

**Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der
Heteroarylketon-vermittelten Inhibierung der Interleukin-6-Expression
in humanen MG-U343 Gliomazellen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Diplom-Biologin Claudia Engel

geb. am 09.02.1980 in Wolfen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Sven-Erik Behrens
2. Prof. Dr. Steffen Roßner
3. PD Dr. Astrid Kehlen

Halle/Saale, am 17.03.2011

°C	Grad Celsius
μ	mikro
2-D	zweidimensional
A. dest	destilliertes Wasser
Ab	Antikörper (<i>Antibody</i>)
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
ADP	Adenosindiphosphat
Akt	durch Insulin und verschiedene Wachstumsfaktoren aktivierbare Proteinkinase
Ala	Alanin
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Fraktion V)
BSF-2	B-Zell-Stimulierungsfaktor-2
BT	Benzothiazol
C	Konzentration
cDNA	<i>copyDNA</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CO ₂	Kohlendioxid
CRP	C-reaktives Protein
CSF	Cerebrospinale Flüssigkeit
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	<i>Dulbeccos` s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC ₅₀	Konzentration einer Substanz, welche zu einer halbmaximalen Wirkung führt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eEF1A1	eukaryotischer Elongationsfaktor 1A1
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMSA	<i>Electro Mobility Shift Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>

et al.	und andere
Fa.	Firma
FACS	Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence activated cell sorting</i>)
FBS	fötales Kälberserum (<i>Fetal bovine serum</i>)
FLNA	Filamin A
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
gp130	Glykoprotein 130
GTP	Guanosintriphosphat
HAK	Heteroarylketon
hIL-6-ELISA	humanspezifischer IL-6-ELISA
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
ICC	Immunzytochemie (<i>Immunocytochemistry</i>)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IF	Immunfluoreszenz
IFN- β 2	Interferon- β 2
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
IP	Immunpräzipitation
IP3	Inositol-3-Phosphat
ISRE	<i>Interferon stimulated response element</i>
I κ B α	Inhibitor von NF κ B
Jak	Januskinase
JIA	Juvenile idiopathische Arthritis
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
Leu	Leucin

LIF	<i>Leukemia-inhibitory factor</i>
Lys	Lysin
M	Molarität
mA	Milli-Ampere
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
mm	Millimeter
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTor	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NFκB	Nuklear-Faktor kappa B
nm	Nanometer
NTK	Non-Target-Kontrolle
OSM	Oncostatin M
p	phospho
PBS	Phosphatpuffer (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEP	Prolylendopeptidase
PFA	Paraformaldehyd
pg	Picogramm
Phe	Phenylalanin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKCδ	Proteinkinase C delta
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
Pro	Prolin
qPCR	quantitative PCR
RA	Rheumatoide Arthritis
Raf	MAP Kinase Kinase Kinase
Ras	Guanosinnukleotid-bindendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung

SH2	<i>Src homology 2 protein domain</i>
SHP2	SHP2-Phosphatase
sIL-6R	löslicher IL-6-Rezeptor
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SL	Stammlösung
Socs3	<i>Supressor of cytokine signalling</i>
Stat	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STS	Staurosporin
Tab.	Tabelle
TF	Transkriptionsfaktor
Th	Thiazol
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u. U.	unter Umständen
VCP1	<i>Valosin-containing-protein 1</i>
vgl.	vergleiche
WB	Western-Blot-Analyse
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
κ B-RE	<i>κB-Response element</i>

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Vom Prolylendopeptidase-Inhibitor zu einem Hemmer der Interleukin-6-Sekretion.....	1
1.2.	IL-6 – ein multifunktionales Zytokin.....	2
1.3.	IL-6 Rezeptoren und die IL-6 Signalkaskade	4
1.4.	IL-6 in inflammatorischen Erkrankungen.....	6
1.5.	Blockade des IL-6-Signalwegs als therapeutischer Ansatz bei inflammatorisch-bedingten Krankheitsverläufen.....	8
1.6.	Aufgaben und Zielsetzung	9
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	11
2.1.	Geräte.....	11
2.2.	Material	12
2.3.	Methoden	19
2.3.1.	Kultivierung und Lagerung von Zellen	19
2.3.2.	Isolation von Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien	20
2.3.3.	cDNA-Synthese.....	20
2.3.4.	Quantitative PCR.....	20
2.3.5.	Agarosegelelektrophorese	21
2.3.6.	Messung der Aktivität von Prolylendopeptidase-Inhibitoren und IC ₅₀ -Bestimmung	21
2.3.7.	Small interfering RNA (siRNA)	22
2.3.8.	Reinigung des Zielproteins eEF1A1	23
2.3.9.	Oberflächenplasmonenresonanz.....	23
2.3.10.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	24
2.3.11.	Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE).....	24
2.3.12.	Dialyse.....	25
2.3.13.	Immunzytochemie	26
2.3.14.	Durchflusszytometrie	26
2.3.15.	Humanspezifischer IL-6-ELISA	27
2.3.16.	Immunpräzipitation	27
2.3.17.	Blaugel	27
2.3.18.	Silbergel	28
2.3.19.	Actinomycin D-Behandlung	28
2.3.20.	Herstellung von Zellextrakten.....	28
2.3.21.	Immunoblotting.....	28

2.3.22.	Statistik.....	29
3.	ERGEBNISSE	30
3.1.	Kausalität zwischen PEP-Aktivität und IL-6-Sekretion	30
3.2.	Einfluss von PEP auf die autokrine IL-6-Expression	31
3.3.	Auswahl und Charakterisierung eines Stimulus der IL-6-Expression.....	34
3.4.	Hemmung der OSM-stimulierten IL-6-Expression durch Heteroarylketone	39
3.5.	Einfluss von Heteroarylketonen auf den Abbau der OSM-stimulierten IL-6- mRNA	42
3.6.	Einfluss von biotinylierten Inhibitoren auf die IL-6-Expression.....	44
3.7.	Konzentrations- und zeitabhängige Markierung durch biotinylierte Inhibitoren ..	45
3.8.	Kolokalisation von PP301 und Mannose-6-Phosphat Rezeptor sowie Calnexin ..	47
3.9.	Validierung der biotinylierten Inhibitoren mit Streptavidin-spezifischem Immunoblot	48
3.10.	Zweidimensionale Gelelektrophorese und Streptavidin-spezifischer Immunoblot	49
3.11.	Streptavidin-spezifische Immunpräzipitation der ausgewählten putativen Interaktionspartner.....	52
3.12.	Isolierung von endogenem eEF1A1 aus humanen MG-U343 Gliomazellen	54
3.13.	Nachweis der Bindung von eEF1A1 und PP301 mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz.....	55
3.14.	Einfluss von eEF1A1 auf die IL-6-Expression.....	56
3.15.	Lokalisation des eEF1A1-Proteins im Vergleich zum biotinylierten Inhibitor PP301.....	59
3.16.	Abhängigkeit der PP301-spezifischen Markierung von eEF1A1	60
3.17.	Einfluss von ausgewählten Proteinen auf die OSM-stimulierte IL-6-mRNA- Expression	64
3.18.	Beeinflussung der OSM-vermittelten Phosphorylierung der Erk1-Kinase durch Heteroarylketone	67
3.19.	Einfluss von Heteroarylketonen auf die OSM-induzierte Stat3- Phosphorylierung.....	71
3.20.	Erk1-abhängige Phosphorylierung des Stat3-Proteins an der Aminosäure Serin 727	80
3.21.	Beeinflussung der Komplexbildung von Stat3/NFκB durch Heteroarylketone	84

3.22.	Einfluss von Heteroarylketonen und deren Interaktionspartner eEF1A1 auf die Socs3-Proteinexpression	86
4.	DISKUSSION	90
5.	AUSBLICK	108
6.	ZUSAMMENFASSUNG	110
7.	LITERATURVERZEICHNIS	113

1. EINLEITUNG

1.1. Vom Prolylendopeptidase-Inhibitor zu einem Hemmer der Interleukin-6-Sekretion

Das Enzym Prolylendopeptidase (EC 3.4.21.26; PEP) ist eine prolinspezifische Serinprotease, welche ubiquitär im Organismus exprimiert wird. Besonders hohe Konzentrationen dieses Proteins konnten im Gehirn nachgewiesen werden [1-3]. In mehreren Arbeiten wurde die Korrelation zwischen pathophysiologischen Störungen des zentralen Nervensystems und einer erhöhten PEP-Aktivität gezeigt [4-6]. Durch die Verwendung von spezifischen PEP-Inhibitoren konnten Verbesserungen in kognitiven Prozessen sowie neuroprotektive Wirkungen erzielt werden [7]. Somit erlangte PEP große Bedeutung als Zielenzym für die Entwicklung von neuen Therapeutika zur Behandlung von demenzbedingten Ausfällen des Zentralen Nervensystems (ZNS).

In weiterführenden Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass PEP mit Tubulin kolokalisiert ist und an dieses Protein bindet. Ebenso wurde gezeigt, dass die Sekretion des sekundären Botenstoffs Inositol-3-Phosphat (IP3) in PEP-antisense Zelllinien modifiziert wird. Aufgrund dieser Daten wurde die Involvierung von PEP im intrazellulären Transportmechanismus im Allgemeinen sowie die Beeinflussung der Sekretion von Chemokinen und Zytokinen im Besonderen diskutiert [8]. Nachfolgende Arbeiten belegten nachdrücklich, dass die Sekretion des inflammatorischen Zytokins Interleukin-6 (IL-6) in der Gliomazelllinie MG-U343 durch die Verwendung spezifischer PEP-Inhibitoren modifiziert wird (unveröffentlichte Daten, Probiodrug AG). Allerdings gab es erste Hinweise darauf, dass die Regulation der IL-6-Sekretion unabhängig von der Regulation der PEP-Aktivität stattfindet. Nähere Untersuchungen zur Charakterisierung der Inhibierung der IL-6-Sekretion mit Hilfe von PEP-Inhibitoren bewiesen für mehrere Zelllinien, dass diese auf einer verminderten Expression des IL-6 Gens beruht und nicht, wie zunächst vermutet, einzig der Transport des IL-6-Proteins betroffen ist [9]. Demzufolge ist anzunehmen, dass PEP-Inhibitoren neben der PEP ein weiteres Zielprotein beeinflussen. Dabei kommt es durch die Interaktion dieses Zielproteins mit den PEP-inhibierenden Substanzen zu einer Verminderung der IL-6-Genexpression. Wie in mehreren Studien beschrieben wurde, besitzt das proinflammatorische Zytokin IL-6 eine große Bedeutung in verschiedenen chronisch inflammatorischen Erkrankungen, insbesondere im Verlauf der rheumatoiden Arthritis (RA) [10-13]. Als Voraussetzung für die Entwicklung eines neuen IL-6-senkenden

Therapeutikums muss dessen Zielprotein und der zugrunde liegende molekulare Wirkmechanismus erforscht werden. Nur mit Hilfe der Identifizierung des Zielproteins von PEP-Inhibitoren, welches für die Blockierung der IL-6-Expression ausschlaggebend ist, kann eine Optimierung der ursprünglichen Substanzen in Richtung einer Medikamentenentwicklung stattfinden [14].

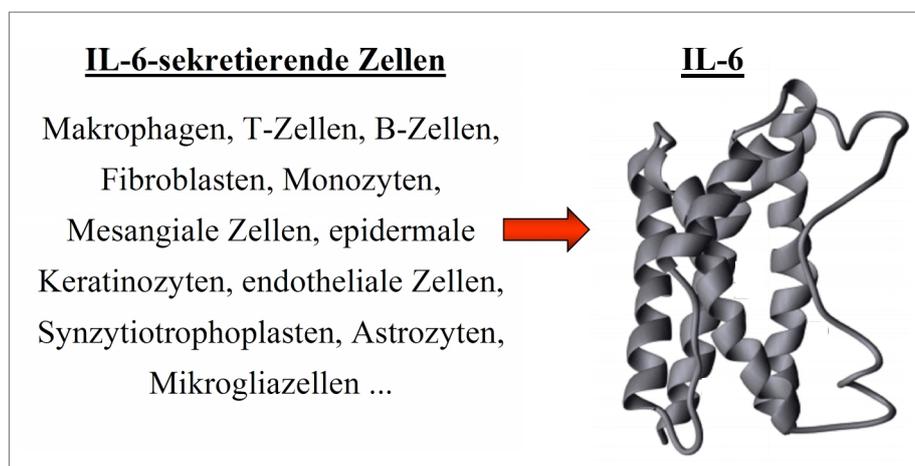
1.2. IL-6 – ein multifunktionales Zytokin

Zytokine übernehmen eine wichtige Rolle als Vermittler in der inter- und intrazellulären Kommunikation eines Organismus. Anders als die Hormone werden sie jedoch nicht in speziellen Zellen gelagert, sondern schnell als Antwort auf einen Stimulus synthetisiert. Zu der großen Gruppe der Zytokine zählen Wachstumsfaktoren, Interferone, Chemokine und Interleukine. Neben der Regulation der Zellproliferation und der Differenzierung von Immunzellen beeinflussen diese Substanzen die Hämatopoese und die Lymphopoese ebenso wie die Entwicklung des Nervensystems und die Embryogenese. Die Synthese und die Sekretion von Zytokinen unterliegen feinen Regulationsmechanismen. An diesen sind sowohl die Substanzen selbst, als auch regulatorische Proteine, welche als Antwort auf Zytokinsignale exprimiert werden, beteiligt [12]. Die Expression dieser Signalmoleküle resultiert infolge der Bindung von Zytokinen an deren spezifische Zytokinrezeptoren [15]. Die Disregulation der Expression einiger Zytokine, wie z.B. des Tumor-Nekrose-Faktors alpha (TNF α), des Interleukin-1 (IL-1) und des IL-6, wurde im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen beschrieben.

IL-6 ist ein Mitglied der Superfamilie der IL-6-Typ-Zytokine, zu der weiterhin Oncostatin M (OSM), Interleukin-11 (IL-11), *Ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *Cardiotrophin-1* (CT-1), *Leukemia inhibitory factor* (LIF) und *Cardiotrophin like cytokine* (CLC) gehören. Diese Zytokinfamilie wird durch die gemeinsame Nutzung der Rezeptoruntereinheit Glykoprotein 130 (gp130) sowie die dreidimensionale Vier-Helix-Bündelstruktur charakterisiert, die in einer auf-auf-ab-ab-Struktur angeordnet sind (Abb. 1.1.) [16].

Das humane 26 kDa große IL-6-Protein besitzt 184 Aminosäuren. Es enthält zwei potentielle Glykosylierungsstellen sowie 4 Cysteinreste [15, 17]. Von vielen Zelltypen ist bekannt, dass sie IL-6 sekretieren. Dazu gehören Monozyten, Makrophagen, B- und T-Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Muskelzellen, Mastzellen, dendritische Zellen, Chondrozyten, Osteoblasten, Keratinozyten und einige Tumorzelllinien (Abb. 1.1.) [18, 19]. Die wichtigsten IL-6-Quellen des Körpers stellen das Fett- und das Muskelgewebe dar [20, 21]. Im ZNS zählen

Mikrogliazellen und Astrozyten zu den bedeutendsten IL-6-Produzenten [22, 23]. Es sind eine Reihe von Stimuli der IL-6-Sekretion bekannt, wozu unter anderem $\text{TNF}\alpha$, IL-1 [24], OSM [25] und Phorbol ester [26] gehören.



1.1. Kristallstruktur des IL6-Proteins und IL-6-sekretierende Zellen [16, 18, 19].

Das Zytokin IL-6 ist in vielen biologischen Prozessen involviert [27, 28]. Dieses vielfältige Wirkungsspektrum spiegelt sich in den zahlreichen Synonymen des IL-6 wider [18, 29]. So wurde es erstmals als Differenzierungsfaktor von B-Zellen (B-Zell-Stimulierungsfaktor-2) identifiziert [30]. In nachfolgenden Studien mit rekombinantem IL-6-Protein und anti-IL-6-Antikörper konnte gezeigt werden, dass IL-6 auch einen Einfluss auf die Differenzierung von T-Zellen, Leberzellen, hämatopoetischen Vorläuferzellen und Neuronen hat [17, 31]. Eine Übersicht der physiologischen IL-6-Effekte stellt Tabelle 1.2. dar.

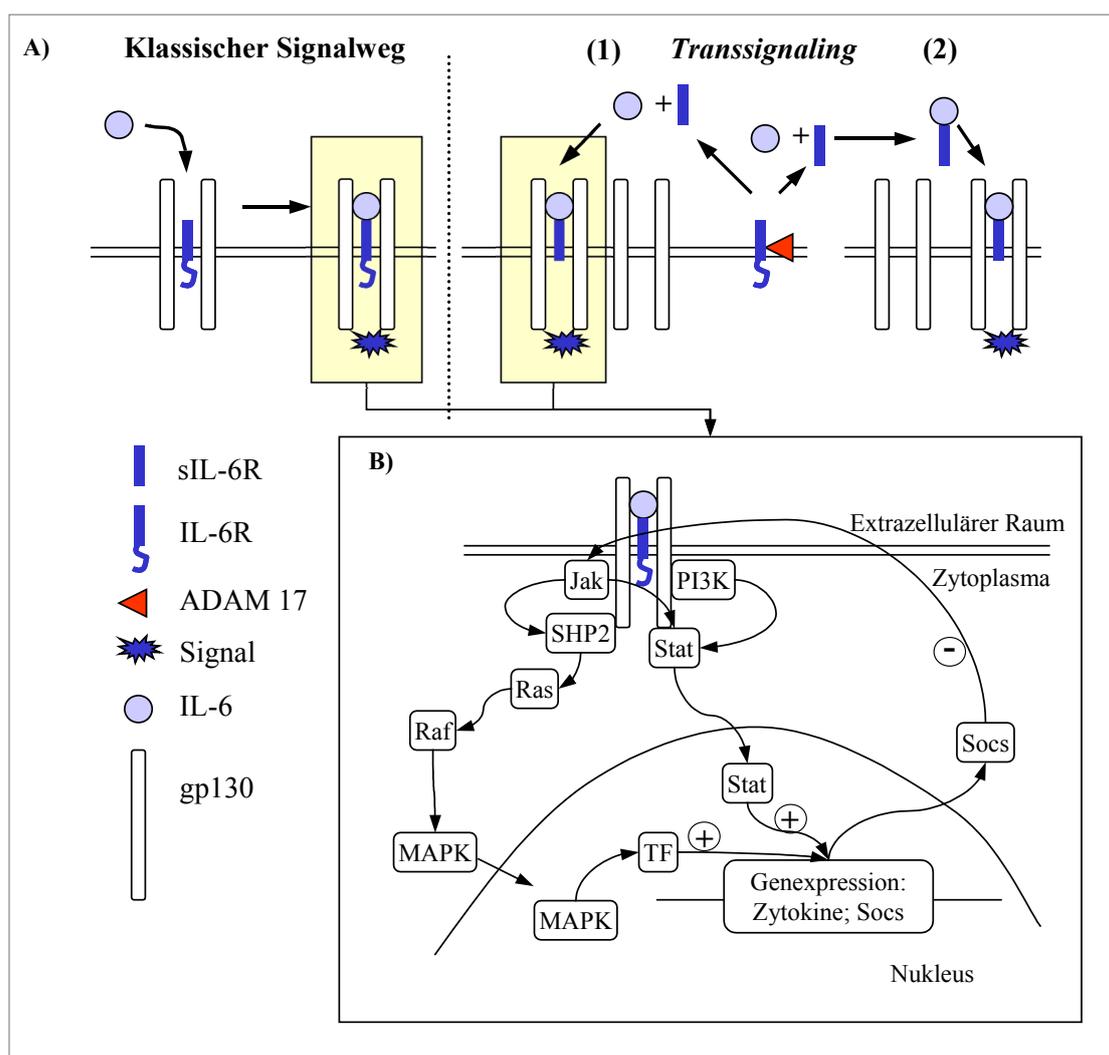
1.2. Funktionen des IL-6 Proteins.

IL-6 Wirkung auf	Funktion/Reaktion	Referenz
B-Zellen	- Differenzierung und Produktion der Immunglobuline IgM, IgG, IgA	[30]
T-Zellen	- Proliferation und Differenzierung zu Killerzellen	[32]
Hämatopoetische Stammzellen	- Differenzierung; Verstärkung der hämatopoetischen Koloniebildung	[33]
Megakaryozyten	- Reifung	[34, 35]
Makrophagen	- Reifung	[36]
Hepatozyten	- Synthese und Sekretion von Akut-Phase-Proteinen	[37-39]
Knochenmetabolismus	- Förderung der Proliferation von Osteoklasten und Induktion der Knochenresorption	[40-42]
Zentrales Nervensystem	- Differenzierung neuronaler Zellen; Induzierung der adrenokortikotropen Hormonsynthese - Auslösen von Fieber durch die Induktion der Prostaglandin E_2 -Synthese	[22, 43, 44]

IL-6 Wirkung auf	Funktion/Reaktion	Referenz
Plazenta	- Sekretion von chorionischen Gonadotropin aus Trophoblasten	[45]

1.3. IL-6 Rezeptoren und die IL-6 Signalkaskade

Die Vielfalt der biologischen Effekte des Zytokins IL-6 geht auf die Einbindung der Rezeptorkomponente gp130 zurück, welche ubiquitär exprimiert wird [19, 46]. Zudem existiert auch eine lösliche Variante dieses Rezeptorproteins (sgp130) [47]. Man unterscheidet 2 Arten der IL-6-Signaltransduktion (Abb. 1.3. A). Beim klassischen Signalweg erfolgt nach der Bindung des IL-6-Moleküls an den membranständigen IL-6-Rezeptor (IL-6R) die Rekrutierung von zwei gp130-Rezeptormolekülen und aufgrund dessen die Signalweiterleitung. Im Gegensatz dazu bindet das IL-6-Protein im Fall des *Transsignaling* an den löslichen IL-6-Rezeptor (sIL-6R) [48].



1.3. A) IL-6-spezifisches klassisches und *Transsignaling* (modifiziert nach [49]) und B) IL-6-Signalkaskade (modifiziert nach [16]).

Dieser wird entweder durch proteolytische Spaltung mit Hilfe der Metalloproteinase ADAM 17, das sogenannte *shedding*, oder durch alternatives Spleißen des membranständigen Rezeptors generiert [49, 50]. Der Komplex sIL-6R/IL-6 kann sowohl Zellen stimulieren welche keinen membranständigen IL-6-Rezeptor exprimieren (Abb. 1.3., *Transsignaling* 2) als auch Zellen, deren membranständige Rezeptoren freigesetzt oder bereits internalisiert wurden (Abb. 1.3., *Transsignaling* 1). Somit ist das Zytokin IL-6 in der Lage, schon in Konzentrationen im nano- und picomolaren Bereich seine Wirkung auf fast alle Körperzellen zu entfalten [51, 52].

Im Gegensatz zu den Rezeptortyrosinkinasen verfügt gp130 über keine eigene Kinasedomäne, weswegen zytoplasmatische Kinasen für die Initiation des Signalwegs benötigt werden [53, 54]. Diese gehören zur Familie der Januskinasen (Jaks), welche konstitutiv mit der intrazellulären Domäne von gp130 assoziiert sind [15, 46]. Die Signalweiterleitung findet im Fall der IL-6-Zytokine über Jak1, Jak2 und Tyk2 statt [54-56]. Die Aktivierung der Januskinasen infolge der Ligandenbindung an den extrazellulären Teil des Rezeptors führt zur Phosphorylierung von mindestens 5 der 6 in Frage kommenden zytoplasmatischen Tyrosinreste von gp130. Aufgrund dieser Aktivierungen erfolgt die Rekrutierung von Signalproteinen mit SH2-Domänen wie z.B. der SHP2-Phosphatase und den Transkriptionsfaktoren *Signal transducer and activator of transcription* (Stat) 1 und 3 [15, 16, 57]. Als Konsequenz der Rekrutierung werden Stat1 und Stat3 an den Aminosäuren Tyrosin 701 bzw. 705 phosphoryliert und translozieren als Homo- und Heterodimere in den Zellkern [58]. Durch die Bindung dieser Dimere an spezifische Promotorelemente von Stat-regulierten Genen wird die Expression dieser beeinflusst [49]. Interessanterweise konnte im Fall der IL-6-Signalkaskade eine erheblich größere Bedeutung der Stat3-Homodimere im Vergleich zu Dimeren mit Stat1 gezeigt werden [59]. Die rekrutierte SHP2-Phosphatase wird durch Jak1 an den Aminosäuren Tyrosin 542 und 580 phosphoryliert, wodurch die Anschaltung des Ras/Raf/Erk-Signalwegs ausgelöst wird [60]. Im Verlauf dieser SHP2-aktivierten Signalkaskade werden die Raf-Kinase und daran anschließend die MAP-(*Mitogen activated protein*) Kinasen Erk1 und Erk2 phosphoryliert, welche die NFκB-Transkriptionsfaktoren aktivieren. Diese sind durch 7 verschiedene Proteine mit einer Rel-Homologie-Domäne charakterisiert, welche als Homo- und Heterodimere die Transkription von Zyto- und Chemokinen sowie eine Reihe anderer Gene beeinflussen. Sie werden deshalb auch als Rel-Proteine bezeichnet. Die Aktivierung dieser Faktoren findet über die Anschaltung des IκBα-Kinase-Komplexes statt, der die Ubiquitinylierung und den proteosomalen Abbau des Inhibitors von NFκB-TFs, IκBα, einleitet. Infolgedessen werden die Rel-Proteine freigesetzt

und translozieren in den Zellkern, wo sie gemeinsam mit Coaktivatoren, wie z.B. CBP (*Creb binding protein*), an die κ B-Elemente von NF κ B-abhängigen Genen binden [61-64]. Die meisten der Dimere, wie das am häufigsten vorhandene Heterodimer aus p50 und p65, wirken aktivierend auf die Genexpression [61].

Aufgrund der beschriebenen Signalkaskaden wird die Expression des IL-6-Gens erhöht und damit die Sekretion des Zytokins angeregt (Abb. 1.3. B) [16]. Um eine Überexpression von Zytokinen zu verhindern, sind mehrere Mechanismen der Negativregulation bekannt [65]. Zum einen wird die Internalisierung der Rezeptorproteine durch die Ligandenbindung verstärkt [66]. Zum anderen findet die Induktion der Genexpression verschiedener Proteine statt, welche in der Lage sind, die Signalkaskade zu inhibieren [16, 67]. Neben Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) und den PIAS-Proteinen (*Protein inhibitors of activated stat*) spielen dabei die Socs-Proteine (*Suppressor of cytokine signaling*) eine bedeutende Rolle [16]. Die Expression dieser letztgenannten Rückkopplungs-Inhibitoren ist von der Phosphorylierung der Stat-Proteine abhängig, da der Socs-Promotor zwei putative Stat3-Bindedomänen enthält [68, 69].

1.4. IL-6 in inflammatorischen Erkrankungen

Der Begriff Inflammation beschreibt eine Vielzahl von Prozessen, die infolge einer Infektion durch Pathogene, dem Kontakt mit toxischen Substanzen oder auch nach einer Gewebsverletzung ablaufen. Die initiale Phase von Entzündungen ist durch 4 physiologische Merkmale gekennzeichnet: Rötung und Anschwellen des betroffenen Gewebes, Schmerz- und Wärmeentwicklung. In den meisten Fällen wird eine Inflammation von Fieber, der Expression von Akut-Phaseproteinen und der Aktivierung des Immunsystems begleitet. Die Regulierung dieser komplexen Vorgänge erfolgt durch die Expression und Sekretion verschiedener Zytokine, Adhäsionsmoleküle und extrazellulärer Matrixproteine [70].

Das Zytokin IL-6 besitzt sowohl anti- als auch proinflammatorische Eigenschaften, wobei eine Überexpression im Allgemeinen mit pathophysiologischen Störungen des ZNS assoziiert wird [40]. Unter dem Einfluss von IL-6 kommt es bei Osteoporose zur Reduktion der Knochendichte [71]. Das Zytokin ist in Verbindung mit dem Multiplen Myelom, kardiovaskulären Erkrankungen, Asthma, septischen Schock, Arteriosklerose, Depressionen, Parodontose sowie im Zusammenhang mit einer erhöhten Stressbelastung beschrieben worden [70, 72-75]. Neben diesen Krankheitsbildern ist eine Vielzahl von IL-6-korrelierten chronischen inflammatorischen Erkrankungen bekannt. Dazu gehören Morbus Crohn, Morbus

Castleman, Morbus Alzheimer, Akute Pankreatitis, virale und bakterielle Meningitis, Psoriasis, Multiple Sklerose, Systemischer Lupus erythematoses, Asthma, Rheumatoide Arthritis (RA) und deren Sonderform, die Juvenile idiopathische Arthritis (JIA) [10, 76-80]. In den genannten Erkrankungen kommt es zu einer Erhöhung der IL-6-Proteinkonzentration im Plasma oder wie bei der viralen und bakteriellen Meningitis in der Cerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) [81-84]. Die pathologisch erhöhten IL-6-Spiegel führen dann zu einer Disregulation der inflammatorischen Prozesse. So konnte beispielsweise auch eine Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten infolge einer Überexpression von IL-6 beobachtet werden [85, 86]. Eine Studie bezüglich einer Pankreas-spezifischen IL-6-Überexpression im Tiermodell hat gezeigt, dass die Symptome vergleichbar mit denen einer Akuten Pankreatitis sind [87]. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen führt die Deletion des IL-6-Gens in Mäusen zu der Resistenz gegenüber einer Antigen-vermittelten Arthritis [88]. Ebenso sind IL-6-Knock-Out-Mäuse resistent, wenn eine Induktion von autoimmuner Enzephalomyelitis stattfindet [89]. Fehlt das Protein allerdings permanent, so wird die Produktion von Akut-Phase-Proteinen ebenso wie die Differenzierung von Makrophagen und Lymphozyten infolge von Verletzungen oder Infektionen disreguliert und somit die bedeutende anti-inflammatorische Wirkung von IL-6 verhindert [90].

