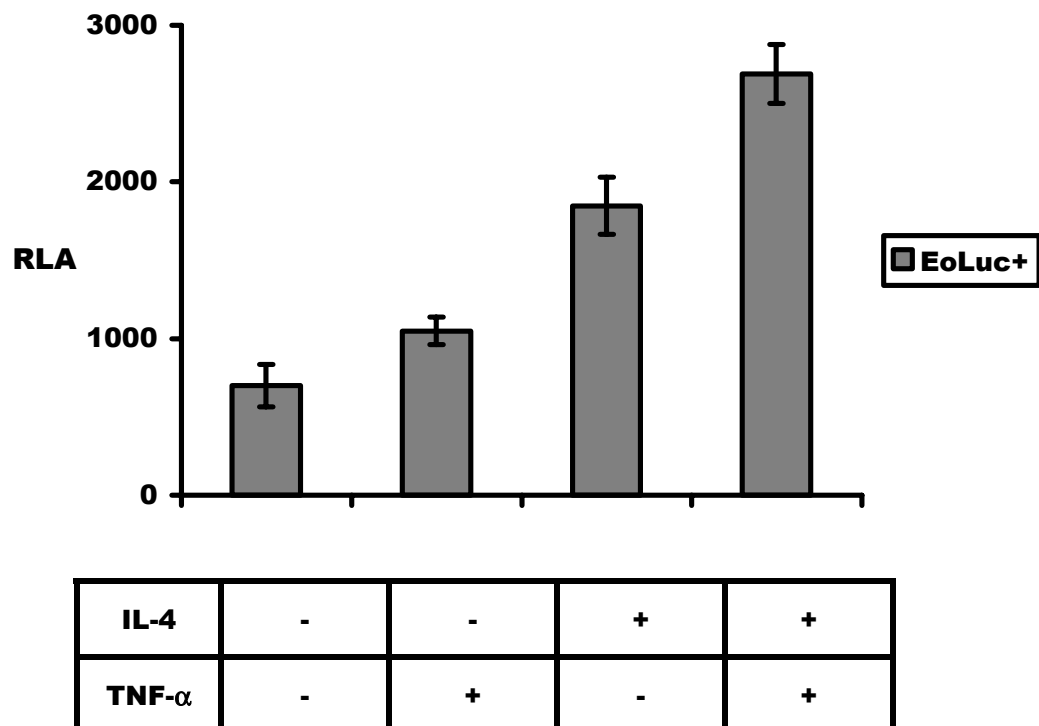


Abb. 11 Reporterassays der Plasmide EoTata (A) und EoLuc+ (B) in A549 Zellen. Die Zellen wurden mit dem angegebenen Eotaxin-1-Promotorkonstrukt transient transfiziert und nach 12 h mit oder ohne IL-4 (10 ng/ml) und/oder TNF- α (10 ng/ml) für 6h inkubiert. Gezeigt sind zwei

repräsentative Experimente. Fehlerbalken geben die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung wieder.

Insertion des Eotaxin-1-Promotors in beide Vektoren vermittelte von IL-4 und TNF- α abhängige Stimulierbarkeit der Plasmide. Der promotorlose Vektor EoLuc+ zeigte eine stärkere Aktivierung und etwas bessere, aber vergleichbare Induktion. Interleukin-4 vermittelte eine etwa 1.5-fache und TNF- α eine 2.5-fache und beide Cytokine zusammen eine 3.5-fache Induktion.

4.1.4 IL-13 und TNF- α aktivieren den Eotaxin-1-Promotor in A549 Zellen

Es ist bekannt, daß Interleukin-13, wie IL-4, Stat6 aktiviert und bei der Pathologie von Asthma eine besondere Rolle spielt. Ob IL-13 auch den Eotaxin-1-Promotor aktiviert, wurde mit Reporterassays in A549 Zellen untersucht (Abb. 12).

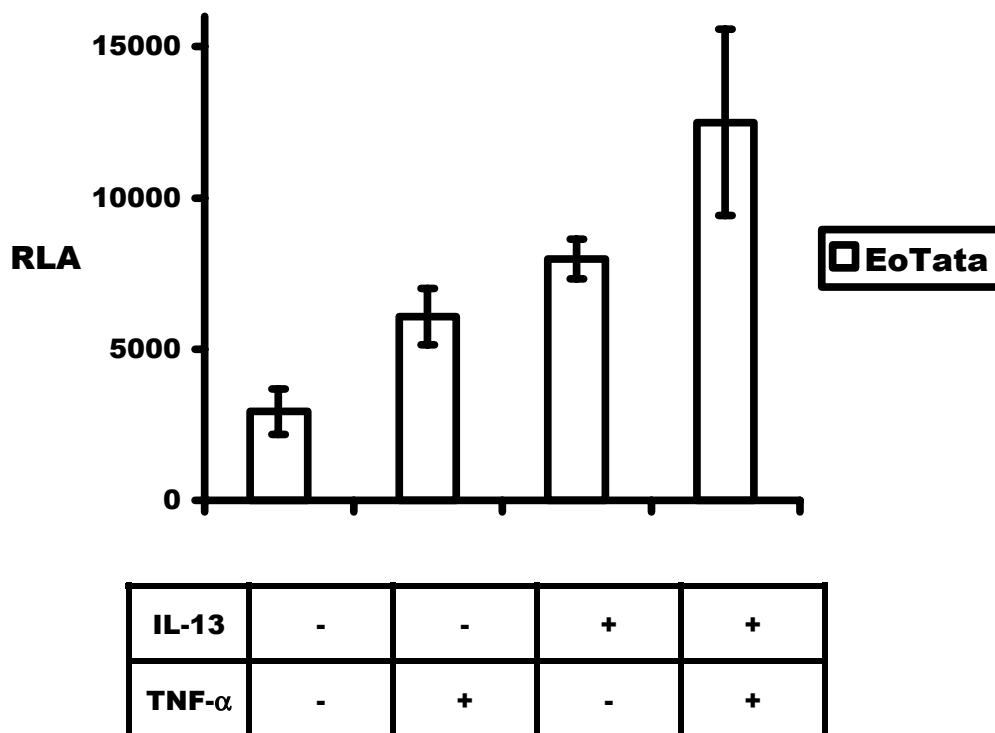


Abb. 12 Reporterassay von EoTata in A549 Zellen. Die Zellen wurden mit EoTata transfiziert und nach 24 h mit oder ohne IL-13 (10 ng/ml) und/oder TNF- α (10 ng/ml) für 6h inkubiert.

Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. Fehlerbalken geben die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung wieder.

IL-13 aktivierte den Eotaxin-1-Promotor des Reporterergenplasmids EoTata in einer IL-4 vergleichbaren Weise mit einer 2-fachen und in der Costimulierung mit TNF- α einer 4-fachen Induktion.

4.1.5 IL-4 und TNF- α aktivieren den Eotaxin-1-Promotor in dermalen Fibroblasten

Auch Versuche bei denen die Reporterplasmide in dermale Fibroblasten transfiziert wurden, zeigten ein ähnliches Ergebnis (Abb. 13).

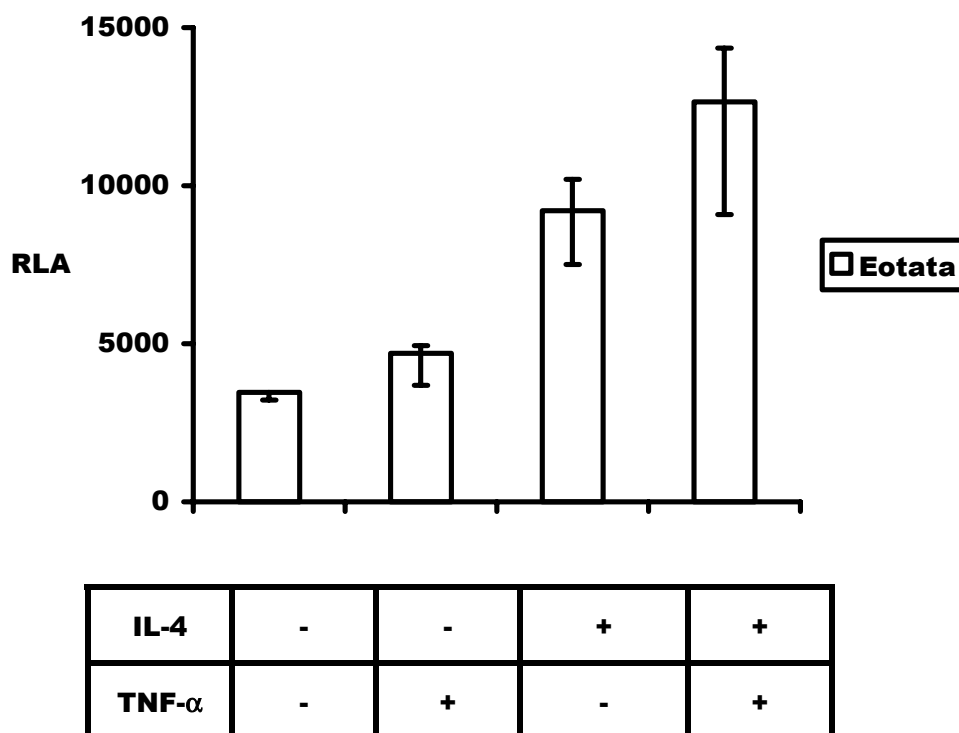


Abb. 13 Reportergenassay von Eotata in dermalen Fibroblasten. Die Zellen wurden mit EoTata transfiziert und nach 24 h mit oder ohne IL-4 (10 ng/ml) und/oder TNF- α (10 ng/ml) für 6h inkubiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. Fehlerbalken geben die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung wieder.

Sowohl IL-4 als auch TNF- α aktivierten den Eotaxin-1-Promotor. IL-4 erhöhte die Luciferaseexpression um ungefähr das 1,4-3, TNF- α um das 1,5-2,5 und beide Cytokine um 3-4-fache.

4.1.6 Mutagenese der Konsensussequenzen

Um die spezifische Aktivierung von Stat-6 bzw. NF κ B-p65 des Eotaxin-1-Promotor zu verifizieren, wurde die Konsensus-Sequenz in den Reporterplasmiden mittels Mutation zerstört und die Promotoraktivität untersucht. Die Mutationen wurden so gewählt, daß die Konsensus-Sequenzen selektiv zerstört sind (Abb. 14).

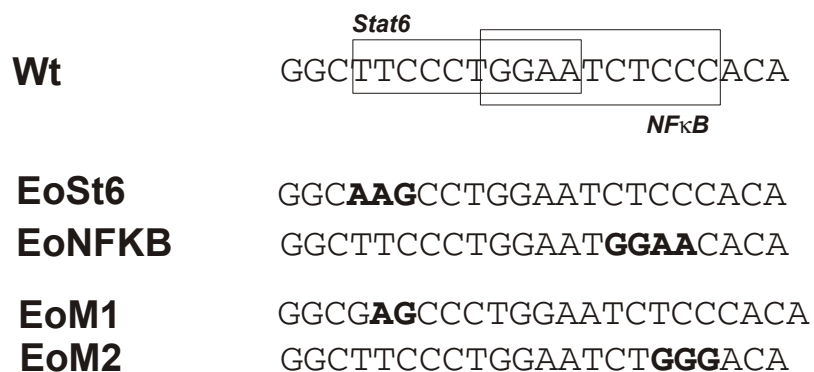


Abb. 14 Ausschnitt aus der Eotaxin-1-Promotorsequenz in den Reporterplasmiden. EoTata=EoLuc+=wt, EoSt6, EoNFKB, EoM1 und EoM2. Mutationen in den mutierten Konsensus-Sequenzen sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Zur Zerstörung der Stat6-Konsensus-Sequenz wurde die Basenfolge TTC in TAG (M1) oder AAG (St6) mutiert. Die NF κ B-Konsensus-Sequenz wurde durch Austausch des Motivs CCC gegen GGG (M2) oder des Motivs CTCC gegen GGAA (NFKB) verändert. Die Mutationen in St6 und NFKB wurden von Herbert Hein (Dissertation Herbert Hein, Uni-Kiel), die Mutationen M1 und M2 wurden selbst durch sequenzspezifische Mutagenese in die Promotorsequenz eingefügt.

Bei der Mutagenese zu EoM1 wurden die Primer M1_{s/as}, bei der Mutation zu EoM2 die Primer M2_{s/as}, in Kombination mit den Primern HB27 und HB19 verwendet (Abb. 15). Die Sequenz des Eotataplasmids zwischen den Primerpaaren HB27/pMn_{as} und HB19/pMn_s enthält Schnittstellen für die Restriktionsenzyme HindIII und XhoI, die später eine Ligation in das Reporterplasmid ermöglichten. Zuerst wurden zwei PCRs durchgeführt. Eine PCR mit dem Primerpaar HB27/pMn_{as} und eine PCR mit dem Primerpaar HB19/pMn_s.

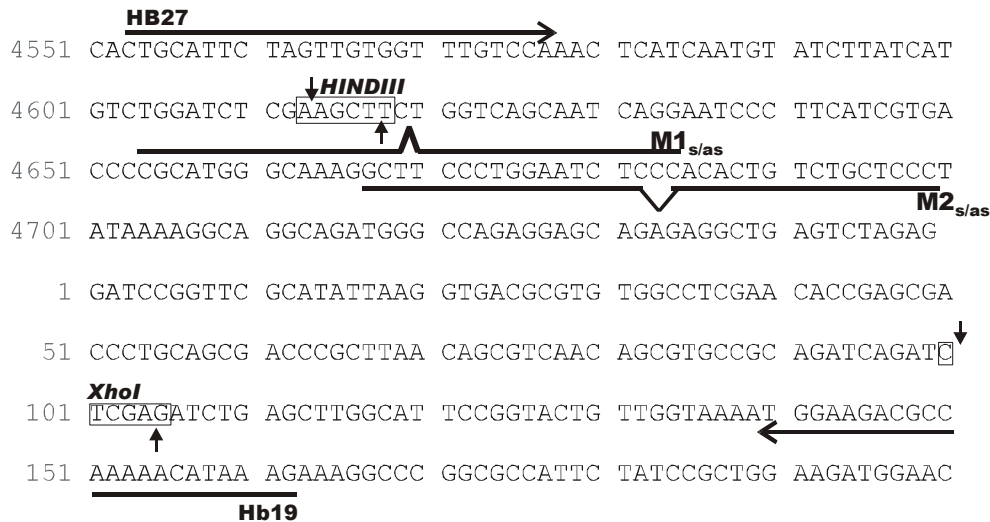


Abb. 15 Primermutagenese des Eotaxin-1-Promotors. In der Sequenz sind die Schnittstellen der Restriktionsenzyme, sowie die Primer angegeben.

Bei beiden PCR-Läufen diente das Plasmid EoLuc als Matrize. Anschließend wurden aus beiden Ansätzen äquimolare Mengen des amplifizierten Fragmentes vereinigt und eine PCR ohne Primer durchgeführt. Das amplifizierte Fragment enthielt die Mutationen und Restriktionsschnittstellen, die eine Einklonierung in einen Vektor ermöglichen.

4.1.6.1.1 Mutagenese der Konsensus-Sequenzen zerstört den Eotaxin-1-Promotor

Mit den Plasmiden EoSt6 und EoNFkB, bei denen der EoTata-Vektor die in Abb. 14 beschriebenen Mutationen enthält, wurden Reporteranalysen in A549 Zellen durchgeführt (Abb. 16).

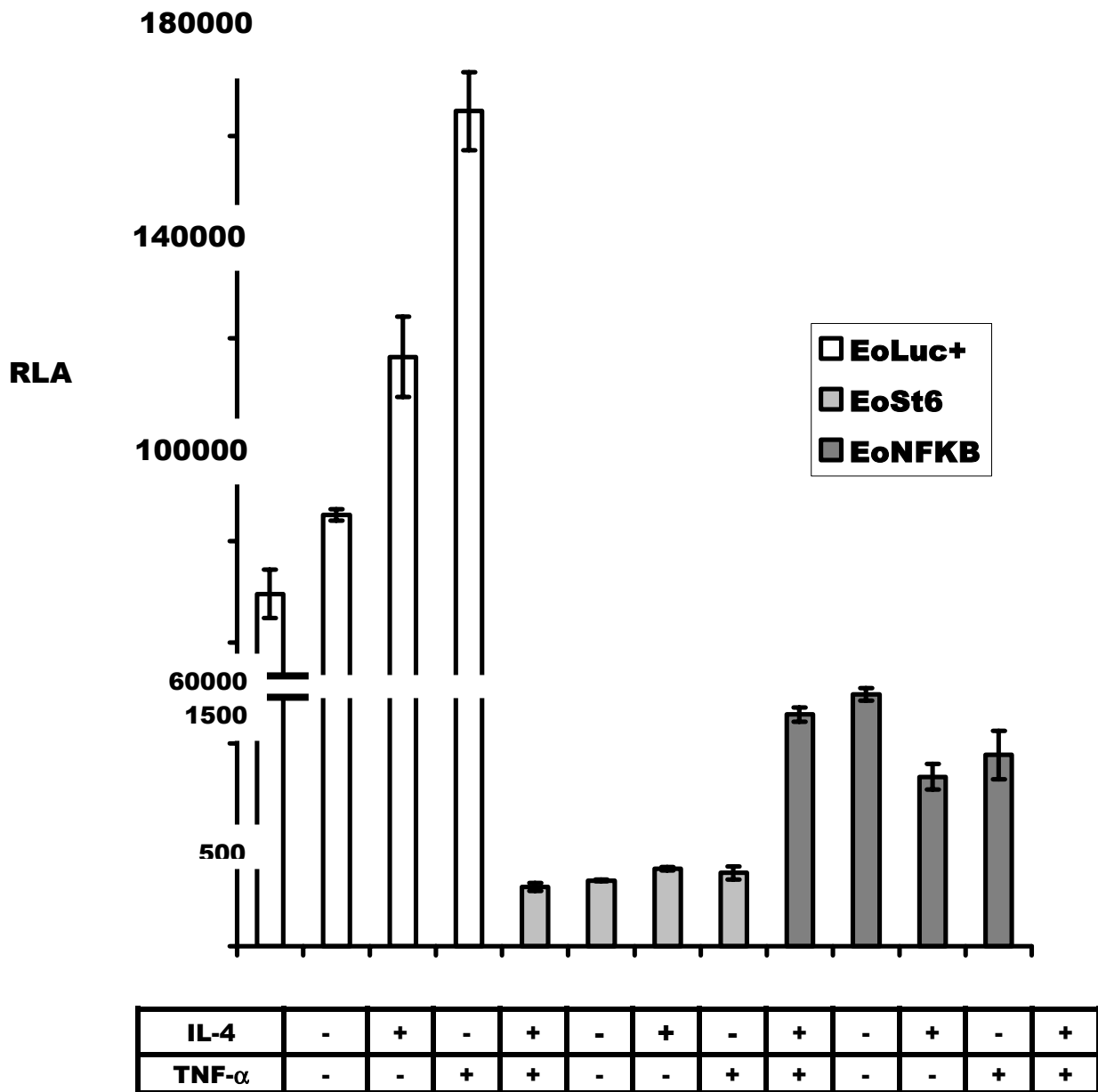


Abb. 16 Reporteragenassay von EoLuc+, EoSt6 und EoNF κ B in A549 Zellen. Die Zellen wurden mit den Plasmiden transfiziert und nach 24 h mit oder ohne IL-4 (10 ng/ml) und/oder TNF- α (10 ng/ml) für 6 h inkubiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. Fehlerbalken geben die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung wieder.

In dem Experiment konnte keine IL-4 oder TNF- α abhängige Induzierbarkeit mehr nachgewiesen werden. Außerdem war die Luciferaseexpression in den Plasmiden, die Mutationen im Eotaxin-1-Promotor-Fragment enthielten (EoSt6, EoNF κ B) durch die Zerstörung des Promotors stark herabgesetzt.

Da Matsukura et al. [194] bei gezielter Mutagenese des Eotaxin-1-Promotors in BEAS-2B Zellen eine selektive Zerstörung der IL-4 oder TNF- α abhängigen Induzierbarkeit beobachten, wurden die nach ihrer Vorgabe entsprechend

mutierten Reporterplasmide EoM1 und EoM2 (Abb. 14) hergestellt. Die Reporterplasmide wurden in A549-Zellen (Abb. 17) und dermale Fibroblasten (Abb. 18) transient transfiziert und die IL-4/TNF- α -abhängige Luciferaseexpression untersucht.

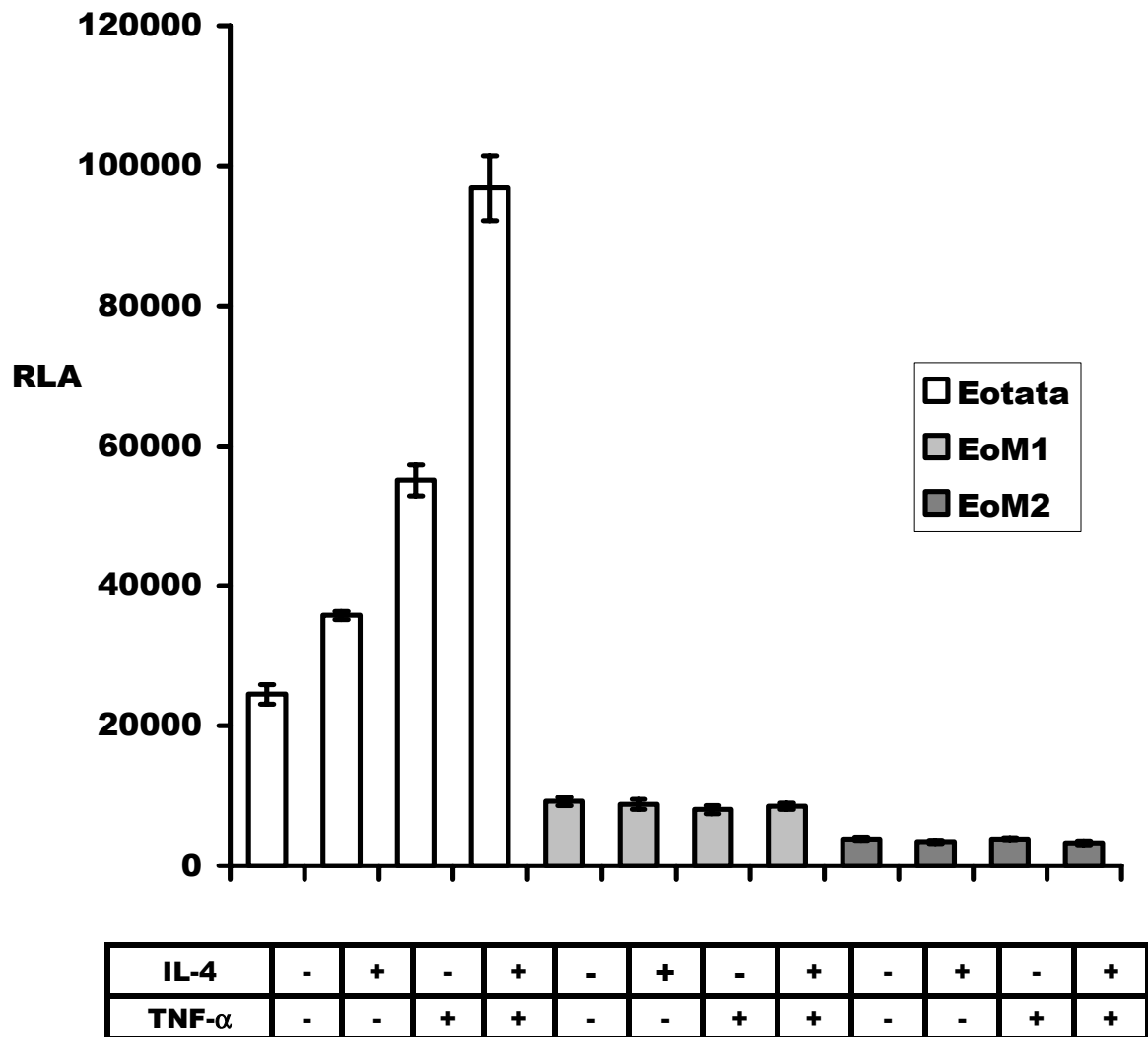


Abb. 17 Reporterassay von EoTata, EoM1 und EoM2 in A549 Zellen. Die Zellen wurden mit den Plasmiden transfiziert und nach 24 h mit oder ohne IL-4 (10 ng/ml) und/oder TNF- α (10 ng/ml) für 6h inkubiert. Fehlerbalken geben die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung wieder.

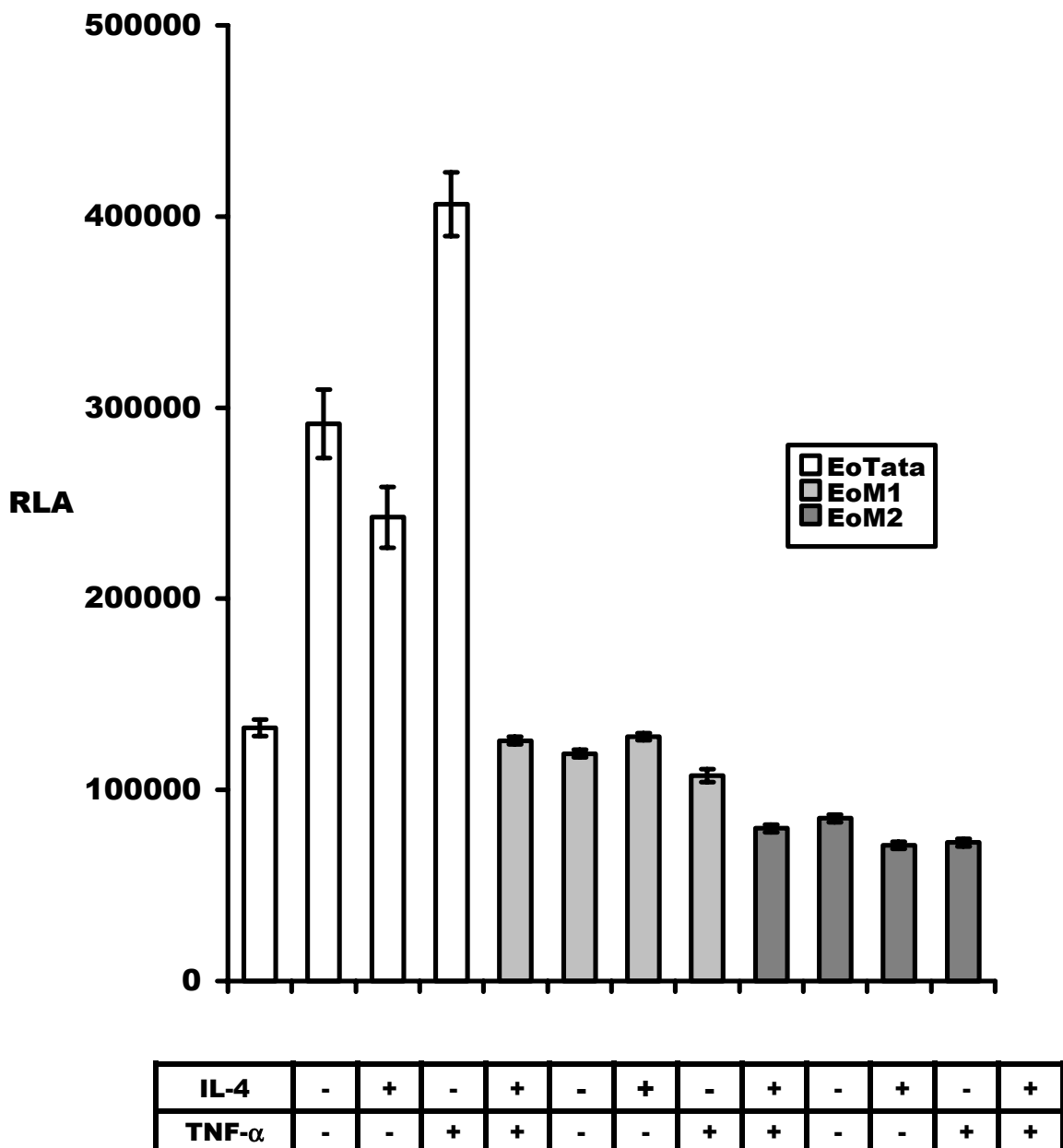


Abb. 18 Reportergenassay von EoTata, EoM1 und EoM2 in Fibroblasten. Die Zellen wurden mit den Plasmiden transfiziert und nach 24 h mit oder ohne IL-4 (10 ng/ml) und/oder TNF- α (10 ng/ml) für 6h inkubiert. Fehlerbalken geben die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung wieder.

Auch diese Mutationen zerstörten die IL-4 oder TNF- α abhängige Induktion unselektiv in A549 Zellen und Fibroblasten. Das Ergebnis unterscheidet sich von dem von Matsukura et al., die eine selektive Ausschaltung der IL-4 bzw. TNF- α Induktion beobachteten [194].

