

**Neue Ansätze zur Identifizierung
niedermolekularer Inhibitoren
der STAT3-Aktivierung
und -Homodimerisierung**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jochen Schust
aus Coburg

Würzburg 2006

Eingereicht am: _____

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

der Dissertation

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Neue Ansätze zur Identifizierung niedermolekularer Inhibitoren der STAT3-Aktivierung und –Homodimerisierung“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form 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

Jochen Schust

Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden, wo sie
aufhört.

Justus von Liebig (1803-73), dt. Chemiker

Meinen Eltern

1. Einleitung	1
1.1. STAT-Proteine	1
1.1.1. Struktur und Aufbau der STAT-Proteine	2
1.1.1.1. N-terminale Domäne	2
1.1.1.2. „coiled-coil“-Domäne	3
1.1.1.3. DNA-Bindungsdomäne	4
1.1.1.4. Transaktivierungsdomäne	4
1.1.1.5. SH2-Domäne	5
1.1.2. STAT Signalkaskade	5
1.1.2.1. Interferon-gesteuerte Aktivierung der STATs	6
1.1.2.2. Src-gesteuerte Aktivierung von STAT3	9
1.1.2.3. STAT-Aktivierung durch Wachstumsfaktoren	10
1.1.3. STAT3-Dimerisierung	11
1.1.4. Translokation von STAT3	12
1.1.5. STAT3 als Transkriptionsfaktor	13
1.1.5.1. Stat3-regulierte Zielgene	14
1.1.5.2. Unphosphoryliertes STAT3 als Transkriptionsfaktor	15
1.2. Fehlregulation von Signalwegen und Tumorentstehung.....	16
1.2.1. STAT3 als Onkogen	16
1.2.2. Inhibition des STAT3-Signalwegs	18
1.2.2.1. Physiologische Protein-Modulatoren der STAT3-Aktivierung	18
1.2.2.2. Direkte Inhibition der STAT3-Aktivierung.....	19
1.3. HTS (<i>High-throughput screening</i>)	25
1.4. Aufgabenstellung.....	27
2. Material und Methoden	28
2.1. Bezugsquellennachweis.....	28
2.1.1. Chemikalien.....	28
2.1.2. Enzyme	29
2.1.3. Radiochemikalien	29
2.1.4. „Kits“ und sonstige Materialien	29
2.1.5. Wachstumsfaktoren und Liganden	30
2.1.6. Medien und Puffer	30
2.1.6.1. Medium für <i>E.coli</i> Bakterien.....	30
2.1.6.2. Zellkulturmedien	31

2.1.7. Stammlösungen und häufig verwendete Puffer.....	32
2.1.8. Bakterienstämme (<i>E. coli</i>).....	33
2.1.9. Zelllinien.....	34
2.1.10 Antikörper.....	35
2.1.11 Plasmide und Oligonukleotide.....	36
2.1.11.1. Ausgangsvektoren.....	36
2.1.11.2. Spezifizierte Vektoren.....	37
2.1.11.3. Wichtige Oligonukleotide.....	38
2.1.12 Peptide.....	39
2.1.13 Rekombinante Proteine.....	39
2.1.14 Chemische Testsubstanzen.....	40
2.2. Molekularbiologische Methoden.....	41
2.2.1. Plasmidpräparation für analytische Zwecke.....	41
2.2.2. Plasmidpräparation für präparative Zwecke.....	41
2.2.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	41
2.2.4. Enzymatische Behandlung von DNA.....	41
2.2.4.1. Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen.....	41
2.2.4.2. Dephosphoylierung von 5'-Enden.....	41
2.2.4.3. Auffüllen überhängender 5'-Enden mit Klenow-Polymerase.....	41
2.2.4.4. Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase.....	42
2.2.5. Gelelektrophorese von DNA.....	42
2.2.6. Isolierung von DNA-Fragmenten.....	43
2.2.7. Arbeiten mit kompetenten Bakterien.....	43
2.2.7.1. Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien (DH5 α).....	43
2.2.7.2. Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> Bakterien (DH5 α).....	43
2.2.7.3. Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> Bakterien (Rosetta).....	43
2.2.7.4. Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> Bakterien (TKB1).....	43
2.2.7.5. Dauerkultur von <i>E.coli</i> -Bakterien.....	43
2.2.8. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	44
2.2.9. Sequenzierung.....	44
2.2.9. Rekombinante Proteinexpression.....	45
2.2.9.1. Proteinexpression aus <i>E. coli</i> (Rosetta).....	45
2.2.9.2. Proteinexpression aus <i>E. coli</i> (TKB1).....	45
2.2.9.3. Aufreinigung der Proteine.....	46
2.3. Biophysikalische Meßmethoden.....	46
2.3.1. Fluoreszenzpolarisation (FP).....	46

2.3.2. HTS (<i>High-Throughput-Screening</i>)	47
2.4. Methoden zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen	48
2.4.1. Allgemeine Zellkulturtechniken	48
2.4.2. Infektion von NIH3T3 Zellen.....	48
2.4.3. Mykoplasmentest.....	48
2.5. Proteinanalytische Methoden	49
2.5.1. Stimulation und Lyse von eukaryotischen Zellen	49
2.5.2. Gewinnung von Zellkernextrakten	49
2.5.2. Proteinbestimmung.....	50
2.5.2.1. BCA Kit	50
2.5.2.1. Bradford Proteinbestimmung	50
2.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	51
2.5.4. Coomassie-Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen	51
2.5.5. Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran.....	51
2.5.6. Ponceau S-Färbung der Nitrozellulosemembran.....	51
2.5.7. Immundetektion von Proteinen (Immunoblot-Analyse).....	52
2.5.8. EMSA	52
2.5.9. <i>In vitro</i> Src-Kinase Assay	53
2.6. Zellbiochemische und –biologische Untersuchungen.....	54
2.6.1. Immunofluoreszenz-Untersuchungen.....	54
2.6.2. Verankerungsunabhängiges Wachstum in Weichagar	54
2.6.3. Apoptose.....	55
2.6.3.1. FACS-Analyse	55
2.6.3.2. TUNEL-Assay.....	55
3. Ergebnisse	56
3.1. Etablierung eines Hochdurchsatz-Verfahrens für das Protein STAT3	56
3.1.1. FRET	56
3.1.2. Fluoreszenzpolarisation	58
3.1.2.1. Prinzip eines FP Hochdurchsatz-Verfahrens für STAT3	59
3.1.2.2. Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine.....	60
3.1.2.3. Das Phosphopeptid GpYLPQTV bindet an unphosphoryliertes STAT3	61
3.1.2.4. Einfluss der Pufferzusammensetzung auf die Bindungskurve	62
3.1.2.5. Untersuchung der Spezifität der Bindung des Phosphopeptids an STAT3	63
3.1.2.6. Test der Inhibition der STAT3-Bindungskurve mittels verschiedener Peptide.....	64
3.1.2.7. Untersuchung der Zeitstabilität des Assays.....	66

3.1.2.8. Berechnung des Z' Wertes	67
3.2. Hochdurchsatz-Analyse chemischer Substanzbibliotheken.....	68
3.2.1. Synthetische Substanzbibliotheken	68
3.2.1.1. Hochdurchsatz-Untersuchung synthetischer Substanzbibliotheken	69
3.2.2. Naturstoffe	71
3.2.2.1. Hochdurchsatz-Untersuchung von Naturstoffbibliotheken	71
3.3. <i>In vitro</i> Charakterisierung des STAT3 Inhibitors „Stattic“	73
3.3.1. Stattic	74
3.3.2. Temperaturabhängigkeit der Inhibition	74
3.3.3. Spezifität der Inhibition	76
3.3.3.1. Spezifität von Stattic innerhalb der STAT-Familie	76
3.3.3.2. Spezifität von Stattic außerhalb der STAT-Familie	78
3.3.4. Kinetische Betrachtungen	79
3.3.4.1. Einfluss des Phosphopeptids auf die Kinetik	80
3.3.4.2. Zeitabhängigkeit der Inhibition von STAT3	81
3.3.4.3. Kinetische Betrachtung der Inhibition innerhalb der STAT-Proteinfamilie.....	83
3.3.4.4. Kinetische Betrachtung der Inhibition von Lck	85
3.3.4.5. Kompetitivreaktion zwischen Stattic und Ac-pYLPQTV-NH ₂	86
3.3.5. Physiologische Antagonisten von Stattic	88
3.3.6. Struktur-Wirkungs-Beziehung.....	89
3.4. Charakterisierung von Stattic in zellbiologischen Assays	91
3.4.1. Zellbiologische Assays mit HepG2 Zellen.....	91
3.4.1.1. Phosphorylierung von STAT3 im Western Blot	91
3.4.1.2. Phosphorylierung von STAT3 im EMSA	93
3.4.1.3. Einfluss der Testsubstanzen auf die STAT3-Dimerisierung	94
3.4.1.4. Etablierung eines STAT Lokalisationsassays in HepG2 Zellen.....	96
3.4.1.5. Lokalisation der STATs unter dem Einfluss von Testsubstanzen	98
3.4.2. NIH3T3 Zellen	100
3.4.2.1. Stabile Expression von v-Src und h-Ras in NIH3T3 Zellen.....	100
3.4.2.2. Einfluss von Stattic auf die Phosphorylierung von STAT3 in NIH3T3/v-Src Zellen	101
3.4.2.3. Apoptose in genetisch veränderten NIH3T3 Zellen.....	102
3.4.2.4. Einfluss von Stattic auf die transformativen Eigenschaften von v-Src und h-Ras	104
3.4.3. Brustkrebszelllinien	107
3.4.3.1. STAT3-Proteinexpression in Brustkrebszelllinien.....	107
3.4.3.2. Einfluss von Stattic auf die STAT3-Phosphorylierung in Brustkrebszelllinien	108
3.4.3.3. Einfluss von Stattic auf Apoptose in Brustkrebszelllinien	109
4. Diskussion	113

4.1. STAT3, ein Zielprotein in der Krebstherapie?	113
4.2. Kleine organische Moleküle als Inhibitoren von STAT3	115
4.3. Hochdurchsatz-Verfahren zur Ermittlung von STAT3 Inhibitoren	116
4.4. Identifikation des STAT3-Inhibitors „Stattic“	118
4.5. In vitro Charakterisierung von Stattic	119
4.6. Zellbiologische Charakterisierung	122
4.7 Ausblick.....	126
5. Zusammenfassung	128
6. Summary	130
7. Danksagungen	132
8. Lebenslauf	133
9. Publikationen.....	134
10. Literaturverzeichnis	135

Abkürzungsverzeichnis

'	Minute
"	Sekunde
α	anti
A	Ampère
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP-1	<i>activator protein-1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BOC	t-Butyloxycarbonyl
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BRCT	BRCA1 Carboxyterminale Domäne
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinder-Serumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
c	<i>concentration</i> (Konzentration)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAS	<i>cellular apoptosis susceptibility</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CFP	Cyan-fluoreszierendes Protein
CLC	<i>cardiotrophin-like cytokine</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CSK	<i>c-terminal Src-Kinase</i>
CT-1	<i>cardiotrophin-1</i>
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton (relative Molmasse)
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
d. AG	diese Arbeitsgruppe
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds DNA	double-stranded DNA (doppelsträngige DNA)
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemical Luminescence</i> (verstärkte Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylendiamin-N, N N', N'-tetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>

FCS	<i>foetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
FP	Fluoreszenzpolarisation
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
g	Gramm
GAS	<i>gamma interferon activated sequence</i>
GDP	Guanosindiphosphat
gp130	Glykoprotein 130
GSH	Glutathion
GST	<i>anti-glutathione S-transferase</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HER	humaner EGFR
HNSCC	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>
IBB	<i>importinβ1 binding domain</i>
IFN- γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL-6	Interleukin-6
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
IRF1	Interferon regulatorischer Faktor 1
JAK	Januskinase
k	kilo~
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB (-Medium)	„Luria Bertani“ (Medium)
LIF	<i>leukemia-inhibitory factor</i>
LPA	<i>lysophosphatidyl acid</i> (Lysophosphatidylsäure)
Lsg.	Lösung
m	<i>mouse</i> ~ (Maus~)
m	milli~
M	molar (Mol pro Liter)
μ	micro~
mAb	<i>monoclonal Antibody</i> (monoklonaler Antikörper)
MAP-Kinase	von Mitogenen aktivierte Proteinkinase
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute
MPW	Millipore-Wasser
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MW	<i>molecular weight</i> (Molekulargewicht)
n	nano~
NaCl	Natriumchlorid
NES	<i>nuclear export signal</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NPC	<i>nuclear pore complex</i>
OD	optische Dichte

OSM	Onkostatin M
p	pico~
p.a.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salz (-Lösung))
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration
PH-Domäne	Pleckstrin Homologie Domäne
PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIAS	<i>protein inhibitor of activated stat</i>
PLC γ	Phospholipase C- γ
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PTB bindend)	<i>phosphotyrosine bindin</i> (Phosphotyrosin- bindend)
PTP(n)	Protein-Tyrosinphosphatase(n)
PY	Phosphotyrosin
PV	Pervanadat
r	<i>rabbit~</i> (Kaninchen~)
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RTK(n)	Rezeptortyrosinkinase(n)
SCC	<i>squamous cell carcinoma</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese
sec	<i>second</i> (Sekunde)
s.	siehe
SH2, 3-Domäne	Src Homologie 2, 3 Domäne
SHC	<i>SH2-domain containing</i>
SHP-2	SH2-Domänene tragende Phosphatase 2
SIE	<i>c-sis-inducible element</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNT-1	<i>sucl-associated neurotrophic factor target 1</i>
s.o.	siehe oben
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
sog.	so genannt
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
Stattic	STAT three inhibitory compound
T _A	Annealing-Temperatur
T _M	Schmelztemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TdT	<i>deoxynucleotidyl transferase</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF α	<i>transforming growth factor α</i>
TRE	<i>TPA response element</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	4-(2', 2', 4', 4'-Tetramethylbutyl)- phenyldecaethylenglycoether
TTP	Thymintriphosphat
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-X nick end labeling</i>
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
u.	und
U	Enzymaktivitätseinheit (Unit)
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
v/v	Verhältnis Volumen zu (Gesamt-)Volumen
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
w/v	Verhältnis Masse zu (Gesamt-)Volumen
w/w	Verhältnis Masse zu (Gesamt-)Masse
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
z.B.	zum Beispiel

Englische Bezeichnungen und Ausdrücke, die aus dem Englischen ins Deutsche übernommen sind, wurden *kursiv* gedruckt.

Abkürzungen der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	L	Leu	Leucin
R	Arg	Arginin	K	Lys	Lysin
N	Asn	Asparagin	M	Met	Methionin
D	Asp	Aspartat	F	Phe	Phenylalanin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin	S	Ser	Serin
E	Glu	Glutamat	T	Thr	Threonin
G	Gly	Glycin	W	Trp	Tryptophan
H	His	Histidin	Y	Tyr	Tyrosin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin

1. Einleitung

Signaltransduktion in eukaryotischen Systemen wird oft durch das Einwirken eines oder mehrerer Botenstoffe ausgelöst. Diese Art der Kommunikation ist ein grundlegender Aspekt in der Entwicklung verschiedener Zelltypen und gewährleistet die Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen. Lösliche, frei diffundierende Liganden und membranständige Liganden binden dabei an ihre Oberflächenrezeptoren, welche das auf der Außenseite empfangene Signal in das Zellinnere weiterleiten. Dabei werden zahlreiche intrazelluläre Signalkaskaden, die sich sowohl ergänzen als auch überlappen können, initiiert, wodurch wichtige physiologische Prozesse in der Zelle reguliert werden können.

1.1. STAT-Proteine

STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) Proteine gehören zu einer Familie latenter zytoplasmatischer Transkriptionsfaktoren, die durch Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Die aktivierten STATs werden in den Zellkern transportiert, wo sie spezifische Promotorelemente von Zielgenen binden und deren Transkription regulieren. Sieben verschiedene STAT-Proteine wurden bislang im menschlichen Genom und in der Maus identifiziert (Levy & Darnell, 2002).

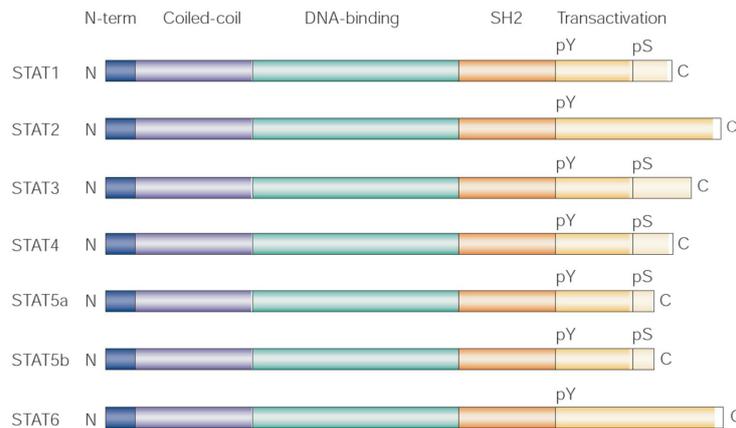


Abb. 1: Die STAT-Proteinfamilie.

Die STAT-Proteine weisen fünf wichtige Domänen auf: die N-terminale Domäne, die „Coiled-coil“-Domäne, die DNA-Bindungsdomäne, die SH2-Domäne (*src homology 2*) und die Transaktivierungsdomäne. In allen sieben identifizierten Mitgliedern der STAT-Familie findet man einen konservierten Tyrosinrest, welcher phosphoryliert werden kann und für die Aktivierung der STATs verantwortlich ist. (Bild entnommen aus (Yu & Jove, 2004))

1.1.1. Struktur und Aufbau der STAT-Proteine

Die STAT-Proteine weisen alle eine Länge zwischen 750 und 850 Aminosäuren auf und haben alle exakt definierte, sowohl strukturell als auch funktionell konservierte Domänen. Alternative Spleißformen am 3'-Ende der Gentranskripte kodieren für kürzere Isoformen von STAT1, 3, 4, 5a und 5b (Caldenhoven *et al.*, 1996; Ripperger *et al.*, 1995; Schindler *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1996). Die kürzeren Isoformen besitzen keine Domäne für die Aktivierung der Transkription, aber können weiterhin an die spezifischen Bindungsstellen der Promotoren der Zielgene binden. Durch Konkurrenz mit den normalen STAT-Proteinen an den Bindungsstellen der Zielgene verhindern die kürzeren STAT-Proteine die Aktivierung der Transkription spezifischer Gene und werden bei Überexpression als dominant-negative Regulatoren der Transkription verwendet (Caldenhoven *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996). Dennoch sind die kurzen Isoformen der STAT-Proteine nicht in allen Fällen dominant-negative Varianten. So bilden STAT3 β und c-Jun Heterokomplexe, die kooperativ an ein IL-6 (Interleukin-6) gesteuertes Promotorelement im α 2-Makroglobulin-Gen binden und dessen Transkription regulieren (Schaefer *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1999b). In diesem Fall wird die Aktivierungsdomäne der Transkription durch das Partnerprotein c-Jun zur Verfügung gestellt.

Die Ähnlichkeiten in den Sequenzen sind nicht gleichmäßig über die Gesamtlänge der STAT-Proteine verteilt. Die am meisten konservierte Region zwischen den Mitgliedern der STAT-Familie ist die SH2-Domäne (*src homology 2*) mit einer durchschnittlichen Identität von etwa 50%. Die DNA-Bindungsdomäne und die Verbindungsdomäne sind durchschnittlich nur zu etwa 45% identisch zwischen zwei STAT-Proteinen. Bei der N-terminalen Domäne und der „coiled-coil“-Domäne findet man eine durchschnittliche Identität von 37% und 35% zwischen zwei menschlichen STAT-Proteinen. Die größten Abweichungen untereinander weisen die Transaktivierungsdomänen auf (Decker & Kovarik, 1999).

1.1.1.1. N-terminale Domäne

Die N-terminale Domäne weist eine Länge zwischen 124 und 145 Aminosäuren auf. Sie ist eine stabile Domäne und kann durch eingeschränkte Proteolyse abgespalten werden (Vinkemeier *et al.*, 1996). Die Analyse der Kristallstruktur der N-terminalen Domäne von STAT4 zeigt, dass diese Domäne aus acht Helices besteht, die in einer hakenförmigen Struktur angeordnet sind (Vinkemeier *et al.*, 1998).

Die N-terminale Domäne besitzt eine wichtige Stelle für eine posttranslationale Modifikation. So kann das Arginin 31 in STAT1 durch die Proteinargininmethyltransferase PRMT1

methyliert werden (Mowen *et al.*, 2001). Dieses Arginin ist konserviert zwischen allen Mitgliedern der STAT-Familie und eine Methylierung des Arginins 31 scheint die Bindung von PIAS1 (*protein inhibitor of activated STATs*) an die STATs zu verhindern, was die Bindungsaffinität zu DNA erhöht und somit zu einer erhöhten transkriptionalen Aktivität von STAT1 führt (Mowen *et al.*, 2001). Neuere Erkenntnisse stellen jedoch diese Methylierung des Arginins 31 in STAT3 in Frage (Komyod *et al.*, 2005).

Weiterhin wurde in früheren Publikation berichtet, dass die N-terminale Domäne eine Rolle in der Dephosphorylierung des Tyrosins 701 von STAT1 (Shuai *et al.*, 1996), in der Interaktion mit Zytokinrezeptordomänen (Li *et al.*, 1997; Murphy *et al.*, 2000) und bei der Regulation der Translokation in den Zellkern (Strehlow & Schindler, 1998) spielt. Neuere Erkenntnisse aus der Kristallstruktur von STAT1 widerlegen jedoch teilweise die früheren Ergebnisse und postulieren vielmehr eine noch zu untersuchende Rolle dieser Domäne in der Proteindimerisierung (Chen *et al.*, 2003).

1.1.1.2. „coiled-coil“-Domäne

Die Kristallstrukturen von STAT3 und STAT1 bestätigen frühere strukturelle Vorhersagen (Fu *et al.*, 1992) und zeigen, dass die „coiled-coil“-Domäne aus vier langen α -Helices besteht (Becker *et al.*, 1998b; Chen *et al.*, 1998). Die exponierte Lage dieser Domäne macht deutlich, dass diese für Protein-Protein-Interaktionen wesentlich ist. Mehrere beschriebene Protein-Protein-Interaktionen an dieser Domäne bestätigen dies, wie zum Beispiel eine Wechselwirkung zwischen STAT1 mit IRF1 (*interferon regulatory factor 1*) (Horvath *et al.*, 1996) oder STAT3 mit c-Jun (Zhang *et al.*, 1999b).

Eine wichtige Funktion spielt diese Domäne auch im Proteinexport aus dem Zellkern. So konnten in STAT1 verschiedene nukleäre Exportsignale identifiziert werden, von welchen sich zwei in der „coiled-coil“-Domäne befinden (Begitt *et al.*, 2000; Mowen & David, 2000). Auch der nukleäre Import von STAT3 scheint mit seiner „coiled-coil“-Domäne verknüpft zu sein (Ma *et al.*, 2003). So wurden die Arginine 214/215 sowohl mit dem Export (Sato *et al.*, 2005) als auch dem Import (Ma & Cao, 2006) von STAT3-Dimeren aus bzw. in den Zellkern in Zusammenhang gebracht.

Neben den intermolekularen Wechselwirkungen konnte auch eine intramolekulare Interaktion zwischen zwei Domänen nachgewiesen werden. Die durch die SH2-Domäne gesteuerte Bindung von STAT3 an die gp130-Rezeptoruntereinheit wird durch eine Wechselwirkung

zwischen der „coiled-coil“-Domäne und der SH2- sowie der Transaktivierungsdomäne reguliert (Zhang *et al.*, 2002b).

1.1.1.3. DNA-Bindungsdomäne

Die DNA-Bindungsdomäne besitzt die allgemeine Struktur einer Immunglobulin-Faltung (Becker *et al.*, 1998b; Chen *et al.*, 1998). STAT-Dimere binden an GAS Motive (*gamma interferon activated sequence*), palindromische Responsivelemente mit der Struktur TTCN_mGAA (Seidel *et al.*, 1995). Leichte Varianzen in der Sequenz der zentralen drei bis vier Aminosäuren legen die Bindungsaffinität der STAT-Proteine zu den Responsivelementen in den Zielgenen fest, wodurch erklärt werden kann, dass verschiedene Mitglieder der STAT-Familie die Transkription verschiedener Zielgene regulieren können. Die Kristallstruktur des STAT3-Dimers gebunden an das GAS-Element m67 (5'-CTAGCATTTCCCGTAAAT) zeigt, dass zwar einige Aminosäuren der DNA-Bindungsdomäne das Zucker-Phosphat-Rückgrat berühren, aber die eigentliche Spezifität aus der Bindung zweier Aminosäuren entsteht. Das Asparagin 466 sowie das Lysin 340 stellen einen direkten Kontakt zu den Basenpaaren im m67 her (Becker *et al.*, 1998b). Die dazu homologen Aminosäuren Asparagin 460 und Lysin 336 übernehmen die gleiche Rolle im STAT1-Protein (Chen *et al.*, 1998).

1.1.1.4. Transaktivierungsdomäne

Die Transkriptionsaktivierungs-Domäne am C-terminalen Ende der STAT-Proteine ist die am wenigsten konservierte Domäne zwischen den Mitgliedern der STAT-Proteinfamilie. Vermutlich tragen diese Unterschiede in der Sequenz zu der Spezifität in der Signalkaskade bei, aber für eine genaue Analyse sind weiterführende Untersuchungen notwendig. In dieser Domäne befindet sich ein zwischen den STATs konserviertes Serin, welches ebenfalls phosphoryliert werden kann und eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Transkription einnimmt (Decker & Kovarik, 2000; Eilers *et al.*, 1995; Wen *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1998). Diese reversible Serinphosphorylierung ist für die vollständige Transkriptionsaktivität einiger STAT-Proteine Voraussetzung. Die Phosphorylierung des Serins 727 von STAT3 ist zum Beispiel essentiell für die Expression des Zielgens *Mcl-1* in Makrophagen (Liu *et al.*, 2003) und wird auch mit einer schlechten Prognose bei bestimmten Brustkrebsarten in Zusammenhang gebracht (Yao-Tsung Yeh, 2006).

Die proteolytische Spaltung von STATs in der Transaktivierungsdomäne durch Proteasen erzeugt C-terminal verkürzte Proteine, die als STAT γ bezeichnet werden. Diese haben keine

Transaktivierungsdomäne und sind dominant-negative Varianten der STATs. Bislang wurden STAT γ Isoformen für STAT3, STAT5a, STAT5b und STAT6 identifiziert (Hendry & John, 2004).

1.1.1.5. SH2-Domäne

Die SH2-Domäne übernimmt eine essentielle Aufgabe bei spezifischen Interaktionen zwischen den STATs und den Rezeptoren einerseits und für die Dimerisierung der STATs andererseits. Die SH2-Domänen können an phosphorylierte Tyrosinreste binden, welche in den intrazellulären Domänen der STAT-aktivierenden Rezeptoren lokalisiert sind (Greenlund *et al.*, 1995). Diese Interaktion ist hoch spezifisch und bestimmt weitgehend, welche Mitglieder der STAT-Familie durch die verschiedenen Rezeptoren aktiviert werden (Gerhartz *et al.*, 1996; Gupta *et al.*, 1996; Heim *et al.*, 1995; Hemmann *et al.*, 1996; Schindler *et al.*, 1995; Stahl *et al.*, 1995; Wiederkehr-Adam *et al.*, 2003).

Hinter dem C-terminalen Ende der SH2-Domäne befindet sich ein innerhalb der STAT-Familie konserviertes Tyrosin. Dieses Tyrosin wird bei Aktivierung der STATs phosphoryliert und führt zu einer Dimerisierung zweier STAT-Proteine über eine reziproke Interaktion zweier SH2-Domänen (Haan *et al.*, 1999).

1.1.2. STAT Signalkaskade

Die STATs bilden einen wichtigen Punkt der Konvergenz vieler Signalkaskaden, die oft in Krebszellen konstitutiv-aktiv sind. Die Bindung von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen an ihre Rezeptoren resultiert in der Aktivierung intrinsischer Rezeptortyrosinkinase-Aktivität oder Aktivierung der Rezeptor-gebundenen Kinasen wie den Januskinasen oder der Src-Kinase. Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, wird in beiden Fällen der zytoplasmatische Teil des Rezeptors phosphoryliert und somit wird eine Bindungsstelle für die STAT-Proteine geschaffen, die wiederum selbst Substrate für eine folgende Tyrosinphosphorylierung bilden. Einige onkogene Kinasen, wie v-Src oder Bcr-Abl, können die STATs auch ohne Mitwirkung von Rezeptoren selbstständig phosphorylieren. Die Phosphorylierung der STATs induziert ihre Dimerisierung über eine reziproke Wechselwirkung der SH2-Domänen mit den C-terminal benachbarten Phosphotyrosinen und den Transport in den Zellkern (Buettner *et al.*, 2002; Levy & Darnell, 2002; Yu & Jove, 2004).

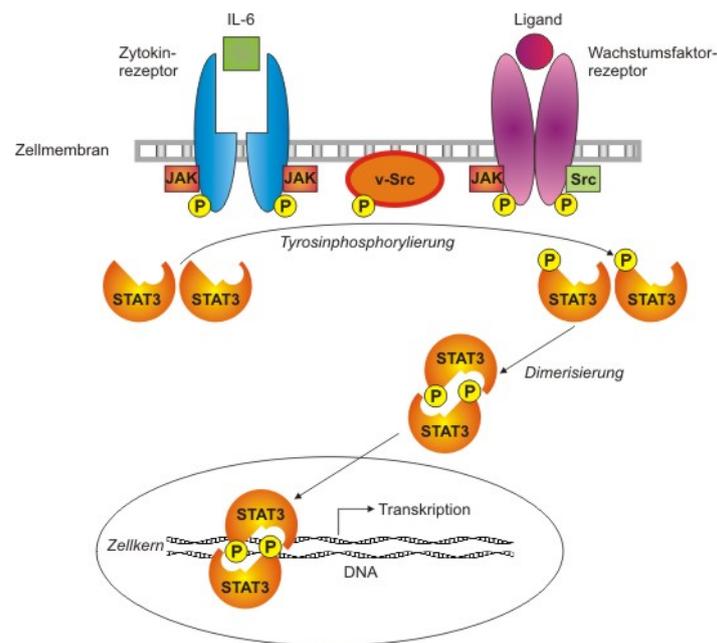


Abb. 2: Die Aktivierung der STATs.

Die STATs (exemplarisch wird die Aktivierung von STAT3 gezeigt) können entweder durch Zytokine (z.B. IL-6 bei STAT3) mit ihren Rezeptoren, direkt durch v-Src oder durch Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren aktiviert werden. Im Falle der Zytokinrezeptoren erfolgt durch Ligandenbindung an den Rezeptor dessen Dimerisierung, eine Phosphorylierung der gebundenen Januskinen (JAKs), welche wiederum den Rezeptor im zytoplasmatischen Teil an einer STAT3-Bindungsstelle phosphorylieren. Dies führt zur Bindung von STAT3 an den Rezeptor und zur Phosphorylierung an einem konservierten Tyrosinrest am C-terminalen Ende von STAT3. In allen drei Fällen bewirkt die Phosphorylierung des Tyrosinrests am STAT3 Dimerisierung über eine intermolekulare reziproke Interaktion zwischen zwei SH2-Domänen und zur Translokation in den Zellkern. Das STAT3-Dimer bindet über die DNA-Bindungsdomäne an Promotorelemente der Zielgene, was die Transkription dieser Gene bewirkt.

1.1.2.1. Interferon-gesteuerte Aktivierung der STATs

Interferone können in zwei große Gruppen eingeteilt werden (Bach *et al.*, 1997; Kisseleva *et al.*, 2002; Pestka, 1997; Stark *et al.*, 1998). Interferone vom Typ I bilden eine große Familie von in vielen Zellsystemen vorhandenen Liganden, deren Signalweg über einen gemeinsamen Rezeptor verläuft. Sie haben potentielle antivirale und wachstumshemmende Eigenschaften, sind aber auch für ihre Wirkung auf das Immunsystem bekannt (Levy & Darnell, 2002; Medzhitov & Biron, 2003). Zur Gruppe der Interferone vom Typ II gehört unter anderem IFN- γ (Aaronson & Horvath, 2002). Im Gegensatz zu Typ I Interferonen, ist die Sekretion von IFN- γ weitgehend auf T-Zellen und natürliche Killerzellen beschränkt.

IL-6 (Interferon Typ I)

Die Erkennung hämatopoetischer Zytokine und Interferone durch ihre jeweiligen Rezeptoren wird gefolgt von der Aktivierung der Januskinasen (JAKs), der Phosphorylierung der Tyrosinreste der Rezeptoren und der folgenden Anlagerung der STATs als wichtige aktivierende Schritte der Signalkaskade. Dabei benutzen die Zytokine verschiedene Kombinationen aus JAKs (JAK1, JAK2, JAK3, TYK2) und STATs, um ihre Signalkette zu aktivieren (Lutticken *et al.*, 1994; Stahl *et al.*, 1994). Die IL-6 (Interleukin-6) -artigen Zytokine (IL-6, IL-11, LIF, OSM, CNTF (*ciliary neurotrophic factor*), CT-1 (*cardiotrophin-1*), CLC (*cardiotrophin-like cytokine*) bilden eine wichtige Familie im STAT Signalweg und wirken über gp130 (*glycoprotein 130*), den LIF (*leukemia-inhibitory factor*) Rezeptor und den OSM (*oncostatin M*) Rezeptor (Gerhartz *et al.*, 1996; Kuropatwinski *et al.*, 1997; Stahl *et al.*, 1995; Tomida *et al.*, 1999).

IL-6 wurde anfänglich als ein Faktor identifiziert, welcher das Wachstum und die Differenzierung von B-Zellen induziert (Hirano *et al.*, 1986; Teranishi *et al.*, 1982). Das erste Ereignis im IL-6-Signalweg ist die Bindung des Liganden an seinen α -Rezeptor (IL-6R α), gefolgt von der Homodimerisierung des gp130-Rezeptors und der Bildung eines ternären Komplexes (Hirano *et al.*, 2000; Hirano *et al.*, 1997). Der gp130-Rezeptor wurde ursprünglich als der verantwortliche Rezeptor für IL-6 angesehen (Hibi *et al.*, 1990), erst später fand man heraus, dass alle bekannten Typ I Interferone gp130 als Rezeptoruntereinheit nutzen. Es gibt verschiedene Tyrosinreste im zytoplasmatischen Teil des Rezeptors, davon ist Y759 eine Bindungsstelle für die Proteintyrosinphosphatase SHP-2 (De Souza *et al.*, 2002; Fukada *et al.*, 1996; Songyang *et al.*, 1993) und SOCS-3 (*suppressor of cytokine signaling-3*) (De Souza *et al.*, 2002; Fukada *et al.*, 1996; Songyang *et al.*, 1993). Die Tyrosine Y767, Y814, Y905 und Y915 sind Bindungsstellen für STATs (Fukada *et al.*, 1996; Gerhartz *et al.*, 1996; Stahl *et al.*, 1995; Yamanaka *et al.*, 1996). Die Dimerisierung des gp130-Rezeptors nach Aktivierung durch IL-6 löst eine Phosphorylierungskaskade aus.

Der erste Schritt dieser Kaskade ist die Autophosphorylierung der Tyrosinkinase der JAK-Familie, welche aus den Mitgliedern JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2 zusammengesetzt ist (Verma *et al.*, 2003). Der Name JAK bedeutet einerseits „just another kinase“ (Darnell *et al.*, 1994), bzw. geht zurück auf den römischen Gott Janus, den zweiköpfigen Gott der Tore (Ihle, 1995). Diese Kinasen werden in sehr vielen verschiedenen Zellarten exprimiert, mit der Ausnahme von JAK3, welches nur in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Leonard & O'Shea, 1998). JAK-Proteine sind konstitutiv am zytoplasmatischen Teil des gp130 in der Nähe der Membran gebunden (Kaplan *et al.*, 1996; Rane & Reddy, 2000), dabei spielt

besonders JAK1 eine wichtige Rolle im IL-6-Signalweg (Guschin *et al.*, 1995; Rodig *et al.*, 1998; Schaper *et al.*, 1998). Die Bindung des Liganden IL-6 an den gp130-Rezeptor löst eine strukturelle Änderung der Konformation des Rezeptors aus, was zur Aktivierung der JAKs durch reziproke Interaktion zweier Januskinasen und anschließender Auto- bzw. Transphosphorylierung führt (Remy *et al.*, 1999). Daraufhin werden Tyrosinreste im zytoplasmatischen Teil des gp130 phosphoryliert. Einige dieser phosphorylierten Tyrosinreste haben das Bindungsmotiv YXXQ und bilden nun eine Andockstelle für die STAT-Proteine (Fu & Zhang, 1993; Greenlund *et al.*, 1994).

Bei der Bindung der STATs an den phosphorylierten zytoplasmatischen Teil des gp130 geht man in der klassischen Sichtweise davon aus, dass monomer vorliegende STATs an den Rezeptor binden, allerdings gibt es Hinweise, dass STAT-Proteine bereits vor ihrer Aktivierung als Komplexe vorliegen (Haan *et al.*, 2000; Ndubuisi *et al.*, 1999; Novak *et al.*, 1998; Stancato *et al.*, 1996). STAT3 wird über die SH2-Domäne an die Phosphotyrosinreste des gp130 angelagert (Gerhartz *et al.*, 1996; Stahl *et al.*, 1995) und seinerseits am Tyrosinrest 705 phosphoryliert (Kaptein *et al.*, 1996a; Shuai *et al.*, 1993). Anschließend löst sich STAT3 vom gp130-Rezeptor ab, dimerisiert über eine reziproke Wechselwirkung zweier SH2-Domänen (Shuai *et al.*, 1994) und wird in den Zellkern transportiert, um dort die Transkription von Zielgenen zu regulieren.

Der gp130-Rezeptor besitzt in der zytoplasmatischen Domäne viele STAT3-Bindungsmotive (YXXQ) und jedes einzelne dieser Bindungsmotive kann STAT3 aktivieren (Stahl *et al.*, 1995). Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Bindungsmotive nicht gleichwertig sind im Sinne der anschließenden DNA-Bindungsaktivität bzw. Transkriptionsaktivität von STAT3 (Schmitz *et al.*, 2000). Interessanterweise stimmt das Phosphotyrosinmotiv von STAT3 nicht mit der vom gp130 abgeleiteten STAT3-Konsensussequenz YXXQ überein.

IFN- γ (Interferon Typ II)

Im Gegensatz zu Typ I Interferonen, die alle an den Rezeptor gp130 binden, bindet das Typ II Interferon IFN- γ an einen anderen Rezeptor (*Type II IFN Receptor*), welcher aus zwei α -Untereinheiten (IFNGR1) und zwei β -Untereinheiten (IFNGR2) zusammengesetzt ist (Bach *et al.*, 1997). In unstimulierten Zellen sind die α - und β -Untereinheiten nicht miteinander assoziiert, allerdings sind die Kinasen JAK1 und JAK2 bereits konstitutiv an die Rezeptorunterheiten gebunden (Bach *et al.*, 1996). Die Aktivierung des Rezeptors durch IFN- γ induziert die rasche Dimerisierung der α -Untereinheiten, wodurch eine Bindungsstelle für die

β -Untereinheiten geschaffen wird. Durch die Komplexbildung der Untereinheiten werden die JAKs in räumliche Nähe gebracht, was zu einer Trans- und Autophosphorylierung der JAKs führt und schließlich die Phosphorylierung des Tyrosins 440 an den α Untereinheiten des Rezeptors bewirkt. STAT1 kann nun an die phosphorylierte pY₄₄₀DKPH Sequenz am carboxyterminalen Ende von IFNGR1 binden (Greenlund *et al.*, 1994; Igarashi *et al.*, 1994). Die aktivierten JAKs phosphorylieren Rezeptor-gebundenes STAT1-Protein am Tyrosinrest 701, was zu einer Homodimerisierung von STAT1 über eine reziproke Wechselwirkung zwischen den SH2-Domänen und den Phosphotyrosinresten führt (Greenlund *et al.*, 1995; Shuai *et al.*, 1994; Shuai *et al.*, 1992). Diese STAT1-Dimere werden anschließend in den Zellkern transportiert und binden dort an so genannte GAS-Elemente (*gamma interferon activated sites*) von IFN- γ regulierten Zielgenen und steuern so die Transkription dieser Zielgene (Decker *et al.*, 1989; Decker *et al.*, 1991; Lew *et al.*, 1989).

1.1.2.2. Src-gesteuerte Aktivierung von STAT3

Die c-Src-Kinase ist das zelluläre Homolog von v-Src, der onkogenen Form des Proteins, welches vom Hühner-Retrovirus *Rous sarcoma* kodiert wird (Brown & Cooper, 1996; Thomas & Brugge, 1997). Die Src-Familie von Tyrosinkinase wird gebildet von Src, Yes, Yrk und Fyn, welche in vielen Zellsystemen exprimiert werden, und Hck, Fgr, Lyn, Lck und Blk, welche vorrangig in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden. Alle Mitglieder der Familie haben ein Molekulargewicht von etwa 60 kDa und bestehen aus sechs verschiedenen Domänen. Eine wichtige Rolle bei der c-Src Aktivierung spielt das Tyrosin 530 am carboxyterminalen Ende des Proteins. Dieses wird von Csk (*c-terminal Src-Kinase*) phosphoryliert, was zu einer intramolekularen Interaktion zwischen dem Phosphotyrosinrest und der SH2-Domäne von Src führt. Die Blockierung der SH2-Domäne hat eine enzymatische Inaktivierung der Src-Kinaseaktivität zur Folge. Eine Dephosphorylierung dieses Tyrosinrests oder eine Deletion des Proteins vor Y527 (wie in v-Src) verändert die Konformation von c-Src und bewirkt eine katalytische Aktivierung (Ishizawa & Parsons, 2004).

Bereits 1995 konnte gezeigt werden, dass die Transformation von 3Y1, NIH/3T3 und BALB/c3T3 Zellen durch v-Src zur Tyrosinphosphorylierung von STAT3 führt (Yu *et al.*, 1995). Weitere Studien zeigten, dass dabei v-Src und STAT3 direkt über die Wechselwirkung zwischen der SH2-Domäne von STAT3 und der SH3-Domäne von v-Src interagieren und diese direkte Wechselwirkung die Phosphorylierung des Tyrosinrests 705 von STAT3 bewirkt (Cao *et al.*, 1996; Chaturvedi *et al.*, 1997; Lund *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu den oben

genannten Interferon-gesteuerten Aktivierungsmöglichkeiten von STAT3 verläuft die Src-gesteuerte STAT3-Phosphorylierung unabhängig von den JAKs (Simon *et al.*, 2002). Diese direkte Aktivierung von STAT3 durch v-Src führt zu einer Homodimerisierung von STAT3, der Bindung der STAT3-Homodimere an Promotorelemente der Zielgene und Regulation der Transkription (Smith & Crompton, 1998).

Andere Mitglieder der Src-Familie werden ebenfalls in Verbindung mit STAT-Aktivierung gebracht. In der T-Lymphoma Mauszelllinie LSTRA, in welcher Lck 40fach überexprimiert vorliegt, konnte neben einer Tyrosinphosphorylierung und DNA-Bindungsaktivität von STAT3 und STAT5 eine Autophosphorylierung und *in vitro* Kinaseaktivität von JAK1 und JAK2 demonstriert werden (Yu *et al.*, 1997). Eine direkte Interaktion zwischen Lck und STAT3 konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Lund *et al.*, 1999).

1.1.2.3. STAT-Aktivierung durch Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel EGF (*epidermal growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*) oder FGF (*fibroblast growth factor*) führen zu einem gesteigerten Wachstum bei verschiedenen Zellarten. Deren Rezeptoren gehören zur Gruppe der Rezeptortyrosinkinase (RTKs) und weisen eine intrinsische Proteintyrosinkinaseaktivität auf (van der Geer *et al.*, 1994). RTKs sind in allen vielzelligen Organismen vorhanden und können extrazelluläre Signale über Phosphorylierung einer Vielzahl von intrazellulären Substraten bis zum Zellkern weiterleiten.

Auch hier führt die Aktivierung des EGFR zur Dimerisierung der Rezeptorunterheiten (Songyang & Cantley, 1995) und zu einer zweiten konformationellen Änderung, die der katalytischen Domäne die Möglichkeit bietet, verschiedene Substratmoleküle zu phosphorylieren (Lemmon & Schlessinger, 1994; Ullrich & Schlessinger, 1990). Neben anderen Signalübermittlerproteinen können auch die STATs über den EGFR phosphoryliert werden (Leaman *et al.*, 1996), dabei spielt besonders c-Src eine wichtige Rolle (Olayioye *et al.*, 1999). Die Stimulation mit EGF resultiert in einer raschen Dimerisierung der STATs, dem Transport in den Zellkern und der Bindung an die STAT-Bindungssequenz SIE (*c-sis-inducible element*) (Sadowski *et al.*, 1993; Silvennoinen *et al.*, 1993).

Auch bei den Wachstumsfaktoren PDGF (Vignais & Gilman, 1999) und FGF (Hart *et al.*, 2000) konnte eine Aktivierung der STATs nachgewiesen werden.

1.1.3. STAT3-Dimerisierung

Die STAT-Dimerisierung ist ein zentrales Element in der Signalkaskade des JAK-STAT-Signalwegs. Für die nukleäre Translokation und die Bindung an Promotorelemente der Zielgene wird fast ausschließlich eine vorangegangene Homodimerisierung der STATs benötigt. Alle Mitglieder der STAT-Familie besitzen einen konservierten Tyrosinrest C-terminal von der SH2-Domäne. Durch die Aktivierung der STATs durch beispielsweise entsprechende Wechselwirkung mit Rezeptoren wird dieser Tyrosinrest phosphoryliert und kann anschließend reziprok von der SH2-Domäne des Dimerisierungspartners gebunden werden (Haan *et al.*, 1999).

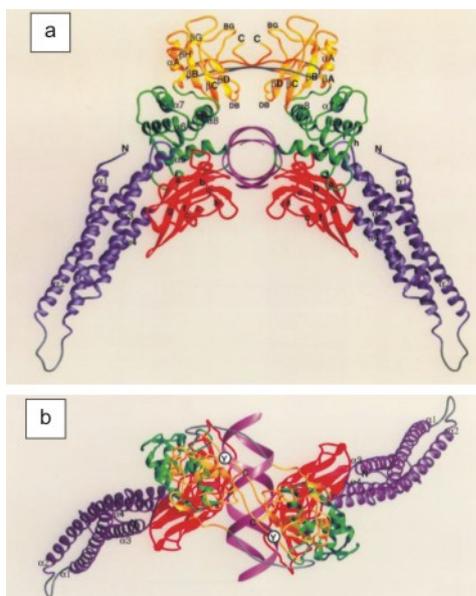


Abb. 3: Kristallstruktur von STAT3.

Das Bändermodell der Kristallstruktur eines STAT3 β Homodimers gebunden an DNA. Gezeigt ist die helikale N-terminale Domäne (blau), die β -Faltblattstruktur der DNA-Bindungsdomäne (rot) mit der gebundenen DNA (lila), ein Verbindungsstück (grün) und die SH2-Domäne mit dem phosphorylierten Tyrosin (gelb). Bild a zeigt eine Seitenansicht, während in der Ansicht von oben in Bild b gut die reziproke Interaktion zwischen den beiden SH2-Domänen der beiden STAT3-Proteine zu erkennen ist. (Bilder entnommen aus (Becker *et al.*, 1998b))

Eine Analyse der Kristallstruktur der STAT3-SH2-Domäne (siehe Abbildung 3) zeigt, dass die Phosphatgruppe des phosphorylierten Tyrosinrests in einer tiefen Tasche unter anderem von einem konservierten Arginin gebunden wird, während die 4 bis 5 Aminosäuren carboxyterminal zum phosphorylierten Tyrosin Wechselwirkungen mit den anderen Aminosäuren der SH2-Domäne eingehen (Becker *et al.*, 1998b; Chen *et al.*, 1998; Waksman *et al.*, 1992). Diese wichtigen 4-5 carboxyterminalen Aminosäuren variieren zwischen den einzelnen Mitgliedern der STAT-Familie und bilden somit ein Merkmal für die Spezifität von STAT-Dimerisierungen (Coleman *et al.*, 2005; Shao *et al.*, 2004; Wiederkehr-Adam *et al.*, 2003).

In der klassischen Betrachtungsweise ging man davon aus, dass die STATs als Monomere im Zytoplasma vorliegen und erst nach Phosphorylierung des Tyrosins dimerisieren. Allerdings mehren sich Hinweise, dass STATs auch ohne Aktivierung als Dimer vorliegen können. So

wurde bereits 1996 das Vorkommen von STAT1/STAT2- und STAT1/STAT3-Heterodimeren beschrieben (Stancato *et al.*, 1996) und auch die Gegenwart von bivalenten Kationen führte zu Dimerisierung von STAT3 ohne vorangegangene Phosphorylierung des Tyrosins (Novak *et al.*, 1998). Weiterführende Untersuchungen konnten bestätigen, dass sowohl STAT1 als auch STAT3 bereits vor Aktivierung als Homodimere vorliegen (Braunstein *et al.*, 2003). Allerdings gibt es Unterschiede bezüglich der Stabilität dieser Dimere (Park *et al.*, 2000). Kürzlich wurde in der Literatur ein strukturell neues STAT3-Homodimer beschrieben, welches sich aufgrund oxidativen Stresses bilden kann und mittels einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen entsteht (Li & Shaw, 2004). Die biologische Signifikanz dieser Disulfid-Dimere bedarf jedoch noch genauerer Untersuchungen.

1.1.4. Translokation von STAT3

Eukaroytische Zellen haben ein System für die Kompartimentalisierung ihrer chromosomalen DNA entwickelt. Daher sind DNA-Replikation und -Transkription räumlich von anderen zellulären Prozessen getrennt. Diese Kompartimentalisierung macht einen Mechanismus zur Regulation der Replikation und der Transkription erforderlich, um den Zugang von DNA-Bindungsfaktoren und anderen regulatorischen und enzymatischen Molekülen zum Zellkern zu steuern. Die nukleäre Membran dient dabei als Barriere, die die Bereiche des Zellkerns vom Zytoplasma räumlich abtrennt. Der Transport von Makromolekülen durch diese Membran wird durch Strukturen gesteuert, die man als NPCs (*nuclear pore complexes*) bezeichnet (Blobel & Wozniak, 2000; Davis, 1995; Lim & Fahrenkrog, ; Rout & Aitchison, 2001). Diese NPCs erlauben die passive Diffusion von kleinen Molekülen, versperren aber den Zugang für bestimmte Moleküle, die eine Größe von etwa 50 kDa überschreiten und keine Signalsequenzen für die Lokalisation besitzen (Weis, 2003).

Für den aktiven Transport in den Zellkern mittels NPCs benötigt ein Protein ein NLS (*nuclear localization signal*) Signal. Klassische NLS Signale haben in der Sequenz viele basische Aminosäuren wie Arginin und Lysin und werden direkt von der Familie der Importin α -Adapter erkannt (Hodel *et al.*, 2001; Jans *et al.*, 2000). Das aminoternale Ende des Importin α enthält mehrere konservierte Aminosäurereste, welche durch das Importin β 1 erkannt werden und die als IBB (*importin β 1 binding domain*) bezeichnet werden. Das Importin β 1 dient dazu, das Importin α mit seinem gebundenen NLS-Protein durch die NPCs zu transportieren (Cingolani *et al.*, 1999). STAT1 und STAT3 besitzen eine NLS-Sequenz in der „coiled-coil“-Domäne und können daher mit Hilfe der Importine in den Zellkern transportiert werden. Während der Import von STAT1 durch Importin α 5 in den Zellkern

bereits untersucht wurde (Fagerlund *et al.*, 2002; McBride *et al.*, 2002; McBride & Reich, 2003; Melen *et al.*, 2001), gibt es anhaltende Diskussionen über den Import von STAT3, da es hier signifikante Unterschiede zu STAT1 gibt. So konnten in STAT3 zwei entsprechende NLS-Sequenzen in der „coiled-coil“-Domäne und der DNA-Bindungsdomäne identifiziert werden (Ma *et al.*, 2003), allerdings gibt es derzeit unterschiedliche postulierte Transport-Modelle (Liu *et al.*, 2005; Ma & Cao, 2006; Ushijima *et al.*, 2005).

Die carboxyterminalen Enden der Importin α -Proteine werden von einem spezifischen Exportrezeptor im Zellkern erkannt, dem CAS-Protein (*cellular apoptosis susceptibility*) (Herold *et al.*, 1998; Kutay *et al.*, 1997). Das CAS-Protein dient dazu, das Importin α zurück in das Zytoplasma zu befördern. STAT-Proteine hingegen werden mittels NES-Signalen (*nuclear export signal*) vom Exportin1 gebunden und vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert. STAT3 besitzt mehrere NES-Signale, von welchen einige für den Transport des phosphorylierten STAT3 aus dem Kern, andere aber für einen von der Phosphorylierung unabhängigen Transport von STAT3 aus dem Kern zuständig sind (Bhattacharya & Schindler, 2003; Sato *et al.*, 2005). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnten Pranada *et al.* zeigen, dass STAT3 unabhängig von der Tyrosinphosphorylierung zwischen Zytoplasma und Zellkern hin- und herwandert (Pranada *et al.*, 2004). Erst nach erfolgter Tyrosinphosphorylierung reichern sich die STAT-Dimere im Zellkern an und regulieren die Transkription ihrer Zielgene (Marg *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2004).

1.1.5. STAT3 als Transkriptionsfaktor

Die Transkription von Verstärkerabhängigen eukaryotischen Genen durch RNA Polymerase II (Pol II) erfordert eine Vielzahl von einzelnen Schritten. Eukaryotische Gentranskription benötigt die Mitwirkung von Faktoren wie Aktivatorproteinen, Coaktivatorproteinen und der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie (Lemon & Tjian, 2000). Im Falle der STAT3-gesteuerten Transkription sind die STATs selbst die Aktivatorproteine. Die Koordination zwischen den STAT3-Proteinen und der Transkriptionsmaschinerie wird von Coaktivatorproteinen übernommen, einer Vielzahl von Multiproteinkomplexen, von welchen viele in der Lage sind, Chromatin zu modifizieren (Naar *et al.*, 2001) oder als Adapter zwischen Verstärkerproteinen und allgemeinen Faktoren dienen (Myers & Kornberg, 2000).

1.1.5.1. Stat3-regulierte Zielgene

Im Zellkern binden die STATs an Promotorregionen ihrer Zielgene und können mit Hilfe des Transkriptionsapparats die Transkription bestimmter Proteine aktivieren. Eine Vielzahl an Studien konnte belegen, dass das anti-apoptotische Protein Bcl-x_L ein Zielgen von STAT3 ist (Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Grandis *et al.*, 2000; Hsieh *et al.*, 2005; Karni *et al.*, 1999; Kijima *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006; Masuda *et al.*, 2002; Niu *et al.*, 2002a; Toyonaga *et al.*, 2003; Xi *et al.*, 2004; Zamo *et al.*, 2002). Indem man die Signalkette von STAT3 durch die Transfektion einer dominant-negativen Variante von STAT3 blockiert, wird die IL-6 induzierte Expression von *bcl-x_L* in menschlichen Plasmazytomzellen unterdrückt, was die Zellen wiederum für Fas-gesteuerte Apoptose empfindlich macht (Catlett-Falcone *et al.*, 1999). In einem ähnlichen Experiment in menschlichen HNSCC (*head and neck squamous cell carcinoma*) Zellen konnte gezeigt werden, dass durch Inhibition des STAT3-Signalwegs die Expression von *bcl-x_L* unterdrückt wurde, was in dieser Zelllinie ebenfalls zum Zelltod führte (Grandis *et al.*, 2000). Auch die Depletion von Src-Kinaseaktivität in Mäusefibroblasten führte zu einem Verschwinden der konstitutiven Phosphorylierung von STAT3, einer erniedrigten *bcl-x_L* Expression und zu einer gesteigerten Apoptoserate (Karni *et al.*, 1999).

Ein weiteres Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie, Mcl-1, hat gleichfalls eine anti-apoptotische Wirkung und wird von STAT3 beispielsweise in „leukemic large granular lymphocytes“ (Epling-Burnette *et al.*, 2001) reguliert. Das Mcl-1-Protein repräsentiert ebenso einen Überlebensfaktor für hämatopoetische Zellen (Zhou *et al.*, 1997). Auch bei Mcl-1 konnten weitere zahlreiche Studien einen Zusammenhang mit STAT3 herstellen (Bhattacharya *et al.*, 2005; Hajime Isomoto, 2005; Hsieh *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2003; Niu *et al.*, 2002a; Rahaman *et al.*, 2002).

Mitglieder der IAP-Proteinfamilie (*inhibitor of apoptosis protein*), wie zum Beispiel Survivin, werden durch konstitutive Aktivierung von STAT3 während der Onkogenese ebenfalls hochreguliert (Gao *et al.*, 2006; Gritsko *et al.*, 2006; Hsieh *et al.*, 2005; Kanda *et al.*, 2004) und tragen zum Überleben von Tumorzellen mit bei (Aoki *et al.*, 2003; Hasegawa *et al.*, 2003).