Im Fall von RA ist eine direkte Korrelation zwischen dem Schweregrad der Erkrankung bzw. dem Krankheitsverlauf mit der Höhe des IL-6-Spiegels nachgewiesen. Sie stellt die häufigste entzündliche Erkrankung der Gelenke dar [91]. Weltweit sind etwa 0,5 - 1 % der Bevölkerung an RA erkrankt, wobei Frauen 3 mal so oft betroffen sind als Männer. Zu Beginn treten vielfach im Alter von 35 - 45 Jahren plötzliche Schmerzen in den Finger- und Zehengelenken auf. Im weiteren Verlauf kommt es zum schmerzhaften Anschwellen und zu einer erhöhten Wärmeentwicklung der Knie-, Schulter-, Hand-, Fuß-, Hüft- und anderer Gelenke. Die molekularen Ursachen dieser Autoimmunerkrankung sind bislang weitgehend ungeklärt. Allerdings ist bekannt, dass einige Zytokine überexprimiert werden, wie z.B. $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und IL-6. Dementsprechend kann eine Verbesserung des Krankheitsbildes durch die Blockade der Synthese dieser proinflammatorischen Zytokine erreicht werden [92, 93].

Im Fall von RA wurden in mehreren Studien pathologisch erhöhte Konzentrationen von IL-6 und sIL-6R in der synovialen Flüssigkeit sowie im Plasma der Patienten festgestellt [94-100]. Dabei korreliert die Menge von IL-6 und sIL-6R mit der Einwanderung von Leukozyten in das arthritische Gelenk [101-103]. Eine solche Korrelation findet man ebenfalls bei Patienten mit JIA [104, 105].

1.5. Blockade des IL-6-Signalwegs als therapeutischer Ansatz bei inflammatorisch-bedingten Krankheitsverläufen

Im Fall des Zusammenhangs zwischen zunehmender pro-inflammatorischer Wirkung von IL-6 und dem Schweregrad einer Erkrankung kann die Blockierung des IL-6-Signalweges eine wirkungsvolle Therapie darstellen [106, 107]. Im letzten Jahrzehnt wurden mehrere Möglichkeiten beschrieben, den IL-6-Signalweg zu manipulieren. Zum einen wird die Expression von IL-6 und verwandter Familienmitglieder wie OSM und *Leucozyte inhibitory factor* (LIF) durch den Einsatz von Glukokortikoiden und NFκB-Inhibitoren gehemmt. Dabei stellen die NFκB-Inhibitoren einen Großteil der bisher kommerziell erhältlichen Medikamente dar. Diese Substanzen werden den Klassen der *Non steroidal anti-inflammatory drugs* (NSAIDS), der *Disease modifying antirheumatic drugs* (DMARDS) und der Glukokortikoide zugeordnet [108]. Zum anderen ist es möglich, mit Hilfe von monoklonalen anti-IL-6- (anti-IL-6-mAb) und anti-IL-6R-Antikörpern sowie von Rezeptor-Fusionsproteinen die Bildung eines effektiven Liganden-Rezeptor-Komplexes zu unterbinden [18, 109]. Diese blockierenden bzw. antagonistisch wirkenden Antikörper gehören zur Klasse der “Biologicals” und ihre Herstellung ist im Vergleich zu den DMARDS und NSAIDS kostenintensiver [92, 93, 110-113]. Sie stellen eine Alternative für die Behandlung von RA dar, da die Therapierung mit DMARDS und NSAIDS nicht immer erfolgreich verläuft. Im Fall von RA und JIA konnte die Wirksamkeit von anti-IL-6-mAbs in Tierversuchen und humanen Studien gezeigt werden [10, 114]. Die Arbeitsgruppe um Matsumoto belegte, dass eine Reduktion der Symptome von Glucose-6-Phosphat-Isomerase-induzierter RA im Mausmodell durch die Injektion von monoklonalen anti-IL-6-Antikörpern stattfindet [115]. Mittels einer einmaligen Gabe des IL-6R-mAb, MR16-1, in der frühen Phase von Kollagen-induzierter RA in Ratten fand eine Verbesserung der Prognose statt [116]. Außerdem konnte in einem Affenmodell nachgewiesen werden, dass die Symptome der Kollagen-induzierten RA, wie z.B. die Gelenkschäden und die Expression des C-reaktiven Proteins (CRP) durch die Behandlung mit dem anti-IL-6R-mAb, MRA, signifikant vermindert wurden [117]. Ausgehend von diesen Ergebnissen hat die Targetierung proinflammatorischer Zytokine, insbesondere von IL-6, große Bedeutung für die Entwicklung von Therapeutika zur Verbesserung des RA-Krankheitsbildes erlangt [18].

1.6. Aufgaben und Zielsetzung

Einige der ursprünglich als PEP-Inhibitoren identifizierten Heteroarylketone sind in der Lage, die autokrine IL-6-Expression in verschiedenen Zelllinien auf transkriptioneller Ebene zu hemmen. Das Zytokin IL-6 spielt in einer Vielzahl von chronisch inflammatorischen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Im Fall von RA konnte die IL-6-Expression direkt mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert werden [101-103]. Für die mögliche Entwicklung eines neuen anti-inflammatorischen Therapeutikums, dessen Wirksamkeit auf der Senkung der IL-6-Sekretion beruht, war es notwendig, das IL-6-relevante Zielprotein von Heteroarylketonen zu identifizieren sowie den zugrunde liegenden molekularen Wirkmechanismus aufzuklären. Diese Untersuchungen sollten mit Hilfe eines geeigneten Modellsystems erfolgen. Aufgrund der Zielstellung ergaben sich folgende Untersuchungsschwerpunkte:

- Ausschluss des PEP-Proteins als IL-6-relevantes Zielprotein von Heteroarylketonen mit Hilfe der siRNA-Technik
- Etablierung eines geeigneten Zellkulturmodells für die Analyse des Wirkmechanismus von Heteroarylketonen
 - Auswahl und Charakterisierung von geeigneten Stimuli der IL-6-Expression mit Hilfe der ELISA- und der qPCR-Technik
- Identifizierung des IL-6-relevanten Zielproteins von Heteroarylketonen
 - Validierung von biotinylierten Heteroarylketonen bezüglich der Inhibierung der IL-6-Expression im Modellsystem mit Hilfe der ELISA-, qPCR- und Immunzytochemie-Technik
 - Identifizierung potentieller Zielproteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2-D) und Streptavidin-spezifischem Immunoblot sowie nano LC-ESI-MS/MS
 - Validierung putativer Zielproteine mittels Immunpräzipitation (IP) und Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)
 - Charakterisierung des Einflusses des potentiellen Zielproteins von Heteroarylketonen auf die IL-6-Expression mit Hilfe der ELISA-, qPCR-, Immunoblot- und Immunzytochemie-Technik

- Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Inhibierung der IL-6-Expression durch Heteroarylketone
 - Identifizierung beteiligter Proteine der stimulierten Signalkaskade der IL-6-Expression im ausgewählten Modellsystem
 - Einfluss von Heteroarylketonen auf die Aktivierung bzw. die Phosphorylierung sowie die Lokalisation ausgewählter Mitglieder der IL-6-Signalkaskade mittels phosphospezifischen Western-Blot-Analysen, Immunzytochemie und Immunpräzipitation

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Geräte

Gerät	Hersteller/Anbieter
Blotting Apparatur	LTF, Wasserburg
Biacore (Oberflächenplasmonenresonanz)	Biacore, Uppsala, Schweden
CASY-Cellcounter	Schärfe System, Reutlingen
CCD-Kamera Spot RT SLIDER	Visitron Systems, Puchheim
CO ₂ -Inkubator MCO-17AI	Sanyo, Gunma, Japan
Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Eismaschine ZBE 30-10	Ziegra, Isernhagen
FACS-Calibur (Durchflusszytometer)	BD Biosciences, Heidelberg
Feinwaage A120S-D1	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axiovert S100	Zeiss, Jena
FPLC-System	Pharmacia Biotech, Erlangen
Gasbrenner Gasprofi 1	WLD-TEC, Göttingen
Gefriertruhe ECC-2080-5	National Lab, Mölln
Inkubationsschrank B6 FUNCTION line	Heraeus, Hanau
Kreisschüttler GFL 3005	GFL, Burgwedel
Kryobehälter GT35 und ARPEGE40	Airliquide, Marne-la-Vallee, Frankreich
Laserscanning-Mikroskop LSM510	Zeiss, Jena
Magnetrührer MR3000	Heidolph, Schwabach
Mikroskopkamera MC80DX	Zeiss, Jena
Novex Gelelektrophoresekammer	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
pH-Meter	Multilab, Berlin
Photometer SmartSpec 3000	Bio-Rad, Hertfordshire, Großbritannien
Plattenreader NOVostar	BMG Labtech GmbH, Offenburg
Plattenreader SUNRISE	Tecan, Crailsheim
Reinstwasseranlage PURELAB Plus UV	USF Seral, Ransbach-Baumbach
Rotor Gene 3000	Corbett Research, Sydney, Australien
Sicherheitswerkbank KR-125 SAFETY	Kojair, Vilppula, Finnland
Stromversorgungsgerät POWER-PAC 200	Bio-Rad, Hertfordshire, Großbritannien

und 300	
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Osterode
Überkopfschüttler	Fröbel Labortechnik, Lindau
Vortex 2 Genie	Scientific Industries, Bochemia, USA
Wasserbad F25	Julabo, Seelbach
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Zentrifuge Allegra 21R und Avanti J20	Beckman, Palo Alto, USA

2.2. Material

Verwendete Antikörper

Antikörper	Anwendung	Hersteller/Anbieter
anti-Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Antikörper (Maus, monoklonal)	ICC	Calbiochem, Darmstadt
anti-Calnexin-Antikörper (Kaninchen, polyklonal)	ICC	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
anti-Creb-Antikörper (Kaninchen, polyklonal)	WB	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
anti-eEF1A1-Antikörper (Maus, monoklonal)	WB, ICC, IP	Millipore/Upstate, Schwalbach
anti-phospho-Erk1/2-(Thr 202/Tyr 204)- Antikörper, (Kaninchen, polyklonal)	WB	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
anti-Erk1/2-Antikörper (Kaninchen, polyklonal)	WB	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
anti-Filamin A-Antikörper (Kaninchen, polyklonal)	ICC	Santa Cruz, Heidelberg
anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Ziege, polyklonal), konjugiert mit HRP	WB	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Ziege, polyklonal), konjugiert mit Rhodamin Red-X™	ICC	dianova, Hamburg
anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Ziege, polyklonal), konjugiert mit Cy2™	ICC	dianova, Hamburg

anti-Maus-IgG-Antikörper (Kaninchen, polyklonal), konjugiert mit Rhodamin Red-X™	ICC	dianova, Hamburg
anti-Maus-IgG-Antikörper (Ziege, polyklonal), konjugiert mit HRP	WB	dianova, Hamburg
anti-Maus-IgG-Antikörper (F(ab)2-Fragment; Ziege, polyklonal), konjugiert mit Cy2™	ICC	dianova, Hamburg
anti-OSMR β -Antikörper (AN-U2; Maus, monoklonal), konjugiert mit Phycoerythrin (PE)	IF	Santa Cruz BT, Heidelberg
anti-p65-Antikörper (Kaninchen, polyklonal)	IP	Santa Cruz BT, Heidelberg
anti-PEP-Antikörper (Kaninchen, polyklonal)	WB	Probiodrug AG, Halle/Saale
anti-phospho-Stat3-Antikörper (Ser 727, Kaninchen, polyklonal)	WB, ICC	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
anti-phospho-Stat3-Antikörper (Tyr 705, Kaninchen, polyklonal)	WB	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
anti-PKC δ -Antikörper (Kaninchen, polyklonal)	WB, ICC	Santa Cruz, Heidelberg
anti-Stat3-Antikörper (Kaninchen, polyklonal)	WB, ICC	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
anti-Stat3-Antikörper (Kaninchen, polyklonal)	IP	Santa Cruz BT, Heidelberg
Streptavidin, konjugiert mit Cy2™	ICC	dianova, Hamburg
Streptavidin, konjugiert mit Cy3™	ICC	dianova, Hamburg
Streptavidin, konjugiert mit HRP	WB	Sigma, Steinheim
anti-VCP1-Antikörper (Kaninchen, polyklonal)	WB	Santa Cruz, Heidelberg
anti-YY1-Antikörper (Kaninchen, polyklonal)	WB	Active Motif, Rixensart, Belgien
anti- α -Tubulin-Antikörper (Maus, monoklonal)	WB	Sigma, Steinheim
anti-gp130-Antikörper (Maus, monoklonal), konjugiert mit PE	IF	R&D Systems, Wiesbaden

anti-IgG1-Antikörper (Isotypkontrolle, Maus, monoklonal), konjugiert mit PE	IF	Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach
---	----	---------------------------------------

Oligonukleotide

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Oligonukleotide von der Fa. Metabion (Planegg) synthetisiert.

mRNA	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
eEF1A1	TCTGGTTGGAATGGTGACAA	ACGAGTTGGTGGTAGGATGC
Erk1	CCAGACCATGATCACACAGG	CTGGAAAGATGGGCCTGTTA
Erk2	Santa Cruz, Heidelberg	Santa Cruz, Heidelberg
FLNA	TCCAGCAGAACAACCTTTCACG	CGATGGACACCAGTTTGATG
G6PDH	ATCGACCACTACCTGGGCAA	TGCAGTAGGTGGTTCTGCAT
GAPDH	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	TTCTAGACGGCAGGTCAGGT
gp130	CCCAAAGTTTGCTCAAGGAG	AATTGTGCCTTGGAGGAGTG
HPRT	TGCTGACCTGCTGGATTACA	CCTGACCAAGGAAAGCAAAG
IL-6	AGTGAGGAACAAGCCAGAGC	GAGGTGCCCATGCTACATTT
OSMR	GGAATGTGCCACACACTTTG	ACATTGGTGCCTTCTTCCAC
p50	CTGGAAGCACGAATGACAGA	TGAGGTCCATCTCCTTGGTC
p65	CCTGGAGCAGGCTATCAGTC	ATCTTGAGCTCGGCAGTGTT
PEP	TGAGCAGTGTCCCATCAGAG	CATCTTCGCTGAACGCATAA
PKC δ	GAAGAAGACCGGAGTTGCTG	GTCGATCAGGACCACATCCT
Socs3	ACACTTCGGGAATGCTGAAC	GAGGAGCATGTCACCAGGAT
Stat1	TTCAGGAAGACCCAATCCAG	CCAGGCTCTTGATTTTCATGC
Stat3	TTTCACTTGGGTGGAGAAGG	TCTGGCCGACAATACTTTCC
VCP1	GCAAACGTATCCATGTGCTG	GGATCACTGTGTCTGGAGCA

Kits

Kit	Hersteller/Anbieter
Nucleo-Spin II, Kat.-Nr.: 740955.50	Macherey-Nagel, Düren
SuperSignalWestPico-Luminescence, Kat.-Nr.: 34080	Perbio, Bonn
SilverSNAP Stain II, Kat.-Nr.: 24612	Perbio, Bonn
SuperScript® II Reverse Transcriptase, Kat.-Nr.: 18064-014	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Kat.-Nr.: 204143	Qiagen, Hilden
Human IL-6 ELISA, Kat.-Nr.: CHC1263	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
PeqGold 1 kb, Kat.-Nr.: 25-2030	Peq Lab, Erlangen
Proteinstandard für WB, Kat.-Nr.: LC5625	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Nuclear Extract Kit, Kat.-Nr.: 40010	Active Motif, Rixensart, Belgien

Zellkultivierung

Lösungen	Hersteller/Anbieter
Rinderserum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Trypsin	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
PBS	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Gentamycin	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
CASYton	Schärfe System, Reutlingen

Puffer und Lösungen

Puffer	Komponenten und pH-Wert
TBE	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 7,4
TBS	10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5
TBS-Tween-20	10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 7,5
Lysepuffer (WB)	Kat.-Nr.: FNN0011, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe Zusatz von 1 mM AEBSF und 1 Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim)

Anode 1	0,3 M Tris, 20 % MeOH (v/v), pH 10,4
Anode 2	25 mM Tris, 20 % MeOH (v/v), pH 10,4
Kathode	25 mM Tris, 5,25 g ϵ -Aminocapronsäure, 20 % MeOH (v/v), pH 9,4
Ladepuffer (DNA-Gele)	60 % Glycerol, 0,25 % Bromphenolblau
Laufpuffer (WB)	Kat.-Nr.: NP 0002, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Antioxidanz (WB)	Kat.-Nr.: NP 0005, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Probenpuffer (WB)	Kat.-Nr.: NP 0007, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Detergenz (WB)	Kat.-Nr.: NP 0009, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
PEP-Messpuffer Nr.1	270 mM HEPES, 1080 mM NaCl, 5,4 mM EDTA, 0,03 % Brij (30 - 35 %), pH 7,6
PEP-Messpuffer Nr.2	5,4 mM DTT, pH 7,6
Waschpuffer (IL-6 Elisa)	9,0 g NaCl, 1,0 ml Tween-20 ad 1,0 l, pH 7,4
Coomassie-Färbelösung	1,0 g Coomassie Brilliant Blue G250 [®] in 200 ml Methanol/A. dest. (1:1), 20 ml Essigsäure
Entfärbelösung	10 % Essigsäure in A. dest.
siRNA-Puffer	Qiagen, Hilden (wird nicht mehr hergestellt)
Dialyse-Puffer	10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005 % Tween-20, pH 7,4

Sonstige Chemikalien

Substanz	Hersteller/Anbieter
Agarose	PeqLab, Erlangen
<i>SP Sepharose High Performance</i>	GE Healthcare, Freiburg
Bradfordreagenz	Sigma, Steinheim
<i>Bovine Serum Albumin (BSA)</i>	Sigma, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Dynabeads M-280 Streptavidin	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Dynabeads Protein G	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
Mercaptoethanol	Lancaster, Morecambe, Großbritannien
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth, Karlsruhe
Oligo (dT)-Primer	Roche, Mannheim
Natriumorthovanadat	Sigma, Steinheim
PBS	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Saponin	Sigma, Steinheim
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween-20	Sigma, Steinheim
Trockenmilchpulver	Roth, Karlsruhe

Alle weiteren gebräuchlichen Chemikalien wurden von der Fa. Roth (Karlsruhe) bezogen.

Stimuli der IL-6-Sekretion

Substanz	SL	c im Ansatz	gelöst in	Anbieter
Phorbol-Myristat-Acetat (PMA)	100 mM	100 nM	DMSO	Sigma, Steinheim
Forskolin	1 mM	10 µM	DMSO	Calbiochem, Darmstadt
<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (GM-CSF)	200 µg/ml	50 ng/ml	A. dest.	Peptotech, Hamburg
Interferon γ (IFN γ)	100 µg/ml	100 ng/ml	PBS	Peptotech, Hamburg
Interleukin-1 β (IL-1 β)	100 µg/ml	100 ng/ml	A. dest.	Peptotech, Hamburg
Isopreteronol	100 mg/ml	10 µM	A. dest.	Sigma, Steinheim
Lipopolysaccharid (LPS)	5 mg/ml	1 µg/ml	PBS	Sigma, Steinheim
Oncostatin M (OSM)	10 µg/ml	100 ng/ml	A. dest.	Peptotech, Hamburg
Staurosporin (STS)	1 mM	10 nM	DMSO	Peptotech, Hamburg
Tumornekrosefaktor- α (TNF α)	20 µg/ml	200 ng/ml	A. dest.	Peptotech, Hamburg

Interleukin-13 (IL-13)	10 µg/ml	100 ng/ml	A. dest.	Peprotech, Hamburg
Interleukin-17 (IL-17)	10 µg/ml	100 ng/ml	A. dest.	Peprotech, Hamburg
Interleukin-4 (IL-4)	10 µg/ml	100 ng/ml	A. dest.	Peprotech, Hamburg
<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i> (MCP-1)	100 µg/ml	100 ng/ml	A. dest.	Peprotech, Hamburg
Pacap	200 µM	1 µM	5 % Essigsäure	Calbiochem, Darmstadt
Prostaglandin 1 (PGE1)	10 mM	100 nM	Ethanol	Sigma, Steinheim
Prostaglandin 2 (PGE2)	10 mM	100 nM	Ethanol	Sigma, Steinheim
Substanz P	500 µM	500 nM	1 N Essigsäure	Bachem, Weil am Rhein
Z-Gly-Pro-AMC	10 mM	30 µM	DMSO	Bachem, Weil am Rhein

Inhibitoren

Für die Synthese der Inhibitoren (Probiodrug AG) wurden jeweils die L-Konfigurationen der Aminosäuren verwendet.

Inhibitor	c / gelöst in	c im Ansatz	Anbieter
PP168	10 mM in DMSO	20 µM	Probiodrug AG, Halle/Saale
PP192	10 mM in DMSO	20 µM	Probiodrug AG, Halle/Saale
PP197	10 mM in DMSO	20 µM	Probiodrug AG, Halle/Saale
PP167	10 mM in DMSO	20 µM	Probiodrug AG, Halle/Saale
PP193	10 mM in DMSO	20 µM	Probiodrug AG, Halle/Saale
PP195	10 mM in DMSO	20 µM	Probiodrug AG, Halle/Saale
PP196	10 mM in DMSO	20 µM	Probiodrug AG, Halle/Saale
PP207	10 mM in DMSO	20 µM	Probiodrug AG, Halle/Saale
PP204	10 mM in DMSO	20 µM	Probiodrug AG, Halle/Saale
PP254	10 mM in DMSO	20 µM	Probiodrug AG, Halle/Saale
PP271	10 mM in DMSO	20 µM	Probiodrug AG, Halle/Saale
PP253	10 mM in DMSO	20 µM	Probiodrug AG, Halle/Saale
PP200	10 mM in DMSO	20 µM	Probiodrug AG, Halle/Saale
PP199	10 mM in DMSO	20 µM	Probiodrug AG, Halle/Saale

PP301	10 mM in DMSO	40 μ M	Probiodrug AG, Halle/Saale
PP310	10 mM in DMSO	40 μ M	Probiodrug AG, Halle/Saale
U0126	10 mM in DMSO	10 μ M	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
Actinomycin D	1 mg/ml in DMSO	10 μ g/ml	Sigma, Steinheim
Fmoc-Ala-Pyrr-CN	10 mM in DMSO	10 μ M	Probiodrug AG, Halle/Saale
AEBSF	1 M in A. dest.	1 mM	Roth, Karlsruhe
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Tablettenform	1 Tabl./5 ml	Roche, Mannheim

Proteine

Protein	Katalognummer	c im Ansatz/Aktiv.	Anbieter
Filamin A (FLNA, rekombinant)	H00002316-P01	1,35 μ M	tebu-bio, Offenbach
<i>Valosin containing Protein</i> (VCP1, rekombinant)	H00007415-P01	2,92 μ M	tebu-bio, Offenbach
rekombinante PEP	-	3 mU/mg	Probiodrug AG, Halle/Saale

siRNA

Alle siRNAs, außer die Non-Target-Kontrolle, wurden von der Fa. Santa Cruz (Heidelberg) erworben. Die verwendeten siRNAs waren gegen die mRNA folgender Proteine gerichtet: PEP, p50, p65, OSMR, gp130, Erk1, Erk2, Stat1, Stat3, Socs3, PKC δ und eEF1A1. Die siRNA, welche keine Homologie zu codierenden Sequenzen im humanen Genom besitzt, (Non-Target-Kontrolle; NTK) wurde von der Fa. Dharmacon (Karlsruhe) hergestellt.

2.3. Methoden

2.3.1. Kultivierung und Lagerung von Zellen

Die Kultivierung der humanen Karzinomzelllinie MG-U343 fand in Inkubatoren bei 37 °C und 5 % CO₂ statt (Sanyo, Japan). Das verwendete Medium enthielt 10 % Kälberserum und 60 μ g/ml Gentamycin. Zur Kultivierung wurden Gewebekulturflaschen unterschiedlicher Größen verwendet (Greiner, Frickenhausen). Das Ablösen der Zellen und die darauf folgende Passagierung der Zelllinien in neue Kulturgefäße erfolgte jeweils montags und freitags. Dafür wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums einmalig in warmen PBS gewaschen und

anschließend mittels Trypsin-Lösung in 4 Minuten von der Wachstumsunterlage gelöst. Danach erfolgte ein Abstoppen der Reaktion mit serumhaltigem Medium und die Überführung der Zellsuspension in 50 ml PP-Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen). Diese wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur und 300 x g zentrifugiert. Nach der Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in serumhaltigem Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension 1:10 verdünnt. Anschließend erfolgte die Einsaat mit einer definierten Zellzahl. Für die Langzeitlagerung wurden 8×10^5 Zellen/ml in FBS mit 10 % DMSO schrittweise bis zu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt (ca. $1\text{ }^{\circ}\text{C/h}$) und dann in flüssigem Stickstoff endgelagert.

2.3.2. Isolation von Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien

Die Isolation von Gesamt-RNA der Zellkulturen erfolgte mit Hilfe des Nucleospin RNAII „Kits“ (Macherey-Nagel, Düren). Zur Vorbereitung der Extraktion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, anschließend mit Extraktionspuffer RAI extrahiert und entsprechend dem Protokoll mit 1 % Mercaptoethanol versetzt. Die weitere Durchführung erfolgte wie vom Hersteller beschrieben. Anschließend wurde die RNA mit 40 μl sterilem und RNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA fand spektrophotometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm statt. Die Lagerung der Gesamt-RNA erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.3. cDNA-Synthese

Die Generierung der cDNA aus der isolierten Gesamt-RNA (Kap. 2.3.2.) erfolgte mit Hilfe der *SuperScript® II Reversen Transcriptase* (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe) unter Verwendung von „random“ Oligonukleotiden und dNTPs. Es wurde jeweils 1 μg der RNA nach dem Protokoll des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Die Durchführung fand mit Hilfe des Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Cambridge, Großbritannien) statt.

2.3.4. Quantitative PCR

Die Durchführung der quantitativen PCR erfolgte mit Hilfe des *QuantiTect SYBR Green PCR Kits* der Fa. Qiagen (Hilden) nach dem Herstellerprotokoll. Eine PCR-Reaktion umfasste maximal 45 Reaktionszyklen. Im Anschluss an die Reaktionen der qPCR wurden Schmelzkurven der PCR-Produkte erstellt. Dafür wurde die Temperatur nach Abschluss der gesamten PCR-Reaktionen schrittweise um jeweils $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Temperaturbereich von 60

bis 99 °C erhöht. In Abhängigkeit der Basen im jeweiligen Gen werden die Doppelstränge zu einer bestimmten Temperatur in Einzelstränge getrennt und dann deren Fluoreszenzintensität detektiert (Rotor Gene 3000, Corbett Research, Sydney, Australien). Werden unterschiedliche Schmelzkurven in einer Probe detektiert, so deutet dies auf die Amplifikation mehrerer Gene hin und ist ein Zeichen für einen unspezifischen Primer. In diesen Fällen wurde ein neues Primerpaar auf die Eignung in der qPCR-Technik getestet. Die Auswertung der qPCR-Reaktionen erfolgte komparativ mit der Rotor Gene 6 Software (LFT, Wasserburg), wobei die jeweilige Kontrolle 100 % gesetzt wurde.

2.3.5. Agarosegelelektrophorese

Für die Agarosegelelektrophorese wurden Gele mit einem Anteil von 2 % Agarose verwendet. Nach Aufkochen der Agarose in TBE-Puffer wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugegeben. Als Elektrophoresepuffer diente TBE. Je 8 µl des PCR-Produkts aus den Reaktionen der qPCR (siehe Kap. 2.3.4.) wurden mit 2 µl Probenpuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V in horizontalen Elektrophoresekammern (Bio-Rad, Hertfordshire, Großbritannien) durchgeführt. Zur Identifizierung der DNA wurde parallel ein Größenstandard auf das Gel aufgetragen.

2.3.6. Messung der Aktivität von Prolylendopeptidase-Inhibitoren und IC₅₀-Bestimmung

Die PEP-Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 10 mM in 100 % DMSO gelöst und dann graduell verdünnt. Die Bestimmung der Inhibierung der PEP-Aktivität erfolgte mit Hilfe des fluorogenen Substrates Z-Gly-Pro-AMC. Es wurde eine kontinuierliche Messung des Substratumsatzes über einen Zeitraum von 22 Minuten folgendes Reaktionsansatzes (dreifache Bestimmung) bei 380/460 nm mit Hilfe des Spektralfluorometers NOVOSTAR durchgeführt (Mikrotiterplatte: NUNC F96 Microwell96 Platte):

- 100 µl Inhibitorlösung (in DMSO) bzw. Blank (H₂O, H₂O-DMSO-Gemisch)
- 100 µl Messpuffer (PEP-Messpuffer Nr. 1 + 2 in gleichen Teilen mischen)
- 20 µl rekombinante PEP in PEP-Puffer
→ Inkubation 15 Minuten bei 30 °C

- 50 µl Z-Gly-Pro-AMC (in DMSO)
→ Messung

Die Auswertung der erhaltenen Datensätze erfolgte mit Hilfe der zum Gerät dazugehörigen Software. Aus der Anfangsgeschwindigkeit des Substratumsatzes durch PEP und der Geschwindigkeit nach Inhibitorgabe wurde die prozentuale Restaktivität von PEP ermittelt. Die Restaktivität wurde gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen. Die Berechnung des IC₅₀-Wertes fand mit Hilfe des Software-Programmes „Prism 4 Graphpad“ durch nichtlineare Regressionsanalyse statt (Fa. Statcon, Witzenhausen).

2.3.7. Small interfering RNA (siRNA)

Das Prinzip der RNA-Interferenz beruht auf dem Abbau von mRNA durch den Einsatz von kurzen, doppelsträngigen RNA-Molekülen, den sogenannten small interfering RNAs (siRNA). Diese binden an die jeweilige mRNA des Zielgens durch die Erkennung einer definierten Sequenz und verursachen so die katalytische Spaltung der mRNA. Somit unterbleibt die Translation dieses Gens und das Protein wird nicht exprimiert. Der Vorgang ist selbstverstärkend und etwa 1000mal effektiver als z.B. eine Antisense-Strategie.