4.2 Regulierung des MCP-4- Promotors

Der neben den Eotaxinen stärkste Rekrutierungsfaktor für Eosinophile ist das MCP-4. Dieses CC-Chemokin aktiviert, wie die Eotaxine, den Chemokinrezeptor CCR3. Die Expression von MCP-4 wird im Gegensatz zu der von Eotaxin-1 durch das Th1-Cytokin IFN- γ hochreguliert. Der MCP-4-Promotor weist kein Stat6-Response-Element (TTCNNNGAA) auf, sondern ein Stat1/5-Response-Element, bei dem das TTC-GAA-Motiv durch drei Basen getrennt ist. Es ist anzunehmen, daß es sich hier um ein regulatorisches Element handelt, dass durch Bindung von IFN- γ aktiviertem Stat1 gesteuert wird.

```
841 TCTGTCTCTA CGGGAGTGAA TTTTCATTGT TTTTCTCTTT CCTGTTGGAG AAAGTAAGAA
901 GAAAACAGCG CCTTTATGGC TTCCCATGGT GAATGGCTGG GCGCGTCTG TGTCCCTGTC
961 TCCTCTCTGG CTCCTTGTGG CCTGAACAGC CAGAAGGAAG CCATGCCATG CTGTTTCAGC
1021 CCTCAGCTTC CCTCTTGCAT TTCCTAGAAA AGTCTTTGGT GCCCAGCTCC AGCTCAGCAG
1081 ATTCAGGATC CCCCTTCATC ATGACTTGGT CAACGCCCTG CTCAGGCCAA GGTCTCTGA
1141 GAGTTCCAAG CTTCTCCACT CCCTATAAAA GGCCGGCGGA ACAGCCAGAG GAGCAGAGAG
```

Abb. 19 Ausschnitt aus der Sequenz des MCP-4-Promotors[271]. Der Teil der Sequenz der für die Reporterexperimente verwendet wurde ist grau unterlegt. Die Konsensus-Sequenz für Stat1/5 ist durch Einrahmung markiert.

4.2.1 MCP-4-Promotor Reporter-Gen-Analysen

Um diese Regulierung nachzuweisen, wurde ein 80 bp langes Fragment aus dem MCP-4-Promotor in den TataLuc+-Vektor kloniert (Dissertation Herbert Hein, Universität Kiel) (Abb. 19, Abb. 20). MCP4sfTataLuc+ (sf=small fragment) enthält zusätzlich zu dem MCP-4-Promotorfragment einen Tatabox-Minimalpromoter.

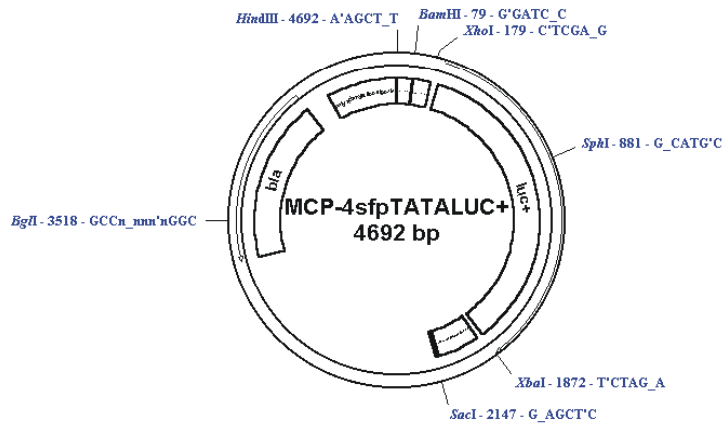


Abb. 20 Reporterplasmid MCP-4sfTataLuc+. Ein 81 bp Fragment des MCP-4-Promotors wurde in das Reporterplasmid pTataLuc+ [255] kloniert.

4.2.2 Interferon- γ aktiviert den MCP-4-Promotor in A549 Zellen

Durch Elektroporation wurden das Plasmid in A549 Zellen transfiziert und die Zellen nach 12 h ohne oder mit 10, 50 oder 100 ng/ml Konzentrationen IFN- γ für 6h stimuliert.

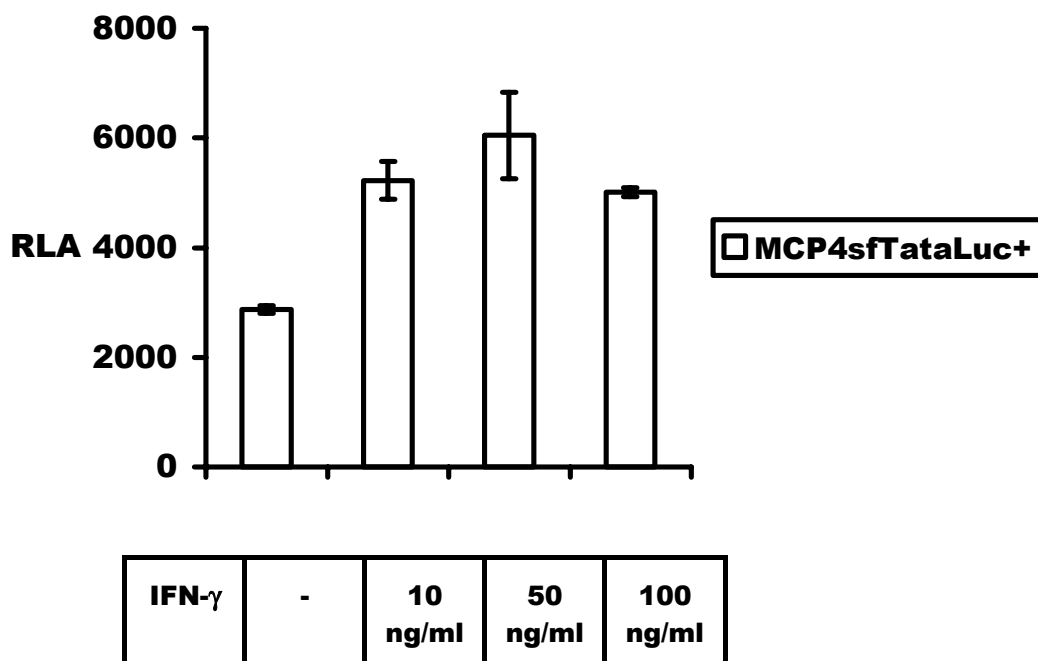


Abb. 21 Reporterassays von MCP-4sfTata in A549 Zellen. Die Zellen wurden mit dem angegebenen Promotorkonstrukt transfiziert und nach 12 h mit IFN- γ in den angegebenen

Konzentrationen für 6h inkubiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. Fehlerbalken geben die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung wieder.

Das MCP-4-Promotorfragment vermittelte eine etwa zweifache Induzierbarkeit durch IFN- γ .

4.2.3 IL-4 aktiviert den MCP-4-Promotor in A549 Zellen nicht

Durch Elektroporation wurde das Plasmid in A549 Zellen transfiziert und die Zellen nach 12 h mit steigenden Konzentrationen IL-4 für 6h stimuliert. IL-4 hatte in den Experimenten keinen Einfluß auf die Promotoraktivität. (Abb. 22).

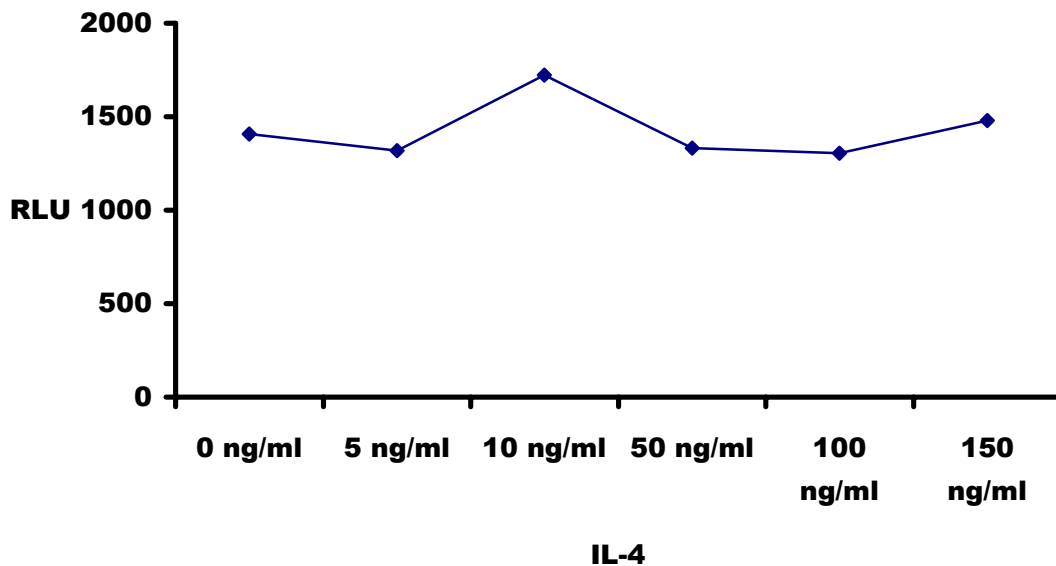


Abb. 22 Reporterassays von MCP-4sfTata in A549 Zellen. Die Zellen wurden mit dem angegebenen Promotorkonstrukt transfiziert und nach 12 h mit IL-4 in den angegebenen Konzentrationen für 6h inkubiert.

4.3 Hemmung von Stat6

Der Transkriptionsfaktor Stat6 ist ein wichtiger Mediator zentraler Wirkungen von IL-4 und IL-13 in allergischen Krankheitszusammenhängen. Eine Inhibierung von Stat6 stellt eine Möglichkeit dar derartige Fehlleitungen des Immunsystems zu korrigieren. Die in dieser Arbeit untersuchte Methode beruht auf dem Prinzip der kompetitiven Hemmung von Stat6 innerhalb der Zelle. Durch Bereitstellung alternativer Bindestellen sollte die Stat6-Bindung an den Rezeptor verhindert und der Signalweg unterbrochen werden (Abb. 23)

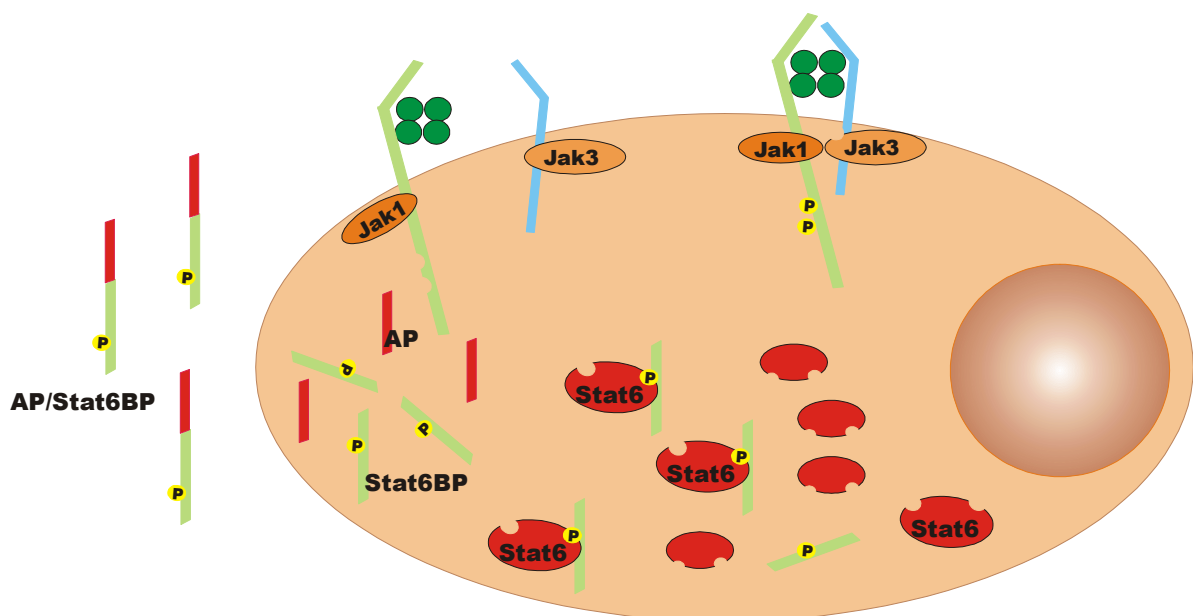
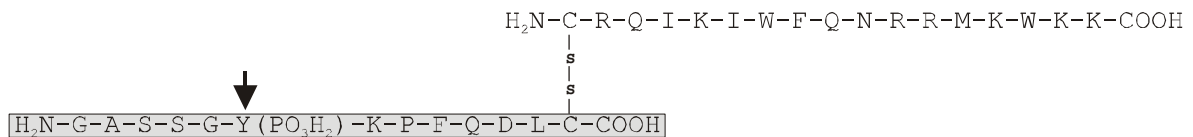


Abb. 23 Konzept des Stat6-Inhibitors AP/Stat6BP. Mit Hilfe des Antennapedia wird eine alternative Stat6-Bindestelle in die Zelle transportiert. Stat6 bindet an diese Bindestelle und nicht mehr an den Rezeptor, so daß eine Aktivierung des Rezeptors keinen Einfluß auf Stat6 hat.

Als untersuchtes Stat6-bindendes Peptid (Stat6BP) wurde ein Peptid mit der Sequenz einer Stat6-Bindestelle des IL-4R α gewählt (Abb. 24). Um die Bindestellen in das Zellinnere zu transportieren, wurde eine Kopplung an das Antennapedia-Peptid benutzt, die für andere Systeme beschrieben ist [272-274]. Das Protein Antennapedia aus *Drosophila melanogaster* besitzt die Eigenschaft ohne aktiven Aufnahmemechanismus Zellmembranen zu durchqueren und in Cytoplasma und Kern von lebenden Zellen zu gelangen [272]. Verantwortlich dafür ist eine 16 Aminosäuren lange Sequenz, die hier verwendet wurde.

AP/Stat6BP :



AP/Stat6CP :

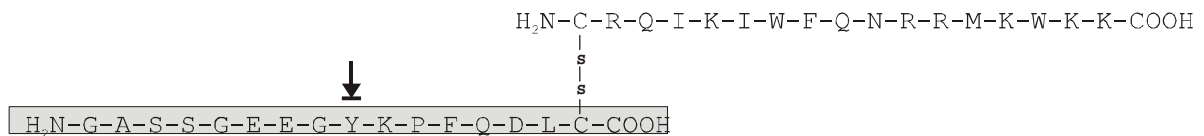


Abb. 24 Inhibitorpeptid für Stat6 (AP/Stat6) und Kontrollpeptid (AP/Stat6CP). Eine 16 AS lange Sequenz aus dem IL-4R α (grau unterlegt) ist über eine Cystein-Disulfidbrücke an das Antennapeptid gekoppelt. Das Inhibitorpeptid besitzt einen phosphorylierten Tyrosinrest (\downarrow) an den Stat6 binden kann, wohingegen das Kontrollpeptid an diesem Rest unphosphoryliert (\downarrow) ist und Stat6 nicht bindet.

4.3.1 Internalisierung von AP/Stat6BP

Die Internalisierung des AP/Stat6BP in lebende Zellen läßt sich am besten durch Fluoreszenzmikroskopie zeigen. Für dieses Experiment, das Sascha Stolzenberger durchführte, wurde die N-terminal mit Biotin markierte Form des Stat6BP verwendet und mit den adhären wachsenden Caki-1 Zellen inkubiert (Abb. 25 A - C). Als Kontrolle wurde AP/Biotin-Stat6BP verwendet, das vor der Inkubation mit den Zellen für 20 min bei 37 °C mit 100 mM DTT behandelt wurde [275]. Durch Inkubation mit dem Reduktionsmittel DTT wurde die Disulfidbrücke zwischen dem AP und dem Biotin-Stat6BP gespalten und das Biotin-Stat6BP sollte nicht mehr in die Zellen transportiert werden können (Abb. 25 D - F). Anschließend wurden die Caki-1 Zellen fixiert und das in die Zellen aufgenommene Biotin-Stat6BP mit Streptavidin-FITC nachgewiesen. In Abb. 25 A und D sieht man eine Phasenkontrastaufnahme der mit AP/Biotin-Stat6BP (A) und mit der Kontrolle (D) behandelten Zellen. Abb. 25 B (AP/Biotin-Stat6BP) zeigt die FITC-Fluoreszenz des in die Zellen aufgenommenen Biotin-Stat6BP. Nach dem Behandeln des AP/Stat6BP mit DTT zeigten die Zellen keine Fluoreszenz mehr (Abb. 25 E). Abb. 25 C und F zeigen die Fluoreszenz der Zellkerne nach dem Anfärben mit 0.1 μ g/ml Hoechst33342.

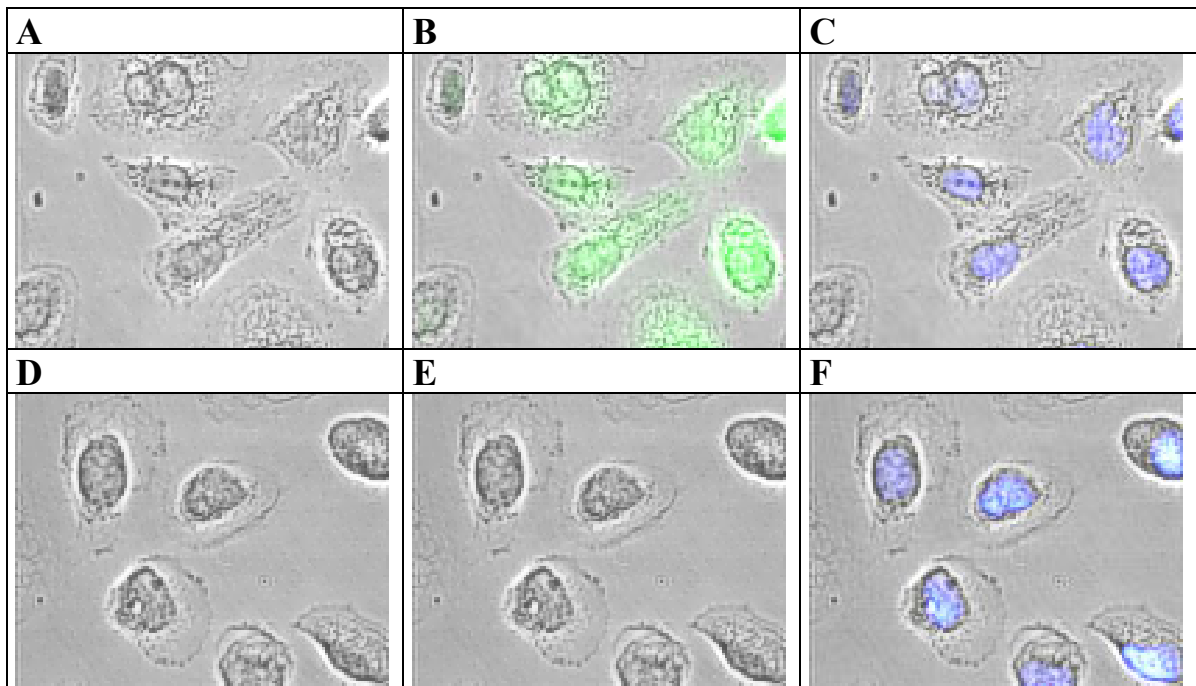


Abb. 25 Internalisierung von Biotin-Stat6BP gekoppelt (A-C) oder ungekoppelt (D-F) mit dem AP in Caki-1 Zellen; 63-fache Vergrößerung. Leicht veränderte Abb. aus Dissertation, Sascha Stolzenberger, Universität Würzburg.

Wie Abb. 25 B zeigt ließ sich das AP/Biotin-Stat6BP im gesamten Cytoplasma und im Kern der Zellen nachweisen. Behandelte man das mit AP gekoppelte Biotin-Stat6BP mit DTT, wurde es nicht mehr in die Zellen aufgenommen (Abb. 25 E), wodurch bewiesen ist, dass das ungekoppelte Biotin-Stat6BP von sich aus nicht die Fähigkeit hat in lebende Zellen transportiert zu werden.

4.3.2 Hemmung der Stat6 Phosphorylierung

Ba/F3-Zellen wurden mit 1 mM Natriumpervanadat-Lösung vorinkubiert. 30 min später wurden die Zellen für 5, 10, 20, 30, 45, 60 und 90 min mit 10 μ M AP/Stat6BP (Abb. 26) oder ohne Peptid (Spur 1) inkubiert, danach für 10 min mit 100 ng/ml hIL-4 stimuliert und dann lysiert. Als Kontrolle wird ein Experiment unter gleichen Bedingungen mit dem AP/Stat6CP durchgeführt (Abb. 27).

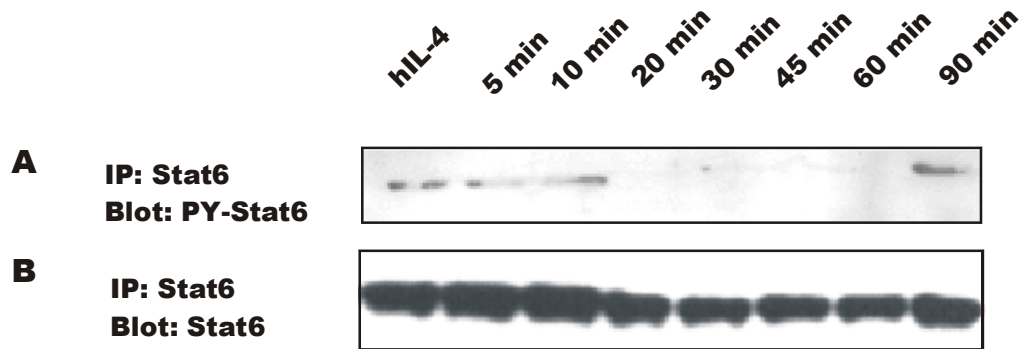


Abb. 26 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat6 in Ba/F3 Zellen nach Behandlung mit 1 mM Natriumpervanadat und AP/Stat6BP; Detektion des Blots mit anti-Phospho-Stat6 (A) und anti-Stat6 (B)

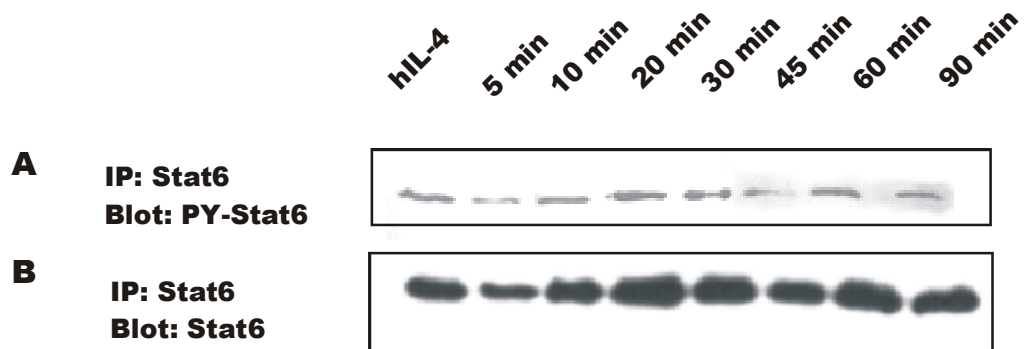


Abb. 27 Immunpräzipitation und Nachweis von Stat6 in Ba/F3 Zellen nach Behandlung mit 1 mM Natriumpervanadat und AP/Stat6CP; Detektion des Blots mit anti-Phospho-Stat6 (A) und anti-Stat6 (B)

Der Nachweis des zeitlichen Ablaufs der Abnahme bzw. der Zunahme der Stat6-Phosphorylierung erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung und Westernblot mit Hilfe eines anti-Phospho-Stat6 Antikörpers. Nach dem Ablösen des ersten Detektionsantikörpers wurde die Nitrocellulosemembran mit einem anti-Stat6 Antikörper detektiert (Abb. 26 und Abb. 27). In Spur 1 von Abb. 26 und Abb. 27 sind die von unbehandelten IL-4 stimulierten Zellen aufgetragen.

4.3.3 Hemmung der Transkription

Die durch AP/Stat6 verhinderte IL-4-abhängige Phosphorylierung von Stat6 sollte eine Dimerisierung verhindern, die zur Kerntranslokation von Stat6 notwendig ist. Ob die relativ kurze Hemmung ausreicht um auch die Transkription merklich zu beeinflussen wurde mit Hilfe von Reporterexperimenten in Ba/F3-4R γ -5xGAS überprüft. Ba/F3-4R γ -5xGAS sind murine Ba/F3-Zellen in die der humane IL-4R α , die humane γ c sowie ein Luciferasereporter, das durch einen artifiziellen Stat6 abhängigen-Promoter reguliert wird, stabil transfiziert sind. Der Promoter besteht aus fünf multimerisierten Stat6-Konsensus-Sequenzen des I ϵ -Promotor [276].

4.3.4 AP/Stat6BP hemmt einen Stat6-regulierten Promotor

In dem Reporterexperiment wurden pro Messpunkt 50 μ l einer Ba/F3-4R γ -5xGAS-RFP-Suspension einer Konzentration von 1×10^6 /ml Zellen verwendet. Diese 50 μ l wurden dann mit demselben Volumen RFP ohne, mit AP/Stat6CP(60 μ M) oder AP/Stat6BP(2 μ M, 20 μ M, 60 μ M) versetzt und 15 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen ohne oder mit 100 ng/ml IL-4 für 2 h im Brutschrank inkubiert, schließlich geerntet und lysiert. Die Luciferaseexpression der einzelnen Meßpunkte wurde im Luminometer bestimmt (Abb. 28).

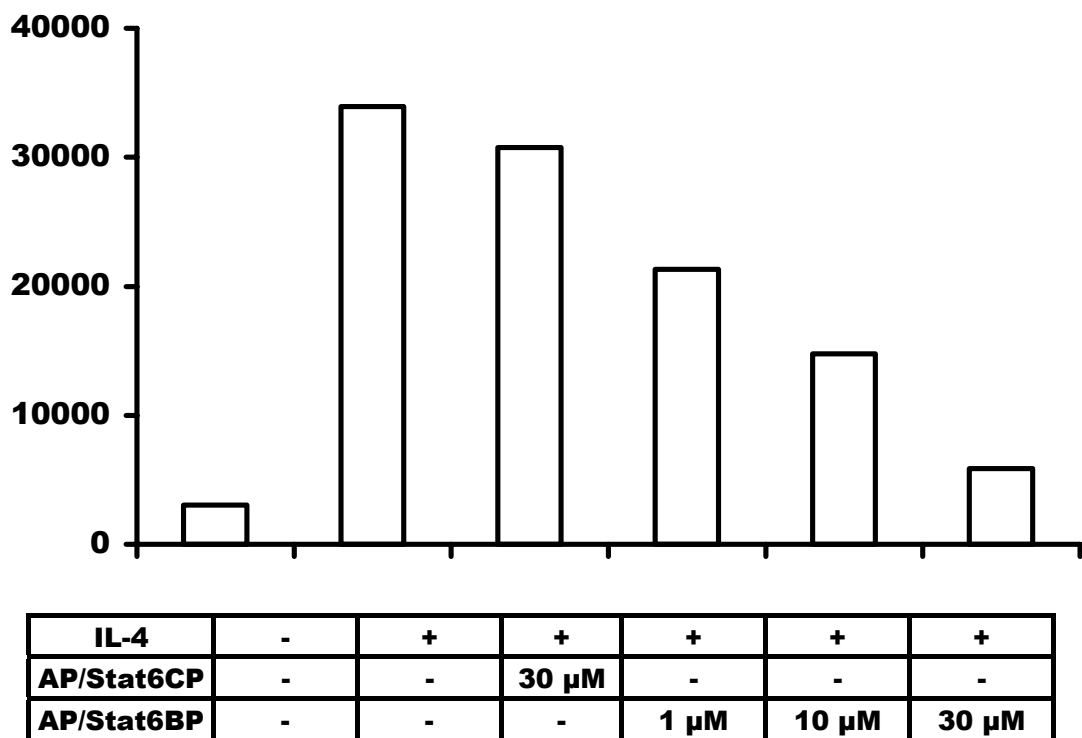


Abb. 28 Reporterexperiment mit Ba/F3- 4R γ - 5xGAS. Die Zellen wurden 15 min mit oder ohne AP/Stat6CP, AP/Stat6BP inkubiert und anschließend für 2 h mit oder ohne 100 ng/ml IL-4 stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

AP/Stat6BP hemmt die Luciferaseexpression konzentrationsabhängig. Bei einer Konzentration von 30 μ M war die Luciferaseexpression bis fast auf die Basalexpression reduziert.