Ein Kontrollgen des Zellzyklus, *c-myc*, wird vom STAT3-Signalweg beispielsweise in der menschlichen Brustkrebszelllinie MDA-MB-435S kontrolliert (Hsieh *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *c-myc* durch STAT3 bei der durch v-Src-induzierten Onkogenese in Fibroblasten und bei der PDGF-induzierten Mitogenese in normalen Zellen eine Rolle spielt (Bowman *et al.*, 2001).

Ein weiteres Beispiel an einem Kontrollgen vom Zellzyklus, welches von STAT3 reguliert wird, ist das pro-proliferative *cyclin D1* Gen (Hsieh *et al.*, 2005; Kijima *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006; Masuda *et al.*, 2002; Sinibaldi *et al.*, 2000; Toyonaga *et al.*, 2003; Xi *et al.*, 2004).

Neben der Transkription von Genen, die Proliferation und Apoptose beeinflussen, benötigt progressives Tumorwachstum auch die kontinuierliche Bildung von neuen Blutgefäßen (Angiogenese) (Folkman, 1990). Die Aktivierung von onkogenen Signalwegen regt die Angiogenese von Tumoren an, wofür zumindest teilweise die Hochregulation von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) verantwortlich ist. Auch hier konnte bereits gezeigt werden, dass STAT3 den *vegf* Promotor transkriptionell aktiviert (Christine *et al.*, 2005; Gray *et al.*, 2005; Hsieh *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2005; Niu *et al.*, 2002b; Xu *et al.*, 2005; Yahata *et al.*, 2003).

Diese Aufzählung von potentiellen STAT3-Zielgenen ist mit Sicherheit nicht vollständig, sondern gibt nur einen Überblick über die am häufigsten beschriebenen Zielgene der STATs. In einigen Fällen, wie bei *bcl-x_L* oder *mcl-1*, gibt es Hinweise, dass diese Gene direkte Zielgene von STAT3 sind, während bei anderen Zielgenen, wie bei *vegf*, Hinweise vorliegen, dass hier die Regulation über STAT3 nur indirekt verläuft. Es ist erwähnenswert, dass es bei Tumorzellen eine große Variation bei der Regulation von STAT3-gesteuerten Genen gibt, die Einfluss auf Zellwachstum und Apoptose nehmen. Beispielsweise werden die *bcl-x_L* und *cyclin D1* Gene nicht in allen menschlichen Krebszellen induziert, in welchen STAT3 konstitutiv-aktiv ist. Diese Zelltyp-abhängige Regulation verschiedener Zielgene von STAT3 spiegelt möglicherweise den Einfluss STAT3-interagierender Proteine wider, wie zum Beispiel anderer Transkriptionsfaktoren und anderer Signalwege, die sich mit der STAT3-Signalkette kreuzen. Daher werden in Zukunft insbesondere Gen-Arrays eine wichtige Rolle einnehmen, um die STAT3-regulierten Zielgene möglichst umfassend und Zell-spezifisch untersuchen zu können, wie an ersten Ansätzen bereits zu sehen ist (Chen *et al.*, 2006; Dauer *et al.*, 2005; Hsieh *et al.*, 2005)

1.1.5.2. Unphosphoryliertes STAT3 als Transkriptionsfaktor

Eine genauere Analyse der Kristallstruktur von STAT1 zeigte, dass STAT1 ohne Tyrosinphosphorylierung dimerisieren kann (Mao *et al.*, 2005) und es konnte auch demonstriert werden, dass unphosphoryliertes STAT3 in den Zellkern wandern kann (Pranada *et al.*, 2004). STAT1 kann auch ohne Aktivierung an DNA binden (Chatterjee-Kishore *et al.*, 2000) und eine neuere Studie mit Affymetrix-Arrays ergab, dass sowohl aktiviertes STAT3 als auch unphosphoryliertes STAT3 die Transkription verschiedener Zielgene regulieren

können (Yang *et al.*, 2005). Daher ist es möglich, dass eine Überexpression von STAT3 selbst bereits einen basalen Beitrag zur Tumorgenese liefert, der unabhängig von einer Aktivierung durch Liganden ist und dieser Effekt durch die Tyrosinphosphorylierung von STAT3 weiter verstärkt wird.

1.2. Fehlregulation von Signalwegen und Tumorentstehung

Tumorzellen zeichnen sich gegenüber normalen Zellen durch eine erhöhte Zellteilungsrate, dem Verlust der Differenzierungsfähigkeit und der Kontaktinhibition, sowie der Fähigkeit zur Invasivität und zur Metastasierung aus. Weitere Merkmale von Krebszellen sind ein ununterbrochenes Wachstum verbunden mit einer Blockade der Apoptose, Versorgung mit Wachstumsfaktoren und Angiogenese, eine mitotische Instabilität und ein Entkommen der Immunantwort. Erworben werden diese Merkmale in einem mehrstufigen Prozess (Hanahan & Weinberg, 2000).

Die Tumorbildung ist eine schrittweise Akkumulation von Fehlregulationen, die u.a. von Mutationen ausgelöst werden können. Die Ursachen dieser Mutationen können sehr unterschiedlich sein. Das Spektrum reicht von intrinsischen Veränderungen, wie z.B. Fehler bei der DNA-Replikation über extern bedingte Schädigungen durch z.B. UV- oder Röntgenstrahlen bis hin zu Viren, die Mutationen verursachen. Gene, die in die Kontrolle des Zellwachstums involviert sind, können aufgrund ihrer Funktion in zwei Kategorien eingeteilt werden; Onkogene und Tumorsuppressorgene.

1.2.1. STAT3 als Onkogen

Normalerweise ist die Aktivierung der STATs ein transienter und genau kontrolliert ablaufender Prozess. In Tumorzellen ist allerdings häufig eine konstitutive Aktivierung von STAT3 und auch von STAT5, zu beobachten. Dies ist nicht ungewöhnlich, da die STATs einen Punkt der Konvergenz in der Signalkette vieler Zytokine und Wachstumsfaktoren bilden und diese Signalkaskaden in Krebszellen häufig überreguliert vorliegen. In vielen Fällen wird die onkogene Tyrosinkinaseaktivität durch unkontrollierte autokrine oder parakrine Ligandenbindung erzeugt, wie man beispielsweise bei der IL-6 regulierten JAK/STAT3-Signalkette in Plasmazytomzellen oder der TGF α -regulierten (*transforming growth factor α*) EGFR Signalkette in HNSCC (*head and neck squamous cell carcinoma*) Zellen sehen kann (Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Grandis *et al.*, 1998). Auch onkogene Derivate einiger Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (v-Src, v-Eyk, v-Ros und Lck) können für

eine konstitutive STAT-Aktivität in Zellen verantwortlich sein (Garcia *et al.*, 1997; Turkson & Jove, 2000; Yu *et al.*, 1995). Alternativ gibt es auch die Möglichkeit, dass genetische Veränderungen, die in Tumorzellen, aber nicht in normalen Zellen gefunden werden (z.B. Bcr-Abl Fusionsproteine), zu einer Liganden-unabhängigen STAT-Aktivierung führen können (Coppo *et al.*, 2003). Es gibt dabei keine Hinweise auf natürlich vorkommende Mutationen in STAT3-Proteinen. Durch übermäßige Tyrosinkinaseaktivität kann es jedoch zu einer konstitutiven Aktivierung von STAT3 kommen.

Viele Studien liefern überzeugende Hinweise darauf, dass eine konstitutive Aktivierung der STATs, insbesondere von STAT3 und STAT5, aktiv an der malignen Transformation beteiligt ist (Yu & Jove, 2004). Diese Annahme beruht auf einer großen Bandbreite von experimentellen Systemen, zum Beispiel transformierten Zelllinien, primären Zellen und Tiermodellen. Konstitutiv-aktive STATs wurden aber nicht nur in verschiedenen Tumorzelllinien gefunden, sondern können auch in menschlichen Primärtumoren identifiziert werden, wenn die Tumorzellen mit den entsprechenden parentalen Zellen verglichen werden (siehe Tabelle 1). In vielen Fällen findet man mehr als ein permanent aktives Mitglied der STAT-Familie.

Tumorart	Konstitutiv-aktive STATs
Plasmozytom	STAT1, STAT3
Leukämien	
HTLV-I-abhängig (<i>human T-cell leukemia virus</i>)	STAT3, STAT5
Erythroleukämie	STAT1, STAT5
Akute myeloische Leukämie (AML)	STAT1, STAT3, STAT5
Chronisch myeloische Leukämie (CML)	STAT5
LGL (<i>large granular lymphocyte leukaemia</i>)	STAT3
Lymphoma	
Burkitt Lymphom	STAT3
Mycosis fungoides	STAT3
Kutanes T-Zellen-Lymphom	STAT3
Non-Hodgkin-Lymphom (NHL)	STAT3
Großzelliges anaplastisches Lymphom (ALCL)	STAT3
Mammakarzinome	STAT1, STAT3, STAT5
Kopf-Hals-Tumoren	STAT1, STAT3, STAT5
Melanoma	STAT3
Ovarialtumoren	STAT3
Lungentumoren	STAT3
Pankreaskarzinome	STAT3
Prostatakarzinome	STAT3

Tabelle 1: Aktivierung der STAT-Proteine in menschlichen Tumorerkrankungen

Eine Übersicht über die konstitutiv-aktiven STAT-Proteine, die in verschiedenen Studien in den jeweiligen Tumorerkrankungen identifiziert werden konnten.
(Tabelle verändert entnommen aus (Yu & Jove, 2004))

Ein genetischer Hinweis für das onkogene Potential von STAT3 kommt von einer konstitutiv-aktiven rekombinanten Mutante von STAT3, die als STAT3C bezeichnet wird (Bromberg *et al.*, 1999). Das STAT3C-Protein ist, wenn es stabil exprimiert wird, ausreichend, um einige Aspekte der zellulären Transformation von Mäusefibroblasten zu steuern, und STAT3C hat die Fähigkeit, Tumore in Nacktmäusen zu erzeugen. Weiterhin wurde gezeigt, dass STAT3 während der Transformation durch v-Src konstitutiv-aktiv ist (Yu *et al.*, 1995). Nachfolgende Studien haben dies bestätigt und demonstrierten, dass aktives STAT3 für die onkogene Transformation durch v-Src oder durch andere Onkogene notwendig ist (Bromberg *et al.*, 1998).

Obwohl die STAT1-Aktivität ebenfalls in einigen Tumoren und Tumorzelllinien erhöht ist, wurde die Funktion des Proteins mehr mit einer versuchten Unterdrückung des Wachstums als mit maligner Transformation in Verbindung gebracht. STAT1 wird daher allgemein als ein potentieller Tumorgegenspieler angesehen (Bromberg *et al.*, 1996; Stephanou & Latchman, 2005; Widschwendter *et al.*, 2002).

1.2.2. Inhibition des STAT3-Signalwegs

Eine konstitutive Aktivierung von STAT3 trägt zu einer permanenten Veränderung im genetischen Programm der Zelle bei. Da STAT3 daran beteiligt ist, fundamentale biologische Prozesse, wie z.B. Apoptose und Wachstum, über die Transkription der Zielgene zu regulieren, ist die Inhibition der STAT3-Signalkette ein neuer Ansatz, maligne Progression in einer großen Bandbreite an menschlichen STAT3-abhängigen Tumoren zu blockieren. Dabei gibt es viele Strategien, Inhibitoren zu entwickeln. Ein Ansatz beinhaltet die Identifizierung von Proteinen und Rezeptoren, die STAT3 aktivieren können und das Design pharmakologischer Inhibitoren, die spezifisch die Funktion dieser Proteine inhibieren können (z.B. Tyrphostin AG490). Beispiele solcher Proteine sind Zytokine, Wachstumsfaktoren, Tyrosinkinasen, Serinkinasen und ihre Rezeptoren. Alternativ kann aber auch versucht werden, die Funktion von STAT3 direkt zu inhibieren.

1.2.2.1. Physiologische Protein-Modulatoren der STAT3-Aktivierung

Physiologische Proteininhibitoren der STAT3-Signalkaskade sind endogene Proteine, welche direkt oder indirekt die Aktivierung von STAT3 herunterregeln können. Zwei Proteinfamilien spielen dabei eine wichtige Rolle, zum einen die Familie der SOCS-Proteine (*suppressor of cytokine signaling*) und andererseits die Familie der PIAS-Proteine (*protein inhibitor of*

activated stat). Die SOCS-Proteine, welche nach Stimulation durch Zytokine exprimiert werden, können an die STAT- bzw. JAK-Bindungsstellen der Rezeptoren binden und somit die Aktivierung weiterer STAT-Proteine verhindern (Krebs & Hilton, 2001). PIAS1 und PIAS3, Mitglieder der PIAS-Familie, interagieren nur mit phosphoryliertem STAT1 bzw. STAT3, verhindern im Zellkern die Bindung der STATs an die DNA und blockieren damit die Transkriptionsaktivität der STATs (Chung *et al.*, 1997; Shuai, 2000).

Die reversible Proteinphosphorylierung wird als Zusammenspiel zwischen Proteinkinasen und den dazu antagonistischen Proteinphosphatasen verstanden. Während die Proteintyrosinkinasen die Phosphorylierung von Tyrosinen katalysieren, katalysieren die Proteintyrosinphosphatasen die Dephosphorylierung. Durch dieses ausgewogene Gleichgewicht wird die spezifische reversible Tyrosinphosphorylierung genau gesteuert. Die Phosphatasen SHP1, SHP2 und PTP1B können katalytisch in die Tyrosinphosphorylierung der STATs eingreifen (Rakesh & Agrawal, 2005). Ob jedoch eine dieser Phosphatasen auch für die direkte Dephosphorylierung von STAT3 verantwortlich ist, konnte bislang nicht abschließend geklärt werden.

1.2.2.2. Direkte Inhibition der STAT3-Aktivierung

siRNA

Eine häufig eingesetzte Methode zur Inaktivierung eines Proteins ist die Transfektion von synthetischen kleinen RNA Molekülen. Diese siRNAs (*small interfering RNAs*) werden in menschlichen Zellen von der RNAase III Dicer aus transfizierter doppelsträngiger RNA herausgeschnitten und anschließend in einen Proteinkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) eingebaut. RISC bindet mit Hilfe der eingebrachten RNA-Fragmente an die mRNA des Zielgens, baut dieses ab und verringert dadurch spezifisch die Expression dieses Zielgens (Dorsett & Tuschl, 2004). Durch den Einsatz dieser Methode bei STAT3 konnte beispielsweise gezeigt werden, dass durch das Inaktivieren von STAT3 das Wachstum von Kehlkopftumoren (Gao *et al.*, 2006) und Prostatakarzinomen (Gao *et al.*, 2005) gehemmt wird, die Induktion von Mammatumoren in Nacktmäuse inhibiert wird (Ling & Arlinghaus, 2005) und in Astrozytomzellen Apoptose induziert wird (Konnikova *et al.*, 2003).

Ködernukleotide (*decoy oligonucleotides*)

Diese Methode beruht auf der Transfektion doppelsträngiger Oligonukleotide, welche die Konsensus-Bindungssequenz eines Transkriptionsfaktors enthalten und von diesem gebunden

werden. Diese Interaktion führt dazu, dass der Transkriptionsfaktor nicht mehr an die Promotorregionen des Zielgens binden kann, was zu einer signifikanten Reduktion oder sogar zu einer völligen Blockade der Transkriptionsaktivität führt (Crinelli *et al.*, 2002). Auch hier wurde gezeigt, dass die Inhibition von STAT3 *in vivo* das Tumorwachstum hemmen kann bzw. zum programmierten Zelltod der Tumorzellen führt (Barton *et al.*, 2004; Leong *et al.*, 2003; Xi *et al.*, 2004).

„G-quartet“ Oligonukleotide

Guanin-reiche DNA- und RNA-Sequenzen können inter- und intramolekulare viersträngige Strukturen bilden, die als „G-quartet“ Oligonukleotide bezeichnet werden. Für STAT3 wurde ein „G-quartet“ Oligonukleotid entwickelt, welches nach Bindungsstudien am Computer an die SH2-Domäne des Proteins binden soll und die Bindung von STAT3 an die DNA inhibiert (Jing *et al.*, 2004; Jing *et al.*, 2003). Diese Oligonukleotide können das Tumorwachstum von HNSCC (*head and neck squamous cell carcinoma*) in Nacktmäusen inhibieren und werden derzeit als möglicher therapeutischer Ansatz bei Krebserkrankungen näher untersucht (Jing *et al.*, 2006).

Dominant-negatives STAT3-Protein

Wie bereits in Kapitel 1.1.1. beschrieben, existiert von STAT3 eine natürlich vorkommende Spleißvariante, das so genannte STAT3 β . Dieses Protein hat keine Transkriptionsdomäne und agiert daher bei Überexpression in einer Zelle als dominant-negatives STAT3 und verhindert die Transkriptionsaktivität von STAT3. So konnte beispielsweise mit dieser Methode gezeigt werden, dass eine Inhibition von STAT3 in U266 Zellen (Catlett-Falcone *et al.*, 1999) und dass eine Gentherapie *in vivo* bei B16 Melanoma (Niu *et al.*, 1999; Niu *et al.*, 2001) zu einer erhöhten Apoptoserate in den jeweiligen Zelllinien führt.

Antisense

Bei dieser Methode wird ein RNA Strang transfiziert, der komplementär zur mRNA des zu inhibierenden Gens ist. Wird die mRNA des Gens transkribiert, bildet die transfizierte Antisense-RNA mit der mRNA einen Doppelstrang, der nicht mehr an den Ribosomen abgelesen werden kann, wodurch die Translation inhibiert wird. Durch RNA-Interferenz-Mechanismen (RNAi) wird der künstlich gebildete RNA-Doppelstrang zudem rasch abgebaut (Redell & Tweardy, 2005). Diese Technik führt bei der Inhibition von STAT3 ebenfalls zu einem verminderten Tumorwachstum von Prostatakarzinomen (Mora *et al.*, 2002) und LGL

(*large granular lymphocyte leukaemia*) (Epling-Burnette *et al.*, 2001) und löst in HNSCC (*head and neck squamous cell carcinoma*) Zellen in Nacktmäusen Apoptose aus (Grandis *et al.*, 2000).

Peptide

Peptidische Inhibitoren werden dazu benutzt, um spezifische Protein-Protein-Interaktionen zu verhindern. Daher liegt es nahe, Peptide zu finden, die spezifisch an die STAT3-SH2-Domäne binden und dadurch die Aktivierung und die Homodimerisierung von STAT3 verhindern. Das Phosphopeptid PpYLKTK inhibiert spezifisch die Bindung von STAT3-Dimeren an DNA. Ein Fusionsprotein dieser Sequenz mit einer Membran-translozierenden Sequenz inhibiert das STAT3-abhängige Wachstum v-Src transformierter 3T3 Zellen in Weichagar (Turkson *et al.*, 2001). Nur wenig später konnte das Phosphopeptid pYLPQTV, welches von einer STAT3-SH2-Bindungsstelle am gp130 Protein abgeleitet ist, identifiziert werden (Ren *et al.*, 2003). Dieses Phosphopeptid besitzt eine beinahe 100fach höhere Affinität zur SH2-Domäne von STAT3 verglichen mit dem Phosphopeptid pYLKTK, welches von der STAT3-SH2-Bindungsstelle des STAT3-Proteins abgeleitet ist. Weiterführende Untersuchungen des YXXQ-Bindemotivs von STAT3 an verschiedenen Rezeptoren lieferten die Grundlagen für die Erstellung spezifischer Peptidinhibitoren des STAT3-Proteins (Shao *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2006; Shao *et al.*, 2004; Wiederkehr-Adam *et al.*, 2003).

Peptide besitzen zwar *in vitro* eine sehr hohe spezifische Aktivität, haben aber den großen Nachteil, dass sie nur sehr schwer die Zellmembran durchdringen können und im Organismus leicht durch Proteasen abgebaut werden. Daher beschäftigt sich ein Zweig der Organischen Chemie mit der Entwicklung von so genannten Peptidmimetika. Diese haben ähnliche Eigenschaften wie die Peptide, sind aber durch die veränderte chemische Struktur besser zellgängig und weniger angreifbar durch Proteasen. Erste Ansätze in diese Richtung wurden auch für die beiden STAT3-Phosphopeptide publiziert (Coleman *et al.*, 2005; Turkson *et al.*, 2004a).

Chemische Inhibitoren

Die Modulation von Protein-Protein-Interaktionen mit kleinen organischen Molekülen ist, obwohl die Durchführbarkeit durch verschiedene Naturstoffe wie Taxol bereits bewiesen werden konnte, mit einer Reihe von Herausforderungen verbunden (Berg, 2003). Das erste Problem ist die Identifikation einer Leitstruktur. Eine zweite Schwierigkeit stellt die enorm große Fläche der beteiligten Aminosäuren von etwa 1100 Å² bei Protein-Protein-Interaktionen

dar (Conte *et al.*, 1999). Diese Fläche übersteigt bei weitem den Bereich, an den ein kleines organisches Moleküle binden kann. Solche großen Flächen mit organischen Molekülen zu modulieren, die noch dazu die Voraussetzungen haben, um später als oral verabreichte Medikamente zu fungieren (Lipinski *et al.*, 2001), scheint auf den ersten Blick unmöglich. Allerdings konnte gezeigt werden, dass tatsächlich nur einige wenige Aminosäuren der Grenzfläche bei einer Interaktion zwischen zwei Proteinen für den Hauptteil der freien Bindungsenergie verantwortlich sind (Clackson & Wells, 1995). Diese so genannten „hot spots“ freier Bindungsenergie scheinen in nahezu allen Protein-Protein-Interaktionen vorhanden zu sein (Bogan & Thorn, 1998) und sind im Zentrum der Interaktionsfläche auf engem Raum lokalisiert, während sie von energetisch weniger bedeutsamen Aminosäuren umgeben sind. Ein drittes Problem ist, dass die Grenzfläche bei Protein-Protein-Interaktionen meist sehr flach ist und daher keine Bindungsstellen für kleine organische Moleküle aufweisen könnte (Jones & Thornton, 1996; Preissner *et al.*, 1998). Ein durch eine Hochdurchsatz-Analyse gefundener Antagonist der c-Myc/Max-Dimerisierung zeigt jedoch, dass auch Protein-Protein-Interaktionen von Transkriptionsfaktoren durch kleine organische Moleküle inhibiert werden können (Berg *et al.*, 2002).

Auch für den Transkriptionsfaktor STAT3 finden sich in der Literatur mögliche Antagonisten (Abb. 4). Aus Bakterien wurde der Naturstoff Galiellalaktone isoliert (Hautzel *et al.*, 1990), welcher unter anderem die DNA-Bindungsaktivität von STAT3 inhibiert. Es wurde postuliert, dass eine kovalente Bindung zwischen dem Naturstoff und dem Cystein-468 in STAT3 für die Wirkung verantwortlich ist, ein experimenteller Beweis konnte aber nicht erbracht werden (Weidler *et al.*, 2000).

Im Folgenden wurden einige Antagonisten des JAK-STAT3-Signalwegs publiziert, allerdings erfolgt in diesen Fällen vermutlich nur indirekt eine Inhibition von STAT3. So wirkt Natriumarsenat wahrscheinlich durch Inhibition von JAK1 antagonistisch auf den STAT3-Signalweg (Cheng *et al.*, 2004). Kurkumin (Diferuloylmethan) inhibiert die Tyrosinphosphorylierung von STAT3, aber nicht von STAT5 und wirkt wachstumshemmend bei Plasmazytomzellen (Bharti *et al.*, 2003). Zusätzlich wirkt Kurkumin antagonistisch auf eine Reihe anderer Signalwege (Aggarwal *et al.*, 2003). Das Cyclopentanon-Prostaglandin 15d-PGJ₂ vermindert möglicherweise über die JAKs eine Phosphorylierung des Tyrosins von STAT3 und löst Apoptose in SCC Zellen (*squamous cell carcinoma*) aus (Siavash *et al.*, 2004). Indirubin-derivate (Inhaltsstoffe der traditionellen chinesischen Kräutermedizin) (Eisenbrand *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2002) antagonisieren die Aktivierung von STAT3, c-Src

und JAK1 und führen zum programmierten Zelltod in STAT3-abhängigen Zelllinien (Nam *et al.*, 2005). Das Azaspiran Atiprimod, ein entzündungshemmender Wirkstoff, führt ebenfalls zur Inhibition des STAT3-Signalwegs und bewirkt bei Plasmazytomzellen Apoptose und Zellzyklusarrest (Amit-Vazina *et al.*, 2005). Der aus Meeresbakterien isolierte Naturstoff Apratoxin A führt zur Apoptose in U2OS Zellen und wirkt vermutlich über den FGFR-Signalweg inhibierend auf die Tyrosinphosphorylierung von STAT3 (Luesch *et al.*, 2006). Resveratrol ist ein natürlich vorkommendes Phytoalexin mit antioxidativer und entzündungshemmender Wirkung, ist in roten Trauben und Rotwein vorhanden und wird mit dem Schutz vor Herzerkrankungen in Verbindung gebracht (Kopp, 1998). Studien demonstrierten weiterhin eine Wirksamkeit gegen Krebs (Delmas *et al.*, 2006) und kürzlich veröffentlichte Untersuchungen zeigten eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivität von Src und STAT3 (Kotha *et al.*, 2006). In einer zellulären Hochdurchsatz-Analyse, in welcher die Wirkung von Substanzen einer Bibliothek auf die STAT3-Phosphorylierung in NIH3T3 Zellen untersucht wurde, konnte JSI-124 (Cucurbitacin I) aus der Familie der Cucurbitacine (Naturstoffe mit bekannten zytotoxischen Effekten auf Tumorzellen) (Chen *et al.*, 2005) identifiziert werden. JSI-124 ist ein Antagonist der STAT3-Phosphorylierung und führt zur Apoptose und zum verminderten Tumorstadium in Nacktmäusen bei STAT3-abhängigen Zelllinien. Allerdings ist auch in diesem Fall die Phosphorylierung der Kinasen JAK1 und JAK2 ebenfalls verringert, was annehmen lässt, dass die Substanz nicht an STAT3 bindet (Blaskovich *et al.*, 2003). Eine neuere Studie zeigte, dass Cucurbitacin I auch das Zytoskelett gesunder Zellen beeinflussen könnte (Graness *et al.*, 2006). Eine Untersuchung von JSI-124 Derivaten führte zur Identifizierung von Cucurbitacin Q (Sun *et al.*, 2005), einer Verbindung, die die Phosphorylierung von STAT3 inhibiert und ebenfalls Apoptose in STAT3-abhängigen Zelllinien auslöst. Zwar wurde gezeigt, dass die Aktivierung von c-Src und JAK2 nicht beeinflusst wird, aber es fehlt bislang ein experimenteller Beweis, dass Cucurbitacin Q direkt an STAT3 bindet und dadurch die antagonistische Wirkung ausübt.

Platinkomplexe, wie zum Beispiel Cisplatin, sind DNA-interkalierende Substanzen, die häufig als Zytostatika eingesetzt werden, die aber nicht nur auf die schnell proliferierenden Tumorzellen, sondern auch auf die parentalen Körperzellen Einfluss nehmen. Der Platinkomplex CPA-7 verringert die Bindung von STAT1 und STAT3 an die DNA und vermindert so das Wachstum von STAT3-abhängigen Zelllinien (Turkson *et al.*, 2004b). Ein durch eine Hochdurchsatz-Analyse gefundenes Derivat IS3 295 löst Apoptose in STAT3-abhängigen Zelllinien aus, verringert die Wachstumsrate dieser Zellen, verhindert die

Transkription einiger Zielgene von STAT3 und inhibiert das Wachstum von Kolonien in Weichagar (Turkson *et al.*, 2005).

Über ein virtuelles Screening wurde der Inhibitor STA-21 identifiziert, der über die Bindung an die SH2-Domäne von STAT3 dessen Dimerisierung inhibieren soll. Zwar konnte gezeigt werden, dass dieser Antagonist Apoptose in STAT3-abhängigen Zelllinien auslöst und *in vitro* die Dimerisierung und die DNA-Bindungsaktivität von STAT3 verhindert, allerdings konnte auch hier kein experimenteller Beweis erbracht werden, dass STA-21 an die SH2-Domäne von STAT3 bindet (Song *et al.*, 2005).

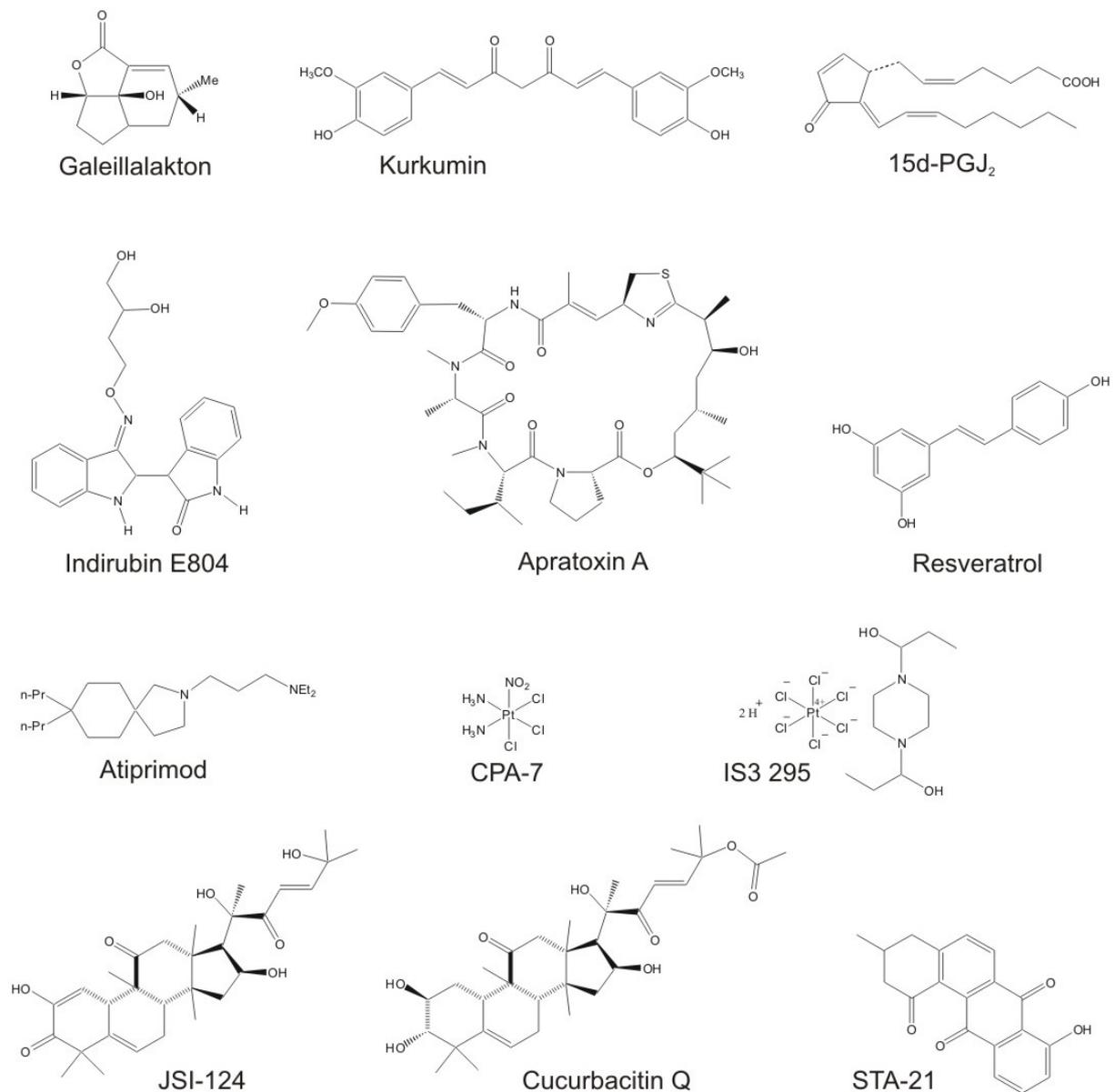


Abb. 4: STAT3-Inhibitoren.

Gezeigt sind die chemischen Strukturen der im Kapitel 1.2.2.2. beschriebenen chemischen Inhibitoren von STAT3 bzw. des STAT3-Signalwegs.

1.3. HTS (*High-throughput screening*)

Außer einem Peptid, welches an die STAT3-SH2-Domäne bindet (Turkson *et al.*, 2001), existierte zu Beginn dieser Arbeit keine Leitstruktur eines direkten STAT3-Inhibitors. Die Suche nach geeigneten Peptidmimetika ist aber oft schwierig. Um ein kleines organisches Molekül zu finden, welches an STAT3 bindet und über diese Bindung spezifisch den STAT3-Signalweg blockiert, muss man mehrere Tausend chemische Verbindungen auf ihre Wirksamkeit hin überprüfen. Für eine Hochdurchsatz-Analyse von chemischen Modulatoren gibt es in der Literatur vielfältige Ansätze.

Zum einen gibt es die Möglichkeit einer *in silico* Untersuchung am Computer, um in chemischen Datenbanken mögliche Leitstrukturen zu finden, die an einen „hot spot“ einer Protein-Protein-Interaktion binden und damit diese modulieren. Zwar erhält man durch diesen Ansatz eine mögliche Vorhersage über die chemische Struktur der Verbindung, allerdings benötigt man für eine solch detaillierte computergestützte Analyse exakte strukturelle Informationen über die Interaktionsfläche der Proteindimere (NMR und Kristallstruktur) und muss die identifizierten Substanzen anschließend synthetisieren bzw. gezielt erwerben und in einer herkömmlichen Hochdurchsatz-Analyse testen (Shoichet, 2004).

Eine zweite Alternative ist die Hochdurchsatz-Analyse von chemischen Substanzbibliotheken in einem *in vitro* Assay oder in einem zellulären System (Berg, 2005). Hier benötigt man zwar kein Vorwissen über die Struktur, aber man braucht eine größere Anzahl chemischer Verbindungen, die analysiert werden. In einem zellulären System beobachtet man die biologischen Effekte einer Testsubstanz und kann wirksame von unwirksamen Substanzen entweder durch einen bestimmten Phänotyp mittels automatisierter Mikroskopie oder durch verschiedene molekularbiologische Experimente voneinander unterscheiden. Zwar erhält man hier bereits die zellgängigen und nichttoxischen Substanzen, allerdings hat die Methode den Nachteil, dass Phänotypen optisch oft schwierig voneinander zu differenzieren sind und die molekularbiologischen Untersuchungen meistens nicht auf ein Hochdurchsatz-Format formatiert werden können. Die größten Nachteile jedoch liegen darin, dass man für die Tests eine größere Menge an Testsubstanz benötigt und dass verschiedene antagonisierte Protein-Protein-Interaktionen zum selben Phänotyp führen können. Die Suche nach dem eigentlichen Zielprotein des Inhibitors gestaltet sich dann häufig aufwendig.

Eine *in vitro* Analyse bietet dabei einige Vorteile gegenüber einem zellulären Ansatz, insbesondere bei einem intrazellulären Zielprotein wie STAT3. Zum einen vereinfacht die Präsenz eines einzigen Zielproteins im Assay die Folgeexperimente nach der Hochdurchsatz-Analyse. Zum anderen kann eine *in vitro* Analyse mit höherer Konzentration der

Testsubstanzen durchgeführt werden, was die Möglichkeit der Identifikation neuer wirksamer Substanzklassen erhöht (Walters & Namchuk, 2003). Natürlich müssen die erhaltenen möglichen Inhibitoren zunächst verifiziert werden und auch in einem zellulären Assay getestet werden, aber dies gestaltet sich einfacher im Vergleich zu einer zellulären Hochdurchsatz-Analyse, da die Anzahl der zu testenden Verbindungen bereits stark eingegrenzt wurden.

1.4. Aufgabenstellung

Das Protein STAT3 galt zu Beginn dieser Arbeit bereits als Onkogen und wurde in Publikationen als mögliches Zielprotein bei der Suche nach Wirkstoffen bei einigen Krebserkrankungen genannt. Tatsächlich wurde diese Hypothese auch im Laufe dieser Arbeit durch vielfältige Publikationen untermauert. Neben einem chemischen Inhibitor des STAT3-Signalwegs (Weidler *et al.*, 2000) und einem peptidischen Inhibitor (Turkson *et al.*, 2001) waren zu dieser Zeit jedoch nur biologische Methoden bekannt, um STAT3 direkt zu inhibieren. Das Peptid bindet an die SH2-Domäne von STAT3 und verhindert so dessen Aktivierung und Dimerisierung. Damit kann STAT3 nicht mehr an DNA binden und es wird das Wachstum von Kolonien in Weichagar verhindert. Dies zeigt, dass auch eine chemische Verbindung, die gezielt an die SH2-Domäne von STAT3 bindet, die Aktivierung und die Dimerisierung des Proteins prinzipiell inhibieren kann. Im Gegensatz zu biologischen Inhibitionsverfahren würde ein chemischer Inhibitor keinen Transfektionsschritt benötigen. Aufgrund der langen Halbwertszeit von STAT3 würde damit auch die zeitliche Kontrolle einer Inhibition vereinfacht.

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein *in vitro* Hochdurchsatz-Verfahren entwickelt werden, mit welchem gezielt Substanzen aus verschiedenen Substanzbibliotheken identifiziert werden könnten, welche die Funktion der STAT3-SH2-Domäne inhibieren. Der nächste Schritt wäre, die gefundenen Substanzen daraufhin zu untersuchen, ob sie spezifisch die Aktivierung und Homodimerisierung von STAT3 antagonisieren. Wurde in diesen Versuchen ein spezifischer STAT3-Inhibitor identifiziert, würden sich *in vitro* Versuche und zelluläre Testsysteme anschließen, um den Inhibitorkandidaten näher zu charakterisieren. Anhand von Derivaten des Antagonisten sollten die für die Reaktion wichtigen Strukturelemente anhand einer Struktur-Wirkungs-Beziehung identifiziert werden, um Rückschlüsse auf den möglichen Reaktionsmechanismus zu gewinnen.

Ein spezifischer chemischer Inhibitor der STAT3-Aktivierung und -Dimerisierung wäre als neues biologisches Werkzeug nutzbar, um die Rolle von STAT3 bei Krebserkrankungen näher zu charakterisieren. Auf der anderen Seite könnte ein solcher Inhibitor auch als mögliche neue Leitstruktur bei der Suche nach Krebstherapeutika dienen.

2. Material und Methoden

2.1. Bezugsquellennachweis

2.1.1. Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Difco, Detroit
Agarose	BRL, Eggenstein
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Bio-Rad, München
ATP (Adenosintriphosphat)	Pharmacia, Freiburg
BES (N,N-Bis(2-Hydroxyl)2-amino-ethansulfonsäure)	Sigma, Taufkirchen
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bisbenzimid	Sigma, Taufkirchen
BOC-Cystein	Fluka, Steinheim
Bradford Reagenz	Biorad, München
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
Chloramphenicol	Calbiochem, Darmstadt
Coomassie G250	Serva, Heidelberg
DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid)	Roche, Mannheim
Desoxynucleotide (dG/A/T/CTP)	Boehringer, Mannheim
DMSO, wasserfrei	Aldrich, Steinheim
Doxorubicin	Sigma, Taufkirchen
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
EGTA (Ethylenglykoltetraessigsäure)	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Geneticin [®] (G418)	Gibco, Eggenstein
GST-Bind-Resin	Novagen, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco, Detroit
HEPES (4-2-Hydroxyethyl-1-piperazin-ethansulfonsäure)	Serva, Heidelberg
His-Bind-Resin	Novagen, Darmstadt
Humaninsulin [®] Normal 40	Lilly, Giessen
Iodnitrotetrazoliumchlorid	Fluka, Steinheim
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Fermentas, St. Leon-Rot
Kanamycin	Gibco, Eggenstein
L-Cystein	Fluka, Steinheim
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
L-Glutathion, oxidiert	Sigma, Taufkirchen
L-Glutathion, reduziert	Sigma, Taufkirchen
L-Lysin	Fluka, Steinheim
L-Serin	Fluka, Steinheim
L-Threonin	Fluka, Steinheim
L-Tyrosin	Fluka, Steinheim

MOPS (3-(N-Morpholino)propan- sulfonsäure	Biomol, Haub
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumdeoxycholat	Sigma, Taufkirchen
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Aldrich, Steinheim
Nonidet-P40	Fluka, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
Poly(dIdC)	Roche, Mannheim
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
SDS (Natriumdoceylsulfat)	Roth, Karlsruhe
SU6656	Calbiochem, Darmstadt
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylendiamin)	Serva, Heidelberg
Tetrazyklin	Sigma, Taufkirchen
Tris (Tris-(hydroxymethyl)aminomethan)	Sigma, Taufkirchen
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween [®] 20 (Polyoxymethylensorbitan Monolaurat)	Sigma, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid	Aldrich, Steinheim

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.2. Enzyme

Klenow-DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot Biolabs, New England
Polynukleotidkinase (PNK) Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot Pharmacia, Freiburg Boehringer, Mannheim Biolabs, New England
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot Boehringer, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
Trypsin	Gibco, Eggenstein

2.1.3. Radiochemikalien

Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham (Braunschweig) bezogen und vor Ablauf der ersten Halbwertszeit eingesetzt.

[γ - ³² P]-dATP	>5000 Ci/mmol
------------------------------------	---------------

2.1.4. „Kits“ und sonstige Materialien

Cryo-Röhrchen	Nunc
ECL Kit	NEN, Brüssel

Filterpapier 3MM	Whatman, USA
Hyperfilm™ MP	Amersham, Braunschweig
Kodak X-omat AR	Kodak, Stuttgart
Kulturgefäße, Plastik	Greiner, Solingen
	Nunclon, Dänemark
	Falcon, U.K.
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce, USA
Nucleopore® Polycarbonat Filter	Whatman, Singapur
Parafilm	Dynatech, Denkendorf
Protein A-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Protein G-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Sterilfilter 0.22 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Sterilfilter 0.45 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA

2.1.5. Wachstumsfaktoren und Liganden

IL-6, human	Pepro Tech, USA
IFN-γ, human	Pepro Tech, USA
EGF, human	Pepro Tech, USA

2.1.6. Medien und Puffer

2.1.6.1. Medium für *E.coli* Bakterien

LB Medium	1,0% Trypton 0,5% Hefeextrakt 1,0% NaCl (pH 7,2)
2xYT Medium	1,6% Trypton 1,0% Hefeextrakt 0,5% NaCl (pH 7,2)

Bei Bedarf wurden dem Medium nach dem Autoklavieren folgende Antibiotika zugesetzt:

Ampicillin	100 mg/mL (in Wasser)
Kanamycin	10 mg/mL (in Wasser)
Chloramphenicol	34 mg/mL (in Ethanol)
Tetrazyklin	12,5 mg/mL (in 50% Ethanol)

Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium 1,5% Agar zugesetzt.

2.1.6.2. Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien sowie alle Zusätze wurden von der Firma Gibco (Eggenstein) bezogen, fötales Kälberserum (FCS) stammten von der Firma Sigma, Taufkirchen.

HepG2	Modified Eagle's Media (MEM) 10% FCS 2 mM L-Glutamin 0,1 mM Nicht-essentielle Aminosäuren 1 mM Natriumpyruvat 1,5 g/L Natriumbicarbonat 100 µg/mL Penicillin/Streptomycin
NIH3T3	Dulbecco's Modified Eagle Media (D-MEM) (4500 mg/L Glukose) 10% FCS 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 100 µg/mL Penicillin/Streptomycin
Phoenix Eco	Dulbecco's Modified Eagle Media (D-MEM) (4500 mg/L Glukose) 10% FCS 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 100 µg/mL Penicillin/Streptomycin
MDA-MB-231	Leibovitz's L15 10% FCS 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 100 µg/mL Penicillin/Streptomycin
MDA-MB-435S	Leibovitz's L15 10% FCS 0,01 mg/mL Insulin, human 2 mM L-Glutamin 100 µg/mL Penicillin/Streptomycin
MDA-MB-453	Leibovitz's L15 10% FCS 2 mM L-Glutamin 100 µg/mL Penicillin/Streptomycin
MDA-MB-468	Leibovitz's L15 10% FCS 2 mM L-Glutamin 100 µg/mL Penicillin/Streptomycin

2.1.7. Stammlösungen und häufig verwendete Puffer

Die im folgenden aufgeführten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

Acrylamidlösung (30/0,8%)	30% (w/v) 0,8% (w/v)	Acrylamid Bisacrylamid
DNA-Auftragspuffer (6x)	0,25% 0,25% 30% 100 mM	Bromphenolblau Xylencyanol Glyzerin EDTA pH 8,0
Laemmli-Puffer (2x)	65 mM 3% 30% 0,01% 5%	Tris/HCl pH 6,8 SDS Glyzerin Bromphenolblau β-Mercaptoethanol
Lyse-Puffer (Stammlösung)	50 mM 150 mM 1 mM 10% 1% 10 mM	Hepes pH 7,5 NaCl EDTA Glyzerin Triton X-100 Tetranatriumpyrophosphat
NET (10x)	150 mM 5 mM 50 mM 0,05%	NaCl EDTA Tris Triton X-100 pH 7,4 (HCl)
Paraformaldehyd (3,7%)	60 mM 55 mM 20 mM 16,4 mM 3,7%	PIPES HEPES EGTA MgSO ₄ Paraformaldehyd pH 7,0 (KOH)
PBS	13,7 mM 2,7 mM 80,9 mM 1,5 mM	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ pH 7,4 (HCl)
4x Sammelgelpuffer	0,5 M 0,4 %	Tris/HCl pH 6,8 SDS
SD-Transblot	50 mM 40 mM 20% 0,004%	Tris/HCl pH 7,5 Glycin Methanol SDS

Strip-Puffer	65 mM 2% 0,68%	Tris/HCl pH 6,8 SDS β-Mercaptoethanol
TAE (10x)	400 mM 10 mM pH 8,0 (Eisessig)	Tris/Acetat EDTA
TBE (10x)	890 mM 890 mM 20 mM	Tris Borsäure EDTA pH 8,0
TE (10:0,1)	10,0 mM 1,0 mM	Tris/HCl pH 8,0 EDTA pH 8,0
4x Trenngelpuffer	1,5 M 0,4%	Tris/HCl pH 8,8 SDS
Tris-Glycin-SDS (10x)	248 mM 1,918 M 1,0%	Tris/HCl pH 7,5 Glycin SDS

2.1.8. Bakterienstämme (*E. coli*)

	Eigenschaften	Referenz
DH5α	F ⁺ /end A1 hsd17 (r _k ⁻ m _k ⁻), supE44, recA1, gyrA (Nal ¹), thi-1, (lacZYA-argF), Amp ^R	Stratagene
Rosetta (DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) pRARE2 ⁷ (Cam ^R)	Novagen
TKB1	B F ⁻ dcm ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) gal 1 (DE3) [pTK Tet ^R]	Stratagene

2.1.9. Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Referenz
HepG2	<i>Homo sapiens</i> (Mensch), hepatokarzinomale Epithelzellen	ATCC HB-8065
NIH3T3	<i>Mus musculus</i> (Maus), embryonale Fibroblasten	ATCC CRL-1658
NIH3T3/v-Src	<i>Mus musculus</i> (Maus), embryonale Fibroblasten, stabil infiziert mit pLXSN-v-Src	d. AG
NIH3T3/h-Ras	<i>Mus musculus</i> (Maus), embryonale Fibroblasten, stabil infiziert mit pLXSN-h-Ras	d. AG
NIH3T3/pLXSN	<i>Mus musculus</i> (Maus), embryonale Fibroblasten, stabil infiziert mit pLXSN	d. AG
Phoenix Eco	Packungszelllinie für die Produktion von ecotropischen Retroviren	Nolan, Stanford
MDA-MB-231	<i>Homo sapiens</i> (Mensch), Brust-Adenokarzinom	ATCC HTB-26
MDA-MB-435S	<i>Homo sapiens</i> (Mensch), Brustdrüsenkarzinom	ATCC HTB-29
MDA-MB-453	<i>Homo sapiens</i> (Mensch), Brustkarzinom metastatisch	ATCC HTB-131
MDA-MB-468	<i>Homo sapiens</i> (Mensch), Brust-Adenokarzinom	ATCC HTB-132

2.1.10 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden als primäre Antikörper eingesetzt.

Antikörper	Eigenschaften	Referenz
α STAT3 (pTyr705)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
α STAT1 (pTyr701)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
α STAT1	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
α Src (pTyr416)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
α JAK2 (pTyr1007/pTyr1008)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
α p44/p42 MAP kinase (pThr202/pTyr204)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
α JNK (pThr183/pTyr185)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
α Akt (pSer473)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
α JAK1 (pTyr1022/pTyr1023)	Kaninchen, polyklonal	BioSource
α STAT3	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
α Src	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
α JNK1	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
α ERK1/2	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
α Akt1/2	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
α H-ras	Ratte, monoklonal	Santa Cruz
α JAK2	Kaninchen, polyklonal	Upstate
α JAK1	Maus, monoklonal	BD Biosciences
α STAT1	Maus, monoklonal	BD Biosciences
α RCC1	Maus, monoklonal	BD Biosciences
α Actin	Kaninchen, polyklonal	Sigma
α Tubulin	Maus, monoklonal	Sigma

Die bei der Immundetektion von Proteinen verwendeten sekundären Antikörper waren mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert.

Antikörper	Verdünnung	Referenz
Ziege gegen Maus	1 : 7500	DakoCytomation
Ziege gegen Kaninchen	1 : 7500	DakoCytomation

Die bei der Immunofluoreszenz verwendeten sekundären Antikörper waren wie folgt konjugiert:

Antikörper	Verdünnung	Referenz
Alexa Fluor 488 Ziege gegen Kaninchen	1 : 1000	MolecularProbes
Alexa Fluor 546 Ziege gegen Maus IgG ₁	1 : 1000	MolecularProbes

2.1.11 Plasmide und Oligonukleotide

2.1.11.1. Ausgangsvektoren

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pcDNA3	Expressionsvektor, Amp ^r , CMV Promotor, BGH poly A, hohe Kopienzahl	Invitrogen, USA
pLXSN	Retroviraler Expressionsvektor, Amp ^r , Neo ^r , ori aus pBR322, 5'-LTR und 3'-LTR aus MoMuLV, SV40 Promotor	Clontech Laboratories
pET28a	Proteinexpressionsvektor, Kan ^r , ori aus pBR322, His Tag, T7 Promotor	Novagen
TAP-tag-F/A	Modifizierter Proteinexpressionsvektor, Amp ^r , Kombination zwischen pMAL-Tev2 und pQE70, N-term. MBP tag, C-term. His tag, Schnittstellen für FseI und AscI	Dr. Mayer, Martinsried
pLXSN ESK/EKS	pLXSN Vektor mit einer modifizierten MCS	J. Ruhe, diese AG
pET32a STAT3 β TC	cDNA von STAT3 β (Aminosäuren 127-722), Maus	Dr. Mueller, Grenoble, Frankreich
pET20b STAT1	cDNA von STAT1-T-flag, full length, Mensch	Dr. Heim, Basel, Schweiz
pcDNA3 h-Ras	cDNA von h-Ras G12V, full length	Dr. Biesinger, diese AG
pBaseHygro v-Src	cDNA von v-Src, full length	Prof. Martin Berkeley, CA, USA

2.1.11.2. Spezifizierte Vektoren

Verwendete Vektoren für FRET:

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pET28a STAT3 – 468 CFP	cDNA von STAT3 β , Maus Aminosäuren 468 bis 722, N-term. CFP	diese AG
pET28a STAT3 – 468 YFP	cDNA von STAT3 β , Maus Aminosäuren 468 bis 722, N-term. YFP	diese AG
pET28a STAT3 – 573 CFP	cDNA von STAT3 β , Maus Aminosäuren 573 bis 722, N-term. CFP	diese AG
pET28a STAT3 – 573 YFP	cDNA von STAT3 β , Maus Aminosäuren 573 bis 722, N-term. YFP	diese AG
pET28a STAT3 – 575 CFP	cDNA von STAT3 β , Maus Aminosäuren 575 bis 722, N-term. CFP	diese AG
pET28a STAT3 – 575 YFP	cDNA von STAT3 β , Maus Aminosäuren 575 bis 722, N-term. YFP	diese AG

Verwendete Vektoren für FP-Assays:

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pET28a STAT3 β TC-VSV	cDNA von STAT3 β , Maus, Aminosäuren 127 bis 722, N-term. 2x VSV tag und poly-His tag	diese AG
pET 28a STAT1 T-flag	cDNA von STAT1, Mensch, Aminosäuren 135 bis 712, N-term. poly-His tag, C-term. T-flag tag	diese AG
TAP-tag-F/A STAT5b	cDNA von STAT5b, Mensch, Aminosäuren 136 bis 704, N-term. MBP tag, C-term. poly-His tag	diese AG
gPGEX LckSH2	cDNA von Lck, Mensch, Aminosäuren 121-226, N-term. GST tag	Dr. Biesinger, Erlangen

Verwendete Vektoren für die Infektion von NIH3T3 Zellen:

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pLXSN v-Src	cDNA von v-Src, full length	diese AG
pLXSN h-Ras	cDNA von Ras G12V, Mensch, full length	diese AG

2.1.11.3. Wichtige Oligonukleotide

STAT468-, „sense“ Oligomer

5'-ATCAGTCCGGAAACATCTGTCAGATGCCAAATGC-3'

STAT573-, „sense“ Oligomer

5'-ATCAGTCCGGACTTGTGAAAAAGTACATCCTGG-3'

STAT575-, „sense“ Oligomer

5'-TTCAGTCCGGAAAAAGTACATCCTGGCCCTTTG-3'

STAT722-, „antisense“ Oligomer

5'-CCGGAATTCGCGGCCGCTTAAATGGTATTGCTGCAGGTCGTTG-3'

Zur Klonierung der FRET-Konstrukte STAT3 – 468/573/575 CFP/YFP

VSVNdeF-, „sense“ Oligomer

5'-TATGTACACCGACATCGAAATGAACCGTCTGGGTAAATACACCGACATCGAAA

TGAACCGTCTGGGTAAACA-3'

VSVNdeR-, „antisense“ Oligomer

5'-TATGTTTTACCCAGACGGTTCATTTTCGATGTCGGTGTATTTACCCAGACGGTTCA

TTTCGATGTCGGTGTACA-3'

Zur Klonierung von STAT3 βTC-VSV (pET28a)

STATM480F Oligomer

5'-GGTATAACATGCTGACCAATAACC-3'

STATM280F Oligomer

5'-CAAATTAAGAACTGGAGGAGCTG-3'

Zur Sequenzierung von STAT3

STAT5b136Fwd-, „sense“ Oligomer

5'-ATTGGCCGGCCCATGTCCCAGAAACACCTCCAGATC-3'

STAT5b741Rev2-, „antisense“ Oligomer

5'-ATTGGCGCGCCGGGTTCTGTGGGTACATGTTATAG-3'

Zur Klonierung von STAT5b (TAP-tag-F/A) aus cDNA (isoliert aus MDA-MB-435S)

hSIEF-, „sense“ Oligomer

5'-AGCTTCATTTCCCGTAAATCCCTA-3'

HSIER-, „antisense“ Oligomer

5'-TAGGGATTTACGGGAAATGAAGCT-3'

hSIE-Mut-F-, „sense“ Oligomer

5'-AGCTTCATTTCCCTTAAATCCCTA-3'

hSIE-Mut-R-, „antisense“ Oligomer

5'-TAGGGATTTAAGGGAAATGAAGCT-3'

Für die EMSA-Analysen

MycMax-, „sense“ Oligomer

5'-Texas red-CACGTGCTGCTGGG-3'

MycMax-, „antisense“ Oligomer

5'-CCCAGACCACGTG-3'

JunJun-, „sense“ Oligomer

5'-Texas red-ATGACTCATATCGGTCC-3'

JunJun-, „antisense“ Oligomer

5'-GGACCGATATGAGTCAT-3'

Für die FP-Assays

2.1.12 Peptide

Alle verwendeten Peptide wurden unter Benutzung von 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (FMoc) Schutzgruppenchemie durch Dr. F. Freundenmann (MPI Biochemie, Martinsried) und Peptide Speciality Laboratories (Heidelberg) synthetisiert und aufgereinigt. Eine Kopplung an 5-Carboxyfluorescein wurde über NHS-Ester realisiert. Alle Peptide wurden vor der Verwendung mittels HPLC (*high pressure liquid chromatography*) und Massenspektrometrie analysiert.

Peptid	Verwendung
5-Carboxyfluorescein-PpYLKTKFI	FP-Assay
5-Carboxyfluorescein-GpYLKTKF	FP-Assay
5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH ₂	FP-Assay (STAT3)
5-Carboxyfluorescein-GpYDKPHVL	FP-Assay (STAT1)
5-Carboxyfluorescein-GpYLVLDWK	FP-Assay (STAT5b)
5-Carboxyfluorescein-GpYEEIP	FP-Assay (Lck)
GpYEEIP	FP-Assay
PGSAAPpYLKTKFI-OH	FP-Assay
PpYLKTK-OH	FP-Assay
pYLPQTV-NH ₂	FP-Assay
Ac-pYLPQTV-NH ₂	FP-Assay, EMSA
GpYDKPHVL	EMSA

2.1.13 Rekombinante Proteine

Protein	Referenz
STAT3 468 CFP (A.S. 468-722)	diese AG
STAT3 468 YFP (A.S. 468-722)	diese AG
STAT3 573 CFP (A.S. 573-722)	diese AG
STAT3 573 YFP (A.S. 573-722)	diese AG
STAT3 575 CFP (A.S. 575-722)	diese AG
STAT3 575 YFP (A.S. 575-722)	diese AG
STAT3 β TC VSV (A.S. 127-722)	diese AG
STAT1 T-flag (A.S. 135-712)	diese AG
STAT5b (A.S. 136-704)	diese AG
Lck (A.S. 121-226)	diese AG
c-Myc	A. Kiessling, diese AG
Max	A. Kiessling, diese AG
c-Jun	A. Kiessling, diese AG

2.1.14 Chemische Testsubstanzen

Für die Hochdurchsatz-Analyse zur Identifikation von Inhibitoren der Aktivierung und der Homodimerisierung von STAT3 wurden 8.298 Substanzen von Chemical Diversity und 9.000 Substanzen von Maybridge untersucht. Weiterhin wurden 1.000 Verbindungen einer Analyticon Naturstoffbibliothek und 4.163 Substanzen aus zur Verfügung gestellten Bibliotheken vom Hans-Knöll-Institut (Jena) und vom Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie (Dortmund) analysiert.