Die in dieser Arbeit verwendete siRNA wurde kommerziell von der Fa. SantaCruz (Heidelberg) erworben. Als unspezifische Kontrolle für siRNA-Transfektionen wurde eine siRNA ohne Homologien zu bekannten Genen (Non-Target) und als unbehandelte Kontrolle DMEM mit Transfektionsreagenz verwendet.

Zunächst wurden 25 µl einer 2 µM siRNA-Lösung mit 25 µl DMEM gemischt. In einem weiteren Reaktionsgefäß erfolgte die Zugabe von je 1 µl Transfektionsreagenz *DharmaFECT1* (Dharmacon, Karlsruhe) zu 49 µl DMEM. Nach der Inkubation beider Ansätze für 5 Minuten bei RT, wurden diese gemischt und 20 Minuten gemeinsam inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte die Passagierung und darauffolgende Einsaat von je 2,5 x 10⁵ U343 Zellen/Kavität in 24-well Mikrotiterplatten. Zu den Zellen wurden 100 µl des Transfektionsgemisches gegeben und die Kavität mit 10 % FBS-haltigem DMEM auf 500 µl aufgefüllt. Nach 48 Stunden erfolgte eine erneute Transfektion der Zellen wie oben beschrieben. Sowohl die Stimulierung der Zellen als auch die Zugabe von Inhibitoren fand nach weiteren 24 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ statt.

Die herunterregulierenden Effekte der siRNAs wurden mittels quantitativer PCR- und Western-Blot-Analyse validiert.

2.3.8. Reinigung des Zielproteins eEF1A1

Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie oben beschrieben in 175 cm² und 300 cm² Zellkulturflaschen. Nach der Ablösung mit Trypsin wurden die Zellen einmal mit PBS/Natriumorthovanadat gewaschen und mit dreimaliger Frost-Tau-Lyse extrahiert. Vor dem letzten Einfrieren der Zellen wurden diese mit 500 µl/20 x 10⁶ PBS mit 1 mM AEBSF und einer Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche)/5 ml resuspendiert. Dann erfolgte die Zentrifugation der Extrakte für 20 Minuten bei 4 °C und 15300 g. Die Überstände wurden gesammelt und mit Hilfe der FPLC-Methode gereinigt. Dafür wurde eine 8 cm³ SP-Sepharose-Säule als Kationenaustauscher und 10 mM Hepes pH 8,0 als Puffer A verwendet. Puffer B enthielt zusätzlich 1 M NaCl. Die Säule wurde zunächst mit 2 M NaCl gespült, um evtl. gebundene Proteine abzuwaschen, anschließend erfolgte die Equilibrierung mit Puffer A. Dem Auftrag der Probe folgend fand ein Waschschriff mit 20 ml Puffer A statt. Dann erfolgte die graduelle Zugabe von Puffer B bis 100 % in 50 ml statt. Zur Kontrolle der 1,5 ml Fraktionen wurden jeweils 10 µg Totalprotein per Immunoblot und Blaugel analysiert. Die Proteingehalte der Fraktionen wurden mit Hilfe der Bradfordmethode in 96-well Mikrotiterplatten mit je 10 µl Probe und 250 µl Bradfordreagenz bestimmt. Für die Verwendung des Proteins bei der Oberflächenplasmonenresonanz fand eine Einengung der entsprechenden Fraktionen auf 10 % des Originalvolumens mit Hilfe von 10 kDa *Cut-Off* Konzentratoren (Vivaspin 2 und VS500; Sartorius, Göttingen) bei 4 °C und 4000 g statt. Die gewonnenen Extrakte wurden im Blaugel densitometrisch ausgewertet und die erhaltenen Konzentrationen von eEF1A1 für die Berechnung der Dissoziationskonstante eingesetzt.

Ingesamt wurden ca. 1,5 Milliarden MG-U343 Zellen verwendet. Nach Abschluss der Reinigung standen für die weiteren Untersuchungen etwa 1,2 mg eEF1A1 zur Verfügung.

2.3.9. Oberflächenplasmonenresonanz

Für die Oberflächenplasmonenresonanz wurde ein Streptavidin Chip (Sensor Chip SA; Kat.-Nr.: BR-1003-98) der Fa. Biacore (Uppsala, Schweden) verwendet, auf den die biotinylierten Inhibitoren PP301 und die Negativkontrolle PP310 gekoppelt wurden. Auf dem Chip wurden die Flusszellen bis zu einer Absättigung (~ 200 - 220 Response Units (RUs)) beladen. Dabei bindet das Biotin des Inhibitors an das Streptavidin auf der Chipoberfläche. Eine 10 mM Stammlösung der Inhibitoren wurde im Versuch 1: 10000 (1 µM) in Dialysepuffer verdünnt. Anschließend wurde das isolierte dialysierte Protein eEF1A1 in einer Konzentration von

5,77 μM zugegeben. Die Datenaufzeichnung und Berechnung der K_d erfolgte über die Software der Fa. Biacore (Uppsala, Schweden).

2.3.10. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradfordreagenz entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die Messung der Absorption bei 595 nm wurde mit Hilfe des Photometers SmartSpec 3000 (Fa. Bio-Rad, Hertfordshire, Großbritannien) durchgeführt. Die als Berechnungsgrundlage für die Proteinkonzentration benötigte Eichkurve wurde mittels BSA-Verdünnungsreihe vom systeminternen Programm des Photometers SmartSpec 3000 berechnet.

2.3.11. Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE)

Die 2-DE wurde von Dr. K. Lehmann in der Fa. Proteome Factory (Berlin) entsprechend dem nachstehendem Protokoll durchgeführt.

Der mit PP301- bzw. PP310-behandelte Zellextrakt wurde mit Harnstoff, Thioharnstoff, Ampholyten sowie DTT versetzt, so dass folgende Endkonzentrationen vorlagen: 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % Ampholyte, 70 mM DTT. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe für 30 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Die zweidimensionale Analyse wurde nach dem Protokoll der Fa. Proteome Factory (Berlin) durchgeführt, dabei erfolgte die Herstellung von zwei identischen Gelen, von denen eins geblottet wurde. Die Proteine des anderen Gels wurden durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht. Für die erste Dimension wurden bis zu 30 μg Protein auf das 8 cm lange IEF-Gel aufgetragen (9 M Harnstoff, 4 % Acrylamid, 0.3 % PDA, 5 % Glycerin, 0.06 % TEMED, 2 % Ampholyte, (pH 2 - 11) und 0.02 % APS). Die isoelektrische Fokussierung erfolgte mit 1841 Vh. Nach der Fokussierung wurden die IEF-Gele für 10 Minuten in Inkubationspuffer (125 mM Tris-phosphat (pH 6.8), 40 % Glycerin, 65 mM DTT, 3 % SDS) equilibriert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Für die zweite Dimension wurden 15 % ige SDS Polyacrylamidgele (375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 15 % Acrylamide, 0.2 % Bisacrylamid, 0.1 % SDS, 0.03 % TEMED, 0.02 % APS) hergestellt (0,1 x 7 x 8 cm). Die equilibrierten IEF-Gele wurden aufgetaut, direkt auf das SDS-Gel aufgebracht und mit 0,5 % Agarose überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V und 30 mA für 1 Stunde und 15 Minuten.

Die Western-Blot-Analyse des zweidimensionalen Gels wurde mit folgenden Bedingungen und Lösungen durchgeführt:

Blotpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS; 20 % Methanol; pH 8,3
Blot-Apparatur	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, Hertfordshire, Großbritannien, Kat.-Nr.: 170-3940)
Membran	Immobilon-P Membran aus PVDF; 0,45 µm (Millipore, Schwalbach, Kat.-Nr.: IPVH 07850)
Stromstärke	40 mA konstant (entspricht 1 mA/cm ² Membran)
Spannung	80 V
Dauer	2 Stunden
Temperatur	4 °C

Die Immunfärbung des Blots erfolgte wie in Kap. 2.3.21. beschrieben.

Die Proteinidentifikation wurde mittels nano LC-ESI-MS/MS durchgeführt. Das System besteht aus einer *Agilent 1100 nanoLC* (Agilent, Waldbronn), dem *PicoTip Emitter* (New Objective, Woburn, MA, USA) und einer *Esquire 3000 plus ion trap MS* (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Die Proteinspots wurden mit Trypsin (Promega, Mannheim) in-Gel verdaut und auf die nano LC-ESI-MS/MS gegeben. Dabei erfolgte nach der 5 minütigen Aufkonzentrierung und Entsalzung der Peptide mit einer Anreicherungsäule (Zorbax SB C18 0,3 x 5 mm; Agilent, Waldbronn) mit 1 % Acetonitril/0,1 % Ameisensäure, die Auftrennung der Peptide über eine Zorbax-300 SB C18-Säule (75 µm x 150 mm; Agilent, Waldbronn) mit einem Gradienten von 5 % Acetonitril/0,1 % Ameisensäure zu 40 % Acetonitril/0,1 % Ameisensäure über 40 Minuten. Die MS-Spektren wurden unter den Standardeinstellungen von Bruker automatisch von der *Esquire 3000 plus* analysiert. Die Proteinidentifikation erfolgte mittels einer Mascot Suche mit dem MS/MS *Ion search* (Matrix Science, London) und der NCBI-Proteindatenbank (*National Center for Biotechnology Information*, Bethesda, MD, USA).

2.3.12. Dialyse

Für die Methode der Oberflächenplasmonenresonanz mussten die jeweiligen putativen Zielproteine der Heteroarylketone dialysiert werden. Insgesamt wurde je 1 ml der Proteinprobe in 1 l Puffer über Nacht bei 4 °C dialysiert. Dafür wurde die Probe in einen

Dialyseschlauch (*Spectra/Por Dialysis membrane # 132650*; Spectrum Laboratories, Inc., CA, USA; MCO 6 – 8 kDa) überführt.

2.3.13. Immunzytochemie

Zur Immunzytochemie-Markierung erfolgte die Kultivierung von 1×10^5 humanen MG-U343 Gliomazellen für 24 Stunden auf 22 x 22 mm-Deckgläsern (Roth, Karlsruhe). Nach der Transfektion, der Stimulation bzw. der Inhibitor-Behandlung der Zellen wurden diese 2 mal mit eiskaltem 0,2 g/ml Natriumorthovanadat/PBS gewaschen, um eventuelle Phosphatreste zu konservieren. Die Fixierung der Zellen erfolgte anschließend, je nach verwendetem Antikörper, für 20 Minuten mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd oder für 10 Minuten mit Methanol. Nach dem dreimaligen Waschen der Zellen für je 10 Minuten mit PBS fand die Inkubation mit den primären und sekundären Antikörpern für je 1 Stunde bei RT statt. Beide Antikörper wurden in 0,01 % Saponin/PBS (w/v) verdünnt. Zum Entfernen von überschüssigen Mengen der Antikörper wurden die Zellen 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die mit den immunmarkierten Zellen bewachsenen Deckgläser wurden mit Hilfe der Einbettungslösung Citifluor (Plano, Wetzlar) und handelsüblichem Nagellack auf Objektträgern (Roth, Karlsruhe) fixiert. Die Nukleinsäure-Markierung mit DAPI wurde nach dem detaillierten Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.3.14. Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurden jeweils $2,5 \times 10^5$ MG-U343 Gliomazellen mit 625 µl Vollmedium in eine Kavität einer 24-well Mikrotiterplatte eingesät und 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dann erfolgte die Behandlung der Proben mit 20 µM Heteroarylketon oder der entsprechenden Konzentration von DMSO sowie die Stimulation für einen Zeitraum von 6 Stunden mit 100 µl/ml OSM in DMEM ohne Serum und die Ablösung der Zellen mit Hilfe von 250 µl Accutase bei 37 °C für 10 Minuten. Die Zellen wurden mit 1 ml PBS abgespült und nach 5-minütiger Pelletierung bei 300 g in je 190 µl kaltem PBS/3 % FBS resuspendiert. Die Markierung von je 90 µl Zellsuspension mit 10 µl Antikörper bzw. der Isotypkontrolle fand für 30 Minuten bei 4 °C statt. Nach zwei Waschschritten mit je 1 ml PBS wurden die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen und am Durchflusszytometer „FACS-Calibur“ die Fluoreszenz der markierten Zellen gemessen. Dabei diente die Isotyp-Kontrolle als Standard für alle lebenden bzw. nicht reaktiven OSMR- und gp130-Zellen.

2.3.15. Humanspezifischer IL-6-ELISA

Der verwendete ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) beruht auf dem Prinzip eines „sandwich“-ELISA. Dafür wurde der Kit *Human IL-6 ELISA* der Fa. Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe) verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die Fluoreszenzmessung fand am Plattenreader SUNRISE statt. Eine mitgeführte Standardkurve ermöglichte die Ermittlung der absoluten Werte des sekretierten IL-6-Proteins im Zellkulturüberstand. Die Ergebnisse wurden mit der Software „Prism 4 Graphpad“ ausgewertet (Fa. Statcon, Witzenhausen).

2.3.16. Immunpräzipitation

Das Prinzip der Immunpräzipitation beruht auf der Interaktion zwischen Antigen und Antikörper. In den durchgeführten Experimenten wurde die Präzipitation außerdem durch die Bindung von Streptavidin an Biotin bewerkstelligt.

Für die Immunpräzipitation erfolgte die Einsaat von 4×10^6 MG-U343 Zellen in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 6 cm. Nach 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen 6 Stunden mit OSM und den jeweiligen Inhibitoren inkubiert. Anschließend fand das zweimalige Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS/Natrium-orthovanadat (0,2 g/l) und die Extraktion mit Lysepuffer statt. Nach der Messung des Proteingehaltes mit der Bradfordmethode wurden 200 - 300 mg Totalprotein mit 2 µg Antikörper in einem Volumen von 500 µl über Nacht bei 4 °C immunpräzipitiert. Bei Bedarf wurden die Proben dafür mit PBS versetzt. Dann wurden die Immunpräzipitationen mit 20 µl Protein G Magnetic-Beads oder Streptavidin-gekoppelten Beads für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert und 3 mal mit je 600 µl PBS gewaschen. Die Abnahme der Überstände erfolgte am Magnetständer. Die Beads wurden in 32 µl Ladepuffer resuspendiert und 10 Minuten bei 90 °C inkubiert, um gebundene Proteine zu denaturieren. Zum Abschluss fand die größenspezifische Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese und die Detektion via Western-Blot-Analyse statt.

2.3.17. Blaugel

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel 5 Minuten mit Wasser unter Schütteln gewaschen und anschließend für 15 Minuten in einer Coomassie-Färbelösung inkubiert. Das Entfärben erfolgte unter Schütteln und mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung.

2.3.18. Silbergel

Die Detektion von Proteinen im Gel erfolgte mit Silber. Dafür wurde der Kit *SilverSNAP Stain II* der Fa. Perbio (Bonn) entsprechend den Anweisungen des Herstellers angewandt.

2.3.19. Actinomycin D-Behandlung

Für die Untersuchung zum IL-6-mRNA-Abbau musste die Neusynthese der mRNA intrazellulär unterbunden werden. Hierfür wurde Actinomycin D angewandt. Nach der Einsaat und der Anheftung von $2,5 \times 10^6$ MG-U343 Gliomazellen in 24-well Mikrotiterplatten erfolgte die Stimulation der Zellen mit 100 ng/ml OSM für 6 Stunden. Anschließend wurde eine Lösung aus 10 µg/ml Actinomycin D und 20 µM Inhibitor bzw. 0,2 % DMSO und serumfreiem Medium zu den Zellen gegeben. Nach der Inkubation für definierte Zeitpunkte erfolgte die Extraktion der Zellen und die Isolation der RNA für qPCR-Experimente.

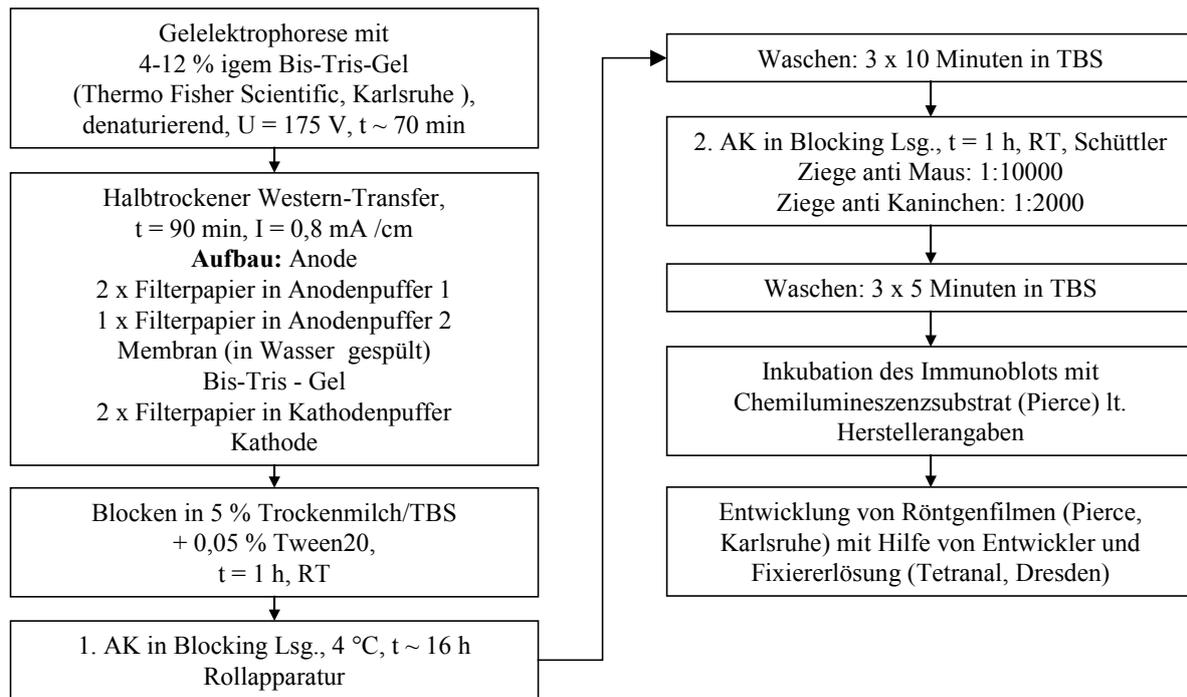
2.3.20. Herstellung von Zellextrakten

Für die Western-Blot-Analysen wurden je nach Versuch Kern- und Zytoplasmaextrakte oder Ganzzellextrakte mit allen löslichen Proteinen verwendet. Der Zellaufschluss behandelter MG-U343 Gliomazellen erfolgte dabei entweder mit Lysepuffer der Fa. Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe) oder mit dem *Nuclear Extract Kit* der Fa. Active Motif (Rixensart, Belgien) nach Herstellerangaben.

2.3.21. Immunoblotting

Die Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen und die Methode des Immunoblottings sind weitverbreitete Methoden, um Proteine separiert und spezifisch darzustellen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diese u.a. verwendet, um den Phosphorylierungsstatus sowie Interaktionen zwischen Proteinen zu zeigen.

Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und die Liste der Antikörper befindet sich in Kapitel 2.2. Die Arbeitsschritte zur Anfertigung eines Immunoblots sind in der Abbildung 2.1. schematisch dargestellt.



2.1. Schema zur Herstellung eines Immunoblots.

2.3.22. Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden die Messwerte einem unabhängigen zweiseitigen t-Test unterzogen und die Signifikanzen berechnet. Als statistisch relevant wurden die p-Werte kleiner als 0,05 (*) herangezogen. Wenn keine Signifikanz zwischen den Messgrößen der behandelten Probe und der Kontrolle vorlag, wurden die Messwerte nicht gekennzeichnet. Eine Signifikanz wird jedoch nachfolgend nur als biologisch relevant bezeichnet, wenn die Probe mindestens eine Abweichung eines Parameters um 15 % gegenüber der Kontrolle zeigt. Da in der Zellkultur mit lebenden Modellsystemen gearbeitet wird, unterliegen „typische“ Messwerte einer höheren Schwankung als Messgrößen, die mit unbelebten Systemen erhoben wurden. Differenzen der Messwerte von behandelter Probe und Kontrolle bis zu 15 % können daher als natürliche Abweichungen, bedingt durch das Modellsystem, betrachtet werden.

3. ERGEBNISSE

A. Einfluss der Prolylendopeptidase (PEP) auf die autokrine IL-6-Sekretion in humanen MG-U343 Gliomazellen

3.1. Kausalität zwischen PEP-Aktivität und IL-6-Sekretion

Die prolinspezifische Serinprotease PEP (EC 3.4.21.26) wird ubiquitär im Organismus exprimiert und liegt zusammen mit Tubulin kolokalisiert vor. Weiterhin ist bekannt, dass PEP direkt an dieses Protein bindet. Bei der Charakterisierung von PEP-antisense-Zelllinien wurde zudem eine modifizierte Sekretion des sekundären Botenstoffes Inositol-3-Phosphat nachgewiesen. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde die Involvierung dieses Enzyms im intrazellulären Transportmechanismus diskutiert [118]. Ein besonderer Aspekt fiel dabei auf die Beeinflussung der Sekretion von Chemokinen und Zytokinen. Deshalb erfolgte weiterführend die Untersuchung des Einflusses von PEP auf den sekretorischen Transport ausgewählter Proteine in MG-U343 Gliomazellen. Für diese Versuche wurde neben dem bereits bei Schulz et al. verwendeten PEP-Inhibitor Fmoc-Ala-Pyrr-CN eine weitere Substanz (PP121) aus einer neuen Klasse von PEP-Inhibitoren, den Heteroarylketonen (HAK), verwendet. Die Detektion der Proteine im Zellkulturüberstand erfolgte mit Hilfe eines humanspezifischen Multiplex-Assays („Bioplex“, Bio-Rad Laboratories, München). Durch die 24-stündige Inkubation von MG-U343 Gliomazellen mit PP121 konnte die Sekretion mehrerer Proteine modifiziert werden. Unter anderem fand die Hemmung der autokrinen IL-6-Sekretion statt (unveröffentlichte Daten, Probiodrug AG). Diese Inhibierung war jedoch nicht durch die Zugabe von Fmoc-Ala-Pyrr-CN möglich (Tab. 3.1.). Da bisher keine Kenntnisse zur Korrelation der Hemmung der PEP-Aktivität und der verringerten autokrinen IL-6-Sekretion vorlagen, wurden weitere Vertreter der Heteroarylketone unter gleichen Versuchsbedingungen bezüglich der Hemmung von PEP und der IL-6-Sekretion untersucht. Aufgrund der Lösung der Inhibitoren in 100 % DMSO erfolgte die Inkubation der Kontrollzellen mit 0,2 % DMSO im Versuchsansatz. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.1. gezeigt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde im Fall der Hemmung der Proteine durch Heteroarylketone ein grauer Hintergrund gewählt. Dabei wird deutlich, dass einige Vertreter der Klasse der Heteroarylketone entweder die PEP-Aktivität (PP192) oder die IL-6-Sekretion (PP253) inhibieren. Ebenso gibt es Vertreter der Heteroarylketone, die sowohl die Aktivität von PEP als auch die Sekretion des Zytokins IL-6 hemmen (PP168) oder keinen dieser

Effekte verursachen (PP254). Dieses Experiment sowie alle nachfolgenden Untersuchungen wurden mit MG-U343 Gliomazellen durchgeführt.

3.1. Inhibierung der PEP-Aktivität und Reduktion der IL-6-Proteinsekretion durch HAK. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit 20 μM HAK oder 0,2 % DMSO als Kontrolle in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand in % bzgl. der unbehandelten Kontrolle mittels eines hIL-6-ELISA. Die K_i -Werte der Inhibitoren bzgl. der Hemmung der PEP-Aktivität wurden *in vitro* in einem Ansatz mit rekombinanter PEP, verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren und Z-Gly-Pro-AMC (PEP-Substrat) per Fluoreszenzmessung bestimmt ($n \geq 2$).

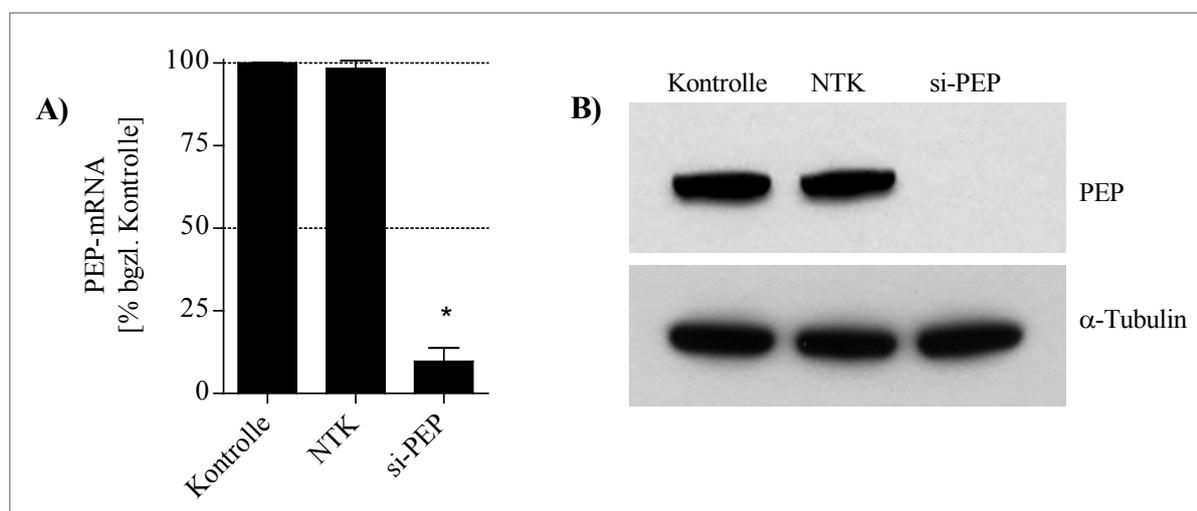
HAK-Verbindung	Effekt auf PEP-Aktivität [K_i -Wert]	verbleibende IL-6 Sekretion [% bezüglich Kontrolle \pm SD]
PP121	$4,6 * 10^{-9}$	$19,5 \pm 5,0$
Fmoc-Ala-Pyrr-CN	$7,0 * 10^{-11}$	$92,9 \pm 17,7$
PP168	$3,8 * 10^{-11}$	$32,8 \pm 13,7$
PP167	$3,8 * 10^{-11}$	$24,9 \pm 6,3$
PP193	$1,2 * 10^{-8}$	$58,8 \pm 10,0$
PP195	$8,0 * 10^{-8}$	$63,8 \pm 10,3$
PP196	$8,2 * 10^{-9}$	$18,1 \pm 2,0$
PP199	$> 2,6 * 10^{-4}$	$182,8 \pm 25,4$
PP207	$> 1,0 * 10^{-5}$	$112,8 \pm 28,0$
PP254	$> 9,5 * 10^{-6}$	$103,1 \pm 30,5$
PP271	$> 2,3 * 10^{-6}$	$79,5 \pm 13,2$
PP192	$3,2 * 10^{-9}$	$98,4 \pm 19,9$
PP197	$4,1 * 10^{-9}$	$96,5 \pm 21,1$
PP253	$4,4 * 10^{-5}$	$13,1 \pm 3,6$
PP200	$> 6,6 * 10^{-5}$	$30,0 \pm 8,4$
PP204	$> 1,0 * 10^{-5}$	$35,1 \pm 6,8$

Beim Vergleich der Daten wird deutlich, dass keine Korrelation zwischen der Wirkung von Heteroarylketonen bezüglich der Hemmung der PEP-Aktivität und der Reduktion des sekretierten IL-6-Proteins existiert. Demzufolge ist die IL-6-Sekretion in MG-U343 Gliomazellen unabhängig von der Aktivität des PEP-Proteins. Diese Daten lassen keinen Schluss auf den Einfluss von PEP bezüglich des Transports anderer Proteine zu.

3.2. Einfluss von PEP auf die autokrine IL-6-Expression

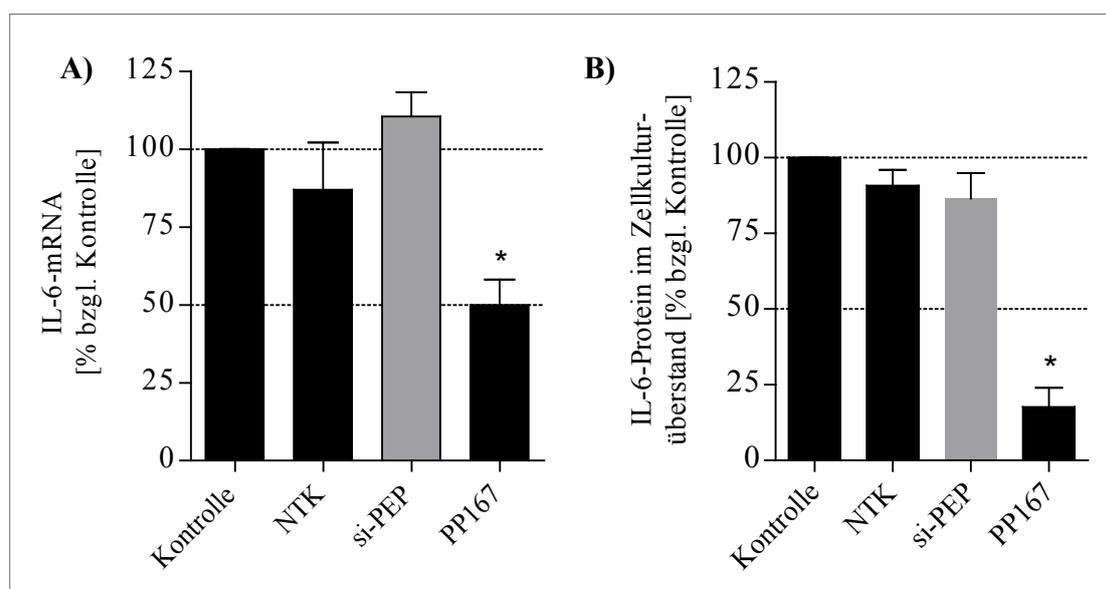
Neben der PEP-Aktivität könnte PEP *per se* als Interaktionspartner für die Komponenten der Signalkaskade, welche zur IL-6-Expression führt, von Bedeutung sein. Deshalb wurde das Protein mittels siRNA-Technik in MG-U343 Gliomazellen herunterreguliert. Die Überprüfung der siRNA-Effizienz fand sowohl auf transkriptioneller (Abb. 3.2. A) als auch auf

translationaler Ebene (Abb. 3.2. B) statt. In jedem dieser Validierungsversuche wurden zwei Kontrollen mitgeführt. Zum einen die Transfektionskontrolle, bei welcher die Zellen nur mit Transfektionsreagenz behandelt wurden (Kontrolle) und zum anderen eine Kontrolle mit einer siRNA, die keine Homologie zu codierenden Sequenzen im humanen Genom besitzt (Non-Target-Kontrolle; NTK). Nach der RNA-Extraktion erfolgte die quantitative Analyse der PEP-mRNA mit Hilfe der qPCR. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Zellen mit siRNA gegen PEP im Transfektionszeitraum von 72 Stunden zu einer Reduktion des PEP-mRNA-Gehalts um 87 % gegenüber den Kontrollzellen führt. Zur Normalisierung dieser Ergebnisse wurde die Expression der mRNA der Referenzgene Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) herangezogen. In der Western-Blot-Analyse wurden die löslichen Proteine siRNA-behandelter Zellen verwendet. Die Detektion fand mit einem spezifischen Antikörper gegen PEP statt. Zur Normalisierung wurde der Immunoblot anschließend mit einem α -Tubulin-spezifischen Antikörper markiert. Es ist ein PEP-spezifisches Signal im Fall beider Kontrollen zu sehen, welche jedoch in der Spur der siRNA-behandelten Zellextrakte fehlt. Dagegen ist α -Tubulin homogen verteilt und somit die Proteinbeladung aller Spuren identisch. Die Ergebnisse der qPCR- sowie der Western-Blot-Analysen belegen, dass die Verringerung der PEP Expression in humanen MG-U343 Zellen mit Hilfe der siRNA-Technik erfolgreich war.