4.3.5 AP/Stat6BP hemmt die Basalexpression eines Stat6-regulierten Promoters

In einem weiteren Experiment wurde auch der Einfluß auf das nicht aktivierte Reporter gen untersucht. Anstelle der unterschiedlichen Konzentrationen von AP/Stat6 wurde der Einfluß auf die Basalexpression untersucht. Jeder Meßpunkt wurde dreifach bestimmt. (Abb. 29)

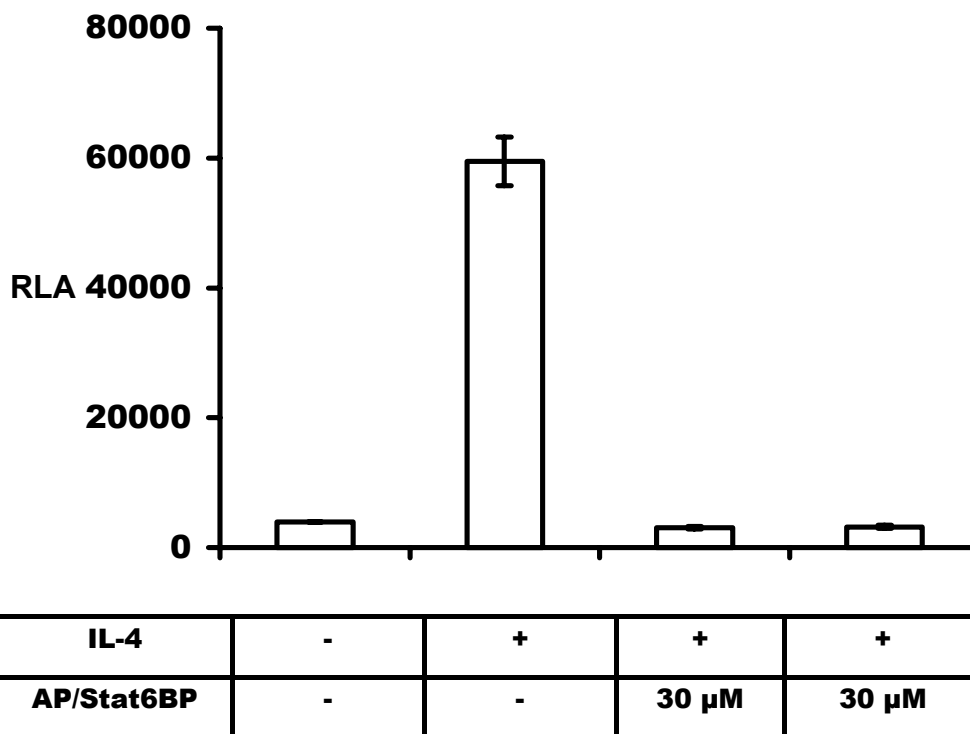


Abb. 29 Reporterexperiment mit Ba/F3- 4R γ - 5xGAS. Die Zellen wurden 15 min mit oder ohne 30 μ M AP/Stat6BP inkubiert und anschließend für 2 h mit oder ohne 100 ng/ml IL-4 stimuliert. Fehlerbalken geben die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung wieder.

Interessanterweise wurde auch eine Hemmung der Expression beobachtet, wenn die Zellen nicht mit IL-4 stimuliert wurden. Das würde auf das Vorliegen von IL-4 Stimulierung unabhängigen Stat6 hindeuten. Diese geringe Hemmung von ungefähr 30 % konnte in mehreren Experimenten reproduziert werden. Es muß beachtet werden, dass dieser Effekt möglicherweise durch experimentelle Einflüsse verursacht wird, da er mit anderen Methoden nicht beobachtet wird.

4.4 Stat6 und der Glucocorticoid-Rezeptor

Glucocorticoide werden in großem Umfang in der Therapie von inflammatorischen, autoimmunen und allergischen Erkrankungen genutzt. Obwohl Corticosteroide die derzeit effektivste Behandlungsmöglichkeit atopischer Erkrankungen darstellen, ist ihre Wirkung auf Th2-Immunantworten nicht eindeutig. So haben verschiedene Studien gezeigt, daß einige typische Th2 Immunantworten gehemmt, andere wiederum aber verstärkt werden. Glucocorticoide beeinflussen die Immunantwort sowohl über eine Veränderung der Cytokinexpression, als auch über eine Wechselwirkung mit deren Signalwegen, was besonders für die Effektorfunktionen Bedeutung hat. Auf welche Weise der IL-4 und der Glucocorticoid Signalweg auf molekularer Ebene interagieren, ist noch weitgehend ungeklärt. Eine mögliche Wechselwirkung ist die des Glucocorticoidrezeptors mit Stat6. Die bekannte Wechselwirkung von Signalwegen der Stat-Moleküle 3, 4 und 5 mit dem Glucocorticoidrezeptor deuten auf diese Möglichkeit hin.

4.4.1 Dexamethason hemmt Stat6 vermittelte Transkription in Ba/F3-4R γ -5xGAS

Der Einfluß von Dexamethason auf die Stat6 vermittelte Transkription wurde in Reporterexperimenten untersucht. Dexamethason ist ein synthetisches therapeutisch verwendetes Glucocorticoid. Die murine Zelllinie Ba/F3-4R γ -5xGas ist für diese Experimente gut geeignet. Sie besitzt einen intakten hIL-4/Stat6 Signalweg und ein stabil transfiziertes Stat6 reguliertes Reporterogen, das sehr sensitiv die Stat6 abhängige Transkription meßbar macht. Ein weiterer Vorteil ist die sehr langsame Proliferation, so daß Proliferations- und Apoptose-Effekte durch Glucocorticoide erst spät Einfluß auf andere Untersuchungen haben.

Ba/F3-4R γ -5xGas-Zellen wurden 12 Stunden ohne oder mit 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM und 150 nM Dexamethason inkubiert. Anschließend wurde die Hälfte der Zellen mit 10 ng/ml IL-4 vier Stunden stimuliert. Um die Beeinflussung des Experimentes durch andere Effekte des Dexamethasons weitgehend auszuschließen, wurde der Zellzustand mit Trypanblaufärbung überprüft. Die

Zellen zeigten weder zu Beginn noch gegen Ende der IL-4 Stimulierung eine Veränderung in Anzahl und Zustand.

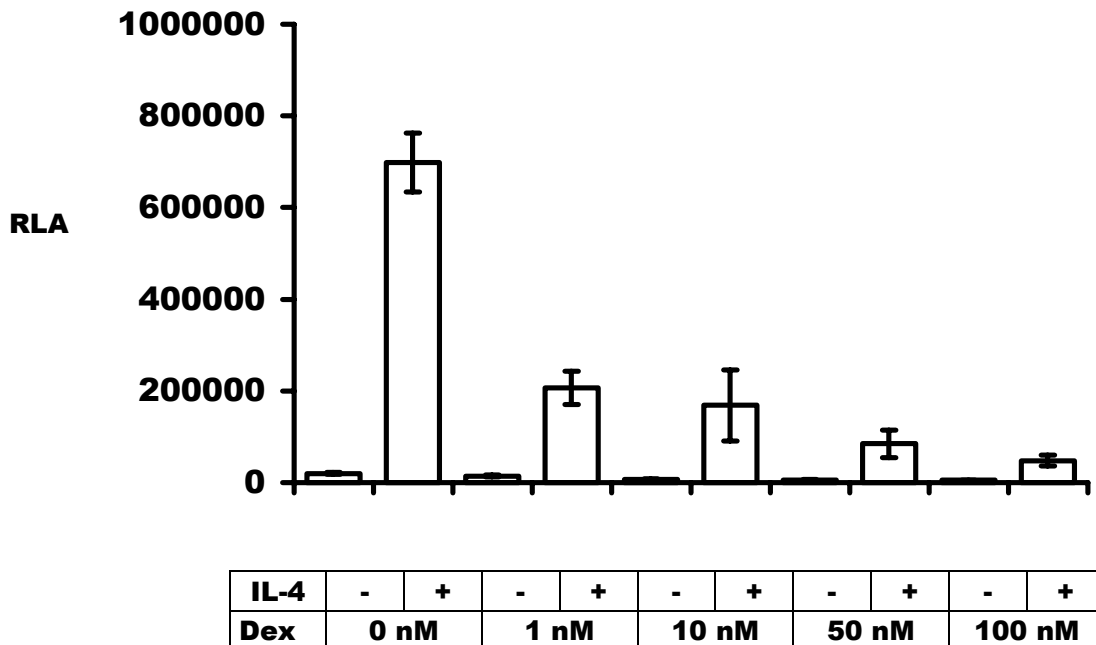


Abb. 30 Ba/F3-4R γ -5xStat6 Zellen wurden 12 Stunden mit der angegebenen Menge Dexamethason stimuliert. Anschließend wurde die eine Hälfte der Zellen ohne, und die andere Hälfte der Zellen mit 10 ng/ml IL-4 inkubiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung dar.

Die IL-4/Stat6 abhängige Luciferaseexpression wurde durch Dexamethason konzentrationsabhängig gehemmt. Die IL-4 abhängige Induktion wurde dabei um ungefähr 95% inhibiert, während die Basalexpression nur um 30% des Wertes ohne Dexamethason reduziert wurde.

4.4.2 Einfluß von Dexamethason auf transient transfizierte Stat6 regulierte Promotoren

Die Wirkung von Glucocorticoiden sollte auch in humanen Zellen untersucht werden. Als Zellen wurde die humane B-Zelllinie Ramos ausgewählt, die über einen intakten IL-4/Stat6-Signalweg verfügt und für transiente Reporterexperimente mit Stat6 regulierten Reporterplasmiden gut geeignet ist. Als Reporterplasmide wurden ein 5xStat6RE-TataLuc+ und ein I ϵ -

TataLuc+-Reporterplasmid verwendet. Bei 5xStat6RE-TataLuc+ handelt es sich um das Reporterplasmid, das in die Ba/F3-4R γ -5xGas stabil integriert ist. β -TataLuc+ enthält ein 51bp langes Fragment aus dem IgE-Klassenwechsellpromotor [276]. Die Plasmide wurden in Ramos-Zellen transfiziert und nach 12 Stunden zuerst für 20 min mit 1 μ g/ml Dexamethason und anschließend für vier Stunden mit 10 ng/ml IL-4 stimuliert (Abb. 31, Abb. 32)

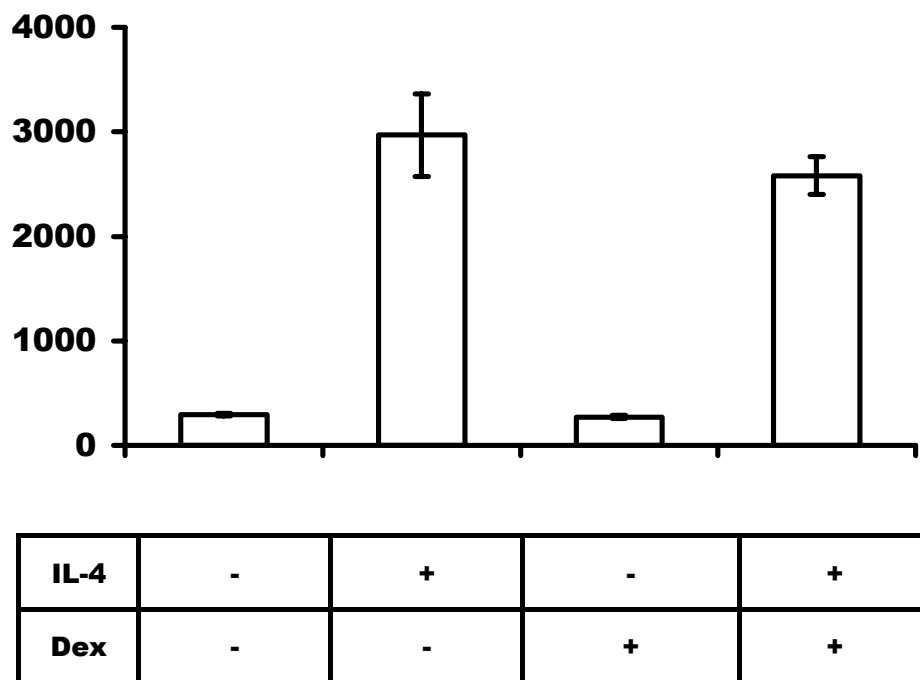


Abb. 31 Reporterassay von 5xStat6RE-TataLuc+ in Ramos-Zellen. Die Zellen wurden mit dem angegebenen Reporterplasmid transfiziert und nach 12 Stunden zuerst 20 min mit 1 μ g/ml Dexamethason und anschließend vier Stunden mit 10 ng/ml IL-4 stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. Fehlerbalken geben die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung wieder.

Der Effekt aus den stabil transfizierten murinen Zellen konnte nicht reproduziert werden, obwohl es sich um das gleiche Reporterkonstrukt handelte. Die Luciferaseexpression wurde durch IL-4 auf das 10 fache erhöht. Waren die Zellen vorher mit Dexamethason inkubiert worden, stieg die Induktion nur auf 87 % des Wertes. Stimulierung nur mit Dexamethason verringerte die Basalaktivität um 8 %. Die Senkung war nicht signifikant, konnte aber in mehreren Experimenten reproduziert werden. Zu berücksichtigen ist hierbei, daß auf Grund des Zellsystems andere Stimulierungsbedingungen gewählt wurden.

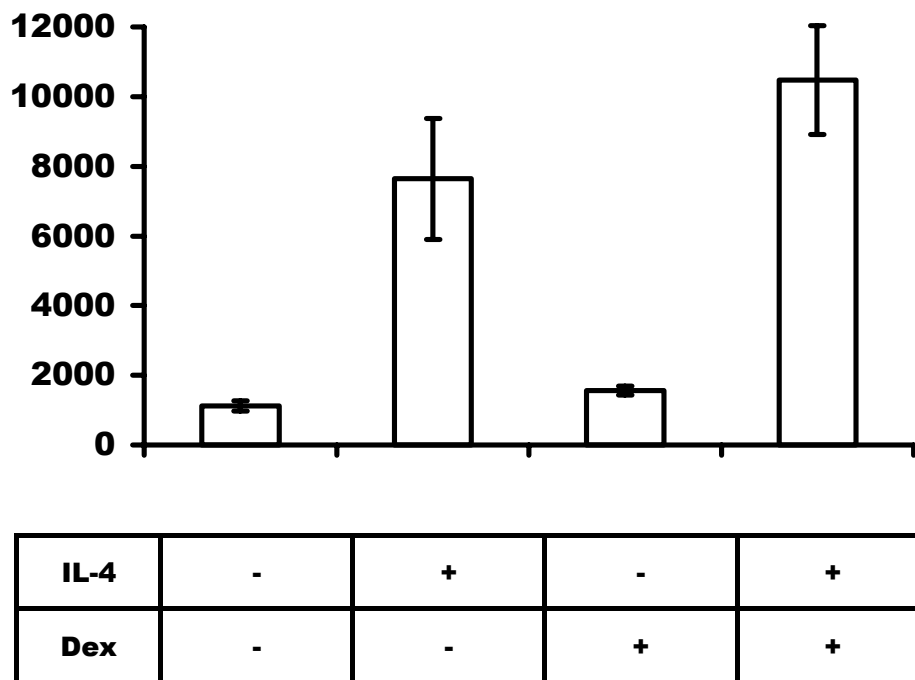


Abb. 32 Reportergenassay von $l\epsilon$ -TataLuc⁺ in Ramos-Zellen. Die Zellen wurden mit dem angegebenen Reporterplasmid transfiziert und nach 12 Stunden zuerst 20 min mit 1 μ g/ml Dexamethason und anschließend vier Stunden mit 10 ng/ml IL-4 stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. Fehlerbalken geben die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung wieder.

Bei Transfektion des Reportergenplasmids $l\epsilon$ -TataLuc⁺ wurde die Luciferaseexpression IL-4 abhängig auf das siebenfache erhöht. Wurden die Zellen vor IL-4-Zugabe 20 min mit Dexamethason inkubiert, erhöhte sich die Induktion um 40 %. Stimulierung nur mit Dexamethason bewirkte eine Erhöhung in der gleichen Größenordnung. Auch in diesem Experiment war der Effekt nicht signifikant, konnte aber in mehreren Experimenten reproduziert werden.

4.4.3 Der Einfluß von Dexamethason auf die Stat6/DNA-Bindung

Die Beeinflussung des Stat6-Signalweges durch Dexamethason wirft die Frage auf, an welcher Stelle des Signalweges die Interaktion stattfindet. Um die Wirkung auf die Stat6/DNA-Bindung zu untersuchen, wurden Experimente mit $l\epsilon$ -Magnetkugeln durchgeführt. Der $l\epsilon$ -Promoter ist ein IL-4 abhängig Stat6-regulierter Promoter, der beim Antikörper-Klassenwechsel zum Typ E eine Rolle spielt [247]. Er reguliert die Expression von sterilen Transkripten, die den

Wechsel zu einem bestimmten Antikörpertyp katalysieren und enthält das Konsensus-Motiv TTCNNNGAA, an das das Stat6-Protein mit hoher Affinität bindet. In den Experimenten wurden Kernextrakte aus Ramos-Zellen verwendet, die entweder ohne, mit 1 µg/ml Dexamethason, 10 ng/ml IL-4 oder Dexamethason und IL-4 für 30 min stimuliert wurden.

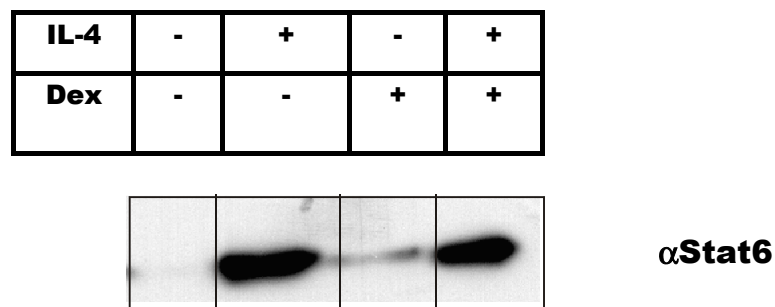


Abb. 33 Bindung von Stat6 an Iε-Magnetkügelchen bei IL-4, Dex oder IL-4/Dex-Stimulierung in Ramos-Zellen. Die Kernextrakte wurden aus Zellen gewonnen, die 30 min ohne oder mit IL-4 und/oder Dexamethason stimuliert worden waren. Dexamethason wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml und IL-4 in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt. Stat6 wurde mit SDS/PAGE-Immunoblot-Analyse nachgewiesen. Der Glucocorticoidrezeptor konnte in den Eluaten nicht nachgewiesen werden.

Es konnte eine Stat6-Bindung an die Iε-Magnetkügelchen bei IL-4-Stimulierung und IL-4/Dexamethason-Stimulierung gezeigt werden. Die Stat6-Bande bei Stimulierung nur mit Dexamethason ist eine nicht reproduzierbare Verunreinigung. Ein signifikanter Einfluß auf die IL-4 induzierte Stat6-DNA-Bindung durch Dexamethason konnte nicht nachgewiesen werden. Der Glucocorticoidrezeptor war ebensowenig gebunden, wie Untersuchung der Eluate mit einem entsprechenden Antikörper zeigten.

4.5 Stat6/DNA-Wechselwirkung

Um die Wechselwirkung zwischen DNA und Proteinen zu untersuchen, wurde die „Magnetobead-Technik“ verwendet, wie in vorhergegangenen Kapiteln schon erwähnt wurde. Dabei werden nachsynthetisierte Promotorfragmente von ungefähr 50 bp Länge an Magnetkügelchen gebunden. Um eine möglichst hohe Dichte an Bindestellen zu gewährleisten, wurden durch Ligation über GATC-Brücken Multimere von bis zu 1 kb Länge hergestellt (Abb. 34).

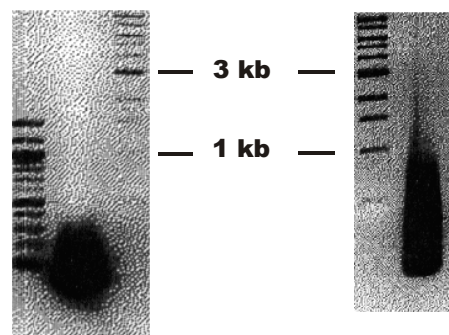


Abb. 34 Agarosegelelektrophorese der Aufligierung eines 50 bp Promotorfragmentes (Eotaxin-1-Promotor) über GATC-Brücken bis auf 1kb. Links ist das 50 bp lange DNA-Fragment und rechts das Gemisch aus aufligierten Fragmenten zu sehen.

Nachdem diese Multimere an den GATC-Enden biotinyliert wurden, konnten sie an Streptavidin-Magnetkügelchen gebunden werden. Die Kügelchen wurden dann mit Zell- oder Kernextrakten inkubiert und anschließend gewaschen. Durch den Waschvorgang werden Proteine konzentriert, die stark an die DNA binden und somit mit hoher Wahrscheinlichkeit spezifisch bindende Transkriptionsfaktoren sind. Weiter kann man unterschiedlich stimulierte Extrakte verwenden, um die faktorabhängige Aktivierung des Promotors zu (Abb. 35) untersuchen. Die Eluate können dann über SDS-PAGE/Immunoblot auf spezifische Transkriptionsfaktoren untersucht werden.

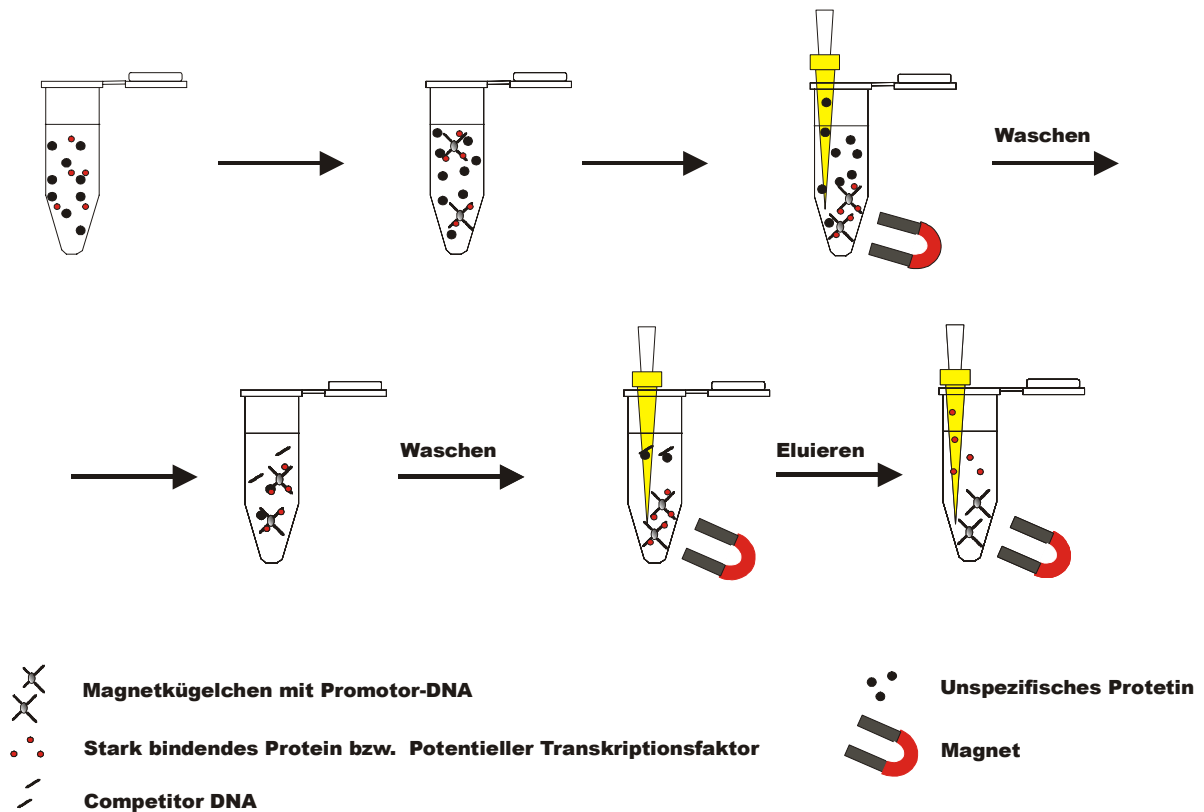


Abb. 35 Zell- oder Kernextrakte werden mit Magnetkügelchen mit Promotor-DNA inkubiert. Das Gemisch wird erst mit Waschpuffer resuspendiert und die Kügelchen dann mit einem Magnet fixiert, so daß der Überstand abgenommen werden kann. Durch mehrere Waschschrte werden die stark bindenden Proteine konzentriert. Schließlich werden diese Proteine und potentiellen Transkriptionsfaktoren mit einem Hochsalzpuffer dem Waschen ähnlich isoliert.

4.5.1 Bestimmung der optimalen Salzkonzentration

Zur Bestimmung der optimalen Salzkonzentration für die Untersuchung der Stat6/DNA-Bindung wurden Kernextrakte aus IL-4 stimulierten A549 Zellen ohne NaCl oder mit 10, 25, 50 und 100 mM NaCl mit ϵ -Magnetkügelchen inkubiert. An die ϵ -Magnetkügelchen ist ein 50 bp langes Fragment aus dem ϵ -Promotor gebunden. Der ϵ -Promoter ist ein IL-4 abhängig Stat6-regulierter Promoter (Abb. 36), der beim Antikörper-Klassenwechsel zum Typ E eine Rolle spielt [247]. Er reguliert die Expression von sterilen Transkripten, die den Wechsel zu einem bestimmten Antikörpertyp katalysieren. Er enthält das Konsensus-Motiv TTCNNNGAA, an das das Stat6-Protein mit hoher Affinität bindet.

```

301 gcatgcgtca agagtagagt cccggaccta ggcaggggcc ctggcgttgg gcctgagaga
361 gaagagaacc tccccagcac tcggtgtgca tcggtagtga accagcctca cctgaccccc
421 gctgttgctc aatcgacttc ccaagaacag agagaaaagg gaacttcacag ggcggccccgg
481 gcctcctggg gttcccaccc catttttagc tgaagcact gaggcagagc tccccctacc
541 caggctccac tgcccggcac agaaataaca accacggta ctgatcatct gggagctgtc

```

Abb. 36 Ausschnitt aus der Sequenz des IgE-Lassenwechsel ($I\epsilon$)-Promotors. Der Teil der Sequenz der für die Reporterexperimente verwendet wurde ist grau unterlegt. Die Konsensus-Sequenz für Stat6 ist durch Einrahmung und Beschriftung gekennzeichnet.

Nach 15 minütiger Inkubation mit jeweils 300 μ g Kernextrakt-Protein in TGED-Puffer mit dem entsprechenden NaCl-Gehalt wurden die Kügelchen jeweils drei mal mit TGED-Puffer der entsprechenden NaCl Konzentration gewaschen. Das Eluat wurde mit SDS-PAGE/Immunoblotanalyse auf die Anwesenheit von Stat6 untersucht.

In den Magnetkügelchenexperimenten band Stat6 am stärksten bei einer NaCl-Konzentration von 25 mM.

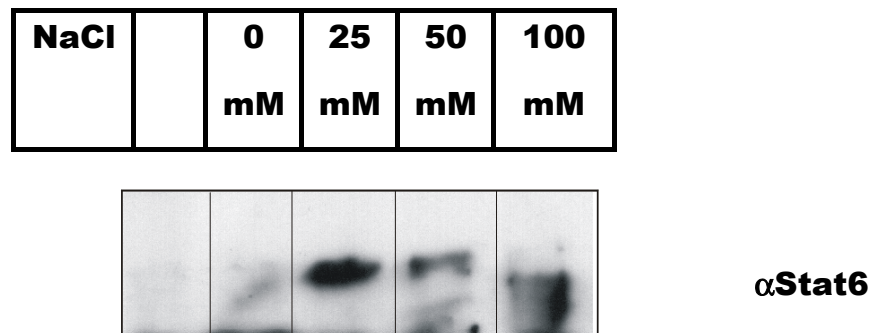


Abb. 37 Bestimmung der optimalen NaCl-Konzentration für die Bindung von Stat6 an $I\epsilon$ -Beads in aus groben TGED-Puffer-Kernextrakten. Die Kernextrakte wurden aus A549 Zellen gewonnen, die 30 min mit IL-4 in einer Konzentration von 10 ng/ml inkubiert wurden. Stat6 wurde mit SDS/PAGE-Immunoblot-Analyse nachgewiesen.

Eine deutlich schwächere Bindung war bei einer Konzentration von 50 mM zu beobachten. Bei den übrigen NaCl-Konzentrationen war keine Stat6-Bindung nachzuweisen.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Verwendung von DNA ohne entsprechende Konsensus-Sequenz die Selektivität erhöht. Es wäre zu erwarten, daß bei Waschsritten mit DNA, die keine Consensus-Element des untersuchten Promotors enthält, unspezifisch DNA-bindende Proteine besser entfernt werden können. Dadurch könnte die Bindung von spezifisch bindenden Faktoren erleichtert und verstärkt werden. Es konnte allerdings keine Verbesserung beobachtet werden.

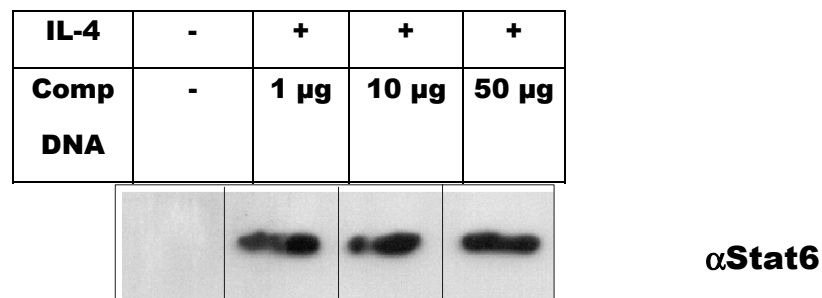


Abb. 38 ϵ -Magnetkugelchenexperiment mit Competitor-DNA. Die Kernextrakte wurden aus A549 Zellen gewonnen, die 30 min mit oder ohne IL-4 in einer Konzentration von 10 ng/ml inkubiert wurden. Die DNA wurde während des Waschschruttes in der angegebenen Konzentration zugesetzt. Stat6 wurde mit SDS/PAGE-Immunoblot-Analyse nachgewiesen.