Speziell untersuchte Testsubstanzen:

Bezeichnung	ID	Referenz
Stattic	MWP00043	Maybridge
2	MWP00044	Maybridge
3	MWP00042	Maybridge
4	TB50	Dr. Berg, diese AG

Die Synthese von Verbindung **4** wurde von Dr. Berg durchgeführt:

10 mg (4,7 μmol) Stattic wurden in 4 mL einer 1:1 Mischung von t-BuOH und trockenem THF gelöst. Die Lösung wurde mit Wasserstoff gesättigt. 120 mg Wilkinson-Katalysator wurde zugegeben und zusätzlicher Wasserstoff durch die Suspension geblasen. Nach 45 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung durch neutrales Al_2O_3 gefiltert und mit THF/t-BuOH (1:1) gewaschen. Nach dem Zusatz von einer gesättigten NH_4Cl Lösung wurde die organische Phase mit Diethylether extrahiert. Das organische Lösungsmittel wurde abgezogen, und das Produkt wurde mittels SiO_2 Chromatographie (Ethylacetat/Pentan) isoliert. Die Ausbeute betrug 10%.

Alle speziell untersuchte Testsubstanzen wurden vor ihrer Verwendung mittels Massenspektrometrie und NMR analysiert.

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Plasmidpräparation für analytische Zwecke

Für analytische Zwecke wurden geringe Mengen von DNA aus 2 mL *E. coli* Kultur mittels des QIAGEN Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.2. Plasmidpräparation für präparative Zwecke

Falls größere und reinere DNA Mengen benötigt wurden, wurde deren Aufreinigung mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.3. Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nucleinsäuren wurde in einem Spektralphotometer bei der Wellenlänge $\lambda = 260$ nm verwendet. Um Verunreinigungen mit Proteinen abzuschätzen, bestimmt man den Quotienten OD_{260}/OD_{280} , welcher für reine DNA etwa 1,8 beträgt. Die Messungen wurden in einem NanoDrop UV-Vis Spektrometer nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.4. Enzymatische Behandlung von DNA

2.2.4.1. Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen

Alle Restriktionen erfolgten mit Typ II Restriktionsendonukleasen, welche meist Tetra-, Penta- oder Hexanukleotidsequenzen mit palindromischer Struktur erkennen. Diese Enzyme schneiden die DNA innerhalb der Erkennungsregion im Gegensatz zu Typ III Restriktionsendonukleasen, bei welchen die Erkennungssequenz und die Schnittstelle nicht identisch sind. Man kann entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder überhängende (*sticky ends*) 3' oder 5' Enden erzeugen.

Der Verdau erfolgte stets mit den vom Hersteller empfohlenen Inkubationspuffern über mindestens 2 Stunden beim Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms (in der Regel 37 °C).

2.2.4.2. Dephosphoylierung von 5'-Enden

Die Religation von Vektoren mit kompatiblen Ende wurde durch Dephosphorylierung ihrer 5'-Enden verhindert. 1-4 µg geschnittene DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 10-20 µl in 1x Phosphatasepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,5) nach Zugabe von 1 µl alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (1 E) für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die dephosphoylierte DNA über ein Agarosegel (ca. 1% Agarose) aufgereinigt und eluiert.

2.2.4.3. Auffüllen überhängender 5'-Enden mit Klenow-Polymerase

Die Klenow (DNA Polymerase I, großes Fragment) kann zum Auffüllen von 5'-Überhängen verwendet werden, um nach Restriktionsverdau glatte Enden (*blunt ends*) für eine anschließende Ligation zu erhalten.

Nach dem Restriktionsverdau, bei dem durch passend gewählte Restriktionsenzyme 5'-Überhänge gebildet wurden, wurde der 60 µl Ansatz (3 µg DNA) mittels Qiagen-Säulen (QIAquick™ PCR Purification Kit) gereinigt und mit 32 µl H₂O eluiert. Zum Eluat wurden 4 µl 10x Klenow Puffer, 0,1 mg/ml BSA, 40 µM dNTPs und 3 Units Klenow-Polymerase (1 U pro µg DNA) zugegeben. Der Gesamtansatz (40 µl) wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 75°C hitzeinaktiviert.

Nach Reinigung des Ansatzes über eine Gelelektrophorese mit anschließender Isolierung der DNA aus dem Agarosegel wurde diese für eine *blunt end*-Ligation verwendet.

2.2.4.4. Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Bei der Ligation katalysiert T4-DNA Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende von Polynukleotiden. 20 bis 100 ng geschnittene Vektor-DNA wurden mit einem 2-5fachen Überschuss des zu klonierenden DNA-Fragments, 1 ml 10x T4-DNA-Ligasepuffer (0,66 M Tris/HCl pH 7,5, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 10 mM ATP) und 1 ml T4-DNA-Ligase (1 E) versetzt (Gesamtvolumen 10 µl) und über Nacht bei 15°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend zur Transformation von Bakterien verwendet. Überschüssiger Ligationsansatz wurde bei -20°C gelagert.

2.2.4.5. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten für EMSA

Die einzelsträngigen „sense“ und „antsense“ Oligonukleotide, die für den EMSA verwendet wurden, wurden vor der radioaktiven Markierung zunächst in einem Puffer bestehend aus 10 mM Tris, pH 8.0 und 100 µM EDTA 10 Minuten bei 95°C inkubiert und langsam auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Die dimerisierten doppelsträngigen Oligonukleotide wurden nun mittels Polynukleotidkinase radioaktiv markiert. Dazu wurden 25 pmol der doppelsträngigen DNA-Moleküle 15 Minuten mit 150 µCi [γ -³²P]dATP und 50U T4 Polynukleotidkinase (Fermentas) inkubiert, anschließend mit 25 mM EDTA versetzt und weitere 10 Minuten bei 75°C behandelt, um die Kinase zu inaktivieren. Die radioaktiv markierten Oligonukleotide wurden mittels Quick Spin DNA Columns (Roche) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und nach dem Messen der Aktivität an einem Szintillationszähler auf 50.000 cpm verdünnt.

2.2.5. Gelelektrophorese von DNA

Doppelsträngige DNA-Moleküle im Größenbereich von 250 bp bis 14 kb wurden in 0.6 bis 2%igen horizontalen Agarosegelen aufgetrennt, die mit Ethidiumbromid versetzt waren. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Vol 6x DNA-Auftragspuffer versetzt. Als Größenmarker wurde die 1 kb DNA Leiter von Gibco (Smart Ladder) aufgetragen, mit dessen Hilfe die Größe der linearisierten DNA Fragmente ermittelt werden konnte. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 30-120 Volt innerhalb von 1-2 Stunden. Die DNA Banden wurden auf einem Transilluminator (UVP) mittels der Ethidiumbromid-Fluoreszenz unter UV-Licht ($\lambda = 302$ nm) sichtbar gemacht und unter Verwendung eines Orangefilters fotografiert (Polaroid 667). Durch Exposition der DNA im UV-Licht bestand jedoch die Gefahr des so genannten „Photoknicks“, wobei es zu chemischen Veränderungen der Nukleotide kommt. Um Mutationen der DNA durch das UV-Licht zu verhindern, wurde DNA, die in weiteren Experimenten verwendet wurde, mit Hilfe eines Darkreaders (Clare Chemical Research) sichtbar gemacht. Dieses Gerät sendet Licht mit

einer Wellenlänge von 460 nm aus und hat somit eine geringere denaturierende Wirkung auf die DNA.

2.2.6. Isolierung von DNA-Fragmenten

Die zu isolierenden Banden wurden mit Hilfe eines Darkreaders (Clare Chemical Research) mit einem sterilem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch die Verwendung des „QIAquick™ Gel Extraktion Kits“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

2.2.7. Arbeiten mit kompetenten Bakterien

2.2.7.1. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien (DH5α)

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien wurde die Methode von Chung und Miller (Chung and Miller, 1993) verwendet. Die Transformationseffizienz war größer als 5×10^6 Klone/ μg DNA.

2.2.7.2. Transformation von kompetenten *E. coli* Bakterien (DH5α)

Zur Transformation von DH5α wurden 3 μl des entsprechenden Ligationsansatzes (100 ng DNA) verwendet. Zu der DNA wurden 50 μl kompetente, auf Eis aufgetaute Bakterien pipettiert und dieser Ansatz wurde anschließend 30 Minuten auf Eis, 45 Sekunden bei 42°C und zwei Minuten auf Eis inkubiert, dann mit 500 μl LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Nach Zentrifugation und Aufnahme des Pellets in 50 μl LB-Medium wurden die Reaktionsansätze auf Agarplatten, welche mit den benötigten Antibiotika versehen waren, ausplattiert.

2.2.7.3. Transformation von kompetenten *E. coli* Bakterien (Rosetta)

Zur Transformation von Rosetta wurden 1-10 ng DNA verwendet. Zu der DNA wurden 9 μl kompetente, auf Eis aufgetaute Bakterien pipettiert und dieser Ansatz wurde anschließend 5 Minuten auf Eis, 30 Sekunden bei 42°C und zwei Minuten auf Eis inkubiert, dann mit 50 μl LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Reaktionsansätze auf Agarplatten, welche mit den benötigten Antibiotika versehen waren, ausplattiert.

2.2.7.4. Transformation von kompetenten *E. coli* Bakterien (TKB1)

Zur Transformation von TKB1 wurden 1-10 ng DNA verwendet. Die Transformation erfolgte nach Angaben des Herstellers (Novagen).

2.2.7.5. Dauerkultur von *E. coli*-Bakterien

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden jeweils 750 μL einer stationären Bakterienkultur (LB-Medium mit Antibiotikazusatz) mit 500 μL einer 50%-igen Glycerinlösung versetzt, kurz

gemischt und bei -80°C gelagert.

2.2.8. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion bietet die Möglichkeit, einen DNA Bereich zwischen zwei bekannten Regionen *in vitro* zu amplifizieren. In einem sich ständig wiederholenden Zyklus aus Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Oligomere an den Matrizen-Strang und Synthese des komplementären Stranges durch Verlängerung der Oligomere wird der zwischen den Oligonukleotiden liegende Sequenzbereich exponentiell amplifiziert.

Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Grundschemata in einem Reaktionsvolumen von $50\ \mu\text{l}$ angesetzt:

1 μl Matrizen-DNA (30 ng/ μl)
 1 μl *sense* 3'-Oligomer, 10 pmol
 1 μl *antisense* 5'-Oligomer, 10 pmol
 5 μl 10x LA Taq Polymerase Puffer
 (20 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 mM KCl, 20mM DTT, 0,1 mM
 EDTA, 0,5% Nonidet P40 (v/v), 0,5% Tween 20 (v/v))
 8 μl dNTP-Mix, 2,5 mM (dGTP, dATP, dTTP, dCTP)
 0,5 μl LA Taq-Polymerase (0,1-0,5 E)
 ad 50 μl H₂O

Dabei wurde folgendes PCR-Synthese-Programm verwendet:

	3 min 94°C	(1. Denaturierung)
Amplifikation	1 min 94°C	(Denaturierung)
25-35 Zyklen	1 min X $^{\circ}\text{C}$	(Hybridisierung)
	x min 72°C	(Synthese)
	5 min 72°C	(Abschluß-Synthese)
	abkühlen auf 4°C	

Nach Beendigung der Synthese das Produkt über Gelelektrophorese aufgereinigt.

2.2.9. Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten automatisiert mittels eines ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) gemäß der Kettenabbruchmethode (Sanger). Die zu sequenzierende DNA wurde hierfür einer vorausgehenden PCR nach folgendem „ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencer“-Protokoll unterzogen wurde:

Reaktionsansatz:

4,0 μl Terminator Ready Reaction Mix (TRR)
 0,5 μg dsDNA
 5,0 pm Primer
 ad 20,0 μl H₂O

PCR-Programm:

25 Zyklen 30 sec 96°C (Denaturierung)
 15 sec 45-60°C (Hybridisierung)
 4 min 60°C (Synthese)
 abkühlen auf 4°C

Anschließend wurde die amplifizierte DNA durch Zugabe von 80 ml H₂O und 250 ml Ethanol (absolut) gefällt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die DNA bei 13000 rpm für 20 Minuten in einer Tischzentrifuge pelletiert, das Pellet in 250 ml Ethanol (75%) gewaschen und erneut durch 5-minütige Zentrifugation pelletiert. Daraufhin wurde der Überstand mit einer Kanüle abgezogen, und das Pellet für eine Minute bei 90°C im Heizblock getrocknet. Das Pellet wurde daraufhin in 20 ml Wasser (HPLC gereinigt) aufgenommen und von dieser Lösung wurden 4 ml in 16 ml Wasser (HPLC gereinigt) in ein Sequenziergefäß verdünnt, welches vorsichtig mit einem Septum verschlossen wurde. Die so präparierte DNA wurde dann bis zur Sequenzierung bei -20°C aufbewahrt und direkt vor der Sequenzierung für 2 Minuten bei 90°C inkubiert.

2.2.9. Rekombinante Proteinexpression

2.2.9.1. Proteinexpression aus *E. coli* (Rosetta)

Mit jeweils einem Klon einer Agarplatte wurde eine Übernachtskultur (LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum) angeimpft. Die Vorkultur wurde am nächsten Morgen 1:50 bis 1:100 in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum verdünnt und die Bakterien bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Bei OD₆₀₀ = 0,3 wurden die Bakterien bei Raumtemperatur so lange weitergeschüttelt, bis der OD₆₀₀ Wert 0,6 erreicht hatte. Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) ist ein künstlicher Induktor des Lactose-Operons bei *Escherichia coli*. Mit 1 mM IPTG wurde die Proteinexpression 5 Stunden lang bei Raumtemperatur induziert und die Zellen anschließend abzentrifugiert (3.500 rpm, 15 Minuten, 4°C). Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde der Zellhaufen bei -80°C gelagert und konnte anschließend aufgeschlossen und das Protein aufgereinigt werden.

2.2.9.2. Proteinexpression aus *E. coli* (TKB1)

Mit jeweils einem Klon einer Agarplatte wurde eine Übernachtskultur (LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum) angeimpft. Die Vorkultur wurde am nächsten Morgen 1:50 bis 1:100 in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum verdünnt und die Bakterien bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Bei OD₆₀₀ = 0,3 wurden die Bakterien bei Raumtemperatur so lange weitergeschüttelt, bis der OD₆₀₀ Wert 0,6 erreicht hatte. Mit 1 mM IPTG wurde die Proteinexpression 5 Stunden lang bei Raumtemperatur induziert und die Zellen anschließend abzentrifugiert (3.500 rpm, 15 Minuten, 4°C). Nun erfolgte die Induktion der Tyrosinkinase nach Angaben des Herstellers und die Zellen wurden danach nochmals abzentrifugiert (3.500 rpm, 15 Minuten, 4°C). Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde der Zellhaufen bei -80°C gelagert und konnte anschließend aufgeschlossen und das Protein aufgereinigt werden.

2.2.9.3. Aufreinigung der Proteine

Die Bakterienzellen der STAT-Proteine wurden in einem Imidazolpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,9, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol) resuspendiert und mit jeweils 10 μ M PMSF und 100 ng/mL Aprotinin versetzt. Die Suspension wurde 5-10 mal für jeweils 2 Minuten auf Eis sonifiziert (Standardeinstellung für Intensität, 70%/30%). Nach dem Zellaufschluß wurde die Suspension abzentrifugiert (19.000 rpm, 20 Minuten, 4°C) und der Überstand jeweils durch einen 45 μ m Filter (Nalgene, Rochester, USA) sterilfiltriert. Die Aufreinigung der STAT-Proteine erfolgte über Schwerkraftsäulen (Novagen) mit dem „His Bind Resin“ (Novagen) nach Angaben des Herstellers. Die Proteine binden über ihre Poly-His Markierung an Nickelkationen, welche auf der Säule am „His Bind Resin“ immobilisiert wurden. Nachdem ungebundene Proteine gewaschen sind, kann das Zielprotein durch Elution mit einem Imidazolpuffer aus der Säule eluiert werden. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem Elutionspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,9, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 10 μ M PMSF, 100 ng/mL Aprotinin), anschließend wurde das Protein gegen einen Dialysepuffer dialysiert (100 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 10% Glycerin, 0,1% Nonidet-P40). Die gereinigten Proteine wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Bakterienzellen des Lck-Proteins wurden in einem STE Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1mM EDTA) resuspendiert und mit jeweils 10 μ M PMSF und 100 ng/mL Aprotinin versetzt. Die Suspension wurde 5-10 mal für jeweils 2 Minuten auf Eis sonifiziert (Standardeinstellung für Intensität, 70%/30%). Nach dem Zellaufschluß wurde die Suspension abzentrifugiert (19.000 rpm, 20 Minuten, 4°C) und der Überstand jeweils durch einen 45 μ m Filter (Nalgene, Rochester, USA) sterilfiltriert. Die Aufreinigung erfolgte über Schwerkraftsäulen (Novagen) mit dem „GST-BindTM Resin“ (Novagen) nach Angaben des Herstellers. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem Elutionspuffer (75 mM HEPES, PH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 10 mM Glutathion (reduziert), 10 μ M PMSF, 100 ng/mL Aprotinin), anschließend wurde das Protein gegen einen Dialysepuffer dialysiert (100 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 10% Glycerin, 0,1% Nonidet-P40). Die gereinigten Proteine wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Reinheit der Proteine wurde mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft.

2.3. Biophysikalische Meßmethoden

2.3.1. Fluoreszenzpolarisation (FP)

Fluoreszenzpolarisation (FP) wurde dazu benutzt, die Affinität der Testsubstanzen zur SH2-Domäne der verwendeten Proteine zu testen. Ein Fluorophor-markiertes Peptid, welches an die SH2-Domäne des jeweiligen Proteins bindet, konkurriert mit der jeweiligen Testsubstanz. Mit Hilfe von FP konnte analysiert werden, welcher Anteil der Peptide nicht mehr an das Protein gebunden waren und somit ermittelt werden, zu welchem prozentualen Anteil diese Bindung durch die jeweiligen Testsubstanzen verhindert werden konnte.

Die Experimente wurden mittels eines Ultra Evolution 384 Lochplatten-Leser (Tecan) durchgeführt. Falls nicht anders im Text aufgeführt, wurde stets unter denselben Pufferbedingungen (50 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1% Nonidet-P40, 2 mM Dithiothreitol, 10% DMSO) gearbeitet. Die Fluoreszenz-markierten Phosphopeptide wurden bei einer Konzentration von 10 nM eingesetzt. Die Experimente wurden in

unbehandelten schwarzen 384 Lochplatten (Corning) durchgeführt. Die eingesetzte Proteinkonzentration richtete sich nach den jeweiligen K_d Werten, die den Bindungskurven entnommen wurden. Bei Raumtemperatur und 30°C wurden 150 nM STAT3, 60 nM STAT1, 150 nM STAT5 und 30 nM Lck eingesetzt. Bei 37°C wurden 370 nM STAT3 und 100 nM Lck verwendet.

Für die c-Myc/Max und Jun/Jun Dimerisierungsuntersuchungen wurden 50 nM Jun/Jun Dimere und 30 nM c-Myc/Max Dimere benutzt. Es wurde derselbe Puffer für beide Proteine verwendet (60 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 9 mM MgCl₂, 3 mM EDTA, 10% DMSO und 0,1% Nonidet-P40). Als Fluoreszenzprobe wurde 3 nM der Texasrot-markierten Oligonukleotide EBox-TR bzw. TRE-TR eingesetzt. Die Inkubation und Messung der Fluoreszenzpolarisation erfolgte analog der STAT-Proteine bei 37°C.

Nach dem Mischen der Testsubstanzen (aus einer 20x Konzentration in DMSO gelöst) mit dem entsprechenden Protein in Eppendorfgläsern wurden die Reaktionslösungen für 10-60 Minuten bei Raumtemperatur, bei 30°C oder bei 37°C inkubiert. Dabei wurden die gelösten Fluoropeptide erst nach der ersten Inkubationszeit den Eppendorfgläsern zugegeben. In Dublikaten zu jeweils 20 µL wurde die Reaktionsmischung anschließend in die schwarzen Mikrotiterplatten pipettiert, für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Fluoreszenzpolarisation und die Totalintensität gemessen.

Die Bindungskurven wurden mit dem Computerprogramm SigmaBlot (SPSS Science Software GmbH, Deutschland) angepasst und ausgewertet. Über die Bindungskurven wurden bei Inhibitionskurven die Fluoreszenzpolarisationswerte in eine entsprechende Proteinkonzentration umgerechnet. Ein Vergleich der Proteinkonzentrationen lieferte die durch die jeweilige Testsubstanz induzierte prozentuale Inhibition der Bindung des markierten Peptids an die SH2-Domäne des Proteins.

2.3.2. HTS (*High-Throughput-Screening*)

Die Testsubstanzen der Substanzbibliotheken wurden mittels Fluoreszenzpolarisation auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Bindung des Fluorophor-markierten Peptids an die SH2-Domäne des Proteins zu inhibieren. Das Screenen der Platten wurde bei Raumtemperatur durchgeführt (25°C bis 30°C). Die Zusammensetzung des Puffers war identisch für alle Untersuchungen mit Fluoreszenzpolarisation (10 mM HEPES, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 % Nonidet P-40, 50 mM NaCl, 10% DMSO). Alle Fluorophor-markierten Peptide wurden bei der Endkonzentration von 10 nM verwendet. Die Konzentration von STAT3 richtete sich nach dem K_d Wert des Proteins, daher wurde STAT3 bei einer Endkonzentration von 150 nM verwendet.

Die Testsubstanzen waren in DMSO gelöst und 384 Lochplatten formatiert. Gelagert wurden die Bibliotheken bei -40°C und wurden vor ihrer Verwendung im Trockenschrank bei Raumtemperatur aufgetaut. Unter Verwendung des Beckman FX Roboters (Beckman Coulter) und entsprechenden Spitzen (Nerb) wurden 20 µL Proteinlösung in 384 Lochplatten (Corning) vorgelegt. Der Transfer der Testsubstanzen erfolgte mittels eines „HDR Tools“ (Beckman Coulter) unter Verwendung des Roboters. Der Transfer wurde vorher mit einer Farbstofflösung geeicht, so dass die Endkonzentration der Testsubstanzen etwa 100 µM betrug. Die Metallspitzen des „HDR Tools“ wurden nach jedem Transferschritt durch Ultraschall in einem DMSO-Bad, durch Eintauchen in ein Methanolbad und durch Trocknen der Spitzen gereinigt. Nach dem Schütteln der Platten wurden jeweils 10 µL Peptidlösung zugegeben und erneut geschüttelt. Die Platten wurden vor der Messung der Fluoreszenzpolarisation an einem Ultra Evolution 384 Lochplatten-Leser (Tecan) mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

2.4. Methoden zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen

2.4.1. Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden in Brutschränken (Heraeus, B5060 Ek/CO₂) bei 0-5% CO₂, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilbänken (Heraeus, Laminair) ausgeführt. Die Zellen wurden regelmäßig (alle 2-3 Tage) mit frischem Medium versorgt und stets vor dem Erreichen der Konfluenz passagiert. Das Einfrieren von Zellen erfolgte im so genannten Einfriermedium (90% FCS und 10% DMSO) in Cryo-Röhrchen (Nunc). Die Bestimmung der Zellzahl für eine Transfektion oder für andere spezielle biochemische Zelltechniken erfolgte mittels des Coulter-Counters ZM der Firma Coulter.

2.4.2. Infektion von NIH3T3 Zellen

Zur Infektion von pLXSN Konstrukten wurde die Verpackungszelllinie Phoenix Eco mittels einer modifizierten Kalziumphosphatmethode mit den Vektoren pLXSN/v-Src, pLXSN/h-Ras oder einem leeren pLXSN Vektor als Kontrolle transfiziert. Dazu wurden 2×10^6 vorselektionierte Phoenix Eco Zellen auf 60 mm Zellkulturschalen (Falcon) ausgesät und nach 12 Stunden mit 25 µM Chloroquin versetzt. Die Transfektion mit den jeweiligen Konstrukten wurde in einem 2x HBS Puffer (280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 100 mM HEPES, pH 7,0) durchgeführt.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit einem minimalen Volumen an Nährmedium versetzt und der retrovirale Überstand wurde nach 36 Stunden, nach weiteren 4 Stunden und 8 Stunden gesammelt und jeweils durch einen 45 µm Filter (Nalgene, Rochester, USA) sterilfiltriert. Der Überstand wurde jeweils mit 5 µg/ml Polybren (Sigma) versetzt und zu den zu infizierenden NIH3T3 Zellen gegeben. 24 Stunden nach erfolgter erster Infektion wurden die NIH3T3 Zellen mit frischem G418-versetzten Nährmedium 14 Tage selektioniert.

Die Selektion Neomycin-Analogon Geneticin[®] (G418), einem Aminoglykosid-Antibiotikum (3-Desoxystreptamin), das am 80S Ribosom wirkt und die eukaryotische Proteinbiosynthese blockiert. G418 wird durch die bakterielle Phosphotransferase APH(3')II, für die ein Gen im Transposon Tn 5 (Neo-Resistenzgen) kodiert, inaktiviert. Zellen ohne Neo-Resistenzgen sterben innerhalb weniger Tage.

2.4.3. Mykoplasmentest

Mykoplasmenkontamination von Zellkulturen beeinflusst die Expression von Zelloberflächenproteinen, die Vermittlung extrazellulärer Signale, den Stoffwechsel und andere Vorgänge und führt hierdurch zu einer Verfälschung von Versuchsergebnissen. Subkonfluente Zellen auf 6 cm Schalen wurden mit Methanol fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und dann für 15 min mit dem DNA-Farbstoff Bisbenzimid (0,1 mg/ml in PBS) bei 37°C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Mykoplasmen hin untersucht.

2.5. Proteinanalytische Methoden

2.5.1. Stimulation und Lyse von eukaryotischen Zellen

Durch Stimulation sollte die Aktivierung von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen in Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen 24 h in serumfreiem Medium gehungert und anschließend nach Bedarf mit den entsprechenden Liganden versetzt.

Zur spezifischen Aufreinigung von Proteinen wurden die Zellen mit Hilfe des Detergens Triton X-100 lysiert. Dabei werden die Zellmembranen aufgelöst, während der Zellkern und die übrigen Zellkompartimente intakt bleiben und durch Zentrifugation abgetrennt werden können.

HepG2 Zellen wurden 24 Stunden in serumfreiem Medium gehungert und eine Stunde mit der entsprechenden Konzentration an Testsubstanz (aus einer 100x Konzentration) oder 1% DMSO versehen. Nach Stimulation der Zellen mit 50 ng/mL IL-6 (25 Minuten) oder 50 ng/mL IFN- γ (15 Minuten) wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 150 μ L Lysepuffer (50 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% Glyzerin, 1% Triton X-100, 10 mM Na₄P₂O₇, 10 mM NaF, 20 μ M Na₃VO₄, 10 μ M PMSF und 100 ng/mL Aprotinin) behandelt.

Zellextrakte aus NIH3T3 Zellen wurden im Wesentlichen wie bei den HepG2 Zellen gewonnen. 3×10^5 Zellen wurden nach 24 Stunden Inkubation mit den entsprechenden Konzentration an Testsubstanz (aus einer 1000x Konzentration) oder 0,1% DMSO zwei Stunden behandelt. Die Zellen wurden nach dem Waschen mit PBS mit 100 μ L NP-40-Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1% Nonidet-P40, 0,25% Natriumdeoxycholat, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 10 mM NaF, 20 μ M Na₃VO₄, 10 μ M PMSF und 100 ng/mL Aprotinin) versehen.

MDA-MB-231, MDA-MB-435S, MDA-MB-453 und MDA-MB-468 Zellen bei einer Konfluenz von etwa 90% mit den entsprechenden Konzentrationen an Testsubstanz (aus einer 500x Konzentration) oder 0,2% DMSO zwei Stunden behandelt und analog zu den HepG2 Zellen lysiert.

Nach 10 Minuten Lyse auf Eis wurde das Zelllysat gesammelt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C) konnten unlösliche Zellbestandteile wie Zellkerne und Zytoskelett abgetrennt werden. Der Überstand, der alle zytosolischen und die meisten membranständigen Proteine enthält, wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und entweder zur Immunpräzipitation weiterverwendet oder als Gesamtlysat benutzt.

2.5.2. Gewinnung von Zellkernextrakten

Zellkernextrakte aus HepG2 Zellen wurden wie in der Literatur beschrieben angefertigt (Weidler *et al.*, 2000). Dazu wurden HepG2 Zellen in 100mm Zellkulturschalen (Falcon) ausgesät und für 72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ in Brutschränken inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mittels serumfreien MEM Medium gehungert.

Um vorphosphorylierte Zellkernextrakte von HepG2 Zellen für die *in vitro* Untersuchungen im EMSA zu erhalten, wurden die Zellen nach dem Entzug des Serums 30 Minuten mit 50

ng/mL IL-6 (STAT3-Aktivierung) beziehungsweise 15 Minuten mit 50 ng/mL IFN- γ (STAT1-Aktivierung) stimuliert und anschließend lysiert.

Für den Effekt der Testsubstanzen auf die STAT Phosphorylierung zu ermitteln, wurden die Zellen vor der Stimulation eine Stunde mit der jeweiligen Testsubstanz vorinkubiert (1% DMSO) und erst anschließend 30 Minuten mit 50 ng/mL IL-6 (STAT3-Aktivierung) beziehungsweise 15 Minuten mit 50 ng/mL IFN- γ (STAT1-Aktivierung) stimuliert und lysiert.

Nach dem Entfernen des Mediums, wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, einmal mit eiskaltem PBS (versetzt mit 1 mM Na₃VO₄ und 5 mM NaF) und mit Hypotonischen Puffer (20 mM HEPES, pH 7,9, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 20 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM Na₄P₂O₇ und 1:50 Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit 150 μ L Hypotonischen Puffer, welcher zusätzlich 0.2% NP-40 enthielt, versetzt, und mit einem sterilen Zellschaber in Eppendorf Gefäße überführt. Nach dem Zentrifugieren der Suspension (1 Minute bei 13.000 rpm) wurde der Überstand abgezogen und die Zellrückstände in 30 μ L Hypertonischen Puffer (20 mM HEPES, pH 7,9, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 20 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM Na₄P₂O₇, 420 mM NaCl, 30% Glycerin und 1:50 Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) resuspendiert. Die Eppendorfgefäße wurden bei 4°C 30 Minuten lang sanft geschüttelt und 20 Minuten zentrifugiert (13.000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.5.2. Proteinbestimmung

2.5.2.1. BCA Kit

Zur Proteinbestimmung wurde der „Micro BCA Protein Assay Kit“ nach Angaben des Herstellers verwendet. Diese Methode beruht auf der Reduktion von Kupferionen ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{+}$) durch verschiedene Seitengruppen von Aminosäuren (vor allem Cystin, Cystein, Tryptophan, Tyrosin), die als Reduktionsmittel fungieren. Die Proteinbestimmung wird nicht durch Detergenzien, wie sie bei der Lyse von Zellen eingesetzt werden, gestört. Die Kupferionen werden durch BCA (Bicinchonische Säure) komplexiert und bilden eine charakteristische violette Färbung, deren Extinktion in einem Elisa-Reader (Dynatech MR5000) gemessen wurde. Als Vergleichsstandard (Kalibrierungskurve) wurde eine Rinderserumalbumin-Konzentrationsreihe (100-2000 μ g Protein/ml) eingesetzt.

2.5.2.1. Bradford Proteinbestimmung

Bei der Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe (465 nm ohne Protein, 595 nm mit Protein). Die Zunahme der Absorption bei 596 nm ist daher ein Maß für die Proteinkonzentration in Lösung. Die Durchführung der Proteinbestimmung erfolgte mit Bradfordlösung (Biorad) nach Angaben des Herstellers. Als Vergleichsstandard (Kalibrierungskurve) wurde eine γ -Globulin-Konzentrationsreihe (20-400 μ g Protein/ml) eingesetzt.

2.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamidgele ermöglichen die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht. Durch das Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur komplexiert, d.h. Konformationseffekte werden dadurch weitgehend aufgehoben. Die Proteine erhalten zugleich eine negative Ladung, die nicht von ihrer Aminosäurezusammensetzung bzw. ihrer Eigenladung abhängt und so ihre Wanderung im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird. Das im Laemmli-Probenpuffer vorhandene β -Mercaptoethanol sorgt zudem dafür, daß intra- und intermolekulare Disulfidbrücken der Proteine reduziert und somit gespalten werden, was schließlich zu einer Denaturierung der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur führt.

Es wurden stets vertikale Gelapparaturen von Atto verwendet. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7-15%ige SDS-Polyacrylamidgele als Trenngel gegossen, über welches im Anschluß ein 4%iges Sammelgel gegossen wurde. Die SDS Gelelektrophorese wurde wie von Sambrook *et al.* (1990) beschrieben durchgeführt. Die Gele wurden entweder mit Coomassie G250 gefärbt oder die Proteine auf Nitrozellulose transferiert. Als Molekulargewichtsstandard bei der Gelelektrophorese wurde ein Kaleidoskopmarker (Bio-Rad) verwendet.

2.5.4. Coomassie-Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden mit Coomassie Lösung (1% Coomassie G250, 10% Essigsäure, 40% Methanol) 5-60 min gefärbt und anschließend mit 10% Methanol und 10% Essigsäure entfärbt und fixiert. Die Gele wurden zwei gewässerten Lagen Zellufanfolie gelegt und getrocknet.

2.5.5. Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Zur Immundetektion von Proteinen wurden diese nach der Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Gershoni & Palade, 1983). Der Transfer erfolgte mit Transblot-SD Puffer für 2-3 h bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell, BA 85, $0,45 \mu\text{M}$) auf einer „Semidry“-Blotapparatur. Das in Transblot-SD equilibrierte Gel wurde auf eine den Gelausmaßen zurechtgeschnittene Nitrozellulosemembran gelegt, die zu beiden Seiten von mehreren Lagen Filterpapier umgeben war.

2.5.6. Ponceau S-Färbung der Nitrozellulosemembran

Nach dem erfolgten Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde diese für 1 min mit einer Lösung des roten Farbstoffs Ponceau S (2 g/L in 2% (w/v) Trichloressigsäure) angefärbt. Unspezifisch angefärbte Bereiche der Nitrozellulose wurden mit destilliertem Wasser entfärbt, so daß letztlich Banden des Proteinmarkers, der zur Immunpräzipitation eingesetzten Antikörper oder der Proteine des Zellysats sichtbar wurden. Die Nitrozellulose wurde dann durch mehrmaliges Waschen in 1x NET-Gelantine (0,25% Gelantine in 1x NET) entfärbt.

2.5.7. Immundetektion von Proteinen (Immunoblot-Analyse)

Bei der Immundetektion wurden die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine mit einem Antikörper-gekoppelten Verfahren nachgewiesen. Das Prinzip dieser Methode basierte darauf, daß in einem ersten Schritt die spezifischen Antikörper die immobilisierte Antigene auf der Nitrozellulose erkennen, während im zweiten Schritt diese ihrerseits durch Antikörper erkannt werden, an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Durch diese enzymatische Aktivität werden schließlich die Antigenbanden detektiert.

Die Behandlung der Nitrozellulosemembran mit den jeweiligen primären und sekundären Antikörpern richtete sich nach den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers. Die Detektion der Banden erfolgte mit dem „ECL-Kit“ (*Enhanced Chemoluminescence*) der Firma NEN und der Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm.

Sollte dieselbe Membran ein weiteres Mal benutzt werden, konnten die gebundenen Antikörper durch Inkubation in "Strip"-Puffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 100 mM β -Mercaptoethanol, 2% SDS) bei 50°C für 1 h in einem Warmwasserschüttler entfernt werden.

2.5.8. EMSA

Der EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) unter der Benutzung einer nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese stellt eine einfache, schnelle und extrem sensitive Methode dar, um Sequenz-spezifische DNA-bindende Proteine zu untersuchen. Proteine, welche spezifisch an ein radioaktiv markiertes DNA Fragment binden, verlangsamen die Bewegung des Fragments während der Elektrophorese. Dies führt zu diskreten Banden im Gel, die den jeweiligen Protein-DNA-Komplexen entsprechen.

Um die Inhibierung der Dimerisierung von phosphorylierter STAT-Dimere zu untersuchen, wurden 3 μ L Zellkernextrakt (etwa 50 μ g Protein) zu 2 μ L 5x Bindungspuffer (65 mM HEPES, pH 7,9, 0,75 mM EDTA, 40% Glycerin und 0,1 % Nonidet-P40), 1 μ L Testsubstanz (gelöst in DMSO von einer 10x Mischung) und 1 μ g poly(dI-dC) (Roche Applied Science) gegeben. Für die Kontrollbahnen wurden entsprechende Oligonukleotide der Reaktion in einem 5fachen Überschuss beigefügt. Peptide, welche an die SH2-Domäne von STAT1 (GpYDKPHVL) bzw. STAT3 (Ac-pYLPQTV-NH₂) binden und somit mit der Testsubstanz konkurrierten, wurden zu einer Endkonzentration von 1 μ M zugegeben. Für die so genannte „Supershift“-Kontrolle wurden 1 μ g anti-STAT3 Antikörper, 1 μ g anti-STAT1 Antikörper oder 1 μ g anti-Src Antikörper als unspezifischer Kontrollantikörper zu den Reaktionsmischungen beigefügt. In allen Fällen betrug das Gesamtvolumen der Reaktion 10 μ L. Alle Reaktionsgemische wurden vor der Zugabe der radioaktiv markierten Oligonukleotide bei 30°C im Heizblock 60 Minuten lang inkubiert.

Für die Untersuchung des Einflusses der Testsubstanzen auf die Phosphorylierung der STATs, wurden die Reaktionsgemische eine Stunde bei Raumtemperatur ohne zugebene Testsubstanz bzw. DMSO inkubiert.

In beiden Fällen wurde nach der Inkubation der Reaktionsgemische 50.000 cpm (~2,5 pmol) radioaktiv markierte hSIE Oligonukleotid-Dimere zugesetzt und die Reaktionsgemische erneut für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Jeweils 9 μ L der Reaktionsgemische wurden auf einem 4% Polyacrylamidgel (0,5x TBE, 2,5% Glycerin) aufgetrennt. Das Gel wurde in einem 0,5x TBE Puffer bei Raumtemperatur und 130V gefahren, anschließend auf 3MM Whatmanpapier überführt, unter Vakuum getrocknet und bei -80°C auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

2.5.9. *In vitro* Src-Kinase Assay

Das Src Substratpeptid KVEKIGEGTYGVVYK (Endkonzentration: 150 μ M) (Upstate) wurde mit 25 ng aktiver Src-Kinase (Upstate) und den Testsubstanzen im Reaktionspuffer (8 mM MOPS, PH 7,0, 0,2 mM EDTA) mit einem Gesamtvolumen von 15 μ L gemischt. Nach 45 Minuten Inkubation bei 37°C wurde 10 μ L ATP Mix (1 mM HEPES, pH 7,0, 22,5 mM Magnesiumacetat, 225 μ M ATP, 100 μ Ci [γ - 32 P]-ATP) zugefügt und die Kinasereaktion wurde 15 Minuten lang bei 37°C durchgeführt. 20 μ L jeder Kinasereaktion wurde auf ein P81 Papier (Upstate) überführt und die Phosphorylierung des Substratpeptids wurde nach Angaben des Herstellers untersucht.

2.6. Zellbiochemische und –biologische Untersuchungen

2.6.1. Immunofluoreszenz-Untersuchungen

HepG2 Zellen wurden in LabTek 16-Loch-Glasplatten (Nunc) ausgesät und 24 Stunden mit Serum-freien Nährmedium gehungert. Nach einstündiger Inkubation mit entsprechenden Konzentrationen an Testsubstanzen (aus einer 100x Konzentration) oder 1% DMSO wurden die Zellen mit 50 ng/mL IL-6 und 50 ng/mL IFN- γ 40 Minuten lang stimuliert. Nach dem Abziehen des Mediums wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit einer 3,7% Paraformaldehyd-Lösung fixiert.

Nach dem Fixieren wurden die Zellen zweimal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen, für 10 Minuten mit einer 1% Triton-X100 Lösung in PBS permeabilisiert und zweimal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungen wurden mittels Inkubation für 20 Minuten mit einem Block-Puffer (1% Ziegen Serum und 0,1% Tween-20 in PBS) inhibiert. Die Inkubation mit den Antikörpern gegen STAT3 (1:250) und STAT1 (1:50) im Block-Puffer erfolgt für 60 Minuten in einer Feuchtigkeitskammer, gefolgt von dreimaligen Waschen mit PBS-T (0,1% Tween-20 in PBS) für jeweils 5 Minuten. Anschließend wurden die Zellen 60 Minuten mit den sekundären Antikörpern Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 546 (jeweils 1:1000) im Block-Puffer in einer abgedunkelten Feuchtigkeitskammer inkubiert und dreimal mit PBS-T gewaschen. Die Zellen wurden mit DAPI (1:200 in PBS-T) 10 Minuten gegengefärbt und nochmals 5 Minuten mit PBS-T gewaschen. Die Glasplatten wurden zuletzt mit 200 μ L Fluoromount G (Interchim) und einem Glasplättchen abgedeckt und wurden mit einem entsprechenden Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.6.2. Verankerungsunabhängiges Wachstum in Weichagar

Freedman und Spin fanden 1974 heraus, daß zwischen dem tumorbildenden Potential einer Zelle *in vivo* und ihrer Fähigkeit, verankerungsunabhängig *in vitro* zu wachsen, ein allgemeiner Zusammenhang besteht (Freedman & Shin, 1974). Obwohl diese Generalisierung nicht für jede transformierte Zelle gilt, kann das Wachstum in Weichagar benutzt werden, um *in vitro* Transformation und Tumorigenizität vorherzusagen. Die Methode hat den Vorteil, daß sie leicht umgesetzt werden kann und weniger Zeit als ein *in vivo* Assay braucht.

7×10^3 NIH3T3/v-*Src*, NIH3T3/h-*Ras* oder NIH3T3/pLXSN Zellen wurden in 200 μ L MEM Nährmedium (0,25% Agar, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 μ g/mL Penicillin/Streptomycin) und entsprechenden Konzentrationen an Testsubstanzen (aus einer 100x Konzentration) oder 1% DMSO suspendiert und auf eine feste 300 μ L Bodenschicht (MEM Medium mit 0,5% Agar) in 24 Lochplatten (Falcon) ausgesät. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen mit 100 μ L MEM Nährmedium (0,25% Agar, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 μ g/mL Penicillin/Streptomycin) mit denselben Konzentrationen an DMSO bzw. Testsubstanzen wie oben versehen. Nach 10-14 Tagen Wachstum wurden die Kolonien mit 20 μ L einer 1 mg/mL Iodnitrotetrazoliumchlorid Lösung eingefärbt. Am nächsten Tag wurden die Zellen am Durchlichtmikroskop analysiert und jedes Feld wurde an vier zufällig ausgewählten Positionen ausgezählt (4x Vergrößerung).

2.6.3. Apoptose

2.6.3.1. FACS-Analyse

Der Einfluss der Testsubstanzen auf den programmierten Zelltod (Apoptose) wurde mittels einer von I. Nicoletti *et al.* veröffentlichten Methode (Nicoletti *et al.*, 1991) mit Durchflusszytometrie analysiert. Ein wichtiges Merkmal apoptotischer Zellen ist das Auftreten von DNA Fragmentierung, wodurch der DNA-Gehalt im Vergleich zu nicht-apoptotischen Zellen abnimmt. Apoptotische Zellen besitzen deshalb einen DNA-Gehalt, der geringer ist als der von Zellen in der G₀/G₁-Phase. Nach Fixierung von Zellen und vollständiger Anfärbung der DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen wie Propidiumiodid, einer sequenzunspezifisch DNA-interkalierenden Substanz, ist die Fluoreszenz dieser Zellen abhängig von deren DNA-Gehalt. Apoptotische Zellen zeigen im Durchflusszytometer deshalb weniger Fluoreszenz als Zellen in G₀/G₁, es erscheint ein so genannter Sub-G₀/G₁-Wert.

NIH3T3/v-Src, NIH3T3/h-Ras und NIH3T3/pLXSN wurden zu 5×10^4 Zellen in 6-Lochplatten (Corning) ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Nach Zugabe entsprechender Konzentrationen an Testsubstanzen (in DMSO aus einer 1000x Konzentration) oder 0,1% DMSO wurden die Zellen weitere 48 Stunden inkubiert. MDA-MB-231, MDA-MB-435S, MDA-MB-453 und MDA-MB-468 Zellen wurden zu 5×10^4 Zellen in 6-Lochplatten (Corning) ausgesät und nach 24 Stunden Inkubation mit Nährmedium mit entsprechender Konzentrationen an Testsubstanzen (in DMSO aus einer 1000x Konzentration) oder 0,1% DMSO versehen und weitere 24 Stunden inkubiert.

Alle Zellen wurden anschließend durch Zugabe einer Trypsin-EDTA Lösung (Gibco) in Eppendorf Gefäße gesammelt und in einem Propidiumiodidpuffer (0,1% Natriumcitrat, 0,1% Triton-X100 und 20 μ M Propidiumiodid in PBS) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 3 Stunden bei 4°C inkubiert und anschließend wurden 10^4 Zellen pro Analyse durch Durchflusszytometrie mit einem FACSCalibur (BD Biosciences), welches mit einem 488 nm Laser ausgestattet war, untersucht.

2.6.3.2. TUNEL-Assay

MDA-MB-231, MDA-MB-435S, MDA-MB-453 und MDA-MB-468 Zellen wurden zu jeweils 4×10^3 Zellen in LabTek 16-Loch-Glasplatten (NUNC) ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit entweder 1% DMSO oder entsprechende Konzentrationen an Testsubstanz (aus einer 100x Konzentration) weitere 24 Stunden behandelt. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einer 4% Paraformaldehydlösung (in PBS) 60 Minuten bei Raumtempertaur fixiert und nach dem Waschen mit PBS zwei Minuten auf Eis permeabilisiert (0,1% Triton X-100 und 0,1% Natriumcitrat in PBS). DNA-Strangbrüche wurden anschließend mittels des „In Situ Cell Death Detection Kits, Fluorescein“ (Roche) sichtbar gemacht. Die Durchführung des Assays erfolgte nach Angabe des Herstellers. Die Zellen wurden mit DAPI (1:200 in PBS-T) 10 Minuten gefärbt und nochmals 5 Minuten mit PBS-T gewaschen. Die Glasplatten wurden zuletzt mit 200 μ L Fluoromount G (Interchim) und einem Glasplättchen abgedeckt und wurden mit einem Zeiss Axioplan 2 Mikroskop (40fach Vergrößerung) analysiert.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung eines Hochdurchsatz-Verfahrens für das Protein STAT3

Die Signalübermittlung innerhalb der Zelle ist normalerweise ein reguliert ablaufender Mechanismus. Allerdings findet man in Tumorzellen häufig genetische Veränderungen, zum Beispiel Mutationen in Rezeptortyrosinkinasen, die zu einer dauerhaften Aktivierung einiger Signalwege führen (Normanno *et al.*, 2006). Daher ist es nicht verwunderlich, dass man in vielen Tumorzelllinien, aber auch in menschlichen Primärtumoren eine konstitutive Aktivierung von STAT3 findet, da dieses Protein ein wichtiger Signalübermittler in der Signalkette von Zytokinen und Wachstumsfaktoren über ihre jeweiligen Rezeptoren ist (Singer & Koretzky, 2002). Die onkogene Rolle von STAT3 in der Tumorentstehung und Tumorprogression konnte bereits mehrfach durch verschiedene Experimente bestätigt werden (Yu & Jove, 2004). Es wurde weiterhin gezeigt, dass ein Peptid, welches an die SH2-Domäne von STAT3 bindet, dessen Dimerisierung inhibiert und dadurch die Zelltransformation, ausgelöst durch das onkogene Proteins v-Src, verhindert (Turkson *et al.*, 2001). Dies deutet darauf hin, dass ein kleines organisches Molekül, welches wie das Peptid an die SH2-Domäne von STAT3 bindet, ebenfalls die Aktivierung und Dimerisierung des Proteins verhindern würde.

3.1.1. FRET

Um einen solchen STAT3 Antagonisten zu identifizieren, ist es notwendig, mehrere Substanzbibliotheken nach geeigneten Kandidaten zu durchsuchen. In der Literatur gibt es verschiedene publizierte *in vitro* Hochdurchsatz-Verfahren, die auch für das STAT3-Protein anwendbar wären. Die Stärke von Fluoreszenz-basierten Verfahren liegt darin, dass diese sehr robust und gut reproduzierbar sind (Hovius *et al.*, 2000). Eine Voraussetzung für die Anwendung von Fluoreszenztechniken ist, dass das zu untersuchende Protein stark fluoreszierend sein muss und gut von der natürlichen Hintergrundfluoreszenz zu unterscheiden ist. Da jedoch bei Proteinen, wie auch im Falle von STAT3, äußerst selten eine Eigenfluoreszenz vorliegt, ist es notwendig, STAT3 mit einem Fluoreszenzmarker zu versehen. Eine gängige Technik, um Proteindimerisierungen zu untersuchen, stellt FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) dar. FRET findet statt, wenn zwei verschiedene Chromophoren über einen Dipol-Dipol-Mechanismus reagieren. Ein durch monochromatisches Licht angeregter Chromophor (Donor) kann bei räumlicher Nähe seine Anregungsenergie auf den anderen Chromophor (Akzeptor) übertragen. Dabei muss das

Absorptionsspektrum des Akzeptors mit dem Fluoreszenzemissions-Spektrum des Donors überlappen. Falls zusätzlich die beiden Moleküle eng benachbart stehen (ca. 10 – 100 Å) und die Orientierung des Dipolmoments der Fluorophore ungefähr parallel ist, wird die eigentliche Fluoreszenz des Donors reduziert und eine neue Fluoreszenz, die des Akzeptors, tritt in Erscheinung.

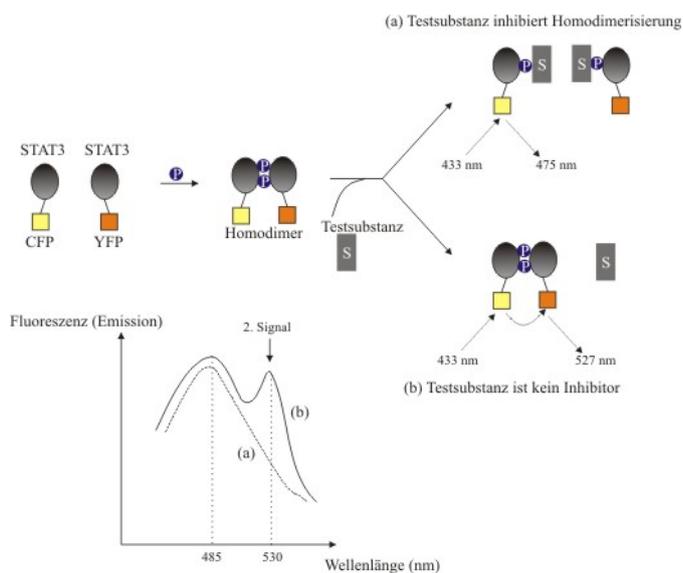


Abb. 5: Prinzip von FRET.

Oben: Zwei mit den unterschiedlichen Chromophoren CFP und YFP markierten STAT3-Proteine dimerisieren nach erfolgreicher Tyrosinphosphorylierung. Nach Zugabe der Testsubstanz können diese nach erfolgreicher Bindung an STAT3 die Dimerisierung verhindern und es erfolgt nur ein Emissionssignal (Fall a). Falls die Testsubstanz nicht die Dimerisierung inhibiert, erhält man ein zweites Emissionssignal, da die Anregungsenergie von CFP auf das in räumlicher Nähe befindliche YFP übertragen wird (Fall b). Unten: Theoretisches Emissionsdiagramm aufgetragen gegen die Wellenlänge der emittierten Fluoreszenz für beide Fälle.

In Abbildung 5 erkennt man das Prinzip des Assays für eine *in vitro* Untersuchung der STAT3-Dimerisierung. Zwei mit den unterschiedlichen Chromophoren CFP (*cyan fluorescent protein*) und YFP (*yellow fluorescent protein*) markierten STAT3-Proteine dimerisieren nach Tyrosinphosphorylierung. Falls eine zugegebene Testsubstanz die Dimerisierung von STAT3 inhibiert, sind die beiden Chromophoren räumlich voneinander getrennt und man registriert nur das Emissionssignal von CFP. Ohne erfolgreiche Trennung der beiden Dimere befinden sich die chromophoren Fluoreszenzmarker CFP und YFP in räumlicher Nähe, wodurch eine Übertragung der Anregungsenergie von CFP auf YFP stattfinden kann. Man erhält nun ein zweites Emissionssignal und kann mit dieser Methode in einer Hochdurchsatz-Untersuchung gut beide Fälle voneinander unterscheiden und somit Testsubstanzen identifizieren, die die Dimerisierung inhibieren.

Für diese Analyse benötigt man phosphorylierte STAT3-Proteine, die jeweils mit den beiden Fluoreszenzmarkern versehen sind. Mittels der Röntgenstruktur vom STAT3-Dimer (Becker *et al.*, 1998b) wurden im Dimer in räumlicher Nähe befindliche N-terminale Aminosäuren identifiziert, es wurden drei STAT3-Fusionsproteine unterschiedlicher Länge (siehe Material und Methoden) konstruiert und rekombinant aus TKB1 *E.coli* exprimiert. Am N-terminalen Ende waren diese drei STAT3-Konstrukte mit jeweils einem Chromophor CFP oder YFP

versehen, um die beiden Chromophoren im Falle einer Dimerisierung in eine räumliche Nähe zu bringen und somit ein FRET-Signal zu erzeugen. Die TKB1 kompetenten Zellen stammen vom BL21(DE3) Stamm ab und enthalten neben einer durch IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induzierbarer T7 RNA-Polymerase, die Proteinexpression erlaubt, eine induzierbare Tyrosinkinase, welche Tyrosinreste des exprimierten Proteins phosphoryliert. Da die Konstrukte ebenfalls einen Poly-His-Rest enthielten, konnten sie nach Expression und Phosphorylierungsreaktion über eine Nickelsäule aufgereinigt werden und in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und angefärbt werden. Wie man in Abbildung 6 sehen kann, waren jedoch nur vier STAT3 Konstrukte löslich, auch fanden sich selbst nach Aufreinigung der Proteine viele zusätzliche Banden im Gel, was eine direkte weitere Verwendung der Proteine für eine Hochdurchsatz-Analyse ausschloss. Da auch weitere Optimierungen der Expression und Aufreinigungsschritte nicht zu einem reinen Protein führten (Daten nicht gezeigt), wurde im Folgenden ein alternatives Verfahren entwickelt.

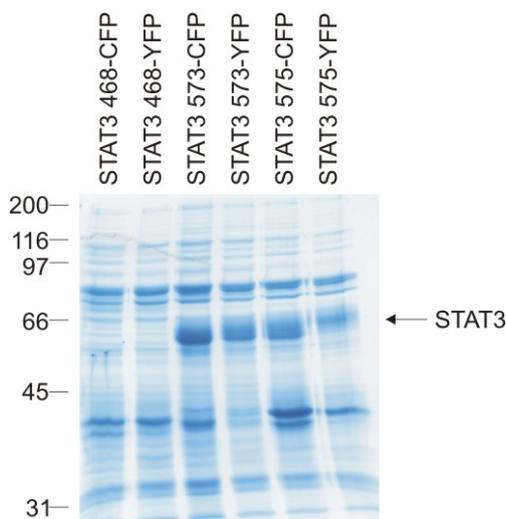


Abb. 6: Expression der STAT3 FRET Konstrukte.

Eine Polyamidacrylgel-Analyse der sechs aufgereinigten STAT3-Proteine für FRET zeigt nach der Coomassie-Färbung, dass nur die längeren STAT3-Proteine (573 und 575) exprimiert wurden. Eine Vielzahl zusätzlicher Banden war bei allen Protein-Präparationen zu erkennen.