3.2. Untersuchung zur Effizienz von siRNA gegen PEP mittels qPCR- und Western-Blot-Analyse. Die Zellen wurden mit spezifischer siRNA gegen PEP oder mit NTK-siRNA transfiziert. (A) Der PEP-mRNA-Gehalt wurde mittels qPCR bestimmt und mit Hilfe der Genexpression von G6PDH, GAPDH und HPRT normiert. Dargestellt ist der relative mRNA-Gehalt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Mittelwert \pm SD, n = 2). (B) Nach der Extraktion der löslichen Proteine wurden je 20 μ g des Gesamtproteins gelelektrophoretisch unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und mittels PEP-spezifischem Immunoblot analysiert. Als Referenzprotein wurde die Expression von α -Tubulin herangezogen.

Um den Einfluss von PEP als Interaktionspartner auf die IL-6-Expression zu untersuchen, wurden MG-U343 Zellen mit siRNA gegen PEP transfiziert und anschließend der IL-6-mRNA-Gehalt sowie die IL-6-Sekretion ermittelt. Als Kontrolle erfolgte die Behandlung der Zellen mit PP167 unter Transfektionsbedingungen. Die Resultate des Versuches sind in Abb. 3.3. dargestellt. Teil A zeigt die relativen IL-6-mRNA-Gehalte der PEP-siRNA- und der PP167-behandelten Zellen im Vergleich zur Transfektionskontrolle. Bei der Verwendung von spezifischer siRNA gegen PEP trat keine signifikante Veränderung der IL-6-mRNA-Gehalte auf, während im Fall der Heteroarylketon-behandelten Zellen dieser Gehalt um etwa 50 % abgesenkt wurde. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit Hilfe der Analyse der mRNA-Expression der Referenzgene GAPDH, G6PDH und HPRT. Ähnlich wie die IL-6-mRNA blieben auch die Werte der IL-6-Sekretion von der Herunterregulation des PEP-Proteins unbeeinflusst (Abb. 3.3. B). Dagegen war das Heteroarylketon PP167 in der Lage, die Konzentration des IL-6-Proteins im Zellkulturüberstand zu erniedrigen.



3.3. Einfluss von siRNA gegen PEP auf die IL-6-Expression. Die Zellen wurden mit NTK-siRNA oder siRNA gegen PEP transfiziert und anschließend mit 20 μ M PP167 bzw. 0,2 % DMSO als Kontrolle in serumfreiem Medium über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert. (A) Der IL-6-mRNA-Gehalt wurde mittels qPCR bestimmt und mit Hilfe der Genexpression von G6PDH, GAPDH und HPRT normiert. (B) Die Ermittlung der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand erfolgte mit einem hIL-6-ELISA. Dargestellt sind jeweils die relativen IL-6-mRNA- bzw. Proteingehalte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Mittelwert \pm SD, n = 3).

Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Hemmung der IL-6-Expression durch Heteroarylketone unabhängig von der Expression und der Aktivität der PEP reguliert wird. Daher haben Heteroarylketone, welche die IL-6-Sekretion spezifisch hemmen, neben der PEP mindestens ein weiteres Zielprotein, das in einer noch nicht bekannten Art und Weise an der IL-6-Genregulation beteiligt ist.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die IL-6-Proteinkonzentration in vielen Krankheitsbildern, wie z.B. RA, Meningitis, Morbus Castleman und Morbus Crohn pathologisch erhöht [70, 119]. In einer Reihe von Studien konnte eine Verbesserung von RA durch die Behandlung mit anti-IL-6 bzw. anti-IL-6-Rezeptor-Antikörpern erzielt werden [115, 120-122]. Die Senkung des pathologisch erhöhten IL-6-Spiegels durch Heteroarylketone kann somit eine wirkungsvolle Methode zur Behandlung von IL-6-korrelierten Erkrankungen darstellen. Eine notwendige Voraussetzung für die Entwicklung anti-inflammatorischer Therapeutika ist jedoch die Identifizierung des Interaktionspartners sowie des molekularen Wirkmechanismus IL-6-senkender Heteroarylketone.

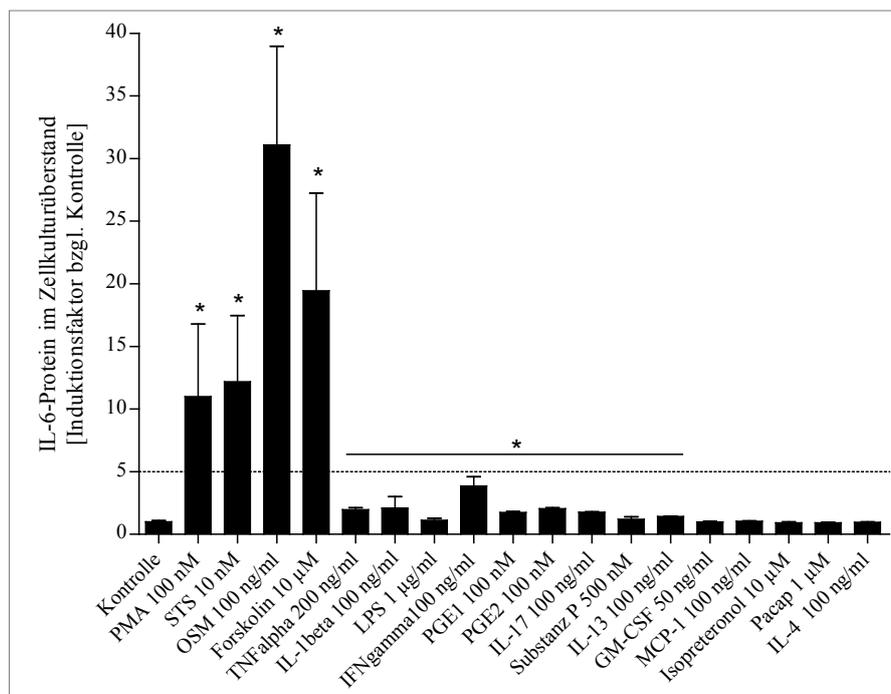
B. Etablierung eines Modellsystems zur definierten Stimulation der IL-6-Expression in humanen MG-U343 Gliomazellen

Für die Identifizierung des unbekanntes IL-6-relevanten Zielproteins von Heteroarylketonen war ein geeignetes zellbasiertes Modellsystem notwendig. Bisher wurde die autokrine IL-6-Expression von MG-U343 Gliomazellen untersucht. Der molekulare Mechanismus der zugrunde liegenden Signalkaskade und die daran beteiligten Komponenten sind nicht bekannt. Deshalb ist die autokrine IL-6-Sekretion kein zweckmäßiges Modell für die Charakterisierung der Interaktionsproteine von Heteroarylketonen sowie deren Wirkmechanismus. Im Folgenden wurde daher nach einem geeigneten Stimulus für die IL-6-Sekretion in MG-U343 Gliomazellen gesucht. Wichtige Kriterien waren dabei, dass der molekulare Signalweg des Stimulus weitgehend erforscht ist und dieser, wie die autokrine IL-6-Expression, durch Heteroarylketone beeinflusst werden kann.

3.3. Auswahl und Charakterisierung eines Stimulus der IL-6-Expression

Aus der Literatur sind verschiedene Substanzen bekannt, die in der Lage sind, die IL-6-Sekretion in kultivierten humanen Zelllinien zu erhöhen [24-26, 123-127]. Diese wurden bezüglich ihrer Wirkung auf die IL-6-Sekretion in der humanen Gliomazelllinie MG-U343 getestet. Dafür erfolgte die Inkubation der Zellen 24 Stunden in serumfreien Medium mit den ausgewählten Substanzen in den angegebenen Konzentrationen (Abb. 3.4.). Die Erhöhung des sekretierten IL-6-Proteins in den Zellkulturüberstand ist als Induktionsfaktor im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle abgebildet. In der Darstellung 3.4. ist deutlich zu sehen, dass die IL-6-Sekretion in MG-U343 Gliomazellen bei Inkubation mit 100 nM PMA und 10 nM STS um das 12-fache anstieg. Durch die Zugabe von 10 μ M Forskolin wurde die

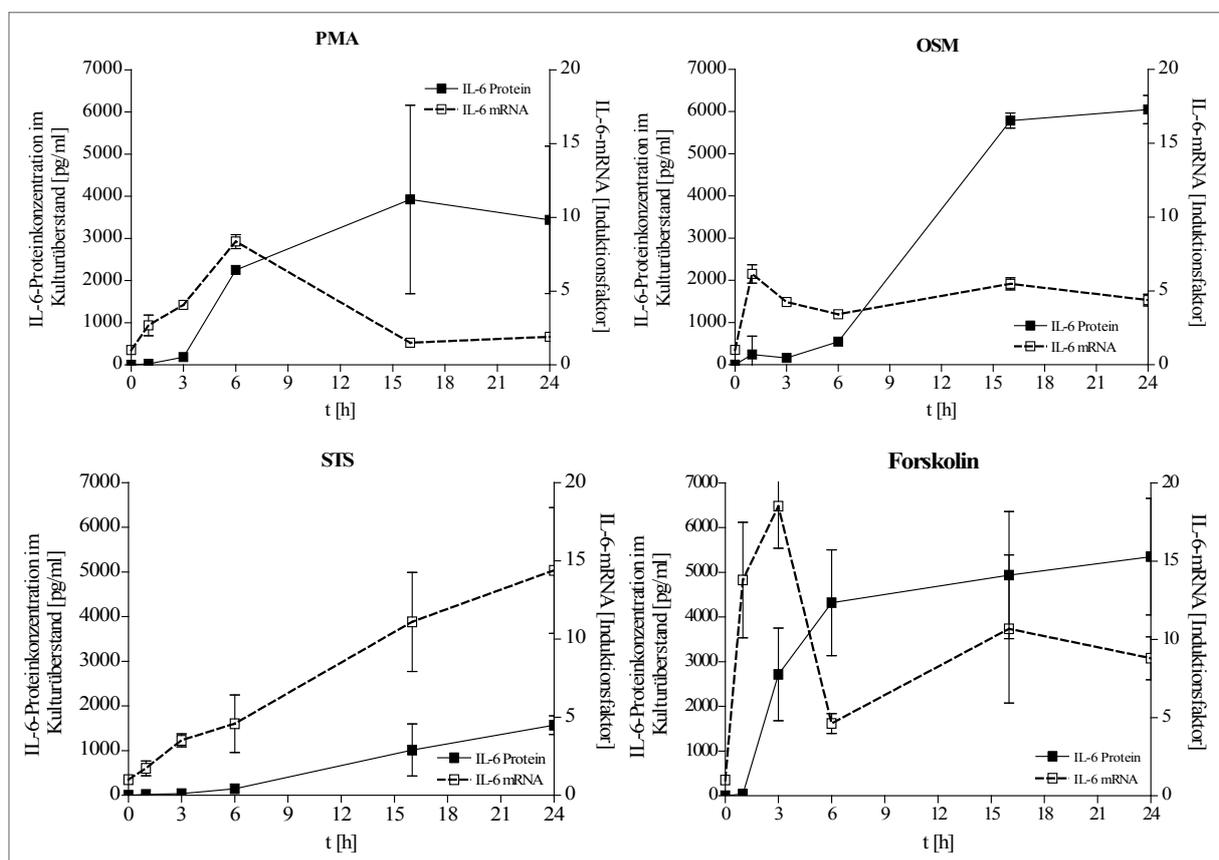
Konzentration des IL-6-Proteins im Zellkulturüberstand um das 23-fache erhöht. Der stärkste Anstieg (35-fach) gegenüber der Kontrolle fand durch Inkubation mit 100 ng/ml OSM statt. Alle anderen getesteten Substanzen veränderten die IL-6-Sekretion in MG-U343 Zellen nicht oder nur geringfügig und wurden deshalb für die Etablierung eines Zellkulturmodells als Stimulus der IL-6-Sekretion ausgeschlossen.



3.4. IL-6-Sekretion in Abhängigkeit verschiedener Substanzen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Substanzen (X-Achse) in den dort angegebenen Konzentrationen 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Danach fand die Bestimmung der Menge des sekretierten IL-6-Proteins in den Zellkulturüberstand mit einem spezifischen humanen IL-6-ELISA statt. Dargestellt sind die Induktionsfaktoren des sekretierten IL-6 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Mittelwert \pm SD, $n \geq 2$).

Aufgrund der signifikanten Erhöhung der IL-6-Sekretion durch PMA, OSM, STS und Forskolin und basierend auf Literaturkenntnissen über deren Wirkmechanismen wurden diese Stimuli für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. So ist bekannt, dass PMA die Proteinkinase C (PKC) aktiviert [128] und Forskolin ein Stimulator der Adenylyl-Zyklase ist [129]. Dagegen werden durch STS verschiedene Kinasen gehemmt, wie z.B. PKC, PKA und PKG [130, 131]. OSM bindet an den Rezeptorkomplex OSMR/gp130 und bewirkt damit die Aktivierung von Kinasen, wie Erk1/2, PKC δ und Akt sowie von den Transkriptionsfaktoren NF κ B und Stat3 [15, 132]. In den folgenden Experimenten fand die Analyse der PMA-, OSM-, STS- und Forskolin-vermittelten IL-6-Genexpression auf transkriptioneller und translationaler Ebene statt. Dabei standen die Fragen im Mittelpunkt, ob die Erhöhung der IL-6-Proteinkonzentration auf einer gesteigerten IL-6-mRNA-Synthese basiert und wie sich

diese in Abhängigkeit der Zeit verändert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.5. dargestellt. Die linke Y-Achse entspricht der absoluten IL-6-Proteinsekretion in das Zellkulturmedium (pg/ml). Die rechte Y-Achse gibt den IL-6-mRNA-Gehalt als Induktionsfaktor bezüglich der Kontrolle zum Zeitpunkt 0 an. Die Analyse der Proben fand zu den Zeitpunkten 1, 3, 6, 16 und 24 Stunden nach der Zugabe der Stimuli statt.

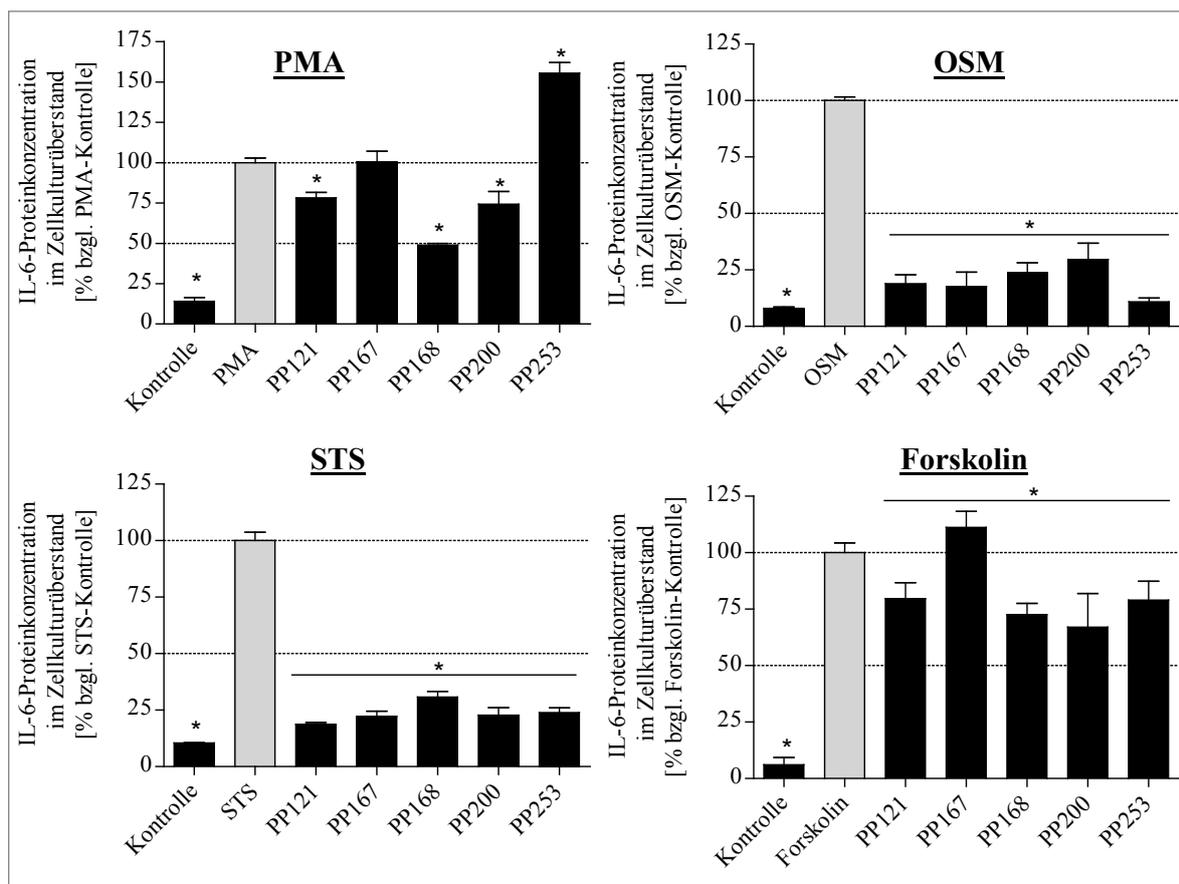


3.5. Analyse der PMA-, OSM-, STS- und Forskolin-abhängigen IL-6-Protein- und Genexpression. Die Zellen wurden mit dem jeweiligen Stimuli 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 1, 3, 6, 16 und 24 Stunden (X-Achse) wurde der Zellkulturüberstand mit einem spezifischen humanen IL-6-ELISA auf das Vorhandensein des IL-6-Proteins überprüft und die absoluten Werte \pm SD in pg/ml ermittelt (linke Y-Achse). Die Bestimmung des IL-6-mRNA-Gehalts erfolgte mittels qPCR. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SD als Induktionsfaktor im Vergleich zur Probe zum Zeitpunkt 0 Stunden (rechte Y-Achse). Zur Normalisierung wurden die mRNA-Gehalte der Referenzgene GAPDH, G6PDH und HPRT herangezogen ($n \geq 2$).

Gemeinsam war allen ausgewählten Stimuli, dass sie genau wie in der autokrinen Signalkaskade zu einer transkriptionellen Aktivierung des IL-6-Gens führen. Prinzipiell unterschied sich der Verlauf der IL-6-mRNA-Synthese jedoch. Die Expression des IL-6-Gens war im Fall von OSM und Forskolin biphasisch, d.h. einer starken Erhöhung und dem schnellen Abfall des IL-6-mRNA-Gehalts innerhalb von 3 Stunden folgte ein zweiter Anstieg der Genexpression. Dabei war die Expressionsrate der IL-6-mRNA bei der Stimulation mit OSM geringer (> 6 -fach) als die der Stimulation mit Forskolin. Bei dieser wurde der IL-6-

mRNA-Gehalt bis zu 18-fach erhöht. Demgegenüber stieg die STS-abhängige IL-6-mRNA-Synthese, ähnlich der des autokrinen Modellsystems, kontinuierlich an (vgl. [9]). Nach einem Zeitraum von 24 Stunden wurde dabei das 15-fache des IL-mRNA-Gehalts der Ausgangskonzentration erreicht. Bei der PMA-Stimulation lag der 9-fache Gehalt der IL-6-mRNA nach 6 Stunden vor, danach wurde sie abgesenkt und stagnierte bei einem Induktionsfaktor von 2. Die Konzentration des IL-6-Proteins stieg bei der Stimulation mit PMA und Forskolin innerhalb der ersten 6 Stunden stark an, während dies nicht auf die OSM- und STS-vermittelte IL-6-Sekretion zutraf. Im Fall der Stimulation mit OSM und STS wurde eine Erhöhung über 1000 pg/ml erst zum Zeitpunkt von 16 Stunden ermittelt. Die Konzentration des IL-6-Proteins im Zellkulturüberstand bei der Stimulation durch PMA, OSM und Forskolin erreichte nach 24 Stunden vergleichbare Werte um 5000 pg/ml. Im Unterschied dazu wurde bei der STS-Stimulation, trotz der sehr starken Synthese der IL-6-mRNA, nur eine IL-6-Proteinkonzentration von 1500 pg/ml erreicht, was etwa einem Viertel der IL-6-Proteinkonzentration der Stimulationen mit OSM, PMA oder Forskolin entsprach.

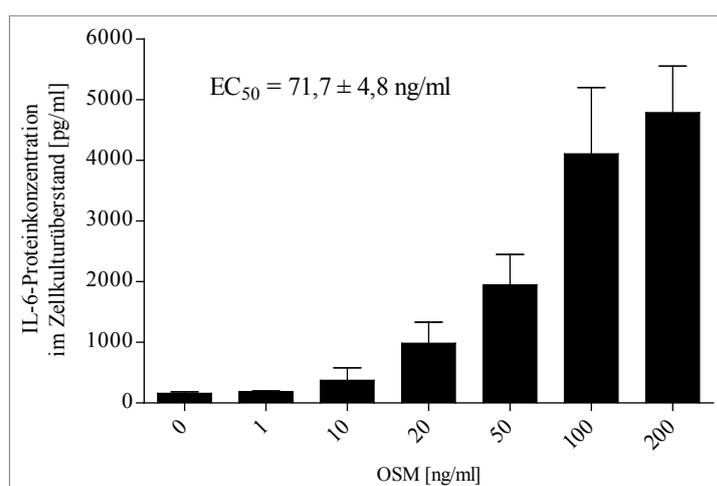
Neben einer definierten Stimulation der IL-6-Expression war die Hemmung dieser durch Heteroarylketone ein weiteres Kriterium für die Auswahl eines entsprechenden Stimulibasierten Modellsystems. Dafür wurden PMA-, OSM-, STS- und Forskolin-behandelte MG-U343 Gliomazellen für 24 Stunden mit ausgewählten HAK-Vertretern inkubiert. Die ermittelten Werte des sekretierten IL-6-Proteins sind in der Abb. 3.6. graphisch dargestellt, wobei die jeweils stimulierte unbehandelte Probe 100 % gesetzt wurde (grau). Die Abbildung zeigt, dass die Vertreter der Heteroarylketone nicht in der Lage waren, die PMA- und Forskolin-abhängige Stimulation der Zellen einheitlich zu inhibieren. Daher waren diese Stimuli nicht geeignet für die Etablierung eines Modellsystems zur Charakterisierung der IL-6-Expression durch Heteroarylketone. Ein einheitliches Muster der Inhibierung, ähnlich dem des autokrinen Modellsystems, ergab sich dagegen bei der Hemmung der STS- und OSM-stimulierten IL-6-Proteinexpression durch ausgewählte Heteroarylketone. In diesem Fall sind alle verwendeten Substanzen in der Lage, die IL-6-Sekretion um 90 bis 70 % gegenüber der stimulierten Kontrolle zu reduzieren. Daher stellen die OSM- sowie die STS-stimulierte IL-6-Expression in MG-U343 Zellen anwendbare Modellsysteme für die Untersuchung des zugrunde liegenden molekularen Mechanismus von Heteroarylketonen dar.



3.6. Modifikation der PMA-, OSM-, STS- und Forskolin-abhängigen IL-6-Sekretion durch Heteroarylketone. Die Zellen wurden mit dem jeweiligen Stimuli und 20 μ M HAK (X-Achse) oder 0,2 % DMSO 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Die Inkubation der Kontrolle erfolgte ohne Stimuli. Danach wurde der Zellkulturüberstand mit einem spezifischen humanen IL-6-ELISA auf das Vorhandensein des IL-6-Proteins überprüft. Dargestellt sind jeweils die relativen IL-6-Proteingehalte gegenüber den stimulierten Kontrollen ohne HAK (Mittelwert \pm SD, $n \geq 3$).

Die Stimulation der IL-6-Sekretion durch STS basiert auf der Hemmung verschiedener Kinasen, wie z.B. PKA, PKC und CaMKII. Infolgedessen werden mehrere Signalkaskaden ausgelöst, welche sich gegenseitig überlagern und beeinflussen. Im Gegensatz dazu beruht der Wirkmechanismus von OSM auf der Stimulation eines spezifischen Rezeptorkomplexes. Dann erfolgt die Weiterleitung des Signals mittels der Aktivierung von Kinasen, wie der *Extracellular-signal regulated kinase 1/2* (Erk1/2), und Transkriptionsfaktoren, z.B. NF κ B [15]. Dabei wird die Aktivierung der beteiligten Signalkaskadekomponenten durch deren Phosphorylierung bewerkstelligt. Die aktivierten Transkriptionsfaktoren sind in der Lage, an die IL-6-Promotorelemente zu binden und damit die transkriptionelle Aktivität der Genexpression zu modulieren [133-135]. Aufgrund dieser Kenntnisse wurde das Modell der OSM-stimulierten und nicht das der STS-stimulierten IL-6-Sekretion in der hier vorliegenden Arbeit für die Identifizierung des IL-6-relevanten Zielproteins von Heteroarylketonen ausgewählt.

Für die Bestimmung der geeigneten OSM-Konzentration wurde ein EC_{50} -Wert der OSM-stimulierten IL-6-Expression ermittelt. Dafür erfolgte die Inkubation von MG-U343 Gliomazellen mit OSM-Konzentrationen von 1 bis 200 ng/ml in serumfreien Medium. Die absoluten Werte des sekretierten IL-6-Proteins in den Zellkulturüberstand werden als Funktion der OSM-Konzentration im Diagramm 3.7. gezeigt. Die Ermittlung des EC_{50} ergab einen Wert von $71,7 \pm 4,8$ ng/ml. Aus der Graphik wird deutlich, dass die Zugabe von 200 ng/ml OSM die Sekretion von IL-6 nicht wesentlich im Vergleich zu 100 ng/ml OSM erhöhte und demnach eine Sättigung erreicht wurde. Resultierend aus diesen Ergebnissen wurde für die nachfolgenden Versuche generell eine OSM-Konzentration von 100 ng/ml verwendet.

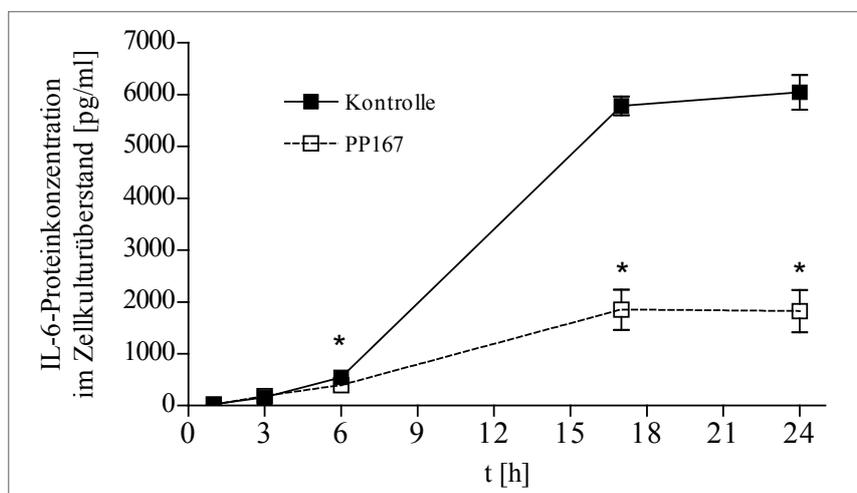


3.7. IL-6-Sekretion in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen von OSM. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von OSM (0 bis 200 ng/ml) 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Danach wurde der Zellkulturüberstand mit einem spezifischen humanen IL-6-ELISA auf das Vorhandensein des IL-6-Proteins überprüft. Dargestellt sind die absoluten Werte in pg/ml (Mittelwert \pm SD, n = 6).