4.5.2 Stat6Renilla bindet an das ϵ -Promoter-Fragment

Um die Stat6-Bindung an die Promotor-Magnetkugelchen mit einer alternativen Methode zu zeigen, wurden Experimente mit einem transient exprimierten Stat6Renilla in Hek 293-Zellen durchgeführt. Hek 293-Zellen wurden verwendet, weil sie keine eigene Stat6-Expression besitzen [112], aber sonst über alle Elemente des IL-4/Stat6-Signalweges verfügen. Stat6Renilla ist ein artifizielles Stat6, an das am Carboxyende zusätzlich die Aminosäuresequenz der Renilla-Luciferase angehängt ist. Renilla-Luciferase wird auch bei Luciferaseassays verwendet und seine Konzentration kann im Luminometer bestimmt werden. Der Expressionsvektor für Stat6Renilla wurde von Dr. Holger Fehr (Physiologische Chemie II, Würzburg) zur Verfügung gestellt.

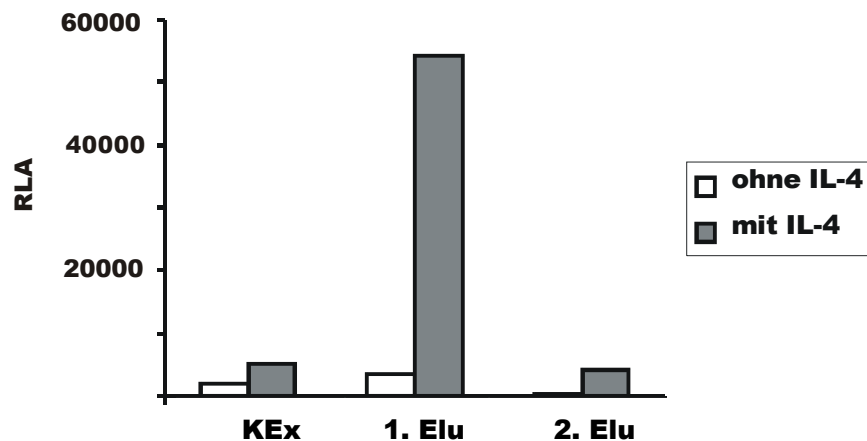


Abb. 39 I ϵ -Magnetkügelchen wurden mit Kernextrakten (KEx) ohne oder mit 10 ng/ml IL-4 stimulierten Hek293-Zellen inkubiert, in die das Stat6Renilla-Expressionsplasmid transient transfiziert wurde. Nach dreimaligem Waschen mit TGED 25mM und zweifacher Elution wurden die Konzentrationen von Stat6Renilla mit Hilfe eines Luminometers bestimmt. Kex bezeichnet einen 1:100 verdünnten Kernextrakt ohne Behandlung mit Magnetkügelchen, 1. bzw. 2. Elu die entsprechenden Eluate von den Magnetkügelchen.

Die Eluate wurden mit Hilfe eines Luminometers auf ihre Stat6Renilla Konzentration untersucht. Als Substrat für die Renilla-Luciferase wurde Coelenterazin oder ein entsprechendes Substrat aus einem Luciferaseassay (Promega) verwendet. Hierbei ist darauf zu achten, daß die Renilla-Luciferase nur als zweites Enzym in dualen Luciferasesystemen Verwendung findet. Bei der Untersuchung der Kernextrakte, die nach einem groben Verfahren hergestellt wurden, ist eine etwa dreifache Anreicherung von Stat6Renilla bei IL-4 Stimulierung zu beobachten. Mit den Magnetkügelchen konnte ungefähr 16 mal mehr Stat6Renilla aus den IL-4 stimulierten als aus den unstimulierten Extrakten isoliert werden. Eine zweite Elution ergab immer noch eine neunmal höhere Menge bei den IL-4 stimulierten Extrakten. (Abb. 39)

4.5.3 Untersuchung verschiedener Stat6-regulierter Promotoren

Die Magnetkugelchentechnik wurde an weiteren Promotoren untersucht. Kriterium für die Auswahl waren eine positive oder negative Regulierbarkeit durch IL-4 und ein Konsenselement für Stat6 bei positiver Regulation und Stat1 bei negativer Regulation. [247], [248], [277], [250], [251], [252], [253], [254]. (Abb. 40)

I ϵ -Promotor

418 5'-CCCGCTGTTGCTCAATCGACTTCCCAAGAACAGAGAGAAAAGGGAAC TTC-3'

Eotaxin-Promotor

2403 5'-GACCCCGCATGGGCAAAGGCTTCCCTGGAACTCCCACACTGTCTGCTCC-3'

IL-1ra-Promotor

1413 5'-TGGTTTCCATTGTGCTCTTCTCCAGGAACCTCAATGAAGGGGAAATAGA-3'

E-Selectin-Promotor

275 5'-AATTTTAAGCATCGTGGATATTCCCGGAAAGTTTTTGGATGCCATTGGG-3'

h15-Lipoxygenase-Promotor

2497 5'-TGAAAGTACCGGGTAAGACTTTCCTGAGAAACCGGAGGTGAACTAGGGTT-3'

hIL-4-Promotor

117 5'-CATTTTCCTATTGGTCTGATTTCACAGGAACATTTTACCTGTTTGTGAGG-3'

hIRF-1-Promotor

1171 5'-TAGCTCTACAACAGCCTGATTTCCCCGAAATGACGGCACGCAGCCGGCC-3'

Fc γ RI-Promotor

264 5'-TTCAAGGATTTGAGATGTATTTCCCAGAAAAGGAACATGATGAAAATGG-3'

Abb. 40 Verschiedene Promotoren die an Magnetkügelchen gekoppelt wurden. Alle werden durch IL-4 reguliert und enthalten ein Stat6- (rotes Kästchen) oder Stat1 (gelbes Kästchen) Consensuselement.

4.5.4 Stat6-Bindung an verschiedenen Promotoren

Bei allen untersuchten Promotoren konnte eine IL-4 abhängige Stat6-Bindung gezeigt werden. Es machte keinen Unterschied, ob bei dem Promotor eine ein TTCNNNGAA-Element oder ein TTCNNNGAA-Element Teil der Sequenz war. Es war aber nur sehr schwer möglich Unterschiede in der Quantität reproduzierbar darzustellen (Abb. 41), da die Quantität bei Reproduktion relativ stark variierte.

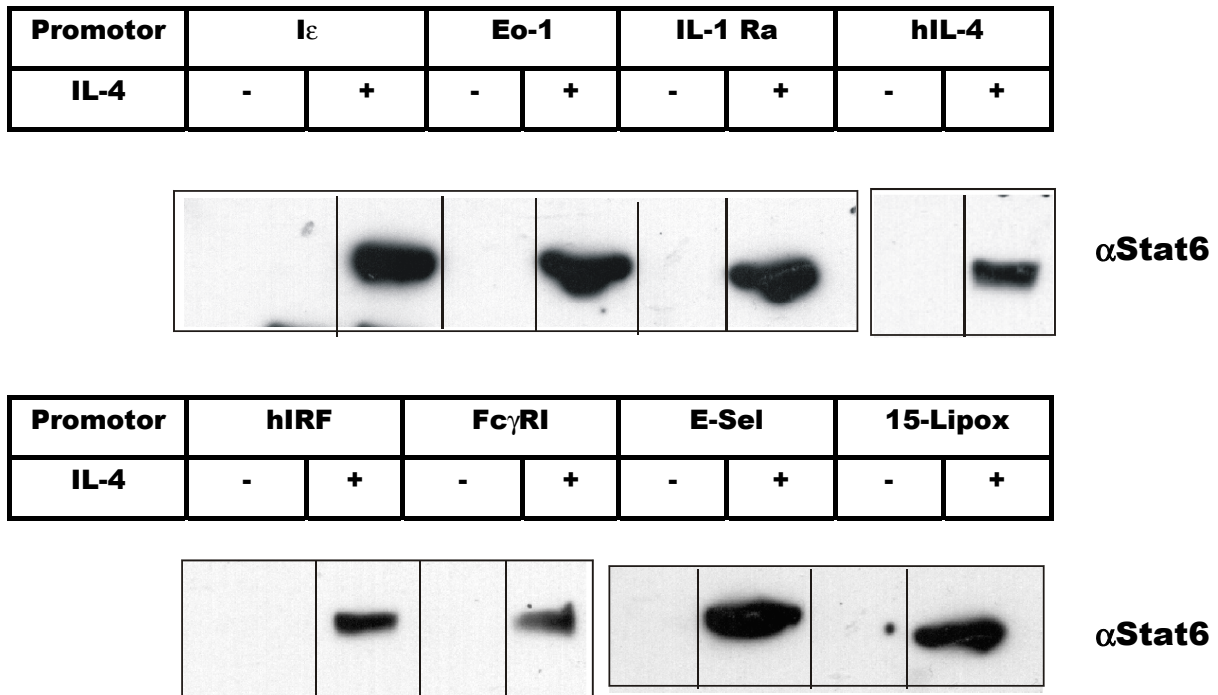


Abb. 41 Bindung von Stat6 an verschiedene Promotoren. Bindende Proteine wurden mit Hilfe von Promotor-DNA-Magnetkugeln aus Kernextrakten isoliert. Die Kernextrakte wurden aus A549-Zellen gewonnen. Die Zellen waren 10 ng/ml 30 min IL-4 inkubiert worden. Stat6 wurde mit SDS/PAGE-Immunoblot-Analyse nachgewiesen.

4.5.5 Proteinfärbung der Eluate

Eine interessante Alternative zur Detektion der bindenden Proteine durch Immunodetektion stellt eine Proteinfärbung dar. Auch Proteine, deren Bindung mit Hilfe von Konsensus-Sequenzen nicht vorhergesagt werden kann, könnten so bestimmt werden. Das experimentell ermittelte Molekulargewicht würde Hinweise auf etablierte Faktoren geben und schließlich könnte das bindende Protein über Immunodetektion ermittelt werden. Möglicherweise wäre bei ausreichender Konzentration auch eine massenspektroskopische Bestimmung oder Sequenzierung denkbar.

Es wurden Amidoschwarzfärbung der Nitrocellulose nach der Immunodetektion, und auch Coomassie- und Silberfärbung (Abb. 42) der Eluate auf Polyacrylamidgelen durchgeführt. Eine selektive Anreicherung spezifischer Transkriptionsfaktoren, so daß eine Färbung mit einer dieser Methoden möglich wäre, gelang jedoch nicht.

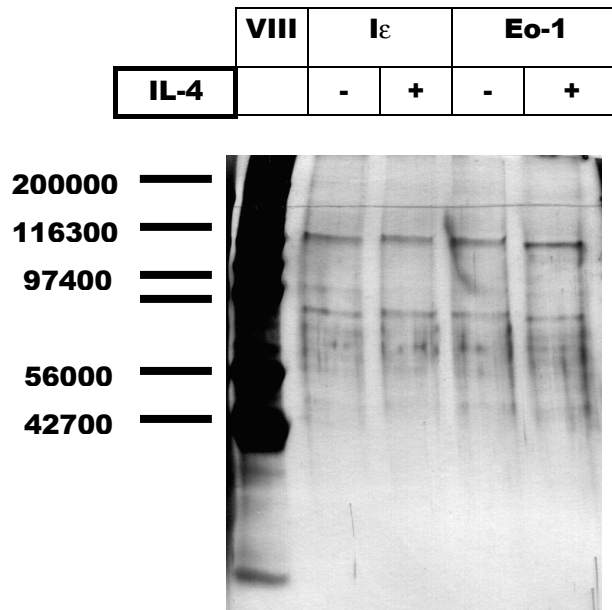


Abb. 42 Silberfärbung der Eluate aus Magnetkugelchenexperiment mit I ϵ - und Eo-1-Magnetkugelchen. Die Kernextrakte wurden aus A549 Zellen gewonnen, die 30 min mit oder ohne IL-4 in einer Konzentration von 10 ng/ml inkubiert wurden. In der ersten Spur ist der Proteinmarker VIII (Merck) aufgetragen.

4.6 Regulierung des Mucin-2-Promotors

Das Erscheinungsbild verschiedener Erkrankungen der Atemwege ist durch eine übermäßige Schleimproduktion geprägt. Wichtige Beispiele sind chronische Bronchitis, cystische Fibrose und auch akutes Asthma. Bei diesen Erkrankungen entwickeln sich Epithelzellen zu Schleim gefüllten Becherzellen. Die Becherzellen sondern verschiedene Proteine ab, die zum großen Teil zur Mucin-Proteinfamilie gehören. Die Mucine verändern in wässriger Umgebung ihre Struktur, so daß der viskose, voluminöse Schleim entsteht, der die Atemwege verstopft.

```

1 GAATTCTACC AAAGATTTAA GAAAGAAGTA TGTCAACTCT GCACAAACCC TTCCAACAAT
61 AACTGAAAAG AGAGGAACAC CTTCAACTCT TCCTCTGAGG CCAGTATTAC CCCGATTCA
121 AAACCACATA AAAACATTAT AAGAAGACTA TGAACCTTTC CTTTGAAAGC AGTCTTTAGA
181 TACAAGCTTT ATCTGACACA TTAACATGTT AGACTGCTTT CAAATGAAAG ACTGTGTATC
241 AAATGAAAGA AGGGGCTTAT GAAGGTGTTG GAAATGAGAT CATCGGGAAA AGAGTGTGGG
301 AAGGGGGCTT TCCTATCCCT CTTATTTACA ACCCAACTTA ATAAACACAC GGTATACTAT
361 TTCTGCTATT CTTTGTTCTA TGTTTCCTGG TTATTTTGAT AATGTACTTT ACCACTGTGG
421 CCAGTTCTTC TCCTGACTCT TTCACTAAAT AAAGTGTTCA TATTTCTGGA AAAAAAAAAA
481 AGAAGGCTAT GAACCAACAT CCCTCATAAA CACAGATGTA AAAATTCTAA ACAAATTAAA
541 AAAATATTTT ACTTTAAGTC CTGGGATGCA TGTGTAGAAC GTGCAGGTTT GTTACATAGG
601 TAAACGTGTG TCATGGTGGT TTGCTGCACC TGTC AACCCA TCACCTAGGT ATTAAGCCCC
661 ACATGCATTA CCTATTTGTC CTGATGCTCT CCCTCCCCTC ACCTCCCACC CCCCACCAGG
721 CCCCAGTGTG TGTTGTTCCC CTCCCTGTAT CCACGTGTTT TCATTCTAAA CAAGATTTTT
781 TCAAATCGAA TCAAAAAATT TATTAAAACATAAACCACAG GGGATTTATTT CCAAGAAATCC
841 AGAGTTGGTC TAACATTCAA AATCAATGTA ATTCATCATG TGAACAGACT AAAGATGACC
901 AATCATAGGA TCATCTCAGT CAATTCAGAA GAAACGCACTT GACCAGATTC AACACCCACT
961 CCTGATAAGA ACTCTCCTAA AAATAGAATA TAACTTTTCT CATCCTCATA ATGGCATTTA
1021 TAAAAGCCTG CAGATGACTC ATACTTAAAC ACTAATGCTT TCCCCTGAAA TCAGGAACAA
1081 GACCAAGATA CCTGCTCTCA CCACTTCTAA TGAACATGGT GCTGGAAAGC ACAGCCAGGC
1141 AATCGGGAAG GTGAATACAC TTAAAAGATC TAGATTGGAA GGGGGAGTGA AACTGTGACA
1201 GATGATGTGA TCATCTGTGC ATAAACGAGT ATCTATAAAG GCAGCGGCAG TTGTCCCTTG
1261 ATATCCACGG GGCATGGGTG CCAGCACCTT AGGACACAAA ATGTATGCGT GCGCTAATCT

```

Diagramm zur Darstellung des Mucin-2-Promotors. Die Sequenz ist in 6 Basenpaaren pro Zeile dargestellt. Die Stat-Consensussequenzen sind durch rechteckige Rahmen hervorgehoben und mit 'Stat6' oder 'Stat1/5' beschriftet. Die Restriktionsschnittstellen Sall (blauer Pfeil) und BglII (grüner Pfeil) sind ebenfalls hervorgehoben und beschriftet. Die Sall-Schnittstelle befindet sich zwischen den Positionen 61 und 121. Die BglII-Schnittstelle befindet sich zwischen den Positionen 1141 und 1201.

Abb. 43 Ausschnitt aus der Sequenz des Muc-2 Promotors. Die Stat-Consensussequenzen sind eingerahmt und beschriftet. Die verwendeten Primer für nested PCR (—) und PCR (—) sind eingezeichnet. Die Restriktionsschnittstellen Sall und BglII sind eingerahmt und beschriftet.

Es wurde gezeigt, dass IL-4 in murinen Atemwegsepithelzellen die Mucin-2-Gen-Expression und Mucus Glykokonjugatproduktion induzierte [211]. Betrachtet man den Mucin-2-Promotor [278] so fällt eine etwa 1000 bp große Region auf, die fünfmal das Stat6-Consensus-Motiv TTCNNNGAA und einmal das Stat5/1-Konsensusmotiv TTCNNNGAA enthält (Abb. 43).

4.6.1 Isolierung eines Enhancer-Elementes aus dem Mucin-2-Promotor

Ein diese Region enthaltendes 1034 bp großes Fragment wurde mit Hilfe einer „nested PCR“ aus genomischer DNA isoliert. Bei der „nested PCR“ wird zuerst ein Fragment amplifiziert, dessen Primer außerhalb des Zielfragmentes liegen und vollständig komplementär zur Matrizen-DNA sind. Ein Bruchteil dieses PCR-Ansatzes dient als Matrize für die PCR des Zielfragmentes. Die Primer für das Zielfragment enthielten die Schnittstellen Sall und BglII, die eine Klonierung in Reporter-genektoren ermöglichte.

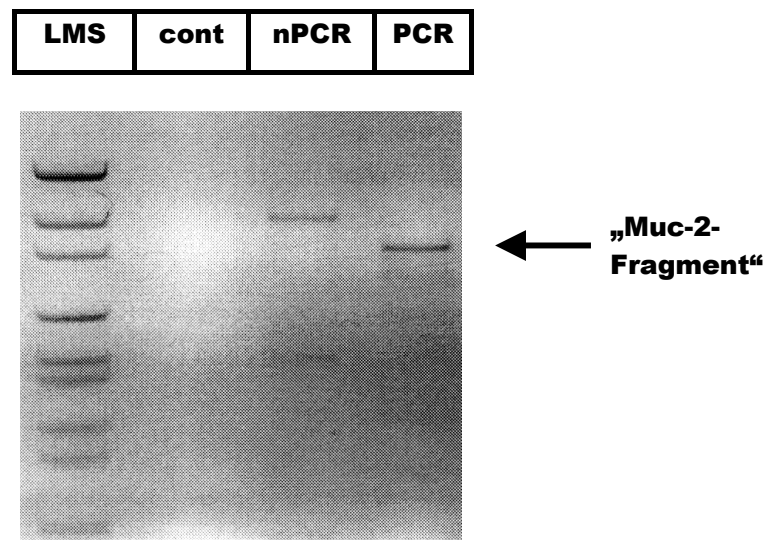
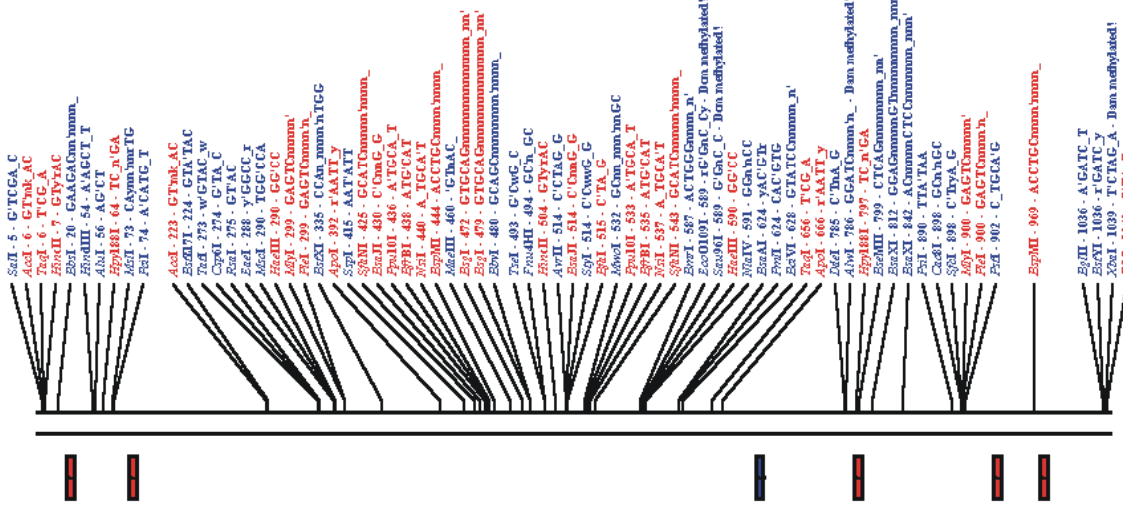


Abb. 44 „Nested PCR“ (nPCR) und PCR von genomischer DNA zur Gewinnung des Muc-2-Promotorfragments. Cont bezeichnet die Kontrolle ohne Matrizen DNA.

4.6.2 Klonierung des Fragmentes in Reporter-genektoren

Da das Muc-2-Fragment Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Sall und BglII besitzt konnte es in die Reporter-genektoren pTKLuc+, pTataLuc+ und pLuc+

zwischen die Schnittstellen Sall und BamHI ligiert werden [255]. Transfektionen mit IL-4 in A549-Zellen zeigten aber keine Stimulierbarkeit.



**Muc-2-Promotor-Fragment
1044 bp**

Abb. 45 Muc-2-Promotorfragment, das in Luciferasereportergenvektoren kloniert wurde. Die Stat6-Konsensus-Sequenzen sind rot, die Stat1/5-Konsensus-Sequenz blau unter der Abbildung markiert.

5 Diskussion

5.1 Eotaxin-1-Promotor

Bei atopischen Erkrankungen sind Eosinophile zentrale Effektorzellen. Bei der Immunantwort auf Helminthen, die als möglicher entwicklungsgeschichtlicher Ursprung der Th2 Immunantwort diskutiert wird, sind sie für die Bekämpfung der Parasiten zuständig.

Eotaxin-1 ist einer der stärksten Rekrutierungsfaktoren, unterstützt die Einwanderung Eosinophiler in betroffene Gewebe und verursacht die Ausschüttung von eosinophilen Mediatoren. In dieser Arbeit wurde der Eotaxin-1-Promotor genauer untersucht.

In der Zwischenzeit sind ähnliche Studien zum Eotaxin-1-Promotor veröffentlicht worden [194, 195, 279, 280]. Die Ergebnisse und Interpretationen der verschiedenen Arbeiten stimmen zum Teil überein. Die Unterschiede und ein neues auf den zusammengefassten Erkenntnissen basierendes Modell sollen hier vorgestellt werden.

Die Kooperation von Transkriptionsfaktoren aus der Stat-Familie (Stat1, Stat6) und der NF- κ B-Familie (p50, p65) in verschiedenen Promotoren ist bekannt und beschrieben. [225, 281]. Die direkte Wechselwirkung wurde nur für Stat6 gezeigt [165].

Der Abstand zwischen Stat- und NF- κ B-Consenselement Bindestellen kann von 10 bis 60 bp betragen, wobei er in Stat6 regulierten Promotoren (γ 3, C ϵ) geringer als bei den Stat1 abhängigen Promotoren (IRF-1, IP-10) ist (Tabelle 3).

Promotor	SRE	NFκB-RE	Abstand (Δ)	Literatur
IRF-1	-123 bis -113	-48 bis -39	64 bp	[163]
IP-10	-224 bis -212	-169 bis -160	43 bp	[282]
Cγ3	-86 bis -77	-48 bis -40	28 bp	[192]
Cε	-82 bis -52	-61 bis -52	11 bp	[225]

Tabelle 3 Sequenzen verschiedener Promotoren, die ein Stat-Response-Element (SBE) und ein benachbartes NFκB-Response-Element enthalten. Der Abstand ist ausgehend von der letzten Base 3' der Stat-Bindestelle bis zur ersten Base 5' der NFκB-Bindestelle angegeben.

Außer dem Eotaxin-1 ist mit dem E-Selectin auch ein weiterer Promotor mit Überlappung beider Elemente bekannt [196]. Im E-Selectin-Promotor überlappen allerdings zwei NFκB-Consensus-Elemente mit einem Stat6-Consensuselement (Abb. 46). Außerdem ist der Promotor nur durch TNF-α aktiviertes NFκB p50/p65 induzierbar, das in einem kompetitiven Mechanismus durch IL-4 aktiviertes Stat6 inhibiert werden kann [196]. In den übrigen Promotoren verstärken sich die Wirkungen von dem für die Consensus-Sequenz spezifischen Stat und den NF-κB-Transkriptionsfaktoren, teilweise in einem synergistischen Effekt.

In dieser Arbeit wurde in dermalen Fibroblasten und der Lungenepithelzelllinie A549 gezeigt, daß IL-4 (IL-13) aktiviertes Stat6 an den Eotaxin-1-Promotor bindet und die Transkription aktiviert. Eine entsprechende Wirkung konnte auch bei TNF-α aktiviertem NF-κB-Faktor p65 beobachtet werden.

TNF-α, LPS, IL-1β und CD40L aktivieren NFκB-Faktoren, die im Cytoplasma in inaktiver Form gebunden an ein Inhibitorprotein vorliegen. Durch die Stimulierung werden die inhibierenden Proteine (IκBs, Inhibitors of κB) phosphoryliert, dann ubiquitinyliert und schließlich degradiert. Der Abbau des Inhibitors legt ein zuvor maskiertes Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal) frei und die NFκB-Faktoren wandern in den Kern und binden an NFκB-Responsive-Elemente in verschiedenen Promotoren. NFκBA (p65) und NFκB1 (p50) sind die beiden häufigsten Faktoren dieser Familie. p65 enthält im Gegensatz zu p50 eine Transaktivierungsdomäne. Homodimere aus p65 oder Heterodimere aus p50/p65 sind transkriptionell aktiv, während Homodimere aus p50 hierfür mit anderen Faktoren kooperieren.[165, 283, 284].

Hoek und Woisetschläger kamen in Fibroblasten und in mit einem Stat6-Expressionsplasmid transfizierten Hek293-Zellen zu dem selben Ergebnis. Ein zusätzlich durchgeführtes Reportergenexperiment mit einem anderen NFκB-Aktivator (CD40-Antikörper) führte im Gegensatz zu Experimenten mit TNFα und

Experimenten mit CD40-Antikörpern und dem I ϵ -Promotor nicht zu einer Aktivierung des Eotaxin-1-Promotors [195]. Das deutet auf eine unterschiedliche Zusammensetzung der aktivierten NF- κ B-Faktoren hin, wie sie schon für CD40 und LPS beschrieben wurde [285].

In BEAS-2B Zellen wiesen Matsukura et al. neben p65 auch p50 als TNF- α induzierten Eotaxin-1-bindenden Faktor nach [194] und in A549-Zellen selbst wurde von Jedrzkiewicz die Bindung von IL-1 β aktivierten p65 und p50 an den Promotor gezeigt [280](Gelshift-Experimente).

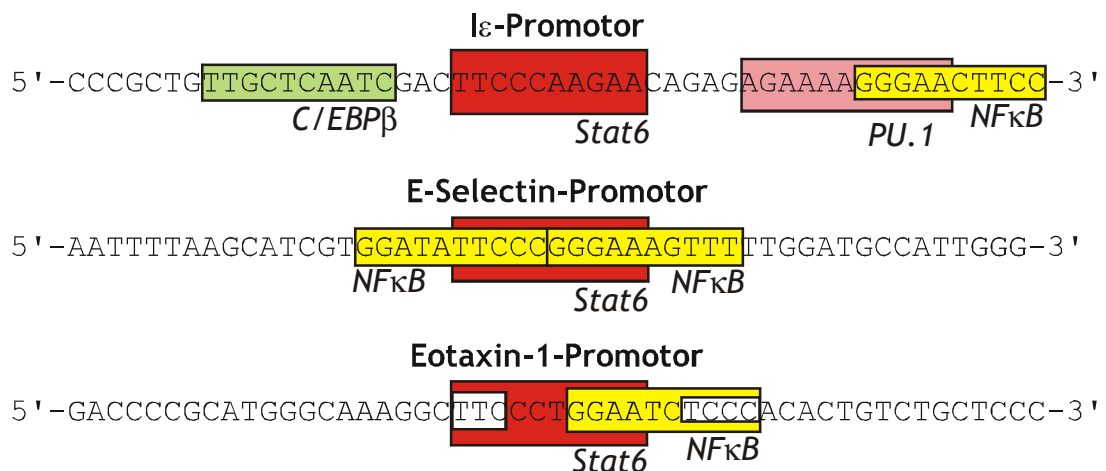


Abb. 46 Stat6/NF κ B regulierte Promotoren mit eingezeichneten Consensus-Sequenzen bzw. Bindestellen. Im Eotaxin-1-Promotor sind potentielle Basen die potentiell an der Bindung weiterer Faktoren beteiligt sind weiß hinterlegt.