3.1.2. Fluoreszenzpolarisation

Eine zweite Technik, die ebenfalls recht häufig in Hochdurchsatz-Verfahren genutzt wird, ist die so genannte Fluoreszenzpolarisation (FP) oder auch Anisotropie (Weber, 1952). Hier wird ausgenutzt, dass die Rotationsgeschwindigkeit von Molekülen in Lösung mit ihrem Molekulargewicht korreliert. Wenn mit einem Fluoreszenzmarker versehene Moleküle in Lösung mit linear polarisiertem Licht bestrahlt werden, ist auch das emittierte Licht linear polarisiert. Diese Polarisation ist ein Ergebnis der PhotoSelektion von Fluorophoren bezüglich ihrer Orientierung im Vergleich zur Polarisationssebene des Anregungslichtes. Da Moleküle in

Lösung nicht starr sind, ändert sich ihre Orientierung und somit die Ausrichtung ihrer Übergangsdipolmomente während der Zeit, in der sie sich im angeregten Zustand befinden. Hauptsächlich durch diese Rotationsdiffusion kommt es dabei zu einer mehr oder minder starken Depolarisierung des emittierten Lichts. Die Messung der Polarisation der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit ermöglicht somit die Bestimmung der Rotationsbewegung der Chromophore. Daher können durch Fluoreszenzpolarisations-Experimente Abweichungen der Rotationsbewegung, ausgelöst durch Änderungen am Molekulargewicht beispielsweise durch Bindungsreaktionen, registriert werden (Sittampalam *et al.*, 1997).

3.1.2.1. Prinzip eines FP Hochdurchsatz-Verfahrens für STAT3

Andere in der Literatur beschriebene Verfahren, wie zum Beispiel ein ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (Haan *et al.*, 1999) oder eine EMSA-Analyse (*electrophoretic mobility shift assay*) (Turkson *et al.*, 2001), für die Identifizierung kleiner organischer Moleküle, die an die SH2-Domäne von STAT3 binden, eignen sich aufgrund der arbeitsintensiven Durchführung wenig für die Hochdurchsatz-Analyse von großen chemischen Substanzbibliotheken. Mit Fluoreszenzpolarisierung (FP) kann man die Bindung eines kleinen Fluoreszenz-markierten Moleküls an seinen signifikant größeren Bindungspartner analysieren, und FP bietet ein homogenes Assayformat, welches die automatisierte Untersuchung großer Substanzbibliotheken erlaubt (Owicki, 2000). Auf der Basis bereits veröffentlichter Assayformate für die SH2-Domänen von Src (Lynch *et al.*, 1997; Lynch *et al.*, 1999) und STAT1 (Wu *et al.*, 1997) wurde daher ein neuer Assay entwickelt, um mittels FP kleine organische Moleküle zu identifizieren, die die Funktion der SH2-Domäne inhibieren.

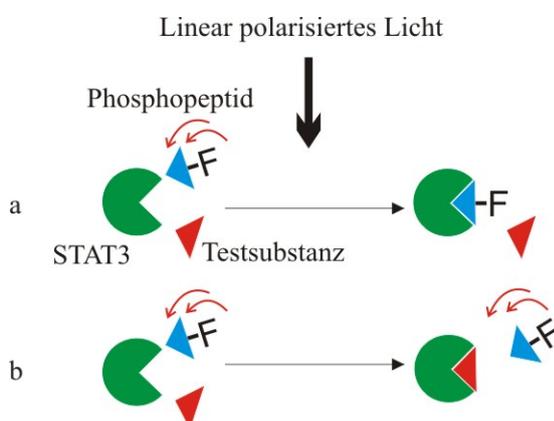


Abb. 7: Prinzip der Fluoreszenzpolarisierung.

Einfallendes linear polarisiertes Licht trifft auf ein Fluoreszenz-markiertes Phosphopeptid, welches an die SH2-Domäne von STAT3 bindet. Das freie Phosphopeptid rotiert schnell in der Lösung, es erfolgt eine Depolarisation des Lichts. Bindet das Phosphopeptid an das STAT3-Protein, rotiert der Proteinkomplex langsam in Lösung, das Licht bleibt polarisiert (a). Verdrängt eine Testsubstanz das Phosphopeptid von der SH2-Domäne (b), rotiert dieses schnell. Es erfolgt eine Depolarisation des Lichts.

Die Polarisation ist direkt proportional zum Molekularvolumen V und zur Viskosität η und indirekt proportional zur Fluoreszenzlebensdauer τ und zur Temperatur T der Lösung (Pope *et al.*, 1999). Wird ein mit einem Fluoreszenzmarker versehenes Phosphopeptid in Lösung mit linear polarisiertem Licht bestrahlt, kommt es aufgrund der Rotationsdiffusion zu einer Depolarisierung des emittierten Lichts. Bindet das Phosphopeptid an ein Protein, hat dieser Komplex ein viel größeres Molekulargewicht und weist daher eine geringere Rotationsdiffusion auf als das freie Peptid. Als Folge davon wird das emittierte Licht weniger depolarisiert (Abbildung 7a). Bindet eine Testsubstanz an die SH2-Domäne, bewirkt dies eine Verdrängung des Phosphopeptids, welches in Folge des geringeren Molekulargewichts schneller rotiert, was eine Depolarisation des Lichts bewirkt (Abbildung 7b).

3.1.2.2. Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine

Aus der Literatur war bereits die Expression von rekombinantem STAT3 aus *E. coli* bekannt (Becker *et al.*, 1998a). Es wurden Konstrukte für STAT3, STAT1 und STAT5b kloniert (siehe Material und Methoden) und diese Fusionsproteine zusammen mit Lck (siehe Material und Methoden) rekombinant aus dem *E.coli* Stamm Rosetta exprimiert und aufgereinigt. Die Rosetta *E.coli* stammen vom BL21(DE3) Stamm ab und enthalten neben seltenen tRNAs eine durch IPTG induzierbare T7 RNA Polymerase, die Proteinexpression erlaubt. Die Aufreinigung erfolgte bei den STAT-Proteinen über einen Poly-Histidin Rest, Lck wurde über eine GST (*anti-glutathione S-transferase*) Markierung aufgereinigt (siehe Material und Methoden).

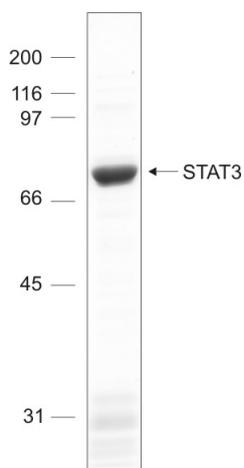


Abb. 8: Reinheit des rekombinanten STAT3-Proteins.

Das aufgereinigte STAT3-Protein aus Rosetta wurde in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und das Gel mit Coomassie angefärbt und anschließend eingescannt. Mit dem Analyseprogramm AIDA wurden die Banden quantifiziert und die Reinheit des STAT3-Proteins auf 96% bestimmt.

Nach der Aufreinigung der Proteine wurden diese in einer Polyacrylamidgel-Analyse aufgetrennt und das Gel mit Coomassie angefärbt. Nach dem Scannen des Gels und dem Quantifizieren der Proteinbanden wurde die Reinheit der Proteine mittels AIDA, einem Analyseprogramm, auf 96% für STAT3 (Abb. 8) bestimmt. STAT1 besaß eine Reinheit von 94 %, STAT5b 96 % und Lck 98 % (Daten nicht gezeigt).

3.1.2.3. Das Phosphopeptid GpYLPQTV bindet an unphosphoryliertes STAT3

Die Peptidsequenz P/A-pYLKTK ist von der SH2-Bindungsdomäne von STAT3 abgeleitet (Turkson *et al.*, 2001). Der N-terminale Teil der Peptidsequenz PpYLKTKFI wurde mit dem Fluoreszenzmarker 5-Carboxyfluorescein versehen und die Bindung dieses Phosphopeptids an unphosphoryliertes rekombinantes STAT3-Protein untersucht. Dieses Peptid zeigte jedoch kaum eine Bindung an STAT3 (Daten nicht gezeigt). Eine ähnlich schwache Bindung an das Protein war mit dem Peptid 5-Carboxyfluorescein-GpYLKTKF zu beobachten. Bei diesem Peptid war das N-terminale Prolin gegen ein Glycin substituiert worden, um die Kopplung an den Fluoreszenzmarker zu vereinfachen. Auch in diesem Fall stieg der Wert für die Fluoreszenzpolarisation mit steigender Proteinkonzentration nur sehr schwach an (Abbildung 8). Die Idee für den Austausch zwischen Prolin und Glycin beim N-terminalen Ende des Peptids kam von Fluoreszenz-markierten Peptiden für die Bindung an STAT1 bzw. Src (Lynch *et al.*, 1997; Lynch *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1997). Ein völlig anderes Bild ergab die Bindung des Phosphopeptids 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂, welches vom gp130-Rezeptor abgeleitet war (Ren *et al.*, 2003) und eine hohe Affinität zur STAT3 SH2-Domäne aufwies. Dieses Phosphopeptid zeigte bei steigender Konzentration von unphosphoryliertem STAT3-Protein im Gegensatz zu den anderen beiden Peptiden einen großen Anstieg in der Fluoreszenzpolarisation (Abbildung 9).

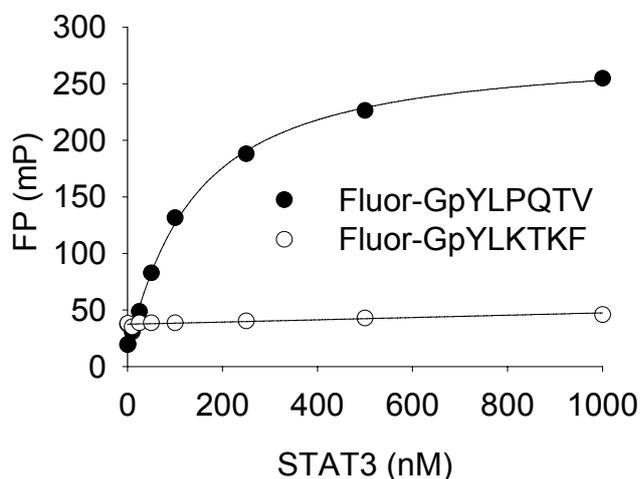


Abb. 9: Vergleich zweier Phosphopeptide für STAT3.

Die Bindung der Fluoreszenz-markierten Phosphopeptide 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV und 5-Carboxyfluorescein-GpYLKTKF an unphosphoryliertes STAT3. Die Peptide wurden bei einer Konzentration von 10 nM bei steigender Konzentration von STAT3 eingesetzt und die Fluoreszenzpolarisation gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Aufgrund der geringen S.A. sind die Fehlerbalken von den Symbolen überlagert.

3.1.2.4. Einfluss der Pufferzusammensetzung auf die Bindungskurve

Alle Experimente mit Fluoreszenzpolarisation wurden unter denselben Pufferbedingungen durchgeführt. Neben einer Puffersubstanz, die dazu diente, den pH Wert der Lösung stabil zu halten, enthielt der Puffer auch Natriumchlorid. Bei der Bindung des Nukleotidinhibitors Guanosin-3'-Monophosphat an Ribonuklease wurde festgestellt, dass mit steigender Salzkonzentration in Lösung die intermolekulare Protein-Bindung gelockert wird (Waldron *et al.*, 2005). Analog dazu wurde bei früheren Messungen der Bindung zwischen Phosphopeptiden und Proteinen mittels Fluoreszenzpolarisation eine Lockerung der Bindung zwischen dem Phosphopeptid und dem Protein bei steigender Salzkonzentration beobachtet (Lynch *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997). Bei der Bindung des Phosphopeptids 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ an unphosphoryliertes STAT3-Protein wurde ebenfalls eine Schwächung der Bindung registriert (Abbildung 10).

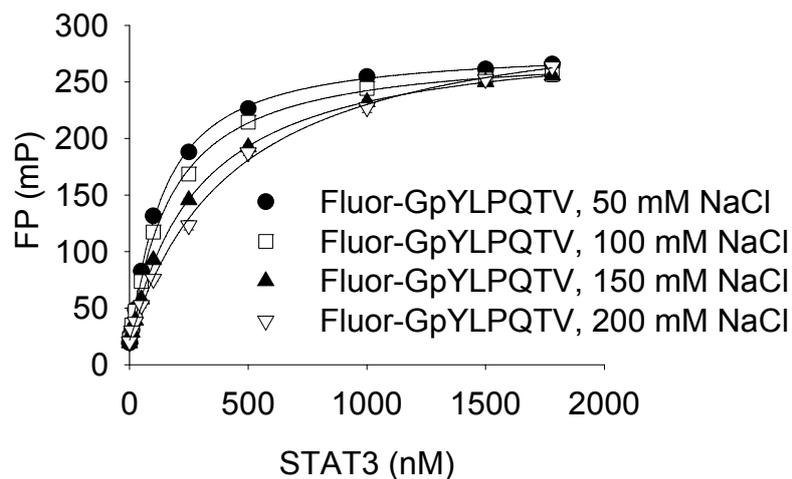


Abb. 10: Einfluss von NaCl auf die Bindung zwischen Fluor-GpYLPQTV und STAT3.

Die Bindung zwischen dem Phosphopeptid 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV (10 nM) und steigender Konzentrationen unphosphoryliertem STAT3-Protein wurde bei verschiedenen Salzkonzentrationen mittels FP bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Aufgrund der geringen S.A. sind die Fehlerbalken von den Symbolen überlagert.

Um den Einfluss der Salzkonzentration auf die Bindung zwischen dem Phosphopeptid und STAT3 zu quantifizieren, wurde der jeweilige K_d Wert aus den Bindungskurven errechnet. Der K_d Wert ist definiert als diejenige Proteinkonzentration, bei welcher die Bindungskurve halbmaximal ist. Der K_d bei 50 mM NaCl errechnete sich zu 150 ± 10 nM. Eine Erhöhung der Salzkonzentration auf 100, 150 oder 200 mM NaCl steigerte die K_d Werte auf 190 ± 20 , 310 ± 30 und 430 ± 50 nM. Im Folgenden wurde die Konzentration von NaCl konstant bei 50 mM

gehalten, um die Bindung zwischen dem Phosphopeptid und dem Protein nicht vor der Zugabe der Testsubstanzen im Vorhinein zu stark zu schwächen.

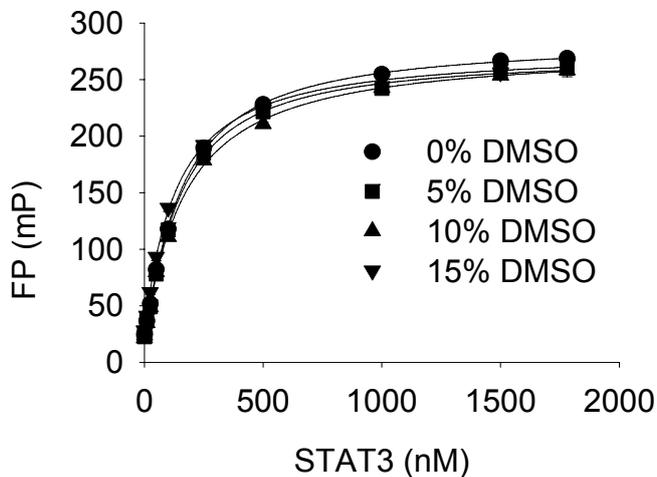


Abb. 11: Einfluss von DMSO auf die Bindung zwischen Fluor-GpYLPQTV und STAT3.

Die Bindung zwischen dem Phosphopeptid 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV und steigender Konzentrationen an unphosphoryliertem STAT3-Protein wurde bei verschiedenen DMSO Konzentrationen mittels FP bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Aufgrund der geringen S.A. sind die Fehlerbalken von den Symbolen überlagert.

Da die Testsubstanzen in DMSO gelöst waren, wurden im Folgenden auch der Einfluss dieses Lösungsmittels auf die Bindungskurve zwischen dem Phosphopeptid und unphosphorylierten STAT3 untersucht. Beim Vergleich der Bindung des Phosphopeptids an das Protein in Abwesenheit von DMSO (Abb. 11) konnte bei Erhöhung der DMSO Konzentration auf 5, 10, und 15% ein Absinken des K_d -Wertes um je 1, 11 und 19% registriert werden. Dies deutete auf eine stärkere Bindung zwischen Phosphopeptid und Protein in Gegenwart dieses Lösungsmittels hin (siehe dazu Kapitel 3.1.2.6.). Daher wurde die DMSO Konzentration in den Folgeexperimenten konstant bei 10% gehalten, um ein ausreichendes Lösen der Testsubstanzen im Assaypuffer sicherzustellen.

3.1.2.5. Untersuchung der Spezifität der Bindung des Phosphopeptids an STAT3

Das Protein Lck gehört zur Src-Proteinfamilie (Isakov & Biesinger, 2000) und besitzt eine SH2-Domäne, deren Bindungsmotiv stark von dem der STAT3-SH2-Domäne abweicht. Um die Selektivität der Bindung zwischen dem Phosphopeptid und dem STAT3 zu testen, wurden daher 10 nM 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ mit steigenden Konzentrationen an Lck inkubiert und mittels Fluoreszenzpolarisation die Bindung des STAT3-Phosphopeptids an die SH2-Domäne von Lck untersucht. Wie man in Abbildung 12 sieht, hat das Phosphopeptid auch bei hohen Konzentrationen von Lck nicht an dessen SH2-Domäne gebunden, ein weiterer Hinweis dafür, dass dieses Peptid spezifisch an die SH2-Domäne von STAT3 bindet. Um nachzuweisen, dass das GST-gereinigte Lck-Protein mit seiner SH2-Domäne funktional war, wurde ebenfalls die Bindung des Phosphopeptids pYEEIP, das bevorzugte SH2-

Bindungsmotiv von Mitgliedern der Src-Kinasefamilie (Lynch *et al.*, 1997), an Lck mit FP untersucht. Der starke Anstieg der Fluoreszenzpolarisation, der bei Inkubation des Phosphopeptids 5-Carboxyfluorescein-GpYEEIP mit nanomolaren Konzentrationen an Lck beobachtet werden konnte, war ein Hinweis auf die Funktionalität des rekombinanten Lck-Proteins (Abbildung 12).

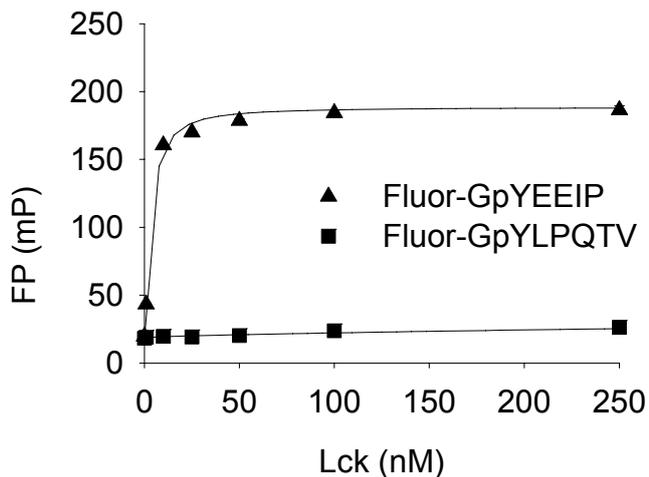


Abb. 12: Spezifitätskontrolle: Bindung verschiedener Phosphopeptide an GST-Lck-SH2.

Die Peptide 5-Carboxyfluorescein-GpYEEIP und 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ (je 10 nM) wurden mit steigender Konzentration an GST-Lck-SH2 Protein behandelt und die Bindung der Peptide an die Lck-SH2-Domäne mittels FP charakterisiert. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Aufgrund der geringen S.A. sind die Fehlerbalken von den Symbolen überlagert.

3.1.2.6. Test der Inhibition der STAT3-Bindungskurve mittels verschiedener Peptide

Im nächsten Schritt wurden verschiedene Peptidsequenzen ohne Fluoreszenzmarkierung auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Bindung zwischen dem Phosphopeptid 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ und der SH2-Domäne von STAT3 zu inhibieren. Wie erwartet, hatte das von der STAT3-Bindungssequenz des gp130-Proteins abgeleitete Peptid Ac-pYLPQTV-NH₂ dabei die besten antagonistischen Eigenschaften (Abbildung 13). Die Beobachtung, dass das korrespondierende Phosphopeptid mit einem freien N-terminalen Ende (pYLPQTV-NH₂) eine reduzierte Aktivität aufwies (Abbildung 13), deckte sich mit früheren Publikationen, dass ein freies N-terminales Ende die Affinität von phosphotyrosinhaltigen Peptiden zur STAT3-SH2-Domäne erniedrigt (Turkson *et al.*, 2001).

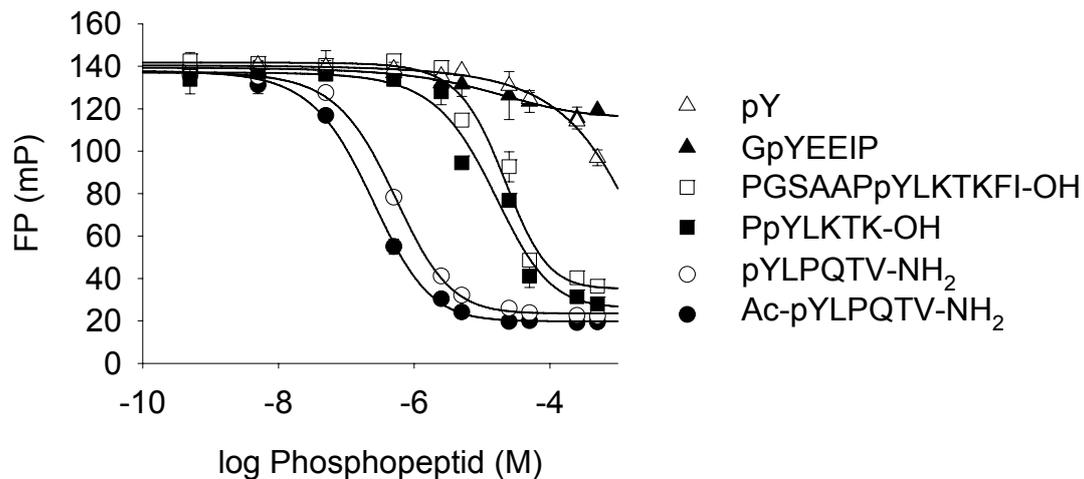


Abb. 13: Phosphopeptidische Inhibition der Bindung von Fluor-GpYLPQTV-NH₂ an STAT3.

Die Inkubation von 150 nM unphosphoryliertem STAT3-Protein und 10 nM 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ mit jeweils steigenden Konzentrationen an in der Grafik angegebenen Phosphopeptiden führte zu einer Inhibition der Bindung von Fluor-GpYLPQTV-NH₂ an die STAT3 SH2-Domäne mit jeweils unterschiedlicher antagonistischer Stärke. Die Inkubation erfolgte ohne DMSO, ansonsten waren die Pufferbedingungen wie im Material- und Methodenteil beschrieben. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Ein quantitativer Vergleich der beiden IC₅₀ Werte ergab für die beiden antagonistischen Phosphopeptide Werte von IC₅₀ = 250 \pm 30 nM für das acetylierte Phosphopeptid und IC₅₀ = 510 \pm 50 nM für das Phosphopeptid mit dem freien N-terminalen Ende (Tabelle 2). Die fehlende inhibitorische Aktivität des unphosphorylierten Peptids Ac-YLPQTV-NH₂ demonstrierte, dass die Interaktion zwischen dem fluoreszierenden Peptid und STAT3 in der Tat durch Wechselwirkungen zwischen der SH2-Domäne und dem Phosphotyrosin zustande kam (Tabelle 2). In Übereinstimmung mit vorherigen Ergebnissen, dass STAT3-abgeleitete Phosphotyrosine, die ein pYLKTK Motiv enthalten, nur mit geringer Affinität an STAT3 binden (Abbildung 9), inhibierten die beiden Phosphopeptide PpYLKTK und PGSAAPpYLKTKFI die Interaktion zwischen dem fluoreszierenden Phosphopeptid und STAT3 nur bei signifikant höheren Konzentrationen (Abbildung 13). Eine Quantifizierung der IC₅₀ Werte ergab bei Abwesenheit von DMSO Werte von IC₅₀ = 39 \pm 3 μ M für PpYLKTK bzw. IC₅₀ = 57 \pm 10 μ M für PGSAAPpYLKTKFI (Tabelle 2). Ebenfalls eine Bestätigung vorheriger Experimente ist das Ergebnis, dass ein Peptid mit dem pYEEI Motiv, welches an die SH2-Domäne des Src-Familienmitgliedes Lck bindet (Abbildung 12), keinen inhibitorischen Effekt zeigte (Abbildung 13 und Tabelle 2). Diese Ergebnisse wiesen darauf

hin, dass mit diesem Assay die selektive Identifikation von kleinen organischen Molekülen möglich sein sollte, die an die SH2-Domäne von STAT3 binden.

Peptidsequenz	IC ₅₀ bei 0% DMSO (μM)	IC ₅₀ bei 15% DMSO (μM)
Ac-pYLPQTV-NH ₂	0,25 ± 0,03	0,14 ± 0,02
pYLPQTV-NH ₂	0,51 ± 0,05	0,33 ± 0,06
Ac-YLPQTV-NH ₂	< 5% Inhibition bei 100 μM	< 5% Inhibition bei 100 μM
PpYLKTK-OH	39 ± 3	25 ± 5
PGSAAPpYLKTKFI-OH	57 ± 10	44 ± 4
GpYEEIP	< 10% Inhibition bei 100 μM	< 10% Inhibition bei 100 μM
pY	< 10% Inhibition bei 100 μM	< 10% Inhibition bei 100 μM

Tabelle 2: Quantifizierung der Ergebnisse aus Abbildung 12.

Gezeigt ist das Mittel ± S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Interessanterweise waren die IC₅₀ Werte der Inhibitorpeptide um 23 – 41% in der Gegenwart von 15% DMSO erniedrigt (Tabelle 2). Auch bei der Bindung von 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ an die SH2-Domäne von STAT3 war dieser Effekt, wenngleich mit einer Reduktion von 19% in Gegenwart von 15% DMSO etwas niedriger, zu beobachten (Abbildung 11). Es wurde spekuliert, dass der Zusatz von DMSO zum wässrigen Puffer die Desolvatisierungsenergie der Peptide nach der Bindung an die SH2-Domäne herabsetzte, was in einer festeren Bindung zwischen Protein und Peptiden resultierte. Die Tatsache, dass der Effekt kleiner war bei Peptiden ohne Fluoreszenzmarkierung könnte eventuell durch eine sterische Hinderung zwischen der SH2-Domäne und dem 5-Carboxyfluorescein erklärt werden, was den Einfluss der reduzierten Desolvatationsenergie auf eine verstärkte Bindung zwischen STAT3 und dem Fluoreszenz-markierten Peptid senken würde.

3.1.2.7. Untersuchung der Zeitstabilität des Assays

Da für eine Hochdurchsatz-Analyse die Stabilität des Verfahrens über mehrere Stunden hinweg eine wichtige Rolle spielt, wurde die Bindung zwischen 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ und STAT3 über 24 Stunden hinweg beobachtet. Nur geringfügige Änderungen in den K_d Werten wurden in dieser Zeitperiode registriert, was den Experimentator von einem potentiellen Termindruck während der Hochdurchsatz-Analyse befreit (Abbildung 14).

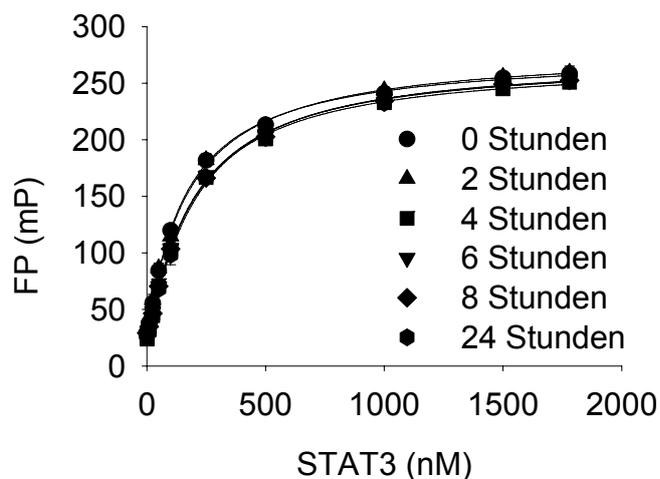


Abb. 14: Zeitliche Stabilität der Bindung zwischen STAT3 und 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂.

Ein Vergleich der Bindungskurven zwischen dem Phosphopeptid und STAT3 über 24 Stunden hinweg lieferte keine signifikanten Abweichungen in den jeweiligen Bindungskurven. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Aufgrund der geringen S.A. sind die Fehlerbalken von den Symbolen überlagert.

3.1.2.8. Berechnung des Z' Wertes

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Eignung eines Hochdurchsatz-Verfahrens ist der so genannte Z' Wert (Zhang *et al.*, 1999a). Der Z' Wert korreliert die Abweichungen innerhalb einer Lochplatte bei Abwesenheit einer Testsubstanz mit den Unterschieden der FP Werte zwischen freiem und Protein-gebundenem Fluoreszenz-markiertem Peptid. Betrachtet man Unterschiede in der Fluoreszenzpolarisation zwischen freiem und Protein-gebundenem Peptid, repräsentiert ein Z' Wert von 1 den perfekten Fall, in welchem die Variationen innerhalb einer Lochplatte 0 sind. Ein Assay mit einem Z' Wert von 0,5 wird dabei noch als gut geeignet für Hochdurchsatz-Verfahren angesehen. Um den Z' Wert in diesem Hochdurchsatz-Verfahren zu bestimmen, wurde die Fluoreszenzpolarisation von einer Mischung, die das Fluoreszenz-markierte Peptid 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ (10 nM) in Gegenwart von 150 nM STAT3 enthielt (gebundener Zustand), verglichen mit den FP Werten einer korrespondierenden Mischung, welche zusätzlich das antagonistisch wirkende Phosphopeptid ohne Fluoreszenzmarkierung (10 μ M) enthielt (freier Zustand) (Abbildung 15).

Die Formel für die Berechnung des Z' Wertes war $Z' = 1 - \frac{3 \cdot \text{STABW}_{\text{gebunden}} + 3 \cdot \text{STABW}_{\text{frei}}}{\text{FP}_{\text{gebunden}} - \text{FP}_{\text{frei}}}$,

wobei STABW die Standardabweichung innerhalb der Einzelwerte und FP den jeweiligen Mittelwert der Fluoreszenzpolarisationswerte bedeutet. Der erhaltene Z' Wert von $0,87 \pm 0,03$ war eine weitere Bestätigung, dass dieser Assay sich sehr gut für ein Hochdurchsatz-Verfahren eignet (Abb. 15).

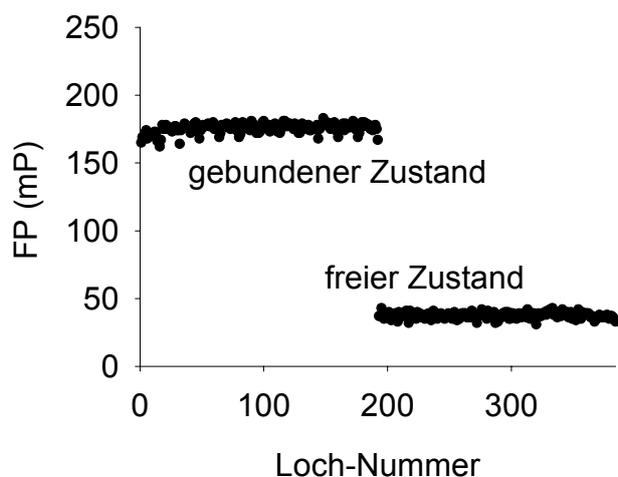


Abb. 15: Bestimmung von Z' .

Die FP Werte zwischen gebundenem und ungebundenem 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ sind als repräsentatives Beispiel gezeigt. Die Berechnung des Z' Wertes erfolgte aus diesen Werten wie im Text beschrieben.

3.2. Hochdurchsatz-Analyse chemischer Substanzbibliotheken

Es ist eine Schlüsselfrage der Chemischen Biologie, wie man kombinatorische Substanzbibliotheken anlegt, die die biologisch relevanten Regionen des chemischen Strukturraums abbilden. Dies ist keineswegs trivial, insbesondere, wenn man bedenkt, dass der gesamte chemische Strukturraum auf 10^{30} bis 10^{200} Strukturen errechnet wurde, aber nur ein ganz geringer Anteil davon biologisch relevante Strukturen darstellt (Tan, 2005). Bei der Zusammenstellung solcher Bibliotheken existieren zwei verschiedene Ansätze. Zum einen basieren einige Substanzbibliotheken zur Untersuchung biologischer Fragestellungen auf organischen Substanzen aus dem Bereich der Kombinatorischen Synthese. Zum anderen gibt es die Alternative, Bibliotheken aus Molekülen zusammenzustellen, die aus Mikroben, Pflanzen oder marinen Organismen gewonnen wurden (Tan, 2005).

3.2.1. Synthetische Substanzbibliotheken

Die Strukturen organisch synthetisierter Substanzbibliotheken basieren oft auf einem stickstoffhaltigen heteroaromatischen Grundgerüst und nur wenige Strukturen besitzen ein Stereozentrum, um die Synthese zu vereinfachen (Tan, 2005). Einige dieser Grundgerüste wurden bereits als privilegierte Strukturen identifiziert, da diese an verschiedene Proteinklassen binden können. Ein klassisches Beispiel für eine solche privilegierte Struktur ist das Benzodiazepin-Gerüst (DeSimone *et al.*, 2004). Oft dienen diese Substanzbibliotheken zur Identifikation neuer Wirkstoffe. Da diese bei oraler Bioverfügbarkeit am nützlichsten

sind, werden meist Lipinskis „Rule of 5“ bei der Auswahl der Strukturen berücksichtigt. Diese Regeln beinhalten, welche Eigenschaften eine Struktur haben sollte, damit sie zu großer Wahrscheinlichkeit eine orale Bioverfügbarkeit besitzt (Lipinski *et al.*, 2001). So sollte beispielsweise das Molekulargewicht einer Substanz kleiner als 500 g/mol sein und die Anzahl der OH-Bindungen oder NH-Bindung liegt idealerweise unter 5, während die Anzahl der Wasserstoffakzeptoratome maximal 10 ist.

3.2.1.1. Hochdurchsatz-Untersuchung synthetischer Substanzbibliotheken

Es wurden zwei verschiedene kommerziell verfügbare Substanzbibliotheken erworben, und es sollte im Folgenden in einem Hochdurchsatz-Verfahren diejenigen Substanzen dieser Bibliotheken identifiziert werden, die spezifisch die Funktion der STAT3-SH2-Domäne inhibieren. Da die Bibliotheken auch zur Identifikation von Modulatoren anderer Protein-Protein-Interaktionen dienen sollten, wurde auf eine möglichst große Diversität der in den Bibliotheken vorhandenen Strukturen geachtet. Abbildung 16 gibt einen Überblick über den Ablauf eines Hochdurchsatz-Verfahrens bei der Identifikation von Protein-Protein-Modulatoren.

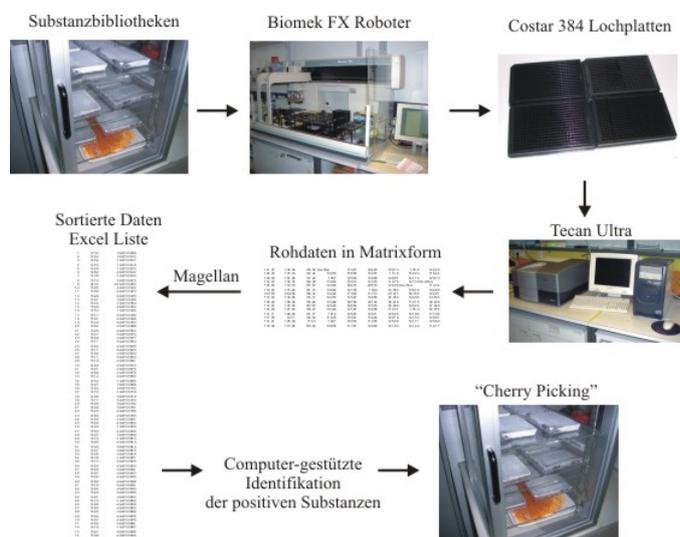


Abb. 16: Durchführung der Hochdurchsatz-Analyse chemischer Substanzbibliotheken.

Die chemischen Substanzbibliotheken wurden nach dem Auftauen in einem Trockenschrank mittels einer Pipetierhilfe (Biomek FX) in Costar 384 Lochplatten transferiert und mit STAT3 (150 nM) und 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ (10nM) gemischt. Das Auslesen der Fluoreszenzpolarisation (FP) erfolgte in einem Tecan Ultra Fluoreszenzleser. Die Rohdaten in Matrixform wurden mit dem Computeranalyseprogramm Magellan in eine Excel Liste konvertiert. Die identifizierten Substanzen, die an die SH2-Domäne von STAT3 banden, wurden im letzten Schritt, dem so genannten „Cherry Picking“ nochmals per Hand verifiziert.

Es wurden in dieser Analyse 17.298 Substanzen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Bindung zwischen dem Phosphopeptid 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ und STAT3 zu inhibieren. Die Substanzbibliotheken wurden je zweimal untersucht und die Fluoreszenzpolarisation gemessen. Aus dem Vergleich zwischen einer Negativkontrolle (gebundenes Peptid) und einer Positivkontrolle (freies Peptid) wurde die Fluoreszenzpolarisation in prozentuale Inhibition umgerechnet und diese Werte miteinander verglichen. Mehrere Selektionskriterien wurden angewendet, um eine geeignete Testsubstanz zu identifizieren. In einem mehrstufigen Prozess wurden zunächst diejenigen Verbindungen herausgefiltert, die in beiden Duplikatmessungen jeweils eine Inhibition von mehr als 60% erreicht hatten (144 Verbindungen). Eine stark veränderte Totalintensität war ein weiteres Ausschlusskriterium, da die Berechnung der Fluoreszenzpolarisation auch auf der Totalintensität beruht und eine Veränderung dieses Wertes durch eine Eigenfluoreszenz der Testsubstanz zu einem verfälschten Ergebnis geführt hätte. Die in parallel durchgeführten Hochdurchsatz-Analysen erhaltenen Modulatoren anderer Protein-Protein-Interaktionen wurden mit den Ergebnissen dieser Arbeit verglichen und diejenigen Testsubstanzen herausgefiltert, die unspezifisch an mehrere Proteine binden können. Die Fähigkeit der Substanz, die Kernlokalisierung von STAT3 zu inhibieren, wurde in HepG2 Zellen mit einem Immunfluoreszenzverfahren am Mikroskop untersucht (Kapitel 3.4). Die serielle Auswertung der genannten Kriterien (Daten nicht gezeigt) führte schließlich zur Identifizierung eines potentiellen Inhibitors von STAT3. In Tabelle 3 wird exemplarisch ein Auszug aus den Primärdaten mit den Werten dieser Testsubstanz aus der Hochdurchsatz-Untersuchung gezeigt.

ID	M (g/mol)	FP 1 (mP)	FP 2 (mP)	Inhibition 1 (%)	Inhibition 2 (%)
MWP00043	211,1918	64	57	67	74

Tabelle 3: Auszug aus den Primärdaten für den potentiellen STAT3 Inhibitor MWP00043.

Gezeigt ist die ID Nummer der Testsubstanz, das Molekulargewicht, die beiden Fluoreszenzpolarisationswerte aus der doppelt ausgeführten Hochdurchsatz-Untersuchung und die prozentuale Inhibition der Bindung des Fluoreszenz-markierten Peptids an die SH2-Domäne von STAT3, die aus den FP Werten berechnet wurde.

3.2.2. Naturstoffe

Aus Mikroben, Pflanzen oder marinen Organismen gewonnene Substanzen, so genannte Naturstoffe, demonstrieren eine viel größere strukturelle Verschiedenheit und Komplexität als Substanzen aus kombinatorischen Synthesen. Sie enthalten meist mehr Sauerstoffatome als Stickstoffatome und besitzen viele Stereozentren (Feher & Schmidt, 2003). Betrachtet man sich die wachsende Anzahl von therapeutisch genutzten Naturstoffen der letzten Jahre, wird die große Bedeutung dieser natürlich vorkommenden Substanzen klar (Newman *et al.*, 2003). Es hat sich gezeigt, dass insbesondere bei der Modulation von Protein-Protein-Interaktionen, die historisch gesehen schwierig mit kleinen organischen Molekülen durchzuführen war (Arkin & Wells, 2004; Berg, 2003; Pagliaro *et al.*, 2004), man innerhalb der Gruppe der Naturstoffe mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eine geeignete Verbindung identifizieren kann (Tan, 2005). Dies ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, dass diese „privilegierten Substanzen“ in der Evolution als vorselektierte Liganden für viele Proteine ausgewählt wurden (Dekker *et al.*, 2005).

3.2.2.1. Hochdurchsatz-Untersuchung von Naturstoffbibliotheken

Analog zu den oben beschriebenen synthetisch erzeugten Substanzbibliotheken wurden die Substanzen dreier verschiedener Bibliotheken von Naturstoffen oder Naturstoffderivaten auf ihre Fähigkeit hin überprüft, die Funktion der SH2-Domäne von STAT3 zu inhibieren. Die Bibliothek von Analyticon enthielt 1000 verschiedene Naturstoffe. Für eine Voruntersuchung der Spezifität wurde ebenfalls die Inhibition der Funktion der SH2-Domänen von STAT1 und STAT5b überprüft. Von den 1000 Verbindungen zeigten 19 Verbindungen eine prozentuale Inhibition von mehr als 60% gegenüber STAT3. Durch das Herausfiltern der unspezifischen Verbindungen durch einen Vergleich mit einem parallel durchgeführten Hochdurchsatz-Screening gegen STAT1 und STAT5b blieben noch 9 potentielle Inhibitor Kandidaten für die Inaktivierung von STAT3. In einem nachfolgenden Selektionsprozess wurde per Hand das Ergebnis des Hochdurchsatz-Verfahrens validiert. Wie man in Abbildung 17 erkennen kann, inhibierten bei der Validierung nur noch fünf der neun untersuchten Verbindungen STAT3 zu über 60% bei einer Inkubation mit jeweils 50 μ M Testsubstanz in FP-Assays. Davon zeigten nur die Verbindungen NP-2 und NP-6 eine signifikant niedrigere Inhibition der anderen getesteten Proteine STAT1, STAT5b und Lck.

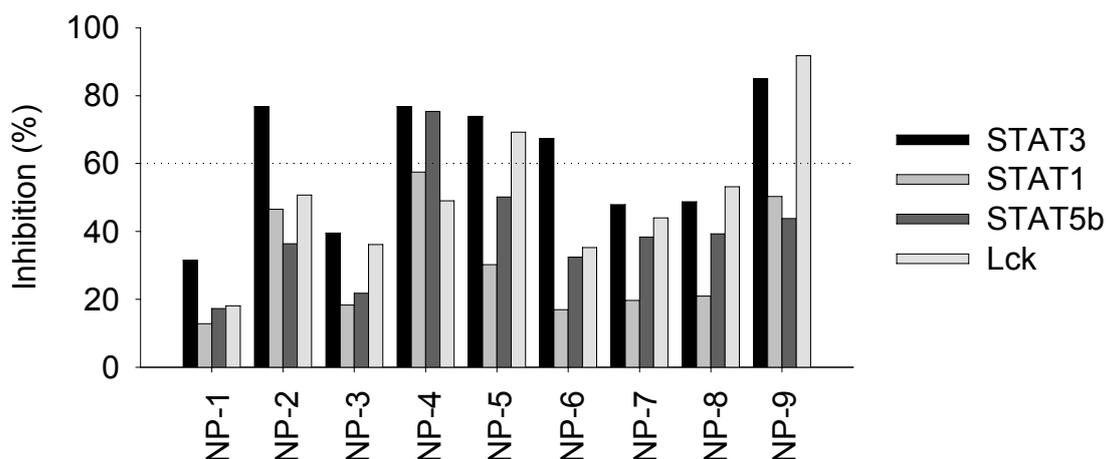


Abb. 17: Validierung der aus der Analyticon Bibliothek identifizierten STAT3 Inhibitorkandidaten.

Die genannten Proteine und die zugehörigen Fluoreszenz-markierten Phosphopeptide wurden mit jeweils 50 μM Testsubstanz 60 Minuten bei 30°C inkubiert und die Fluoreszenzpolarisation gemessen (siehe Kapitel 2). Über die jeweiligen Bindungskurven der Proteine wurden die erhaltenen Werte in Proteinkonzentrationen umgerechnet und in eine prozentuale Inhibition umgesetzt. Die gestrichelte Linie zeigt das Auswahlkriterium einer Inhibition von 60%.

Anschließend wurden die Verbindungen in HepG2 Zellen unter dem Mikroskop auf Toxizität überprüft und die Fähigkeit der jeweiligen Substanz, die Kernlokalisierung von STAT3 zu inhibieren, mit einem Immunfluoreszenzverfahren am Mikroskop untersucht. Hier erwiesen sich beide Verbindungen als zytotoxisch, während die anderen untersuchten Testsubstanzen nicht oder nur geringfügig den Transport von STAT3 in den Zellkern inhibierten (Daten nicht gezeigt). Daher wurde aus dieser Hochdurchsatz-Untersuchung kein spezifischer Inhibitor der STAT3-Aktivierung identifiziert.

Weitere Substanzbibliotheken bestehend aus Naturstoffen oder Naturstoffderivaten wurden vom Hans-Knöll-Institut in Jena und vom Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund zur Verfügung gestellt. Die Hochdurchsatz-Untersuchung der insgesamt 4163 Substanzen auf ihre Fähigkeit, an die SH2-Domäne von STAT3 zu binden, ergab jedoch keine weiteren Inhibitorkandidaten von STAT3 (Daten nicht gezeigt).

3.3. In vitro Charakterisierung des STAT3 Inhibitors „Stattic“

STAT3 spielt in der krankhaften Signalübermittlung wie zum Beispiel bei Krebserkrankungen eine bedeutende Rolle, da dieses Protein einen wichtigen Punkt der Konvergenz von Signalen vieler überregulierter Wachstumsfaktoren, Zytokinrezeptoren oder anderen onkogenen Proteinen wie beispielsweise Src bildet. Als Folge führt in Krebszellen ein Ausschalten des STAT3-Proteins unter anderem zur Apoptose, was durch zahlreiche zellbiologische Untersuchungen belegt werden konnte (Yu & Jove, 2004). Dies unterstreicht die Rolle von STAT3 als ein wichtiges Zielprotein bei der Entwicklung neuer Therapien von Krebserkrankungen. So wird die Funktion der STAT3-SH2-Domäne in NIH3T3/v-Src Zellen durch ein Phosphopeptid inhibiert, welches an diese Domäne bindet (Turkson *et al.*, 2001). Der große Vorteil eines kleinen Moleküls, welches analog an das Protein binden würde, liegt also darin, dass es vermutlich sowohl die Aktivierung als auch die Dimerisierung von STAT3 verhindern würde (Abbildung 18).

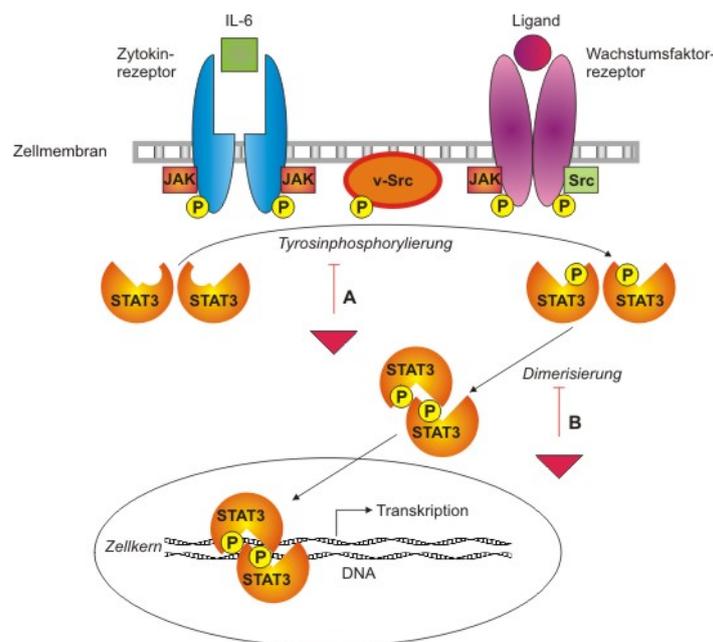


Abb. 18: Mechanismus der Inhibition der STAT3-SH2-Domäne.

Ein kleines Molekül, welches die STAT3-SH2-Domäne bindet, würde das Andocken von STAT3 an die aktivierten Oberflächenrezeptoren (z.B. den IL-6 Rezeptor) und konstitutiv-aktive Tyrosinkinasen (z.B. v-Src) verhindern. Somit wäre die Tyrosinphosphorylierung von STAT3 effektiv und selektiv unterbunden (Fall A). Aber als zweiten Effekt hätte ein solcher Antagonist auch die Fähigkeit, die Dimerisierung derjenigen STAT3 Moleküle zu inhibieren, die bereits am Tyrosinrest phosphoryliert wurden, was die Effizienz der Inhibition erhöht (Fall B).

3.3.1. Stattic

Bei der sequentiellen Analyse der bei der Hochdurchsatz-Untersuchung gefundenen Inhibitor Kandidaten von STAT3 wurde die Substanz MWP00043 aus der Substanzbibliothek von Maybridge als ein kleines organisches Molekül identifiziert, welches spezifisch an die SH2-Domäne von STAT3 bindet. Diese Substanz wurde „Stattic“ genannt (STAT three inhibitory compound) und wurde im Laufe der folgenden Arbeit näher charakterisiert. Betrachtet man die Struktur des 6-Nitro-benzo[*b*]thiophen-1,1-dioxids (Abb. 19), so fällt neben der aromatischen Nitrogruppe besonders das Michael-Akzeptor-System bestehend aus einer Vinylsulfongruppe auf. Beide Reste könnten einen wichtigen Beitrag für die inhibitorische Wirkung auf die STAT3-SH2-Domäne leisten.

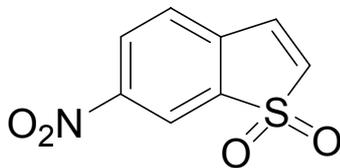


Abb. 19: Stattic.

Die chemische Strukturformel des STAT3 Inhibitors Stattic (STAT three inhibitory compound).

3.3.2. Temperaturabhängigkeit der Inhibition

Die chemische Struktur von Stattic legt die Vermutung nahe, dass es sich beim Mechanismus der Reaktion um eine irreversible Michaeladdition zwischen einer nukleophilen Aminosäure von STAT3 und des Inhibitors handelt. Eine solche kovalente Reaktion wäre stark temperaturabhängig, daher wurde im folgenden Versuch die Bindung von Stattic an die SH2-Domäne von STAT3 bei verschiedenen Temperaturen untersucht.

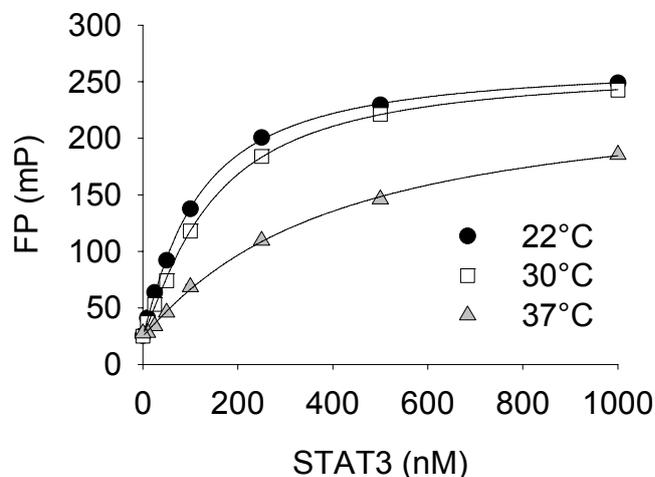


Abb. 20: STAT3-Bindungskurven bei unterschiedlichen Temperaturen.

Die Bindung von 10 nM 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ an die SH2-Domäne von STAT3 wurde mittels Fluoreszenzpolarisation bei den Temperaturen 22°C, 30°C und 37°C untersucht. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Aufgrund der geringen S.A. sind die Fehlerbalken von den Symbolen überlagert.

Dazu wurde zunächst die Temperaturstabilität des Proteins mit dem beschriebenen Fluoreszenzpolarisations-Assay überprüft. Beim Vergleich der Bindung zwischen dem Phosphopeptid 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ und STAT3 stellte sich heraus, dass die Bindungskurven bei 22°C und 30°C vergleichbar waren, während die Kurve bei 37°C deutlich darunter verlief (Abbildung 20). Dies war vermutlich auf eine leichte thermische Labilität des rekombinant erzeugten STAT3-Proteins zurückzuführen, dennoch waren alle drei Bindungskurven für die Untersuchung der Inhibition bei den untersuchten Temperaturen geeignet.

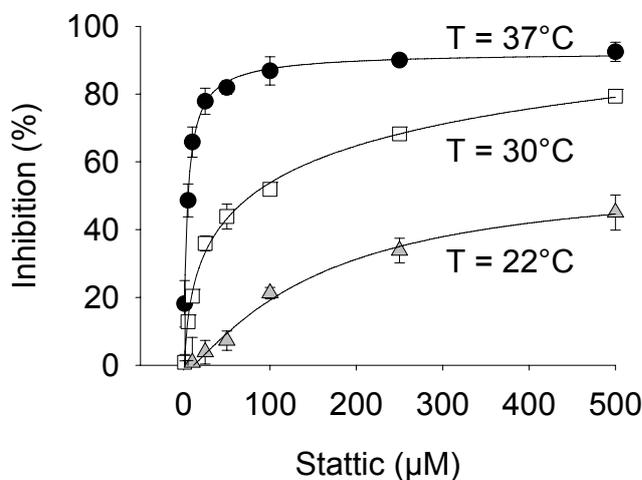


Abb. 21: Temperaturabhängige Inhibition von STAT3 durch Stattic.

Die Inhibition der Bindung zwischen dem Peptid 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ (10 nM) und STAT3 durch Stattic bei verschiedenen Temperaturen (22°C, 30°C und 37°C) wurde mittels Fluoreszenzpolarisierung gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Abbildung 21 zeigt die prozentuale Inhibition der Bindung von 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ an STAT3 durch Stattic bei unterschiedlichen Temperaturen. Dabei wurde das Protein vor Zugabe des Peptids 60 Minuten lang mit verschiedenen Konzentrationen an Stattic bei 22°C, 30°C und 37°C inkubiert und anschließend die Fluoreszenzpolarisierung gemessen. Über die Bindungskurven der jeweiligen Temperatur wurden die FP Werte in eine Proteinkonzentration umgerechnet und als prozentuale Inhibition ausgedrückt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Bindung an die STAT3-SH2-Domäne und die daraus resultierende Inhibition der Bindung des Phosphopeptids an STAT3 stark temperaturabhängig verlief. Während bei Raumtemperatur (22°C) nur eine schwache Aktivität erkennbar war, konnte man bei 30°C bereits eine mittlere Aktivität beobachten. Bei der physiologisch relevanten Temperatur von 37°C zeigte sich eine überaus starke antagonistische Wirkung (der anscheinende IC₅₀ Wert nach 60 Minuten betrug: $5,1 \pm 0,8$ µM). Die moderate Aktivität bei der Hochdurchsatz-Untersuchung (67% und 74%) ist dadurch erklärbar, dass diese Testsubstanz an einem hochsommerlichen Tag mit einer Raumtemperatur von 30°C gefunden wurde. Die starke Abhängigkeit von der Temperatur deutet auf einen irreversibel ablaufenden inhibitorischen Mechanismus hin, der im Folgenden näher untersucht wurde.

3.3.3. Spezifität der Inhibition

Ein besonders wichtiges Kapitel bei der Charakterisierung eines Antagonisten einer Protein-Protein-Interaktion ist die Spezifität. Kleine organische Moleküle, die als Inhibitoren von Proteinkinasen eingesetzt werden, sind oftmals unspezifisch und verhindern meist nicht nur die Kinaseaktivität eines Proteins, sondern vieler Proteine. Der Einsatz chemischer Antagonisten sowohl als biologisches Werkzeug, um ungeklärte Fragestellungen der Signaltransduktion näher zu erforschen, als auch als therapeutisch eingesetzter Wirkstoff, um Krankheiten wie z.B. Krebs zu behandeln, macht zunächst eine Untersuchung der Spezifität notwendig (Knight & Shokat, 2005).

3.3.3.1. Spezifität von Stattic innerhalb der STAT-Familie

Neben einer konstitutiven Aktivität von STAT3 in mehreren Krebsarten sind ebenfalls die STAT-Familienmitglieder STAT1 und STAT5 in einigen Fällen konstitutiv-aktiv (Yu & Jove, 2004). STAT5 besitzt analog zu STAT3 einen onkogenen Charakter (Paukku & Silvennoinen, 2004), während STAT1 als eine Art Gegenspieler von STAT3 angesehen wird und proapoptotisch ist (Stephanou & Latchman, 2005). Aufgrund der unterschiedlichen Wirkungsweisen zwischen STAT3 und STAT1 ist es essentiell bei der Charakterisierung eines STAT3 Antagonisten, auch dessen inhibitorische Wirkung auf STAT1 zu testen. Dazu wurde zunächst die temperaturabhängige Stabilität der STAT1- und STAT5-Bindungskurven mit Fluoreszenzpolarisation überprüft. Da jedoch beide Proteine bei 37°C vermutlich aufgrund einer thermischen Labilität keine stabile Bindungskurve aufwiesen (Abbildung 22), wurden die nachfolgenden Spezifitätsuntersuchungen bei einer Temperatur von 30°C durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurden jeweils STAT3-, STAT1- oder STAT5b-Protein mit steigenden Konzentrationen an Stattic bei 30°C inkubiert, mit dem entsprechenden Fluoreszenzmarkierten Phosphopeptid versehen und die Fluoreszenzpolarisation gemessen. Diese Werte wurden über die jeweiligen Bindungskurven in prozentuale Inhibition umgerechnet und in eine Inhibitionkurve aufgetragen (Abb. 23). Dabei wies Stattic die höchste Aktivität bei der Inhibition der Bindung des Phosphopeptids an die SH2-Domäne von STAT3 auf, während die anderen Familienmitglieder der STAT-Familie geringfügiger durch Stattic beeinflusst wurden. Die entsprechende Stattic-Konzentration für eine 50%-ige Inhibition von STAT3 betrug $52 \pm 12 \mu\text{M}$, während STAT1 und STAT5b bei 250 μM Stattic nur zu $43 \pm 3\%$ und $41 \pm 9\%$ inhibiert waren. Die reduzierte Inhibition der Funktion der SH2-Domänen von STAT1 und STAT5b korrelierte gut mit der Ähnlichkeit der SH2-Domänen der STATs, so sind die

SH2-Domänen von STAT1 und STAT3 zu 78% ähnlich und die von STAT5b und STAT3 zu 59% ähnlich.