3.4. Hemmung der OSM-stimulierten IL-6-Expression durch Heteroarylketone

Für die Untersuchung der zeitabhängigen Wirkung von Heteroarylketonen auf die OSM-induzierte IL-6-Sekretion erfolgte die Inkubation von MG-U343 Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden mit 100 ng/ml OSM und dem HAK-Vertreter PP167. Die Probenentnahme fand zu den Zeitpunkten 1, 3, 6, 17 und 24 Stunden nach der OSM-Stimulation statt. Als Ausgangswert wurde nicht konditioniertes Medium verwendet, welches nachweislich kein IL-6 enthielt. Im Zeitraum von 0 bis 6 Stunden (Abb. 3.8.) war nur ein geringer Anstieg der absoluten IL-6-Sekretion in der Kontroll- und der HAK-behandelten Probe zu beobachten. Im weiteren Verlauf nahm die IL-6-Sekretion der Kontrollzellen stark zu und erreichte Werte über 6000 pg IL-6 pro ml Zellkulturüberstand. Im Vergleich dazu wurde die IL-6-Sekretion

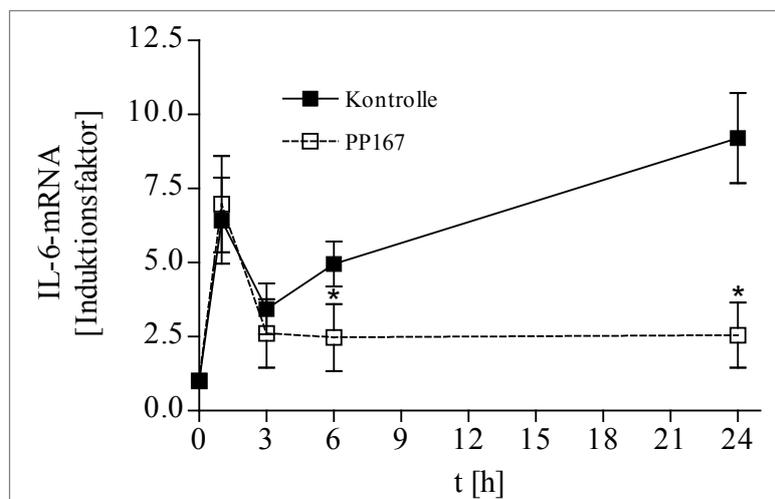
in den PP167-behandelten Zellen nur schwach erhöht und stagnierte bei einem Wert von etwa 1500 pg/ml IL-6. Ein signifikanter Unterschied der IL-6-Sekretion war erst nach 6 Stunden OSM-Inkubation nachweisbar.



3.8. Einfluss von PP167 auf die OSM-stimulierte IL-6-Proteinsekretion. Die Zellen wurden mit 20 μ M PP167 oder 0,2 % DMSO als Kontrolle in serumfreiem Medium inkubiert. Zu den Zeitpunkten 1, 3, 6, 17 und 24 Stunden erfolgte die Bestimmung der IL-6-Proteinkonzentration in pg/ml im Kulturüberstand mit einem spezifischen humanen IL-6-ELISA. Dargestellt sind die absoluten Werte in pg/ml (Mittelwert \pm SD, n = 3).

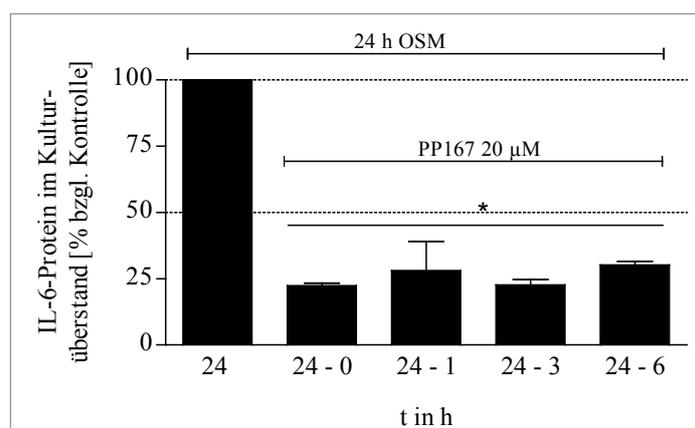
Weiterhin wurde überprüft, ob die Verminderung der stimulierten IL-6-Proteinsekretion, wie die autokrine Sekretion, durch die Regulation des IL-6-Gens auf transkriptioneller Ebene erfolgt. Dafür fand die Behandlung der Zellen mit PP167 und OSM wie oben beschrieben statt. Die Quantifizierung des IL-6-mRNA-Gehalts zu den Zeitpunkten 0, 1, 3, 6 und 24 Stunden nach der OSM-Stimulation wurde mit Hilfe der qPCR-Technik durchgeführt. Die Induktionsfaktoren der IL-6-mRNA sind als Funktion der Zeit graphisch im Diagramm 3.9. abgebildet. Im Verlauf von einer Stunde ist die Expression der IL-6-mRNA im Vergleich zum Zeitpunkt 0 etwa 7-fach erhöht, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen PP167-behandelten Zellen und Kontrollzellen beobachtet wurden. Der Abbau der IL-6-mRNA erfolgte innerhalb der folgenden 2 Stunden in beiden Zellpopulationen. Nach 6 Stunden stieg die Expression der IL-6-mRNA in den Kontrollzellen wieder an, während bei PP167-behandelten Zellen die mRNA-Synthese stagnierte. Dieses Ergebnis korreliert mit den Daten der IL-6-Proteinsekretion (Abb. 3.8.). Vergleicht man die Kurvenverläufe der IL-6-mRNA-Gehalte miteinander, wird deutlich, dass Heteroarylketone nur den zweiten Anstieg der IL-6-Genexpression beeinflussen. Dieser ist für die Quantität der Proteinsekretion ausschlaggebend, denn erst nach 6 Stunden OSM-Stimulation war ein steiler Anstieg der IL-6-Sekretion zu beobachten (Abb. 3.8.). Dagegen führte die erste starke Erhöhung des

IL-6-mRNA-Gehalts innerhalb von 3 Stunden nur zu einer sehr geringen Expression des Zytokins.



3.9. Einfluss von PP167 auf die OSM-stimulierte IL-6-mRNA-Expression. Die Zellen wurden mit 20 μ M PP167 bzw. 0,2 % DMSO als Kontrolle und 100 ng/ml OSM in serumfreiem Medium über einen Zeitraum von 1, 3, 6 und 24 Stunden inkubiert. Der IL-6-mRNA-Gehalt wurde mittels qPCR bestimmt und mit Hilfe des mRNA-Gehalts von G6PDH, GAPDH und HPRT normiert. Dargestellt ist der mRNA-Gehalt als Induktionsfaktor der Kontrolle zum Zeitpunkt 0 Stunden (Mittelwert \pm SD, $n \geq 6$).

Um die Aussage zu unterstützen, dass die Wirkung von Heteroarylketonen auf der Beeinflussung des zweiten Anstiegs der IL-6-mRNA-Synthese beruht, wurde PP167 nachfolgend jeweils 1, 3 und 6 Stunden nach der OSM-Stimulation zu humanen MG-U343 Gliomazellen gegeben. Insgesamt erfolgte die Stimulierung über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die IL-6-Sekretion ist als Funktion der Zeit relativ zur Kontrolle in Abb. 3.10. gezeigt.

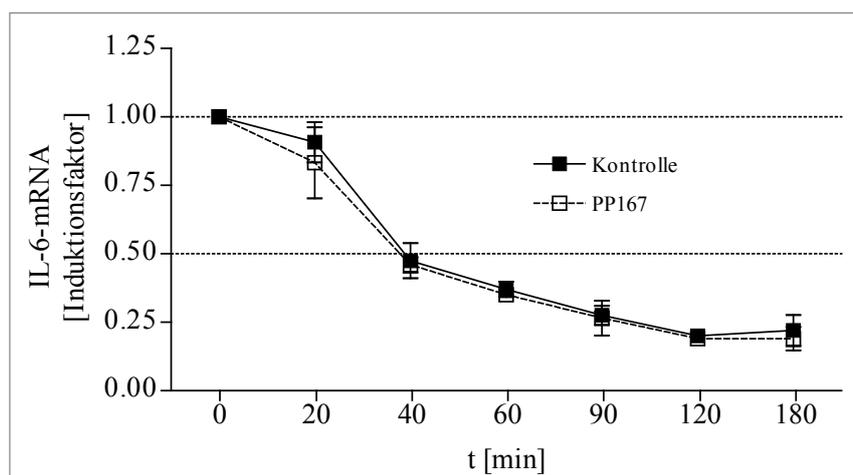


3.10. OSM-stimulierte IL-6-mRNA-Expression bei zeitverzögerter Zugabe von PP167. Die Zellen wurden mit 100 ng/ml OSM in serumfreiem Medium über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von 20 μ M PP167 bzw. 0,2 % DMSO als Kontrolle nach 0, 1, 3 und 6 Stunden. Anschließend wurde der IL-6-mRNA-Gehalt mittels qPCR bestimmt und mit Hilfe des mRNA-Gehalts von G6PDH, GAPDH und HPRT normiert. Dargestellt ist jeweils der relative mRNA-Gehalt im Vergleich zur OSM-stimulierten Kontrolle ohne Inhibitor (Mittelwert \pm SD, $n=3$).

Unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe des Inhibitors wiesen die Zellen eine mindestens 70-prozentige Verringerung des IL-6-Proteins im Zellkulturüberstand auf. Demnach bestätigt sich, dass der erste sehr starke Anstieg der IL-6-mRNA nur zu einem geringen Anteil an der Menge des gesamten sekretierten IL-6-Proteins beteiligt ist. Diese verzögerte Wirkung von Heteroarylketonen ist vermutlich auf die selektive Interaktion mit Proteinen oder Proteinkomplexen zurückzuführen, welche erst im Verlauf der OSM-Signalkaskade in einem Zeitfenster von 3 bis 6 Stunden synthetisiert oder aktiviert werden.

3.5. Einfluss von Heteroarylketonen auf den Abbau der OSM-stimulierten IL-6-mRNA

Bisher war nicht bekannt, ob Heteroarylketone ihre Wirkung über die Hemmung der IL-6-mRNA-Synthese oder über den verstärkten Abbau der IL-6-mRNA ausüben. Um den Einfluss von Heteroarylketonen auf den IL-6-mRNA-Abbau zu untersuchen, wurden MG-U343 Gliomazellen nach einer 6-stündigen OSM-Stimulation mit Actinomycin D behandelt. Dieses Antibiotikum inhibiert die Synthese von mRNA durch Interkalation an die DNA [136]. Zusätzlich fand die Inkubation der Zellen mit 20 μ M PP167 bzw. 0,2 % DMSO als Kontrolle statt. Anschließend erfolgte die Probennahme nach 20, 40, 60, 190, 120 und 180 Minuten. Der IL-6-mRNA-Gehalt der Zellen zum Zeitpunkt 0 Stunden nach der OSM-Stimulation wurde 1 gesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.11. als Funktion der Zeit graphisch dargestellt.



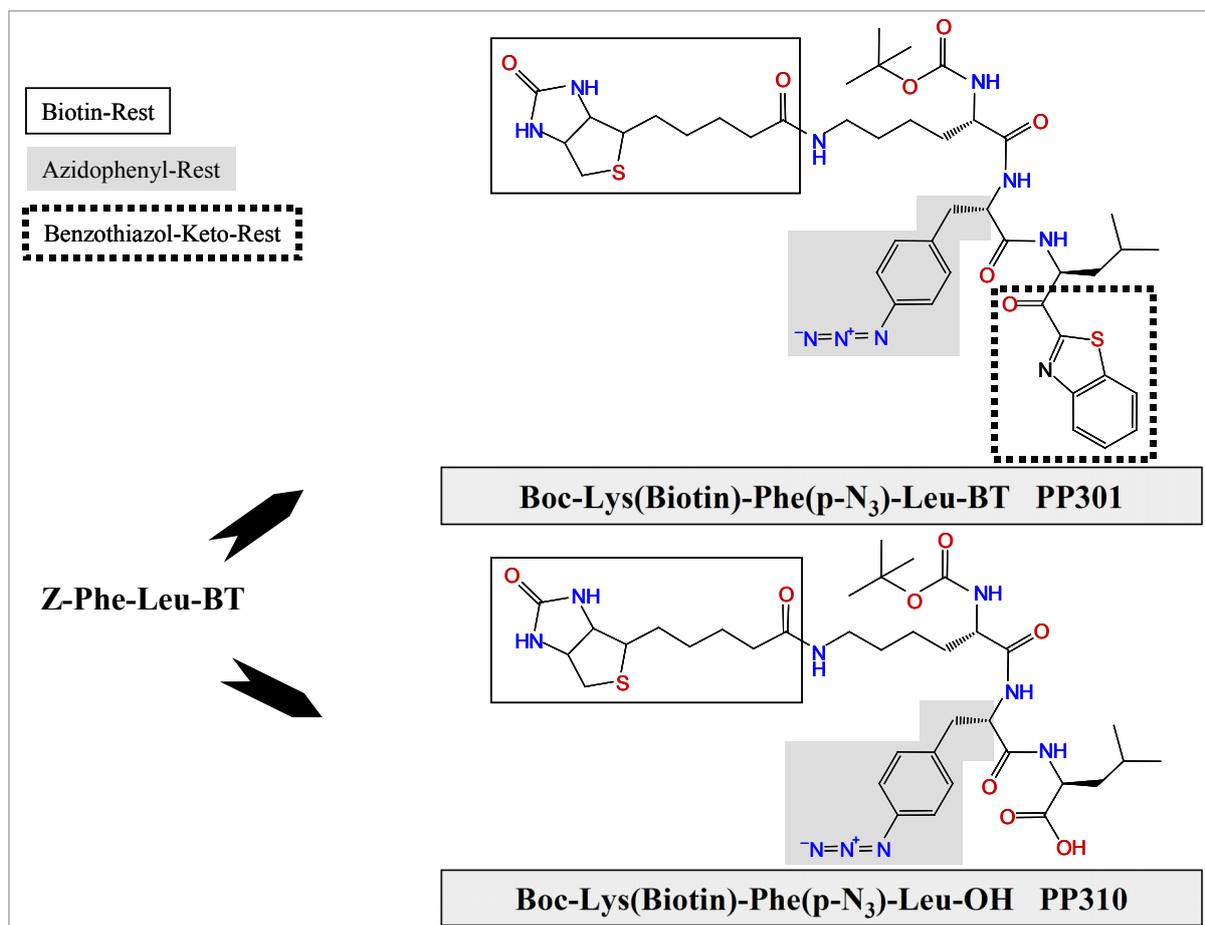
3.11. Einfluss von PP167 auf die Stabilität der OSM-stimulierten IL-6-mRNA über einen Zeitraum von 3 Stunden. Die Zellen wurden mit 100 ng/ml OSM in serumfreiem Medium über einen Zeitraum von 6 Stunden inkubiert. Nachfolgend erfolgte die Zugabe von 20 μ M PP167 bzw. 0,2 % DMSO als Kontrolle und 10 μ g/ml Actinomycin D zur Inhibierung der mRNA-Neusynthese. Aus den Proben wurde nach 20, 40, 60, 90, 120 und 180 Minuten die Gesamt-RNA extrahiert. Der IL-6-mRNA-Gehalt wurde mittels qPCR bestimmt und mit Hilfe des mRNA-Gehalts der Referenzgene GAPDH, G6PDH und HPRT normiert. Dargestellt ist der mRNA-Gehalt als Induktionsfaktor der Kontrolle zum Zeitpunkt von 0 Stunden nach der Zugabe von OSM (Mittelwert \pm SD, n = 2).

Bis auf geringfügige Unterschiede bei dem Messpunkt von 20 Minuten ist der Verlauf der abgebildeten Graphen identisch, was auf einen übereinstimmenden Abbau der IL-6-mRNA in PP167-behandelten- und Kontrollzellen schließen lässt. Somit haben Heteroarylketone keinen Einfluss auf die Stabilität der OSM-stimulierten IL-6-mRNA, sondern müssen deren Synthese modifizieren.

Aufgrund aller vorliegenden Ergebnisse wurde für die Identifizierung des Interaktionsproteins von Heteroarylketonen das Modell der OSM-stimulierten IL-6-Expression zum Zeitpunkt von 6 Stunden in humanen MG-U343 Gliomazellen verwendet.

C. Identifizierung der IL-6-relevanten Interaktionspartner von Heteroarylketonen im Modellsystem der OSM-stimulierten MG-U343 Gliomazellen

Für die nachfolgenden Versuche fand die strukturelle Modifikation der bisher verwendeten Heteroarylketone statt. Die Synthese der Inhibitoren PP301 und PP310 erfolgte mit Biotin für die Streptavidin-vermittelte Fixierung und Detektion. Die Änderungen an den Heteroarylketonen sind in der Abbildung 3.12. schematisch dargestellt.

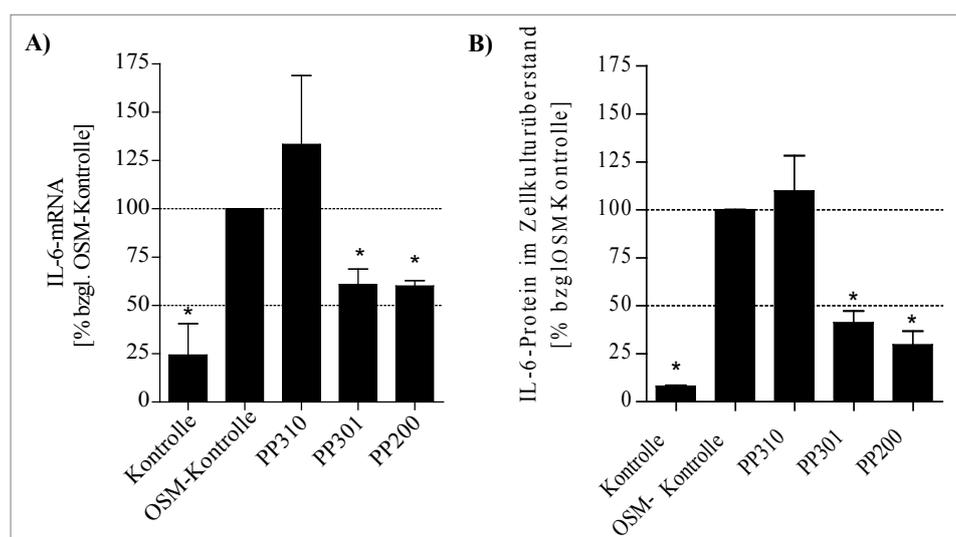


3.12. Struktur der biotinylierten Inhibitoren PP301 und PP310.

Um sicherzustellen, dass eine stabile kovalente Bindung zwischen Inhibitor und Zielprotein hergestellt wird, wurde eine Azidgruppe als photoreaktiver Crosslinker angefügt. Bei Bestrahlung dieser Azidgruppe mit UV-Licht wird ein Nitren gebildet. Nitrene stellen Elektronenmangelverbindungen dar, welche sich unter Einschub- oder Additionsreaktionen an nukleophile Partner stabilisieren. Dieses ermöglicht die kovalente Verknüpfung zwischen Inhibitor und putativen Interaktionspartnern. Die IL-6-senkende Wirkung von Heteroarylketonen wird über eine Benzothiazolstruktur vermittelt. Der IL-6-bioaktive biotinylierte Inhibitor PP301 verfügt über die Benzothiazolstruktur, während diese der negativen Kontrolle PP310 fehlt. Die Ausgangssubstanz für die Synthese der biotinylierten Inhibitoren war die IL-6-senkende Verbindung PP200, welche keinen PEP-Inhibitor darstellt. Bereits kleinste Veränderungen von Molekülen können zu einer Modifikation der biologischen Aktivität führen. Deshalb war es notwendig, die biotinylierten Substanzen bezüglich deren Wirksamkeit auf die IL-6-Expression zu validieren.

3.6. Einfluss von biotinylierten Inhibitoren auf die IL-6-Expression

Um nachzuweisen, dass die biotinylierten Substanzen identische Eigenschaften wie die nicht-biotinylierten Heteroarylketone aufweisen, fand die Untersuchung der Beeinflussung der IL-6-Expression durch diese Substanzen auf transkriptioneller sowie auf translationaler Ebene statt (Abb. 3.13.).

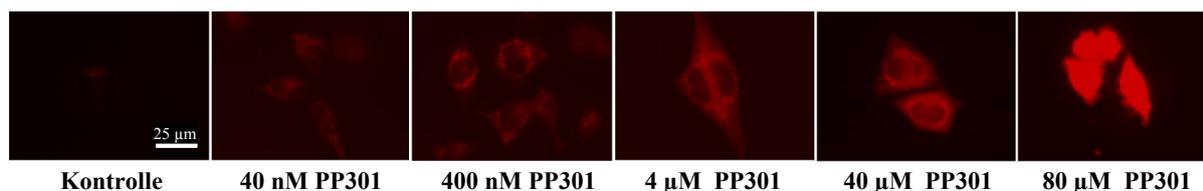


3.13. Einfluss der biotinylierten Inhibitoren PP301 und PP310 auf die OSM-stimulierte IL-6-Expression. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit 40 μ M PP301, PP310, 20 μ M PP200 oder DMSO als Kontrolle in serumfreiem Medium inkubiert. (A) Die IL-6-mRNA-Gehalte wurden mit einer qPCR-Analyse ermittelt und mit Hilfe der mRNA-Gehalte von GAPDH, G6PDH und HPRT normiert. (B) Die Bestimmung der IL-6-Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand erfolgte mittels eines hIL-6-ELISA. Dargestellt ist jeweils der relative IL-6-mRNA- bzw. Proteingehalt im Vergleich zur stimulierten OSM-Kontrolle (Mittelwert \pm SD, $n \geq 2$).

Im Unterschied zu den bisher verwendeten Heteroarylketonen mussten die biotinylierten Inhibitoren in einer Konzentration von 40 μM eingesetzt werden, um eine signifikante Inhibierung der IL-6-Expression zu erzielen. Die Stimulation der verwendeten MG-U343 Gliomazellen erfolgte mit 100 ng/ml OSM über einen Zeitraum von 24 Stunden. Für die Normalisierung der Ergebnisse der qPCR wurde die mRNA der Referenzgene GAPDH, G6PDH und HPRT verwendet. In beiden Untersuchungen wurden jeweils die Werte von OSM-stimulierten Kontrollzellen 100 % gesetzt. Die biotinylierte Substanz PP301 war bei einer Konzentration von 40 μM in der Lage, die OSM-vermittelte IL-6-Genexpression von MG-U343 Zellen um 40 % zu inhibieren, während diese durch die Negativkontrolle PP310 nicht gehemmt wurde. Basierend auf dieser Hemmung der IL-6-Genexpression konnte auch die Menge des IL-6-Proteins im Zellkulturüberstand durch die Inkubation mit PP301 um 60 % gegenüber der stimulierten Kontrolle inhibiert werden. Dagegen wurde die IL-6-Sekretion durch die Zugabe der Negativkontrolle PP310 nur gering beeinflusst. Demzufolge konnte nachgewiesen werden, dass der biotinylierte Inhibitor PP301 trotz der Modifizierungen aktiv ist, da er hemmend auf die IL-6-Expression wirkt.

3.7. Konzentrations- und zeitabhängige Markierung durch biotinylierte Inhibitoren

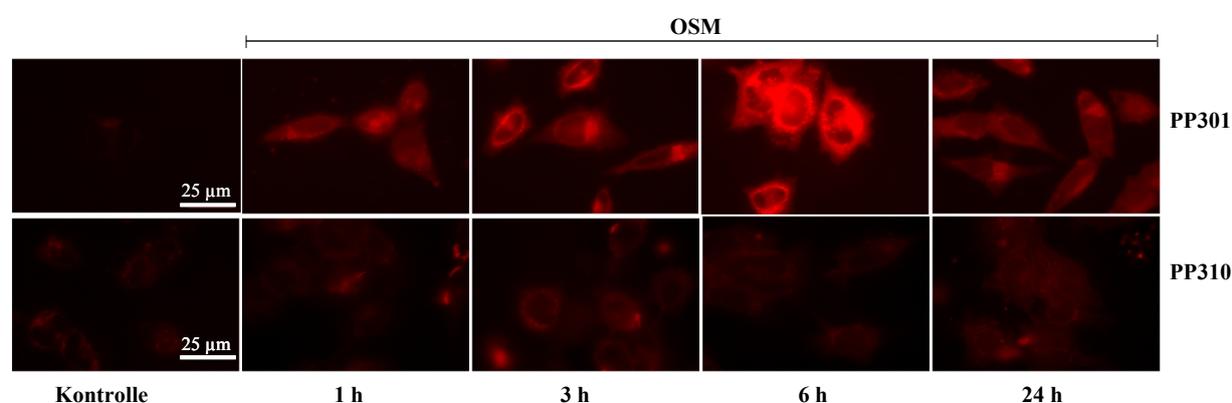
Im weiteren Verlauf der Validierung der biotinylierten Inhibitoren wurde die Methode der Immunzytochemie angewandt. Mit diesen Experimenten ist aufgrund der Biotinmarkierung des Inhibitors die Lokalisation dieser Substanz intrazellulär möglich. Somit kann auch auf die Lokalisation des Zielproteins von Heteroarylketonen geschlossen werden. Um die dosisabhängige Markierung von MG-U343 Gliomazellen durch den biotinylierten Inhibitor PP301 zu untersuchen, wurden die auf Deckgläser kultivierten Zellen 24 Stunden mit Konzentrationen zwischen 40 nM bis 80 μM PP301 sowie 100 ng/ml OSM inkubiert. Nach 10 Minuten Bestrahlung mit UV-Licht erfolgte die Detektion von Biotin in den Proben mit Hilfe von Cy3-konjugiertem Streptavidin.



3.14. Konzentrationsabhängige Markierung von PP301-behandelten Zellen durch Cy3-konjugiertes Streptavidin. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM sowie PP301 in den oben angegebenen Konzentrationen inkubiert. Nach der 10-minütigen Bestrahlung mit UV-Licht folgte die Fixierung mit 4 % PFA und die Markierung mit Cy3-konjugiertem Streptavidin. Die Bildaufnahme der Proben fand am Fluoreszenzmikroskop statt.

In Abb. 3.14. kann man deutlich erkennen, dass die Kontrollzellen nicht markiert worden sind. Dagegen fand eine stete Intensivierung der Markierung der Zellen mit zunehmender Konzentration des Inhibitors PP301 statt. Daher liegt eine Korrelation vor. Nach der Inkubation der Zellen mit dem biotinylierten Inhibitor war eine inhomogene perinukleäre zytoplasmatische Markierung zu sehen.

Um die Zeitabhängigkeit der Markierung von MG-U343 Gliomazellen durch PP301 zu untersuchen, wurde im folgenden Experiment eine Kinetik der Markierung OSM-stimulierter MG-U343 Gliomazellen durch jeweils 40 μM PP301 oder PP310 über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt (Abb. 3.15.).

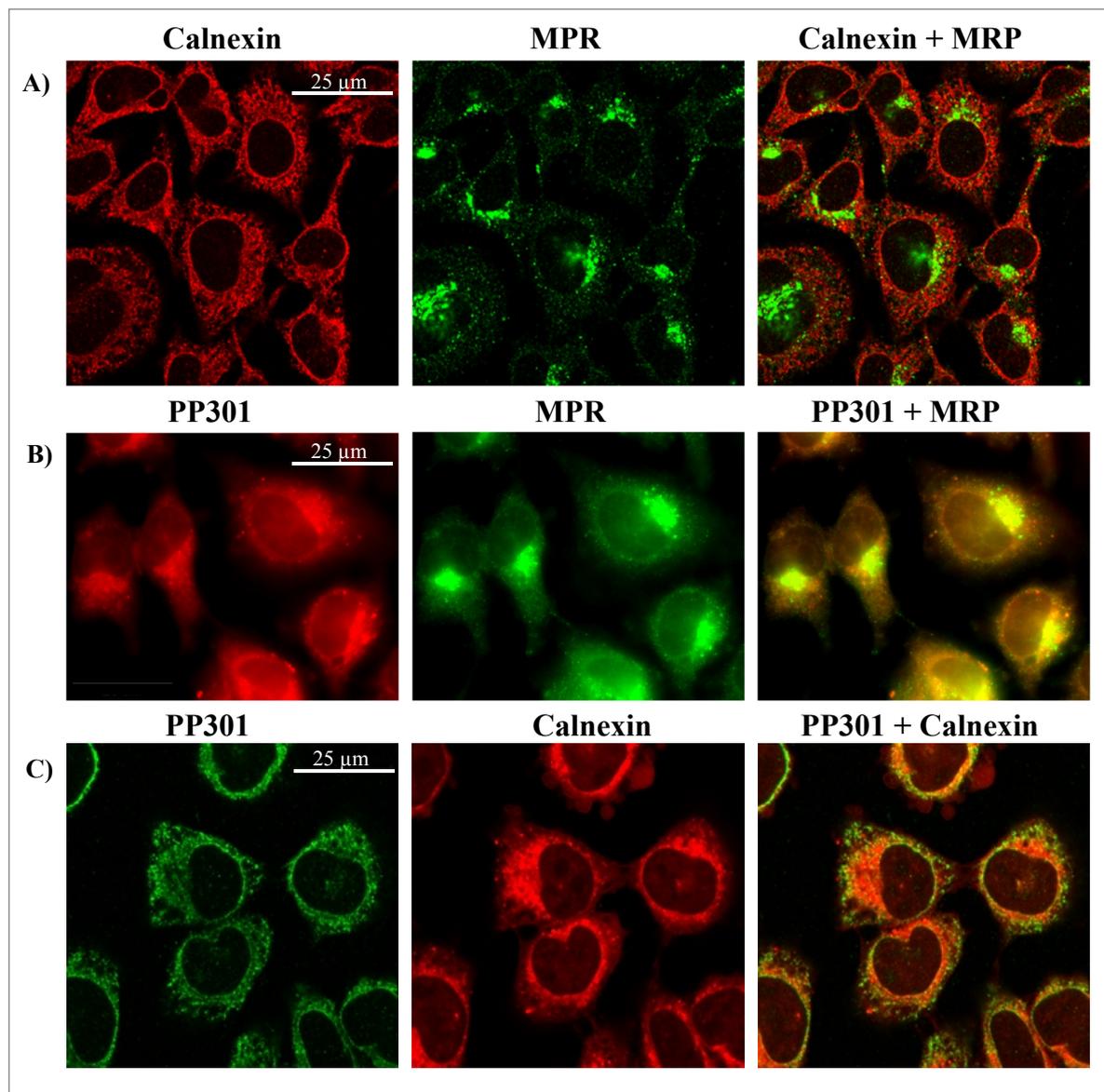


3.15. Zeitabhängige Markierung von PP301- und PP310-behandelten Zellen mit Cy3-konjugiertem Streptavidin. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit 100 ng/ml OSM und 40 μM PP301 bzw. PP310 inkubiert. Zu den Zeitpunkten 1, 3, 6 und 24 Stunden erfolgte eine 10-minütige Bestrahlung mit UV-Licht. Danach fand die Fixierung mit 4 % PFA und die Markierung statt. Die Bildaufnahme erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

Bereits nach einer Stunde Inkubation mit PP301 war die perinukleäre Anreicherung dieses Inhibitors im Zytoplasma zu beobachten, wobei die Strukturen auf eine endosomale Verteilung bzw. eine Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum (ER) hindeuten. Die Markierung nahm mit längerer Inkubationszeit zu und erreichte nach 6 Stunden ihre stärkste Ausprägung. Damit korreliert die Hemmung des zweiten Anstiegs der IL-6-mRNA-Expression durch Heteroarylketone mit dem Markierungsmuster des Inhibitors PP301. Nach 24 Stunden war die Intensität der Zellmarkierung deutlich schwächer. Dagegen wurde diese bei allen Zeitpunkten der Negativkontrolle PP310 gleich der Kontrolle zum Zeitpunkt von 0 Stunden beibehalten.