An den Eotaxin-1-Promotor können nach derzeitigem Kenntnisstand also p50 und p65 binden. In Fibroblasten bindet nur p65. Außerdem scheint die Art des Stimulus wichtig zu sein, da CD40 aktivierte NF κ B-Faktoren zwar für die Aktivierung des I ϵ -Promotors ausreichen, nicht aber für die Aktivierung des Eotaxin-1-Promotors. Möglicherweise ist das der Grund, warum in A549 nach Aktivierung durch IL-1 β p50 Bindung nachgewiesen wurde [280], in Experimenten in dieser Arbeit in A549 Zellen nach TNF α -Stimulierung jedoch nicht. Interessant ist auch, daß die unterschiedlichen Ergebnisse in Zelllinien auftreten, während in den aus Patienten entnommenen Fibroblasten (Primärzellen) nur p65 Aktivierung, sowohl in der Hoeck/Woisetschläger-Untersuchung als auch in dieser Arbeit, gefunden wurde.

Der Eotaxin-1-Promotor war in der Lage IL-4, IL-13 und TNF- α abhängige Transkription in Reportergenexperimenten zu vermitteln. Es zeigte sich, dass dazu kein Minimalpromotor notwendig ist. Bei dem Fragment, das eine Tata-Box

enthält, handelt es sich also um einen vollwertigen Promotor. Die Aktivierung durch TNF- α war stärker als die durch IL-4 bzw. IL-13. Stimulierung mit beiden Faktoren führte zu einer Verstärkung, aber nicht zu additivem oder synergistischem Verhalten. Hoeck und Woisetschläger konnten einen synergistischen Effekt auf der Stufe der Proteinexpression nachweisen [195], aber nicht, entsprechend den vorgestellten Ergebnissen, bei der transkriptionellen Regulierung, wohingegen Matsukura et al. in BEAS-2B einen leichten Synergismus feststellten. Möglicherweise ist dieser Effekt durch die Limitierung des von beiden Transkriptionsfaktoren genutzten Cofaktor CBP/p300 zu erklären [286].

In weiteren Reporterexperimenten dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Consensus-Elemente intakt sein müssen, um eine Aktivierung der Transkription zu vermitteln. Durch gezielte Mutation wurden die Consensus-Elemente zerstört (Abb. 47), und die Wirkung auf die Regulierbarkeit untersucht.



Abb. 47 Ausschnitt aus der Eotaxin-1-Promotorsequenz in den Reporterplasmiden EoTata=EoLuc+=wt, EoSt6, EoNFkB, EoM1 und EoM2. Mutationen in den mutierten Consensus-Sequenzen sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Die Mutationen in den Reporterplasmiden EoSt6 und EoNFkB zerstörten jeweils sowohl die IL-4 abhängige als auch TNF- α abhängige Stimulierbarkeit des Eotaxin-1-Promotors. Das deutet auf eine Funktion als positiv *cis*-regulierendes Element des Fragmentes im Eotaxin-1-Promotor hin. Wider Erwarten konnte bei EoSt6, bei dem nur das Stat6-Consensus-Element nicht aber das NF κ B-Consensus-Element zerstört ist, keine TNF- α abhängige Induktion gemessen werden. Ebenso war keine IL-4 abhängige Induktion in EoNFkB nachzuweisen.

Dieser Effekt ließe sich durch Bindung weiterer nicht identifizierter Transkriptionsfaktoren erklären, die durch die Mutationen an der Bindung gehindert werden, worauf später eingegangen werden wird.

Da Matsukura et al. in BEAS-2B-Zellen die erwartete selektive Zerstörung der Consensussequenzen mit anderen Mutationen zeigen konnten, wurden die entsprechenden Plasmide hergestellt (EoM1, EoM2) [194]. Allerdings war auch mit diesen neuen Mutationen kein selektiver Effekt in A549 und Fibroblasten zu messen.

In den Experimenten von Hoeck und Woisetschläger führte die Zerstörung der Stat6-Consensussequenz in Fibroblasten, entsprechend den hier vorgestellten Ergebnissen, zum Verlust der Promotoraktivität. Bei der Mutation des NF- κ B-Elementes wurde der Promotor allerdings weder vollständig noch selektiv zerstört. Bei verringerter Basalexpression war das Plasmid mit zerstörter NF- κ B-Consensussequenz sowohl IL-4 als auch TNF- α induzierbar, wobei die TNF- α abhängige Induzierbarkeit stärker beeinträchtigt war. [195]

Aus diesem Ergebnis ziehen Hoeck et al. den Schluß, dass die Aktivierung des Eotaxin-1-Promotors in jedem Fall, also auch bei TNF- α -Aktivierung, Stat6 abhängig ist. Zur Überprüfung führten sie Experimente in Stat6-defizienten Hek293-Zellen durch, in denen eine TNF- α abhängige Stimulierung des Eotaxin-1-Promotors und auch Eotaxin-1-Protein-Segregation nur bei Cotransfektion eines Stat6-Expressionsplasmides möglich war. Außerdem hemmte ein trans-dominant negatives Stat6-Protein, dem die Carboxyterminale-Transaktivierungsdomäne fehlt, sowohl die IL-4 als auch die TNF- α abhängige Eotaxin-1-Expression. Allerdings konnten sie weder eine TNF- α abhängige Aktivierung von Stat6 noch eine TNF- α -abhängige DNA-Bindung von Stat6 nachweisen.

Man kann diese Ergebnisse erklären, wenn man die Bindung eines oder mehrerer Cofaktoren annimmt, die für eine Aktivierung notwendig sind. Die Bindung könnte direkt für die Wirkung von Stat6 bzw. p65 oder/und für die Funktion als positiv regulierendes *cis*-Element notwendig sein. Die Expression eines oder mehrerer Cofaktoren ist möglicherweise durch Stat6 induzierbar und vom zellulären Hintergrund abhängig. Möglicherweise kann auch p50 die Rolle eines solchen Faktors übernehmen.

Es ist beschrieben, dass das Stat6-Consensus-Motiv aus dem I ϵ -Promotor alleine nicht ausreicht um IL-4-abhängige Induzierbarkeit in einem Reporterplasmid zu

vermitteln [287],[188], [288]. Wahrscheinlich ist nicht die Bindung oder Wechselwirkung des für den I ϵ -Promotor spezifischen Transkriptionsfaktor C/EBP β ausschlaggebend, wie vermutet wird.

Bei Seidel [153], Ezernieks [190] und Bömmel [276] reichen Fragmente aus, die wenige Basen länger als das Stat6-Consensus-Motiv sind, um Induzierbarkeit zu vermitteln (Abb. 48).

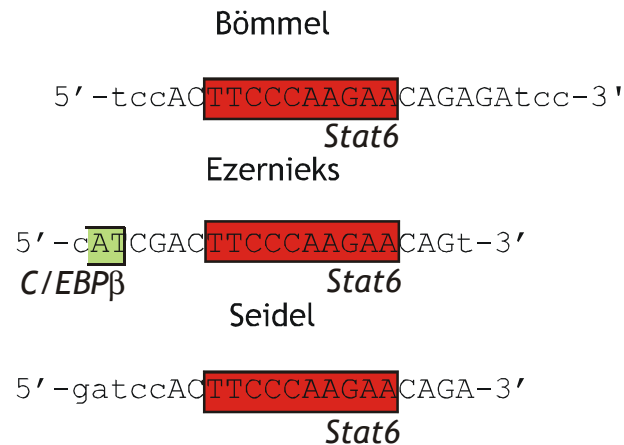
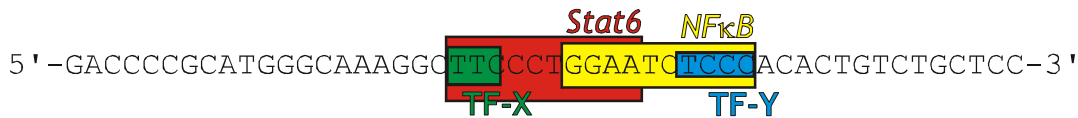


Abb. 48 Verschiedene aus dem I ϵ -Promotor abgeleitete IL-4 induzierbare Minimalsequenzen. Benachbarte Basen, die zur Ligation verwendet wurden sind in Kleinbuchstaben. Consensus-Sequenzen für Stat6 und C/EBP β sind angegeben.

Allerdings unterscheidet sich der Eotaxin-1-Promotor sowohl 5' als auch 3' von der Stat-6-Consensussequenz des I ϵ -Promotor. Trotzdem deuten die Ergebnisse aus diesem sehr ähnlichen Promotor darauf hin, dass andere Faktoren wichtig sein könnten. Ein Faktor, der sowohl mit IL-4 aktiviertem Stat6 [172] als auch mit TNF- α aktiviertem p65 [284, 289] wechselwirkt ist zum Beispiel CBP/p300 [290]. Ohmori und Hamilton erklären die Inhibierung von NF κ B-abhängiger Transkription im IRF-1-Promotor durch Konkurrenz um diesen Faktor [286]. Auch andere bekannte und unbekannte Wechselwirkungen von Stat6 und p65 sind in Betracht zu ziehen. Wenn man berücksichtigt, dass die Mutationen die Bindung solcher Faktoren unabhängig von der Bindung eines der beiden identifizierten Faktoren, also Stat6 oder NF κ B, beeinträchtigen, muß außerdem von einer Wechselwirkung mit der DNA ausgegangen werden. Ein Beispiel für einen solchen Faktor in einem anderen Kontext ist TFII-I. TFII-I bindet im c-Fos Promotor an ein Element aus 7 Basen, wobei 4 Basen gleichzeitig zum Consensuselement von Stat1/Stat3 gehören [173].



Promotor	IL-4	TNF-α	Stat6	NF-κB (p65)	TF-x	TF-y	Aktivität
Wt	+	-	+	-	+	+	+
Wt	-	+	-	+	+	+	+
Wt	+	+	+	+	+	+	+
Mut TF-X	+	-	-	+	-	+	-
Mut TF-Y	-	+	+	-	+	-	-

Abb. 49 Modell des Eotaxin-1-Promotors unter Annahme von zwei Cofaktoren TF-X und TF-Y. Stat6 oder NF-κB (p65) ist nur in der Lage die Transkription zu induzieren, wenn beide Faktoren an die DNA binden.

In dem Modell in Abb. 49 und Abb. 50 sind die äußeren Basen der Consensussequenzen von Stat6 und NFκB nicht allein für die Bindung von Stat6 und p65 (p50) essentiell, sondern auch für die Bindung eines oder mehrerer Cofaktoren. Durch die Mutation des Stat6-Elementes wird verhindert das ein Faktor bindet, der zusammen mit p65 für eine TNF-α induzierte Aktivierung notwendig ist. Dieser Faktor kann wahrscheinlich Stat6-abhängig hochreguliert werden, bindet aber IL-4 unabhängig. Möglicherweise ist dieser Faktor in anderen Zellsystemen und/oder bei Aktivierung von p65/p50-Komplexen nicht essentiell oder so stark exprimiert, daß die durch die Mutationen verringerte Affinität der Bindestelle kompensiert werden kann. Eine entsprechendes Modell könnte auch die Zerstörung der Promotoraktivität durch Mutationen im NF-κB-Element erklären.

Auch die von Hoeck/Woisetschläger beobachtete auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinende Inhibierung der TNF-α abhängigen Induktion durch ein dominant-negatives Stat6 läßt sich erklären. Das verwendete Stat6 ohne Transaktivierungsdomäne wandert *in vivo* nicht in den Kern, selbst wenn es *in vitro* an DNA bindet [174]. Ein überexprimiertes Stat6 könnte über Wechselwirkung mit dem Cofaktor die Kerntranslokation verhindern. Das deutet auf eine Lokalisierung des Cofaktors im Cytoplasma hin. Dass der Faktor durch TNF-α aktiviert werden muß und zum Beispiel nicht CD40 abhängig aktivierbar ist [195], beweist diese These zwar nicht, kann aber als unterstützender Hinweis interpretiert werden.

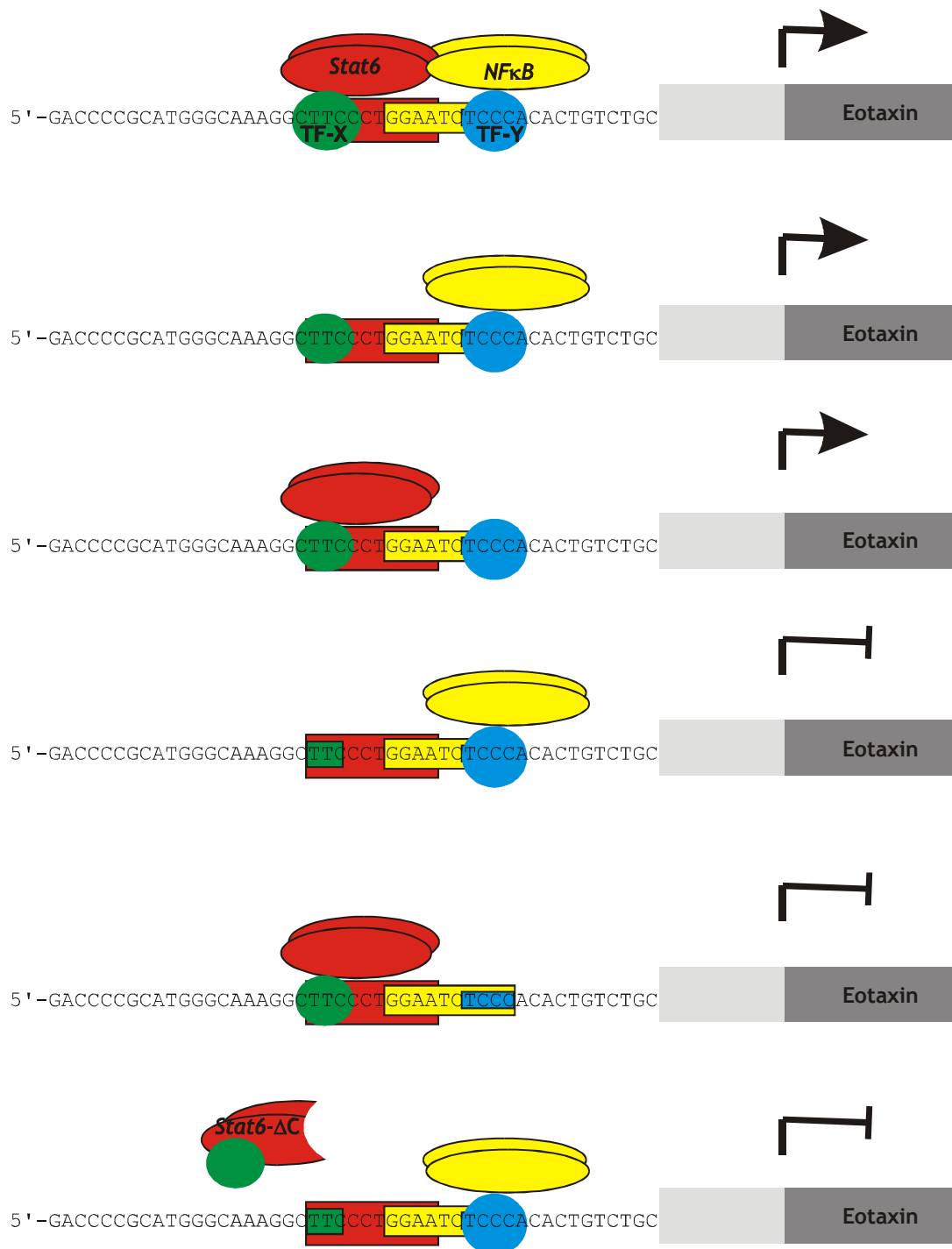


Abb. 50 Aktivierungsschema zum Eotaxin-1-Promotor-Modell. Die Transkriptionsfaktoren sind exemplarisch beschriftet. Die Farben und Consensussequenzen entsprechen vorhergehenden Abbildungen. Aktivierung des Promotors ist durch einen Pfeil gekennzeichnet, Nicht-Aktivierung durch ein T-Ende.

Auch wenn die Grundprinzipien der Regulation des Eotaxin-1-Promotors mit Hilfe der zusammengefassten Ergebnisse zu erklären sind, bleiben einige Fragen offen. In allen bisher untersuchten Zellen, die den Eotaxin-1-Promotor aktivieren, ist bei der IL-4 Aktivierung Stat6 und bei der TNF- α Aktivierung p65 beteiligt.

Möglicherweise bindet in manchen Zellen oder unter bestimmten Bedingungen auch p50. Nicht unwichtig ist, daß die durch CD40- Stimulation [195] im Gegensatz zu den durch IL-1 β -Stimulation [280] freigesetzten NF κ B-Faktoren nicht in der Lage sind den Promotor zu aktivieren. Interessant und offen bleibt die Frage, wie TNF- α mit Hilfe von Stat6 eine Aktivierung vermittelt, ohne das Stat6-Aktivierung und induzierte Stat6-DNA-Bindung gemessen werden. Eine Möglichkeit ist die Existenz vermittelnder Faktoren für die vor allem auch die hier vorgestellten Ergebnisse sprechen, wobei erst die Identifizierung dieser Proteine genauere Untersuchungen ermöglichen würde. Eine Methode sie nachzuweisen, wäre die Durchführung eines Singh-Screening einer Expressionsbibliothek. Weitere Hinweise auf ihr Vorliegen könnte eine UV-Quervernetzung von den potentiellen Faktoren mit radioaktiver Promotor-DNA und eine anschließende gelelektrophoretische Analyse ergeben. Alternativ könnten auch Southwestern-Blot-Experimente durchgeführt werden, um das Molekulargewicht dieser Proteine zu bestimmen. Außerdem besteht die Möglichkeit die Faktoren über Affinitätschromatographie (oder auch Magnetkügelchen-Technik) zu isolieren und weiter zu charakterisieren.

5.2 Hemmung von Stat6

In den letzten Jahren ist es mehr und mehr gelungen die molekularen Mechanismen und Interaktionen allergischer Erkrankungen aufzuklären. Diese Erkenntnisse ermöglichen das Design neuer Wirkstoffe, die spezifisch eingreifen und den Wirkungs-/Nebenwirkungs-Quotienten erhöhen können.

Der IL-4/IL-13 regulierte Jak/Stat6-Signalweg ist elementarer Bestandteil von Th2-Immunantworten und somit ein mögliches Ziel für die Einwirkung solcher Therapeutika [50, 291, 292]. Im Gegensatz zu anderen Signalwegen ermöglicht er nicht nur Eingriff in die Symptomatik, sondern eröffnet zusätzlich Perspektiven für eine grundsätzliche Heilung allergischer Erkrankungen.

Zur Zeit werden verschieden Ansätze verfolgt diesen Signalweg zu hemmen. Einer der in der Entwicklung weit fortgeschrittenen Ansätze, der sich gegenwärtig in der klinischen Erprobung befindet, ist die Hemmung mit R121D/Y124D. Dieser IL-4 Antagonist verhindert die Bindung der IL-4R α -Kette und kann so den Signalweg beider IL-4 Rezeptortypen und auch IL-13 induzierte Aktivierung unterbinden [50].

Einen noch selektiveren Ansatz stellt die Inhibierung von Stat6 dar.

Durch IL-4/IL-13 induzierte Rezeptordimerisierung wird die IL-4R α -Kette an den Resten Y550, Y578 und Y606 durch die Jak-Kinasen phosphoryliert und [109] [110, 293], Stat6-Moleküle assoziieren über ihre SH2-Domäne an die entstandenen Bindestellen und werden anschließend an einem für die Kerntranslokation essentiellen Tyrosin-Rest Y641 phosphoryliert [112]. Diese Phosphorylierung verursacht die Bildung von dimeren Stat6-Komplexen, die in den Kern wandern. Im Kern bindet Stat6 an responsive Elemente im Promoterbereich verschiedener Gene, die für unterschiedliche Funktionen verantwortlich sind, wie Ausprägung des Th2-Typs in T-Helferzellen, aber auch mittelbar und unmittelbar an der Symptomatik beteiligte, wie IgE-Klassenwechsel, Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen oder Mucinen. Obwohl die Stat6- Aktivierung in hohem Maß IL-4/IL-13 spezifisch ist, sind in der letzten Zeit weitere Aktivatoren, wie VEGF, IFN- α , IL-15, CD28, PDGF, TNF α , [130, 131, 152, 294-297] dokumentiert worden. Die *in vivo* Relevanz dieser Signalwege muß allerdings kritisch beurteilt werden. In den meisten Fällen kann trotzdem eine direkte Verbindung zu Th2-Immunantworten gezogen werden, die

unabhängig von IL-4 und IL-13 ist. Hier stellt der Stat6-Inhibitor möglicherweise eine wichtige Ergänzung oder auch Alternative zu IL-4/IL-13-Hemmern dar.

Stat6 knockout Mäuse (Stat6^{-/-}) weisen ebenfalls auf eine essentielle Funktion von Stat6 hin. Der Phänotyp zeigt zwar eine normale Entwicklung von B- und T-Zellen, der IgE und IgG1- Spiegel im Serum ist jedoch reduziert, die CD23 und MHC II-Expression ist stark verringert und es findet keine T_H2 Differenzierung von T-Zellen mehr statt [139, 298, 299]. Damit zeigt die Stat6^{-/-} Maus einen ähnlichen Phänotyp, wie die IL-4^{-/-} Maus [300, 301] und die IL-4Rα^{-/-} Maus [302].

Zur Zeit sind verschiedene Methoden bekannt Stat6 spezifisch zu hemmen. Eine Möglichkeit besteht darin die Expression von Stat6 durch antisense-Oligonucleotide zu inhibieren [303]. Durch Hybridisierung von zur Stat6-mRNA komplementären antisense-Oligonucleotiden konnte die IL-4 induzierte Cε-Transkription in DND39 Zellen gehemmt werden [304]. In einem anderen Ansatz wurden durch Transfektion von *cis*-Element-Doppelstrang-Oligonucleotiden (*cis*-element double stranded oligodeoxyribonucleotides, ODN), auch decoy-Oligonucleotide genannt, verschiedene IL-4 spezifische Reaktionen, wie Transkription, und überraschenderweise auch Proliferation gehemmt [305].

Bei der Aktivierung von Stat6 wird die Spezifität durch die Assoziation von Stat6 mit der IL-4Rα-Kette vermittelt [109]. Die Entwicklung eines weiteren spezifischen Inhibitors kann sich genau das zu Nutze machen. In dieser Arbeit wurde zusammen mit Dr. Sascha Stolzenberger ein Stat6-Inhibitor untersucht der seine Spezifität aus der Sequenzidentität zum Stat6-Bindemotiv des IL-4Rα gewinnt. Die Effektivität solcher Fragmente als spezifische kompetitive Inhibitoren wurde schon in früheren Untersuchungen gezeigt [306]. Um die inhibitorischen Peptide in die Zelle zu schleusen wurde ein Weg gewählt, der auch in der therapeutischen Applikation eine Option darstellt.

Der Transkriptionsfaktor Antennapedia aus *Drosophila melanogaster* besitzt die Eigenschaft Membranen eukaryotischer Zellen durchqueren zu können, ohne dafür Energie oder einen Rezeptor zu benötigen [307, 308].

Eine nähere Untersuchung dieses Phänomens ergab, daß ein nur 16 AS langes Peptid (AS 43→58) der dritten Helix der Homöodomäne des Antennapediaproteins für dieses Verhalten verantwortlich ist. Es zeigte sich, daß dieses Peptid (Antennapediapeptid (AP) oder auch Penetratin) in der Lage war, andere, kovalent mit dem Antennapediapeptid verknüpfte Peptide oder

Oligonukleotide in Zellen zu transportieren. Die Internalisierung des Antennapediapeptids findet sowohl bei 37 °C, als auch bei 4 °C statt und ist nicht abzusättigen [307]. Es ist daher zu erwarten, dass die Internalisierung unabhängig von Rezeptoren stattfindet. Der intrazelluläre Transport von AP funktioniert mit Zellen, die α -2.8-Polysialinsäure (PSA) auf der Zelloberfläche exprimieren besser, als mit solchen, die kein PSA tragen [309]. Vermutlich erhöht PSA die intrazelluläre Aufnahme von AP durch lokale Erhöhung der Konzentration an der Zellmembran oder stabilisiert die Wechselwirkung des Antennapediapeptids mit der Membran. In der Zwischenzeit hat sich gezeigt, daß viele Homöoproteine ähnliche Internalisierungseigenschaften wie das Antennapediaprotein haben [310], so daß in nächster Zeit die Entwicklung von weiteren Peptidvektoren zu erwarten ist.

Antennapedia ist in verschiedenen Ansätzen benutzt worden um Inhibitorpeptide in Zellen zu schleusen.

In CCL 39 Fibroblasten konnte durch ein Antennapedia gekoppeltes prolinreiches SH3-bindendes Peptid die Grb2-Sos vermittelte Proliferation gehemmt werden [274].

Durch ein synthetisches Peptid, das vom Grb2-SH2 Bindungsepitop des EGF-Rezeptors abgeleitet war, wurde die durch EGF und PDGF induzierte MAP-Kinase-Aktivierung stark vermindert [311].

In einem weiteren methodisch vergleichbaren Ansatz wurde die Aktivierung der Phospholipase C γ (PLC γ) in Kleinhirnzellen nach Stimulierung mit Fibroblast Growth Factor (FGF) verhindert. Hierbei wurde ein kurzes Peptid mit einer aus dem FGF-Rezeptor abgeleiteten AS-Sequenz verwendet, das an die SH2-Domäne der PLC γ bindet. Nach dem Einschleusen des Peptids in die Neuronen wurde die Phospholipidhydrolyse inhibiert und die Bildung von Neuriten in den behandelten Zellen gehemmt [273].

Durch Internalisierung von kurzen phosphorylierten Peptiden konnte die Hemmung der Signaltransduktion von CD44 [312] und der Stimulation der Proliferation durch ein PI3-Kinase bindendes Peptid [313] gezeigt werden.

Außerdem wurde mit einem nicht phosphorylierten Peptid, abgeleitet von dem cdk Inhibitor p21^{WAF1}, die Proliferation von humanen Krebszellen gehemmt [314]. Diese Studien belegen eindrucksvoll, dass phosphorylierte antagonistische Peptide, die in lebende Zellen transportiert werden, dort ihr Zielprotein finden

und mit endogenen Substraten dieser Proteine kompetieren können. Die Peptide sind offenbar auch im Cytoplasma in der Regel so stabil, dass sich ihre Wirkung auf längerfristige Vorgänge, wie etwa die Proliferation, auswirken kann. In einzelnen Fällen konnten die Wirkung von Peptiden bis zu 8 Tagen nach der Applikation in Zellen nachgewiesen werden [275, 315].

In den hier vorgestellten Experimenten wurde eine 16 AS langes Peptid aus der IL-4R α -Sequenz an ein Antennapeptid gekoppelt. Das Konzept und die Peptide sind in Abb. 51 schematisch dargestellt.

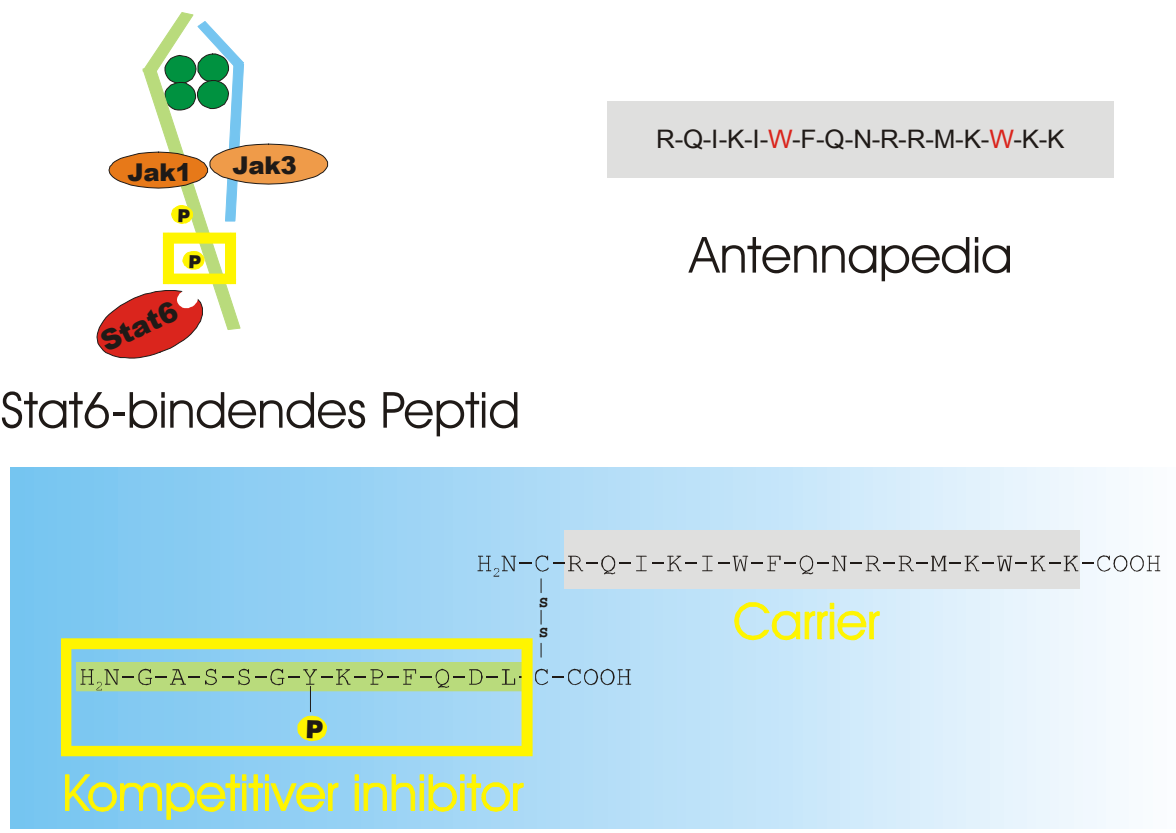


Abb. 51 Schema zur Hemmung mit Stat6-AP. AP/Stat6BP besteht aus dem Membran gängigen Antennapeptid und dem aus der IL-4R α -Kette gewonnen Inhibitorpeptid.