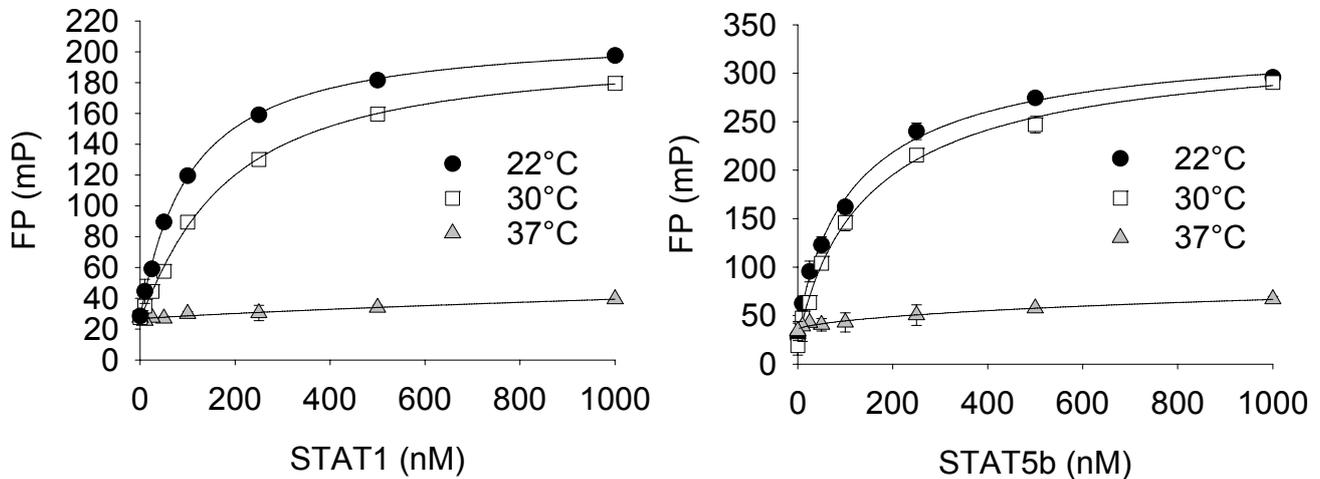


Abb. 22: STAT1 und STAT5 Bindungskurven bei unterschiedlichen Temperaturen.

Die Bindung der Fluoreszenz-markierten Phosphopeptide 5-Carboxyfluorescein-GpYDKPHVL (10 nM, STAT1) und 5-Carboxyfluorescein-GpYLVLDWK (10 nM, STAT5) an die SH2-Domänen von STAT1 und STAT5 wurde bei 22°C, 30°C und 37°C bei steigenden Proteinkonzentrationen mit Fluoreszenzpolarisation gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Aufgrund der geringen S.A. sind die Fehlerbalken von den Symbolen überlagert.

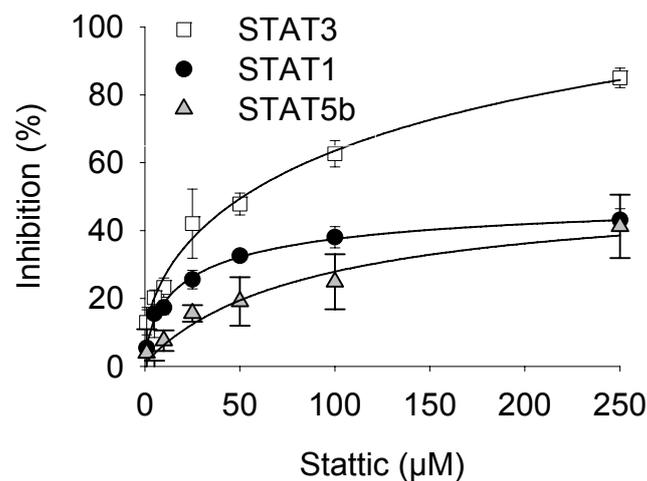


Abb. 23: Spezifität von Stattic innerhalb der STAT-Proteinfamilie.

Je 150 nM der Proteine STAT1, STAT3 und STAT5b wurden mit steigenden Konzentrationen von Stattic bei 30°C 60 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 10 nM des jeweiligen Fluoreszenz-markierten Phosphopeptids wurde die Fluoreszenzpolarisation gemessen und über die Bindungskurven der Proteine in prozentuale Inhibition umgerechnet. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

3.3.3.2. Spezifität von Stattic außerhalb der STAT-Familie

Bei einem Einsatz von Stattic in einem zellulären System ist es essentiell, dass sich die antagonistische Wirkung von Stattic auf das STAT3-Protein beschränkt und andere Protein-Protein-Interaktionen nicht moduliert werden. Daher wurde bei der folgenden Untersuchung neben der Bindung von Stattic an die SH2-Domäne von STAT3, auch die Anlagerung des Antagonisten an die SH2-Domäne von Lck überprüft. Lck ist ein Mitglied der Src-Proteinfamilie und ist im Signalweg der T-Zellen involviert, welcher zu Mitose und Wachstum von T-Zellen führt (Singer & Koretzky, 2002). Weiterhin wurde der Einfluss von Stattic auf die Dimerisierung der Transkriptionsfaktoren c-Myc und Max und auf die Homodimerisierung von Jun betrachtet. Die Myc-Familienmitglieder sind Transkriptionsfaktoren, die eine Transkriptionsaktivierungsdomäne in der N-terminalen Region und eine Transkriptionsregulator-Domäne mit einer basischen Domäne (b), einer Helix-loop-helix-Domäne (HLH) und einer Leucin-Reißverschluss-Domäne (Zip) in der Nähe des C-terminalen Endes haben. Myc-Proteine bilden Heterodimere mit dem Max-Protein über die C-terminale Helix des HLH Motivs und der Leucin-Reißverschluss-Domäne und die Myc/Max-Komplexe aktivieren die Transkription bis zu 15% aller Gene eines Organismus, in dem sie spezifisch an das E-Box Motiv (CACGTG) über ihre basische Region binden (Dang *et al.*, 1999). Das Protein c-Jun besteht aus einer C-terminalen basischen Region (b) und Leucin-Reißverschluss-Domäne (Zip) und einer N-terminalen Transkriptionsaktivierungsdomäne. Es gehört zu einer großen Gruppe von bZip-Proteinen, die homo- und heterodimere Komplexe bilden können, die wiederum an das TRE-DNA-Erkennungsmotiv (*TPA response element*) binden. Die Komplexe zusammengenommen bilden den generischen Transkriptionsfaktor AP-1 (*activator protein-1*) (Dunn *et al.*, 2002). Während bei der physiologisch relevanten Temperatur von 37°C mit steigender Konzentration an Stattic effektiv die Bindung des Phosphopeptids 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ an die SH2-Domäne von STAT3 inhibiert wurde, wurde die Bindung des Phosphopeptids 5-Carboxyfluorescein-GpYEEIP an Lck nur wenig beeinflusst (Abbildung 24). Dies zeigte, dass Stattic bevorzugt an die SH2-Domäne von STAT3 bindet. Auch die Dimerisierung der Proteine c-Myc und Max bzw. die Homodimerisierung von Jun wurde durch Stattic kaum inhibiert. Dies deutete darauf hin, dass Stattic spezifisch an die STAT3-SH2-Domäne bindet.

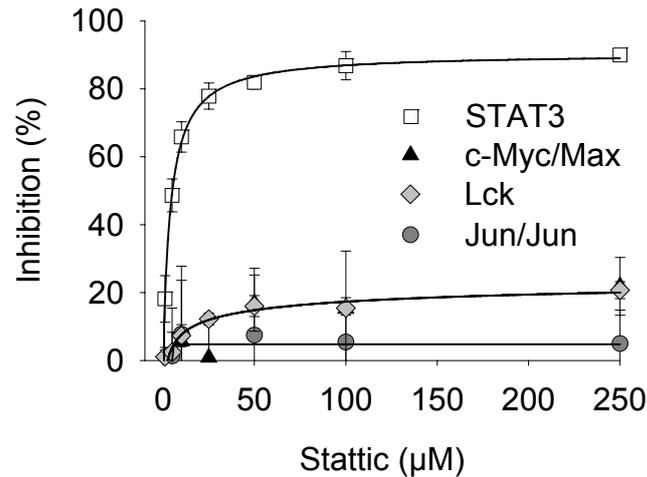
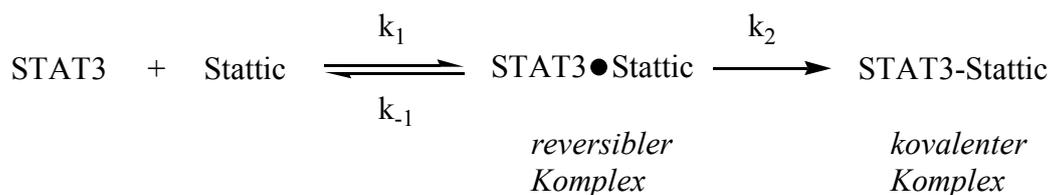


Abb. 24: Spezifität von Stattic bei Protein-Protein-Interaktionen.

Die antagonistische Wirkung von Stattic auf bestimmte Protein-Protein-Interaktionen wurde mit Fluoreszenzpolarisation untersucht. Dabei wurden die Proteine im jeweiligen Puffer (siehe Material und Methoden) 60 Minuten bei 37°C mit steigenden Konzentrationen an Stattic inkubiert, anschließend die jeweiligen Fluoreszenz-markierten Phosphopeptide oder Oligonukleotide zugesetzt und die Fluoreszenzpolarisation gemessen. Es wurden die Bindung von 10 nM 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ an 370 nM STAT3 und 10 nM 5-Carboxyfluorescein-GpYEEIP an 100 nM Lck getestet. Für eine mögliche Inhibition der c-Myc/Max und Jun/Jun Dimerisierung durch Stattic wurde die Bindung von 3 nM des Oligonukleotids EBox-TR an 50 nM Jun/Jun bzw. an 30 nM c-Myc/Max Dimer untersucht und die Fluoreszenzpolarisation gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel ± S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

3.3.4. Kinetische Betrachtungen

Die bisherigen Ergebnisse der Charakterisierung von Stattic deuteten darauf hin, dass Stattic bevorzugt die Funktion der SH2-Domäne von STAT3 inhibiert und dass diese Reaktion temperaturabhängig verläuft, was auf einen irreversibel ablaufenden Mechanismus hindeuten würde. Betrachtet man sich die mögliche Kinetik einer solchen Reaktion, so würde sich zunächst ein reversibler Komplex zwischen dem Inhibitor Stattic und STAT3 bilden. In einem langsameren chemischen Schritt würde dann eine kovalente Bindung gebildet, es würde der kovalente STAT3-Stattic Komplex entstehen. Dabei wäre die Geschwindigkeitskonstante k_2 der langsameren Reaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Powers *et al.*, 2002).



Da die Konzentrationen von Stattic sehr viel höher sind als die eingesetzte Proteinkonzentration an STAT3, kann die Kinetik durch die Gleichung von Kitz und Wilson beschrieben werden (Kitz & Wilson, 1962).

$$k' = \frac{k_2}{1 + \frac{K_i}{[\text{Stattic}]}}$$

Diese Gleichung kann auch in linearisierter Form dargestellt werden:

$$\frac{1}{k'} = \frac{K_i}{k_2 [\text{Stattic}]} + \frac{1}{k_2}$$

$$K_i = \frac{[\text{STAT3}][\text{Stattic}]}{[\text{STAT3} \bullet \text{Stattic}]}$$

K_i ist hierbei die Dissoziationskonstante des STAT3/Stattic Komplexes und k_2 ist die maximale Geschwindigkeitskonstante falls das Protein mit Inhibitor gesättigt vorliegt.

3.3.4.1. Einfluss des Phosphopeptids auf die Kinetik

Neben dem jeweiligen Protein und dem Antagonisten Stattic liegt auch das entsprechende Fluoreszenz-markierte Phosphopeptid in der Reaktionsmischung vor und könnte daher ebenfalls eine Auswirkung auf die Kinetik haben. Um dieses zu untersuchen, wurde das STAT3-Protein mit Stattic bei 37°C inkubiert, anschließend das Phosphopeptid zugesetzt und die Fluoreszenzpolarisation gemessen. Im zweiten Fall wurde das Protein zusammen mit dem Phosphopeptid und dem Inhibitor 60 Minuten lang inkubiert und analog die Fluoreszenzpolarisation gemessen. Es gab keine nennenswerten Unterschiede in der jeweils resultierenden Inhibitionskurve (Abbildung 25), was darauf hindeutet, dass das Phosphopeptid bei der kinetischen Betrachtung vernachlässigbar ist.

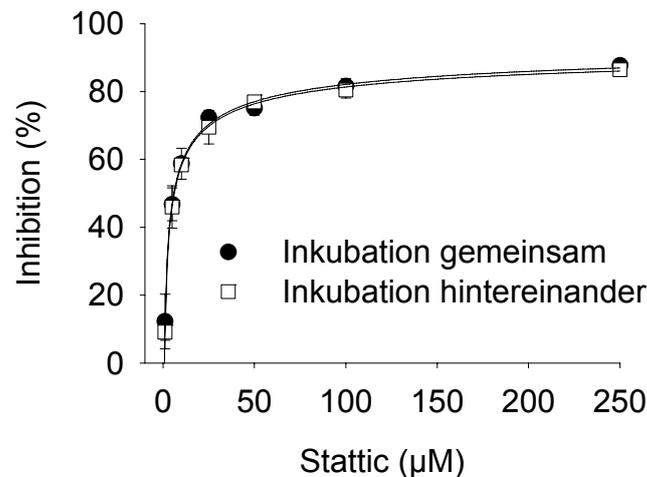


Abb. 25: Beeinflussung der Bindung zwischen STAT3 und dem Phosphopeptid durch die Reihenfolge der Zugabe der Reagenzien.

Inkubation gemeinsam: Stattic wurde zusammen mit 370 nM STAT3 und 10 nM 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Inkubation hintereinander: Stattic wurde mit 370 nM STAT3 60 Minuten lang bei 37°C behandelt, erst dann wurden 10 nM 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ zugegeben. In beiden Fällen wurde die Fluoreszenzpolarisation gemessen und in prozentuale Inhibition umgerechnet. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Auch bei einer Inkubation bei 30°C wurde die Bindung von 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ an STAT3, von 5-Carboxyfluorescein-GpYDKPHVL an STAT1 und von 5-Carboxyfluorescein-GpYLVLDWK an STAT5b nicht durch die Reihenfolge der Zugabe der Reagenzien beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Daher wurde auch in diesen Fällen das jeweilige Phosphopeptid bei der Untersuchung der Kinetik vernachlässigt.

3.3.4.2. Zeitabhängigkeit der Inhibition von STAT3

Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Bindung von 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ an die STAT3-SH₂-Domäne durch Stattic stark abhängig von der Temperatur verlief, was ein erster Hinweis auf eine irreversibel ablaufende Reaktion war. Falls die Reaktion tatsächlich über eine kovalente Bindung zwischen dem STAT3-Protein und Stattic ablaufen sollte, wäre die Inhibition auch zeitabhängig. Daher wurde im folgenden STAT3-Protein zusammen mit verschiedenen Konzentrationen an Stattic und dem STAT3-Phosphopeptid bei 37°C über unterschiedliche Zeitpunkte hinweg inkubiert und die Fluoreszenzpolarisation gemessen.

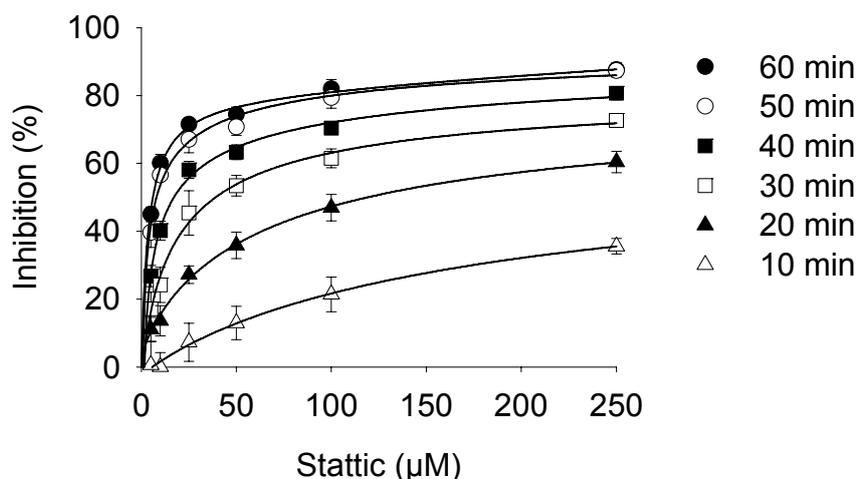


Abb. 26: Die Inhibition der Bindung zwischen STAT3 und dem Phosphopeptid verlief zeitabhängig.

370 nM STAT3 wurde zusammen mit 10 nM 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ und verschiedenen Konzentrationen an Stattic für 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten bei 37°C inkubiert, die Fluoreszenzpolarisation gemessen und die FP Werte über die jeweilige Bindungskurve in prozentuale Inhibition umgerechnet. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Die Abbildung 26 demonstriert, dass die Inhibition der Bindung des Phosphopeptids an STAT3 durch Stattic tatsächlich zeitabhängig verlief. Während die Messung nach 10 Minuten eine relativ schwach ansteigende Inhibitionskurve lieferte, war die Inhibition der Bindung nach 60 Minuten deutlich stärker. Eine Quantifizierung der IC₅₀ Werte der einzelnen Bindungskurven konnte dieses Ergebnis bestätigen (Tabelle 4) und lieferte damit einen weiteren Hinweis auf einen kovalent ablaufenden Mechanismus. So lag der IC₅₀ Wert der Inhibitionskurve von 10 Minuten noch über 250 μ M, während nach 60 Minuten Reaktionszeit der IC₅₀ Wert mit $6 \pm 1 \mu$ M deutlich niedriger lag.

Zeitpunkt (min)	IC ₅₀ (μ M)
10 min	> 250 μ M
20 min	$120 \pm 29 \mu$ M
30 min	$40 \pm 10 \mu$ M
40 min	$17 \pm 2 \mu$ M
50 min	$8 \pm 2 \mu$ M
60 min	$6 \pm 1 \mu$ M

Tabelle 4: IC₅₀ Werte aus den Inhibitionskurven aus Abbildung 25.

Der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei Einzelmessungen ergaben die IC₅₀ Werte der Tabelle.

3.3.4.3. Kinetische Betrachtung der Inhibition innerhalb der STAT-Proteinfamilie

Da die rekombinanten Fusionsproteine STAT1 und STAT5b bei 37°C nicht stabil waren (Abb. 22), wurde die Untersuchung der Kinetik der STAT-Proteine bei einer Temperatur von 30°C durchgeführt. STAT3-Protein wurde zusammen mit verschiedenen Konzentrationen an Stattic und dem Phosphopeptid bei 30°C über unterschiedliche Zeitpunkte hinweg inkubiert und die Fluoreszenzpolarisation gemessen. Nach der Umrechnung in prozentuale Inhibition wurden diese Werte in einer halblogarithmischen Skala aufgetragen (Abb. 27).

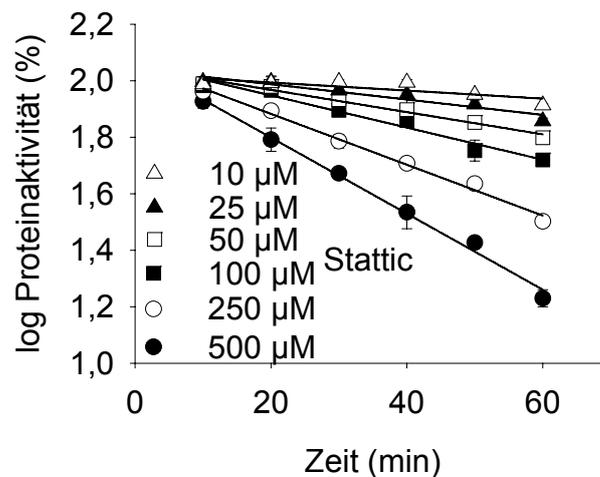


Abb. 27: Zeitabhängige Inhibition der Bindung zwischen STAT3 und dem Phosphopeptid.

150 nM STAT3 wurde zusammen mit 10 nM 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ und verschiedenen Konzentrationen an Stattic für 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten bei 30°C inkubiert, die Fluoreszenzpolarisation gemessen und die FP Werte in prozentuale Proteinaktivität umgerechnet. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel ± S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

In dem halblogarithmischen aufgetragenen Diagramm der Proteinaktivität gegen die Zeit bei der Inhibition der Bindung des Fluoreszenz-markierten Phosphopeptids GpYLPQTV an STAT3 konnte man analog zur Abbildung 26 eine zeitabhängige Inhibition der Reaktion durch Stattic auch bei einer Reaktionstemperatur von 30°C erkennen. Dies äußerte sich in den unterschiedlichen Steigungen der Geraden in dem Diagramm.

5-Carboxyfluorescein-GpYDKPHVL und STAT1 wurden analog mit verschiedenen Konzentrationen an Stattic 10-60 Minuten bei 30°C inkubiert und die daraus resultierenden Inhibitionen der Bindung des Peptids an die SH2-Domäne von STAT1 in ein halblogarithmisches Diagramm eingetragen (Abb. 28). Zwar konnte auch in diesem Fall eine leichte Zeitabhängigkeit der Reaktion beobachtet werden, allerdings war die Inhibitionrate im Vergleich zu STAT3 deutlich niedriger (Abb. 23).

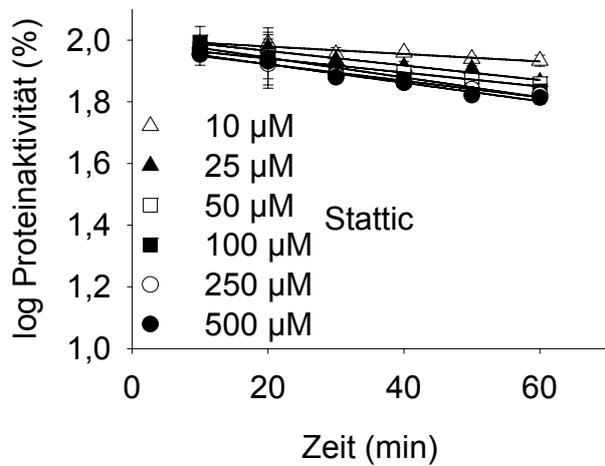


Abb. 28: Zeitabhängige Inhibition der Bindung zwischen STAT1 und dem Phosphopeptid.

150 nM STAT1 wurde zusammen mit 10 nM 5-Carboxyfluorescein-GpYDKPHVL und verschiedenen Konzentrationen an Static für 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten bei 30°C inkubiert, die Fluoreszenzpolarisation gemessen und die FP Werte in prozentuale Proteinaktivität umgerechnet. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Auch STAT5 und das Phosphopeptid 5-Carboxyfluorescein-GpYLVLDWK wurden in einer Reaktion zusammen mit denselben Konzentrationen an Static für 10-60 Minuten bei 37°C inkubiert, die Fluoreszenzpolarisation gemessen und die halblogarithmisch aufgetragenen Inhibitionskurven gegen die Zeit betrachtet (Abb. 29). Wie schon bei STAT3 und STAT1 war wieder eine leichte Zeitabhängigkeit der Inhibition zu sehen, aber diese war im Vergleich zu STAT3 ebenfalls deutlich niedriger ausgeprägt.

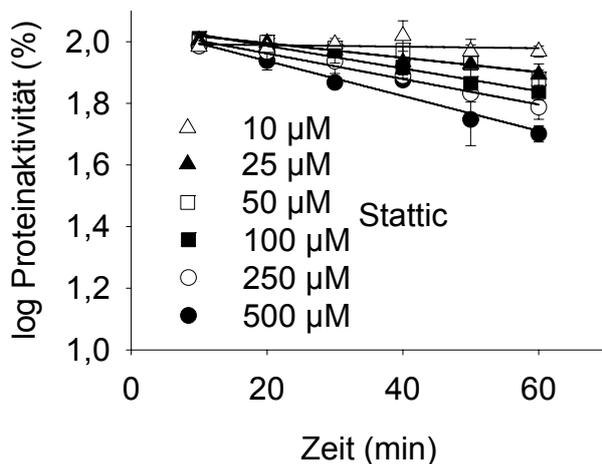


Abb. 29: Zeitabhängige Inhibition der Bindung zwischen STAT5b und dem Phosphopeptid.

150 nM STAT5b wurde zusammen mit 10 nM 5-Carboxyfluorescein-GpYLVLDWK und verschiedenen Konzentrationen an Static für 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten bei 30°C inkubiert, die Fluoreszenzpolarisation gemessen und die FP Werte in prozentuale Proteinaktivität umgerechnet. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Die Reaktionsgleichung der Kinetik lässt sich rechnerisch folgendermaßen abbilden (siehe Kapitel 3.3.4.):

$$\frac{1}{k'} = \frac{K_i}{k_2 [\text{Stattic}]} + \frac{1}{k_2}$$

Man erhält also eine Geradengleichung mit $1/k'$ und $1/[\text{Stattic}]$ als Variablen. k' ist hierbei die beobachtete Geschwindigkeitskonstante beim jeweiligen Zeitpunkt. Dieser Wert entspricht den Steigungen aus den Diagrammen 27 bis 29. Trägt man die Steigungen aus diesen Graphen in ein doppelt-reziprokes Folgediagramm mit der reziproken Steigung gegen die reziproke Stattic-Konzentration ein (Abb. 31), kann man aus diesem leicht die Geschwindigkeitskonstante k_2 ableiten, um die Inhibitionsrate zu charakterisieren. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der y-Achse entspricht dabei dem Wert $1/k_2$.

Protein	k_2
STAT3	$12 \pm 2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$
STAT1	$3 \pm 1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$
STAT5b	$5 \pm 1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$

Tabelle 5: Ermittelte Geschwindigkeitskonstanten aus der kinetischen Untersuchung.

Die Steigungen (k') aus der halblogarithmischen Auftragung der prozentualen Proteinaktivität gegen die Zeit (Abb. 27-29) wurden in ein Sekundärdiagramm mit $1/k'$ gegen die reziproke Konzentration an Stattic übertragen. Der Schnittpunkt der resultierenden Geraden mit der y-Achse lieferte die Geschwindigkeitskonstante k_2 der jeweiligen Inhibition. Gezeigt wird das Mittel \pm S.A. aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Ein Vergleich der erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten (Tabelle 5) deutete darauf hin, dass die Inhibition der Bindung des Phosphopeptids an die STAT3-SH2-Domäne irreversibel mit einer Geschwindigkeitskonstante $k_2 = 12 \pm 2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ verläuft. Auch die Bindung der jeweiligen Phosphopeptide an STAT1 und STAT5 scheint durch Stattic über eine irreversible Reaktion inhibiert zu werden, allerdings mit signifikant niedrigeren Geschwindigkeitskonstanten.

3.3.4.4. Kinetische Betrachtung der Inhibition von Lck

Ein Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten bei der Inhibition der jeweiligen Phosphopeptide an die STAT-Proteine deutete zwar darauf hin, dass innerhalb der STAT-Proteinfamilie aufgrund der Ähnlichkeiten innerhalb der SH2-Domänen es ebenfalls zu einer kovalent ablaufenden Reaktion kommt, aber dass Stattic bevorzugt an STAT3 bindet. Daher

stellte sich nun die Frage, ob Stattic auch an andere Proteine irreversibel binden kann. Um diese Fragestellung exemplarisch zu beantworten, wurde im folgenden Versuch das Phosphopeptid 5-Carboxyfluorescein-GpYEEIP zusammen mit dem Protein Lck und verschiedenen Konzentrationen an Stattic für 10-60 Minuten analog zu den vorherigen kinetischen Versuchen bei 30°C inkubiert. Nach dem Messen der Fluoreszenzpolarisation wurden die Werte in prozentuale Proteinaktivität umgerechnet und in einem halblogarithmischen Diagramm aufgetragen (Abb. 30). Die Reaktion verlief unabhängig von der Zeit, was darauf hindeutet, dass Stattic keine irreversible Reaktion mit der SH2-Domäne von Lck eingeht

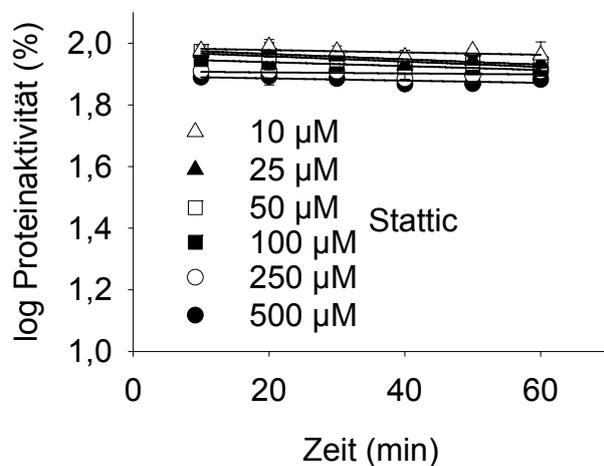


Abb. 30: Zeitabhängige Inhibition der Bindung zwischen Lck und dem Phosphopeptid.

30 nM Lck wurde zusammen mit 10 nM 5-Carboxyfluorescein-GpYEEIP und verschiedenen Konzentrationen an Stattic für 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten bei 30°C inkubiert, die Fluoreszenzpolarisation gemessen und die FP Werte in prozentuale Proteinaktivität umgerechnet. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

3.3.4.5. Kompetitivreaktion zwischen Stattic und Ac-pYLPQTV-NH₂

Man unterscheidet zwischen kompetitiver, nicht-kompetitiver und unkompetitiver Inhibition (Whiteley, 2000). Als kompetitiver Antagonist wird in der Pharmakologie eine Substanz bezeichnet, die an ein bestimmtes Protein bindet und dabei mit einem anderen Substrat entsprechend dem Massenwirkungsgesetz um dieselbe Bindungsstelle konkurriert. Bei einer nicht-kompetitiven Kinetik binden beide Moleküle voneinander unabhängig an zwei verschiedene Positionen im Protein. Beim dritten Fall, der unkompetitiven Hemmung, kann der eine Antagonist nur an einen Komplex aus dem Protein und dem Substrat binden, nicht jedoch an das freie Protein. Es besteht also eine direkte Abhängigkeit beider Substanzen zueinander.

Es konnte gezeigt werden, dass das Phosphopeptid Ac-pYLPQTV-NH₂ die Bindung zwischen 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ und STAT3 inhibiert, indem es die STAT3-SH2-Domäne blockiert (Kapitel 3.1.2.6.). Auch gab es deutliche Hinweise darauf, dass Stattic in einer irreversibel ablaufenden Reaktion ebenfalls an die SH2-Domäne von STAT3 bindet

(Kapitel 3.3.4.). Im nächsten Schritt galt es daher zu demonstrieren, dass die antagonistische Wirkung von Stattic dadurch zustande kommt, dass Stattic in einer kovalent ablaufenden Reaktion an derselben Stelle im Protein bindet, an die auch das Phosphopeptid 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ andockt. Es wurde analog zu Kapitel 3.3.4.3. STAT3-Protein zusammen mit verschiedenen Konzentrationen an Stattic und dem Phosphopeptid 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ für 10-60 Minuten bei 30°C inkubiert und die Fluoreszenzpolarisation gemessen. Zusätzlich wurde diese Kinetikuntersuchung in Gegenwart des STAT3-SH2-Domäne bindenden Phosphopeptids Ac-pYLPQTV-NH₂ wiederholt und anhand einer doppelt-reziproken Auswertung der Kinetiken (siehe Kapitel 3.3.4.3.) untersucht, ob Stattic und das Phosphopeptid zueinander kompetitiv, nicht-kompetitiv oder unkompetitiv reagieren.

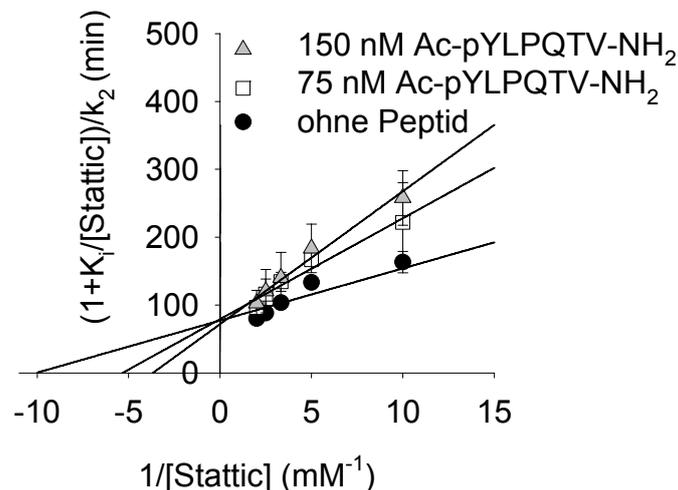


Abb. 31: Stattic und Ac-pYLPQTV-NH₂ waren zueinander kompetitiv.

150 nM STAT3 wurde zusammen mit verschiedenen Konzentrationen an Stattic und 10 nM 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ für 10-60 Minuten bei 30°C inkubiert und die Fluoreszenzpolarisation gemessen. Dabei wurden zwei Reaktionsansätze zusätzlich mit 75 nM oder 150 nM Ac-pYLPQTV-NH₂ behandelt. Die FP Daten wurden in prozentuale Proteinaktivität umgerechnet und in ein halblogarithmisches Diagramm (vgl. Kapitel 3.3.4.3.) übertragen. Die reziproken Steigungen aus diesen Diagrammen wurden in das obige Sekundärdiagramm gegen die reziproke Konzentration an Stattic aufgetragen. Alle drei Geraden schneiden sich in einem Punkt auf der y-Achse (entspricht dem Wert 1/k₂). Das Peptid Ac-pYLPQTV-NH₂ reagierte also kompetitiv mit Stattic. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel ± S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Die drei Geraden aus Abbildung 31 schneiden sich näherungsweise in einem Punkt auf der y-Achse, welcher der Geschwindigkeitskonstanten k₂ aus dem obigen Kinetikmodell entspricht (siehe Kapitel 3.3.4.3.). Man kann also folgern, dass im Rahmen der Messungenauigkeit alle drei Reaktionen dieselbe Geschwindigkeitskonstante k₂, aber verschiedene Dissoziationskonstanten K_i aufwiesen. Daher waren Stattic und das Phosphopeptid Ac-

pYLPQTV-NH₂ zueinander kompetitiv und konkurrierten um dieselbe Bindungsstelle im STAT3-Protein. Dies deutete darauf hin, dass die antagonistische Wirkung von Stattic aufgrund einer kovalenten Bindung innerhalb des STAT3-Proteins zustande kommt.

3.3.5. Physiologische Antagonisten von Stattic

Bislang wurde bei der Betrachtung der Inhibition der Bindung des Phosphopeptids 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ an die STAT3-SH2-Domäne nur die Beziehung der direkten Interaktionspartner zueinander bzw. die Wirkung von Stattic auf andere Proteine untersucht. Dabei wurde jedoch nicht berücksichtigt, dass bei einem Einsatz von Stattic in einem physiologisch relevanten Umfeld, wie zum Beispiel in einem zellulären System oder *in vivo*, neben verschiedenen Proteinen und Stattic auch viele andere Moleküle, wie zum Beispiel freie Aminosäuren vorkommen, die ebenfalls eine chemische Reaktion mit Stattic eingehen könnten und damit die inhibitorische Wirkung des STAT3-Inhibitors erheblich schwächen würden.

Daher wurden neben dem Phosphopeptid 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂, STAT3 und Stattic mehrere Konzentrationen an Lysin, Serin, Threonin, Cystein, BOC-Cystein, Glutathion in oxidiert und reduzierter Form, sowie Dithiothreitol inkubiert. Die Behandlung für 60 Minuten bei 30°C mit anschließender Messung der Fluoreszenzpolarisation ergab, dass die Aminosäuren Lysin, Serin und Threonin keinen Einfluss auf die inhibitorische Wirkung von Stattic auf die Bindung des Phosphopeptids an die SH2-Domäne von STAT3 ausübten (Abb. 32). Lysin gehört zur Gruppe der proteinogenen Aminosäuren und besitzt einen basischen Charakter. Auch Serin und Threonin sind proteinogene Aminosäuren und besitzen eine nukleophile Hydroxylgruppe, die ebenfalls eine chemische Reaktion mit Stattic eingehen könnte. Während die durch die Schutzgruppe t-Butyloxycarbonyl (BOC) geschützte proteinogene Aminosäure BOC-Cystein keinen Einfluss auf die Reaktion hatte, reduzierte interessanterweise das freie Cystein die antagonistische Reaktion von Stattic um etwa 40% bei einer Konzentration von 2 mM (Abb. 32). Dies deutete an, dass ein Cystein in der SH2-Domäne von STAT3 möglicherweise als nukleophile Aminosäure bei der inhibitorischen Reaktion als Donor für den Michael-Akzeptor Stattic dienen könnte. Glutathion verhinderte sowohl in der reduzierten als auch in der oxidierten Form zumindest teilweise die Reaktion (Abb. 32). Glutathion, ein Tripeptid aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin, ist in fast allen Zellen teilweise auch in höherer Konzentration vorhanden, da es eine starke antioxidative Wirkung ausübt und in den Zellen eine Schutzfunktion innehat. Daher würde man bei einem

Einsatz von Stattic in einem zellulären System wohl einen leicht erhöhten IC_{50} Wert im Vergleich zu den Fluoreszenzpolarisations-Experimenten erwarten, da Stattic in den Zellen nur zum Teil aktiv ist. Dithiothreitol (DTT) ist eine chemische Verbindung, die häufig in der Molekularbiologie eingesetzt wird, um bei Proteinen in Lösung die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen (SH-) zu Disulfidbrücken zu verhindern. Bereits bei der Etablierung eines Hochdurchsatz-Verfahrens auf der Basis von Fluoreszenzpolarisation wurde beobachtet, dass die Zugabe von DTT zum Puffer die inhibitorische Wirkung von Stattic verhinderte (Daten nicht gezeigt). Bei Konzentrationen von DTT über 1 mM fand nahezu keine Inhibition mehr statt (Abb. 32). Da DTT unter physiologischen Bedingungen nicht vorkommt, hat dieses Ergebnis nur für *in vitro* Assays eine Bedeutung.

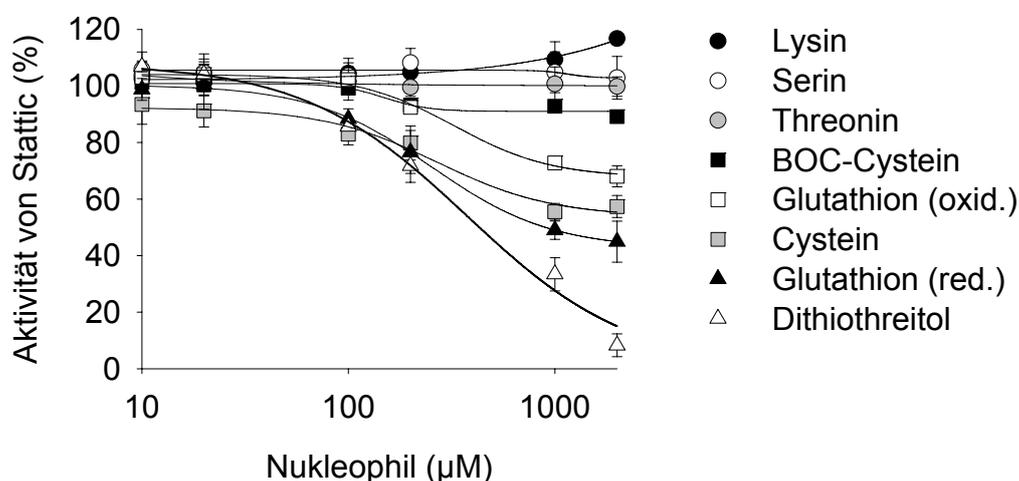


Abb. 32: Antagonistische Substanzen von Stattic.

150 nM STAT3 wurde zusammen mit 100 µM Stattic, 10 nM 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ und verschiedenen Konzentrationen an den Nukleophilen Lysin, Serin, Threonin, *t*-Butyloxycarbonylcystein (BOC-Cystein), Glutathion (oxidiert), Cystein, Glutathion (reduziert) oder Dithiothreitol (DTT) für 60 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach dem Messen der Fluoreszenzpolarisation wurden die Werte in prozentuale Aktivität von Stattic umgerechnet. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel ± S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

3.3.6. Struktur-Wirkungs-Beziehung

Bei der Charakterisierung eines Antagonisten spielt die so genannte Struktur-Wirkungs-Beziehung eine zentrale Rolle, da man so weitere Erkenntnisse für den chemischen Mechanismus der inhibitorischen Reaktion gewinnen kann. Bei einem Vergleich der Inhibition der Bindung des Fluoreszenz-markierten Phosphopeptids an die SH2-Domäne von STAT3 zwischen Stattic und Verbindung **2**, wurde die Notwendigkeit der aromatischen

Nitrogruppe in Stattic deutlich. Ein Austausch zwischen der Nitrogruppe in Stattic zu der Aminogruppe in Verbindung **2** bewirkte ein deutliches Absinken der prozentualen Inhibition von $87 \pm 4\%$ auf $8 \pm 4\%$ bei 60-minütiger Inkubation mit $100 \mu\text{M}$ Stattic (Tabelle 6). Dies konnte auch durch den Test der Verbindung **3** bestätigt werden. Hier wurde die Nitrogruppe durch ein Wasserstoffatom ersetzt, was ein Absinken der antagonistischen Aktivität auf $18 \pm 5\%$ zur Folge hatte (Tabelle 6). Neben der Nitrogruppe war die Betrachtung der Doppelbindung in der Vinylsulfongruppe, welche ein Michael-System darstellt, von besonderem Interesse. In der Tat bewirkte eine Sättigung der Doppelbindung in Verbindung **4** ebenfalls einen drastischen Abfall der prozentualen Inhibition auf $12 \pm 2\%$ (Tabelle 6). Zusammenfassend deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass Stattic über eine kovalent ablaufende Reaktion an das STAT3-Protein bindet und damit die Bindung des Phosphopeptids an die STAT3-SH2-Domäne inhibiert.

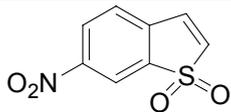
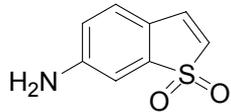
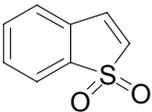
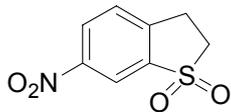
Bezeichnung	Strukturformel	STAT3
Stattic		$87 \pm 4\%$
2		$8 \pm 4\%$
3		$18 \pm 5\%$
4		$12 \pm 2\%$

Tabelle 6: Struktur-Wirkungs-Beziehung von Stattic.

370 nM STAT3 wurde zusammen mit 10 nM 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ und $100 \mu\text{M}$ der entsprechenden chemischen Testsubstanz 60 Minuten bei 37°C inkubiert und die Fluoreszenzpolarisation gemessen. Diese Werte wurden in prozentuale Inhibition der Bindung des Peptids an STAT3 umgerechnet und das Mittel + S.A. aus drei unabhängigen Messungen in die Tabelle übertragen.

3.4. Charakterisierung von Stattic in zellbiologischen Assays

Im Allgemeinen werden in der biologisch-medizinischen Grundlagenforschung zur Prüfung und Charakterisierung der Verträglichkeit und Wirksamkeit vieler Substanzen Tierexperimente eingesetzt. In den letzten Jahren werden jedoch zunehmend Ersatz- bzw. Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen entwickelt und erfolgreich verwendet. Dabei handelt es sich um *in vitro* Testsysteme, die einfache oder komplexe physiologische und biochemische Prozesse bzw. Reaktionen des Gesamtorganismus repräsentieren. Mit ihnen können Aspekte der Wirkung aufgeklärt werden, es ergeben sich aber auch Möglichkeiten, spezielle Fragen, wie Mechanismus und Lokalisierung von Wirkung und Disposition von Wirkstoffen zu bearbeiten. Den größten Teil unter den *in vitro* Methoden nehmen die Zellkulturen ein. Ein besonderes Problem ist jedoch die Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen. Dies kann umgangen werden, indem humane menschliche Zelllinien verwendet werden. Humanes Gewebe, z.B. aus Biopsiematerial, für entsprechende Primärkulturen zu erhalten, ist derzeit aus unterschiedlichen Gründen sehr schwierig und teuer. Daher kommen überwiegend humane Zelllinien zum Einsatz. Diese Zellen sind genetisch gesehen identisch zu den Primärzellen, somit entfallen aufwendige, die Zellmorphologie bzw. –aktivität einschränkende Isolierung und Reinigung. Die Arbeit mit permanenten Zelllinien hat weiterhin den Vorteil, dass diese eine sehr hohe Lebensdauer haben und über Jahre hinweg durch Passagieren vermehrt werden können.

3.4.1. Zellbiologische Assays mit HepG2 Zellen

Die humane Zelllinie HepG2 wurde 1979 aus einer Leberbiopsie eines Kindes, welches an einem primären Hepatoblastom erkrankt war, isoliert (Aden *et al.*, 1979). Diese Zelllinie besitzt noch viele Funktionen, die für normale humane Hepatozyten typisch sind. Da die Leber den Großteil des Metabolismus von Fremdstoffen im Organismus übernimmt, werden oft Hepatozyten verwendet, wenn komplexe Fremdstoff-metabolische Untersuchungen durchgeführt werden sollen. Es ist bekannt, dass STAT3 in Hepatozyten durch den Liganden Interleukin-6 (IL-6) konstitutiv-aktiv wird (Kordula T. *et al.*, 1995), somit wurde diese Zelllinie als erstes Modell bei der *in vitro* Untersuchung von Stattic herangezogen.

3.4.1.1. Phosphorylierung von STAT3 im Western Blot

Die große Stärke einer chemischen Substanz, die die Funktion der STAT3-SH2-Domäne inhibiert, liegt darin, dass diese sowohl die Aktivierung von STAT3 als auch die Dimerisierung inhibieren würde. Daher wurde zunächst untersucht, ob Stattic in HepG2

Zellen die Aktivierung von STAT3 unterbindet. In Hepatozyten phosphoryliert der Ligand IL-6 über den gp130-Rezeptor und die JAKs das STAT3-Protein am Tyrosin 705 und diese Phosphorylierung wird durch Transfektion von dominant-negativem STAT3 verhindert (Kaptein *et al.*, 1996b). Gleichzeitig sollten andere Signalwege nicht von der antagonistischen Wirkung betroffen sein. Als Kontrolle wurde parallel untersucht, ob die IFN- γ induzierte STAT1-Phosphorylierung am Tyrosin 701 ebenfalls durch Stattic inhibiert wird. Aufgrund der Ähnlichkeit der SH2 Domänen der beiden Proteine (78% ähnlich), bot dieses System die Möglichkeit, zu untersuchen, ob Stattic spezifisch nur auf die Tyrosinphosphorylierung von STAT3 Einfluss nimmt.

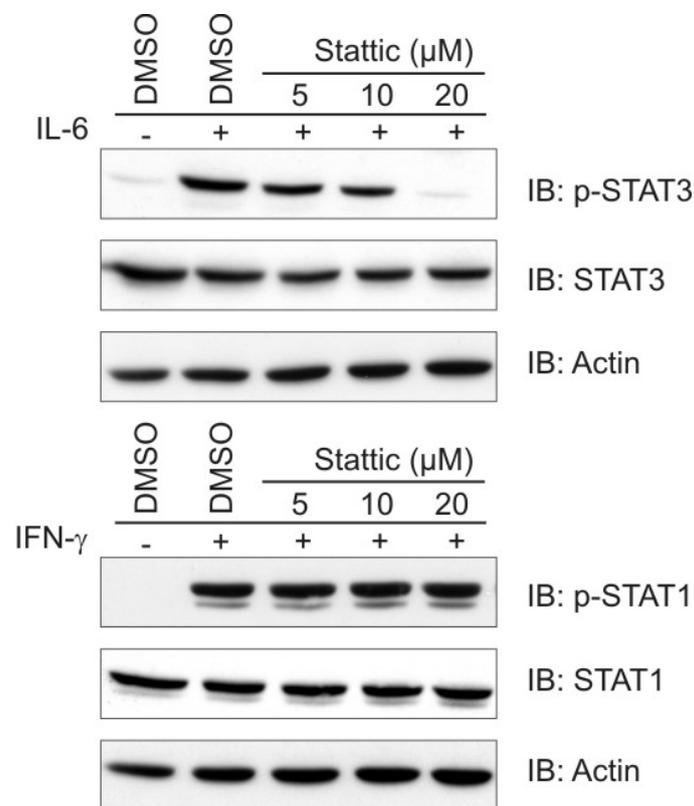


Abb. 33: Spezifische Inhibition der Tyrosinphosphorylierung von STAT3 in HepG2 Zellen durch Stattic in der Westernblotanalyse.

HepG2 Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreien Medium kultiviert und 60 Minuten mit den angegebenen Konzentrationen an Stattic oder 1% DMSO behandelt. Anschließend wurden die Zellen entweder für 25 Minuten mit 50 ng/mL IL-6 oder für 15 Minuten 50 ng/mL IFN- γ stimuliert. Etwa 50 μ g des Totallysats wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse mit den Antikörpern p-STAT3 (Y705), STAT3, p-STAT1 (Y701) und STAT1 analysiert. Ein Antikörper gegen Actin diente als Ladekontrolle.

Dazu wurden gehungerte HepG2 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Stattic behandelt und entweder mit IL-6 oder IFN- γ stimuliert. Das Ergebnis aus der Westernblotanalyse zeigt, dass zwar die Tyrosinphosphorylierung von STAT3 durch 20 μ M

Stattic inhibiert werden konnte, aber bei dieser Konzentration STAT1 durch IFN- γ weiterhin aktivierbar war (Abb. 33).

3.4.1.2. Phosphorylierung von STAT3 im EMSA

Ein EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) ist ein DNA-Bindungsassay, der auf einer nicht-denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese beruht. Dieser Assay ist eine einfache, schnelle und sehr sensitive Methode, um Sequenz-spezifische DNA-bindende Proteine zu analysieren. Proteine, die spezifisch an DNA-Fragmente binden, deren Ende radioaktiv markiert wurde, verlangsamen die Bewegung dieses Fragments während der Elektrophorese. Als Resultat erhält man diskrete Banden, die den individuellen Protein-DNA-Komplexen entsprechen. In den meisten Fällen werden Zellextrakte eingesetzt, die das zu untersuchende Protein enthalten (Carthew *et al.*, 1985).

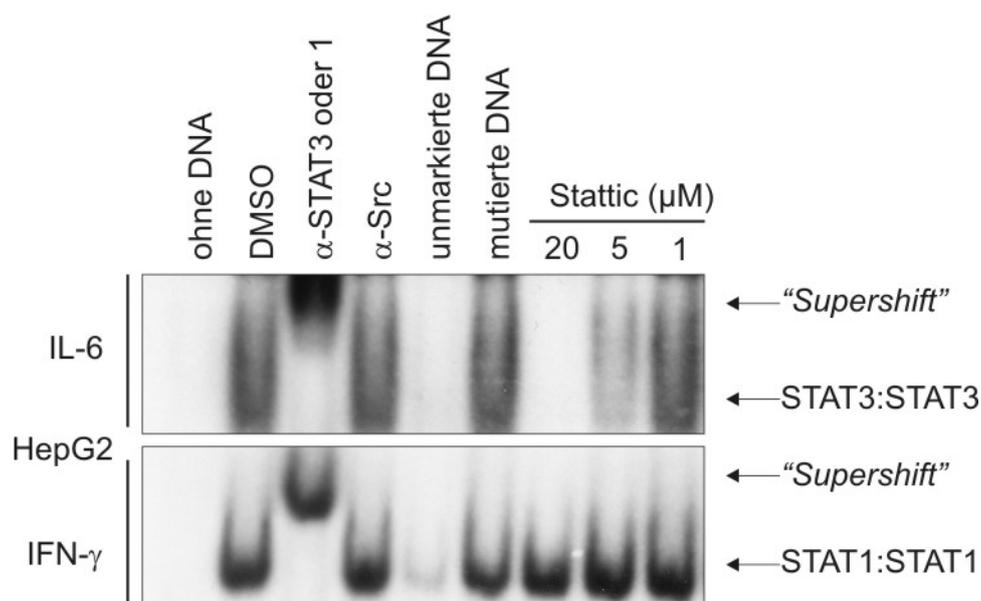


Abb. 34: Spezifische Inhibition der Tyrosinphosphorylierung von STAT3 in HepG2 Zellen durch Stattic im EMSA.

HepG2 Zellen wurden 24 Stunden mit serumfreien Medium kultiviert und 60 Minuten mit den angegebenen Konzentrationen an Stattic oder 1% DMSO behandelt. Anschließend wurden die Zellen entweder für 30 Minuten mit 50 ng/mL IL-6 oder für 15 Minuten 50 ng/mL IFN- γ stimuliert. Als Kontrolle wurden einige Kernextrakte zusätzlich mit 1 μ g STAT3 Antikörper, 1 μ g STAT1 Antikörper oder 1 μ g Src Antikörper, oder 5-fachen Überschuss an unmarkierter DNA (hSIE) bzw. unmarkierter mutierter DNA behandelt. Je 50 μ g der mit radioaktiv markierter DNA (hSIE) behandelten Zellkernextrakte wurden in einem 4%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf einem Röntgenfilm exponiert. Gezeigt sind die DNA-gebundenen STAT3- und STAT1-Dimere und der jeweilige Supershift.

Das STAT3-Protein wird durch IL-6 am Tyrosin 705 phosphoryliert, STAT3 homodimerisiert und wird anschließend in den Zellkern transportiert, wo das Proteindimer an

Promotorelemente bindet, um Transkription zu regulieren. Sowohl aktive STAT3-Dimere, als auch aktive STAT1-Dimere binden an die Promotorsequenz hSIE (Sadowski *et al.*, 1993), nicht jedoch monomere STATs.

Für das folgende Experiment wurden HepG2 Zellen nach dem Hungern entweder mit verschiedenen Konzentrationen an Stattic oder 1% DMSO behandelt und anschließend mit IL-6 oder IFN- γ stimuliert. Die Zellkernextrakte wurden mit einem radioaktiv markiertem DNA-Fragment (hSIE) behandelt und die Bindung der STAT3-Dimere bzw. STAT1-Dimere an hSIE-Fragmente in einem EMSA analysiert. Dabei wurden mehrere Kontrollen eingesetzt, um die Richtigkeit der analysierten Komplexe zu bestätigen. Die Inkubation der Extrakte mit einem Antikörper gegen STAT3 (oben) bzw. STAT1 (unten) zeigte den so genannten „Supershift“ und bestätigte, dass in der oberen Reihe DNA-gebundene STAT3-Dimere und in der unteren Reihe DNA-gebundene STAT1-Dimere zu sehen sind (Abb. 34). Ein unspezifischer Src-Antikörper zeigte hingegen keinen „Supershift“. Ein 5-facher Überschuss an nicht radioaktiv markierter DNA löscht beide Banden aus, während ein 5-facher Überschuss an mutierter DNA keinen Effekt zeigte (Abb. 34). Dies bestätigte, dass die gezeigten Protein-DNA-Komplexe mit dem DNA-Fragment hSIE gebildet wurden. Während eine Behandlung der Zellen mit 5 μ M Stattic bereits eine deutlich schwächere STAT3:STAT3:DNA Bande zeigte und 20 μ M Stattic das Signal völlig auslöschte, hatten dieselben Konzentrationen keinen Effekt auf die STAT1-DNA-Komplexe (Abb. 34). Da nur phosphorylierte STAT3-Dimere DNA binden können, bestätigte das Ergebnis, dass Stattic spezifisch die Phosphorylierung des Tyrosins 705 von STAT3 inhibiert, aber keinen Effekt auf die Tyrosinphosphorylierung von STAT1 ausübt (Abb. 33).