3.8. Kolokalisation von PP301 und Mannose-6-Phosphat Rezeptor sowie Calnexin

Der Inhibitor PP301 weist eine strukturierte perinukleäre Lokalisation im Zytoplasma auf. Eine ähnliche Lokalisation ist vom ER bzw. den späten Endosomen bekannt [137]. Um die Markierung des Inhibitors PP301 zu spezifizieren wurden daher Kolokalisationsstudien mit dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR), einem Marker für späte Endosomen und Calnexin, einem Markerprotein des ER, durchgeführt [138, 139] (Abb. 3.16. A).



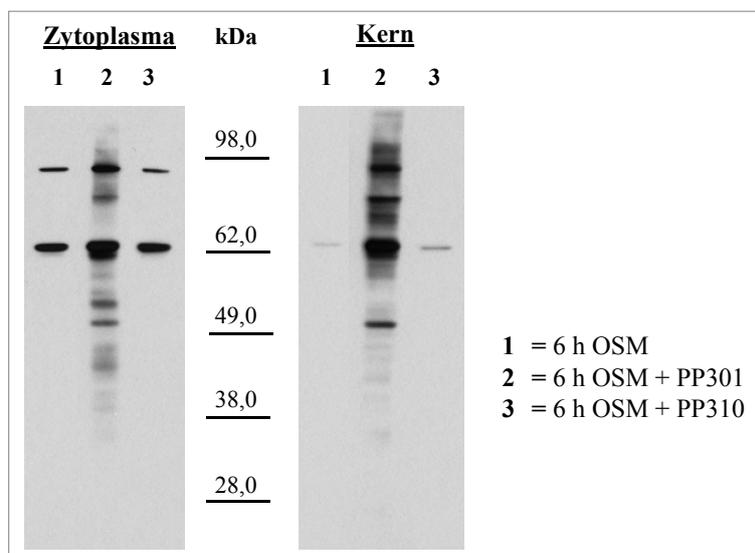
3.16. Intrazelluläre Lokalisation von MPR, Calnexin und PP301 in OSM-stimulierten Zellen. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM und 40 µM PP301 inkubiert. Nach der 10-minütigen Bestrahlung mit UV-Licht folgte die Fixierung und die Markierung von (A) Calnexin mit Red-X-konjugiertem sekundären Antikörper und MPR mit Cy2-konjugiertem-Antikörper, (B) PP301 mit Cy3-konjugiertem-Streptavidin und MPR mit Cy2-konjugierten sekundären Antikörper, sowie (C) PP301 mit Cy2-konjugiertem-Streptavidin und Calnexin mit Red-X-konjugiertem sekundären Antikörper. Die Bildaufnahme erfolgte für die Teile (A) und (C) mit dem Laserscanning-Mikroskop und für den Teil (B) mit dem Fluoreszenzmikroskop.

Während mit Hilfe der Markierung von Calnexin durch den Fluoreszenzfarbstoff Red-X eine gepunktete Struktur (rot) um den gesamten Zellkern erreicht wurde, zeichnete sich die grüne Cy2-Markierung des MPR durch inhomogenere Strukturen aus, die sich gehäuft an einer Stelle marginal des Zellkerns befanden. Bei einer Überlagerung beider Bilder ist deutlich zu erkennen, dass unterschiedliche Bereiche in der Zelle angefärbt wurden. Im sauren Milieu der Endosomen werden z.B. internalisierte Rezeptorkomplexe recycelt, während am ER die Translation von Proteinen, deren Faltung und posttranslationale Modifikationen sowie der Transport von Transmembranproteinen und sekretorischen Proteinen stattfindet [137]. Beide Zellkompartimente spielen demnach für Signaltransduktionsprozesse sowie bei der Sekretion von Proteinen eine große Rolle. Beim Vergleich der PP301-spezifischen Markierung mit den Calnexin- bzw. MPR-markierten Zellen wird deutlich, dass PP301 mit beiden Proteinen kolokalisiert vorliegt, wobei eine stärkere Kolokalisation mit dem MPR-Protein erreicht wurde (Abb. 3.16. B und C). Aufgrund der unterschiedlichen physiologischen Funktionen der repräsentierten Zellorganellen sind für das Zielprotein des biotinylierten Inhibitors PP301 mehrere Lokalisationen und somit funktionelle Eigenschaften denkbar.

3.9. Validierung der biotinylierten Inhibitoren mit Streptavidin-spezifischem Immunoblot

Für die Verwendung der biotinylierten Inhibitoren in der 2-D-Gelelektrophorese sollte überprüft werden, ob diese in der Lage sind, Proteine *in vivo* spezifisch mit Biotin zu markieren. Zu diesem Zweck erfolgte die Extraktion von Zellkernen und Zytoplasma von Kontrollzellen, PP301- und PP310-behandelten Zellen. Für die Detektion der biotinylierten Proteine wurde ein spezifischer HRP-konjugierter anti-Streptavidin-Antikörper verwendet. Die Western-Blot-Analysen sind in der Abbildung 3.17. gezeigt. Es sind jeweils 20 µg des Gesamtproteins der jeweiligen Extrakte in der oben genannten Reihenfolge aufgetragen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit der Methode nach Bradford. In beiden Fraktionen wurden Proteine spezifisch durch die Zugabe des Inhibitors PP301 mit Biotin markiert, während dies in den Fraktionen der Negativkontrolle mit PP310 nicht der Fall war. In der Zytoplasmafraktion der PP310-behandelten Zellen konnten zwei spezifische Banden detektiert werden, welche ebenso in der stimulierten Kontrolle vorhanden waren. Auch in der Kernfraktion glichen die markierten Proteine der OSM-behandelten Kontrolle denen der PP310-behandelten Zellen. Die so detektierten Proteine sind entweder endogen biotinyliert oder sie wurden unabhängig von der Benzothiazolgruppe markiert. Die Proteine, welche

zusätzlich durch die Inkubation mit PP301 spezifisch markiert worden sind, stellen somit putative Interaktionspartner von Heteroarylketonen dar.

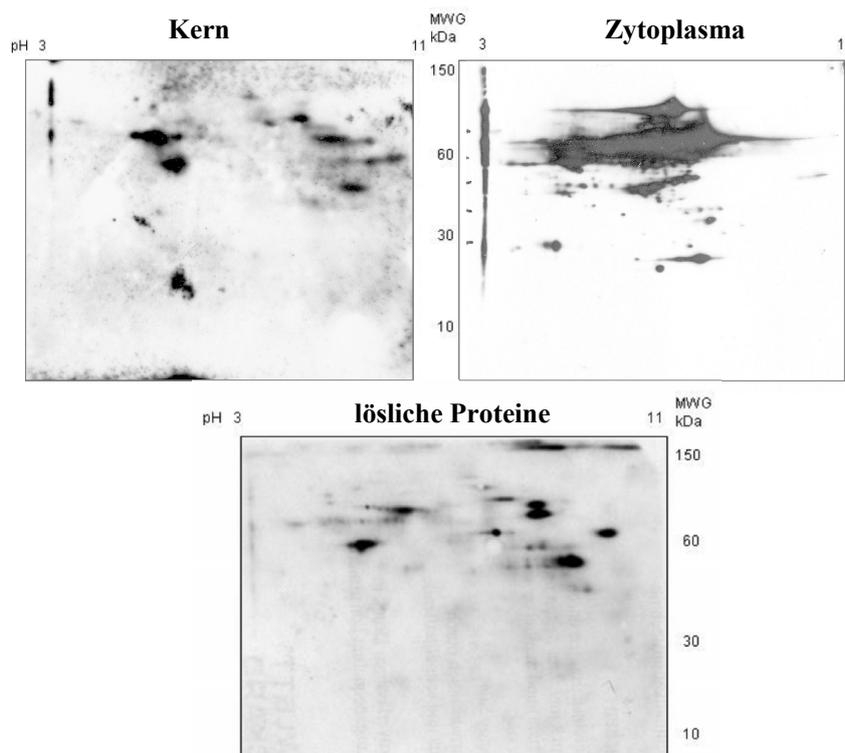


3.17. Western-Blot-Analyse von PP301- und PP310-behandelten Zellen. Die Zellen wurden mit 40 μM PP301 und 100 ng/ml OSM über einen Zeitraum von 6 Stunden in serumfreiem DMEM inkubiert. Nach 10-minütiger Bestrahlung mit UV-Licht folgte ein Waschschrift mit 0,2 mg/ml Natriumorthovanadat in PBS und die anschließende Fraktionierung in Zellkerne und Zytoplasma. Die Extrakte wurden mittels Streptavidin-spezifischem Immunoblot analysiert.

Das Ergebnis ist identisch mit den Resultaten der Immunzytochemie (vgl. Abb. 3.15.). Auch in diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die PP301-spezifisch markierten Zellen nach 6 Stunden OSM-Stimulation eine stärkere Intensität aufweisen als die PP310-behandelten Kontrollzellen. Somit wurden in diesen Zellen mehr Proteine markiert. Dagegen gleichen die Markierungen der PP310-behandelten Zellen zu allen Zeitpunkten denen der OSM-stimulierten Zellen zum Zeitpunkt von 0 Stunden. Aufgrund der IL-6-senkenden Wirkung von PP301 und dessen spezifischer Markierung von Proteinen, konnte der Inhibitor in der 2-D-Gelelektrophorese und damit zur Identifizierung des Bindungspartners von Heteroarylketonen verwendet werden.

3.10. Zweidimensionale Gelelektrophorese und Streptavidin-spezifischer Immunoblot

Um die in Abb. 3.17. (eindimensionaler Immunoblot) durch den Inhibitor PP301 spezifisch-markierten Proteine zu identifizieren, erfolgte die Auftrennung der dort verwendeten Zellextrakte in einer 2-D-Gelelektrophorese.



3.18. 2-D-Western-Blot-Analysen von PP301-behandelten Zellextrakten. MG-U343 Zellen wurden mit 40 μ M PP301 und 100 ng/ml OSM über einen Zeitraum von 6 Stunden in serumfreiem DMEM inkubiert. Nach 10-minütiger Bestrahlung mit UV-Licht folgte ein Waschschriff mit 0,2 mg/ml Natriumorthovanadat in PBS und die anschließende Lyse der Zellen. Der Kern- und Zytoplasmaextrakt sowie ein Extrakt mit allen löslichen Proteinen wurden zweidimensional gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Biotinylierte Proteine wurden mit Hilfe eines HRP-konjugierten anti-Streptavidin-Antikörpers detektiert.

Dabei wurden die Proteine zunächst entsprechend ihrem pH-Wert mittels einer isoelektrischen Fokussierung aufgetrennt. Im Anschluss daran erfolgte die Trennung nach dem Molekulargewicht. Es wurden 2 identische Gele angefertigt. In einem der beiden Gele fand die Detektion aller vorhandenen Proteine mit Hilfe einer Silberfärbung statt. Die Proteine des zweiten Gels wurden auf einer PVDF-Membran immobilisiert und diese anschließend in Abhängigkeit der spezifischen Bindung von Streptavidin an Biotin gefärbt. Anders als im eindimensionalen Immunoblot wurde durch die Zweidimensionalität die Möglichkeit verringert, dass sich mehrere Proteine in einem sogenannten Spot überlagern. Die angefertigten Immunoblots des Kern- und Zytoplasmaextrakts sowie des Extrakts mit den löslichen Proteinen von PP301-behandelten MG-U343 Zellen sind in Abb. 3.18. gezeigt. Parallel dazu wurden die jeweiligen Immunoblots der mit PP310-behandelten MG-U343 Zellen (Negativkontrollen) angefertigt (Daten nicht gezeigt). Während in den abgebildeten Immunoblots eine Reihe von Proteinen detektiert werden konnte, waren in den Negativkontrollen nur wenige Protein-Spots sichtbar.

Im Anschluss an die 2-D-Gelelektrophorese erfolgte die Zuordnung der Proteine der immunogefärbten PVDF-Membran mit denen des dazugehörigen Silbergels. Nach dem Verdau der ausgewählten Proteine durch Trypsin fand die Identifizierung dieser mit Hilfe von nanoLC-ESI-MS/MS und einem Sequenzvergleich mit der NCBI Proteindatenbank (*National Center for Biotechnology Information*, Bethesda, MD, USA) statt. Auf diese Weise konnte eine Reihe von Proteinen identifiziert werden (Tab. 3.19.).

3.19. Identifizierte PP310-spezifisch-(1. Spalte) und PP301-spezifisch-(2. – 4. Spalte) markierte Proteine der 2-D-Gelelektrophorese.

Negativkontrolle (PP310)	Kernfraktion (PP301)	Zytoplasmafraktion (PP301)	Extrakt löslicher Proteine (PP301)
-	eukaryotischer Elongationsfaktor 1A1 (eEF1A1)	eukaryotischer Elongationsfaktor 1A1 (eEF1A1)	eukaryotischer Elongationsfaktor 1A1 (eEF1A1)
eukaryotischer Elongationsfaktor 2 (eEF2)	-	-	eukaryotischer Elongationsfaktor 2 (eEF2)
Annexin A2	-	Annexin A2	Annexin A2
-	-	Annexin A5	-
Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase	-	Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase	Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase
Enolase 1	-	-	Enolase 1
Pyruvatkinase	Pyruvatkinase	-	Pyruvatkinase
β -Aktin	β -Aktin	β -Aktin	β -Aktin
Peroxiredoxin 1	-	Peroxiredoxin 6	-
ATP-Synthase, mitochondrial F1	Vimentin	<i>Brain fatty acid binding protein</i>	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor</i>
<i>NAD(P)H menadiione oxidoreductase 1</i>	Moesin	Triose-Phosphate Isomerase 1	<i>Katanin p60 subunit A-like 2</i>
<i>RuvB-like protein</i>	Chaperonin/ HSP60	Keratin 2	Chaperonin/ HSP60
-	γ -Aktin	Filamin A (FLNA)	<i>Valosin-containing protein 1 (VCP1)</i>
-	β -Tubulin	Phosphoglyceratmutase 1 Isoform 2	Phosphoglyceratkinase 1
-	<i>Thyroid hormone binding protein</i> <i>Prolyl 4-hydroxylase</i>	<i>5-Aminoimidazole-4-carboxamid ribonucleotid formyltransferase/IMP cyclohydrolase, isoform CRA_c</i>	HSP 70/ Protein 8 Isoform 1
-	<i>Endothelial actin-binding protein</i>	-	
-	54 kDa Protein	-	-

Die identifizierten Proteine der Negativkontrolle (linke Spalte, grau) sind entweder endogen biotinyliert oder sie wurden unspezifisch markiert. Diese Proteine scheiden als Interaktionspartner von Heteroarylketonen aus. Von den restlichen Proteinen wurden aufgrund der in der Literatur veröffentlichten Angaben 3 Kandidaten ausgewählt, die an der IL-6-Expression beteiligt sein könnten. Dabei handelt es sich um den eukaryotischen Elongationsfaktor 1A1 (eEF1A1), das Filamin A (FLNA) und das *Valosin-containing protein 1* (VCP1). Eine Übersicht über die physiologischen Funktionen der Proteine zeigt Tabelle 3.20. Aus diesen ergibt sich eine mögliche direkte Involvierung in der Regulation der OSM-stimulierten IL-6-Expression von MG-U343 Gliomazellen.

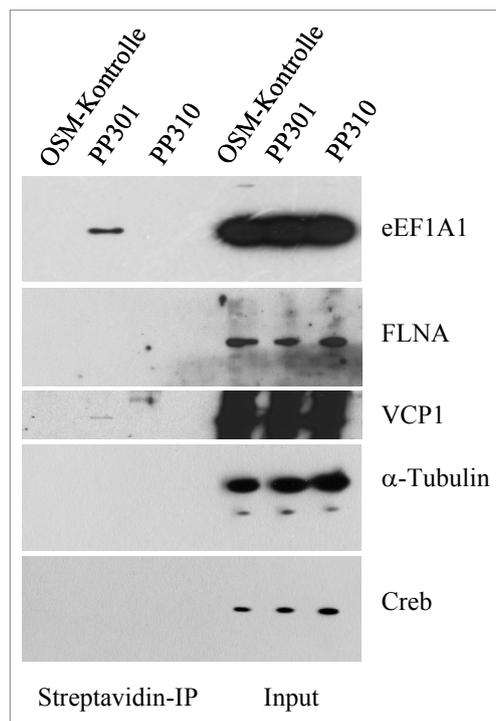
3.20. Physiologische Funktionen ausgewählter Proteine der 2-D-Gelelektrophorese.

Identifiziertes Protein	Funktion	Referenz
eEF1A1	GTPase; Mitglied von Signalkaskaden; Transport von Aminoacyl-tRNAs an das Ribosom (für mRNA Synthese); Transport von mRNA; Interaktionspartner von PKC δ ; bindet SH2-Domänen-Proteine	[140-148]
FLNA	Aktin bindendes Protein; c-terminale Domäne ist Interaktionspartner von TFs, Integrinen, Transmembranrezeptoren und sekundären Botenstoffen; lokalisiert im Zytoskelett	[149-154]
VCP1	involviert in Vesikeltransport und -fusion; beteiligt am Abbau von I κ B α im 26S Proteasom; beteiligt bei der Assemblierung von Peroxisomen; Interaktionspartner von Akt	[155-160]

Um zu überprüfen, ob die ausgewählten Proteine tatsächlich spezifisch durch die Inkubation von MG-U343 Gliomazellen mit PP301 mit Biotin markiert wurden, fand eine Streptavidin-spezifische Immunpräzipitation statt. Dabei konnte der Nachweis der Proteine in der nachfolgenden Antikörper-spezifischen Western-Blot-Analyse nur dann erfolgen, wenn diese zuvor durch den Inhibitor PP301 mit Biotin markiert wurden.

3.11. Streptavidin-spezifische Immunpräzipitation der ausgewählten putativen Interaktionspartner

Für die Streptavidin-spezifische Immunpräzipitation wurden die Zellextrakte aus der 2-D-Analyse eingesetzt. Die Fällung erfolgte mit Streptavidin-konjugierten Agarosebeads. Anschließend wurde ein Immunoblot angefertigt, wobei die Detektion der Proteine mit spezifischen HRP-konjugierten Antikörpern gegen eEF1A1, FLNA und VCP1 durchgeführt wurde (Abb. 3.21.).



3.21. Streptavidin-spezifische Immunpräzipitation von PP301- und PP310-behandelten Zellextrakten.

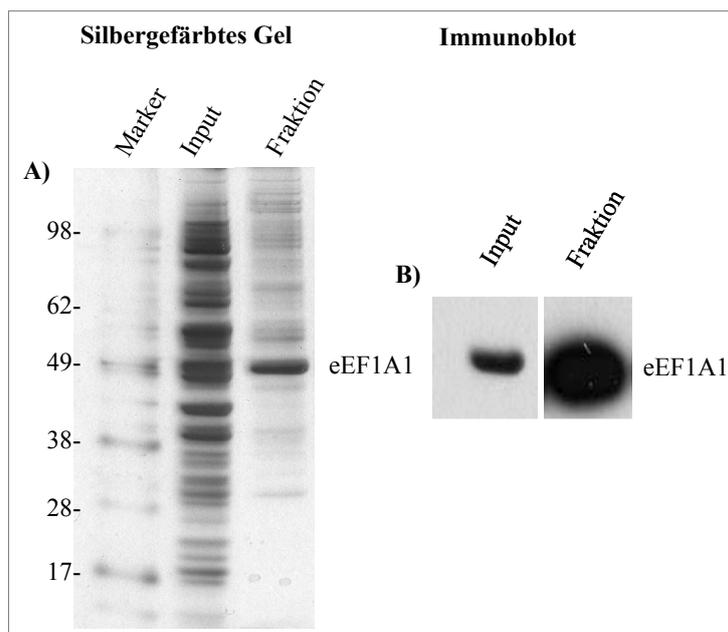
Die Zellen wurden für 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM und 0,4 % DMSO, 40 μ M PP301 oder PP310 in serumfreiem Medium inkubiert. Nach der 10-minütigen Bestrahlung mit UV-Licht erfolgte ein Waschschritt mit Natriumorthovanadat/PBS (0,2 g/l) und die Lyse der Zellen. Je Probe wurden 300 μ g Gesamtprotein mit 40 μ l Streptavidin-Beads 1 Stunde bei 4 $^{\circ}$ C im Rotator präzipitiert. Nach dem 3-maligen Waschen der Präzipitate mit je 600 μ l kaltem PBS erfolgte die Resuspension der Beads in je 32 μ l Ladepuffer. Die Präzipitate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert. Die Markierung fand mit HRP-konjugierten spezifischen Antikörpern gegen eEF1A1, FLNA, VCP1, α -Tubulin und Creb statt.

Mit dieser Methode konnte eEF1A1, jedoch nicht FLNA und VCP1, im Extrakt PP301-behandelter Zellen nachgewiesen werden. Im Fall der letztgenannten Proteine besteht demnach die Möglichkeit, dass sie falsch als positive Kandidaten identifiziert wurden. In den Extrakten der stimulierten Kontrolle und der PP310-behandelten Negativkontrolle konnten in keinem, der für diese Proteine spezifisch-markierten Immunoblots, Signale detektiert werden. Die Auftrennung der nicht präzipitierten Zellextrakte (Inputs) und die anschließende Detektion mit Antikörpern gegen die ausgewählten Proteine diente der Kontrolle des Probenauftrags. Zusätzlich wurden die Immunoblots der Zellextrakte mit Antikörpern gegen 2 Proteine gewählt, die nicht als PP301-spezifisch-markierte Proteine identifiziert worden waren. Dafür wurden die Immunoblots mit α -Tubulin und Creb inkubiert. In beiden Fällen war der Nachweis von biotinylierten Proteinen in den mit Streptavidin präzipitierten Extrakten negativ. Deshalb ist die unspezifische Bindung von PP301 an Proteine unwahrscheinlich. Aufgrund der PP301-spezifischen Markierung von eEF1A1 sollte die

Bindung zwischen diesem Protein und dem Inhibitor mit einer weiteren Methode überprüft werden.

3.12. Isolierung von endogenem eEF1A1 aus humanen MG-U343 Gliomazellen

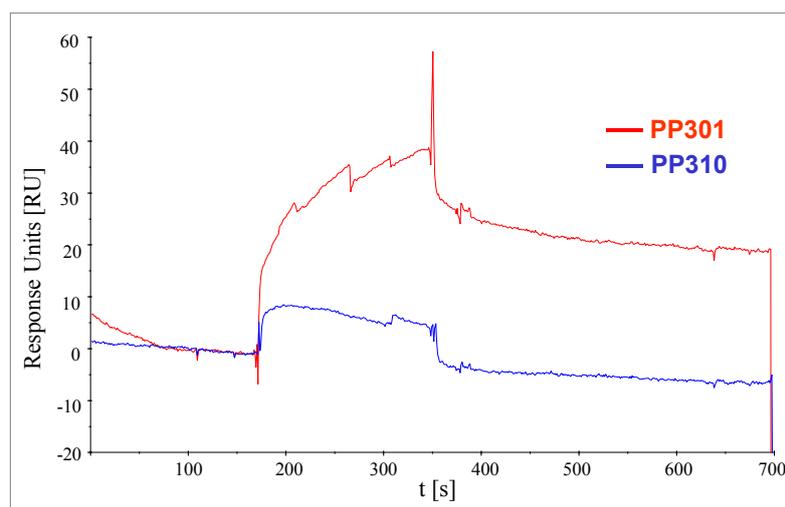
Für den *in vitro*-Nachweis der Interaktion von eEF1A1 und PP301 wurde die Technik der Oberflächenplasmonenresonanz angewandt. Bei dieser Methode wird der Inhibitor mit Hilfe des Biotins auf einen Streptavidin-Chip fixiert und nachfolgend das Protein dazugegeben. Für die Oberflächenplasmonenresonanz-Methode war es notwendig, das endogene eEF1A1-Protein anzureichern. Dafür kam zum einen die Methode der Klonierung des eEF1A1-Gens und die Überexpression in einem geeigneten Modellorganismus und zum anderen die Isolation des Proteins aus Zellen in Frage. Da eEF1A1 eines der häufigsten Proteine in der Zelle darstellt und einen Anteil von etwa 1 – 2 % des Gesamtproteins ausmacht, wurde die letztgenannte Methode ausgewählt [161]. Diese hat zudem den Vorteil, dass mögliche posttranslationale zelltypspezifische Modifikationen des Proteins, welche für die Bindung an den Inhibitor von Bedeutung sind, erhalten bleiben. Zum Zweck der Isolierung des eEF1A1-Proteins wurden 1,5 Milliarden MG-U343 Gliomazellen extrahiert. Anschließend erfolgte die Reinigung dieses Zellextrakts mit Hilfe der *Fast protein liquid chromatography* (FPLC). Für die Überprüfung des Proteingehalts der Fraktionen wurden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt. Von den so erhaltenen Gelen wurde eines mit Coomassieblau oder Silber gefärbt und das andere für eine eEF1A1-spezifische Western-Blot-Analyse verwendet (Abb. 3.22.). Die Fraktionen, welche das eEF1A1-Protein enthielten, wurden zusammengeführt und mit Hilfe von 10 kDa-CO-Mikrokonzentratoren aufkonzentriert. Die Überprüfung dieser Fraktionen bezüglich des Vorhandenseins von eEF1A1 fand mit den o.g. Methoden statt. Mittels Densitometrie konnte der prozentuale Gehalt von eEF1A1 in den Proben ermittelt werden. Nach der Isolation stand für die Oberflächenplasmonenresonanz ein Proteinextrakt mit einem Anteil an eEF1A1 von 40 % zur Verfügung, was einer Gesamtmenge von 1,2 mg eEF1A1 entsprach.



3.22. Anreicherung von eEF1A1 aus MG-U343 Gliomazellen mit Hilfe von FPLC und 10 kDa-MWCO-Mikrokonzentratoren. Es wurden jeweils 20 μg des Ausgangsextrakts mit allen löslichen Proteinen und einer Reinigungsfraktion gelelektrophoretisch aufgetrennt und nachfolgend das Gel (A) mit Silber gefärbt und (B) für die Anfertigung einer eEF1A1-spezifischen Western-Blot-Analyse verwendet.

3.13. Nachweis der Bindung von eEF1A1 und PP301 mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz

Nach der erfolgreichen Isolierung des eEF1A1-Proteins aus MG-U343 Gliomazellen fand der Nachweis der Bindung zwischen dem eEF1A1-Protein und dem Inhibitor PP301 mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz statt. Als Negativkontrolle wurde die biotinylierte Substanz PP310 mitgeführt. Als Folge einer spezifischen Bindung des Inhibitors auf die Flusszellen eines Streptavidin-Chips kann man einen Anstieg der Messeinheiten beobachten (Response Units, RU). Nach der Absättigung des Streptavidin-Chips wurde das angereicherte eEF1A1-Protein auf die Flusszellen gegeben. Im Fall einer Bindung von eEF1A1 an die Inhibitoren sollte die Anzahl der RUs signifikant ansteigen. In der Abbildung 3.23. sind die RU-Einheiten als Funktion der Zeit dargestellt.