In dieser Arbeit wurde die Translokation durch die Membran, die Inhibierung der Phosphorylierung und der Transkription gezeigt. Weiterführende Untersuchungen sind in der Dissertation von Dr. Sascha Stolzenberger (Dissertation Sascha Stolzenberger, Universität Würzburg) zu finden.

Im Vergleich mit den oben angeführten Studien war das kurze Zeitfenster in dem eine Inhibierung beobachtet wurde, überraschend. Wahrscheinlich ist dieses

Phänomen auf eine Desaktivierung durch spezifische und/oder unspezifische Phosphatasen zurückzuführen, da das Zeitfenster durch Einsatz des Phosphatasehemmers Natriumpervanadat vergrößert werden konnte. Allerdings scheiterten Versuche die Wirkung von Phosphatasen durch Verwendung eines nicht mehr hydrolysierbaren Phospho-Tyrosin-Analog Phosphonomethyl-L-Phenylalanin [316] zu umgehen. Dieses Analog ist nicht mehr in der Lage SH2-Domänen zu binden. (Dissertation Sascha Stolzenberger, Universität Würzburg). Erstaunlich effektiv hemmte AP/Stat6BP dagegen die Transkription, wenngleich die Untersuchungen auf Grund der Erfahrungen aus den Experimenten zur Phosphorylierung nur über einen kurzen Zeitraum beobachtet wurden. In unterschiedlichen AP/Stat6BP-Präparationen konnte ein Aktivitätsunterschied festgestellt werden, der in weiterführenden Arbeiten untersucht werden muß. Unerwartet ist zudem die Inhibierung der Basalaktivität in den Ba/F3-4R γ -5xGAS-Zellen. Das eine Stat6-Inhibierung in diesen Zellen einen Einfluß auf die Basalaktivität hat, wurde auch in den Experimenten zur Wechselwirkung von Stat6 und dem Glucocorticoidrezeptor beobachtet. Die Befunde deuten darauf hin, dass auch in unstimulierten Zellen Stat6 an den Promotor bindet. Eine Aktivierung durch von den Zellen selbst ausgeschüttetes IL-4 ist unwahrscheinlich, da es sich um eine Prä-B-Zelllinie handelt. Allerdings kann bei einer Zelllinie nie ein artifizieller Effekt ausgeschlossen werden, der durch die Transformation der Zellen oder durch Mutagenese über längere Kulturzeiträume (Zelldrift) entstanden sein kann.

5.3 Stat6 und der Glucocorticoidrezeptor

Die bei der Behandlung von Asthma und allergischer Rhinitis eingesetzten Therapeutika sind in den meisten Patienten effektiv, wohingegen die Behandlung der atopischen Dermatitis auf größere Schwierigkeiten stößt.

Zu den effektivsten und am vielseitigsten einsetzbaren Medikamenten gehören Corticosteroide (Tabelle 4). [317]

	Asthma	Allergische Rhinitis	Atopische Dermatitis	Atopische Bindehautentzündung	Anaphylaxis
Topicale Corticosteroide	+++	+++	++	+++	-
Bronchodilatoren	+++	-	-	-	+++ (Adrenalin)
Cromone	+	+	-	++	-
Theophylline	++	-	-	-	-
Antihistaminika	-	++	+	-	+
Antileukotriene	+	-	-	-	-

Tabelle 4 Vergleich derzeitig verwendeter Therapeutika atopischer Erkrankungen. Legende: **+++**, hoch effektiv; **++**, effektiv; **+**, schwach effektiv; **-**, ineffektiv. [317]

Die Therapie mit Corticosteroiden hat aber auch Nachteile. Systemische Nebeneffekte begrenzen die Dosierung bei der Vergabe über längere Zeiträume und bei der Behandlung von atopischer Dermatitis ist der Einsatz durch die hervorgerufene dermale Atrophie begrenzt. Zusätzlich tritt speziell bei der Behandlung von Asthma nicht selten eine Steroidresistenz auf.

Corticosteroide binden an einen cytosolischen Glucocorticoidrezeptor, der in den Zellkern wandert und als Homodimer an Promotoren bindet und die Transkription aktiviert. Grundsätzlich beruht die Wirkung auf der Unterdrückung vieler inflammatorischer Gene, eingeschlossen Cytokine, inflammatorische Enzyme, Adhäsionsmoleküle und inflammatorische Mediatorrezeptoren.

Bei dem Einsatz als Therapeutikum ist ein vorrangiges Ziel eine möglichst hohe Wirkung auf die Pathologie bei gleichzeitig möglichst geringem Umfang an Nebenwirkungen zu erreichen. Zumeist kann dies durch eine hohe Spezifität erreicht werden.

Es hat sich gezeigt, dass aktivierte Glucocorticoidrezeptoren auf zwei Arten in die zelluläre Regulation eingreifen. Zum einen aktivieren sie Promotoren in dem sie an

ein Consensusmotiv binden. Durch diesen Mechanismus werden vor allem die endocrinen und metabolischen Funktionen vermittelt. Zum anderen binden sie Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B, AP-1 oder NF-AT [318], verhindern die Bindung an Promotoren und unterdrücken die Transkription verschiedener Gene, inflammatorische Proteine, Cytokine, Enzyme und Adhäsionsmoleküle eingeschlossen. Dieser Wirkmechanismus ist für die meisten bei der Therapie erwünschten Effekte verantwortlich. Bei der Entwicklung neuer topischer Corticosteroide versucht man das Gleichgewicht zu Gunsten der inhibitorischen Effekte zu verschieben.

Auf welche Weise der IL-4 und der Glucocorticoid Signalweg auf molekularer Ebene interagieren, ist noch weitgehend ungeklärt. Eine mögliche Wechselwirkung ist die des Glucocorticoidrezeptors mit Stat6.

Die Wechselwirkung aktivierter Glucocorticoidrezeptoren mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren ist bekannt. Neben AP-1 [319-321], NF- κ B [322] sind auch Mitglieder der Stat-Familie Bindungspartner für Glucocorticoidrezeptoren.

Dabei treten bei der Wechselwirkung von Glucocorticoiderezeptoren und Stat-Molekülen sowohl synergistische Verstärkung als auch Hemmung der faktorinduzierten Transkription auf.

In Cos-7-Zellen, die mit Prolaktin stimuliert wurden, führt die Wechselwirkung von Glucocorticoidrezeptor und Stat5 bei dem β -Casein-Promotor zu einer synergistischen Verstärkung, wohingegen eine Inhibierung des LTR-Promotors beobachtet werden [166, 171]. Im β -Casein Promotor wurde zudem eine Verstärkung der Stat6 abhängigen Induktion durch den Glucocorticoidrezeptor gemessen[187].

In der Ratten Zelllinie H4IIE und in COS-7-Zellen, die mit IL-6 stimuliert wurden, kommt es zu einer Verstärkung der Transkription des γ -Fibrinogen- und des MMTV-Promotors durch Kooperation von Stat3 mit dem Glucocorticoidrezeptor [168].

In Monozyten wurde eine Verstärkung der IFN- γ induzierten Expression von Fc γ RI durch das synthetische Glucocorticoid Dexamethason (Dex) gemessen, und der

Effekt auf eine Kooperation von Stat1, dem Glucocorticoidrezeptor und dem Transkriptionsfaktor PU.1 zurückgeführt werden [167].

Außerdem hemmt Dex die IL-12 induzierten Stat4-Phosphorylierung durch Dex gezeigt, ohne dass die IL-4 induzierte Stat6-Phosphorylierung beeinträchtigt wird [323].

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Dexamethason die IL-4 induzierte Aktivierung eines stabil transfizierten Reportergens konzentrationsabhängig hemmt. Um die Beeinflussung des Experimentes durch andere Effekte des Dexamethasons weitgehend auszuschließen, wurde der Zellzustand mit Trypanblaufärbung überprüft. Die Zellen zeigten weder zu Beginn noch gegen Ende der IL-4 Stimulierung eine Veränderung in Anzahl und Zustand.

Da in den transienten Experimenten eine kürzere Stimulierung mit Dexamethason gewählt wurde, ist es schwierig die Ergebnisse zu vergleichen. Eine Dexamethason abhängige Hemmung konnte bei der transienten Transfektion des in den Ba/F3-4R γ -5xGas stabil transfizierten Reportergens in Ramoszellen nicht signifikant und nur tendenziell nachgewiesen werden. Ein Reporterplasmid, das ein 51bp langes Fragment aus dem IgE-Klassenwechsellpromotor [276] enthält, zeigte tendenziell sogar eine Erhöhung. Das würde der beim β -Caseinpromotor beobachteten Verstärkung der IL-4/Stat6-Aktivierung entsprechen [187]. Für abschließende Interpretation müssten aber weitere Experimente mit verbesserten experimentellen Parametern durchgeführt werden.

In den Experimenten zur DNA-Bindung von Stat6 zeigt Dexamethason keinen Einfluß. Ebenso wenig konnte eine Dexamethason induzierte Bindung des Glucocorticoidrezeptors an das Element gemessen werden. In weiteren Experimenten konnte allerdings von Armelle Biola in einer Kooperation die Assoziation von Stat6 und Glucocorticoidrezeptor mittels Coimmunpräzipitation nachgewiesen werden [324].

5.4 Stat6/DNA-Wechselwirkung

Verschiedene Stat-Transkriptionsfaktoren werden gleichzeitig in vielen Zelltypen exprimiert und auch aktiviert. Obwohl die Bindungsstellen (Consensussequenzen) sehr ähnlich sind, wird eine erstaunliche Selektivität erreicht. Das wird durch die unterschiedlichen Phänotypen der Stat-Knock out-Mäuse eindrucksvoll belegt [325].

Die natürlichen Sequenzen variieren, gehorchen aber dem allgemeinen Muster $TT(N)_nGAA$. In den meisten Fällen kann dieses auf das Muster $TTC(N)_nGAA$ reduziert werden. $TTC(N)_2GAA$ bindet Stat3-Homodimere und Stat3-enthaltende-Heterodimere, $TTC(N)_3GAA$ bindet Stat1-Homodimere, Stat3-Homodimere oder Stat3-enthaltende Heterodimere, Stat5-Homodimere und Stat6-Homodimere, $TTC(N)_4GAA$ bindet Stat6-Homodimere [112, 153, 154].

	T	T	C	N	N	N	N	G	A	A
A				2	3	4	2		8	8
C			8	6	5					
G						3	6	8		
T	8	8				1				

Tabelle 5 Schema zur Basenverteilung acht verschiedener humaner Stat6-regulierter Promotoren. Literaturverweis: [247, 248, 250, 277] [192, 212, 251, 252]

Betrachtet man verschiedene Stat6-regulierte Promotoren mit dem Konsensusmotiv $TTC(N)_4GAA$, so fällt eine relativ hohe Homologie der ersten Basen nach bzw. vor dem palindromischen Teil der Bindungsstelle auf, die möglicherweise für die Bindung von Stat6 oder anderen Faktoren eine Rolle spielt (Tabelle 5).

Neben Stat6 bindet auch der Transkriptionsfaktor BCL-6 an dieses Consensusmotiv [326], und wirkt dort als spezifischer Transkriptionshemmer. $BCL-6^{-/-}$ -Mäuse entwickeln Myocarditis, pulmonale Vaskulitis, haben keine germinalen Zentren und erhöhte Expression von Th2-typischen Cytokinen [327].

Für Stat6 ist die Wechselwirkung mit verschiedenen Cofaktoren gezeigt.

So wurde die Assoziation durch Coimmunpräzipitation mit p300/CBP [172], NF κ B-Faktoren (p50/p65) [165], dem Glucocorticoidrezeptor [324] und mit IRF-4 [175] gezeigt.

In verschiedenen Promotoren konnte eine Kooperation mit anderen Faktoren nachgewiesen werden. Der am besten untersuchte Promotor ist der IgE-Klassenwechsel oder I ϵ -Promotor. Bei diesem Promotor wurde die Beteiligung von C/EBP β , Stat6, PU.1, NF κ B (p50/p65) [225, 288] und BSAP [328] nachgewiesen. In diesem Promotor überlappt die PU.1- mit der distalen NF κ B-Consensussequenz. Durch selektive Mutation einer der überlappenden Bindestellen (PU.1 oder NF κ B), bleibt der Promotor unbeeinflusst, wohingegen die Mutation beider Bindestellen die Induzierbarkeit unterbindet [225].

Um die Wechselwirkung von Stat6 und anderen Transkriptionsfaktoren mit der DNA zu untersuchen, wurde die „Magnetobead-Technik“ verwendet. Dabei werden nachsynthetisierte Promotorfragmente über eine Biotin/Streptavidin-Wechselwirkung an Magnetkügelchen gebunden. Die Kügelchen werden dann mit Zell- oder Kernextrakten inkubiert und anschließend gewaschen. Durch den Waschvorgang werden Proteine konzentriert, die stark an die DNA binden und somit mit hoher Wahrscheinlichkeit spezifisch bindende Transkriptionsfaktoren sind. Weiter kann man unterschiedlich stimulierte Extrakte verwenden, um die faktorabhängige Aktivierung des Promotors zu untersuchen. Die Eluate können dann über SDS-PAGE/Immunoblot auf spezifische Transkriptionsfaktoren untersucht werden. [268-270, 284]

In den Experimenten konnte die Wechselwirkung von Stat6 mit verschiedenen Promotoren nachgewiesen werden. Dabei wurden Promotoren untersucht, die ein positives *cis*-Element mit der Consensussequenz TTC(N)₄GAA enthalten und auch zwei Promotoren, die ein von Stat1 positiv, von Stat6 aber negativ reguliertes *cis*-Element TTC(N)₃GAA enthalten (Abb. 40). [247], [248], [277], [250], [251], [252], [253], [254]

I ϵ -Promotor

418 5'-CCCGCTGTTGCTCAATCGACTTCCCAAGAAACAGAGAGAAAAGGGAAC TTC-3'

Eotaxin-Promotor

2403 5'-GACCCCGCATGGGCAAAGGCTTCCCTGGAAATCTCCACACTGTCTGCTCC-3'

IL-1ra-Promotor

1413 5'-TGGTTTCCATTGTGCTCTTCTCCAGGAACTCAATGAAGGGGAAATAGA-3'

E-Selectin-Promotor

275 5'-AATTTTAAGCATCGTGGATATTCCCGGAAAGTTTTTGGATGCCATTGGG-3'

h15-Lipoxygenase-Promotor

2497 5'-TGAAAGTACCGGGTAAGACTTTCCTGAGAAACCGGAGGTGAACTAGGGTT-3'

hIL-4-Promotor

117 5'-CATTTTCCTATTGGTCTGATTTACAGGAAACATTTTACCTGTTTGTGAGG-3'

hIRF-1-Promotor

1171 5'-TAGCTCTACAACAGCCTGATTTCCCGAAATGACGGCACGCAGCCGGCC-3'

Fc γ RI-Promotor

264 5'-TTCAAGGATTTGAGATGTATTTCCAGAAAGGAACATGATGAAAATGG-3'

Abb. 52 Verschiedene Promotoren die an Magnetkügelchen gekoppelt wurden. Alle werden durch IL-4 reguliert und enthalten ein Stat6- (rotes Kästchen) oder Stat1 (gelbes Kästchen) Consenselement.

Stat6 bindet neben TTC(N)₄GAA auch an TTC(N)₃GAA-Consensussequenzen, wenngleich das Verhältnis in einer Untersuchung artifizierlicher Bindestellen auf 93:7 bestimmt wurde [154]. Zumeist werden diese durch Stat6 negativ reguliert. Eine Ausnahme bilden das Element aus dem Fc ϵ RIIb(CD23b)-Promotor und der Lymphotoxin- α -Promotor. Andere bekannte Elemente, wie hIRF-1, Fc γ RI und die Chemokine MIG und IP-10 [205, 210, 286] [203] werden durch Stat6 negativ und durch Stat1 positiv reguliert.

Es konnten in dieser Arbeit keine quantitativen Unterschiede der Bindung von Stat6 an beide Consensusmotiven festgestellt werden. Eine Möglichkeit diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen, bietet die beschriebene Verwendung eines Renilla-Luciferase-gekoppelten Stat6, dessen Bindung im Luminometer ähnlich

einem Reporterassay bestimmt werden kann. Bei Verwendung von λ -Magnetkugeln konnte ungefähr 16 mal mehr Stat6Renilla aus den IL-4 stimulierten als aus den unstimulierten Extrakten isoliert werden. Weiterführende vergleichende Versuche können möglicherweise mehr Aufschluß über das Bindeverhalten an den unterschiedlichen Consensussequenzen geben. Die Detektion der bindenden Proteine durch Proteinfärbung gelang nicht, da hierfür nicht genügend spezifisch bindende Proteine isoliert werden konnten. Lediglich Banden unspezifisch bindender Proteine, bei denen es sich wahrscheinlich um typische Verunreinigungen, wie Poly(ADP-ribose)polymerase oder das Ku Antigen handelte [329], waren zu sehen. Neben Stat6 wurde bei den Untersuchungen zum Eotaxin-1-Promotor auch der Faktor p65 mit der Magnetkugeln-Technik nachgewiesen. Abschliessend betrachtet, bietet die Magnetkugeln eine nützliche Methode Protein-DNA-Wechselwirkungen zu untersuchen. Ob die Methode ein größeres Potential besitzt und zur Isolierung von unbekanntem Transkriptionsfaktoren für die Silbergel- oder sogar massenspektrometrische Analyse sinnvoll angewendet werden könnte, kann mit den hier vorgestellten Experimenten allerdings noch nicht abgeschätzt werden. Bei der Hochdurchsatzuntersuchung von DNA-Protein-Wechselwirkungen in der industriellen Forschung ist man auf die Verwendung von Oligonucleotid bedeckten Platten übergegangen, bei denen auch die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung zur Befestigung genutzt wird [291, 330].

5.5 Regulierung des Mucin-2-Promotors

Viele epitheliale Oberflächen des Körpers sind normalerweise mit Schleim (Mucus) bedeckt, der durch Becherzellen und submucosale Drüsen-Schleimzellen abgesondert, verschiedene Schutzfunktionen ausübt. Atemwegsschleim schützt zum Beispiel die unteren Atemwege und Alveoli vor Austrocknung und Schädigung durch eingeatmete Partikel, Pathogene, oder auch chemische Reizstoffe.

Übermäßige Schleimproduktion trägt im Gegensatz dazu in verschiedenen Fällen zur Symptomatik von Krankheitsbildern bei. Als wichtige Beispiele können hier Asthma, chronische Bronchitis und cystische Fibrose genannt werden. [331, 332] Atemwegshypertrophie, Mucus-Hypersecretion und Becherzell-Hyperplasie sind auch entscheidende Charakteristika von IL-4 und IL-13-transgenen Mäusen [211, 217] und konnten auf die Mitwirkung von IL-4R α zurückgeführt werden [333].

Weiter wurde gezeigt, dass der zentrale Jak/Stat6-Signalweg der IL-4R α -Kette eine Rolle spielt. So sind Stat6^{-/-}-Mäuse sowohl vor Antigen-induzierter Atemwegs-hyperreaktion als auch vor Antigen-induzierter Mucus-Produktion geschützt [334, 335].

Mucus besteht im wesentlichen aus Mucinen und anorganischen Salzen, die in Wasser gelöst sind. Mucine sind eine Familie großer, stark glykosylierter Proteine. Neben den sekretierten Mucinen der mucosalen Oberflächen und des Speichels gibt es auch einige Mucine mit einer hydrophoben transmembranen Domäne, die membrangebunden vorkommen.

Mucingene codieren für Mucinmonomere, die als stäbchenförmige Apomucine synthetisiert und posttranslational weitflächig glykolysiert werden.

In den eigentlichen Mucinen können zwei Regionen unterschieden werden. Die amino- und carboxyterminalen Regionen, die nur leicht glykolysiert, aber Cystein-reich sind. Man vermutet das die Cysteine zwischen den einzelnen Mucinen Disulfidbrücken ausbilden können.

Der zweite Bereich, die zentrale Region, besteht aus verschiedenen Tandemwiederholungen von 10 bis 80 Resten, die zu bis zu 50% aus Serin- oder Threonin-Resten bestehen. Dieser Bereich wird mit Hunderten von Sauerstoff-verbrückten Oligosacchariden besetzt. Stickstoff-verbrückte Oligosaccharide, sind

auch vorhanden, aber wesentlich seltener. Die immense Wasserspeicherkapazität und auch die hohe Proteolysebeständigkeit liegt in diesem Zucker-Mantel begründet.

Mucine werden als Aggregate mit einem Molekulargewicht von 1-10 Millionen Da segregiert. Innerhalb dieser Aggregate sind die Monomere in erster Linie nicht-kovalent aber wahrscheinlich in geringerem Ausmaß auch über Disulfidbindungen verbunden.

Der Mucus in Becherzellen ist verdichtet und vergrößert sein Volumen in Berührung kommt in kürzester Zeit. Ein Modell erklärt die Volumenvergrößerung über einen Ladungsaustauschmechanismus. Mucine sind von polyanionischen >Ladungen bedeckt, die durch Calcium-Kationen neutralisiert werden. Während der Exocytose diffundieren die Calciumionen aus der Zelle, so daß sich die negativen Ladungen abstoßen und durch Wassermoleküle hydratisiert werden. [336]

Es wurde gezeigt, dass IL-4 *in vitro* in murinen Atemwegsepithelzellen die Mucin-2-Gen-Expression und Mucus Glykokonjugatproduktion induzierte, sowie *in vivo* im Atemwegsepithelium von Mäusen die Mucin-5-Expression erhöhte. [211]

Da die Expression einzelner Mucine von Stat-Proteinen reguliert wird, wurde für Mucin-1 (Episialin) gezeigt. Ein 500 bp vom Transkriptionsstart entferntes Element aus dem Mucin-1-Promotor vermittelte IL-6 und IFN- γ vermittelte Induzierbarkeit von Reportergenen und in Gelshiftelementen konnte die Bindung von IL-6 aktiviertem Stat3 und IFN- γ aktiviertem Stat1 gemessen werden [337].

Betrachtet man den Mucin-2-Promotor [278] so fällt eine etwa 1000 bp große Region auf, die fünfmal das Stat6-Consensus-Motiv TTCNNNGAA und einmal das Stat5/1-Consensusmotiv TTCNNNGAA enthält. Das Element wurde mit Hilfe einer „nested“-PCR amplifiziert und in Vektoren einkloniert. Erste Reporterexperimente in A594-Zellen zeigten keine Induzierbarkeit durch IL-4. In den Versuchen von Gaemers et al. zum MUC-1-Promotor sind die A549-Zellen im Gegensatz zu T47D Brustcarcinomzellen relativ schlecht geeignet. Möglicherweise ist für die Untersuchung des MUC-2-Promotors auch ein anderes Zellsystem besser geeignet. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass nicht das Stat6- sondern die TTC(N)₃GAA-Stat-Bindestelle das zentrale regulatorische Element darstellt.

Untersuchungen mit entsprechenden Cytokinen könnten darüber weiteren Aufschluß geben.

6 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor Stat6 vermittelt zentrale Wirkungen von IL-4 und IL-13, die in der Pathologie atopischer Erkrankungen eine Rolle spielen. Seine Spezifität für diese beiden allergieassoziierten Cytokine ist eine wesentliche Motivation ihn näher zu untersuchen. In dieser Arbeit sollte mehr über die Funktion von Stat6 herausgefunden werden. Außerdem wurden Möglichkeiten untersucht dieses Verhalten zu beeinflussen.

Einen Schwerpunkt der Arbeit bildete die Regulation des Eotaxin-1-Promotors. Eotaxin-1 ist einer der stärksten Rekrutierungsfaktoren für Eosinophile, die eine zentrale Rolle bei der Immunpathologie allergischer Erkrankungen spielen. Mit Hilfe der Daten konnte eine neue Hypothese zur Regulation des Eotaxin-1-Promotors entwickelt werden. Zum Vergleich wurde mit der Untersuchung des Promotors eines weiteren Chemokins, des MCP-4, begonnen.

In Zusammenarbeit mit Dr. Sascha Stolzenberger wurde ein Weg untersucht den Stat6-Signalweg zu hemmen. Dabei wurden mit Hilfe des Antennapedia-Peptides Stat6-Bindepeptide in die Zelle transportiert, um dort über eine kompetitive Hemmung die Signaltransduktion zu unterbinden. Ergebnis dieser Arbeiten ist ein hochspezifischer, aber nur transient wirkender Stat6 Inhibitor.

Die Stat6/DNA-Wechselwirkung wurde mit der Magnetobead-Technik untersucht. Dabei werden Promotorfragmente an Magnetkügelchen gekoppelt und unter Ausnutzung der Magnetisierung an die DNA bindende Proteine isoliert und über SDS-PAGE/Immunoblotanalyse untersucht. Mit dem Verfahren konnte die Stat6-Bindung an acht verschiedene Promotoren nachgewiesen werden.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Pallardy aus Paris wurde die Wechselwirkung von Stat6 mit dem Glucocorticoid-Rezeptor untersucht. Glucocorticoide kontrollieren Entzündungen und Interaktionen des aktivierten Rezeptors mit anderen Proteinen aus der Stat-Familie sind seit längerem bekannt. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, interagiert Stat6 mit dem Glucocorticoidrezeptor unabhängig von einer Bindung an DNA.

Zusätzlich wurde der Mucin-2-Promotor auf Stat6-Regulierung untersucht. Mucine sind wichtige Bestandteile des Schleimes. Verstärkte Schleim-Sekretion ist ein klinisches Symptom asthmatischer Erkrankungen und trägt zur Zerstörung der Lunge bei. Ein potentiell Stat6 reguliertes Fragment aus dem Mucinpromoter wurde mit Hilfe von PCR-Techniken isoliert und in Reportergenvektoren kloniert.