3.4.1.3. Einfluss der Testsubstanzen auf die STAT3-Dimerisierung

Um den Einfluss von Stattic auf die STAT-Dimerisierung zu untersuchen, wurde ebenfalls eine *in vitro* EMSA Analyse verwendet. Dafür wurden HepG2 Zellen 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert und entweder mit IL-6 oder mit IFN- γ stimuliert, um STAT3 bzw. STAT1 zu phosphorylieren. Die vorphosphorylierten Zellkernextrakte wurden *in vitro* mit den angegebenen Konzentrationen an Stattic oder mit DMSO inkubiert und in einem EMSA analysiert. Neben der „Supershift“-Kontrolle mit den Antikörpern gegen STAT3, STAT1 und Src, sind auch die bereits in Abbildung 34 gezeigten Kontrollen mit einem Überschuss an radioaktiv unmarkierter DNA und mutierter DNA gezeigt. Als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellkernextrakte mit dem Peptid Ac-pYLPQTV-NH₂ (Abb. 35, oben) oder dem Peptid GpYDKPHVL (Abb. 35, unten) behandelt, um die Dimerisierung der STAT-

Proteine mit einem Peptid zu inhibieren. Sowohl die Dimerisierung von STAT3 (Abb. 35, oben) als auch von STAT1 (Abb. 35, unten) konnten durch die Kontrollpeptide, die an die jeweilige SH2-Domäne der Proteine binden, inhibiert werden, was zu einer Schwächung der entsprechenden DNA-bindenden Aktivität führte. Die Inkubation der vorphosphorylierten Zellkernextrakte mit verschiedenen Konzentrationen an Stattic führte zu einer Dosis-abhängigen Inhibition der STAT3-Dimerisierung (Abb. 35, oben), während die Bindung der STAT1-Dimere an die DNA durch Stattic nicht inhibiert wurde (Abb. 35, unten). Interessanterweise war die Bindung der STAT1-Dimere an DNA stärker bei höheren Konzentrationen an Stattic, was aber vermutlich auf einen unspezifischen Bindungseffekt zurückzuführen war. So kann man eine stärkere Bindung auch bei den Antikörperkontrollen beobachten (Abb. 35).

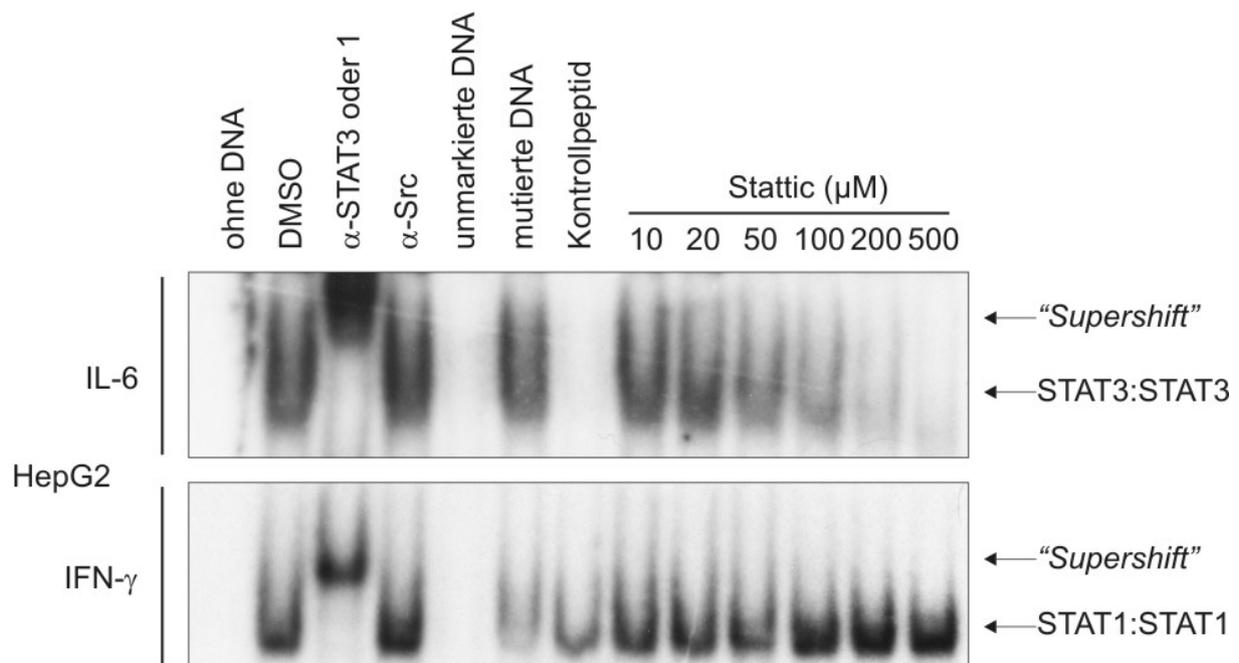


Abb. 35: Stattic inhibierte spezifisch die Dimerisierung von STAT3.

HepG2 Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreien Medium kultiviert und für 30 Minuten mit 50 ng/mL IL-6 oder für 15 Minuten 50 ng/mL IFN- γ stimuliert. Die Zellkernextrakte wurden entweder mit 1% DMSO oder mit den angegebenen Konzentrationen Stattic 60 Minuten bei 30°C inkubiert. Als Kontrolle wurden einige Kernlysate zusätzlich mit 1 μ g STAT3 Antikörper, 1 μ g STAT1 Antikörper oder 1 μ g Src Antikörper, oder 5-fachen Überschuss an unmarkierter DNA (hSIE) bzw. unmarkierter mutierter DNA behandelt. Als Positivkontrolle für die Inhibition der Dimerisierung wurden Extrakte mit 1 μ M Ac-pYLPQTV-NH₂ (oben) oder 1 μ M GpYDKPHVL (unten) inkubiert. Je 50 μ g der mit radioaktiv markierter DNA (hSIE) behandelten Zellkernextrakte wurden in einem 4%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf einem Röntgenfilm exponiert. Gezeigt sind die DNA-gebundenen STAT3 und STAT1-Dimere und der jeweilige Supershift.

Neben Stattic wurde auch die inhibitorische Aktivität der inaktiven Substanzen **2-4** (Tabelle 6) auf die Dimerisierung von STAT3 und STAT1 überprüft. Analog wurden vorphosphorylierte HepG2 Zellkernextrakte mit 1% DMSO oder der entsprechenden Konzentration an Testsubstanz inkubiert und in einem EMSA analysiert. Während selbst 500 μM der Testsubstanz **3** nur eine geringfügige antagonistische Wirkung auf die STAT3-Dimerisierung hatte, hatten alle anderen getesteten Verbindungen keinen Einfluss auf die Dimerbildung von STAT3 oder STAT1 (Abb. 36). Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass Stattic sowohl die Tyrosinphosphorylierung von STAT3 in HepG2 Zellen, als auch die STAT3-Dimerisierung *in vitro* inhibiert.

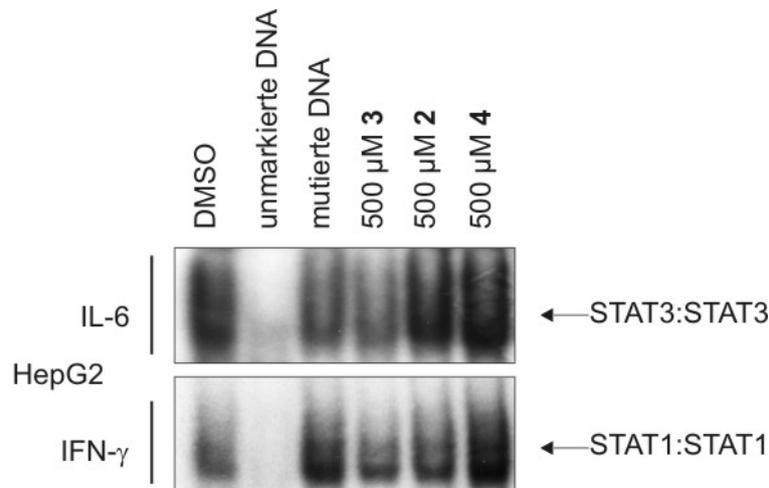


Abb. 36: Einfluss der Testsubstanzen 2-4 auf die STAT-Dimerisierung.

HepG2 Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert und für 30 Minuten mit 50 ng/mL IL-6 oder für 15 Minuten 50 ng/mL IFN- γ stimuliert. Die Zellkernextrakte wurden entweder mit 1% DMSO oder mit 500 μM der Testsubstanzen **2-4** 60 Minuten bei 30°C inkubiert. Als Kontrolle wurden einige Kernlysate zusätzlich mit einem 5-fachen Überschuss an unmarkierter DNA (hSIE) bzw. unmarkierter mutierter DNA behandelt. Je 50 μg der mit radioaktiv markierter DNA (hSIE) behandelten Zellkernextrakte wurden in einem 4%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf einem Röntgenfilm exponiert. Gezeigt sind die DNA-gebundenen STAT3 und STAT1-Dimere.

3.4.1.4. Etablierung eines STAT Lokalisationsassays in HepG2 Zellen

Sowohl STAT3 als auch STAT1 dimerisieren nach erfolgter Aktivierung durch Phosphorylierung des Tyrosins und die STAT-Dimere werden anschließend in den Zellkern transportiert. Dort binden sie an Promotorsequenzen und regulieren die Transkription von Zielgenen. Ging man früher davon aus, dass die STATs vor ihrer Aktivierung im Zytoplasma lokalisiert sind und erst nach ihrer Dimerisierung in den Zellkern wandern, konnte inzwischen gezeigt werden, dass die STATs unabhängig von der Tyrosinphosphorylierung zwischen

Zytoplasma und Zellkern hin- und herwandern (Pranada *et al.*, 2004). Es erfolgt nach Phosphorylierung der STATs kein Rücktransport der Proteine vom Zellkern ins Zytoplasma, was eine Akkumulation der STATs im Zellkern zur Folge hat (Marg *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2004).

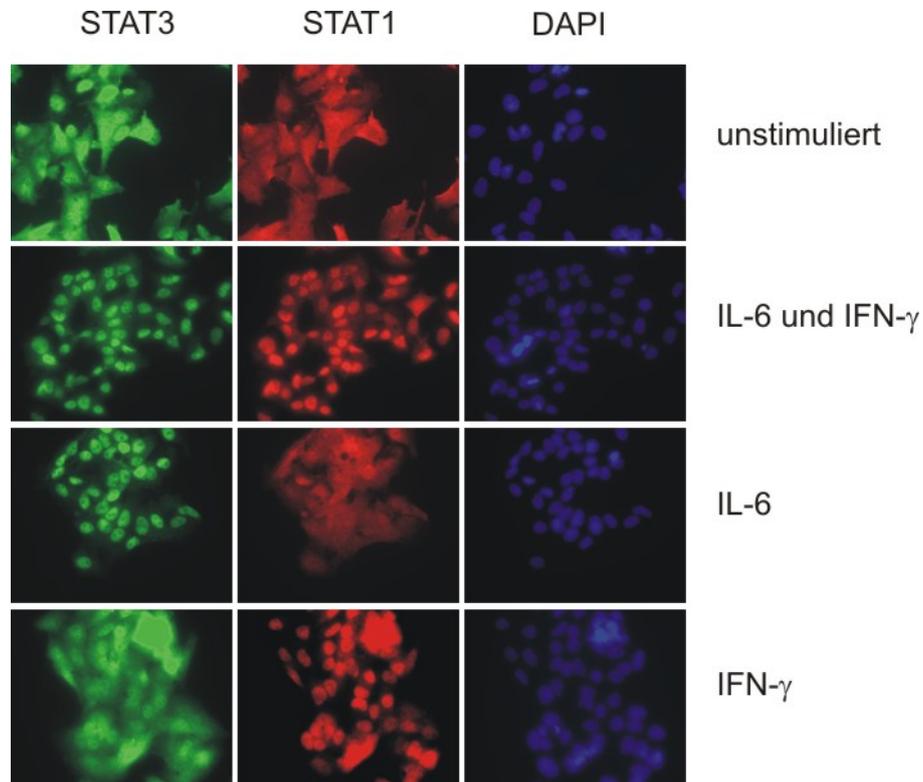


Abb. 37: Etablierung eines Lokalisationsassays von STAT3 und STAT1.

HepG2 Zellen wurden 24 Stunden in serumfreien Medium kultiviert und anschließend 40 Minuten mit 50 ng/mL IL-6 und/oder 50 ng/mL IFN- γ stimuliert. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen STAT3 und STAT1, sowie mit einer DAPI-Lösung gefärbt. Unter einem Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen mit einem 40x Objektiv fotografiert.

Um die Wirkung von Stattic auf die Lokalisation von STAT3 und STAT1 zu untersuchen, wurde ein mikroskopisches Immunfluoreszenz-Verfahren etabliert. Dazu wurden HepG2 Zellen zunächst 24 Stunden im serumfreien Medium gehungert und anschließend mit IL-6 und IFN- γ stimuliert. Nach dem Fixieren, Permeabilisieren und Färben von STAT3, STAT1 durch die entsprechenden Antikörper und den Zellkernen durch DAPI wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Während in den unstimulierten Zellen sowohl STAT3 als auch STAT1 über die gesamte Zelle verteilt war, war das phosphorylierte STAT3- und STAT1-Protein im Zellkern lokalisiert (Abb. 37). Eine getrennte Stimulation beider Proteine zeigte, dass die Wanderung der Proteine in den Zellkern unabhängig voneinander

erfolgte. Daher konnten bei Inkubation mit einer Testsubstanz und gleichzeitiger Stimulation mit IL-6 und IFN- γ die Lokalisation beider Proteine untersucht werden und somit Testsubstanzen herausgefiltert werden, die spezifisch nur STAT3 inhibieren.

3.4.1.5. Lokalisation der STATs unter dem Einfluss von Testsubstanzen

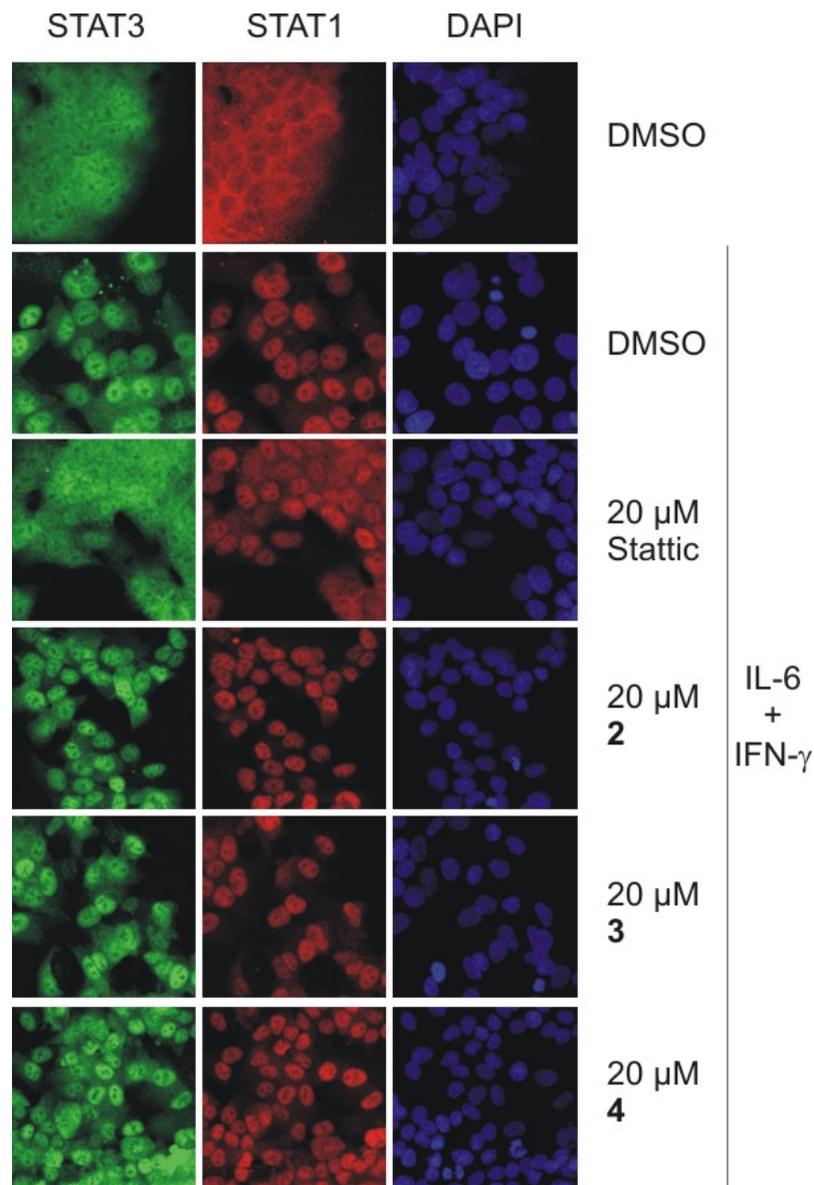


Abb. 38: Lokalisation von STAT3 und STAT1 unter dem Einfluss verschiedener Testsubstanzen.

HepG2 Zellen wurden 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert und 60 Minuten lang mit entweder 1% DMSO oder 20 μ M der angegebenen Testsubstanzen inkubiert. Nach 40-minütiger Stimulation mit 50 ng/mL IL-6 und 50 ng/mL IFN- γ wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen STAT3 und STAT1, sowie mit DAPI-Lösung gefärbt. Unter einem konfokalen Mikroskop wurden die Zellen mit einem 40x Objektiv fotografiert.

Um zu untersuchen, ob Stattic oder Derivate spezifisch die Lokalisation von STAT3 inhibieren, wurden HepG2 Zellen gehungert, dann mit 1% DMSO oder der entsprechenden Testsubstanz versetzt und mit IL-6 und IFN- γ stimuliert. STAT3-Protein und STAT1-Protein wurde in den Zellen durch entsprechende Antikörper sichtbar gemacht und die Zellkerne mit einer DAPI-Lösung angefärbt. Wie man in Abbildung 37 sehen kann, waren bei den unstimulierten Zellen STAT3 und STAT1 komplett über die gesamte Zelle verteilt (Abb. 38, Reihe 1), während nach erfolgter Stimulation beide Proteine größtenteils im Zellkern lokalisiert waren (Abb. 38, Reihe 2). 20 μ M Stattic war ausreichend, um die Lokalisation von STAT3 im Zellkern zu verhindern, während STAT1 zumindest überwiegend nukleär lokalisiert war (Abb. 38, Reihe 3). Die im Fluoreszenzpolarisations-Assay negativen Verbindungen 2-4 (Tabelle 6) beeinflussten hingegen nicht die Lokalisation von STAT3 und STAT1 (Abb. 38, Reihen 4-6).

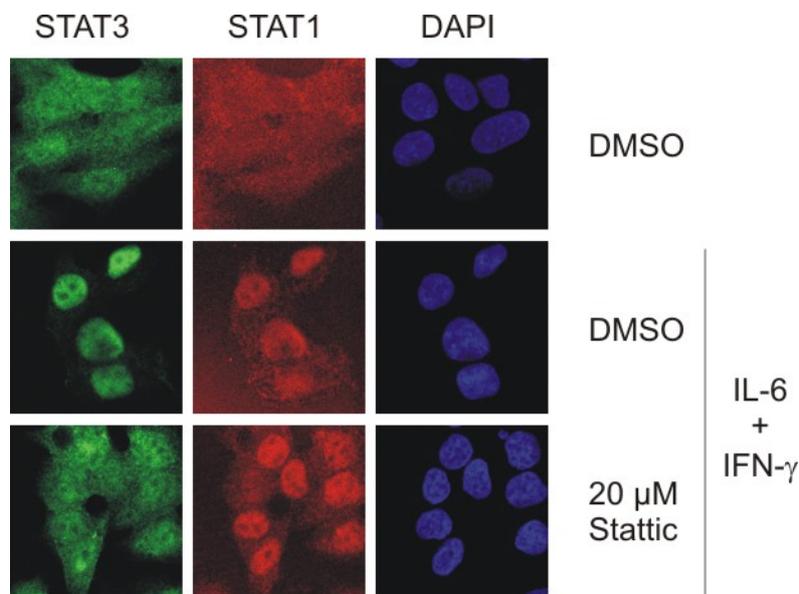


Abb. 39: Stattic inhibierte spezifisch die Lokalisation von STAT3 im Zellkern.

HepG2 Zellen wurden 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert und 60 Minuten lang mit entweder 1% DMSO oder 20 μ M Stattic inkubiert. Nach 40-minütiger Stimulation mit 50 ng/mL IL-6 und 50 ng/mL IFN- γ wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen STAT3 und STAT1, sowie mit DAPI-Lösung gefärbt. Unter einem konfokalen Mikroskop wurden die Zellen mit einem 63x Objektiv fotografiert.

Mit einem 63x Objekt wurden Aufnahmen in einer höheren Auflösung angefertigt. Analog zur Abbildung 38 sieht man eine homogene Verteilung beider STATs über die gesamte Zelle in gehungerten HepG2 Zellen (Abb. 39, Reihe 1). Nach Stimulation mit den Liganden lokalisierten STAT3 und STAT1 im Zellkern (Abb. 39, Reihe 2), während nach Behandlung mit Stattic nur STAT1 im Zellkern akkumulierte und STAT3 weiterhin sowohl im

Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert war (Abb. 39, Reihe 3). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Stattic in der Lage war, spezifisch die Funktionalität der STAT3-SH2-Domäne zu inhibieren. Über diese antagonistische Wirkung verhinderte der Inhibitor Stattic auch spezifisch die Akkumulation von stimuliertem STAT3 im Zellkern.

3.4.2. NIH3T3 Zellen

Die murine Zelllinie NIH3T3 sind hoch Kontakt-inhibierte Mausfibroblasten, die aus NIH Swiss Embryonalzellen gewonnen wurden (Jainchill *et al.*, 1969). Diese Zelllinie eignet sich bestens für Transformationsassays und wurde daher auch schon bei früheren Untersuchungen von STAT3 herangezogen. So ist bekannt, dass STAT3 auch Liganden-unabhängig durch onkogene Proteine wie zum Beispiel v-Src phosphoryliert wird. In v-Src transformierten NIH3T3 Zellen ist das STAT3-Protein konstitutiv-aktiv (Yu *et al.*, 1995) und ist für die transformativen Eigenschaften des onkogenen v-Src essentiell (Bromberg *et al.*, 1998).

3.4.2.1. Stabile Expression von v-Src und h-Ras in NIH3T3 Zellen

Für die Gewinnung stabiler NIH3T3/v-Src Zellen wurden zunächst Phoenix Eco Zellen transient mit v-Src, h-Ras oder einem leeren Kontrollvektor transfiziert. Phoenix Eco ist eine ecotrope Packungszelllinie und verpackt RNA des transfizierten Vektors pLXSN und dem gewünschten Gen in infektiöse, Replikations-inkompetente retrovirale Partikel. Diese retroviralen Partikel können nun ecotrope Zielzellen infizieren und das Zielgen übertragen. Es wurden im Folgenden parentale NIH3T3 Zellen mit den Virenüberständen infiziert und durch antibiotische Selektion polyklonale NIH3T3/v-Src, NIH3T3/h-Ras und NIH3T3/pLXSN Zellen gewonnen.

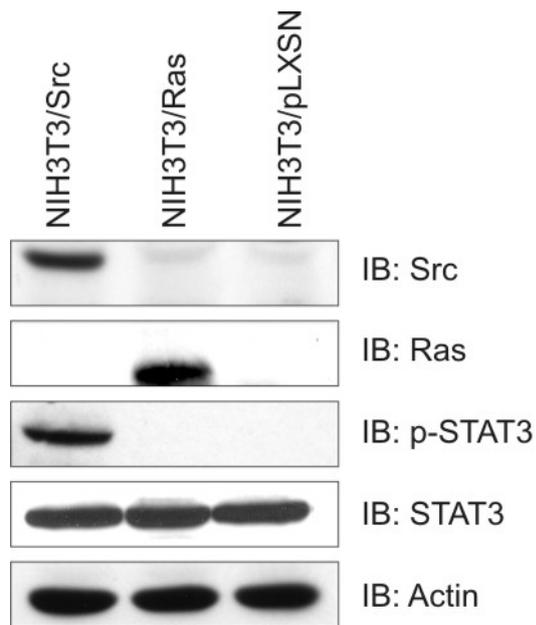


Abb. 40: Westernblotanalyse der polyklonalen NIH3T3 Zellen.

Polyklonale NIH3T3/Src, NIH3T3/Ras und NIH3T3/pLXSN Zellen wurden in serumhaltigen Medium kultiviert. Etwa 30 μ g Totallysat wurde mittels SDS-Page aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse mit Antikörpern gegen Src, Ras, p-STAT3 (Y705) und STAT3 analysiert. Ein Antikörper gegen Actin diente als Ladekontrolle.

Eine Westernblotanalyse der polyklonalen Zellen bestätigte die Literaturvorgaben, dass in v-Src transformierten NIH3T3 Zellen STAT3 konstitutiv-aktiv war und eine Tyrosinphosphorylierung aufwies (Abb. 40). Hingegen zeigten die NIH3T3/h-Ras Zellen und die mit Leervektor infizierten NIH3T3/pLXSN Zellen zwar dieselbe STAT3-Proteinmenge, aber keine Tyrosinphosphorylierung von STAT3 (Abb. 40).

3.4.2.2. Einfluss von Stattic auf die Phosphorylierung von STAT3 in NIH3T3/v-Src Zellen

Da nun bestätigt war, dass STAT3 in v-Src transformierten NIH3T3 Zellen phosphoryliert vorliegt, wurde untersucht, ob Stattic auch in diesen Zellen die Phosphorylierung von STAT3 inhibieren kann. Dazu wurden NIH3T3/v-Src Zellen 2 Stunden lang mit verschiedenen Konzentrationen an Stattic und 20 μ M SU6656 behandelt und einer Westernblotanalyse unterworfen. Während die Behandlung mit 10 μ M Stattic keinen Einfluss auf die Tyrosinphosphorylierung von STAT3 hatte, inhibierte die zweistündige Inkubation mit 20 μ M die STAT3-Phosphorylierung in den NIH3T3/v-Src Zellen (Abb. 41, links). Der kommerziell erhältliche Src-Inhibitor SU6656 verhinderte ebenfalls eine STAT3-Aktivierung in den Zellen, was bestätigte, dass STAT3 direkt über v-Src phosphoryliert wird (Abb. 41, links).

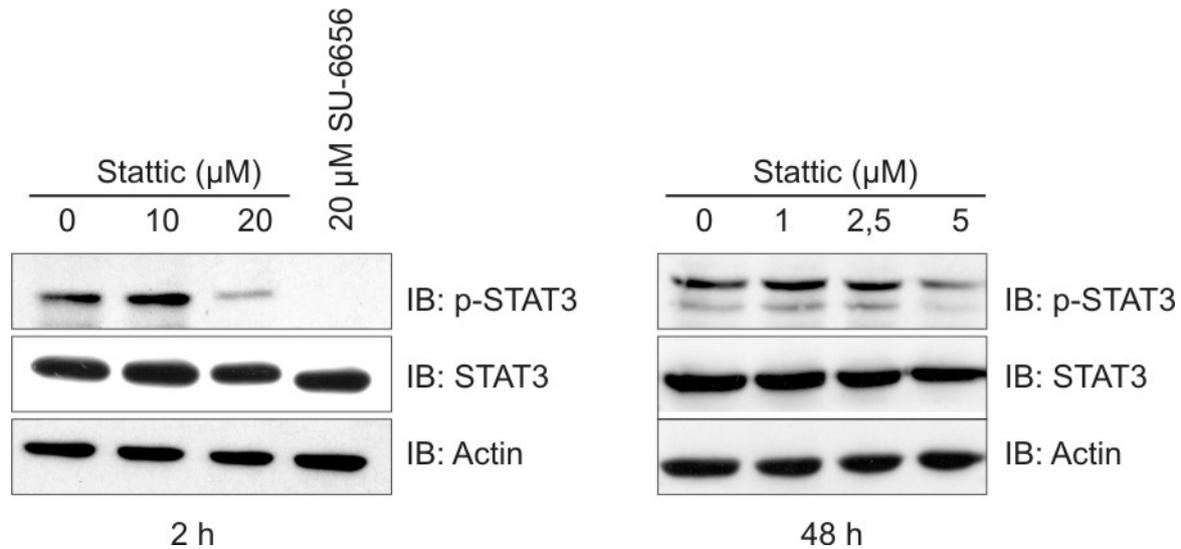


Abb. 41: Die zeitabhängige Inhibition der STAT3 Phosphorylierung in NIH3T3/v-Src Zellen durch Stattic.

Polyklonale NIH3T3/Src Zellen wurden mit 0,1% DMSO oder den entsprechenden Konzentrationen an Stattic oder dem Src-Inhibitor SU6656 für 2 Stunden (links) oder 48 Stunden (rechts) inkubiert. Etwa 30 μg Totallysate wurde mittels SDS-Page aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse mit Antikörpern gegen p-STAT3 (Y705) und STAT3 analysiert. Ein Antikörper gegen Actin diente als Ladekontrolle.

Interessanterweise war die Antagonisierung der STAT3-Phosphorylierung abhängig von der Zeit. So zeigte Stattic in NIH3T3/v-Src Zellen, die 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an Stattic inkubiert wurden, bereits bei 5 μM eine Wirkung auf die STAT3-Aktivität (Abb. 41, rechts). Dies deutete darauf hin, dass Stattic durch eine irreversible Reaktion an das STAT3-Protein bindet und dadurch in der Zelle akkumuliert.

3.4.2.3. Apoptose in genetisch veränderten NIH3T3 Zellen

Die Apoptose (griechisch: „der Niedergang“) ist eine spezielle Form des programmierten Zelltods. Im Gegensatz zum anderen wichtigen Mechanismus des Zelltods, der Nekrose, ist die Apoptose ein von der betroffenen Zelle selbst durchgeführter aktiver Mechanismus und somit ein Teil des Stoffwechsels der Zelle (Kerr *et al.*, 1972). Diese Form des Zelltods unterliegt einer strengen Kontrolle und damit wird gewährleistet, dass benachbartes Zellgewebe nicht beschädigt wird. Apoptose und Nekrose lassen sich bereits optisch gut voneinander unterscheiden. Während unter anderem bei der Apoptose ein Schrumpfen der Zellen einsetzt und ein Abbau der DNA durch Endonukleasen in definierte Stücke stattfindet, schwellen bei der Nekrose die Zellen an, wobei deren Plasmamembran zerstört wird (Darzynkiewicz *et al.*, 1997).

STAT3 gilt als antiapoptotisch und daher ist es nicht verwunderlich, dass es eine Vielzahl an Beispielen in der Literatur gibt, wo eine Inhibition von STAT3 zum Auslösen von Apoptose führt (Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2001; Niu *et al.*, 2002a). Es gibt eine Reihe von Methoden, um apoptotische Zellen von normal wachsenden Zellen zu unterscheiden. Eine gängige und einfach durchführbare Methode wurde 1991 von Nicoletti *et al.* entwickelt (Nicoletti *et al.*, 1991). Diese Methode geht auf die auftretende DNA-Fragmentierung bei der Apoptose zurück (Oberhammer *et al.*, 1993). Da apoptotischen Zellen durch dieses Phänomen einen DNA-Gehalt besitzen, der geringer ist als der von Zellen in der G₀/G₁-Phase, können die apoptotischen Zellen nach dem Anfärben mit dem DNA-Interkalator Propidiumiodid mittels Durchflusszytometrie gut von nicht-apoptotischen Zellen unterschieden werden. Apoptotische Zellen zeigen im Durchflusszytometer deshalb weniger Fluoreszenz als Zellen in G₀/G₁, es erscheint ein so genannter Sub-G₀/G₁-Wert (Vermees *et al.*, 2000).

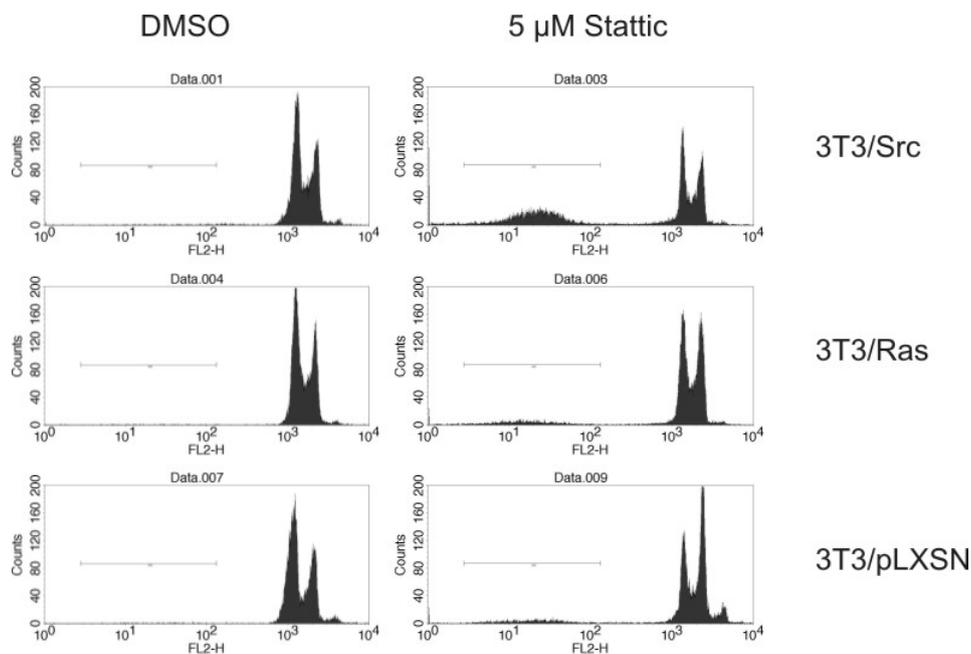


Abb. 42: Erhöhte Apoptoserate durch Inhibition von STAT3 durch Stattic in NIH3T3/Src Zellen.

Genetisch veränderte NIH3T3 Zellen wurden 48 Stunden mit entweder 0,1% DMSO oder 5 μM Stattic behandelt und 3 Stunden mit einem Propidiumiodid-Puffer gefärbt. Der gesamte DNA-Gehalt und der Sub-G₀/G₁-Wert wurde mittels Durchflusszytometrie quantitativ bestimmt. Gezeigt sind exemplarisch die logarithmisch aufgenommenen Auswertungen des DNA-Gehalts der Zellen aus einem von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Da in NIH3T3/Src Zellen STAT3 konstitutiv-aktiv ist, sollte eine Inhibition von STAT3 in diesen Zellen zur Apoptose führen, während NIH3T3/Ras und NIH3T3/pLXSN Zellen nur eine geringere Apoptoserate nach Inkubation mit Stattic zeigen sollten. Nach Behandlung der Zellen mit DMSO oder 5 μM Stattic für 48 Stunden wurden die Zellen mit Propidiumiodid angefärbt und der DNA-Gehalt mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Tatsächlich zeigten die mit 5 μM Stattic behandelten Zellen einen deutlichen Sub- G_0/G_1 -Wert, während alle anderen behandelten Zellen deutlich weniger apoptotische Zellen aufwiesen (Abb. 42). Eine Bestätigung für dieses Ergebnis war die Westernblot-Analyse der Inhibition der STAT3-Phosphorylierung in den NIH3T3/Src Zellen (Abb. 41). Auch hier war nach 48 Stunden Inkubation mit 5 μM Stattic die Funktionalität der STAT3-SH2-Domäne inhibiert.

Eine Zusammenstellung aller drei durchgeführten Messreihen ergab eine prozentuale Apoptoserate der Stattic-behandelten NIH3T3/Src Zellen von $32,8 \pm 3,6\%$, während der Sub- G_0/G_1 -Wert der anderen beiden Zelllinien signifikant niedriger war (Abb. 43). Dies deutete darauf hin, dass Stattic durch Inhibition von STAT3 in den NIH3T3/Src Zellen zum programmierten Zelltod führt.

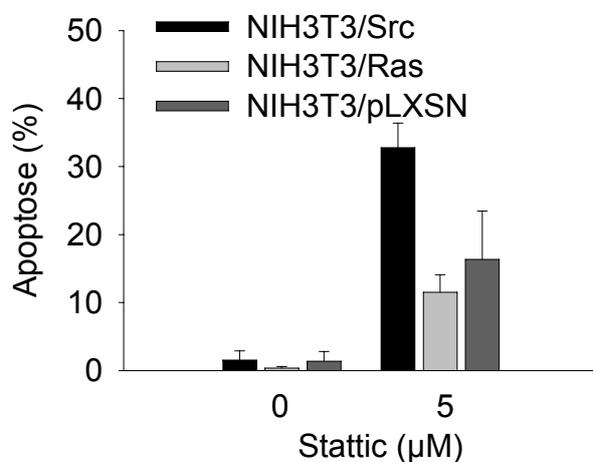


Abb. 43: Quantifizierung der Ergebnisse aus Abbildung 42.

Genetisch veränderte NIH3T3 Zellen wurden 48 Stunden mit entweder 0,1% DMSO oder 5 μM Stattic behandelt und 3 Stunden mit einem Propidiumiodid-Puffer gefärbt. Der DNA-Gehalt und der Sub- G_0/G_1 -Wert wurde mittels Durchflusszytometrie quantitativ bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

3.4.2.4. Einfluss von Stattic auf die transformativen Eigenschaften von v-Src und h-Ras

Unter einer malignen Transformation versteht man die bösartige Veränderung von Zellen unter anderem unter dem Einfluss chemischer Substanzen oder onkogener Viren. Bösartig transformierte Zellen unterscheiden sich von ihren normalen Gegenstücken in einer Vielzahl von Aspekten und zeigen die Eigenschaften von Tumorzellen. Bedeutsam unter diesen Unterschieden ist der Verlust der Kontaktinhibition, der Erwerb einer unendlichen Lebensspanne und die Fähigkeit, in Tieren Tumore zu bilden. Freedman und Shin fanden

1974 heraus, dass zwischen dem tumorbildenden Potential einer Zelle *in vivo* und ihrer Fähigkeit, verankerungsunabhängig *in vitro* zu wachsen, ein allgemeiner Zusammenhang besteht (Freedman & Shin, 1974). Obwohl diese Generalisierung nicht für jede transformierte Zelle gilt, kann das Wachstum in Weichagar benutzt werden, um *in vitro* Transformation zu untersuchen. Die Methode hat den Vorteil, dass sie leicht umgesetzt werden kann und weniger Zeit als ein *in vivo* Assay benötigt.

Sowohl NIH3T3/v-Src Zellen als auch NIH3T3/h-Ras Zellen zeigen im Gegensatz zu parentalen NIH3T3 Zellen ein Wachstum von Kolonien in Weichagar. Die Kolonienbildung der NIH3T3/h-Ras Zellen verläuft unabhängig von STAT3 (Aftab *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2003). Bei der Transformation von v-Src in NIH3T3 Zellen konnte hingegen gezeigt werden, dass in diesem Fall STAT3 konstitutiv-aktiv ist und die STAT3-Aktivität für die Transformation essentiell ist (Bromberg *et al.*, 1998; Turkson *et al.*, 1998). Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass ein zellgängiges Peptid mit der Sequenz PpYLKTK an die STAT3 SH2-Domäne bindet und Src-induziertes Wachstum von Kolonien von NIH3T3/v-Src Zellen in Weichagar verhindert (Turkson *et al.*, 2001). Daher sollte ein kleines organisches Molekül, welches die Funktion der STAT3-SH2-Domäne inhibiert, denselben Effekt aufweisen.

Es wurden NIH3T3/Src, NIH3T3/Ras und NIH3T3/pLXSN Zellen auf eine Schicht Weichagar gebettet und alle 2-3 Tage über einen Zeitraum von 2 Wochen mit DMSO oder den entsprechenden Konzentrationen an Testsubstanzen behandelt. Anschließend wurden die Kolonien eingefärbt und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Bereits 1 μM Stattic war ausreichend, um das Wachstum der Kolonien von NIH3T3/Src Zellen etwa zu halbieren, während bei dieser Konzentration das Wachstum der NIH3T3/Ras Kolonien nicht betroffen war (Abb. 44). Interessanterweise lag die Konzentration von 1 μM um einen Faktor 5-20 niedriger als die sonstigen für einen inhibitorischen Effekt benötigten Konzentrationen. Diese Diskrepanz war jedoch durch die Tatsache erklärbar, dass das Experiment über einen Zeitraum von 14 Tagen hinweg durchgeführt wurde und bereits vorherige Versuche eine Zeitabhängigkeit der Reaktion zeigten (Kapitel 3.4.2.2.). Die negative Kontrollverbindung 4 aus der Struktur-Wirkungs-Untersuchung (Tabelle 6) hatte in diesem Assay keinen Effekt auf das Wachstum beider Kolonien (Abb. 44). Der Src-Inhibitor SU6656 wurde als Positivkontrolle verwendet und stoppte bei einer Konzentration von 5 μM völlig das Wachstum der Kolonien der NIH3T3/Src Zellen, aber nicht das der NIH3T3/Ras Zellen (Abb. 44). NIH3T3/pLXSN Zellen zeigten in einem Kontrollversuch kein Wachstum von Kolonien (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend wiesen die Ergebnisse darauf hin, dass Stattic durch direkte Inhibition von STAT3 die transformativen Eigenschaften von v-Src inhibiert.

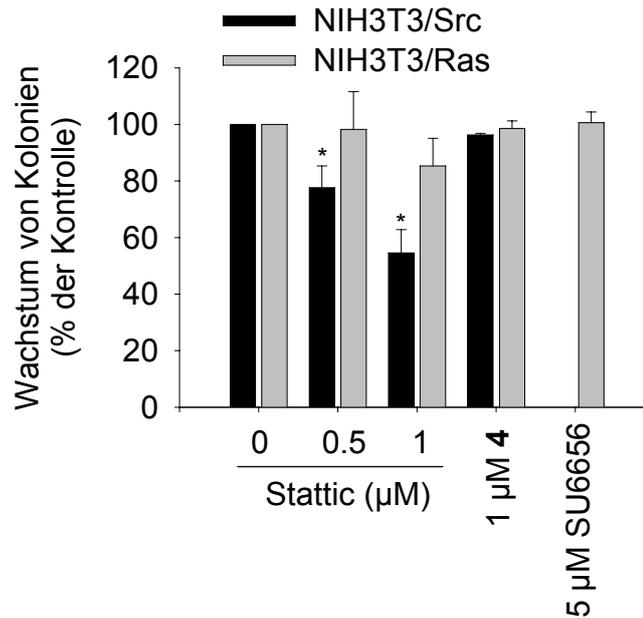


Abb. 44: Stattic inhibierte spezifisch die transformativen Eigenschaften von v-Src in NIH3T3 Zellen.

Genetisch manipulierte NIH3T3 Zellen wurden auf einer 0,5%-igen zellkulturmediumhaltigen Weichagarschicht ausgesät und mit einer 0,25%-igen Weichagarschicht überdeckt. Die 0,25%-ige Weichagarschicht enthielt neben dem Medium entweder 1% DMSO oder die entsprechende Konzentration an Inhibitoren. Alle 2-3 Tage wurden die Kolonien mit einer frischen entsprechenden 0,25%-igen Weichagarschicht versorgt und nach 10-14 Tagen eingefärbt. Es wurden die Kolonien unter einem Lichtmikroskop in vier zufällig ausgewählten Bereichen ausgezählt. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. * Werte sind signifikant von der DMSO Kontrolle verschieden ($p < 0,01$).

Um zu demonstrieren, dass die gezeigte antagonistische Wirkung von Stattic auf das Koloniewachstum von NIH3T3/Src Zellen nicht auf einer Inhibition der Src-Kinaseaktivität beruhte, wurde ein *in vitro* Src-Kinaseassay angeschlossen. Dazu wurde das Src Substratpeptid KVEKIGEGTYGVVYK zusammen mit aktiver Src-Kinase, radioaktiv markiertem ATP und den angegebenen Konzentrationen an Testsubstanzen inkubiert. Die Kinaseaktivität von Src wurde mit einem Szintillationszähler ausgewertet. Wie man in Abbildung 45 sehen kann, hatten selbst 50 μ M an Stattic keine Auswirkung auf die Kinaseaktivität von Src. Der Src-Inhibitor SU6656 hingegen reduzierte bei 20 μ M die Kinaseaktivität um etwa 70%. Dies deutete darauf hin, dass Stattic das Wachstum der Kolonien der NIH3T3/Src Zellen in den Transformationsassay durch direkte Inhibition von STAT3-Aktivität verhindert, aber keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität von Src hat.

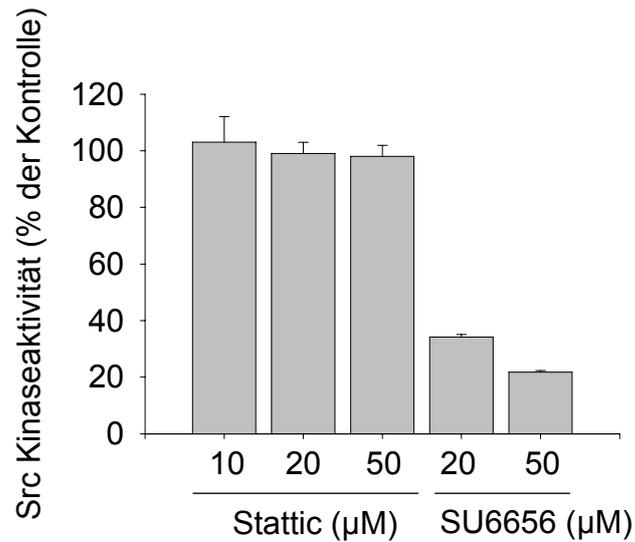


Abb. 45: Einfluss von Stattic auf die Src Kinaseaktivität.

150 µM Src Substratpeptid KVEKIGEGTYGVVYK, 25 ng aktive Src-Kinase (Upstate) und die angegebenen Konzentrationen an Stattic und SU6656 wurden zusammen 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Kinasereaktion wurde 15 Minuten bei 37°C mit radioaktiv markiertem ATP durchgeführt, die Reaktionsmischungen auf P81 Papier übertragen und die Radioaktivität mit einem Szintillationszähler gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel \pm S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

3.4.3. Brustkrebszelllinien

Die Zelllinie MDA-MB-231 wurde aus einem Brust-Adenokarzinom einer 51-jährigen Frau isoliert und besitzt die Morphologie von Epithelzellen (Brinkley *et al.*, 1980). MDA-MB-435S ist eine spindelförmige Zelllinie, die 1976 aus einem metastatischen Brustdrüsenkrebs einer 31-jährigen Frau isoliert wurde (Brinkley *et al.*, 1980). MDA-MB-453 Zellen wurden ebenfalls 1976 aus dem metastatischen Mammakarzinom einer 48-jährigen Frau isoliert und haben eine Epithelzell-Morphologie (Brinkley *et al.*, 1980). STAT3 ist in einer Reihe von menschlichen Primärtumoren konstitutiv-aktiv und wirkt dort antiapoptotisch. Auch in menschlichen Mammakarzinomen liegt STAT3 häufig phosphoryliert vor (Yu & Jove, 2004). Daher wurden die oben genannten Brustkrebszelllinien als drittes zelluläres System für die Charakterisierung des Inhibitors Stattic herangezogen.

3.4.3.1. STAT3-Proteinexpression in Brustkrebszelllinien

In einem ersten Schritt wurde zunächst in allen verwendeten Zelllinien untersucht, ob STAT3 konstitutiv-aktiv vorlag. Dazu wurden MDA-MB-231, MDA-MB-435S und MDA-MB-453 Zellen kultiviert und in einer Westernblotanalyse untersucht. Die beiden Zelllinien MDA-

MB-231 und MDA-MB-435S wiesen eine deutliche Bande für eine Tyrosinphosphorylierung von STAT3 auf. In den MDA-MB-453 Zellen war nur eine geringe Menge an STAT3-Protein vorhanden, dieses war jedoch in dieser Zelllinie nicht phosphoryliert (Abb. 46).

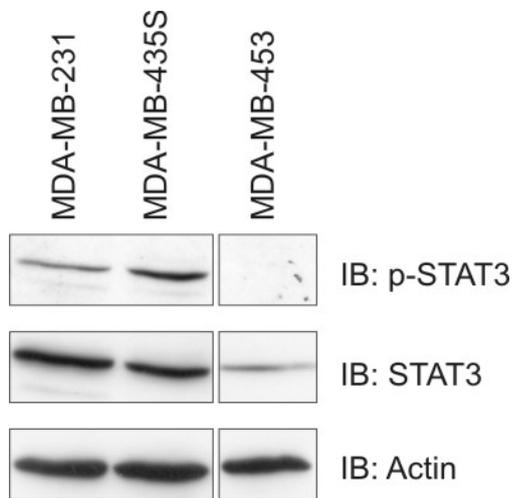


Abb. 46: STAT3-Aktivität in Brustkrebszelllinien.

Verschiedene Brustkrebszelllinien wurden in serumhaltigem Medium kultiviert. Etwa 30 µg Totallysat wurde mittels SDS-Page aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse mit Antikörpern gegen p-STAT3 (Y705) und STAT3 analysiert. Ein Antikörper gegen Actin diente als Ladekontrolle.

3.4.3.2. Einfluss von Stattic auf die STAT3-Phosphorylierung in Brustkrebszelllinien

Da nun ein Testsystem mit zwei STAT3-abhängigen Zelllinien (MDA-MB-231 und MDA-MB-435S) und einer Brustkrebszelllinie ohne konstitutiv-aktives STAT3 als Kontrolle zur Verfügung stand, wurde im Folgenden untersucht, ob Stattic auch in diesem Zellsystem in der Lage war, STAT3-Phosphorylierung spezifisch zu inhibieren. Dazu wurden alle zwei STAT3-abhängigen Zelllinien mit verschiedenen Konzentrationen an Stattic behandelt und einer Westernblotanalyse unterworfen. Wie man in Abbildung 47 sehen kann, wurde in beiden Zelllinien nach Behandlung mit Stattic die Phosphorylierung von STAT3 inhibiert, während der STAT3-Proteinlevel selbst nicht beeinflusst wurde. Als Spezifitätskontrolle wurde zusätzlich die Autophosphorylierung der im Signalweg über STAT3 liegenden Kinasen JAK1, JAK2 und Src betrachtet. Das Tyrosin 416 im c-Src-Protein blockiert den Zugang zur Kinasedomäne, daher kann die Src-Kinase erst nach erfolgter Autophosphorylierung dieses Tyrosins aktiv werden. Die Tyrosine 1022/1023 in JAK1 bzw. 1007/1008 in JAK2 liegen im sog. „*activation loop*“ der beiden Proteine und steuern die Autophosphorylierung. Stattic hatte keine Auswirkung auf die Autophosphorylierung der Kinasen und somit auch nicht auf die Kinaseaktivität (Abb. 47). Die Proteine Akt, JNK und ERK1/2 befinden sich in STAT3-unabhängigen Signalwegen und ihre Phosphorylierung wurde ebenfalls von Stattic nicht

beeinflusst (Abb. 47). Zusammenfassend deutete dies abermals darauf hin, dass Stattic direkt an STAT3 bindet und spezifisch dieses Protein antagonisiert.

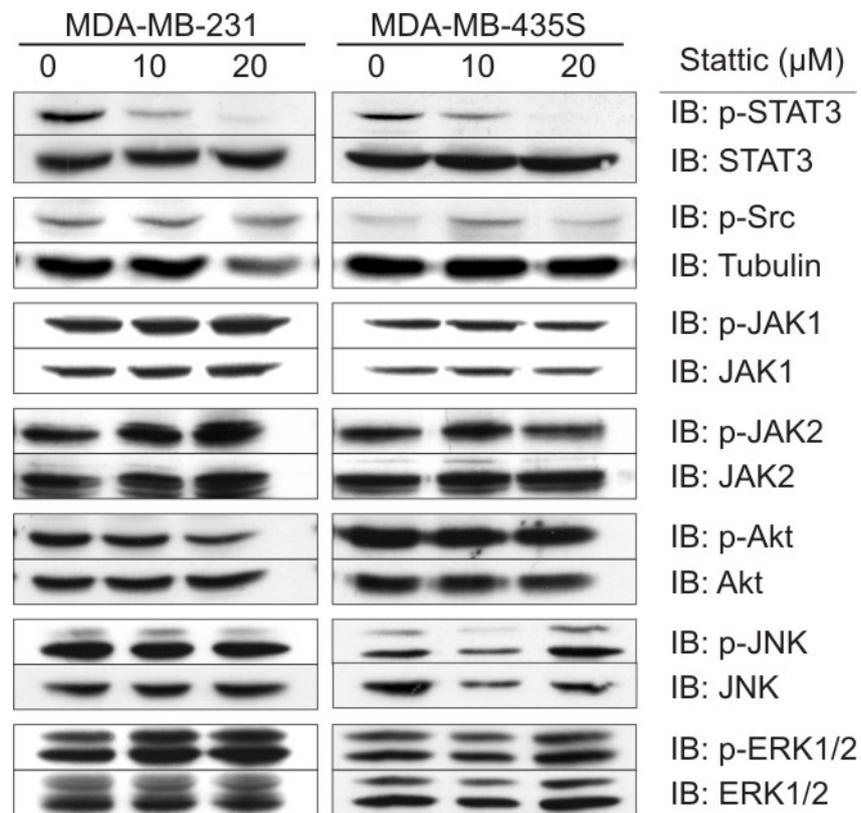


Abb. 47: Einfluss von Stattic auf ausgewählte Proteine in Brustkrebszelllinien.

Die Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435S wurden entweder mit 0,1% DMSO oder 10 μM oder 20 μM Stattic für zwei Stunden inkubiert. Etwa 30-50 μg Totallysat wurde mittels SDS-Page aufgetrennt und in der folgenden Westernblotanalyse mit Antikörpern gegen p-STAT3 (Y705), STAT3, p-Src (Y416), Tubulin, p-JAK1 (Y1022/Y1023), JAK1, p-JAK2 (Y1022/Y1023), JAK2, p-Akt (S473), Akt, p-JNK (T183/Y185), JNK, p-ERK1/2 (T202/Y204) und ERK1/2 analysiert. Die Experimente für diese Abbildung wurden von Bianca Sperl durchgeführt.

3.4.3.3. Einfluss von Stattic auf Apoptose in Brustkrebszelllinien

Aus der Literatur sind mehrere Beispiele bekannt, wo in den Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435S durch Inhibition von STAT3 durch kleine organische Inhibitoren Apoptose ausgelöst wird (Sun *et al.*, 2005; Turkson *et al.*, 2005; Turkson *et al.*, 2004b). Da die dritte Zelllinie MDA-MB-453 unabhängig von STAT3 ist, sollte in dieser durch Inaktivierung von STAT3 keine Apoptose ausgelöst werden.

Um die Apoptoserate in den drei Brustkrebszelllinien zu testen, wurden zunächst die Zellen entweder mit 0,1% DMSO oder 10 μM Stattic für 24 Stunden inkubiert, anschließend mit

Propidiumiodid gefärbt und einer Durchflusszytometrie unterworfen. Es wurde der prozentuale Sub-G₀/G₁-Wert quantitativ bestimmt. Dieser Wert entspricht dem Anteil an apoptotischen Zellen. In Abbildung 48 kann man erkennen, dass die Inkubation mit 10 µM Stattic selektiv in den MDA-MB-231 und den MDA-MB-435S Zellen die Apoptoserate erhöhte. Die STAT3-unabhängige Zelllinie MDA-MB-453 zeigte nur eine äußerst geringfügig erhöhte Apoptose im Vergleich zur DMSO Kontrolle.

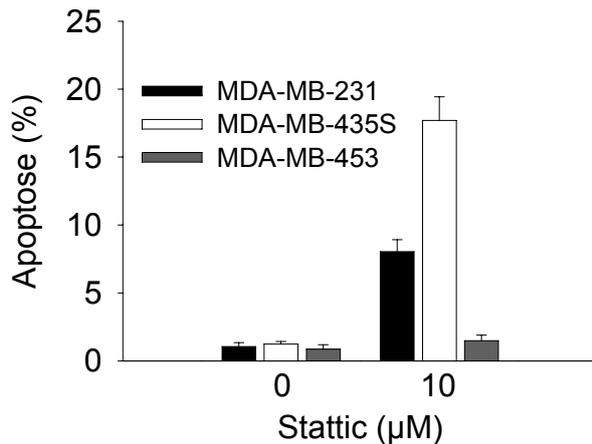


Abb. 48: Einfluss von Stattic auf die Apoptoserate in STAT3-abhängigen Brustkrebszellen.