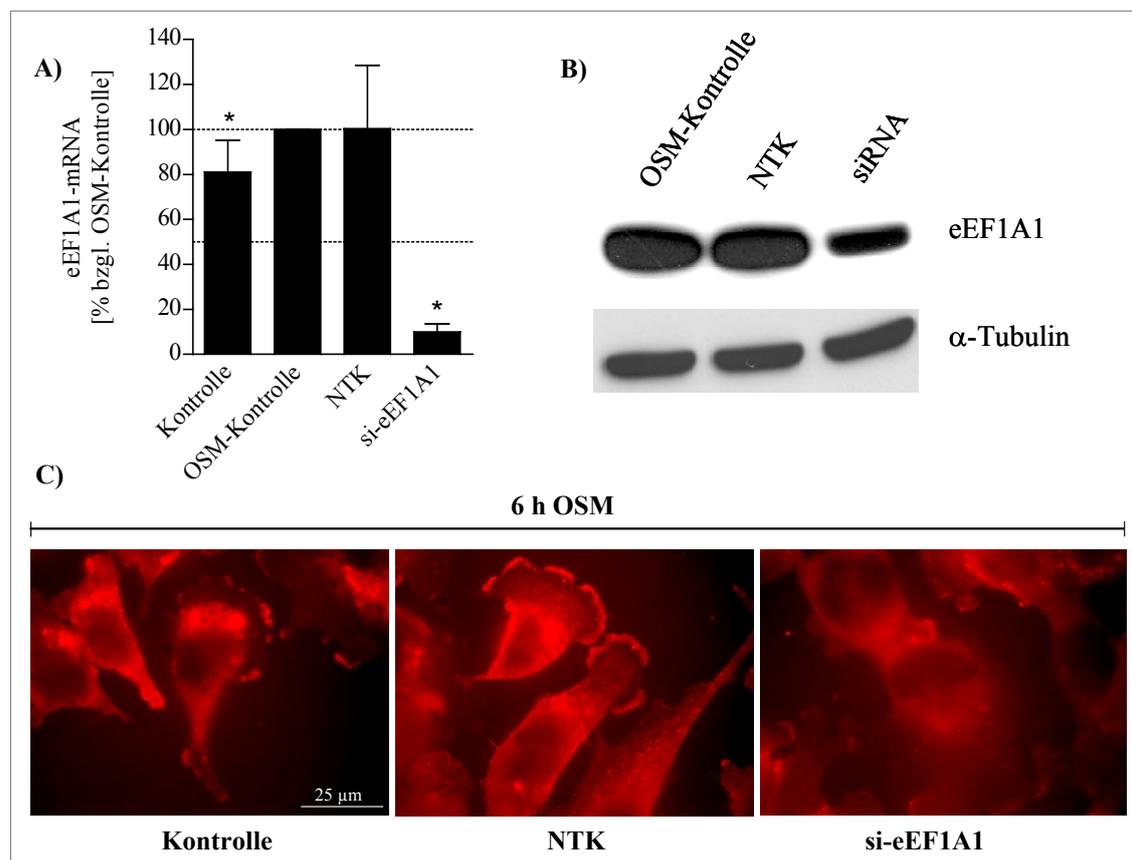
3.23. Bindung von eEF1A1 an PP301 und PP310. Die Validierung der Bindung erfolgte mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz. Nach der Fixierung der biotinylierten Inhibitoren auf die Flusszellen eines Streptavidin-Chips wurde zu diesen das gereinigte eEF1A1-Protein gegeben. Bei einer Bindung steigt die Anzahl der RUs an. Das Diagramm zeigt die RUs in Abhängigkeit der Zeit.

Wie im Diagramm dargestellt, stieg die Anzahl der RUs bei der Zugabe des eEF1A1-Proteins zu der Flusszelle mit dem Inhibitor PP301 deutlich an. Dagegen war nur eine geringe Zunahme der RUs zu beobachten, wenn das eEF1A1-Protein zu der Flusszelle mit PP310 gegeben wurde. Somit ist das Protein eEF1A1 in der Lage, spezifisch an PP301, nicht jedoch an PP310, zu binden. Das Experiment wurde 3 Mal wiederholt. Aus den Kurvenverläufen in den Diagrammen der PP301-Probe konnte eine Dissoziationskonstante (K_d) der Bindung von eEF1A1 an PP301 von 200 nM ermittelt werden. Aufgrund dieser erfolgreichen *in vitro* Bindungsstudien ist eEF1A1 als Interaktionspartner von PP301 charakterisiert worden. Nachfolgend sollte untersucht werden, ob das eEF1A1-Protein an der Regulation der OSM-stimulierten IL-6-Expression von MG-U343 Gliomazellen beteiligt ist.

3.14. Einfluss von eEF1A1 auf die IL-6-Expression

Für die Beantwortung der Frage, ob eEF1A1 neben der bekannten Funktion in der mRNA-Synthese auch für die OSM-stimulierte IL-6-Expression wichtig ist, wurde die siRNA-Technik angewandt. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, die Expression des eEF1A1-Proteins spezifisch herunter zu regulieren. Zunächst erfolgte die Validierung der Spezifität der verwendeten siRNA gegen eEF1A1 bezüglich ihres Effekts auf die Transkription der eEF1A1-mRNA bzw. der Translation des eEF1A1-Proteins. Als Kontrollen wurden eine NTK-siRNA sowie untransfizierte Zellen eingesetzt. Die Ergebnisse (Abb. 3.24.) zeigen deutlich, dass die eEF1A1-mRNA-Synthese gehemmt wurde (A) und basierend darauf auch

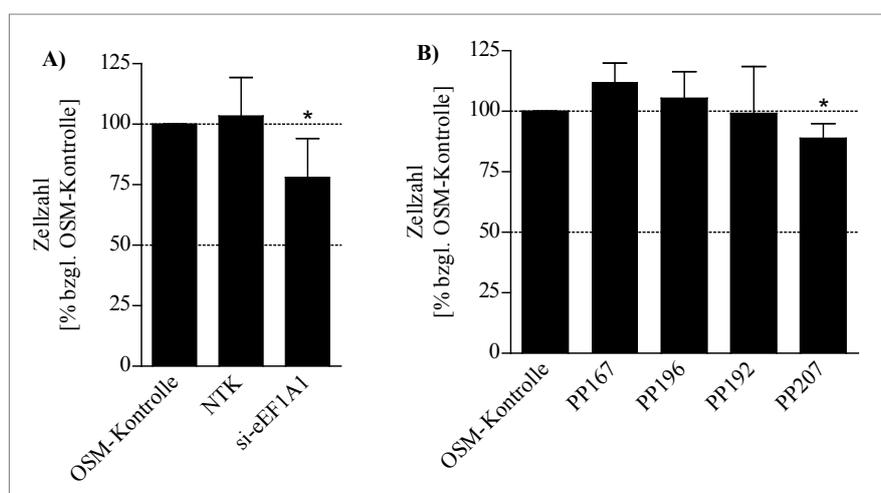
die eEF1A1-Proteinexpression signifikant inhibiert werden konnte. Dies wurde mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse und durch die Markierung der Zellen im Immunzytochemieassay verdeutlicht (B und C). Mit Hilfe der Färbung der Zellen mit einem spezifischen Antikörper gegen eEF1A1 ist die Lokalisation dieses Proteins in den äußeren Bereichen der Zellmembranen und marginal um den Zellkern zu sehen.



3.24. Untersuchung zur Effizienz von siRNA gegen eEF1A1 mittels (A) qPCR-, (B) Western-Blot- und (C) Immunzytochemie-Analyse. Die Zellen wurden mit NTK-siRNA oder spezifischer siRNA gegen eEF1A1 transfiziert. (A) Der eEF1A1-mRNA-Gehalt wurde mittels qPCR bestimmt und mit Hilfe der Genexpression von G6PDH und HPRT normiert. Dargestellt ist der relative mRNA-Gehalt im Vergleich zur OSM-stimulierten Kontrolle (Mittelwert \pm SD, $n = 3$). (B) Nach der Extraktion der löslichen Proteine wurden je 20 μ g des Gesamtproteins gelelektrophoretisch unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Hilfe eines eEF1A1-spezifischen Western-Blot analysiert. Als Referenzprotein wurde α -Tubulin herangezogen. (C) Nach der Transfektion der auf Deckgläsern kultivierten Zellen erfolgte die Fixierung mit Methanol und die Markierung mit einem primären spezifischen anti-eEF1A1-Antikörper sowie einem sekundären Cy3-konjugierten Antikörper.

Die Abbildung 3.24. (B) zeigt, dass trotz der Behandlung mit spezifischer siRNA gegen eEF1A1 das Protein in geringen Mengen in MG-U343 Gliomazellen vorhanden war. Aufgrund dieses Restproteins und der damit verbleibenden Aktivität von eEF1A1, bezüglich seiner Funktion in der mRNA-Synthese, sichert dies wahrscheinlich das Überleben der Zellen. Es wurden keine sichtbaren Unterschiede hinsichtlich der Zellmorphologie zwischen transfizierten Zellen und Kontrollzellen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnte

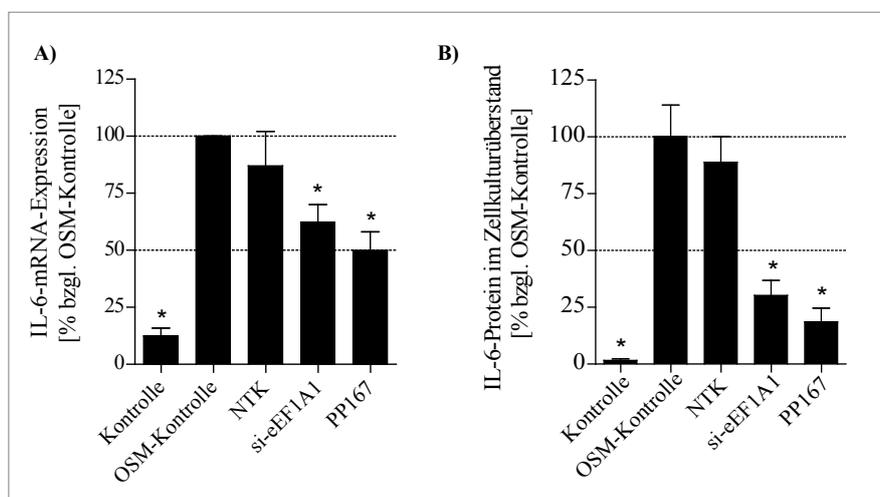
nachgewiesen werden, dass durch die siRNA-vermittelte Hemmung der eEF1A1-Expression die Proliferationsrate der Zellen um ca. 20 % abnahm (Abb. 3.25. A), was vermutlich auf einen allgemeinen Verlust der Vitalität der Zellen zurückzuführen ist und auf den funktionellen Eigenschaften des Elongationsfaktors in der Proteinbiosynthesemaschinerie beruht. Dass diese Funktionen des eEF1A1-Proteins nicht durch die 24-stündige Inkubation der Zellen mit Heteroarylketonen beeinträchtigt werden, ist im Diagramm 3.25. B erkennbar. In diesem Fall wurde die Proliferationsrate der Zellen nur in sehr geringem Maße im Vergleich zu den stimulierten Kontrollzellen modifiziert, was ein Hinweis dafür ist, dass Heteroarylketone nicht in die Funktionen von eEF1A1 in der Proteinbiosynthese eingreifen.



3.25. Einfluss von eEF1A1-spezifischer siRNA und von Heteroarylketonen auf die Proliferation OSM-stimulierter Zellen. (A) Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden mit NTK-siRNA oder spezifischer siRNA gegen eEF1A1 transfiziert. (B) Die Zellen wurden mit 20 μ M Heteroarylketon oder 0,2 % DMSO als Kontrolle für 24 Stunden inkubiert. Alle Proben wurden für 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM stimuliert. Anschließend erfolgte die Ablösung der Zellen von der Wachstumsoberfläche mit Trypsin und die Messung der Zellzahl mit Hilfe des Casy-Cellcounters. Dargestellt sind die relativen Zellzahlen der siRNA- bzw. der Heteroarylketon-behandelten Proben im Vergleich zur nicht-transfizierten bzw. zur OSM-stimulierten Kontrolle (Mittelwert \pm SD, $n \geq 2$).

Nach der erfolgreichen Validierung der spezifischen siRNA gegen eEF1A1 fand die Untersuchung der Beeinflussung von eEF1A1 auf die OSM-stimulierte IL-6-Expression in MG-U343 Gliomazellen statt. Dafür wurden die Zellen nach einer 72-stündigen Transfektion mit der siRNA gegen eEF1A1 für 6 Stunden mit OSM stimuliert. Die Quantifizierung der IL-6-Expression erfolgte auf transkriptioneller und translationaler Ebene. Neben der NTK-Probe sowie den stimulierten und unstimulierten Kontrollzellen wurden PP167-behandelte MG-U343 Gliomazellen als Vergleich mitgeführt (Abb. 3.26.). Bei der Hemmung der Transkription der eEF1A1-mRNA wurde eine Reduktion der IL-6-mRNA um 40 % erreicht (A). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit dem der PP167-behandelten Kontrolle. Der Hemmung der mRNA-Expression folgend nahm auch die IL-6-Proteinsekretion durch die

Behandlung mit spezifischer siRNA gegen eEF1A1 um bis zu 70 % ab (B). Übereinstimmend damit wiesen die PP167-behandelten Zellen eine Reduktion des sekretierten IL-6-Proteins von 80 % gegenüber der stimulierten Kontrolle auf.



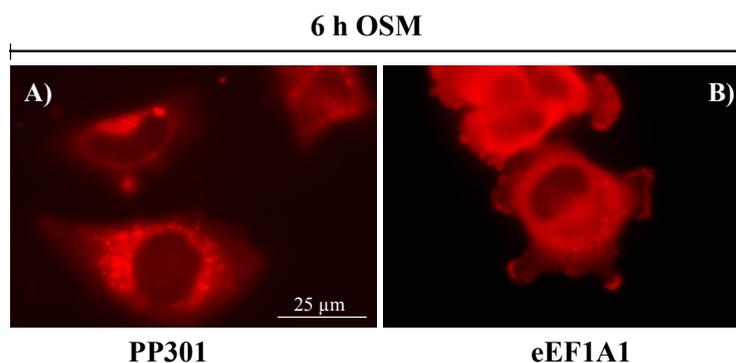
3.26. Einfluss von eEF1A1 auf die OSM-stimulierte IL-6-Expression. Die Zellen wurden mit NTK- oder spezifischer siRNA gegen eEF1A1 transfiziert. Die Transfektion der Kontrollen erfolgte ohne siRNA. Danach fand die 6-stündige Inkubation der Zellen mit 20 μ M PP167 oder 0,2 % DMSO als Kontrolle in serumfreiem Medium sowie 100 ng/ml OSM statt. (A) Der IL-6-mRNA-Gehalt wurde mittels qPCR bestimmt und mit Hilfe der Genexpression von G6PDH und HPRT normiert. (B) Die Bestimmung der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand erfolgte mit Hilfe eines hIL-6-ELISA. Dargestellt sind jeweils die relativen IL-6-mRNA- bzw. Proteingehalte im Vergleich zur OSM-stimulierten Kontrolle (Mittelwert \pm SD, $n \geq 2$).

Obwohl die transfizierten MG-U343 Gliomazellen, wie oben beschrieben, noch über geringe Konzentrationen des eEF1A1-Proteins verfügen, wurde die Inhibierung der IL-6-Expression durch die Herunterregulation des eEF1A1-Proteins nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigen, dass eEF1A1 an der Hemmung der OSM-stimulierten IL-6-Expression beteiligt ist. Demnach könnte die Sekretion des IL-6-Proteins durch die Bindung von Heteroarylketonen an eEF1A1 modifiziert werden.

3.15. Lokalisation des eEF1A1-Proteins im Vergleich zum biotinylierten

Inhibitor PP301

Bei einer Interaktion des eEF1A1-Proteins mit den Heteroarylketonen ist die gemeinsame intrazelluläre Lokalisation naheliegend. Für die Überprüfung dessen sollten Koloalisionsstudien durchgeführt werden. Diese waren jedoch aufgrund der notwendigen unterschiedlichen Fixierungslösungen für die jeweiligen Antikörper nicht möglich. Deshalb wurden die Zellen getrennt markiert. Eine Gegenüberstellung der Markierungen zeigt Abbildung 3.27.

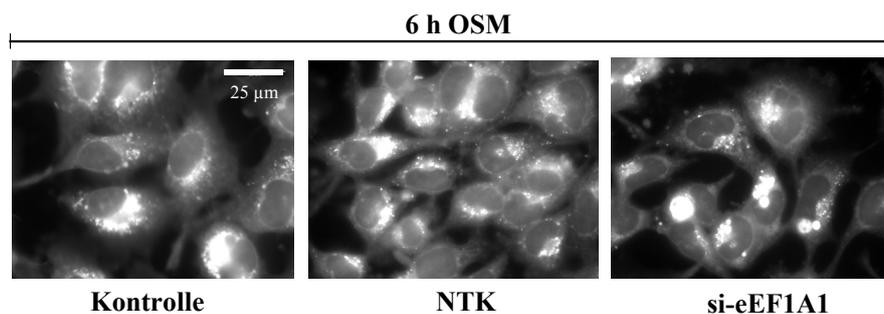


3.27. Intrazelluläre Lokalisation von PP301 und eEF1A1 in OSM-stimulierten Zellen. (A) Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM und 40 µM PP301 inkubiert. Nach der 10-minütigen Bestrahlung mit UV-Licht folgte die Fixierung mit 4 % PFA und die Markierung der Zellen durch Cy3-konjugiertes Streptavidin. (B) Die Zellen wurden mit spezifischer siRNA gegen eEF1A1 transfiziert und nach der Fixierung mit Methanol mit einem primären spezifischen anti-eEF1A1-Antikörper sowie einem sekundären Cy3-konjugierten Antikörper markiert. Die Bildaufnahme erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop.

Es ist zu sehen, dass der Elongationsfaktor eEF1A1 perinukleär, im Zytoplasma sowie in den Zellfortsätzen lokalisiert ist. Diese verschiedenen Lokalisationen deuten auf die multifunktionellen Eigenschaften des Proteins hin. Die perinukleäre Färbung konnte auch mit dem Inhibitor PP301 beobachtet werden. Wie zuvor untersucht, entspricht dies einer Kompartimentierung im ER bzw. in den späten Endosomen. Die perinukleäre Markierung war mit beiden verwendeten Antikörpern zu sehen. Demnach liegt das biotinylierte Heteroarylketon PP301 mit hoher Wahrscheinlichkeit mit dem eEF1A1-Protein kolokalisiert vor.

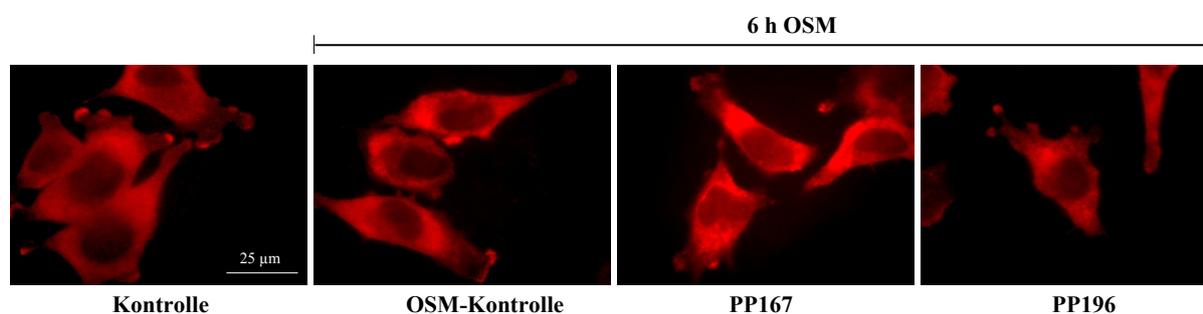
3.16. Abhängigkeit der PP301-spezifischen Markierung von eEF1A1

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde die Abhängigkeit des PP301-spezifischen Markierungsmusters in MG-U343 Gliomazellen vom eEF1A1-Protein untersucht. Dies fand ebenfalls durch den Einsatz der spezifischen siRNA gegen eEF1A1 statt. Wenn eine Kolokalisation des biotinylierten Inhibitors PP301 mit dem eEF1A1-Protein vorliegt, so sollte die PP301-spezifische Markierung der Zellen nach der siRNA-vermittelten Herunterregulation von eEF1A1 modifiziert werden. Die Detektion des Biotins erfolgte mit Cy3-konjugiertem Streptavidin (Abb. 3.28.).



3.28. Modifikation der PP301-spezifischen Markierung OSM-stimulierter Zellen durch die siRNA-vermittelte Herunterregulation von eEF1A1. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden mit NTK- oder spezifischer siRNA gegen eEF1A1 transfiziert bzw. lediglich mit Transfektionsreagenz (Kontrolle) behandelt. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen mit 100 ng/ml OSM und 40 µM PP301 über einen Zeitraum von 6 Stunden. Nach der 10-minütigen Bestrahlung mit UV-Licht fand die Fixierung mit 4 % PFA und Cy3-konjugiertem Streptavidin statt. Die Bildaufnahme erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop.

Die PP301-behandelten Kontrollzellen wiesen eine typische perinukleäre Lokalisation auf, die die späten Endosomen und das ER kennzeichnet. Die Markierungen wurden nicht durch die Transfektion mit NTK-siRNA verändert (Abb. 3.28.). Dagegen führte die siRNA-vermittelte Hemmung der eEF1A1-Expression zu einer dramatischen Veränderung. Obwohl der Inhibitor PP301 wie zuvor perinukleär lokalisiert ist, akkumulierte er in diesem Fall in großen, einzelnen, vesikulären Strukturen. Somit wurde die PP301-spezifische Markierung durch die Herunterregulation der eEF1A1-Expression verändert. Die Modifikation des Markierungsmusters unterstützt die Ergebnisse der *in vitro*-Experimente zur Bindung von PP301 an das eEF1A1-Protein. Zusätzlich zu diesen Ergebnissen sollte der Einfluss von Heteroarylketonen auf die Lokalisation des eEF1A1-Proteins untersucht werden. Dafür wurden die Zellen mit den nicht-biotinylierten Inhibitoren PP167 und PP196 inkubiert und im Anschluss daran das eEF1A1-Protein markiert (Abb. 3.29.).

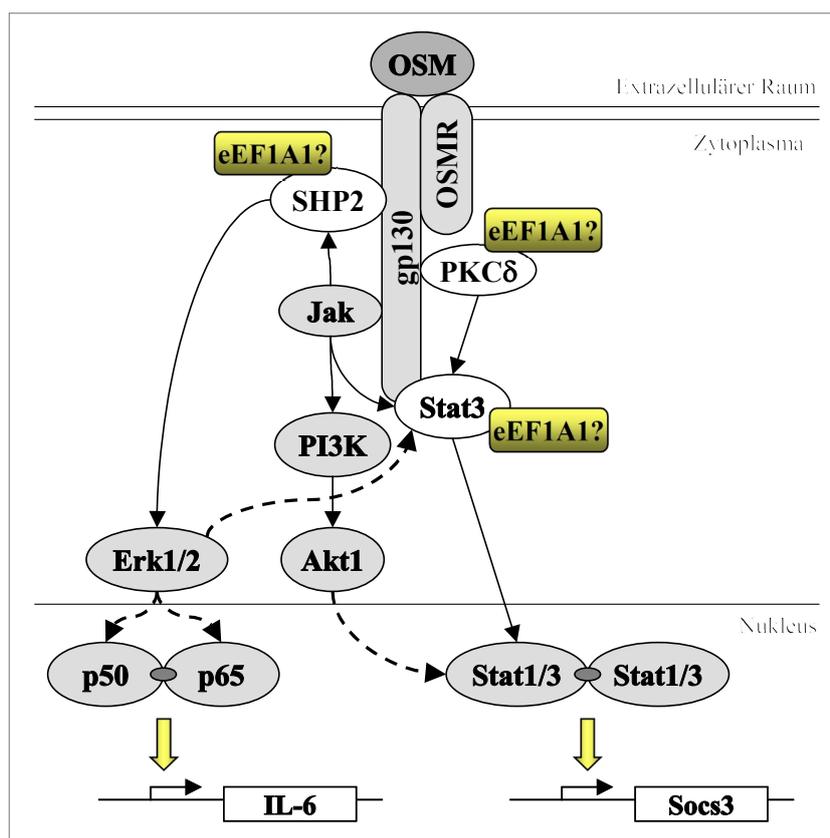


3.29. Modifikation der eEF1A1-spezifischen Markierung von OSM-stimulierten Zellen durch Heteroarylketone. Die Zellen wurden 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM und 20 µM Heteroarylketon oder 0,2 % DMSO (Kontrolle) inkubiert. Anschließend fand die Fixierung der Zellen mit Methanol und die Markierung mit einem primären spezifischen anti-eEF1A1-Antikörper sowie einem sekundären Cy3-konjugierten Antikörper statt. Die Bildaufnahme erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop.

Es wurde weder durch die OSM-Stimulation noch durch die Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren eine Modifikation der Lokalisation des eEF1A1-Proteins erreicht. Demzufolge haben Heteroarylketone keinen Einfluss auf die Verteilung dieses Proteins in der Zelle. Aufgrund der Bindung des eEF1A1-Proteins an den Inhibitor PP301 wurde der zugrunde liegende molekulare Mechanismus der Beeinflussung der OSM-stimulierten IL-6-Expression durch Heteroarylketone untersucht. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse vorgestellt.

D. Molekularer Wirkmechanismus der Beeinflussung der OSM-stimulierten IL-6-Expression durch Heteroarylketone in humanen MG-U343 Gliomazellen

Aus der Literatur ist bekannt, dass durch die Bindung von OSM an den Rezeptorkomplex gp130/OSMR bzw. gp130/LIFR verschiedene Signalkaskaden ausgelöst werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte belegt werden, dass der Rezeptorkomplex gp130/LIFR nur eine geringfügige Bedeutung in der OSM-vermittelten IL-6-Sekretion von MG-U343 Gliomazellen hat (Daten nicht gezeigt). Daher wurden die nachfolgenden Untersuchungen ausschließlich auf den gp130/OSMR-Rezeptorkomplex bezogen. Ausgehend von der Aktivierung der Januskinasen (JAKs) Jak1, Jak2 und Tyk2 werden die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP2, die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) sowie der Transkriptionsfaktor *Signal transducer and activator 3* (Stat3) phosphoryliert. Die aktivierte PI3K verursacht die Phosphorylierung der Akt-Kinase, welche ihrerseits über die Aktivierung der mTor-Kinase unter anderem die Phosphorylierung von Stat1 und Stat3 bewirkt. Neben diesem Signalweg kann Stat3 auch durch andere Kinasen, wie z.B. die Proteinkinase C delta (PKC δ) oder direkt durch die Bindung an gp130 phosphoryliert werden [15, 16, 25, 57]. Die Phosphorylierung von SHP2 führt über die Anschaltung des Ras/Raf/Erk-Signalwegs zur Aktivierung von Stat3 und den NF κ B-Transkriptionsfaktoren. Aufgrund der Phosphorylierung von I κ B α findet die Freisetzung der NF κ B-Dimere statt, die daraufhin in den Zellkern translozieren können. Sowohl NF κ B als auch Stat3 sind in der Lage, die Expression des IL-6-Gens zu regulieren (Abb. 3.30.). Dabei können die NF κ B-Komponenten, am häufigsten tritt das Dimer aus p50 und p65 auf, direkt an ein κ B-Element des IL-6-Promotors binden, während die Aktivierung von Stat3 zu einer Erhöhung der transkriptionellen Aktivität der Promotoren mit einer Stat3-Konsensussequenz führt [134, 162-164]. Zu diesen gehört u.a. das Socs3-Protein (*Suppressor of cytokine signalling*), welches als Negativregulator der IL-6-Genexpression fungiert [67, 165, 166].



3.30. Schema der OSM-induzierten Signalkaskade (modifiziert nach [15]).

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen multifunktionellen Eigenschaften des eEF1A1-Proteins sind mehrere Möglichkeiten der Einflussnahme dieses Proteins auf die Regulation der oben beschriebenen OSM-induzierten Signalwege denkbar. So konnte gezeigt werden, dass eEF1A1 in der Lage ist, mit der SHP2-Phosphatase zu interagieren. Diese Interaktion wird durch die Bindung eines phosphorylierten Tyrosins von eEF1A1 an die SH2-Domänen von SHP2 ermöglicht [146]. Wenn die Bindung zwischen der SHP2-Phosphatase und eEF1A1 durch Heteroarylketone modifiziert werden würde, so hätte dies Auswirkungen auf die Aktivierung des Ras/Raf/Erk-Signalwegs und somit auf die Phosphorylierung von Stat3 und NFκB. Neben der SHP2-Phosphatase verfügt auch das Stat3-Protein selbst über eine SH2-Domäne. Demzufolge wäre die direkte Beeinflussung der Stat3-Aktivierung durch die Interaktion zwischen Heteroarylketonen und eEF1A1 vorstellbar. Außerdem wurde in der Literatur die Bindung von eEF1A1 an PKCδ beschrieben [167]. Aus diesem Grund könnte die PKCδ-vermittelte Stat3-Aktivierung ein weiterer Prozess sein, der durch Heteroarylketone beeinflusst wird (Abb. 3.30.). Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur Einflussnahme der an der OSM-Signalkaskade beteiligten Proteine auf die OSM-induzierte IL-6-Expression dargestellt.

3.17. Einfluss von ausgewählten Proteinen auf die OSM-stimulierte IL-6-mRNA-Expression

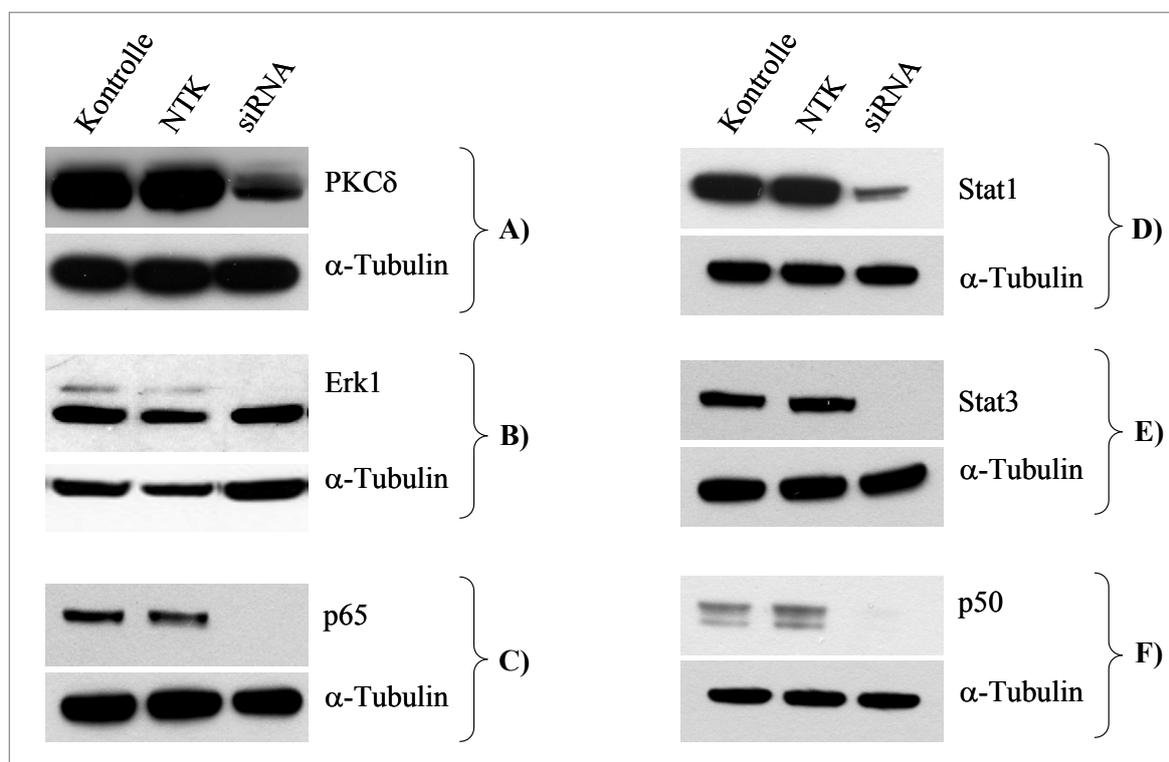
Wie zuvor dargestellt sind 3 Signalwege bekannt, die durch die Stimulation mit OSM angeschaltet werden. Um zu überprüfen, welche der oben genannten Mitglieder der OSM-vermittelten Signalkaskade an der IL-6-Expression zum Zeitpunkt von 6 Stunden nach der OSM-Stimulation in humanen MG-U343 Gliomazellen beteiligt sind, wurde die Expression dieser Proteine mit Hilfe der siRNA-Technik herunterreguliert. Nach der 72-stündigen Transfektion der Zellen mit den entsprechenden siRNAs erfolgte die OSM-Stimulation der Zellen für 6 Stunden (Tab. 3.31.). Zum Vergleich wurden eine Transfektionskontrolle und eine NTK-Kontrolle mitgeführt. Für die Validierung der spezifischen siRNAs fand die Untersuchung der Effizienz dieser auf transkriptioneller und translationaler Ebene statt. Als Referenzgene für die qPCR-Analyse diente die Expression der mRNAs von G6PDH und HPRT.