Eotaxin-1-Promotor

- Stat-6 und NF κ B-p65 binden an den Eotaxin-1-Promotor
- Interleukin-4 und TNF- α aktivieren den Eotaxin-1-Promotor in A549 Zellen
- IL-13 und TNF- α aktivieren den Eotaxin-1-Promotor in A549 Zellen
- IL-4 und TNF- α aktivieren den Eotaxin-1-Promotor in dermalen Fibroblasten
- Mutagenese der Consensussequenzen zerstört die Funktion des Eotaxin-1-Promotor
- Entwicklung einer neuen Hypothese zur Regulation des Eotaxin-1-Promotors

Stat-6 Hemmung

- AP/Stat6 wird in Zellen aufgenommen
- AP/Stat6 hemmt die Stat6-Phosphorylierung
- AP/Stat6 hemmt die Luciferaseexpression im Reporterexperiment

Stat-6-Promotoren

- Herstellung von Magnetobeads verschiedenener Promotoren
- Stat6-Bindung an acht verschiedene Promotoren

Stat6/Glucocorticoide

- Inhibierung des 5xStat6 Consensus-element-Promotors durch Dexamethason
- Dexamethason beeinflusst die DNA-Bindung von Stat6 nicht

Mucin-2-Promotor

- Klonierung eines Enhancerelementes des Mucin-2-Promotors
- Ligation in verschiedene Reporterplasmid

7 Literaturverzeichnis

1. Sunyer, J., et al., *International assessment of the internal consistency of respiratory symptoms. European Community Respiratory Health Study (ECRHS)*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(3 Pt 1): p. 930-5.
2. Chinn, S., et al., *Sensitization to individual allergens and bronchial responsiveness in the ECRHS. European Community Respiratory Health Survey*. Eur Respir J, 1999. **14**(4): p. 876-84.
3. Pearce, N., et al., *Comparison of asthma prevalence in the ISAAC and the ECRHS. ISAAC Steering Committee and the European Community Respiratory Health Survey. International Study of Asthma and Allergies in Childhood*. Eur Respir J, 2000. **16**(3): p. 420-6.
4. Strachan, D., et al., *Worldwide variations in prevalence of symptoms of allergic rhinoconjunctivitis in children: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)*. Pediatr Allergy Immunol, 1997. **8**(4): p. 161-76.
5. Asher, M.I., et al., *International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods*. Eur Respir J, 1995. **8**(3): p. 483-91.
6. Robey, E. and B.J. Fowlkes, *Selective events in T cell development*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 675-705.
7. Romagnani, S., *T-cell subsets (Th1 versus Th2)*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2000. **85**(1): p. 9-18; quiz 18, 21.
8. Turk, J.L. and A.D. Bryceson, *Immunological phenomena in leprosy and related diseases*. Adv Immunol, 1971. **13**: p. 209-66.
9. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
10. Romagnani, S., *Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more*. Immunol Today, 1991. **12**(8): p. 256-7.
11. Lenschow, D.J., T.L. Walunas, and J.A. Bluestone, *CD28/B7 system of T cell costimulation*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 233-58.
12. Manetti, R., et al., *Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and*

- inhibits the development of IL-4-producing Th cells.* J Exp Med, 1993. **177**(4): p. 1199-204.
13. Hsieh, C.S., et al., *Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria- induced macrophages.* Science, 1993. **260**(5107): p. 547-9.
 14. Novick, D., et al., *Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response.* Immunity, 1999. **10**(1): p. 127-36.
 15. Bendelac, A., R.D. Hunziker, and O. Lantz, *Increased interleukin 4 and immunoglobulin E production in transgenic mice overexpressing NK1 T cells.* J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1285-93.
 16. Pulendran, B., et al., *Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(3): p. 1036-41.
 17. Siegal, F.P., et al., *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood.* Science, 1999. **284**(5421): p. 1835-7.
 18. 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.
 19. 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.
 20. Schaefer, G., C. Venkataraman, and U. Schindler, *Cutting edge: fisp (il-4-induced secreted protein), a novel cytokine- like molecule secreted by th2 cells.* J Immunol, 2001. **166**(10): p. 5859-63.
 21. Ouyang, W., et al., *Inhibition of Th1 Development Mediated by GATA-3 through an IL-4-Independent Mechanism.* Immunity, 1998. **9**: p. 745-755.
 22. Ho, I.C., D. Lo, and L.H. Glimcher, *c-maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms.* J Exp Med, 1998. **188**(10): p. 1859-66.
 23. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann, *Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones.* J Exp Med, 1989. **170**(6): p. 2081-95.

24. Le, H.V., et al., *Isolation and characterization of multiple variants of recombinant human interleukin 4 expressed in mammalian cells*. J Biol Chem, 1988. **263**(22): p. 10817-23.
25. Wlodaver, 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.
26. Walter, M.R., et al., *Crystal structure of recombinant human interleukin-4*. J Biol Chem, 1992. **267**(28): p. 20371-6.
27. Redfield, C., et al., *Secondary structure and topology of human interleukin 4 in solution*. Biochemistry, 1991. **30**(46): p. 11029-35.
28. 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.
29. 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.
30. Presnell, S.R. and F.E. Cohen, *Topological distribution of four-alpha-helix bundles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(17): p. 6592-6.
31. Heldin, C.H., *Dimerization of cell surface receptors in signal transduction*. Cell, 1995. **80**(2): p. 213-23.
32. Nicola, N.A., *Structural aspects of cytokine/receptor interactions*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **766**: p. 253-62.
33. Cabrillat, H., et al., *High affinity binding of human interleukin 4 to cell lines*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **149**(3): p. 995-1001.
34. Park, L.S., et al., *Characterization of the human B cell stimulatory factor 1 receptor*. J Exp Med, 1987. **166**(2): p. 476-88.
35. Kondo, M., et al., *Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4*. Science, 1993. **262**(5141): p. 1874-7.
36. 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.

37. Zurawski, S.M., et al., *Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction.* Embo J, 1993. **12**(7): p. 2663-70.
38. 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.
39. Kammer, W., et al., *Homodimerization of interleukin-4 receptor alpha chain can induce intracellular signaling.* J Biol Chem, 1996. **271**(39): p. 23634-7.
40. Lai, S.Y., et al., *Interleukin-4-specific signal transduction events are driven by homotypic interactions of the interleukin-4 receptor alpha subunit.* Embo J, 1996. **15**(17): p. 4506-14.
41. Fujiwara, H., et al., *Homodimerization of the human interleukin 4 receptor alpha chain induces Cepsilon germline transcripts in B cells in the absence of the interleukin 2 receptor gamma chain.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(11): p. 5866-71.
42. Reichel, M., et al., *The IL-4 receptor alpha-chain cytoplasmic domain is sufficient for activation of JAK-1 and STAT6 and the induction of IL-4-specific gene expression.* J Immunol, 1997. **158**(12): p. 5860-7.
43. Nelms, K., et al., *The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions [In Process Citation].* Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 701-38.
44. 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.
45. Cosman, D., *The hematopoietin receptor superfamily.* Cytokine, 1993. **5**(2): p. 95-106.
46. Hage, T., P. Reinemer, and W. Sebald, *Crystals of a 1:1 complex between human interleukin-4 and the extracellular domain of its receptor alpha chain.* Eur J Biochem, 1998. **258**(2): p. 831-6.
47. VanderKuur, J.A., et al., *Domains of the growth hormone receptor required for association and activation of JAK2 tyrosine kinase.* J Biol Chem, 1994. **269**(34): p. 21709-17.
48. Fukunaga, R., E. Ishizaka-Ikeda, and S. Nagata, *Growth and differentiation signals mediated by different regions in the cytoplasmic*

- domain of granulocyte colony-stimulating factor receptor. Cell, 1993. 74(6): p. 1079-87.*
49. DaSilva, L., et al., *Growth signaling and JAK2 association mediated by membrane-proximal cytoplasmic regions of prolactin receptors. J Biol Chem, 1994. 269(28): p. 18267-70.*
 50. Reinemer, P., W. Sebald, and A. Duschl, *The Interleukin-4-Receptor: From Recognition Mechanism to Pharmacological Target Structure. Angew Chem Int Ed Engl, 2000. 39(16): p. 2834-2846.*
 51. 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.*
 52. Chomarat, P. and J. Banchereau, *Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. Int Rev Immunol, 1998. 17(1-4): p. 1-52.*
 53. Sugamura, K., et al., *The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. Annu Rev Immunol, 1996. 14: p. 179-205.*
 54. Dawson, C.H., B.L. Brown, and P.R. Dobson, *A 70-kDa protein facilitates interleukin-4 signal transduction in the absence of the common gamma receptor chain. Biochem Biophys Res Commun, 1997. 233(1): p. 279-82.*
 55. Obiri, N.I., et al., *Receptor for interleukin 13. Interaction with interleukin 4 by a mechanism that does not involve the common gamma chain shared by receptors for interleukins 2, 4, 7, 9, and 15. J Biol Chem, 1995. 270(15): p. 8797-804.*
 56. Duschl, A. and W. Sebald, *Transmembrane and intracellular signalling by interleukin-4: receptor dimerization and beyond. Eur Cytokine Netw, 1996. 7(1): p. 37-49.*
 57. Smerz-Bertling, C. and A. Duschl, *Both Interleukin 4 and Interleukin 13 Induce Tyrosine Phosphorylation of the 140-kDa Subunit of the Interleukin 4 Receptor. The Journal of Biological Chemistry, 1995. 270(2)(13): p. 966-970.*
 58. Matthews, D.J., et al., *Function of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma-chain in biologic responses of X-linked severe combined immunodeficient B cells to IL-2, IL-4, IL-13, and IL-15. Blood, 1995. 85(1): p. 38-42.*

59. Hilton, D.J., et al., *Cloning and characterization of a binding subunit of the interleukin 13 receptor that is also a component of the interleukin 4 receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 497-501.
60. 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.
61. Fanslow, W.C., et al., *Identification of a distinct low-affinity receptor for human interleukin-4 on pre-B cells*. Blood, 1993. **81**(11): p. 2998-3005.
62. 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.
63. 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.
64. Murata, T. and R.K. Puri, *Comparison of IL-13- and IL-4-induced signaling in EBV-immortalized human B cells*. Cell Immunol, 1997. **175**(1): p. 33-40.
65. Obiri, N.I., et al., *The IL-13 receptor structure differs on various cell types and may share more than one component with IL-4 receptor*. J Immunol, 1997. **158**(2): p. 756-64.
66. 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.
67. Izuhara, K. and N. Harada, *Interleukin-4 (IL-4) induces protein tyrosine phosphorylation of the IL- 4 receptor and association of phosphatidylinositol 3-kinase to the IL-4 receptor in a mouse T cell line, HT2*. J Biol Chem, 1993. **268**(18): p. 13097-102.
68. 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.
69. Ihle, J.N., et al., *Signaling through the hematopoietic cytokine receptors*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 369-98.

70. Leonard, W.J. and J.J. O'Shea, *JAKS AND STATS: Biological Implications*. Annual Reviews of Immunology, 1998. **16**: p. 293-323.
71. Rane, S.G. and E.P. Reddy, *Janus kinases: components of multiple signaling pathways*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5662-79.
72. 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.
73. Witthuhn, B.A., et al., *Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells*. Nature, 1994. **370**(6485): p. 153-7.
74. 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.
75. Wang, H.Y., et al., *The IL-4-induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate is dependent on JAK1 expression in human fibrosarcoma cells*. J Immunol, 1997. **158**(3): p. 1037-40.
76. Fernandez-Botran, R. and E.S. Vitetta, *A soluble, high-affinity, interleukin-4-binding protein is present in the biological fluids of mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(11): p. 4202-6.
77. Keegan, A.D., et al., *Similarities and differences in signal transduction by interleukin 4 and interleukin 13: analysis of Janus kinase activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 7681-5.
78. Murata, T., P.D. Noguchi, and R.K. Puri, *IL-13 induces phosphorylation and activation of JAK2 Janus kinase in human colon carcinoma cell lines: similarities between IL-4 and IL-13 signaling*. J Immunol, 1996. **156**(8): p. 2972-8.
79. Palmer-Crocker, R.L., C.C. Hughes, and J.S. Pober, *IL-4 and IL-13 activate the JAK2 tyrosine kinase and Stat6 in cultured human vascular endothelial cells through a common pathway that does not involve the gamma c chain*. J Clin Invest, 1996. **98**(3): p. 604-9.
80. Wang, L.M., et al., *IL-4 activates a distinct signal transduction cascade from IL-3 in factor-dependent myeloid cells*. Embo J, 1992. **11**(13): p. 4899-908.

81. Wang, L.M., et al., *The insulin receptor substrate-1-related 4PS substrate but not the interleukin-2R gamma chain is involved in interleukin-13-mediated signal transduction.* Blood, 1995. **86**(11): p. 4218-27.
82. 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.
83. Patti, M.E., et al., *4PS/insulin receptor substrate (IRS)-2 is the alternative substrate of the insulin receptor in IRS-1-deficient mice.* J Biol Chem, 1995. **270**(42): p. 24670-3.
84. Withers, D.J., et al., *Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice.* Nature, 1998. **391**(6670): p. 900-4.
85. Lefort, S., et al., *IL-13 and IL-4 share signal transduction elements as well as receptor components in TF-1 cells.* FEBS Lett, 1995. **366**(2-3): p. 122-6.
86. Izuhara, K., et al., *Interleukin-4 induces association of the c-fes proto-oncogene product with phosphatidylinositol-3 kinase.* Blood, 1996. **88**(10): p. 3910-8.
87. Marte, B.M. and J. Downward, *PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond.* Trends Biochem Sci, 1997. **22**(9): p. 355-8.
88. Carpenter, C.L. and L.C. Cantley, *Phosphoinositide kinases.* Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(2): p. 153-8.
89. Finney, M., et al., *Interleukin 4 activates human B lymphocytes via transient inositol lipid hydrolysis and delayed cyclic adenosine monophosphate generation.* Eur J Immunol, 1990. **20**(1): p. 151-6.
90. Sozzani, P., et al., *Interleukin-13 inhibits protein kinase C-triggered respiratory burst in human monocytes. Role of calcium and cyclic AMP.* J Biol Chem, 1995. **270**(10): p. 5084-8.
91. Justement, L., et al., *BSF1 induces membrane protein phosphorylation but not phosphoinositide metabolism, Ca²⁺ mobilization, protein kinase C translocation, or membrane depolarization in resting murine B lymphocytes.* J Immunol, 1986. **137**(11): p. 3664-70.

92. Dokter, W.H., et al., *Interleukin-4-mediated inhibition of C-Fos mRNA expression: role of the lipoxygenase directed pathway*. *Leukemia*, 1994. **8**(7): p. 1181-4.
93. Schnyder, B., et al., *Growth inhibition signalled through the interleukin-4/interleukin-13 receptor complex is associated with tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1*. *Biochem J*, 1996. **315**(Pt 3): p. 767-74.
94. 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.
95. Harada, N., et al., *Identification of an essential region for growth signal transduction in the cytoplasmic domain of the human interleukin-4 receptor*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(32): p. 22752-8.
96. Friedrich, K. and S. Wietek, *Experimental regulation of STAT gene expression reveals an involvement of STAT5 in interleukin-4-driven cell proliferation*. *Biol Chem*, 2001. **382**(2): p. 343-51.
97. Wery, S., et al., *Interleukin-4 induces activation of mitogen-activated protein kinase and phosphorylation of shc in human keratinocytes*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(15): p. 8529-32.
98. Crowley, M.T., S.L. Harmer, and A.L. DeFranco, *Activation-induced association of a 145-kDa tyrosine-phosphorylated protein with Shc and Syk in B lymphocytes and macrophages*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(2): p. 1145-52.
99. Pruetz, W., et al., *Association between GRB2/Sos and insulin receptor substrate 1 is not sufficient for activation of extracellular signal-regulated kinases by interleukin-4: implications for Ras activation by insulin*. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(3): p. 1778-85.
100. Welham, M.J., V. Duronio, and J.W. Schrader, *Interleukin-4-dependent proliferation dissociates p44erk-1, p42erk-2, and p21ras activation from cell growth*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(8): p. 5865-73.
101. Ueno, H., et al., *c-Cbl is tyrosine-phosphorylated by interleukin-4 and enhances mitogenic and survival signals of interleukin-4 receptor by linking with the phosphatidylinositol 3'-kinase pathway*. *Blood*, 1998. **91**(1): p. 46-53.

102. Musso, T., et al., *IL-4 and IL-13 induce Lsk, a Csk-like tyrosine kinase, in human monocytes.* J Exp Med, 1994. **180**(6): p. 2383-8.
103. Scharenberg, A.M. and J.P. Kinet, *The emerging field of receptor-mediated inhibitory signaling: SHP or SHIP?* Cell, 1996. **87**(6): p. 961-4.
104. Imani, F., et al., *Interleukin-4 (IL-4) induces phosphatidylinositol 3-kinase (p85) dephosphorylation. Implications for the role of SHP-1 in the IL-4-induced signals in human B cells.* J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 7927-31.
105. Haque, S., et al., *Protein-tyrosine phosphatase Shp-1 is a negative regulator of IL-4- and IL-13-dependent signal transduction.* J Biol Chem, 1998. **273**(51): p. 33893-6.
106. Huang, H. and W.E. Paul, *Protein tyrosine phosphatase activity is required for IL-4 induction of IL-4 receptor alpha-chain.* J Immunol, 2000. **164**(3): p. 1211-5.
107. David, M., et al., *Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(12): p. 7050-8.
108. Zamorano, J. and A.D. Keegan, *Regulation of apoptosis by tyrosine-containing domains of IL-4R alpha: Y497 and Y713, but not the STAT6-docking tyrosines, signal protection from apoptosis.* J Immunol, 1998. **161**(2): p. 859-67.
109. Schindler, U., et al., *Components of a Stat recognition code: evidence for two layers of molecular selectivity.* Immunity, 1995. **2**(6): p. 689-97.
110. 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.
111. Wang, D.Z., et al., *Independent pathways for de-repression of the mouse Ig heavy chain germ-line epsilon promoter: an IL-4 NAF/NF-IL-4 site as a context-dependent negative element.* Int Immunol, 1996. **8**(7): p. 977-89.
112. Mikita, T., et al., *Requirements for Interleukin-4-Induced Gene Expression and Functional Charakterization of Stat6.* Molecular and Cellular Biology, 1996. **16**: p. 5811-5820.
113. Kurata, H., et al., *Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells.* Immunity, 1999. **11**(6): p. 677-88.

114. Pesu, M., et al., *Interleukin-4-induced transcriptional activation by stat6 involves multiple serine/threonine kinase pathways and serine phosphorylation of stat6*. *Blood*, 2000. **95**(2): p. 494-502.
115. Lischke, A., et al., *The interleukin-4 receptor activates STAT5 by a mechanism that relies upon common gamma-chain*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(47): p. 31222-9.
116. 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.
117. Copeland, N.G., et al., *Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes*. *Genomics*, 1995. **29**(1): p. 225-8.
118. Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. *Science*, 1994. **264**(5164): p. 1415-21.
119. Gay, B., et al., *Dual specificity of Src homology 2 domains for phosphotyrosine peptide ligands*. *Biochemistry*, 1997. **36**(19): p. 5712-8.
120. Pawson, T. and G.D. Gish, *SH2 and SH3 domains: from structure to function*. *Cell*, 1992. **71**(3): p. 359-62.
121. Waksman, G., et al., *Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: crystal structures of the complexed and peptide-free forms*. *Cell*, 1993. **72**(5): p. 779-90.
122. Stark, G.R., et al., *How cells respond to interferons*. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 227-64.
123. Wen, Z., Z. Zhong, and J.E. Darnell, Jr., *Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation*. *Cell*, 1995. **82**(2): p. 241-50.
124. Darnell Jr., J.E., *STATs and Gene Regulation*. *Science*, 1998. **277**: p. 1630-1635.
125. Chatterjee-Kishore, M., F. van den Akker, and G.R. Stark, *Association of STATs with relatives and friends*. *Trends Cell Biol*, 2000. **10**(3): p. 106-11.
126. Bhattacharya, S., et al., *Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon- alpha*. *Nature*, 1996. **383**(6598): p. 344-7.

127. Li, X., et al., *Cooperative binding of Stat1-2 heterodimers and ISGF3 to tandem DNA elements*. *Biochimie*, 1998. **80**(8-9): p. 703-10.
128. Shuai, K., et al., *Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions*. *Cell*, 1994. **76**(5): p. 821-8.
129. Farrar, J.D., et al., *Recruitment of Stat4 to the human interferon-alpha/beta receptor requires activated Stat2*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(4): p. 2693-7.
130. Fasler-Kan, E., et al., *Interferon-alpha activates signal transducers and activators of transcription 5 and 6 in Daudi cells*. *Eur J Biochem*, 1998. **254**(3): p. 514-9.
131. Gupta, S., M. Jiang, and A.B. Pernis, *IFN-alpha activates Stat6 and leads to the formation of Stat2:Stat6 complexes in B cells*. *J Immunol*, 1999. **163**(7): p. 3834-41.
132. Matsumoto, M., et al., *Activation of the transcription factor ISGF3 by interferon-gamma*. *Biol Chem*, 1999. **380**(6): p. 699-703.
133. Sanceau, J., et al., *IFN-beta induces serine phosphorylation of Stat-1 in Ewing's sarcoma cells and mediates apoptosis via induction of IRF-1 and activation of caspase-7*. *Oncogene*, 2000. **19**(30): p. 3372-83.
134. Bluysen, H.A., et al., *Combinatorial association and abundance of components of interferon-stimulated gene factor 3 dictate the selectivity of interferon responses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(12): p. 5645-9.
135. Nielsen, M., et al., *Interleukin-2 induces tyrosine phosphorylation and nuclear translocation of stat3 in human T lymphocytes*. *Eur J Immunol*, 1994. **24**(12): p. 3082-6.
136. Moriggl, R., et al., *Stat5 activation is uniquely associated with cytokine signaling in peripheral T cells*. *Immunity*, 1999. **11**(2): p. 225-30.
137. Nagata, Y. and K. Todokoro, *Interleukin 3 activates not only JAK2 and STAT5, but also Tyk2, STAT1, and STAT3*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **221**(3): p. 785-9.
138. Köhler, I. and E.P. Rieber, *Allergy-associated Iε and FCε receptor II (CD 23b) genes activated via binding of an interleukin-4-induced transcription*

- factor to a novel responsive element*. European Journal of Immunology, 1993. **23**: p. 3066-3071.
139. Kaplan, M.H., et al., *Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 313-9.
 140. van der Bruggen, T., et al., *Interleukin-5 signaling in human eosinophils involves JAK2 tyrosine kinase and Stat1 alpha*. Blood, 1995. **85**(6): p. 1442-8.
 141. Caldenhoven, E., et al., *Activation of the STAT3/acute phase response factor transcription factor by interleukin-5*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25778-84.
 142. Heinrich, P.C., et al., *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. Biochem J, 1998. **334**(Pt 2): p. 297-314.
 143. Lai, C.F., et al., *Receptors for interleukin (IL)-10 and IL-6-type cytokines use similar signaling mechanisms for inducing transcription through IL-6 response elements*. J Biol Chem, 1996. **271**(24): p. 13968-75.
 144. van der Plas, D.C., et al., *Interleukin-7 signaling in human B cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells and murine BAF3 cells involves activation of STAT1 and STAT5 mediated via the interleukin-7 receptor alpha chain*. Leukemia, 1996. **10**(8): p. 1317-25.
 145. Demoulin, J.B., et al., *Distinct roles for STAT1, STAT3, and STAT5 in differentiation gene induction and apoptosis inhibition by interleukin-9*. J Biol Chem, 1999. **274**(36): p. 25855-61.
 146. Wehinger, J., et al., *IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes*. FEBS Lett, 1996. **394**(3): p. 365-70.
 147. Gollob, J.A., et al., *Impairment of STAT activation by IL-12 in a patient with atypical mycobacterial and staphylococcal infections*. J Immunol, 2000. **165**(7): p. 4120-6.
 148. Kaplan, M.H., et al., *Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4- deficient mice*. Nature, 1996. **382**(6587): p. 174-7.
 149. Köhler, I., et al., *Human interleukin-13 activates the interleukin-4-dependent transcription factor NF-IL-4 sharing a DNA binding motif with*

- an interferon-gamma-induced nuclear binding factor*. FEBS Letters, 1994. **345**: p. 187-192.
150. Nielsen, M., et al., *Interleukin 2 and 15 activate Stat3alpha in human T lymphocytes*. Cytokine, 1998. **10**(10): p. 735-8.
 151. Demoulin, J.B. and J.C. Renauld, *Signalling by cytokines interacting with the interleukin-2 receptor gamma chain*. Cytokines Cell Mol Ther, 1998. **4**(4): p. 243-56.
 152. Masuda, A., et al., *Interleukin-15 induces rapid tyrosine phosphorylation of STAT6 and the expression of interleukin-4 in mouse mast cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(38): p. 29331-7.
 153. Seidel, H.M., et al., *Spacing of palindromic half sites as determinant of selective STAT (signal transducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity*. Proceedings of the National Academy of Science of the United states of America, 1995. **92**: p. 3041-3045.
 154. Ehret, G.B., et al., *DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites*. J Biol Chem, 2001. **276**(9): p. 6675-88.
 155. Chen, X., et al., *Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA*. Cell, 1998. **93**(5): p. 827-39.
 156. Becker, S., B. Groner, and C.W. Muller, *Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA*. Nature, 1998. **394**(6689): p. 145-51.
 157. Vinkemeier, U., et al., *Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4*. Science, 1998. **279**(5353): p. 1048-52.
 158. Xu, X., Y.L. Sun, and T. Hoey, *Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain*. Science, 1996. **273**(5276): p. 794-7.
 159. Horvath, C.M., et al., *Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon- stimulated gene factor 3 transcription complex*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(12): p. 6957-64.
 160. Muhlethaler-Mottet, A., et al., *Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1*. Immunity, 1998. **8**(2): p. 157-66.

161. Look, D.C., et al., *Stat1 depends on transcriptional synergy with Sp1*. J Biol Chem, 1995. **270**(51): p. 30264-7.
162. Stephanou, A., et al., *Signal transducer and activator of transcription-1 and heat shock factor-1 interact and activate the transcription of the Hsp-70 and Hsp- 90beta gene promoters*. J Biol Chem, 1999. **274**(3): p. 1723-8.
163. Ohmori, Y., R.D. Schreiber, and T.A. Hamilton, *Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB*. The Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(23): p. 14899-14907.
164. Ohmori, Y. and T.A. Hamilton, *Cooperative interaction between interferon (IFN) stimulus response element and kappa B sequence motifs controls IFN gamma- and lipopolysaccharide-stimulated transcription from the murine IP-10 promoter*. J Biol Chem, 1993. **268**(9): p. 6677-88.
165. Shen, C.-H. and J. Stavnezer, *Interaction of Stat6 and NF- κ B: Direct Association and Synergistic Activation of Interleukin-4-Induced Transcription*. Molecular and Cellular Biology, 1998. **18**(6): p. 3395-3404.
166. Stocklin, E., et al., *Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor*. Nature, 1996. **383**(6602): p. 726-8.
167. Aittomaki, S., et al., *Cooperation among stat1, glucocorticoid receptor, and PU.1 in transcriptional activation of the high-affinity fcgamma receptor I in monocytes [In Process Citation]*. J Immunol, 2000. **164**(11): p. 5689-97.
168. Zhang, Z., et al., *STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling*. J Biol Chem, 1997. **272**(49): p. 30607-10.
169. Zhang, J.J., et al., *Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon γ signaling*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 1996. **93**: p. 15092-15096.
170. Look, D.C., et al., *Direct suppression of Stat1 function during adenoviral infection*. Immunity, 1998. **9**(6): p. 871-80.

171. Pfitzner, E., et al., *p300/CREB-binding protein enhances the prolactin-mediated transcriptional induction through direct interaction with the transactivation domain of Stat5, but does not participate in the Stat5-mediated suppression of the glucocorticoid response.* Mol Endocrinol, 1998. **12**(10): p. 1582-93.
172. Gingras, S., et al., *p300/CBP is required for transcriptional induction by interleukin-4 and interacts with Stat6.* Nucleic Acids Res, 1999. **27**(13): p. 2722-9.
173. Kim, D.-W., et al., *TFII-I Enhances Activation of the c-fos Promoter through Interactions with Upstream Elements.* Molecular and Cellular Biology, 1998. **18**(6): p. 3310-3320.
174. Mikita, T., et al., *Mutational analysis of the STAT6 SH2 domain.* J Biol Chem, 1998. **273**(28): p. 17634-42.
175. Gupta, S., et al., *Lineage-specific modulation of interleukin 4 signaling by interferon regulatory factor 4.* J Exp Med, 1999. **190**(12): p. 1837-48.
176. Zhang, J.J., et al., *Ser727-dependent recruitment of MCM5 by Stat1alpha in IFN-gamma-induced transcriptional activation.* Embo J, 1998. **17**(23): p. 6963-71.
177. Ouchi, T., et al., *Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN-gamma target genes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5208-13.
178. Zhu, M., et al., *Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFN-gamma-mediated signaling.* Cell, 1999. **96**(1): p. 121-30.
179. Fish, E.N., et al., *Activation of a CrkL-stat5 signaling complex by type I interferons.* J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 571-3.
180. Zhang, X., et al., *Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 7138-46.
181. Starr, R., et al., *A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling.* Nature, 1997. **387**(6636): p. 917-21.
182. Naka, T., et al., *Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor.* Nature, 1997. **387**(6636): p. 924-9.
183. Endo, T.A., et al., *A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases.* Nature, 1997. **387**(6636): p. 921-4.

184. Losman, J.A., et al., *Cutting edge: SOCS-1 is a potent inhibitor of IL-4 signal transduction*. J Immunol, 1999. **162**(7): p. 3770-4.
185. van Hal, P.T., et al., *Potential indirect anti-inflammatory effects of IL-4. Stimulation of human monocytes, macrophages, and endothelial cells by IL-4 increases aminopeptidase-N activity (CD13; EC 3.4.11.2)*. J Immunol, 1994. **153**(6): p. 2718-28.
186. Wei, L.H., et al., *IL-4 and IL-13 upregulate arginase I expression by cAMP and JAK/STAT6 pathways in vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **279**(1): p. C248-56.
187. Moriggl, R., et al., *Comparison of the transactivation domains of Stat5 and Stat6 in lymphoid cells and mammary epithelial cells*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(7): p. 3663-78.
188. Delphin, S. and J. Stavnezer, *Characterization of an Interleukin-4 (IL-4) Responsive Region in the Immunoglobulin Heavy Chain Germline ϵ Promoter: Regulation by NF-IL-4, a C/EBP Family Member and NF- κ B/p50*. Journal of Experimental Medicine, 1995. **181**: p. 181-192.
189. Ichiki, T., W. Takahashi, and T. Watanabe, *Regulation of the expression of human C epsilon germline transcript. Identification of a novel IL-4 responsive element*. J Immunol, 1993. **150**(12): p. 5408-17.
190. Ezernieks, J., et al., *The human IgE germline promoter is regulated by Interleukin-4, interleukin-13, interferon- α and interferon- γ via an interferon-g-activated site and its flanking regions*. European Journal of Biochemistry, 1996. **240**: p. 667-673.
191. Xu, M. and J. Stavnezer, *Regulation of transcription of immunoglobulin germ-line gamma 1 RNA: analysis of the promoter/enhancer*. The EMBO Journal, 1992. **11**(1): p. 145-155.
192. Schaffer A, C.A., Shah S, Zan H, Casali P, *The evolutionarily conserved sequence upstream of the human Ig heavy chain S gamma 3 region is an inducible promoter: synergistic activation by CD40 ligand and IL-4 via cooperative NF-kappa B and STAT-6 binding sites*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5327-36.
193. 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.