MDA-MB-231, MDA-MB-435S und MDA-MB-453 Zellen wurden 24 Stunden mit entweder 0,1% DMSO oder 10 µM Stattic behandelt und 3 Stunden mit einem Propidiumiodid-Puffer gefärbt. Der DNA-Gehalt und der Sub-G₀/G₁-Wert wurde mittels Durchflusszytometrie quantitativ bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren das Mittel ± S.A. für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Neben der Möglichkeit, den Sub-G₀/G₁-Wert der Zellen mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen und über diesen Wert Rückschlüsse auf die Apoptose zu ziehen, gibt es weitere klassische Apoptoseassays. Einer davon ist der so genannte TUNEL-Assay (*TdT-mediated dUTP-X nick end labeling*) (Gold *et al.*, 1994; Gorczyca *et al.*, 1993). Hier werden die Zellen mit einer Reaktionsmischung behandelt, die TdT (*deoxynucleotidyl transferase*) und die Fluorescein-markierte DNA-Base dUTP enthält. Ein Merkmal der frühen Apoptosestadien der Zelle sind DNA-Strangbrüche. Diese können detektiert werden, indem das Enzym TdT den Einbau von Fluorescein-dUTP an die freien 3'-OH-Enden der ein- und doppelsträngigen DNA-Stücke katalysiert. Die Fluorescein-markierten DNA-Stücke können nun unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

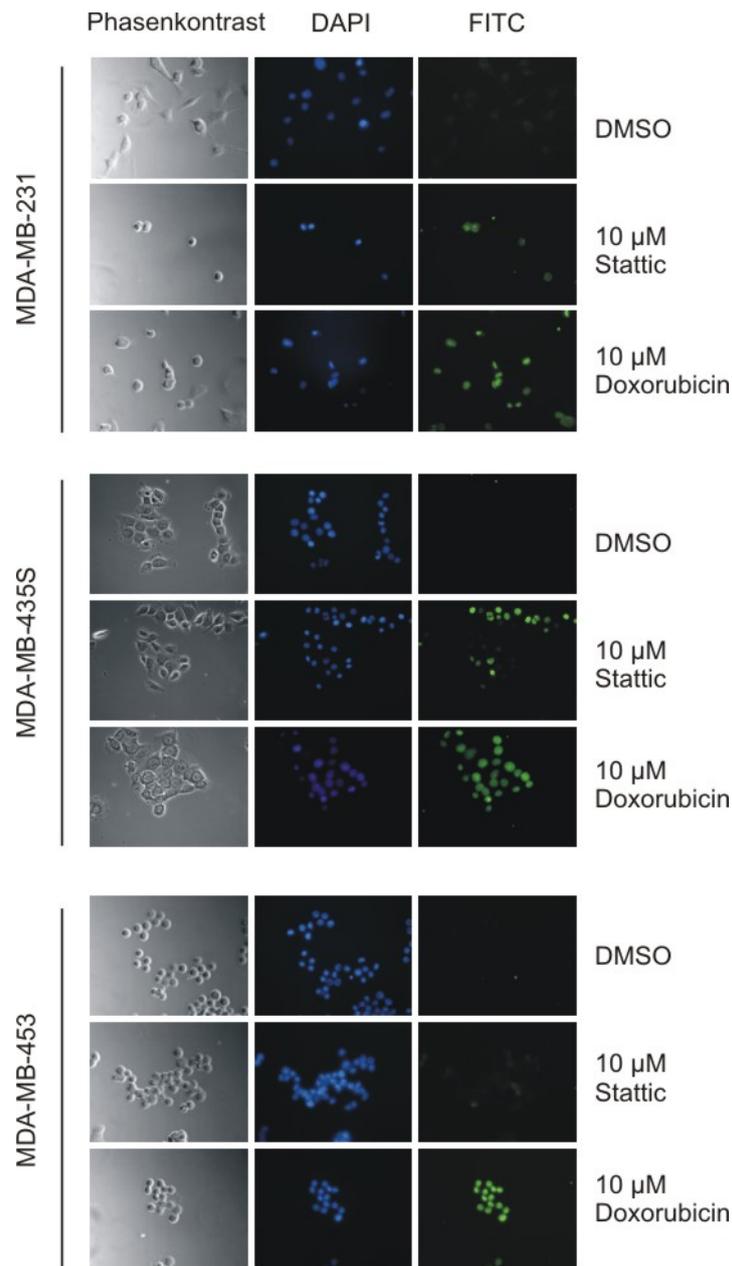


Abb. 49: TUNEL-Assay von Stattic-behandelten Brustkrebszellen.

Verschiedene Brustkrebszelllinien wurden 24 Stunden lang entweder mit 0,1% DMSO, 10 μM Stattic oder 10 μM Doxorubicin inkubiert. Die Zellen wurden fixiert, mit dem „In Situ Cell Death Detection Kit“ (Roche) nach Angaben des Herstellers behandelt und mit einer DAPI-Lösung angefärbt. Unter einem Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen mit einem 40x-Objektiv fotografiert. Gezeigt sind Phasenkontrastbilder, die Zellkerne (DAPI) und FITC-Färbung, welche DNA-Strangbrüche repräsentiert.

MDA-MB-231, MDA-MB-435S und MDA-MB-453 Zellen wurden entsprechend mit Stattic oder dem Chemotherapeutikum Doxorubicin behandelt und die DNA-Strangbrüche in einem TUNEL Assay sichtbar gemacht. 10 μM Stattic löste in den beiden Zelllinien mit konstitutiv-aktivem STAT3 (MDA-MB-231 und MDA-MB-435S) Apoptose aus, was man an der FITC Färbung, die DNA-Strangbrüche repräsentiert, in Abbildung 49 erkennen kann. Die STAT3-

unabhängige Zelllinie MDA-MB-453 hingegen zeigte keine Färbung von FITC und somit auch im TUNEL-Assay keine Anzeichen von Apoptose. Doxorubicin wurde als Positivkontrolle verwendet und löste in allen drei Zelllinien Apoptose aus (Abb. 49). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Stattic nur in Brustkrebszelllinien Apoptose auslöste, in welchen STAT3 phosphoryliert und konstitutiv-aktiv war. In der STAT3-unabhängigen Zelllinie MDA-MB-453 waren keine Anzeichen von Apoptose zu erkennen. Dies deutete darauf hin, dass Stattic selektiv STAT3 inhibiert und diese antagonistische Reaktion nur dann zum programmierten Zelltod führt, falls STAT3 phosphoryliert vorliegt.

4. Diskussion

Um grundlegende zelluläre Ereignisse wie Wachstum, Migration oder Differenzierung zu ermöglichen, muss das Gleichgewicht von Aktivierung und Inaktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren oder Zytokinrezeptoren einer ständigen und genauen Regulation unterworfen sein. Die Deregulation solcher Prozesse, z.B. durch unkontrollierte Kinaseaktivität, ist Ursache für die Entstehung hyperproliferativer Erkrankungen, wie z.B. Krebs (Kurzrock, 2001). Krebs ist eine genetische Erkrankung (Albertson *et al.*, 2003), so gelten beispielsweise Mutationen in den Rezeptoren oft als Auslöser für eine Erkrankung. Die Zielproteine einer Krebstherapie müssen aber nicht notwendigerweise selbst genetisch verändert sein. So trifft eine große Anzahl onkogener Signalwege auf eine limitierte Zahl von nukleären Transkriptionsfaktoren (Darnell, 2002). Diese Transkriptionsfaktoren bilden das letzte Glied in der Signalkette und führen schließlich nach Aktivierung zu einem entsprechenden Genexpressionsmuster, welches letztlich für Malignität verantwortlich ist. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde von Darnell *et al.* argumentiert, dass Transkriptionsfaktoren logische Zielproteine bei der Bekämpfung von Krebs sind (Darnell, 2002). Das Ausschalten eines einzelnen konstitutiv-aktiven Transkriptionsfaktors kann zur Blockade von schädlichen Effekten einer Vielzahl genetischer Veränderungen am Beginn der Signalkette führen.

4.1. STAT3, ein Zielprotein in der Krebstherapie?

Als ideales Zielprotein in der Krebstherapie sollte ein Transkriptionsfaktor vier allgemeine Kriterien erfüllen. Zum einen sollte dieses Protein zu einem hohen Prozentanteil in verschiedensten Tumorzellen konstitutiv-aktiv vorliegen. Von dem latent zytoplasmatischen Transkriptionsfaktor STAT3 ist bekannt, dass dieser aktiv an der malignen Transformation beteiligt ist. Eine konstitutive Aktivität von STAT3 wurde mit einer großen Häufigkeit in diversen menschlichen Zelllinien und Geweben gefunden (Bowman *et al.*, 2000; Buettner *et al.*, 2002).

Weiterhin sollte das Genexpressionsmuster nicht nur für das Überleben und das Wachstum der Krebszelle verantwortlich sind, sondern auch für andere maligne Merkmale wie Angiogenese oder der entkommenden Immunantwort (Hanahan & Weinberg, 2000). Von STAT3 ist bekannt, dass über die Transkription die Gene *bcl-x_L*, *survivin* oder *mcl1* reguliert werden. Diese Gene sichern unter anderem das Überleben und das Zellwachstum einer Tumorzelle in vielen Krebsarten (Niu *et al.*, 2002a). *c-myc* oder *cyclin D1* sind ebenfalls

publizierte Zielgene von STAT3 (Bromberg *et al.*, 1999). Auch das proapoptotische Protein p53, eines der wichtigsten Regulatoren von Zellwachstum und Überleben von Tumorzellen, wird exprimiert bei einer Inhibition von STAT3 durch Transfektion der dominant-negativen Variante von STAT3 in die menschlichen Melanomzelllinie A2058 (Niu *et al.*, 2005). Die intrinsische Fähigkeit von Krebszellen, unkontrolliert zu wachsen und der Apoptose zu widerstehen, ist für die Tumorentwicklung zwar oft notwendig, aber nicht ausreichend. Während der Organogenese müssen alle Zellen eines Gewebes große Nähe zu einem Blutgefäß besitzen, um die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu sichern (Hanahan & Folkman, 1996). Das stärkste Angiogenese-induzierende Signal generiert VEGF (Grunstein *et al.*, 1999), welches transkriptionell direkt von STAT3 reguliert wird (Niu *et al.*, 2002b). Die Fähigkeit, der Immunantwort zu entkommen, ist ein weiteres malignes Merkmal von Tumorzellen (Pardoll, 2003). Auch hier konnte gezeigt werden, dass in STAT3-defizienten Makrophagen die Expression entzündungsfördernder Stoffe wie zum Beispiel Zytokine stark erhöht ist (Takeda *et al.*, 1999). Zusammenfassend ist das Genexpressionsmuster des Transkriptionsfaktors STAT3 verantwortlich für viele Merkmale von Krebszellen und erfüllt somit das zweite Kriterium eines Zielproteins.

Das Prinzip der Wirksamkeit der Antagonisierung von STAT3 wurde 1999 durch Niu *et al.* demonstriert (Niu *et al.*, 1999). In diesen Studien induzierte die Expression einer dominant-negativen Variante des STAT3-Proteins Apoptose in Mausmelanoma-Zellen. Dies führte zu dem unerwarteten Nebeneffekt, dass selbst benachbarte Tumorzellen Apoptose einleiteten, die keine Gentherapie erhalten hatten (Niu *et al.*, 2001). Dies zeigte, dass STAT3 ein lohnendes Ziel für die Krebstherapie ist.

Tumorzellen sollten auch abhängiger von STAT3 sein als normale, gesunde Zellen. STAT3 spielt eine wichtige Rolle in der frühen Embryonalentwicklung, weshalb das frühe Ausschalten von STAT3 in Mäusen einen embryonal-lethalen Phänotyp hervorruft (Takeda *et al.*, 1997). Jedoch wachsen und überleben normale STAT3-defiziente Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Akira, 2000). Während in vielen Studien gezeigt werden konnte, dass die Inhibition der konstitutiven Aktivität von STAT3 in Tumorzellen zur Apoptose führt (Battle & Frank, 2002; Bowman *et al.*, 2000; Buettner *et al.*, 2002), konnte dies in normalen Zellen nicht beobachtet werden (Bowman *et al.*, 2001; Turkson *et al.*, 2001). Da STAT3 in vielen Zellen exprimiert ist (Chen *et al.*, 2006), ist dies eine weitere wichtige Voraussetzung für die Wahl von STAT3 als Zielprotein.

4.2. Kleine organische Moleküle als Inhibitoren von STAT3

Ein Ansatz, um den STAT3-Signalweg zu blockieren, ist die Inhibition der im Signalweg über STAT3 liegenden Kinasen, die für die Phosphorylierung von STAT3 verantwortlich sind. So konnte bei kleinen organischen Molekülen, welche die Proteine JAK, Src und den EFGR blockieren, gezeigt werden, dass diese den STAT3-Signalweg antagonisieren und Apoptose in Tumorzellen auslösen, in welchen das STAT3-Protein konstitutiv-aktiv vorliegt (Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2001; Niu *et al.*, 2002a). Zum Beispiel inhibiert Cucurbitacin I aus der klassischen chinesischen Kräutermedizin den JAK/STAT3 Signalweg über ein bislang unbekanntes Zielprotein (Blaskovich *et al.*, 2003). Der große Nachteil dieser unselektiven Inhibitoren im Vergleich zu direkten STAT3-Inhibitoren liegt darin, dass diese viele potentielle Zielproteine haben und somit meist unselektiv sind.

Es gab bereits viele Ansätze, STAT3 direkt zu antagonisieren. Diese Ansätze beinhalteten siRNA, Ködernucleotide, „G-quartet“ Oligonucleotide, Antisense oder die Verwendung der dominant-negativen STAT3-Variante (Kapitel 1.2.2.2.). Obwohl sich diese Nucleotidsäure-basierten Strategien gut für erste Versuche in Zellkultur eignen, haben sie dennoch einige Nachteile. Zum einen ist die klinische Nutzbarkeit als therapeutische Wirkstoffe aufgrund der hohen Herstellungskosten eingeschränkt und zum zweiten benötigen alle diese Varianten einen Transfektionsschritt, damit die Nucleotidsäuren die Zellmembran durchdringen können. Da STAT3-Proteine in der Zelle eine Halbwertszeit von etwa 8,5 Stunden aufweisen (Siewert *et al.*, 1999), ist die zeitliche Kontrolle der Transfektionsreaktion durch die bereits existierenden STAT3-Proteine stark limitiert.

Eine weitere Alternative ist die Wahl der physiologischen Protein-Modulatoren der STAT3-Proteine als Zielproteine. Durch gezielte Aktivierung der Proteine der SOCS-Familie, der PIAS-Familie oder von Phosphatasen (Kapitel 1.2.2.1.) könnte man ebenfalls die STAT3 Aktivierung inhibieren. Obwohl diese STAT3-interagierende Proteine als potentielle Zielkandidaten für eine therapeutische Entwicklung angesehen werden können, haben diese Proteine in den meisten Fällen eine Vielzahl weiterer Funktionen in der Zelle. Daher würden Agonisten dieser Protein-STAT3-Interaktionen in den meisten Fällen nicht spezifisch sein.

Ideal für die Inhibition von STAT3 wäre ein kleines organisches Molekül, welches direkt und spezifisch die STAT3-Aktivierung inhibieren würde. Allerdings gilt die direkte spezifische Inhibition von STATs aufgrund einer sehr flachen Bindungstasche der SH2-Domäne (Fry & Vassilev, 2005) und der großen Interaktionsfläche (Conte *et al.*, 1999) als äußerst schwierig. Dass eine direkte Inhibition dennoch möglich ist, zeigt das rationale Design von Peptiden, die an die STAT3-SH2-Domäne binden und dadurch die Aktivität von STAT3 antagonisieren (Turkson *et al.*, 2001). Diese kurzen Peptidsequenzen blockieren die STAT3-SH2-

Phosphotyrosin Interaktionen, die STAT3 Dimerisierung und die DNA-Bindungsaktivität von STAT3 sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Jedoch haben Peptide gegenüber kleinen organischen Molekülen die entscheidenden Nachteile, dass sie nur schwer die Zellmembran durchdringen können und in der Zelle durch Proteasen angreifbar sind. Kleine organische Moleküle, die die Funktion der STAT3-SH2-Domäne antagonisieren, könnten sowohl die Phosphorylierung von STAT3 als auch die Dimerisierung inhibieren. Daher können auch bereits phosphorylierte STAT3-Proteine inaktiviert werden, was die Effizienz erhöht. Anhand der Inhibition der Myc-Max-Dimerisierung durch ein kleines organisches Molekül konnte gezeigt werden, dass kleine organische Moleküle auch allgemein in der Lage sind, Protein-Protein-Interaktionen von Transkriptionsfaktoren zu antagonisieren (Berg *et al.*, 2002).

4.3. Hochdurchsatz-Verfahren zur Ermittlung von STAT3 Inhibitoren

Zunächst wurde ein Hochdurchsatz-Verfahren zur Identifikation von Aktivierungs- und Dimerisierungsinhibitoren von STAT3 in Betracht gezogen. Dieses Verfahren basierte auf FRET (Kapitel 3.1.1.), allerdings konnten die dazu benötigten STAT3-Proteine nicht aus Bakterien rekombinant gewonnen werden (Kapitel 3.1.1.). Um mit einer alternativen Methode ein kleines organisches Molekül zu identifizieren, welches an die SH2 Domäne von STAT3 bindet, wurde ein Fluoreszenzpolarisation-basierendes Hochdurchsatz-Verfahren etabliert (Kapitel 3.1.2.1.). Fluoreszenzpolarisation gilt als die empfindlichste, robusteste und am meisten verwendete Methode für Hochdurchsatz-Verfahren, um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen (Roehrl *et al.*, 2004). So ist es nicht verwunderlich, dass in der Literatur eine Reihe von Beispielen existieren, die auf Fluoreszenzpolarisation basierende Screeningverfahren eingesetzt haben (de Jong *et al.*, 2005).

Bei der Entwicklung des Assays wurde zunächst nach einem geeigneten Fluoreszenzmarkierten Phosphopeptid gesucht, welches an die STAT3-SH2-Domäne bindet. Ein von der STAT3-SH2-Bindungsdomäne abgeleitetes Phosphopeptid (Turkson *et al.*, 2001) zeigte jedoch im FP Assay keine Bindung an die SH2-Domäne (Kapitel 3.1.2.3.). Der Austausch von Prolin zu Glycin in der Sequenz vereinfachte zwar die Kopplung an 5-Carboxyfluorescein, aber auch dieses Phosphopeptid zeigte keine Bindung an die SH2-Domäne im FP-Assay (Kapitel 3.1.2.3.). Erst ein von der STAT3-Bindungsstelle des gp130-Rezeptors abgeleitetes Phosphopeptid (Ren *et al.*, 2003) zeigte eine stabile Bindungskurve (Kapitel 3.1.2.3.). Dies steht im Einklang mit der Literatur, in welcher pYXXQ als bevorzugte STAT3-Bindungssequenz beschrieben wird (Haan *et al.*, 1999).

Nach der Wahl eines Phosphopeptids wurde im nächsten Schritt die Zusammensetzung des Puffers variiert. Insbesondere die Salzkonzentration spielt eine wichtige Rolle, wie bereits in einem Src-SH2-Bindungsassay (Lynch *et al.*, 1997) beschrieben wurde. Beispielsweise wird durch Zugabe von Salzionen die Enthalpie der Ionen-Protein-Wechselwirkung verändert und es kommt zu einer Schwächung der Bindung zwischen dem Nukleotidinhistor Guanosin-3'-Monophosphat an das Protein Ribonuklease aufgrund einer kompetitiven Bindung mit den Salzionen (Waldron *et al.*, 2005). Dieser Effekt konnte auch in der Wechselwirkung zwischen dem STAT3-Phosphopeptid und der STAT3-SH2-Domäne im FP-Assay beobachtet werden (Kapitel 3.1.2.4.). Daher wurde im Folgenden der Natriumchloridgehalt des Puffers für *in vitro* Fluoreszenzpolarisations-Messungen konstant bei 50 mM gehalten. Da die Testsubstanzen in DMSO gelöst vorlagen, wurde auch der Einfluss dieses chemischen Lösungsmittels auf den Assay untersucht. Es stellte sich heraus, dass eine Erhöhung der DMSO-Konzentration nur ein leichtes Absinken der K_d Werte der Bindungskurven zur Folge hatte (Kapitel 3.1.2.4.). Dies steht im Einklang mit Untersuchungen eines FP-Assays für Protein-Protein-Interaktionen zwischen FtsZ/ZipA (Kenny *et al.*, 2003) und der Bindung eines Fluoreszenz-markierten Bad-Peptids an das Protein Bcl-x_L (Qian *et al.*, 2004). Daher war das Assayformat auch für die Verwendung von DMSO geeignet.

Die Spezifität der Bindung des STAT3-Phosphopeptids an die SH2-Domäne wurde untersucht, indem die Interaktion zwischen diesem Peptid und einem rekombinant exprimierten Lck Protein mittels FP bestimmt wurde. Die SH2-Domänen der beiden Proteine unterscheiden sich stark voneinander, es konnte somit ausgeschlossen werden, dass das STAT3-Phosphopeptid generell an jede SH2-Domäne bindet. Im Vergleich mit einem Lck-Peptid (Lynch *et al.*, 1997) konnte die spezifische Bindung der jeweiligen Phosphopeptide an ihre Proteine bestätigt werden (Kapitel 3.1.2.5.). Im Folgenden wurde untersucht, ab welcher Konzentration Phosphopeptide ohne Fluoreszenz-Markierung das an STAT3 gebundene Fluoreszenz-markierte Phosphopeptid verdrängen können. Dabei wies das diesem Peptid analoge Peptid ohne die entsprechende Fluoreszenzmarkierung die besten antagonistischen Eigenschaften auf (Kapitel 3.1.2.6.). Die fehlende inhibitorische Aktivität des unphosphorylierten Peptids wurde ebenfalls bei der Bindung von BACH1-Peptiden an die Proteindomäne BRCT (BRCA1 Carboxyterminale Domäne) beobachtet (Lokesh *et al.*, 2006) und zeigte, dass eine SH2-Phosphotyrosin-Wechselwirkung für die Bindung des STAT3-Phosphopeptids an die STAT3-SH2-Domäne verantwortlich ist. Während Fluoreszenz-markierte Peptide, die von der STAT3-SH2-Bindungsdomäne abgeleitet waren, keine Bindung an das unphosphorylierte STAT3-Protein zeigten (Kapitel 3.1.2.3.), konnten

die analogen unmarkierten Phosphopeptide das vom gp130-Rezeptor abgeleitete Phosphopeptid vom Protein verdrängen (Kapitel 3.1.2.6.). Diese Inhibition war deutlich geringer verglichen mit der Peptidsequenz pYLPQTV und steht im Einklang mit der Theorie, dass pYXXQ die bevorzugte Bindungssequenz für die STAT3-SH2-Domäne darstellt (Haan *et al.*, 1999). Das Peptid GpYEEIP wurde bereits in der Literatur untersucht und zeigte dort nur schwache inhibitorischen Fähigkeiten in einem STAT1-Bindungsassay (Wu *et al.*, 1997), konnte aber die Bindung des analogen Fluor-Peptids an Src antagonisieren (Lynch *et al.*, 1997). Dies stimmt mit den Untersuchungen dieser Arbeit überein, da 5-Carboxyfluorescein-GpYEEIP an das zur Src-Familie zugehörige Lck-Protein bindet, aber nur geringe inhibitorische Aktivität im STAT3-Assay hatte (Kapitel 3.1.2.6.). Phosphotyrosin selbst hatte nur eine geringe antagonistische Wirkung in diesem Assay. Dies zeigte, dass eine bestimmte Peptidsequenz für die Inhibition benötigt wird und eine geringe Abweichung zu veränderten Affinitäten führen kann. Auch dies konnte bereits in Publikationen bestätigt werden (Lokesh *et al.*, 2006; Lynch *et al.*, 1997; Lynch *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2002a). Zusammengenommen demonstrierten die Ergebnisse, dass die spezifische Inhibition einer STAT3-SH2-Domäne möglich ist.

Die zeitliche Stabilität spielt bei einem Hochdurchsatz-Verfahren eine wichtige Rolle. Hochdurchsatz-Verfahren, die auf Fluoreszenzpolarisation beruhen, werden in der Literatur als zeitlich sehr robust beschrieben (Lokesh *et al.*, 2006; Nikolovska-Coleska *et al.*, 2004; Qian *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2002a), was experimentell bestätigt werden konnte (Kapitel 3.1.2.8.). Der Z' -Wert eines Hochdurchsatz-Verfahrens gilt als Maß für die Fehlerabweichungen (Zhang *et al.*, 1999a) und wurde mit $0,87 \pm 0,03$ berechnet (Kapitel 3.1.2.8.). In anderen Verfahren wurden Z' -Werte von 0,73 und 0,80 für einen Bcl-X_L-Assay (Qian *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2002a), 0,88 für XIAP-Assay (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) (Nikolovska-Coleska *et al.*, 2004) und 0,87 für den bereits erwähnten BRCT-Assay (Lokesh *et al.*, 2006) ermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass das in dieser Arbeit etablierte Hochdurchsatz-Verfahren stabil ist und gut dafür geeignet ist, kleine organische Moleküle zu identifizieren, die an die SH2-Domäne von STAT3 binden.

4.4. Identifikation des STAT3-Inhibitors „Stattic“

Es wurden in dieser Arbeit zunächst 17.298 Substanzen aus kommerziellen Substanzbibliotheken auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Bindung zwischen dem Phosphopeptid 5-Carboxyfluorescein-GpYLPQTV-NH₂ und STAT3 zu inhibieren und somit die Funktion der STAT3-SH2-Domäne zu inhibieren. Die niedrige Anzahl von 144

gefundenen Substanzen, welche das Phosphopeptid vom STAT3 mit einer Inhibitionsrate von mehr als 60% verdrängen konnten, entspricht einem prozentualen Anteil von nur 0,8% (Kapitel 3.2.1.). Auch aus den insgesamt 5.163 Naturstoffen bzw. Naturstoffderivaten konnten nur 9 potentielle Inhibitoren von STAT3 identifiziert werden (Kapitel 3.2.2.). Diese Zahlen erscheinen auf den ersten Blick extrem niedrig, verdeutlichen aber, dass nur bestimmte Substanzklassen Protein-Protein-Interaktionen inhibieren können. So wurde in einer Hochdurchsatz-Analyse der FtsZ-ZipA-Interaktion mittels Fluoreszenzpolarisation aus 250.000 Substanzen 29 mögliche Antagonisten (0,01%) (Kenny *et al.*, 2003) und bei einer Analyse der Bcl-x_L-Bad-Interaktion aus 370.400 Substanzen 425 mögliche Inhibitoren (Qian *et al.*, 2004) identifiziert (0,1%). Bei der Auswahl eines selektiven Inhibitors wurden sehr harte Selektionskriterien angelegt, so wurde insbesondere darauf geachtet, dass der Inhibitor zellgängig war und in HepG2 Zellen selektiv die nukleäre Lokalisation von STAT3 inhibierte, aber nicht die von STAT1 (Kapitel 3.4.1.4. und 3.4.1.5.). Dies ist ein sehr hartes Auswahlkriterium, da die SH2-Domänen der beiden Proteine zu 78% ähnlich sind. Da aber STAT1 und STAT3 konträre Eigenschaften haben und STAT1 als antiproliferativ angesehen wird (Bromberg *et al.*, 1996; Stephanou & Latchman, 2005; Widschwendter *et al.*, 2002), wäre ein Inhibitor, der die Funktion beider SH2-Domänen inhibiert, kontraproduktiv. Zudem ist bekannt, dass in Tumoren und Tumorzelllinien oft mehr als ein Mitglied der STAT-Familie konstitutiv-aktiv vorliegt (Yu & Jove, 2004) und man daher für das gezielte Ausschalten von STAT3 einen innerhalb der STAT-Familie selektiven STAT3-Inhibitor benötigt. Aufgrund der harten Selektionskriterien konnte schließlich nur eine Verbindung identifiziert werden (Tabelle 3), die den Ansprüchen gerecht wurde. Diese Substanz, MWP00043, wurde Stattic (*STAT three inhibitory compound*) getauft (Abb. 19), da aufgrund der selektiven Inhibition von STAT3 das Protein statisch über die gesamte Zelle verteilt bleibt und nach Aktivierung nicht im Kern akkumuliert (Kapitel 3.4.1.5.).

4.5. In vitro Charakterisierung von Stattic

Zu Beginn dieser Arbeit gab es in der Literatur bis auf peptidische Inhibitoren von STAT3 (Turkson *et al.*, 2001) und einem chemischen Inhibitor des STAT3-Signalwegs (Weidler *et al.*, 2000) keine direkten chemischen Antagonisten von STAT3. Im Laufe dieser Arbeit erschienen zwar mehrere Publikationen über Inhibitoren des STAT3-Signalwegs, aber bislang wurde nie experimentell gezeigt, dass die jeweilige Substanz über eine direkte Bindung an STAT3 den antagonistischen Effekt ausübt. Um Hinweise auf den Mechanismus von Stattic zu bekommen, wurde dieser STAT3-Inhibitor zunächst *in vitro* charakterisiert.

Bei der Betrachtung der Struktur (Abb. 19) fällt neben der aromatischen Nitrogruppe insbesondere eine Vinylsulfongruppe im Molekül auf, die ein Michael-Akzeptorsystem darstellt. Dies legt die Vermutung nahe, dass die inhibitorische Reaktion irreversibel verläuft und dass eine nukleophile Aminosäure des STAT3-Proteins als Michael-Donor auftritt und eine kovalente Bindung geknüpft wird. Irreversible Inhibitoren gibt es sehr häufig in der Literatur, so sind beispielsweise irreversible chemische Inhibitoren von Serin-, Threonin- oder Cysteinproteasen (Powers *et al.*, 2002) oder auch irreversible Kinaseinhibitoren des EGFR (Albanell & Gascon, 2005) bekannt. Aber auch sehr bekannte Medikamente wie Aspirin (Reinhart, 1999) oder Penicillin (Buynak, 2006) sind irreversible Inhibitoren und werden seit langem in der Therapie verwendet. Eine Inhibition der Bindung des Fluoreszenz-markierten Phosphopeptids an STAT3 bei drei verschiedenen Temperaturen zwischen 22°C und 37°C zeigte eine starke Abhängigkeit der Reaktion von der Temperatur. Dabei war die Inhibition bei der physiologisch relevanten Temperatur von 37°C mit einem IC₅₀-Wert von $5 \pm 1 \mu\text{M}$ am besten (Kapitel 3.3.2.). Da eine Temperatur-Abhängigkeit häufig mit einer kovalent ablaufenden Reaktion in Zusammenhang gebracht wird, deutete dies ebenfalls auf einen irreversiblen Mechanismus hin. In den weiteren Experimenten stellte sich schließlich auch heraus, dass die Reaktion auch stark zeitabhängig war (Kapitel 3.3.4.2.), was diese These untermauerte.

Wie schon in Kapitel 4.3. angedeutet, ist die Spezifität eines STAT3-Inhibitors gegenüber anderen Proteinen von entscheidender Bedeutung. Daher wurde das Potential von Stattic, Fluoreszenz-markierte Phosphopeptide von der STAT1-SH2-Domäne bzw. STAT5b-SH2-Domäne zu verdrängen, näher untersucht. Es stellte sich heraus, dass bei 100 μM Stattic im Vergleich zu STAT3 der Inhibitionswert für STAT1 40% niedriger und für STAT5b 60% niedriger lag (Kapitel 3.3.3.1.). Bedenkt man die Ähnlichkeiten der SH2-Domänen zueinander (78% ähnlich mit STAT1 und 59% mit STAT5b), korrelierten die Inhibitionswerte mit dem Grad der Ähnlichkeit der SH2-Domänen. So zeigte Stattic kaum eine Wirkung bei der Verdrängung eines Phosphopeptids von der SH2-Domäne von Lck oder bei der Dimerisierung von c-Myc/Max und Jun/Jun, die im Gegensatz zu den STATs oder Lck keine SH2-Domäne haben (Kapitel 3.3.3.2.). Dies deutete darauf hin, dass Stattic spezifisch innerhalb der STAT-Familie bevorzugt an das STAT3-Protein bindet, aber andere Protein-Protein-Interaktionen nicht von Stattic beeinflusst werden. Bei einer eingehenden Betrachtung der Kinetik der Inhibitionsreaktion stellte sich heraus, dass die antagonistische Reaktion bei STAT3, STAT1 und STAT5b zeitabhängig verlief (Kapitel 3.3.4.3.), während bei Lck keine Abhängigkeit von der Zeit zu registrieren war (Kapitel 3.3.4.4.). Auch dies untermauerte die

These, dass Stattic spezifisch die Funktion der SH2-Domäne von STAT3 inhibiert, aber nicht andere SH2-Domänen außerhalb der STAT-Proteinfamilie. Ein Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten der Kinetik innerhalb der STAT-Familie machte deutlich, dass die STAT1- bzw. STAT5-Reaktion 75% bzw. 58% langsamer verlief als die Inhibitionsreaktion bei STAT3 (Kapitel 3.3.4.3.). Somit konnte gezeigt werden, dass die Inhibitionsreaktion bei STAT3 innerhalb der STAT-Familie am schnellsten ablief. Auch in der Literatur gibt es Beispiele für kinetische Betrachtungen irreversibler Reaktionen zwischen chemischen Inhibitoren und Proteinen (Choi *et al.*, 2005).

Um die Bindung von Stattic an die STAT3-SH2-Domäne eingehender zu charakterisieren, wurde die kinetische Betrachtung mit einem zusätzlich in der Lösung befindlichen unmarkierten Phosphopeptid, welches an die STAT3-SH2-Domäne bindet, durchgeführt. Die Auswertung der Kinetik ergab eine kompetitive Inhibition beim Vergleich zwischen diesem Phosphopeptid und Stattic (Kapitel 3.3.4.5.). Dies wies darauf hin, dass Stattic und das Phosphopeptid um dieselbe Bindungsstelle im STAT3-Protein konkurrierten und untermauerte somit die These, dass Stattic kovalent innerhalb oder in der Nähe der STAT3-SH2-Domäne bindet. Der Einsatz von verschiedenen Nucleophilen als mögliche physiologische Inhibitoren von Stattic (Kapitel 3.3.5.) zeigte einerseits, dass in einer zellulären Umgebung mit einer leicht höheren Konzentration von Stattic für eine Inhibition im Vergleich zu den *in vitro* Daten gerechnet werden sollte, da Glutathion leicht störend auf die Reaktion wirkte, aber in vielen Zellen in höherer Konzentration vorhanden ist. So ist Glutathion das vorherrschende niedermolekulare Thiol in Zellen (0,5 – 10 mmol/L) und befindet sich zu 90% im Zytosol (Wu *et al.*, 2004). Ein Vergleich verschiedener Aminosäuren wies darauf hin, dass vermutlich ein Cysteinrest im STAT3-Protein für die kovalente Bindung an Stattic verantwortlich sein könnte, da Cystein ebenfalls die antagonistische Reaktion abschwächte. In der Literatur gibt es ebenso Beispiele von Vinylsulfon-haltigen Verbindungen, die selektiv an Cysteinreste in Proteinen kovalent binden können (Palmer *et al.*, 1995). Die Frage, ob Stattic tatsächlich an ein Cysteinrest in der SH2-Domäne von STAT3 bindet, konnte im Laufe dieser Arbeit mit massenspektrometrischen Untersuchungen, Mutationsanalysen und Bindungsstudien am Computer jedoch nicht abschließend geklärt werden (Daten nicht gezeigt). Als Beweis für diese These könnten in weiterführenden Experimenten massenspektrometrische oder kristallografische Untersuchungen dienen.

Einen zusätzlichen Hinweis auf den Mechanismus der Reaktion lieferte eine Struktur-Wirkungs-Beziehung von Stattic. So konnte gezeigt werden, dass sowohl die Nitrogruppe als auch die Doppelbindung der Vinylsulfongruppe entscheidend für die inhibitorische Aktivität

von Stattic sind (Kapitel 3.3.6.). Dies bestätigte nochmals die These, dass Stattic kovalent an STAT3 bindet.

4.6. Zellbiologische Charakterisierung

STAT3 als latent zytoplasmatischer Transkriptionsfaktor bindet im ersten Schritt der Aktivierung an phosphorylierte Tyrosinreste von Rezeptoren oder onkogenen Proteinen und wird daraufhin selbst am Tyrosinrest 705 phosphoryliert. Erst nach der anschließenden Dimerisierung über eine reziproke Interaktionen zwischen jeweils einem Phosphotyrosin und einer STAT3-SH2-Domäne akkumuliert STAT3-Protein im Nukleus und bindet dort an Promotorsequenzen, um die Transkription von Zielgenen zu regulieren. Frühere Arbeiten mit einem Phosphopeptid, welches an die SH2-Domäne von STAT3 bindet, deuteten bereits eine Inhibition der Dimerisierung von STAT3 an (Turkson *et al.*, 2001). Da bereits experimentelle Hinweise existierten, dass Stattic an die SH2-Domäne von STAT3 bindet, würde man eine Blockade der Bindung von STAT3 an Rezeptoren und eine draus resultierende Inhibition der Phosphorylierung des Proteins erwarten. Im zweiten Schritt sollte ein solcher Inhibitor analog zum oben erwähnten Peptid auch die Dimerisierung von STAT3 inhibieren können.

Deshalb wurde untersucht, ob Stattic die Phosphorylierung von STAT3 inhibieren kann. Dies konnte in verschiedenen Zellsystemen demonstriert werden. In HepG2 Zellen inhibierte 20 μM Stattic die STAT3-Tyrosinphosphorylierung, während die Phosphorylierung von STAT1 bei dieser Konzentration stabil war (Kapitel 3.4.1.1.). Dieses Ergebnis konnte auch anhand einer EMSA-Analyse bestätigt werden, in welcher bereits 5 μM Stattic eine Schwächung des DNA-Bindungsaktivität der STAT3-Dimer hervorrief, während selbst 20 μM die DNA-Bindungsaktivität von STAT1 nicht schwächte (Kapitel 3.4.1.2.). Cheng *et al.* konnten beispielsweise nur zeigen, dass Natriumarsenat im gleichen Zellsystem erst bei 40 μM unspezifisch die Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 inhibiert (Cheng *et al.*, 2004). Dies zeigte, dass in einem zellulären System Stattic innerhalb der STAT-Familie bevorzugt STAT3 inhibiert. Weiterführende Untersuchungen der Inhibition der Phosphorylierung von STAT3 in NIH3T3/Src Zellen und zwei Brustkrebszelllinien konnten dies bestätigen. In NIH3T3/Src Zellen ist STAT3 konstitutiv-aktiv (Kapitel 3.4.2.1.) und während nach zweistündiger Inkubationsdauer der Zellen mit 20 μM Stattic das Phosphorylierungssignal von STAT3 unterdrückt wurde, erzeugten nach 48 Stunden bereits 5 μM denselben Effekt (Kapitel 3.4.2.2.). Dies korrelierte mit den *in vitro* Experimenten, in welchen ebenfalls eine Zeitabhängigkeit zu beobachten war und deutete auf einen irreversiblen Mechanismus hin. Mit dem NIH3T3/Src Zell-System wurde auch der Einfluss des Platinkomplexes IS3 295 auf

die STAT3 Phosphorylierung überprüft und während IS3 295 nach 24 Stunden eine ähnliche Inhibitionsrate wie Stattic zeigte (Turkson *et al.*, 2005), wurde in diesem Fall jedoch die Zeitabhängigkeit nicht untersucht. Um die Spezifität in einer zellulären Umgebung näher zu charakterisieren, wurde ebenfalls der Einfluss auf die konstitutive STAT3-Aktivität (Kapitel 3.4.3.1.) in den Brustkrebszellen MDA-MB-231 und MDA-MB-435S analysiert. Dabei wurde beobachtet, dass bereits 10 μM Stattic in einer Westernblot-Analyse ausreichten, um die STAT3-Phosphorylierung zu schwächen (Kapitel 3.4.3.2.). Auch in der Literatur finden sich einige Beispiele von Publikationen, die auf dieses Zellsystem zurückgegriffen haben (Song *et al.*, 2005; Turkson *et al.*, 2005). Es wurden im Rahmen dieser Arbeit über die Phosphorylierung von STAT3 hinaus auch die Autophosphorylierung der in der Signalkette über STAT3 liegenden Kinasen JAK1, JAK2 und Src untersucht, sowie die Phosphorylierung von den Proteinen Akt, ERK1/2 und JNK, die in anderen Signalwegen angesiedelt sind. Während die Analysen in dieser Arbeit keine Inhibition der Phosphorylierung der getesteten Proteine anzeigten (Kapitel 3.4.3.2.), findet man bei publizierten STAT3-Inhibitoren oftmals eine Inhibition der über STAT3 liegenden Kinasen (Blaskovich *et al.*, 2003; Nam *et al.*, 2005), was auf einen anderen Mechanismus des getesteten Antagonisten hinweist. Es wurden auch unzureichende Tests publiziert, so wurde in den Westernblot-Analysen der Verbindungen STA-21 (Song *et al.*, 2005) und Cucurbitacin Q (Sun *et al.*, 2005), beides potentielle direkte Inhibitoren von STAT3, die Phosphorylierung der Kinase JAK1 in den Tests ausgelassen. Dabei spielt die Kinase JAK1 in der STAT3-Signalkette eine besonders wichtige Rolle bei der STAT3-Phosphorylierung (Guschin *et al.*, 1995; Rodig *et al.*, 1998; Schaper *et al.*, 1998). Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass Stattic gezielt die Tyrosinphosphorylierung von STAT3 unterband, während andere Signalwege und darüber liegende Kinasen nicht beeinflusst wurden. Dies deutete darauf hin, dass Stattic diesen Effekt durch kovalente Bindung an das STAT3-Protein hervorruft.

Neben der Phosphorylierung wurde im nächsten Schritt getestet, ob Stattic auch die Dimerisierungsreaktion der STATs inhibieren kann. Dazu wurde eine *in vitro* EMSA-Analyse mit vorphosphorylierten STAT3- und STAT1-Dimeren aus nukleären Extrakten herangezogen, da nur dimerisierte STAT-Proteine an ein radioaktiv markiertes Oligonukleotid binden können (Levy & Darnell, 2002). Dieses Experiment zeigte, dass die 60-minütige Inkubation mit 50 μM Stattic bereits die DNA-Bindungsaktivität von STAT3 deutlich schwächte, während die DNA-Bindungsaktivität von STAT1 selbst bei Inkubation mit 500 μM Stattic nicht inhibiert wurde. Vergleicht man die erhaltenen Inhibitionswerte mit den Daten aus der Westernblot-Analyse, so wurde interessanterweise eine höhere Konzentration

an Stattic benötigt, um einen antagonistischen Effekt zu erzielen. Da aber die eigentliche Inhibitionsreaktion *in vitro* bei 30°C durchgeführt wurde, erklärt sich diese Tatsache aus der bereits gezeigten Abhängigkeit der Reaktion von der Temperatur (Kapitel 3.3.2. und Kapitel 3.4.2.2.). Betrachtet man sich analoge Experimente aus der Literatur, so findet man häufig nicht nur eine STAT3:STAT3:DNA Bande, sondern auch DNA-gebundene STAT3:STAT1 Heterodimere und STAT1:STAT1 Homodimere (Turkson *et al.*, 2005). Haan *et al.* fanden jedoch heraus, dass das Auftauchen dieser zusätzlichen Banden stark vom verwendeten Liganden bei der Stimulation der Zellen abhängig ist (Haan *et al.*, 2005). Zwar gibt es in der Literatur Berichte über STAT1-Aktivierung nach Stimulation mit IL-6 (Costa-Pereira *et al.*, 2002), allerdings scheint dieser Effekt nur in STAT3-defizienten Zellen aufzutreten. Daher war in HepG2 Zellen das selektive Auftreten von STAT3-Dimeren nach IL-6 Stimulation und von STAT1-Dimeren nach Stimulation mit IFN- γ zu erwarten.

Nach dem experimentellen Beweis, dass Stattic sowohl die Phosphorylierung als auch *in vitro* die Dimerisierung von STAT3, aber nicht von STAT1 inhibierte, wurde nun untersucht, ob Stattic aufgrund dieses selektiven antagonistischen Effekts auch ausschließlich die Lokalisation von STAT3 in den Zellkern inhibieren würde. Im Anschluss an die Etablierung eines Lokalisationsexperiments, mit welchem die Wanderung von STAT3 und STAT1 in den Zellkern gleichzeitig verfolgbar war (Kapitel 3.4.1.4.), wurden die Zellen mit 20 μ M Stattic inkubiert und anschließend stimuliert. Beide STAT-Proteine waren vor Stimulation komplett über die gesamte Zelle verteilt und nach Stimulation im Zellkern lokalisiert, was im Einklang mit einer quantitativen Analyse der Proteinverteilung der STATs vor und nach Stimulation in verschiedenen Zellsystemen steht (Meyer *et al.*, 2002). Auch andere Publikationen beschreiben eine stetige Wanderung der STAT-Proteine zwischen Zytoplasma und Zellkern im gehungerten Zustand (Kretzschmar *et al.*, 2004; Meyer & Vinkemeier, 2004; Prana da *et al.*, 2004). Es war deutlich zu beobachten, dass nach Inkubation mit 20 μ M Stattic selektiv STAT3 an der Lokalisation im Zellkern inhibiert wurde, nicht jedoch STAT1 (Kapitel 3.4.1.5.). Dies stand im Einklang mit den vorangegangenen Versuchen über die Phosphorylierung oder Dimerisierung und deutete ebenfalls auf eine selektive STAT3-Inhibition hin.

Ein zellgängiges Phosphopeptid, welches an die STAT3-SH2-Domäne bindet, inhibierte das STAT3-abhängige Wachstum von Kolonien von NIH3T3/v-Src Zellen in Weichagar (Turkson *et al.*, 2001). Da STAT3-Aktivität für die transformativen Fähigkeiten von v-Src essentiell zu sein scheint (Bromberg *et al.*, 1998; Silva, 2004), bot sich mit diesem Transformationsassay eine Möglichkeit, die Wirkung von Stattic auf eine onkogene

Eigenschaft von STAT3 zu testen. NIH3T3/Ras Zellen dienten dabei als Kontrolle, da diese Zellen weitgehend unabhängig von STAT3 Kolonien in Weichagar bilden können (Aftab *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2003). 1 μM Stattic reduzierte dabei die Anzahl der Kolonien der NIH3T3/Src Zellen um die Hälfte, während die Anzahl der Kolonien der NIH3T3/Ras Zellen nicht signifikant niedriger lag. Interessanterweise lag die Konzentration von 1 μM um einen Faktor 5-20 niedriger als die sonstigen für einen inhibitorischen Effekt benötigten Konzentrationen. Diese Diskrepanz war jedoch durch die Tatsache erklärbar, dass das Experiment über einen Zeitraum von 14 Tagen hinweg durchgeführt wurde und bereits vorherige Versuche eine Zeitabhängigkeit der Reaktion zeigten (Kapitel 3.4.2.4.). Untermuert wurde dieser Versuch durch einen Src-Kinaseassay (Kapitel 3.4.2.4.), der darauf hindeutete, dass die inhibitorische Wirkung von Stattic auf das Wachstum der Kolonien durch direkte Inhibition von STAT3 zustande kam. Eine Reduktion des Wachstums der NIH3T3/Ras Zellen in Kontaktinhibitionsassays („*focus formation*“) wurde bei Transfektion von höheren Konzentrationen an dominant-negativem STAT3 beobachtet und daher wäre auch in Weichagar bei einer vollständigen Inhibition von STAT3 ein reduzierender Effekt auf das Koloniewachstum von NIH3T3/Ras Zellen zu erwarten (Turkson *et al.*, 1998). Derselbe Effekt wurde beispielsweise in einem analogen Weichagar-Assay beobachtet, in welchem STAT3 durch den Platinkomplex IS3 295 inhibiert wurde (Turkson *et al.*, 2005).

Es ist bekannt, dass eine Inhibition von STAT3 selektiv in STAT3-abhängigen Tumorzellen Apoptose auslöst (Battle & Frank, 2002; Bowman *et al.*, 2000; Buettner *et al.*, 2002), aber nicht in normalen Zellen (Bowman *et al.*, 2001; Turkson *et al.*, 2001). Diese Tatsache wurde dazu benutzt, Stattic in zwei Zellsystemen zu testen. In NIH3T3/Src Zellen führte die 48-stündige Inkubation mit 5 μM Stattic in Übereinstimmung mit der Inhibition der Phosphorylierung von STAT3 (Kapitel 3.4.2.2.) zu einer drastischen Erhöhung der Apoptoserate (Kapitel 3.4.2.3.). Interessanterweise zeigten auch die beiden Kontrollzelllinien eine leicht höhere Apoptoserate. Allerdings ist bekannt, dass auch in Zelllinien, die bei vereinfachter Betrachtung als STAT3-unabhängig bezeichnet werden, durch die Inhibition von STAT3 Apoptose ausgelöst werden kann, da mit steigender Zelldichte auch diese Zelllinien phosphoryliertes STAT3-Protein aufweisen können (Vultur *et al.*, 2004). Daher ist die leicht erhöhte Apoptoserate in diesen Zellen eher diesem Effekt als einer unspezifischen Inhibition durch Stattic zuzuschreiben. Auch die Behandlung von STAT3-inaktiven Zellen mit der Verbindung Resveratrol, einem Inhibitor des STAT3-Signalwegs, führte in diesen Zellen zu einer reversiblen Hemmung des Wachstums und einer leicht erhöhten Apoptoserate (Kotha *et al.*, 2006), was diese These weiter untermauerte. Die Inhibition von STAT3 in

verschiedenen STAT3-abhängigen und -unabhängigen Brustkrebszelllinien zeigte nach 24-stündiger Inkubation mit 10 μ M Stattic deutliche Anzeichen von Apoptose in den beiden Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435S (Kapitel 3.4.3.3.), die MDA-MB-453 Zellen zeigten hingegen keine erhöhte Apoptoserate. Da MDA-MB-453 Zellen im Gegensatz zu den anderen beiden Brustkrebszelllinien kein konstitutiv-aktives STAT3-Protein haben (Kapitel 3.4.3.1.), deutete dieses Ergebnis darauf hin, dass Stattic durch die direkte Inhibition von STAT3 in Zellen mit konstitutiv-aktiven STAT3 Apoptose auslöst. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit verschiedenen Inhibitoren des STAT3-Signalwegs erreicht (Song *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2005; Turkson *et al.*, 2005), was dieses Ergebnis zusätzlich unterstützte.

Eine Bestätigung der Struktur-Wirkungs-Beziehung aus Kapitel 3.3.6. wurde in den zellulären Assays gewonnen. Insbesondere Verbindung **4** ohne die Doppelbindung zeigte keine Effekte bei der Inhibition der Dimerisierung (Kapitel 3.4.1.3.), der Antagonisierung der Lokalisation (Kapitel 3.4.1.5.) oder in den Weichagar-Assays (Kapitel 3.4.2.3.). Dies bestätigte nochmals die bereits aufgestellte These, dass Stattic kovalent an STAT3 bindet.

Im Vergleich zu den bereits publizierten Inhibitoren von STAT3 oder dem STAT3-Signalweg (Kapitel 1.2.2.2.) ist ein klarer Vorteil von Stattic, dass dieser Inhibitor direkt auf STAT3 einwirkt, was man äußerst selten findet. So gelten nur Galiellalakton (Weidler *et al.*, 2000), die Platinkomplexe CPA-7 und IS3 295 (Turkson *et al.*, 2005; Turkson *et al.*, 2004b) und STA-21 (Song *et al.*, 2005) als direkte STAT3-Antagonisten. Ein weiterer wichtiger Vorteil von Stattic liegt in der Selektivität gegenüber von STAT1, die ansonsten in der Literatur nur von STA-21 mittels einer EMSA-Analyse, aber nicht in einer Westernblot-Analyse gezeigt wurde.

4.7 Ausblick

Zusammenfassend konnte durch umfassende *in vitro* Analysen und biologische Experimente in drei verschiedenen Zellsystemen demonstriert werden, dass Stattic über eine kovalente Bindung vermutlich in der SH2-Domäne von STAT3 bindet. Über diese irreversible Reaktion, die zeit- und temperaturabhängig verlief, wurde die Phosphorylierung und Dimerisierung von STAT3 inhibiert. Durch die Tatsache, dass selektiv die Aktivierung von STAT3, aber nicht die von STAT1 antagonisiert wurde, stellt dieser chemische Inhibitor ein erstklassiges biologisches Werkzeug dar, um genauer den Zusammenhang zwischen konstitutiv-aktivem STAT3 und Krebs zu erforschen. So wäre es beispielsweise interessant, die Genexpression von normalen und Krebszellen vor und nach der Inkubation mit Stattic miteinander zu

vergleichen und somit Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen STAT3 und Krebs zu schließen.

Da in vielen Krebszellen meist mehrere STATs konstitutiv-aktiv sind, wäre es nun möglich, selektiv STAT3 in diesen Zellen auszuschalten und somit auch die Rolle von STAT1 in diesem Zusammenhang näher zu beleuchten. Das Zusammenspiel dieser beiden Proteine in Krebserkrankungen wurde bislang unzureichend erforscht.

In Verbindung mit dem in dieser Arbeit etablierten Hochdurchsatz-Verfahren wäre es zukünftig möglich, eine Sekundärbibliothek von verschiedenen Stattic-Derivaten auf ihre inhibitorische Aktivität auf STAT3 hin zu überprüfen und die Struktur-Wirkungs-Beziehung auszubauen. Damit könnte eine Leitstruktur identifiziert werden, die in der Krebstherapie eingesetzt werden könnte.

5. Zusammenfassung

Die STATs (*signal transducers and activators of transcription*) sind eine Familie latent zytoplasmatischer Transkriptionsfaktoren, die Signale von der Zellmembran in den Zellkern weiterleiten. Ein Mitglied der Proteinfamilie, STAT3, ist aufgrund übermäßiger Tyrosinkinase-Aktivität in einer breiten Vielzahl von Krebszelllinien und menschlichen Tumoren konstitutiv-aktiv. Um kleine organische Moleküle zu identifizieren, die die Funktion der SH2-Domäne von STAT3 blockieren und dadurch die Aktivität und die Dimerisierung des Proteins inhibieren, wurde ein Hochdurchsatz-Verfahren entwickelt, welches auf Fluoreszenzpolarisation beruht. Das Prinzip dieses Verfahrens war die Bindung eines Fluorescein-markierten Phosphotyrosin-Peptids, welches von gp130, einer Untereinheit des Interleukin-6-Rezeptors, abgeleitet war, an nicht phosphoryliertes STAT3-Protein. Der K_d Wert dieser Bindung betrug 150 nM und der Assay war stabil im Hinblick auf die Salzkonzentration, der Konzentration an Dimethylsulfoxid und der Zeit. Der Assay wurde auf ein 384-Lochplattenformat angepasst und wies einen Z' -Wert von 0,87 auf. Das Fluorescein-markierte Phosphotyrosin-Peptid band spezifisch an die SH2-Domäne von STAT3 und die Bindung konnte durch Phosphotyrosin-Peptide unterschiedlich stark inhibiert werden.

Die Hochdurchsatz-Analyse mehrerer Substanzbibliotheken führte schließlich zur Identifikation eines spezifischen STAT3-Inhibitors, Stattic (*STAT three inhibitory compound*). Stattic ist das erste nicht-peptidische kleine Molekül, welches selektiv die Funktion der STAT3-SH2-Domäne beeinträchtigte. Dabei spielte der Aktivierungszustand von STAT3 *in vitro* keine Rolle. Die gleichzeitige Inkubation mit Stattic führte im Fluoreszenzpolarisations-Assay zur Inhibition der Bindung des Fluorescein-markierten Phosphotyrosin-Peptids an die SH2-Domäne von STAT3. Diese antagonistische Reaktion stellte sich als stark temperaturabhängig heraus und hatte *in vitro* bei der physiologisch relevanten Temperatur von 37°C nach 60 Minuten einen IC_{50} Wert von 5,1 μ M. Zusammen mit einer Abhängigkeit von der Zeit wiesen die Ergebnisse auf eine irreversibel ablaufende Reaktion unter Knüpfung einer kovalenten Bindung zwischen Stattic und STAT3 hin. Die Inhibition war spezifisch gegenüber der Bindung verschiedener Fluorescein-markierten Phosphotyrosin-Peptide an die jeweiligen Proteine STAT1, STAT5b und Lck und Stattic hatte ebenfalls nur einen sehr geringen Effekt auf die Proteindimerisierung von c-Myc/Max und Jun/Jun. Die genauere Betrachtung der Kinetik der antagonistischen Reaktion zeigte eine signifikante Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit beim Vergleich zwischen STAT3 und STAT1 bzw. STAT3 und STAT5b. Die Inhibierung der Bindung des entsprechenden Fluorescein-

markierten Phosphotyrosin-Peptids an das Protein Lck durch Stattic war hingegen nicht zeitabhängig. Diese Versuche zeigten eine deutliche Präferenz der Bindung von Stattic an das Protein STAT3. Die Verdrängung des Fluorescein-markierten Phosphotyrosin-Peptids von der STAT3-SH2-Domäne durch Stattic verlief kompetitiv zur Inhibition mit einem Phosphotyrosin-Peptid, welches an die SH2-Domäne von STAT3 bindet. In Verbindung mit den vorherigen Experimenten wies dies auf eine kovalente Bindung von Stattic innerhalb des STAT3-Proteins hin. Eine abschließende Struktur-Wirkungs-Beziehung *in vitro* zeigte die Notwendigkeit sowohl von der Nitrogruppe als auch von der Doppelbindung der Vinylsulfongruppe in Stattic für die Bindung an STAT3 und untermauerte die These, dass Stattic kovalent innerhalb des STAT3-Proteins bindet.

In zellbiologischen Systemen wurde die Wirksamkeit von Stattic anhand verschiedener molekularbiologischer Assays bestätigt. Stattic inhibierte selektiv die Tyrosinphosphorylierung von STAT3 in HepG2 Zellen, in NIH3T3/v-Src Zellen und in den Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435S. Aber auch bereits phosphorylierte STAT3-Proteine wurden durch Stattic *in vitro* an der Homodimerisierung gehindert, was in einer EMSA-Analyse gezeigt wurde. Somit inhibierte Stattic *in vitro* selektiv die Signalkette von STAT3 unabhängig von dessen Aktivierungszustand. Andere Signalketten oder die Funktion der in der Signalkette über STAT3 liegenden Tyrosinkinasen wurden in Zellen nicht beeinflusst. Im Folgenden konnte demonstriert werden, dass Stattic als direkter STAT3-Inhibitor dessen Lokalisierung in den Zellkern inhibierte, nicht jedoch die Lokalisierung des Gegenspielers STAT1. Weiterhin reduzierte der Einsatz von Stattic selektiv das von v-Src in NIH3T3 Zellen induzierte und von STAT3-abhängige Wachstum von Kolonien in Weichagar. Dass Stattic schließlich selektiv die Apoptoserate in Zellen mit konstitutiver STAT3-Aktivität erhöhte, bestätigte die bisherigen Daten.