194. Matsukura, S., et al., *Activation of eotaxin gene transcription by NF-kappa B and STAT6 in human airway epithelial cells.* J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6876-83.
195. 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.
196. Bennett, B.L., et al., *Interleukin-4 suppression of tumor necrosis factor alpha-stimulated E-selectin gene transcription is mediated by STAT6 antagonism of NF-kappaB.* J Biol Chem, 1997. **272**(15): p. 10212-9.
197. Metz, K., et al., *Interleukin-4 upregulates the heat-shock protein Hsp90alpha and enhances transcription of a reporter gene coupled to a single heat shock element.* FEBS Letters, 1996. **385**: p. 25-28.
198. Toru, H., et al., *Interleukin-4 induces homotypic aggregation of human mast cells by promoting LFA-1/ICAM-1 adhesion molecules.* Blood, 1997. **89**(9): p. 3296-302.
199. Ohmori, Y., M.F. Smith, Jr., and T.A. Hamilton, *IL-4-induced expression of the IL-1 receptor antagonist gene is mediated by STAT6.* J Immunol, 1996. **157**(5): p. 2058-65.
200. Georas, S.N., et al., *Stat6 inhibits human interleukin-4 promoter activity in T cells.* Blood, 1998. **92**(12): p. 4529-38.
201. Kotanides, H. and N.C. Reich, *Interleukin-4-induced STAT6 Recognizes and Activates a Target Site in the Promoter of the Interleukin-4 Receptor Gene.* The Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(11): p. 25555-25561.
202. Coccia, E.M., et al., *IFN-gamma and IL-4 differently regulate inducible NO synthase gene expression through IRF-1 modulation.* Int Immunol, 2000. **12**(7): p. 977-85.
203. Deng, W., Y. Ohmori, and T.A. Hamilton, *Mechanisms of IL-4-mediated suppression of IP-10 gene expression in murine macrophages.* J Immunol, 1994. **153**(5): p. 2130-6.
204. Larner, A.C., et al., *IL-4 attenuates the transcriptional activation of both IFN-alpha and IFN-gamma-induced cellular gene expression in monocytes and monocytic cell lines.* J Immunol, 1993. **150**(5): p. 1944-50.

205. Ohmori, Y., V. Casolaro, and T. Hamilton, *IL-4-Induced STAT6 Suppresses IFN- γ -Stimulated STAT1-Dependent Transcription in Mouse Macrophages*. The Journal of Immunology, 1997. **159**: p. 5474-5482.
206. Conrad, D.J. and M. Lu, *Regulation of human 12/15-lipoxygenase by Stat6-dependent transcription*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **22**(2): p. 226-34.
207. Worm, M.M., A. Tsytsykova, and R.S. Geha, *CD40 ligation and IL-4 use different mechanisms of transcriptional activation of the human lymphotoxin alpha promoter in B cells*. Eur J Immunol, 1998. **28**(3): p. 901-6.
208. Stellato, C., et al., *Differential regulation of epithelial-derived C-C chemokine expression by IL-4 and the glucocorticoid budesonide*. J Immunol, 1999. **163**(10): p. 5624-32.
209. Boothby, M., et al., *A DNA binding protein regulated by IL-4 and by differentiation in B cells*. Science, 1988. **242**(4885): p. 1559-62.
210. Ohmori, Y. and T.A. Hamilton, *STAT6 Is Required for the Anti-inflammatory Activity of Interleukin-4 in Mouse Peritoneal Macrophages*. The Journal of Biological Chemistry, 1998. **273** (44)(october 30): p. 29202-29209.
211. Dabbagh, K., et al., *IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 6233-7.
212. Khew-Goodall, Y., et al., *Stat6 activation is essential for interleukin-4 induction of P-selectin transcription in human umbilical vein endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(6): p. 1421-9.
213. Kaplan, M.H., et al., *Stat proteins control lymphocyte proliferation by regulating p27Kip1 expression*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(4): p. 1996-2003.
214. Palmer-Crocker, R.L. and J.S. Pober, *IL-4 induction of VCAM-1 on endothelial cells involves activation of a protein tyrosine kinase*. J Immunol, 1995. **154**(6): p. 2838-45.
215. Wills-Karp, M., et al., *Interleukin-13: Central Mediator of Allergic Asthma*. Science, 1998. **282**(18 December): p. 2258-2261.
216. 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.

217. Zhu, Z., et al., *Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production.* J Clin Invest, 1999. **103**(6): p. 779-88.
218. Grunig, G., et al., *Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma.* Science, 1998. **282**(5397): p. 2261-3.
219. Urban, J.F., Jr., et al., *IL-13, IL-4R α , and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite Nippostrongylus brasiliensis.* Immunity, 1998. **8**(2): p. 255-64.
220. Bishop, G.A. and B.S. Hostager, *B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes.* Curr Opin Immunol, 2001. **13**(3): p. 278-85.
221. Punnonen, J., H. Yssel, and J.E. de Vries, *The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4⁺ or CD8⁺ T cells.* J Allergy Clin Immunol, 1997. **100**(6 Pt 1): p. 792-801.
222. Stavnezer, J., *Antibody class switching.* Adv Immunol, 1996. **61**: p. 79-146.
223. Splawski, J.B., S.M. Fu, and P.E. Lipsky, *Immunoregulatory role of CD40 in human B cell differentiation.* J Immunol, 1993. **150**(4): p. 1276-85.
224. Linehan, L.A., et al., *STAT6 is required for IL-4-induced germline Ig gene transcription and switch recombination.* J Immunol, 1998. **161**(1): p. 302-10.
225. Stutz, A.M. and M. Woisetschlager, *Functional synergism of STAT6 with either NF-kappaB or PU.1 to mediate IL-4-induced activation of IgE germline gene transcription [In Process Citation].* J Immunol, 1999. **163**(8): p. 4383-91.
226. Stavnezer, J., *Immunology. A touch of antibody class [comment].* Science, 2000. **288**(5468): p. 984-5.
227. Tracy, R.B., C.L. Hsieh, and M.R. Lieber, *Stable RNA/DNA hybrids in the mammalian genome: inducible intermediates in immunoglobulin class switch recombination.* Science, 2000. **288**(5468): p. 1058-61.
228. Iio, A., T.A. Waldmann, and W. Strober, *Metabolic study of human IgE: evidence for an extravascular catabolic pathway.* J Immunol, 1978. **120**(5): p. 1696-701.

229. Weller, P.F., *Human eosinophils*. J Allergy Clin Immunol, 1997. **100**(3): p. 283-7.
230. Macfarlane, A.J., et al., *Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(1 Pt 1): p. 99-107.
231. Plaut, M., et al., *Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores*. Nature, 1989. **339**(6219): p. 64-7.
232. Wedemeyer, J., M. Tsai, and S.J. Galli, *Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(6): p. 624-31.
233. Yokota, A., et al., *Two species of human Fc epsilon receptor II (Fc epsilon RII/CD23): tissue-specific and IL-4-specific regulation of gene expression*. Cell, 1988. **55**(4): p. 611-8.
234. te Velde, A.A., et al., *IFN-alpha and IFN-gamma have different regulatory effects on IL-4- induced membrane expression of Fc epsilon RIIb and release of soluble Fc epsilon RIIb by human monocytes*. J Immunol, 1990. **144**(8): p. 3052-9.
235. Suter, U., G. Texido, and H. Hofstetter, *Expression of human lymphocyte IgE receptor (Fc epsilon RII/CD23). Identification of the Fc epsilon RIIa promoter and its functional analysis in B lymphocytes*. J Immunol, 1989. **143**(9): p. 3087-92.
236. Gustavsson, S., S. Wernersson, and B. Heyman, *Restoration of the antibody response to IgE/antigen complexes in CD23- deficient mice by CD23+ spleen or bone marrow cells*. J Immunol, 2000. **164**(8): p. 3990-5.
237. Corry, D.B. and F. Kheradmand, *Induction and regulation of the IgE response*. Nature, 1999. **402**(6760 Suppl): p. B18-23.
238. Palframan, R.T., et al., *Mechanisms of acute eosinophil mobilization from the bone marrow stimulated by interleukin 5: the role of specific adhesion molecules and phosphatidylinositol 3-kinase*. J Exp Med, 1998. **188**(9): p. 1621-32.
239. Collins, P.D., et al., *Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo*. J Exp Med, 1995. **182**(4): p. 1169-74.

240. Ganzalo, J.A., et al., *Mouse Eotaxin expression parallels eosinophil accumulation during lung allergic inflammation but it is not restricted to a Th2-type response*. *Immunity*, 1996. **4**(1): p. 1-14.
241. Ponath, P.D., et al., *Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(3): p. 604-12.
242. Weber, C., J. Katayama, and T.A. Springer, *Differential regulation of beta 1 and beta 2 integrin avidity by chemoattractants in eosinophils*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(20): p. 10939-44.
243. Grayson, M.H., et al., *alphadbeta2 integrin is expressed on human eosinophils and functions as an alternative ligand for vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)*. *J Exp Med*, 1998. **188**(11): p. 2187-91.
244. Bochner, B.S., *Road signs guiding leukocytes along the inflammation superhighway*. *J Allergy Clin Immunol*, 2000. **106**(5): p. 817-28.
245. Elsner, J., et al., *Human eotaxin represents a potent activator of the respiratory burst of human eosinophils*. *Eur J Immunol*, 1996. **26**(8): p. 1919-25.
246. Giembycz, M.A. and M.A. Lindsay, *Pharmacology of the eosinophil*. *Pharmacol Rev*, 1999. **51**(2): p. 213-340.
247. Mills, F.C., J.S. Brooker, and R.D. Camerini-Otero, *Sequences of human immunoglobulin switch regions: implications for recombination and transcription*. *Nucleic Acids Res*, 1990. **18**(24): p. 7305-16.
248. Hein, H., et al., *Genomic organization, sequence, and transcriptional regulation of the human eotaxin gene*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **237**(3): p. 537-42.
249. Smith, M.F., et al., *LPS-induced expression of the human IL-1 receptor antagonist gene is controlled by multiple interacting promoter elements*. *J Immunol*, 1994. **153**(8): p. 3584-93.
250. Collins, T., et al., *Structure and chromosomal location of the gene for endothelial- leukocyte adhesion molecule 1*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(4): p. 2466-73.

251. Kritzik, M.R., et al., *Characterization and sequence of an additional 15-lipoxygenase transcript and of the human gene*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1352**(3): p. 267-81.
252. Eder, A., H. Krafft-Czepa, and P.H. Krammer, *The 5' region of the human interleukin 4 gene: structure and potential regulatory elements*. *Nucleic Acids Res*, 1988. **16**(2): p. 772.
253. Cha, Y., et al., *Human interferon regulatory factor 1: intron-exon organization*. *DNA Cell Biol*, 1992. **11**(8): p. 605-11.
254. Ernst, L.K., et al., *Three genes for the human high affinity Fc receptor for IgG (Fc gamma RI) encode four distinct transcription products*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(22): p. 15692-700.
255. Altschmied, J. and J. Duschl, *Set of optimized luciferase reporter gene plasmids compatible with widely used CAT vectors*. *Biotechniques*, 1997. **23**(3): p. 436-8.
256. Sambrock, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 2 ed. 1989, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
257. Hanahan, D., J. Jessee, and F.R. Bloom, *Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria*. *Methods Enzymol*, 1991. **204**: p. 63-113.
258. Chung, C.T., S.L. Niemela, and R.H. Miller, *One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(7): p. 2172-5.
259. Kitaura, M., et al., *Molecular cloning of a novel human CC chemokine (Eotaxin-3) that is a functional ligand of CC chemokine receptor 3*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(39): p. 27975-80.
260. Lottspeich, F. and H. Zorbas, *Bioanalytik*. 1998, Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH. 1035.
261. Köhler, I., P. Alliger, and E.P. Rieber, *Activation of Gene Transcription by IL-4, IL-13 and IFN-gamma Through a Shared DNA Binding Motif*. *Behring Instituts Mitteilungen*, 1995. **96**: p. 78-86.
262. Klingmuller, U., et al., *Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals*. *Cell*, 1995. **80**(5): p. 729-38.

263. Lischke, A., W. Kammer, and K. Friedrich, *Different human interleukin-4 mutants preferentially activate human or murine common receptor gamma chain*. Eur J Biochem, 1995. **234**(1): p. 100-7.
264. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
265. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(259): p. 680-5.
266. Dignam, J.D., R.M. Lebovitz, and R.G. Roeder, *Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei*. Nucleic Acids Res, 1983. **11**(5): p. 1475-89.
267. Takeshita, T., et al., *Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor*. Science, 1992. **257**(5068): p. 379-82.
268. Gabrielsen, O.S., et al., *Magnetic DNA affinity purification of yeast transcription factor tau--a new purification principle for the ultrarapid isolation of near homogeneous factor*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(15): p. 6253-67.
269. Gabrielsen, O.S., et al., *Two polypeptide chains in yeast transcription factor tau interact with DNA*. J Biol Chem, 1989. **264**(13): p. 7505-11.
270. Gabrielsen, O.S. and J. Huet, *Magnetic DNA affinity purification of yeast transcription factor*. Methods Enzymol, 1993. **218**: p. 508-25.
271. Hein, H., et al., *Regulatory sequences and transcriptional regulation of the human MCP-4 gene (SCYA13) in dermal fibroblasts*. Journal of Investigative Dermatology, 1999. **113** (3): p. 372.
272. Prochiantz, A., *Getting hydrophilic compounds into cells: lessons from homeopeptides*. Curr Opin Neurobiol, 1996. **6**(5): p. 629-34.
273. Hall, H., et al., *Inhibition of FGF-stimulated phosphatidylinositol hydrolysis and neurite outgrowth by a cell-membrane permeable phosphopeptide*. Curr Biol, 1996. **6**(5): p. 580-7.
274. Cussac, D., et al., *A Sos-derived peptidimer blocks the Ras signaling pathway by binding both Grb2 SH3 domains and displays antiproliferative activity*. Faseb J, 1999. **13**(1): p. 31-8.

275. Troy, C.M., et al., *Downregulation of Cu/Zn superoxide dismutase leads to cell death via the nitric oxide-peroxynitrite pathway*. J Neurosci, 1996. **16**(1): p. 253-61.
276. Bommel, H., et al., *The environmental pollutant pyrene induces the production of IL-4*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(4): p. 796-802.
277. Smith, M.F., Jr., et al., *Human IL-1 receptor antagonist promoter. Cell type-specific activity and identification of regulatory regions*. J Immunol, 1992. **149**(6): p. 2000-7.
278. Velcich, A., et al., *Organization and regulatory aspects of the human intestinal mucin gene (MUC2) locus*. J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 7968-76.
279. Matsukura, S., et al., *Interleukin-13 upregulates eotaxin expression in airway epithelial cells by a STAT6-dependent mechanism*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. **24**(6): p. 755-61.
280. Jedrzkiewicz, S., et al., *IL-1beta induces eotaxin gene transcription in A549 airway epithelial cells through NF-kappaB*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(6): p. L1058-65.
281. Pine, R., *Convergence of TNFalpha and IFNgamma signalling pathways through synergistic induction of IRF-1/ISGF-2 is mediated by a composite GAS/kappaB promoter element*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(21): p. 4346-54.
282. Ohmori, Y. and T.A. Hamilton, *The interferon-stimulated response element and a kappa B site mediate synergistic induction of murine IP-10 gene transcription by IFN-gamma and TNF-alpha*. J Immunol, 1995. **154**(10): p. 5235-44.
283. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF-kappaB AND REL PROTEINS: Evolutionary Conserved Mediators of Immune Responses*. Annual Reviews of Immunology, 1998. **16**: p. 225-60.
284. Sheppard, K.A., et al., *Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(9): p. 6367-78.
285. Lin, S.C., H.H. Wortis, and J. Stavnezer, *The ability of CD40L, but not lipopolysaccharide, to initiate immunoglobulin switching to immunoglobulin G1 is explained by differential induction of NF-kappaB/Rel proteins*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): p. 5523-32.

286. Ohmori, Y. and T.A. Hamilton, *Interleukin-4/STAT6 represses STAT1 and NF-kappa B-dependent transcription through distinct mechanisms*. J Biol Chem, 2000. **275**(48): p. 38095-103.
287. Albrecht, B., S. Peiritsch, and M. Woisetschlager, *A bifunctional control element in the human IgE germline promoter involved in repression and IL-4 activation*. Int Immunol, 1994. **6**(8): p. 1143-51.
288. Mikita, T., M. Kurama, and U. Schindler, *Synergistic Activation of Germline epsilon Promoter Mediated by Stat6 and C/EBPbeta*. The Journal of Immunology, 1998. **161**: p. 1822-1828.
289. Hottiger, M.O., L.K. Felzien, and G.J. Nabel, *Modulation of cytokine-induced HIV gene expression by competitive binding of transcription factors to the coactivator p300*. Embo J, 1998. **17**(11): p. 3124-34.
290. Vo, N. and R.H. Goodman, *CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation*. J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 13505-8.
291. Seidel, H.M., P. Lamb, and J. Rosen, *Pharmaceutical intervention in the JAK/STAT signaling pathway*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2645-56.
292. Foster, P.S., *STAT6: an intracellular target for the inhibition of allergic disease*. Clin Exp Allergy, 1999. **29**(1): p. 12-6.
293. 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.
294. Bartoli, M., et al., *Vascular endothelial growth factor activates STAT proteins in aortic endothelial cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(43): p. 33189-92.
295. Guo, D., et al., *Induction of Jak/STAT signaling by activation of the type 1 TNF receptor*. J Immunol, 1998. **160**(6): p. 2742-50.
296. Oki, S., et al., *Stat6 activation and Th2 cell differentiation [correction of proliferation] driven by CD28 [correction of CD28 signals]*. Eur J Immunol, 2000. **30**(5): p. 1416-24.
297. Patel, B.K., et al., *Stat6 and Jak1 are common elements in platelet-derived growth factor and interleukin-4 signal transduction pathways in NIH 3T3 fibroblasts*. J Biol Chem, 1996. **271**(36): p. 22175-82.

298. Shimoda, K., et al., *Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene*. Nature, 1996. **380**(6575): p. 630-3.
299. Takeda, K., et al., *Essential role of Stat6 in IL-4 signalling*. Nature, 1996. **380**(6575): p. 627-30.
300. Kopf, M., et al., *IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with Leishmania major*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 1127-36.
301. Pearce, E.J., et al., *Schistosoma mansoni in IL-4-deficient mice*. Int Immunol, 1996. **8**(4): p. 435-44.
302. Mohrs, M., et al., *Differences between IL-4- and IL-4 receptor alpha-deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling*. J Immunol, 1999. **162**(12): p. 7302-8.
303. Galderisi, U., A. Cascino, and A. Giordano, *Antisense oligonucleotides as therapeutic agents*. J Cell Physiol, 1999. **181**(2): p. 251-7.
304. Hill, S., et al., *Homologous human and murine antisense oligonucleotides targeting stat6. Functional effects on germline cepsilon transcript*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **21**(6): p. 728-37.
305. Wang, L.H., et al., *Targeted disruption of stat6 DNA binding activity by an oligonucleotide decoy blocks IL-4-driven T(H)2 cell response*. Blood, 2000. **95**(4): p. 1249-57.
306. Hou, J., et al., *An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat*. Science, 1994. **265**(5179): p. 1701-6.
307. Derossi, D., et al., *The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes*. J Biol Chem, 1994. **269**(14): p. 10444-50.
308. Derossi, D., et al., *Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 18188-93.
309. Joliot, A.H., et al., *alpha-2,8-Polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide*. New Biol, 1991. **3**(11): p. 1121-34.
310. Chatelin, L., et al., *Transcription factor hoxa-5 is taken up by cells in culture and conveyed to their nuclei*. Mech Dev, 1996. **55**(2): p. 111-7.

311. Williams, E.J., et al., *Selective inhibition of growth factor-stimulated mitogenesis by a cell-permeable Grb2-binding peptide*. J Biol Chem, 1997. **272**(35): p. 22349-54.
312. Peck, D. and C.M. Isacke, *Hyaluronan-dependent cell migration can be blocked by a CD44 cytoplasmic domain peptide containing a phosphoserine at position 325*. J Cell Sci, 1998. **111**(Pt 11): p. 1595-601.
313. Derossi, D., et al., *Stimulation of mitogenesis by a cell-permeable PI 3-kinase binding peptide*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **251**(1): p. 148-52.
314. Bonfanti, M., et al., *p21WAF1-derived peptides linked to an internalization peptide inhibit human cancer cell growth*. Cancer Res, 1997. **57**(8): p. 1442-6.
315. Theodore, L., et al., *Intraneuronal delivery of protein kinase C pseudosubstrate leads to growth cone collapse*. J Neurosci, 1995. **15**(11): p. 7158-67.
316. Garbay-Jaureguiberry, C., D. Ficheux, and B.P. Roques, *Solid phase synthesis of peptides containing the non-hydrolysable analog of (O)phosphotyrosine, p(CH₂PO₃H₂)Phe. Application to the synthesis of 344-357 sequences of the beta 2 adrenergic receptor*. Int J Pept Protein Res, 1992. **39**(6): p. 523-7.
317. Barnes, P.J., *Therapeutic strategies for allergic diseases*. Nature, 1999. **402**(6760 Suppl): p. B31-8.
318. Cato, A.C.B. and E. Wade, *Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids*. BioEssays, 1996. **18**(5): p. 371-378.
319. Jonat, C., et al., *Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone*. Cell, 1990. **62**(6): p. 1189-204.
320. Yang-Yen, H.F., et al., *Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction*. Cell, 1990. **62**(6): p. 1205-15.
321. Schule, R., et al., *Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor*. Cell, 1990. **62**(6): p. 1217-26.

322. Caldenhoven, E., et al., *Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids*. Mol Endocrinol, 1995. **9**(4): p. 401-12.
323. Franchimont, D., et al., *Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes*. J Immunol, 2000. **164**(4): p. 1768-74.
324. Biola, A., et al., *The glucocorticoid receptor and STAT6 physically and functionally interact in T-lymphocytes*. FEBS Lett, 2000. **487**(2): p. 229-33.
325. Ihle, J.N., *The Stat family in cytokine signaling*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(2): p. 211-7.
326. Harris, M.B., et al., *Transcriptional Repression of Stat6-Dependent Interleukin-4-Induced Genes by BCL-6: Specific Regulation of Iepsilon Transcription and Immunoglobulin E Switching*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 7264-7275.
327. Dent, A.L., et al., *Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6*. Science, 1997. **276**(5312): p. 589-92.
328. Thienes, C.P., et al., *The transcription factor B cell-specific activator protein (BSAP) enhances both IL-4- and CD40-mediated activation of the human epsilon germline promoter*. J Immunol, 1997. **158**(12): p. 5874-82.
329. Kadonaga, J.T., *Purification of sequence-specific binding proteins by DNA affinity chromatography*. Methods Enzymol, 1991. **208**: p. 10-23.
330. Choo, Y. and A. Klug, *Selection of DNA binding sites for zinc fingers using rationally randomized DNA reveals coded interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 11168-72.
331. Jeffery, P.K. and D. Li, *Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes*. Eur Respir J, 1997. **10**(7): p. 1655-62.
332. Louahed, J., et al., *Interleukin-9 upregulates mucus expression in the airways*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **22**(6): p. 649-56.
333. Cohn, L., et al., *Th2-induced airway mucus production is dependent on IL-4Ralpha, but not on eosinophils*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 6178-83.
334. Kuperman, D., et al., *Signal transducer and activator of transcription factor 6 (Stat6)- deficient mice are protected from antigen-induced*

airway hyperresponsiveness and mucus production. J Exp Med, 1998. **187**(6): p. 939-48.

335. Mathew, A., et al., *Signal transducer and activator of transcription 6 controls chemokine production and T helper cell type 2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation.* J Exp Med, 2001. **193**(9): p. 1087-96.
336. Bowen, R., *Mucus and Mucins.*

http://arbl.cvmb.colostate.edu/hbooks/pathys/misc_topics/mucins.htm
. 1998.

337. Gaemers, I.C., et al., *A stat-responsive element in the promoter of the episialin/MUC1 gene is involved in its overexpression in carcinoma cells.* J Biol Chem, 2001. **276**(9): p. 6191-9.

8 Anhang

8.1 Schriftenverzeichnis

Publikationen:

- Haake, M., Hein, H., Duschl, A., Bartels, J., Regulation of the Eotaxin-1-Promoter by IL-4 and TNF- α . *Manuskript in Bearbeitung*
- Stolzenberger, S.; Haake, M.; Duschl, A.: Specific inhibition of Interleukin-4 dependent Stat6 activation by an intracellularly delivered peptide. *European Journal of Biochemistry*. *Zur Veröffentlichung angenommen.*
- Bömmel, H., Haake, M., Hein, H.; Bartels, J., Schauer C., Pöschl U., Kracht M., Duschl A. : The diesel exhaust component pyrene induces expression of IL-8 but not of eotaxin. *Zur Publikation eingereicht.*
- Biola A., Andreau K., David M., Sturm M., Haake M., Bertoglio J., Pallardy M., 2000: The glucocorticoid receptor and STAT6 physically and functionally interact in T-lymphocytes. *FEBS Lett.* **487(2)**, 229-233.

Veröffentlichte Abstracts:

- Hein H., Haake M., Duschl A., Christophers E., Schroeder J., Bartels J. 1999: Regulatory sequences and transcriptional regulation of the human MCP-4 gene (SCYA13) in dermal fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* 113 (3), 372.
- Stolzenberger S., Haake M., Bömmel H., Duschl A. 1998: Intracellularly delivered peptides as a means to disrupt protein-protein contacts in signal transduction. *Abstract book, 2nd Joint Meeting of the study groups "Signal Transduction" (DGfl and DGZ) and the study group "Gene Technology/Biotechnology" (GBM)*, 87.

- Ezernieks J., Haake M., Schnarr B, Duschl A, 1997 The same region of the IgE germline promoter is regulated by IL-4, IL-13, IFN α and IFN β . *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 378, 153.

8.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen einer Zusammenarbeit zwischen Herrn Prof. Dr. F. Grummt und Herrn Prof. Dr. W. Sebald am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II der Universität Würzburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Albert Duschl angefertigt.

Ich danke Herrn Professor Dr. Walter Sebald und Herrn Professor Dr. Friedrich Grummt für die Möglichkeit diese Arbeit durchführen zu können.

Prof. Dr. Albert Duschl spreche ich meinen besonderen Dank aus für die Überlassung des Themas und seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Danken möchte ich auch in besonderem Maße Angelika Wagner für die technische Unterstützung.

Herrn Wolfgang Hädelt für die DNA-Sequenzierungen.

Ich danke Heike Bömmel, Herbert Hein und Joachim Bartels, Sascha Stolzenberger, und Marc Pallardy für die angenehme Zusammenarbeit in verschiedenen Projekten.

Zusätzlichen Dank schulde ich den übrigen Kollegen aus dem Arbeitskreis Sebald, die mir hilfsbereit zur Seite standen, wobei ich Juris Ezernieks, Daniel Krämer, Annette Nelde, Bernd Schnarr, Christian Söder und nicht zu vergessen Diana Rotzer namentlich erwähnen möchte.

8.3 Lebenslauf

Name: Markus Haake
Geboren am: 29.04.1970 in Arnsberg/Sauerland
Familienstand: ledig

Schulbildung

1976-1980 Johannesschule in Sundern

1980-1989 Städtisches Gymnasium Sundern

1989 Abitur

Wissenschaftlicher Werdegang

1990-1992 Studium der Chemie an der Universität Dortmund
Okt 1992 Vordiplom in Chemie

1992-1997 Studium der Chemie an die Universität Würzburg
Dez 1997 Diplom Chemie

1997 Diplom-Arbeit in der Physiologischen Chemie II/ Würzburg
mit dem Thema „*Molekulare Analyse der Interleukin-4
regulierten Genexpression. IL-4 vermittelte Induktion der
Elemente GAS und ISRE des humanen I ϵ -Promoters und des
Elementes HSE des HSP α 90-Promoters*“

1997-2001 Dissertation mit dem Titel „*Stat6 vermittelte Genregulation
in eukaryontischen Zellen*“ in der Physiologischen Chemie
II/Würzburg

8.4 Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation „Stat6 vermittelte Genregulation in eukaryontischen Zellen“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den