Mit Stattic konnte daher ein neues biologisches Werkzeug generiert werden, um selektiv STAT3 in Zelllinien oder Tumoren in Tiermodellen auszuschalten, die eine konstitutive STAT3-Aktivität aufweisen.

6. Summary

Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs) are a family of latent cytoplasmic transcription factors which signals from the cell membrane to the nucleus. One member of the protein family, STAT3, is constitutively activated by aberrant upstream tyrosine kinase activities in a broad spectrum of cancer cell lines and human tumors. A high-throughput assay based on fluorescence polarization was developed to identify small organic molecules blocking the function of the STAT3 SH2 domain and thereby inhibiting STAT3 activity and dimerization. The principle of the assay was the binding of a fluorescein-labeled phosphotyrosine-peptide derived from the interleukin-6 receptor subunit gp130 to unphosphorylated STAT3 with a K_d of 150 nM. The assay was stable with regard to salt concentration, dimethyl sulfoxide concentration, and time. It has been adapted to a 384-well format, with a Z' value of 0.87. The fluorescein-labeled phosphotyrosine-peptide bound specifically to the STAT3 SH2 domain and this binding could be inhibited by different phosphotyrosine-peptides with varying activities.

High-throughput screening of a number of compound libraries led to the identification of a specific STAT3 inhibitor, dubbed Stattic (STAT three inhibitory compound). Stattic is depicted as the first non-peptidic small molecule having an selective impact on the function of the STAT3 SH2 domain. Thereby the activation state of STAT3 was irrelevant in vitro. Simultaneous incubation with Stattic inhibited the binding of the fluorescein-labeled phosphotyrosine-peptide to the SH2 domain of STAT3 in the fluorescence polarization assay. This antagonistic reaction turned out to be strongly temperature-dependent and showed an IC_{50} of 5.1 μ M in vitro at the physiological relevant temperature of 37°C after 60 minutes incubation. With regard to an time-dependency these results suggested an irreversible reaction with the formation of a covalent bond between Stattic and STAT3. The inhibitory reaction was specific over the binding of different fluorescein-labeled phosphotyrosin-peptides to the particular proteins STAT1, STAT5b and Lck, and Stattic also only marginally inhibited the protein dimerization of c-Myc/Max or Jun/Jun. A closer look on the kinetics of the reaction revealed a significant slowdown of the reaction speed comparing STAT3 to STAT1 or STAT3 to STAT5b. Stattic inhibited the binding of the corresponding fluorescein-labeled phosphotyrosine-peptides to Lck in a time-independent way altogether showing a clear preference of Stattic binding to STAT3. The displacement of the fluorescein-labeled phosphotyrosine-peptide from the STAT3 SH2 domain through Stattic was competitive to a phosphotyrosine-peptide binding to the SH2 domain of STAT3. With regard to other results,

this result indicated Stattic covalently binding to STAT3. A structure-activity relationship *in vitro* showed the nitro moiety and the double bond within the vinylsulfone moiety of Stattic being important for binding to STAT3. This confirmed the indication that Stattic covalently binds to STAT3 domain.

The effectiveness of Stattic in cellular systems was proven by different molecular biological assays. Stattic selectively inhibited the tyrosine phosphorylation in HepG2 cells, in NIH3T3/*v-src* cells as well as in the breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MDA-MB-435S. But also STAT3 proteins which already were phosphorylated could not dimerize after incubation with Stattic *in vitro* which was shown with an EMSA analysis. Thereby Stattic also inhibited STAT3 signaling *in vitro* regardless of STAT3 phosphorylation. Other signalling pathways or function of upstream tyrosinkinases in cells were not inhibited at the same time. It could be demonstrated that the direct STAT3 inhibitor Stattic specifically inhibited nuclear localization of STAT3, but not of its counterpart STAT1. Stattic reduced *v-src* induced STAT3 dependent colony growth of NIH3T3 cells in soft agar. The results were confirmed by Stattic selectively increasing the apoptotic rate in cell lines having constitutively active STAT3.

In summary, Stattic turned out to be a novel biological tool to selectively inhibit STAT3 in cell lines or tumor animal models which show constitutive active STAT3.

7. Danksagungen

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Friedrich Grummt für die Erstellung des Erstgutachtens, sein stetes Interesse an dieser Arbeit, dem gewährten wissenschaftlichen Freiraum und seine bereitwillige Betreuung und Unterstützung am Institut für Biochemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg bedanken. Herrn Prof. Dr. Utz Fischer danke ich ganz herzlich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich bedanke ich mich für die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit und das Vertrauen, sehr frei arbeiten zu können.

Besonders herzlicher Dank gebührt Herrn Dr. Thorsten Berg für seine immerwährende Unterstützung bei meiner Arbeit, die Einführung in das Arbeitsgebiet, die Korrektur dieser Arbeit und für die chemischen Synthesen.

Vielen Dank auch an Herrn Dr. Thomas Mayer und seiner Mitarbeiter für die Benutzung seines Roboters und der chemischen Substanzbibliotheken.

Ein ganz besonderer Dank für technischen Rat und unermüdliche praktische Hilfe in allen Fragen des Laboralltags geht an Angela Berg, Judith Mueller und Bianca Sperl, ohne deren Unterstützung die Arbeit in dieser Form kaum möglich gewesen wäre.

Danken möchte ich an dieser Stelle allen Mitarbeitern der Abteilung, die mich während meiner Promotion sowohl sozial als auch fachlich unterstützt haben. Besonders hervorzuheben sind dabei Anke Kiessling und Wolfgang Reindl für ihre stetige Diskussionsbereitschaft, die wertvollen Anregungen, die gute Zusammenarbeit im Labor, die Bereitstellung von molekularbiologischen Materialien und ihre konstruktive Kritik. Vielen Dank an Michaela Bairlein für die Korrektur dieser Arbeit, für ihre fröhliche und hilfsbereite Art und die vielen guten Unterhaltungen. Andreas Roidl und Ute Richter danke ich zudem für die immer herrschende Gesprächsbereitschaft im Büro und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich danke allen jetzigen und früheren Kollegen der Arbeitsgruppe, die zu einem entspannten und stets heiteren Arbeitsklima beigetragen haben. Außerdem möchte ich mich bei den Technischen Angestellten für den reibungslosen Ablauf des Laboralltags und die zuverlässige Bereitstellung von Materialien bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Marta Murgia, Dr. Beatrix Schäfer und Dr. Beatrice Marg für unsere gemeinsamen Kochabende, die vielen Diskussionen über fachliche und auch weniger fachliche Themen, ihre stets motivierende Art und ihr immer offenes Ohr auch für persönliche Angelegenheiten.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meinen Eltern, dass sie immer hinter mir standen und für ihre stete Hilfe und emotionale Unterstützung, die auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Allen Freunden, insbesondere Marcus, möchte ich für die nie endende Unterstützung und die Geduld danken. Ohne Euch hätte ich das nicht geschafft!

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Jochen Schust
Geburtsdatum: 07.08.1975
Geburtsort: Coburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Akademische Ausbildung:

11/2002 – 07/2006 **Anfertigung der vorliegenden Dissertation**
„Neue Ansätze zur Identifizierung niedermolekularer
Inhibitoren der STAT3-Aktivierung und -Homodimerisierung“
unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Grummt

10/1998 – 09/2002 **Hauptstudium Chemie-Diplom, Universität Würzburg**
Diplomarbeit: „Charakterisierung der FGFR4 vermittelten
Signaltransduktion in der Tumorentwicklung“
unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Grummt
Abschluss: Diplom-Chemiker

10/1996 – 09/1998 **Grundstudium Chemie-Diplom, Universität Bayreuth**
Abschluss: Vordiplom Chemie

Schule und Zivildienst:

09/1986 – 07/1995 Gymnasium Ernestinum in Coburg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

09/1982 – 07/1986 Grundschule in Weidhausen

07/1995 – 09/1996 Zivildienst im Landkrankenhaus Coburg

9. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in bzw. sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Schust, J., Berg, T.,

A high-throughput fluorescence polarization assay for STAT3.

Anal. Biochem. **2004**, *330*, 114-118.

Schust, J., Sperl, B., Hollis, A., Mayer, T.U., Berg, T.,

Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization.

Zur Veröffentlichung eingereicht.

10. Literaturverzeichnis

- Aaronson, D.S. & Horvath, C.M. (2002). *Science*, **296**, 1653-1655.
- Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. & Knowles, B.B. (1979). **282**, 615-616.
- Aftab, D.T., Kwan, J. & Martin, G.S. (1997). *PNAS*, **94**, 3028-3033.
- Aggarwal, B.B., Kumar, A. & Bharti, A.C. (2003). *Anticancer Res*, **23**, 363-98.
- Akira, S. (2000). *Oncogene*, **19**, 2607-11.
- Albanell, J. & Gascon, P. (2005). *Curr Drug Targets*, **6**, 259-74.
- Albertson, D.G., Collins, C., McCormick, F. & Gray, J.W. (2003). *Nat Genet*, **34**, 369-76.
- Amit-Vazina, M., Shishodia, S., Harris, D., Van, Q., Wang, M., Weber, D., Alexanian, R., Talpaz, M., Aggarwal, B.B. & Estrov, Z. (2005). *Br J Cancer*, **93**, 70-80.
- Aoki, Y., Feldman, G.M. & Tosato, G. (2003). *Blood*, **101**, 1535-1542.
- Arkin, M.R. & Wells, J.A. (2004). *Nat Rev Drug Discov*, **3**, 301-17.
- Bach, E., Tanner, J., Marsters, S., Ashkenazi, A., Aguet, M., Shaw, A. & Schreiber, R. (1996). *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 3214-3221.
- Bach, E.A., Aguet, M. & Schreiber, R.D. (1997). *Annu Rev Immunol*, **15**, 563-91.
- Barton, B.E., Murphy, T.F., Shu, P., Huang, H.F., Meyenhofen, M. & Barton, A. (2004). *Mol Cancer Ther*, **3**, 1183-1191.
- Battle, T.E. & Frank, D.A. (2002). *Curr Mol Med*, **2**, 381-92.
- Becker, S., Corthals, G.L., Aebersold, R., Groner, B. & Muller, C.W. (1998a). *FEBS Letters*, **441**, 141-147.
- Becker, S., Groner, B. & Muller, C.W. (1998b). *Nature*, **394**, 145-151.
- Begitt, A., Meyer, T., van Rossum, M. & Vinkemeier, U. (2000). *PNAS*, **97**, 10418-10423.
- Berg, T. (2003). *Angewandte Chemie International Edition*, **42**, 2462-2481.
- Berg, T. (2005). *Angewandte Chemie International Edition*, **44**, 5008-5011.
- Berg, T., Cohen, S.B., Desharnais, J., Sonderegger, C., Maslyar, D.J., Goldberg, J., Boger, D.L. & Vogt, P.K. (2002). *PNAS*, **99**, 3830-3835.
- Bharti, A.C., Donato, N. & Aggarwal, B.B. (2003). *J Immunol*, **171**, 3863-3871.
- Bhattacharya, S., Ray, R.M. & Johnson, L.R. (2005). *Biochem J*, **392**, 335-44.
- Bhattacharya, S. & Schindler, C. (2003). *J. Clin. Invest.*, **111**, 553-559.
- Blaskovich, M.A., Sun, J., Cantor, A., Turkson, J., Jove, R. & Sebt, S.M. (2003). *Cancer Res*, **63**, 1270-1279.
- Blobel, G. & Wozniak, R.W. (2000). *Nature*, **403**, 835-836.
- Bogan, A.A. & Thorn, K.S. (1998). *Journal of Molecular Biology*, **280**, 1-9.
- Bowman, T., Broome, M.A., Sinibaldi, D., Wharton, W., Pledger, W.J., Sedivy, J.M., Irby, R., Yeatman, T., Courtneidge, S.A. & Jove, R. (2001). *PNAS*, **98**, 7319-7324.
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J. & Jove, R. (2000). *Oncogene*, **19**, 2474-88.
- Braunstein, J., Brutsaert, S., Olson, R. & Schindler, C. (2003). *J. Biol. Chem.*, **278**, 34133-34140.
- Brinkley, B.R., Beall, P.T., Wible, L.J., Mace, M.L., Turner, D.S. & Cailleau, R.M. (1980). *Cancer Res*, **40**, 3118-29.
- Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Besser, D., Lathem, W.W. & Darnell, J.E., Jr. (1998). *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 2553-2558.
- Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Wen, Z., Schreiber, R.D. & Darnell, J.E., Jr. (1996). *PNAS*, **93**, 7673-7678.
- Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C. & Darnell, J., James E. (1999). *Cell*, **98**, 295-303.
- Brown, M.T. & Cooper, J.A. (1996). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, **1287**, 121-149.
- Buettner, R., Mora, L.B. & Jove, R. (2002). *Clin Cancer Res*, **8**, 945-954.

- Buynak, J.D. (2006). *Biochemical Pharmacology*, **71**, 930-940.
- Caldenhoven, E., van Dijk, T.B., Solari, R., Armstrong, J., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Koenderman, L. & de Groot, R.P. (1996). *J Biol Chem*, **271**, 13221-7.
- Cao, X., Tay, A., Guy, G. & Tan, Y. (1996). *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1595-1603.
- Carthew, R.W., Chodosh, L.A. & Sharp, P.A. (1985). *Cell*, **43**, 439-48.
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J.L. & Nunez, G. (1999). *Immunity*, **10**, 105-115.
- Chang, T.-Y., Tsai, W.-J., Chou, C.-K., Chow, N.-H., Leu, T.-H. & Liu, H.-S. (2003). *Life Sciences*, **73**, 1265-1274.
- Chatterjee-Kishore, M., Wright, K.L., Ting, J.P. & Stark, G.R. (2000). *EMBO J*, **19**, 4111-22.
- Chaturvedi, P., Sharma, S. & Reddy, E. (1997). *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 3295-3304.
- Chen, C.-L., Hsieh, F.-C. & Lin, J. (2006). *Experimental and Molecular Pathology*, **80**, 295-305.
- Chen, J.C., Chiu, M.H., Nie, R.L., Cordell, G.A. & Qiu, S.X. (2005). *Nat Prod Rep*, **22**, 386-99. Epub 2005 Apr 4.
- Chen, X., Bhandari, R., Vinkemeier, U., van den Akker, F., Darnell, J.E., JR. & Kuriyan, J. (2003). *Protein Sci*, **12**, 361-365.
- Chen, X., Vinkemeier, U., Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Darnell, J., James E. & Kuriyan, J. (1998). *Cell*, **93**, 827-839.
- Cheng, H.Y., Li, P., David, M., Smithgall, T.E., Feng, L. & Lieberman, M.W. (2004). *Oncogene*, **23**, 3603-12.
- Choi, K., Siegel, M., Piper, J.L., Yuan, L., Cho, E., Strnad, P., Omary, B., Rich, K.M. & Khosla, C. (2005). *Chem Biol*, **12**, 469-75.
- Christine, R., Sylvie, R., Erik, B., Genevieve, P., Amelie, R., Gerard, R., Marc, B., Christian, G. & Samir, A. (2005). *Cancer Res*, **65**, 195-202.
- Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P. & Shuai, K. (1997). *Science*, **278**, 1803-5.
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K. & Muller, C.W. (1999). *Nature*, **399**, 221-229.
- Clackson, T. & Wells, J.A. (1995). *Science*, **267**, 383-6.
- Coleman, D.R., Ren, Z., Mandal, P.K., Cameron, A.G., Dyer, G.A., Muranjan, S., Campbell, M., Chen, X. & McMurray, J.S. (2005). *J. Med. Chem.*, **48**, 6661-6670.
- Conte, L.L., Chothia, C. & Janin, J. (1999). *Journal of Molecular Biology*, **285**, 2177-2198.
- Coppo, P., Dusanter-Fourt, I., Millot, G., Nogueira, M.M., Dugray, A., Bonnet, M.L., Mitjavila-Garcia, M.T., Le Pesteur, D., Guilhot, F., Vainchenker, W., Sainteny, F. & Turhan, A.G. (2003). *Oncogene*, **22**, 4102-10.
- Costa-Pereira, A.P., Tininini, S., Strobl, B., Alonzi, T., Schlaak, J.F., Is'harc, H., Gesualdo, I., Newman, S.J., Kerr, I.M. & Poli, V. (2002). *PNAS*, **99**, 8043-8047.
- Crinelli, R., Bianchi, M., Gentilini, L. & Magnani, M. (2002). *Nucl. Acids Res.*, **30**, 2435-2443.
- Dang, C.V., Resar, L.M.S., Emison, E., Kim, S., Li, Q., Prescott, J.E., Wonsey, D. & Zeller, K. (1999). *Experimental Cell Research*, **253**, 63-77.
- Darnell, J.E., Jr. (2002). *Nat Rev Cancer*, **2**, 740-9.
- Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M. & Stark, G.R. (1994). *Science*, **264**, 1415-21.
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T. & Traganos, F. (1997). *Cytometry*, **27**, 1-20.
- Dauer, D.J., Ferraro, B., Song, L., Yu, B., Mora, L., Buettner, R., Enkemann, S., Jove, R. & Haura, E.B. (2005). **24**, 3397-3408.
- Davis, L.I. (1995). *Annual Review of Biochemistry*, **64**, 865-896.
- de Jong, L.A.A., Uges, D.R.A., Franke, J.P. & Bischoff, R. (2005). *Journal of Chromatography B*, **829**, 1-25.

- De Souza, D., Fabri, L.J., Nash, A., Hilton, D.J., Nicola, N.A. & Baca, M. (2002). *Biochemistry*, **41**, 9229-36.
- Decker, T. & Kovarik, P. (1999). *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, **55**, 1535-1546.
- Decker, T. & Kovarik, P. (2000). *Oncogene*, **19**, 2628-37.
- Decker, T., Lew, D.J., Cheng, Y.S., Levy, D.E. & Darnell, J.E., Jr. (1989). *EMBO J*, **8**, 2009-14.
- Decker, T., Lew, D.J., Mirkovitch, J. & Darnell, J.E., Jr. (1991). *EMBO J*, **10**, 927-32.
- Dekker, F.J., Koch, M.A. & Waldmann, H. (2005). *Curr Opin Chem Biol*, **9**, 232-9.
- Delmas, D., Lancon, A., Colin, D., Jannin, B. & Latruffe, N. (2006). *Curr Drug Targets*, **7**, 423-42.
- DeSimone, R.W., Currie, K.S., Mitchell, S.A., Darrow, J.W. & Pippin, D.A. (2004). *Comb Chem High Throughput Screen*, **7**, 473-94.
- Dorsett, Y. & Tuschl, T. (2004). *Nature Reviews Drug Discovery*, **3**, 318-329.
- Dunn, C., Wiltshire, C., MacLaren, A. & Gillespie, D.A.F. (2002). *Cellular Signalling*, **14**, 585-593.
- Eilers, A., Georgellis, D., Klose, B., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A., Wilks, A. & Decker, T. (1995). *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 3579-3586.
- Eisenbrand, G., Hippe, F., Jakobs, S. & Muehlbeyer, S. (2004). *J Cancer Res Clin Oncol*, **130**, 627-35. Epub 2004 Aug 31.
- Epling-Burnette, P.K., Liu, J.H., Catlett-Falcone, R., Turkson, J., Oshiro, M., Kothapalli, R., Li, Y., Wang, J.-M., Yang-Yen, H.-F., Karras, J., Jove, R. & Loughran, T.P., Jr. (2001). *J. Clin. Invest.*, **107**, 351-362.
- Fagerlund, R., Melen, K., Kinnunen, L. & Julkunen, I. (2002). *J. Biol. Chem.*, **277**, 30072-30078.
- Feher, M. & Schmidt, J.M. (2003). *J Chem Inf Comput Sci*, **43**, 218-27.
- Folkman, J. (1990). *J Natl Cancer Inst*, **82**, 4-7.
- Freedman, V.H. & Shin, S.I. (1974). *Cell*, **3**, 355-9.
- Fry, D.C. & Vassilev, L.T. (2005). *J Mol Med*, **83**, 955-63. Epub 2005 Nov 11.
- Fu, X., Schindler, C., Improta, T., Aebersold, R. & Darnell, J., Jr. (1992). *PNAS*, **89**, 7840-7843.
- Fu, X.-Y. & Zhang, J.-J. (1993). *Cell*, **74**, 1135-1145.
- Fukada, T., Hibi, M., Yamanaka, Y., Takahashi-Tezuka, M., Fujitani, Y., Yamaguchi, T., Nakajima, K. & Hirano, T. (1996). *Immunity*, **5**, 449-460.
- Gao, L., Zhang, L., Hu, J., Li, F., Shao, Y., Zhao, D., Kalvakolanu, D.V., Kopecko, D.J., Zhao, X. & Xu, D.-Q. (2005). *Clin Cancer Res*, **11**, 6333-6341.
- Gao, L.-f., Wen, L.-j., Yu, H., Zhang, L., Meng, Y., Shao, Y.-t., Xu, D.-q. & Zhao, X.-j. (2006). *Acta Pharmacologica Sinica*, **27**, 347-352.
- Garcia, R., Bowman, T.L., Niu, G., Yu, H., Minton, S., Muro-Cacho, C.A., Cox, C.E., Falcone, R., Fairclough, R., Parsons, S., Laudano, A., Gazit, A., Levitzki, A., Kraker, A. & Jove, R. (2001). *Oncogene*, **20**, 2499-513.
- Garcia, R., Yu, C., Hudnall, A., Catlett, R., Nelson, K., Smithgall, T., Fujita, D., Ethier, S. & Jove, R. (1997). *Cell Growth Differ*, **8**, 1267-1276.
- Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Hemmann, U., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., Horn, F., Heinrich, P.C. & Graeve, L. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 12991-12998.
- Gershoni, J.M. & Palade, G.E. (1983). *Anal Biochem*, **131**, 1-15.
- Gold, R., Schmied, M., Giegerich, G., Breitschopf, H., Hartung, H.P., Toyka, K.V. & Lassmann, H. (1994). *Lab Invest*, **71**, 219-25.
- Gorczyca, W., Bigman, K., Mittelman, A., Ahmed, T., Gong, J., Melamed, M.R. & Darzynkiewicz, Z. (1993). *Leukemia*, **7**, 659-70.

- Grandis, J.R., Drenning, S.D., Chakraborty, A., Zhou, M.-Y., Zeng, Q., Pitt, A.S. & Tweardy, D.J. (1998). *J. Clin. Invest.*, **102**, 1385-1392.
- Grandis, J.R., Drenning, S.D., Zeng, Q., Watkins, S.C., Melhem, M.F., Endo, S., Johnson, D.E., Huang, L., He, Y. & Kim, J.D. (2000). *PNAS*, **97**, 4227-4232.
- Graness, A., Poli, V. & Goppelt-Struebe, M. (2006). *Biochemical Pharmacology*, **72**, 32-41.
- Gray, M.J., Zhang, J., Ellis, L.M., Semenza, G.L., Evans, D.B., Watowich, S.S. & Gallick, G.E. (2005). **24**, 3110-3120.
- Greenlund, A.C., Farrar, M.A., Viviano, B.L. & Schreiber, R.D. (1994). *EMBO J*, **13**, 1591-600.
- Greenlund, A.C., Morales, M.O., Viviano, B.L., Yan, H., Krolewski, J. & Schreiber, R.D. (1995). *Immunity*, **2**, 677-687.
- Gritsko, T., Williams, A., Turkson, J., Kaneko, S., Bowman, T., Huang, M., Nam, S., Eweis, I., Diaz, N., Sullivan, D., Yoder, S., Enkemann, S., Eschrich, S., Lee, J.-H., Beam, C.A., Cheng, J., Minton, S., Muro-Cacho, C.A. & Jove, R. (2006). *Clin Cancer Res*, **12**, 11-19.
- Grunstein, J., Roberts, W.G., Mathieu-Costello, O., Hanahan, D. & Johnson, R.S. (1999). *Cancer Res*, **59**, 1592-1598.
- Gupta, S., Yan, H., Wong, L.H., Ralph, S., Krolewski, J. & Schindler, C. (1996). *EMBO J*, **15**, 1075-84.
- Guschin, D., Rogers, N., Briscoe, J., Witthuhn, B., Watling, D., Horn, F., Pellegrini, S., Yasukawa, K., Heinrich, P., Stark, G.R. & et al. (1995). *EMBO J*, **14**, 1421-9.
- Haan, S., Hemmann, U., Hassiepen, U., Schaper, F., Schneider-Mergener, J., Wollmer, A., Heinrich, P.C. & Grotzinger, J. (1999). *J. Biol. Chem.*, **274**, 1342-1348.
- Haan, S., Keller, J.F., Behrmann, I., Heinrich, P.C. & Haan, C. (2005). *Cellular Signalling*, **17**, 1542-1550.
- Haan, S., Kortylewski, M., Behrmann, I., Muller-Esterl, W., Heinrich, P.C. & Schaper, F. (2000). *Biochem J*, **345**, 417-21.
- Hajime Isomoto, S.K., Nathan W. Werneburg, Steve F. Bronk, Maria Eugenia Guicciardi, David A. Frank, Gregory J. Gores,. (2005). *Hepatology*, **42**, 1329-1338.
- Hanahan, D. & Folkman, J. (1996). *Cell*, **86**, 353-364.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000). *Cell*, **100**, 57-70.
- Hart, K.C., Robertson, S.C., Kanemitsu, M.Y., Meyer, A.N., Tynan, J.A. & Donoghue, D.J. (2000). *Oncogene*, **19**, 3309-20.
- Hasegawa, T., Suzuki, K., Sakamoto, C., Ohta, K., Nishiki, S., Hino, M., Tatsumi, N. & Kitagawa, S. (2003). *Blood*, **101**, 1164-1171.
- Hautzel, R., Anke, H. & Sheldrick, W.S. (1990). *J Antibiot (Tokyo)*, **43**, 1240-4.
- Heim, M.H., Kerr, I.M., Stark, G.R. & Darnell, J.E., Jr. (1995). *Science*, **267**, 1347-9.
- Hemmann, U., Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Kurapkat, G., Grotzinger, J., Wollmer, A., Zhong, Z., Darnell, J.E., Jr., Graeve, L., Heinrich, P.C. & Horn, F. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 12999-13007.
- Hendry, L. & John, S. (2004). *Eur J Biochem*, **271**, 4613-4620.
- Herold, A., Truant, R., Wiegand, H. & Cullen, B.R. (1998). *J. Cell Biol.*, **143**, 309-318.
- Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T. & Kishimoto, T. (1990). *Cell*, **63**, 1149-1157.
- Hirano, T., Ishihara, K. & Hibi, M. (2000). *Oncogene*, **19**, 2548-56.
- Hirano, T., Nakajima, K. & Hibi, M. (1997). *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **8**, 241-252.
- Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A. & et al. (1986). *Nature*, **324**, 73-6.
- Hodel, M.R., Corbett, A.H. & Hodel, A.E. (2001). *J. Biol. Chem.*, **276**, 1317-1325.
- Horvath, C., Stark, G., Kerr, I. & Darnell, J., Jr. (1996). *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 6957-6964.

- Hovius, R., Vallotton, P., Wohland, T. & Vogel, H. (2000). *Trends in Pharmacological Sciences*, **21**, 266-273.
- Hsieh, F.-C., Cheng, G. & Lin, J. (2005). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **335**, 292-299.
- Igarashi, K., Garotta, G., Ozmen, L., Ziemiecki, A., Wilks, A., Harpur, A., Larner, A. & Finbloom, D. (1994). *J. Biol. Chem.*, **269**, 14333-14336.
- Ihle, J.N. (1995). *Adv Immunol*, **60**, 1-35.
- Isakov, N. & Biesinger, B. (2000). *Eur J Biochem*, **267**, 3413-21.
- Ishizawar, R. & Parsons, S.J. (2004). *Cancer Cell*, **6**, 209-214.
- Jainchill, J.L., Aaronson, S.A. & Todaro, G.J. (1969). *J Virol*, **4**, 549-53.
- Jans, D.A., Xiao, C.Y. & Lam, M.H. (2000). *Bioessays*, **22**, 532-44.
- Jing, N., Li, Y., Xiong, W., Sha, W., Jing, L. & Tweardy, D.J. (2004). *Cancer Res*, **64**, 6603-6609.
- Jing, N., Li, Y., Xu, X., Sha, W., Li, P., Feng, L. & Tweardy, D.J. (2003). *DNA Cell Biol*, **22**, 685-96.
- Jing, N., Zhu, Q., Yuan, P., Li, Y., Mao, L. & Tweardy, D.J. (2006). *Mol Cancer Ther*, **5**, 279-286.
- Jones, S. & Thornton, J.M. (1996). *PNAS*, **93**, 13-20.
- Jung, J.E., Lee, H.-G., Cho, I.-H., Chung, D.H., Yoon, S.-H., Yang, Y.M., Lee, J.W., Choi, S., Park, J.-W., Ye, S.-K. & Chung, M.-H. (2005). *FASEB J.*, 04-3099fje.
- Kanda, N., Seno, H., Konda, Y., Marusawa, H., Kanai, M., Nakajima, T., Kawashima, T., Nanakin, A., Sawabu, T., Uenoyama, Y., Sekikawa, A., Kawada, M., Suzuki, K., Kayahara, T., Fukui, H., Sawada, M. & Chiba, T. (2004). *Oncogene*, **23**, 4921-9.
- Kaplan, D.H., Greenlund, A.C., Tanner, J.W., Shaw, A.S. & Schreiber, R.D. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 9-12.
- Kaptein, A., Paillard, V. & Saunders, M. (1996a). *J. Biol. Chem.*, **271**, 5961-5964.
- Kaptein, A., Paillard, V. & Saunders, M. (1996b). *J. Biol. Chem.*, **271**, 5961-5964.
- Karni, R., Jove, R. & Levitzki, A. (1999). *Oncogene*, **18**, 4654-62.
- Kenny, C.H., Ding, W., Kelleher, K., Benard, S., Dushin, E.G., Sutherland, A.G., Mosyak, L., Kriz, R. & Ellestad, G. (2003). *Analytical Biochemistry*, **323**, 224-233.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972). *Br J Cancer*, **26**, 239-57.
- Kijima, T., Niwa, H., Steinman, R.A., Drenning, S.D., Gooding, W.E., Wentzel, A.L., Xi, S. & Grandis, J.R. (2002). *Cell Growth Differ*, **13**, 355-362.
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J. & Schindler, C.W. (2002). *Gene*, **285**, 1-24.
- Kitz, R. & Wilson, I.B. (1962). *J. Biol. Chem.*, **237**, 3245-3249.
- Knight, Z.A. & Shokat, K.M. (2005). *Chemistry & Biology*, **12**, 621-637.
- Komyod, W., Bauer, U.-M., Heinrich, P.C., Haan, S. & Behrmann, I. (2005). *J. Biol. Chem.*, **280**, 21700-21705.
- Konnikova, L., Kotecki, M., Kruger, M. & Cochran, B. (2003). *BMC Cancer*, **3**, 23.
- Kopp, P. (1998). *Eur J Endocrinol*, **138**, 619-20.
- Kordula T., Bugno M., Goldstein J. & Travis J. (1995). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **216**, 999-1005.
- Kotha, A., Sekharam, M., Cilenti, L., Siddiquee, K., Khaled, A., Zervos, A.S., Carter, B., Turkson, J. & Jove, R. (2006). *Mol Cancer Ther*, **5**, 621-629.
- Krebs, D.L. & Hilton, D.J. (2001). *Stem Cells*, **19**, 378-387.
- Kretzschmar, A.K., Dinger, M.C., Henze, C., Brocke-Heidrich, K. & Horn, F. (2004). *Biochem J*, **377**, 289-97.
- Kuropatwinski, K.K., De Imus, C., Gearing, D., Baumann, H. & Mosley, B. (1997). *J. Biol. Chem.*, **272**, 15135-15144.
- Kurzrock, R. (2001). *Biomedecine & Pharmacotherapy*, **55**, 543-547.
- Kutay, U., Bischoff, F.R., Kostka, S., Kraft, R. & Gorlich, D. (1997). *Cell*, **90**, 1061-1071.

- Leaman, D., Pisharody, S., Flickinger, T., Commane, M., Schlessinger, J., Kerr, I., Levy, D. & Stark, G. (1996). *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 369-375.
- Lemmon, M.A. & Schlessinger, J. (1994). *Trends Biochem Sci*, **19**, 459-63.
- Lemon, B. & Tjian, R. (2000). *Genes Dev.*, **14**, 2551-2569.
- Leonard, W.J. & O'Shea, J.J. (1998). *Annual Review of Immunology*, **16**, 293-322.
- Leong, P.L., Andrews, G.A., Johnson, D.E., Dyer, K.F., Xi, S., Mai, J.C., Robbins, P.D., Gadiparthi, S., Burke, N.A., Watkins, S.F. & Grandis, J.R. (2003). *PNAS*, **100**, 4138-4143.
- Levy, D.E. & Darnell, J.E. (2002). *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **3**, 651-662.
- Lew, D.J., Decker, T. & Darnell, J.E., Jr. (1989). *Mol Cell Biol*, **9**, 5404-11.
- Li, L. & Shaw, P.E. (2004). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **322**, 1005-1011.
- Li, X., Leung, S., Kerr, I. & Stark, G. (1997). *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 2048-2056.
- Lim, R.Y. & Fahrenkrog, B. *Current Opinion in Cell Biology*, **In Press, Corrected Proof**.
- Lin, Q., Lai, R., Chirieac, L.R., Li, C., Thomazy, V.A., Grammatikakis, I., Rassidakis, G.Z., Zhang, W., Fujio, Y., Kunisada, K., Hamilton, S.R. & Amin, H.M. (2005). *Am J Pathol*, **167**, 969-980.
- Ling, X. & Arlinghaus, R.B. (2005). *Cancer Res*, **65**, 2532-2536.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. & Feeney, P.J. (2001). *Advanced Drug Delivery Reviews*, **46**, 3-26.
- Liu, H., Ma, Y., Cole, S.M., Zander, C., Chen, K.-H., Karras, J. & Pope, R.M. (2003). *Blood*, **102**, 344-352.
- Liu, H.J., Moroi, Y., Masuda, T., Yasumoto, S., Kokuba, H., Imafuku, S., Koga, T., Tetsuya, T., Tu, Y.T., Aburatani, H., Furue, M. & Urabe, K. (2006). *British Journal of Dermatology*, **154**, 926-932.
- Liu, L., McBride, K.M. & Reich, N.C. (2005). *PNAS*, **102**, 8150-8155.
- Lokesh, G.L., Rachamalla, A., Kumar, G.D.K. & Natarajan, A. (2006). *Analytical Biochemistry*, **352**, 135-141.
- Luesch, H., Chanda, S.K., Raya, R.M., DeJesus, P.D., Orth, A.P., Walker, J.R., Izpisua Belmonte, J.C. & Schultz, P.G. (2006). **2**, 158-167.
- Lund, T., Garcia, R., Medveczky, M., Jove, R. & Medveczky, P. (1997). *J. Virol.*, **71**, 6677-6682.
- Lund, T.C., Coleman, C., Horvath, E., Sefton, B.M., Jove, R., Medveczky, M.M. & Medveczky, P.G. (1999). *Cellular Signalling*, **11**, 789-796.
- Lutticken, C., Wegenka, U.M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A.G., Wilks, A.F., Yasukawa, K., Taga, T. & et al. (1994). *Science*, **263**, 89-92.
- Lynch, B.A., Loiacono, K.A., Tiong, C.L., Adams, S.E. & MacNeil, I.A. (1997). *Analytical Biochemistry*, **247**, 77-82.
- Lynch, B.A., Minor, C., Loiacono, K.A., van Schravendijk, M.R., Ram, M.K., Sundaramoorthi, R., Adams, S.E., Phillips, T., Holt, D., Rickles, R.J. & MacNeil, I.A. (1999). *Analytical Biochemistry*, **275**, 62-73.
- Ma, J. & Cao, X. (2006). *Cellular Signalling*, **In Press, Corrected Proof**.
- Ma, J., Zhang, T., Novotny-Diermayr, V., Tan, A.L.C. & Cao, X. (2003). *J. Biol. Chem.*, **278**, 29252-29260.
- Mao, X., Ren, Z., Parker, G.N., Sondermann, H., Pastorello, M.A., Wang, W., McMurray, J.S., Demeler, B., Darnell, J., James E. & Chen, X. (2005). *Molecular Cell*, **17**, 761-771.
- Marg, A., Shan, Y., Meyer, T., Meissner, T., Brandenburg, M. & Vinkemeier, U. (2004). *J. Cell Biol.*, **165**, 823-833.
- Masuda, M., Suzui, M., Yasumatu, R., Nakashima, T., Kuratomi, Y., Azuma, K., Tomita, K., Komiyama, S. & Weinstein, I.B. (2002). *Cancer Res*, **62**, 3351-3355.

- McBride, K.M., Banninger, G., McDonald, C. & Reich, N.C. (2002). *EMBO J*, **21**, 1754-63.
- McBride, K.M. & Reich, N.C. (2003). *Sci STKE*, **2003**, RE13.
- Medzhitov, R. & Biron, C.A. (2003). *Current Opinion in Immunology*, **15**, 2-4.
- Melen, K., Kinnunen, L. & Julkunen, I. (2001). *J. Biol. Chem.*, **276**, 16447-16455.
- Meyer, T., Gavenis, K. & Vinkemeier, U. (2002). *Experimental Cell Research*, **272**, 45-55.
- Meyer, T., Hendry, L., Begitt, A., John, S. & Vinkemeier, U. (2004). *J. Biol. Chem.*, **279**, 18998-19007.
- Meyer, T. & Vinkemeier, U. (2004). *European Journal of Biochemistry*, **271**, 4606-4612.
- Mora, L.B., Buettner, R., Seigne, J., Diaz, J., Ahmad, N., Garcia, R., Bowman, T., Falcone, R., Fairclough, R., Cantor, A., Muro-Cacho, C., Livingston, S., Karras, J., Pow-Sang, J. & Jove, R. (2002). *Cancer Res*, **62**, 6659-6666.
- Mowen, K. & David, M. (2000). *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 7273-7281.
- Mowen, K.A., Tang, J., Zhu, W., Schurter, B.T., Shuai, K., Herschman, H.R. & David, M. (2001). *Cell*, **104**, 731-741.
- Murphy, T.L., Geissal, E.D., Farrar, J.D. & Murphy, K.M. (2000). *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 7121-7131.
- Myers, L.C. & Kornberg, R.D. (2000). *Annu Rev Biochem*, **69**, 729-49.
- Naar, A.M., Lemon, B.D. & Tjian, R. (2001). *Annu Rev Biochem*, **70**, 475-501.
- Nam, S., Buettner, R., Turkson, J., Kim, D., Cheng, J.Q., Muehlbeyer, S., Hippe, F., Vatter, S., Merz, K.-H., Eisenbrand, G. & Jove, R. (2005). *PNAS*, **102**, 5998-6003.
- Ndubuisi, M.I., Guo, G.G., Fried, V.A., Etlinger, J.D. & Sehgal, P.B. (1999). *J. Biol. Chem.*, **274**, 25499-25509.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. & Snader, K.M. (2003). *J Nat Prod*, **66**, 1022-37.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. & Riccardi, C. (1991). *J Immunol Methods*, **139**, 271-9.
- Nikolovska-Coleska, Z., Wang, R., Fang, X., Pan, H., Tomita, Y., Li, P., Roller, P.P., Krajewski, K., Saito, N.G., Stuckey, J.A. & Wang, S. (2004). *Analytical Biochemistry*, **332**, 261-273.
- Niu, G., Bowman, T., Huang, M., Shivers, S., Reintgen, D., Daud, A., Chang, A., Kraker, A., Jove, R. & Yu, H. (2002a). *Oncogene*, **21**, 7001-10.
- Niu, G., Heller, R., Catlett-Falcone, R., Coppola, D., Jaroszeski, M., Dalton, W., Jove, R. & Yu, H. (1999). *Cancer Res*, **59**, 5059-5063.
- Niu, G., Shain, K.H., Huang, M., Ravi, R., Bedi, A., Dalton, W.S., Jove, R. & Yu, H. (2001). *Cancer Res*, **61**, 3276-3280.
- Niu, G., Wright, K.L., Huang, M., Song, L., Haura, E., Turkson, J., Zhang, S., Wang, T., Sinibaldi, D., Coppola, D., Heller, R., Ellis, L.M., Karras, J., Bromberg, J., Pardoll, D., Jove, R. & Yu, H. (2002b). *Oncogene*, **21**, 2000-8.
- Niu, G., Wright, K.L., Ma, Y., Wright, G.M., Huang, M., Irby, R., Briggs, J., Karras, J., Cress, W.D., Pardoll, D., Jove, R., Chen, J. & Yu, H. (2005). *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 7432-7440.
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F. & Salomon, D.S. (2006). *Gene*, **366**, 2-16.
- Novak, U., Ji, H., Kanagasundaram, V., Simpson, R. & Paradiso, L. (1998). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **247**, 558-563.
- Oberhammer, F., Wilson, J.W., Dive, C., Morris, I.D., Hickman, J.A., Wakeling, A.E., Walker, P.R. & Sikorska, M. (1993). *EMBO J*, **12**, 3679-84.
- Olayioye, M.A., Beuvink, I., Horsch, K., Daly, J.M. & Hynes, N.E. (1999). *J. Biol. Chem.*, **274**, 17209-17218.
- Owicki, J.C. (2000). *J Biomol Screen*, **5**, 297-306.
- Pagliaro, L., Felding, J., Audouze, K., Nielsen, S.J., Terry, R.B., Krog-Jensen, C. & Butcher, S. (2004). *Current Opinion in Chemical Biology*, **8**, 442-449.

- Palmer, J.T., Rasnick, D., Klaus, J.L. & Bromme, D. (1995). *J Med Chem*, **38**, 3193-6.
- Pardoll, D. (2003). *Annu Rev Immunol*, **21**, 807-39. Epub 2001 Dec 19.
- Park, O.K., Schaefer, L.K., Wang, W. & Schaefer, T.S. (2000). *J. Biol. Chem.*, **275**, 32244-32249.
- Paukku, K. & Silvennoinen, O. (2004). *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **15**, 435-455.
- Pestka, S. (1997). *Semin Oncol*, **24**, S9-18-S9-40.
- Pope, A.J., Haupts, U.M. & Moore, K.J. (1999). *Drug Discovery Today*, **4**, 350-362.
- Powers, J.C., Asgian, J.L., Ekici, O.D. & James, K.E. (2002). *Chem Rev*, **102**, 4639-750.
- Pranada, A.L., Metz, S., Herrmann, A., Heinrich, P.C. & Muller-Newen, G. (2004). *J. Biol. Chem.*, **279**, 15114-15123.
- Preissner, R., Goede, A. & Frommel, C. (1998). *Journal of Molecular Biology*, **280**, 535-550.
- Qian, J., Voorbach, M.J., Huth, J.R., Coen, M.L., Zhang, H., Ng, S.-C., Comess, K.M., Petros, A.M., Rosenberg, S.H., Warrior, U. & Burns, D.J. (2004). *Analytical Biochemistry*, **328**, 131-138.
- Rahaman, S.O., Harbor, P.C., Chernova, O., Barnett, G.H., Vogelbaum, M.A. & Haque, S.J. (2002). *Oncogene*, **21**, 8404-13.
- Rakesh, K. & Agrawal, D.K. (2005). *Biochemical Pharmacology*, **70**, 649-657.
- Rane, S.G. & Reddy, E.P. (2000). *Oncogene*, **19**, 5662-79.
- Redell, M.S. & Tweardy, D.J. (2005). *Curr Pharm Des*, **11**, 2873-87.
- Reinhart, W.H. (1999). *Ther Umsch*, **56**, 713-7.
- Remy, I., Wilson, I.A. & Michnick, S.W. (1999). *Science*, **283**, 990-993.
- Ren, Z., Cabell, L.A., Schaefer, T.S. & McMurray, J.S. (2003). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **13**, 633-636.
- Ripperger, J.A., Fritz, S., Richter, K., Hocke, G.M., Lottspeich, F. & Fey, G.H. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 29998-30006.
- Rodig, S.J., Meraz, M.A., White, J.M., Lampe, P.A., Riley, J.K., Arthur, C.D., King, K.L., Sheehan, K.C.F., Yin, L. & Pennica, D. (1998). *Cell*, **93**, 373-383.
- Roehrl, M.H., Wang, J.Y. & Wagner, G. (2004). *Biochemistry*, **43**, 16056-66.
- Rout, M.P. & Aitchison, J.D. (2001). *J. Biol. Chem.*, **276**, 16593-16596.
- Sadowski, H.B., Shuai, K., Darnell, J.E., Jr. & Gilman, M.Z. (1993). *Science*, **261**, 1739-44.
- Sato, N., Tsuruma, R., Imoto, S., Sekine, Y., Muromoto, R., Sugiyama, K. & Matsuda, T. (2005). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **336**, 617-624.
- Schaefer, T., Sanders, L. & Nathans, D. (1995). *PNAS*, **92**, 9097-9101.
- Schaper, F., Gendo, C., Eck, M., Schmitz, J., Grimm, C., Anhuf, D., Kerr, I.M. & Heinrich, P.C. (1998). *Biochem J*, **335**, 557-65.
- Schindler, C., Fu, X.Y., Improta, T., Aebersold, R. & Darnell, J.E., Jr. (1992). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 7836-9.
- Schindler, U., Wu, P., Rothe, M., Brasseur, M. & McKnight, S.L. (1995). *Immunity*, **2**, 689-697.
- Schmitz, J., Dahmen, H., Grimm, C., Gendo, C., Muller-Newen, G., Heinrich, P.C. & Schaper, F. (2000). *J Immunol*, **164**, 848-854.
- Seidel, H., Milocco, L., Lamb, P., Darnell, J., Jr, Stein, R. & Rosen, J. (1995). *PNAS*, **92**, 3041-3045.
- Shao, H., Cheng, H.Y., Cook, R.G. & Tweardy, D.J. (2003). *Cancer Res*, **63**, 3923-3930.
- Shao, H., Xu, X., Jing, N. & Tweardy, D.J. (2006). *J Immunol*, **176**, 2933-2941.
- Shao, H., Xu, X., Mastrangelo, M.-A.A., Jing, N., Cook, R.G., Legge, G.B. & Tweardy, D.J. (2004). *J. Biol. Chem.*, **279**, 18967-18973.
- Shoichet, B.K. (2004). **432**, 862-865.
- Shuai, K. (2000). *Oncogene*, **19**, 2638-44.
- Shuai, K., Horvath, C.M., Huang, L.H.T., Qureshi, S.A., Cowburn, D. & Darnell, J., James E. (1994). *Cell*, **76**, 821-828.

- Shuai, K., Liao, J. & Song, M. (1996). *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4932-4941.
- Shuai, K., Schindler, C., Prezioso, V.R. & Darnell, J.E., Jr. (1992). *Science*, **258**, 1808-12.
- Shuai, K., Stark, G.R., Kerr, I.M. & Darnell, J.E., Jr. (1993). *Science*, **261**, 1744-6.
- Siavash, H., Nikitakis, N.G. & Sauk, J.J. (2004). *Br J Cancer*, **91**, 1074-80.
- Siewert, E., Muller-Esterl, W., Starr, R., Heinrich, P.C. & Schaper, F. (1999). *Eur J Biochem*, **265**, 251-7.
- Silva, C.M. (2004). *Oncogene*, **23**, 8017-23.
- Silvennoinen, O., Schindler, C., Schlessinger, J. & Levy, D.E. (1993). *Science*, **261**, 1736-9.
- Simon, A.R., Takahashi, S., Severgnini, M., Fanburg, B.L. & Cochran, B.H. (2002). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **282**, L1296-1304.
- Singer, A.L. & Koretzky, G.A. (2002). *Science*, **296**, 1639-1640.
- Sinibaldi, D., Wharton, W., Turkson, J., Bowman, T., Pledger, W.J. & Jove, R. (2000). *Oncogene*, **19**, 5419-27.
- Sittampalam, G.S., Kahl, S.D. & Janzen, W.P. (1997). *Current Opinion in Chemical Biology*, **1**, 384-391.
- Smith, P.D. & Crompton, M.R. (1998). *Biochem J*, **331**, 381-5.
- Song, H., Wang, R., Wang, S. & Lin, J. (2005). *PNAS*, **102**, 4700-4705.
- Songyang, Z. & Cantley, L.C. (1995). *Trends in Biochemical Sciences*, **20**, 470-475.
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R.J. & et al. (1993). *Cell*, **72**, 767-78.
- Stahl, N., Boulton, T.G., Farruggella, T., Ip, N.Y., Davis, S., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S. & et al. (1994). *Science*, **263**, 92-5.
- Stahl, N., Farruggella, T.J., Boulton, T.G., Zhong, Z., Darnell, J.E., Jr. & Yancopoulos, G.D. (1995). *Science*, **267**, 1349-53.
- Stancato, L.F., David, M., Carter-Su, C., Larner, A.C. & Pratt, W.B. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 4134-4137.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. & Schreiber, R.D. (1998). *Annu Rev Biochem*, **67**, 227-64.
- Stephanou, A. & Latchman, D.S. (2005). *Growth Factors*, **23**, 177-82.
- Strehlow, I. & Schindler, C. (1998). *J. Biol. Chem.*, **273**, 28049-28056.
- Sun, J., Blaskovich, M.A., Jove, R., Livingston, S.K., Coppola, D. & Sebt, S.M. (2005). *Oncogene*, **24**, 3236-45.
- Takeda, K., Clausen, B.E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Forster, I. & Akira, S. (1999). *Immunity*, **10**, 39-49.
- Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T. & Akira, S. (1997). *PNAS*, **94**, 3801-3804.
- Tan, D.S. (2005). *Nat Chem Biol*, **1**, 74-84.
- Teranishi, T., Hirano, T., Arima, N. & Onoue, K. (1982). *J Immunol*, **128**, 1903-1908.
- Thomas, S.M. & Brugge, J.S. (1997). *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **13**, 513-609.
- Tomida, M., Heike, T. & Yokota, T. (1999). *Blood*, **93**, 1934-1941.
- Toyonaga, T., Nakano, K., Nagano, M., Zhao, G., Yamaguchi, K., Kuroki, S., Eguchi, T., Chijiwa, K., Tsuneyoshi, M. & Tanaka, M. (2003). *Cancer Letters*, **201**, 107-116.
- Turkson, J., Bowman, T., Garcia, R., Caldenhoven, E., De Groot, R.P. & Jove, R. (1998). *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 2545-2552.
- Turkson, J. & Jove, R. (2000). *Oncogene*, **19**, 6613-26.
- Turkson, J., Kim, J.S., Zhang, S., Yuan, J., Huang, M., Glenn, M., Haura, E., Sebt, S., Hamilton, A.D. & Jove, R. (2004a). *Mol Cancer Ther*, **3**, 261-269.
- Turkson, J., Ryan, D., Kim, J.S., Zhang, Y., Chen, Z., Haura, E., Laudano, A., Sebt, S., Hamilton, A.D. & Jove, R. (2001). *J. Biol. Chem.*, **276**, 45443-45455.

- Turkson, J., Zhang, S., Mora, L.B., Burns, A., Sebti, S. & Jove, R. (2005). *J. Biol. Chem.*, **280**, 32979-32988.
- Turkson, J., Zhang, S., Palmer, J., Kay, H., Stanko, J., Mora, L.B., Sebti, S., Yu, H. & Jove, R. (2004b). *Mol Cancer Ther*, **3**, 1533-1542.
- Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1990). *Cell*, **61**, 203-12.
- Ushijima, R., Sakaguchi, N., Kano, A., Maruyama, A., Miyamoto, Y., Sekimoto, T., Yoneda, Y., Ogino, K. & Tachibana, T. (2005). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **330**, 880-886.
- van der Geer, P., Hunter, T. & Lindberg, R.A. (1994). *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 251-337.
- Verma, A., Kambhampati, S., Parmar, S. & Plataniias, L.C. (2003). *Cancer and Metastasis Reviews*, **22**, 423-434.
- Vermes, I., Haanen, C. & Reutelingsperger, C. (2000). *Journal of Immunological Methods Flow Cytometry*, **243**, 167-190.
- Vignais, M.-L. & Gilman, M. (1999). *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 3727-3735.
- Vinkemeier, U., Cohen, S.L., Moarefi, I., Chait, B.T., Kuriyan, J. & Darnell, J.E., Jr. (1996). *EMBO J*, **15**, 5616-26.
- Vinkemeier, U., Moarefi, I., Darnell, J.E., Jr. & Kuriyan, J. (1998). *Science*, **279**, 1048-52.
- Vultur, A., Cao, J., Arulanandam, R., Turkson, J., Jove, R., Greer, P., Craig, A., Elliott, B. & Raptis, L. (2004). *Oncogene*, **23**, 2600-16.
- Waksman, G., Kominos, D., Robertson, S.C., Pant, N., Baltimore, D., Birge, R.B., Cowburn, D., Hanafusa, H., Mayer, B.J., Overduin, M., Resh, M.D., Rios, C.B., Silverman, L. & Kuriyan, J. (1992). **358**, 646-653.
- Waldron, T.T., Schrifft, G.L. & Murphy, K.P. (2005). *Journal of Molecular Biology*, **346**, 895-905.
- Walters, W.P. & Namchuk, M. (2003). *Nat Rev Drug Discov*, **2**, 259-66.
- Wang, D., Stravopodis, D., Teglund, S., Kitazawa, J. & Ihle, J. (1996). *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 6141-6148.
- Weber, G. (1952). *Biochem J*, **51**, 145-55.
- Weidler, M., Rether, J., Anke, T. & Erkel, G. (2000). *FEBS Letters*, **484**, 1-6.
- Weis, K. (2003). *Cell*, **112**, 441-451.
- Wen, Z., Zhong, Z. & Darnell, J., James E. (1995). *Cell*, **82**, 241-250.
- Whiteley, C.G. (2000). *Cell Biochem Biophys*, **33**, 217-25.
- Widschwendter, A., Tonko-Geymayer, S., Welte, T., Daxenbichler, G., Marth, C. & Doppler, W. (2002). *Clin Cancer Res*, **8**, 3065-3074.
- Wiederkehr-Adam, M., Ernst, P., Muller, K., Bieck, E., Gombert, F.O., Ottl, J., Graff, P., Grossmuller, F. & Heim, M.H. (2003). *J. Biol. Chem.*, **278**, 16117-16128.
- Wu, G., Fang, Y.-Z., Yang, S., Lupton, J.R. & Turner, N.D. (2004). *J. Nutr.*, **134**, 489-492.
- Wu, P., Brasseur, M. & Schindler, U. (1997). *Analytical Biochemistry*, **249**, 29-36.
- Xi, S., Gooding, W.E. & Grandis, J.R. (2004). **24**, 970-979.
- Xiao, Z., Hao, Y., Liu, B. & Qian, L. (2002). *Leuk Lymphoma*, **43**, 1763-8.
- Xu, Q., Briggs, J., Park, S., Niu, G., Kortylewski, M., Zhang, S., Gritsko, T., Turkson, J., Kay, H., Semenza, G.L., Cheng, J.Q., Jove, R. & Yu, H. (2005). **24**, 5552-5560.
- Yahata, Y., Shirakata, Y., Tokumaru, S., Yamasaki, K., Sayama, K., Hanakawa, Y., Detmar, M. & Hashimoto, K. (2003). *J. Biol. Chem.*, **278**, 40026-40031.
- Yamanaka, Y., Nakajima, K., Fukada, T., Hibi, M. & Hirano, T. (1996). *EMBO J*, **15**, 1557-65.
- Yang, J., Chatterjee-Kishore, M., Staugaitis, S.M., Nguyen, H., Schlessinger, K., Levy, D.E. & Stark, G.R. (2005). *Cancer Res*, **65**, 939-947.
- Yao-Tsung Yeh, F.O.-Y., I-Fen Chen, Sheau-Fang Yang, Yuan-Yung Wang, Hung-Yi Chuang, Jinu-Huang Su, Ming-Feng Hou, Shyng-Shiou F. Yuan., (2006). *International Journal of Cancer*, **118**, 2943-2947.

-
- Yu, C., Jove, R. & Burakoff, S. (1997). *J Immunol*, **159**, 5206-5210.
- Yu, C.L., Meyer, D.J., Campbell, G.S., Larner, A.C., Carter-Su, C., Schwartz, J. & Jove, R. (1995). *Science*, **269**, 81-3.
- Yu, H. & Jove, R. (2004). *Nat Rev Cancer*, **4**, 97-105.
- Zamo, A., Chiarle, R., Piva, R., Howes, J., Fan, Y., Chilosi, M., Levy, D.E. & Inghirami, G. (2002). *Oncogene*, **21**, 1038-47.
- Zhang, H., Nimmer, P., Rosenberg, S.H., Ng, S.-C. & Joseph, M. (2002a). *Analytical Biochemistry*, **307**, 70-75.
- Zhang, J.H., Chung, T.D. & Oldenburg, K.R. (1999a). *J Biomol Screen*, **4**, 67-73.
- Zhang, J.J., Zhao, Y., Chait, B.T., Lathem, W.W., Ritzi, M., Knippers, R. & Darnell, J.E., Jr. (1998). *EMBO J*, **17**, 6963-71.
- Zhang, T., Seow, K.T., Ong, C.T. & Cao, X. (2002b). *J. Biol. Chem.*, **277**, 17556-17563.
- Zhang, X., Wrzeszczynska, M.H., Horvath, C.M. & Darnell, J.E., Jr. (1999b). *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 7138-7146.
- Zhou, P., Qian, L., Kozopas, K.M. & Craig, R.W. (1997). *Blood*, **89**, 630-643.