3.31. Untersuchungen zur Effizienz spezifischer siRNA gegen verschiedene OSM-Signalkaskadenkomponenten mittels qPCR. Die Zellen wurden mit spezifischer siRNA der unten angegebenen Proteine sowie mit NTK-siRNA transfiziert. Anschließend fand die OSM-Stimulation für 6 Stunden statt. Die Menge der jeweiligen mRNA wurde mittels qPCR bestimmt und mit Hilfe der Genexpression von G6PDH und HPRT normiert. Dargestellt sind die relativen mRNA-Gehalte im Vergleich zur nicht transfizierten Kontrolle (Mittelwert \pm SD, $n \geq 2$). Die Werte der mitgeführten NTK-Proben wurden nicht aufgelistet.

siRNA	Rest-mRNA-Gehalt [% bzgl. Kontrolle \pm SD]
gp130	4,1 \pm 2,3
OSMR	9,1 \pm 3,3
Erk1	7,9 \pm 4,1
Erk2	9,8 \pm 2,6
p65	13,3 \pm 4,8
p50	28,1 \pm 3,9
PKC δ	19,6 \pm 4,1
Stat1	11,2 \pm 3,8
Stat3	18,1 \pm 6,4
Socs3	19,4 \pm 7,2

Wie die Auswertung der qPCR zeigte, konnte durch den Einsatz der spezifischen siRNA der OSM-Signalkaskadenkomponenten deren mRNA-Expression um mindestens 70 % inhibiert werden (Tab. 3.31.). Aufgrund der verringerten mRNA-Transkriptionsrate sank auch die Expression der entsprechenden Proteine signifikant ab (Abb. 3.32. und 3.33.). Das α -Tubulin-

Protein wurde in den Western-Blot-Analysen als Referenz für die Proteinexpression der siRNA-behandelten Proben verwendet.

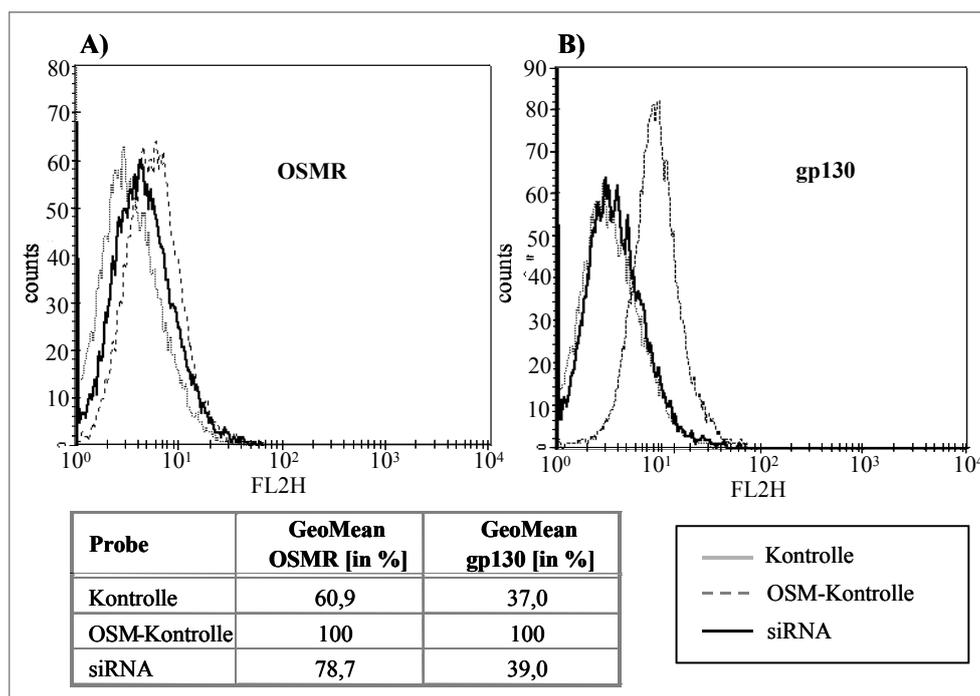


3.32. Analyse der Effizienz spezifischer siRNA ausgewählter OSM-Signalkaskadekomponenten mittels Western-Blot. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit spezifischer siRNA gegen A) PKC δ , B) Erk1, C) p65, D) Stat1, E) Stat3 und F) p50 sowie NTK-siRNA transfiziert. Nach der 6-stündigen OSM-Stimulation fand die Extraktion der löslichen Proteine statt. Dann wurden je 20 μ g des Gesamtproteins in einem spezifischen Western-Blot analysiert. Die Detektion der o.g. Proteine erfolgte mit einem sekundären HRP-konjugierten Antikörper. Als Referenz wurde die Proteinexpression von α -Tubulin herangezogen.

In den abgebildeten proteinspezifisch markierten Immunoblots waren die Signale der Kontrolle und von NTK ähnlich stark ausgeprägt, während die der siRNA Proben jeweils schwächer oder gar nicht vorhanden waren. Die Signale des Referenzproteins α -Tubulin sind dagegen in allen Proben nahezu identisch. Für das Socs3-Protein konnte keine Western-Blot-Analyse erstellt werden, da alle getesteten anti-Socs3-Antikörper lediglich unspezifische Signale detektierten.

Im Fall der Rezeptorkomponenten OSMR und gp130 wurde die Expression mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. In den Histogrammen ist jeweils die Intensität des Fluoreszenzsignals gegen die Anzahl der Ereignisse dargestellt (Abb. 3.33.). Je weiter die Graphen nach rechts verschoben sind, desto stärker war die Fluoreszenz pro Zelle (MFI) und desto häufiger wurde die jeweilige Rezeptorkomponente auf der Zelloberfläche exprimiert. In

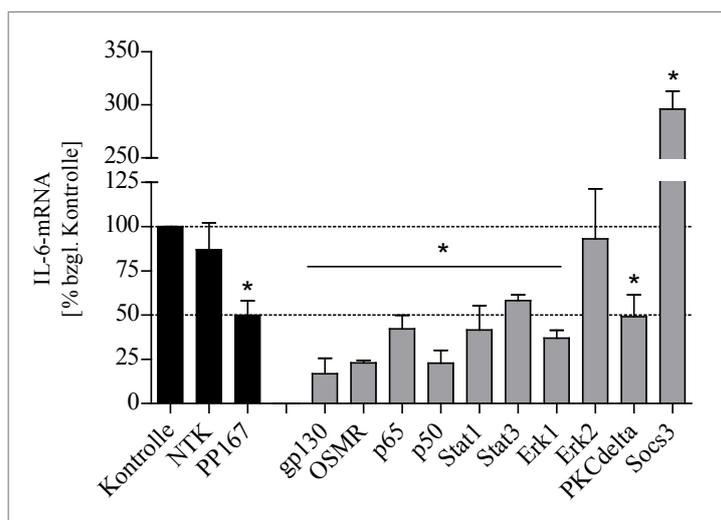
der dazugehörigen Tabelle sind die relativen geometrischen Mittel der siRNA-behandelten Proben gegenüber der OSM-stimulierten Kontrolle aufgelistet.



3.33. Untersuchung der Oberflächenexpression der Rezeptorkomponenten gp130 und OSMR mittels FACS-Analyse nach siRNA-Transfektion und OSM-Stimulation. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit spezifischer siRNA gegen (A) OSMR und (B) gp130 transfiziert. Nach der 6-stündigen OSM-Stimulation fand die Ablösung der Zellen mit Accutase und die Markierung der Zellen mit (A) einem anti-OSMR-PE-konjugierten Antikörper oder (B) einem anti-gp130- PE-konjugierten Antikörper statt. In beiden Versuchen wurde eine IgG-Isotypkontrolle mitgeführt. Die Auswertung der Fluoreszenzmarkierung der Zellen erfolgte mit Hilfe des Durchflusszytometers FACS Calibur. Im Histogramm wurde die Fluoreszenzintensität (MFI, X-Achse) gegen die Anzahl der Ereignisse (Y-Achse) aufgetragen.

Die Expressionen des OSMR- und des gp130-Proteins konnten durch die Inkubation der Zellen mit OSM um 39 % und um 63 % gesteigert werden. Mit Hilfe der siRNA-Technik wurde die Expression auf 79 % (OSMR) und 39 % (gp130) des Werts der OSM-stimulierten Kontrolle herunterreguliert.

Nach der erfolgreichen Validierung der siRNAs wurden diese mit Hilfe der qPCR-Technik auf den Effekt im Hinblick auf die IL-6-mRNA-Expression in MG-U343 Gliomazellen untersucht (Abb. 3.34.). Die spezifische siRNA von gp130 und OSMR wurde eingesetzt, weil die Aktivierung des Rezeptorkomplexes den Ausgangspunkt für alle 3 Signalwege darstellt. Durch die Transfektion von MG-U343 Gliomazellen mit diesen siRNAs konnte tatsächlich eine Reduktion der OSM-induzierten IL-6-mRNA um bis zu 80 % gezeigt werden. Außer der Erk2-Kinase hatten alle ausgewählten Proteine einen Einfluss auf die Synthese der IL-6-mRNA. Zusätzlich wurden die Zellen mit einer spezifischen siRNA gegen das Socs3-Protein transfiziert, um den Einfluss des Negativregulators der IL-6-Expression zu überprüfen.



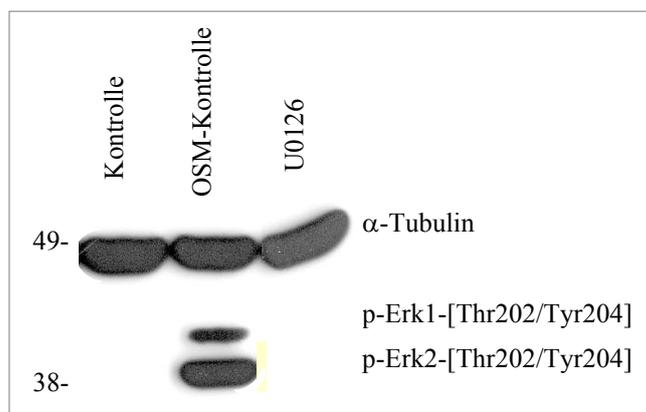
3.34. Einfluss von spezifischer siRNA gegen ausgewählte Komponenten der OSM-Signalkaskade auf die IL-6-mRNA-Expression mittels qPCR. Die Zellen wurden mit spezifischer siRNA gegen verschiedene Proteine (siehe X-Achse) und mit einer NTK-siRNA transfiziert. Im Fall der PP167 Probe erfolgte die Behandlung mit 20 μ M PP167. Alle Zellen wurden 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM stimuliert. Der IL-6-mRNA-Gehalt wurde mittels qPCR bestimmt und mit Hilfe der Genexpression von G6PDH und HPRT normiert. Dargestellt sind jeweils die relativen IL-6-mRNA-Gehalte im Vergleich zur OSM-stimulierten Kontrolle (Mittelwert \pm SD, $n \geq 2$).

Durch die Inkubation der Zellen mit der entsprechenden siRNA wurde eine Inhibierung der IL-6-Expression zwischen 40 und 75 % erreicht. Die Wirkung dieser siRNAs auf die IL-6-mRNA-Synthese ist vergleichbar mit der von PP167 (vgl. Abb. 3.26., Reduzierung um 50 %). Außer der Erk2-Kinase spielen demnach alle Proteine der oben dargestellten Signalwege in der IL-6-Expression im Zeitfenster von 6 Stunden nach der OSM-Stimulation in MG-U343 Gliomazellen eine wichtige Rolle. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren Stat1 und Stat3 neben ihrer beschriebenen Funktion als Negativregulatoren der IL-6-Expression durch die Erhöhung der Proteinexpression von Socs3 auch eine Wirkung als Positivregulatoren in der OSM-Signalkaskade ausüben [168, 169].

3.18. Beeinflussung der OSM-vermittelten Phosphorylierung der Erk1-Kinase durch Heteroarylketone

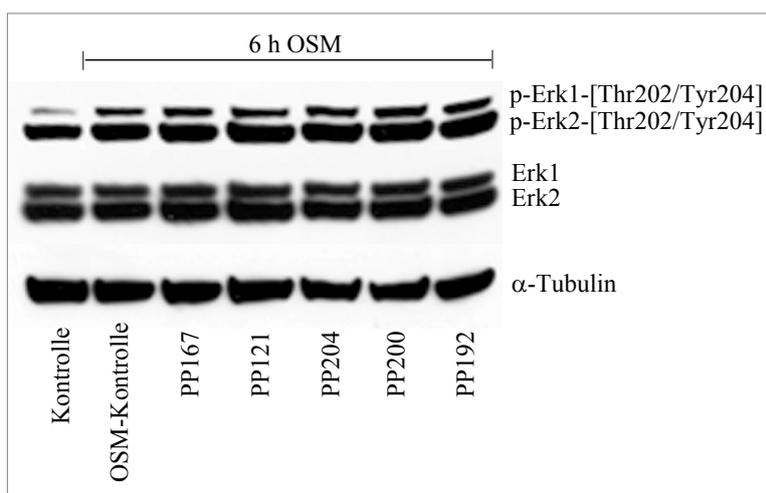
Um die Einflussnahme von Heteroarylketonen auf die Erk1-Kinase-Aktivierung zu zeigen, wurde überprüft, ob diese durch OSM aktiviert wird. Eine Aktivierung findet dabei durch die Phosphorylierung der Erk1-Kinase an den Aminosäuren Threonin 202 und Tyrosin 204 statt. Das Experiment wurde mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse durchgeführt, in dem Zellextrakt von unstimulierten, OSM-stimulierten und U0126-behandelte Zellen eingesetzt

wurde. Die Substanz U0126 diente als Kontrolle, da sie einen spezifischen Inhibitor der Erk1/2-Phosphorylierung darstellt [170].



3.35. Einfluss von OSM auf die Phosphorylierung der Erk1-Kinase. Die Zellen wurden für 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM und parallel dazu mit 10 μ M U0126 bzw. 0,1 % DMSO inkubiert. Nach der Extraktion der löslichen Proteine wurde je 20 μ g Gesamtproteinextrakt in einem Western-Blot analysiert. Zur Detektion wurde ein phosphospezifischer anti-Erk1/2-Antikörper sowie ein sekundärer HRP-konjugierter Antikörper verwendet. Die Proteinexpression von α -Tubulin wurde als Referenz herangezogen.

Das Ergebnis des phosphospezifischen Immunoblots in Abb. 3.35. zeigt, dass die Phosphorylierung der Erk1-Kinase an den Aminosäuren Threonin 202 und Tyrosin 204 nach 6 Stunden OSM-Stimulation erfolgte. Diese konnte durch die Inkubation der Zellen mit dem spezifischen Erk1/2-Inhibitor U0126 gehemmt werden. Weiterhin sollte der Einfluss von Heteroarylketonen auf die phosphorylierte Erk1-Kinase nach der OSM-Stimulation untersucht werden (Abb. 3.36.).

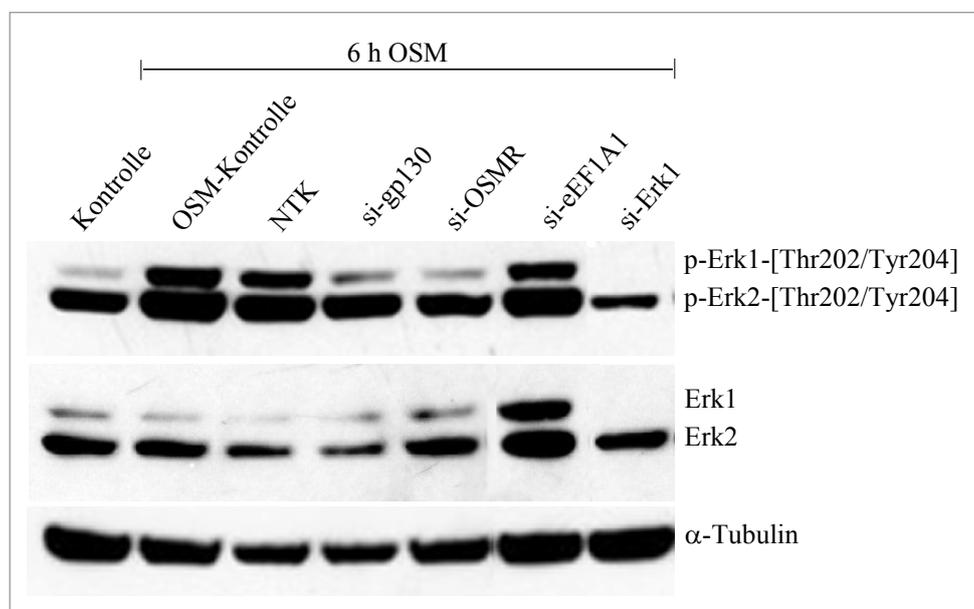


3.36. Analyse des Einflusses von IL-6-bioaktiven und IL-6-unwirksamen Heteroarylketonen auf die OSM-induzierte Phosphorylierung der Erk1/2-Kinase mittels Western-Blot. Die Zellen wurden für 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM und parallel mit je 20 μ M Heteroarylketon inkubiert. Nach der Extraktion der löslichen Proteine wurden je 20 μ g Gesamtproteinextrakt in einem Western-Blot analysiert. Zur Detektion wurde ein phosphospezifischer anti-Erk1/2-Antikörper sowie ein sekundärer HRP-konjugierter Antikörper verwendet. Die Proteinexpression von α -Tubulin diente als Referenz.

Für die Untersuchung fand die Behandlung der OSM-stimulierten Zellen mit den Heteroarylketonen PP167, PP121, PP204 und PP200 (IL-6-bioaktiv) sowie PP192 (IL-6-unwirksam) statt. Als Beladungskontrolle für die Western-Blot-Analyse wurden Antikörper gegen das Erk1-Protein sowie das α -Tubulin-Protein eingesetzt.

Im oben abgebildeten Immunoblot ist die Aktivierung der Erk1-Kinase in Abhängigkeit einer 6-stündigen OSM-Stimulation zu sehen. Die phosphospezifischen Erk1-Signale wurden durch die Inkubation der Zellen mit Heteroarylketonen nicht modifiziert. Auch die Expression des Erk1-Proteins blieb durch die Heteroarylketon-Behandlung unbeeinflusst. Somit wurde nachgewiesen, dass sowohl IL-6-bioaktive als auch IL-6-unwirksame Heteroarylketone keinen Einfluss auf die OSM-vermittelte Aktivierung des Erk1-Proteins bezüglich der Phosphorylierungen an den Aminosäuren Threonin 202 und Tyrosin 204 in MG-U343 Gliomazellen haben.

Ebenso wurde die Beeinflussung des Interaktionspartners der Heteroarylketone eEF1A1 auf die Aktivierung der Erk1-Kinase untersucht. Dafür fand die Transfektion der Zellen mit spezifischer siRNA gegen die Proteine gp130, OSMR, eEF1A1 und Erk1 sowie mit NTK-siRNA statt. Im Anschluss daran erfolgte die 6-stündige Stimulation der transfizierten Zellen mit OSM und deren Analyse mittels Western-Blot. Als Kontrolle diente wiederum die Proteinexpression von α -Tubulin sowie der Erk1-Kinase (Abb. 3.37.).

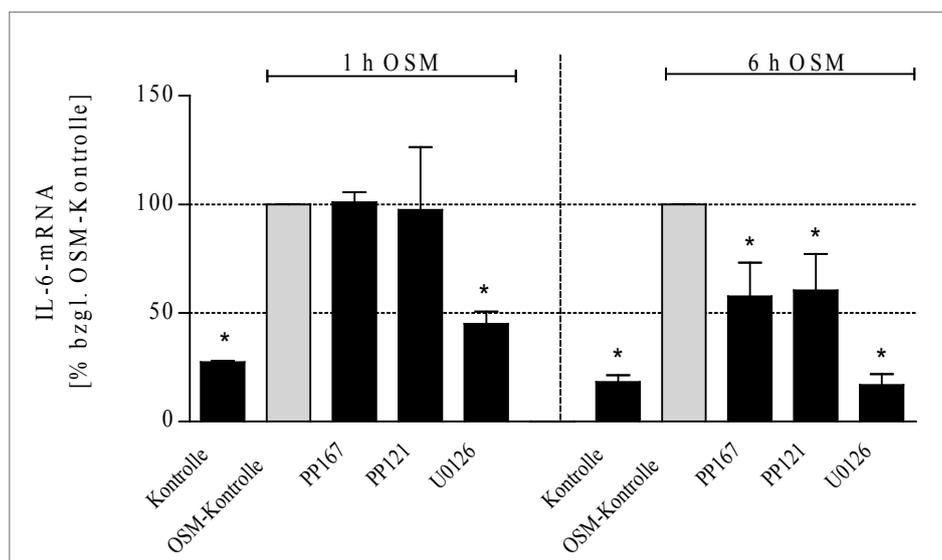


- 3.37. Analyse des Einflusses der Herunterregulation von gp130, OSMR und eEF1A1 auf die OSM-induzierte Phosphorylierung der Erk1/2-Kinase mittels Western-Blot-Analyse.** Die Transfektion der Zellen erfolgte mit den oben genannten siRNAs. Als Kontrollen wurden eine spezifische siRNA gegen Erk1 sowie die NTK-siRNA mitgeführt. Anschließend fand die 6-stündige Stimulation mit 100 ng/ml OSM statt. Nach der Extraktion der löslichen Proteine wurden je 40 μ g Gesamtproteinextrakt in einem Western-Blot analysiert. Zur Detektion wurden spezifische Erk1/2-Antikörper sowie sekundäre HRP-konjugierte Antikörper verwendet. Die Proteinexpression des Proteins α -Tubulin diente als Referenz.

Die Abbildung 3.37. zeigt, dass die Herunterregulation der eEF1A1-Expression keinen Effekt auf die Phosphorylierung des Erk1-Proteins an den Aminosäuren Threonin 202 und Tyrosin 204 hat. Dagegen konnte durch die Inkubation der Zellen mit der spezifischen siRNA der Proteine gp130 und OSMR eine starke Verminderung der entsprechenden Phosphorylierungen der Erk1-Kinase erreicht werden. Als Kontrolle für die Signalspezifität wurden Erk1-siRNA transfizierte Zellen verwendet. In diesem Fall war der Nachweis der Erk1-Kinase nicht möglich. Die Detektion des Erk1-Proteins zeigte, dass alle transfizierten Zellen, außer den si-eEF1A1-behandelten Proben, über vergleichbare Mengen dieses Proteins verfügen. Durch die Herunterregulation des eEF1A1-Proteins wurde die Expression dieser Kinase erhöht, was auf eine Funktion des eEF1A1-Proteins als Negativregulator der Erk1-Kinase hinweist. Mit Hilfe des Referenzproteins α -Tubulin konnte nachgewiesen werden, dass in allen Proben ähnliche Proteinmengen untersucht wurden.

Aufgrund der Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen wird deutlich, dass die Phosphorylierung der Erk1-Kinase an den Aminosäuren Threonin 202 und Tyrosin 204 unabhängig von der Inkubation von MG-U343 Gliomazellen mit Heteroarylketonen und der eEF1A1-Expression erfolgt.

Parallel dazu wurde festgestellt, dass sich das Wirkprinzip von Heteroarylketonen von dem des Erk1/2-spezifischen Inhibitors U0126 unterscheidet (Abb. 3.38.).



3.38. Zeitabhängige Hemmung der IL-6-mRNA-Expression durch den spezifischen Erk1/2-Kinase-Inhibitor U0126 im Vergleich zu Heteroarylketonen. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von einer und 6 Stunden mit 20 μ M Heteroarylketon, 10 μ M U0126 oder 0,2 % DMSO als Kontrolle in serumfreiem Medium inkubiert. Parallel dazu erfolgte die Stimulation der Zellen mit 100 ng/ml OSM. Der IL-6-mRNA-Gehalt wurde mittels qPCR bestimmt und mit Hilfe des mRNA-Gehalts von G6PDH, GAPDH und HPRT normiert. Dargestellt ist der relative IL-6-mRNA-Gehalt im Vergleich zur OSM-stimulierten Kontrolle (Mittelwert \pm SD, $n \geq 2$).

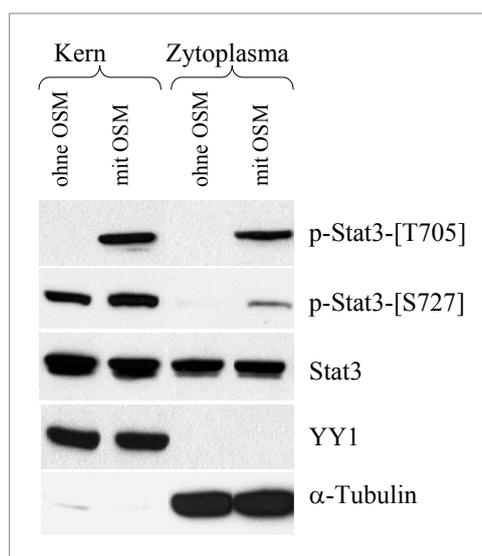
Während Heteroarylketone (vgl. Kap. 3.4.) nur in der Lage sind, den zweiten Anstieg der IL-6-mRNA-Synthese zu inhibieren, bleibt die erste Erhöhung der IL-6-mRNA-Synthese unbeeinflusst. In der Abbildung 3.38. sind die relativen Mengen der IL-6-mRNA von Heteroarylketon- und U0126-behandelten MG-U343 Gliomazellen nach der OSM-Stimulation für eine bzw. 6 Stunden dargestellt. Die stimulierten Kontrollen wurden 100 % gesetzt. Gegenüber den Ergebnissen mit Heteroarylketonen war durch die Inkubation der Zellen mit dem spezifischen Erk1/2-Inhibitor U0126 die signifikante Hemmung der OSM-induzierten Erhöhung der IL-6-mRNA-Expression zu beiden Zeitpunkten möglich.

Wie in Schema 3.30. gezeigt, hängt die Aktivierung des Ras/Raf/Erk-Signalwegs von der Aktivierung der SHP2-Phosphatase ab. Aufgrund der SH2-Domänen dieser Phosphatase bindet das eEF1A1-Protein an SHP2 [146]. Diese Bindung bzw. die OSM-vermittelte Aktivierung von SHP2 wird jedoch nicht durch die Interaktion zwischen eEF1A1 und Heteroarylketonen beeinträchtigt. Demzufolge basiert die Inhibition der IL-6-Expression in MG-U343 Gliomazellen durch Heteroarylketone nicht auf der Modifizierung der Bindung des eEF1A1-Proteins an die SHP2-Phosphatase. Der Hemmung der IL-6-Expression durch bioaktive Heteroarylketone muss somit ein anderer molekularer Wirkmechanismus zugrunde liegen.

3.19. Einfluss von Heteroarylketonen auf die OSM-induzierte Stat3-Phosphorylierung

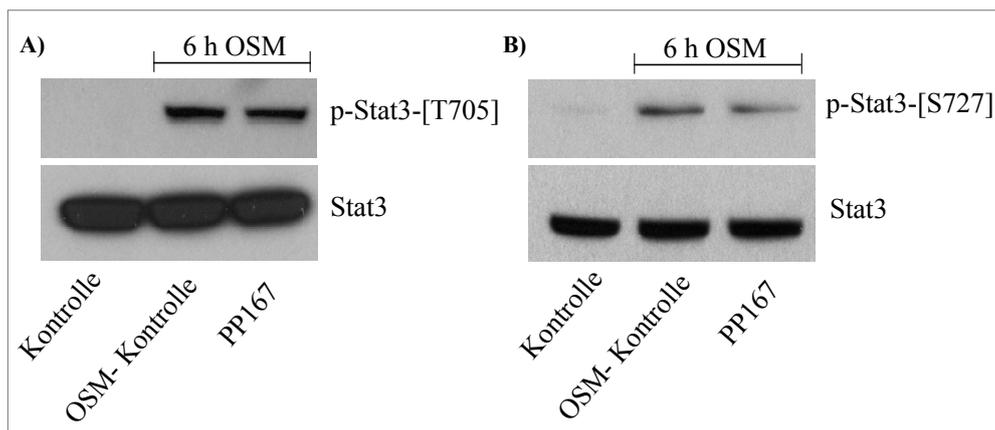
In der OSM-vermittelten IL-6-Expression erfolgt neben der Aktivierung der erwähnten Kinasen die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Stat3. Dabei werden durch eine direkte Interaktion von Stat3 mit gp130, mit den Jak-Kinasen und auch mit anderen Kinasen die Aminosäuren Tyrosin 705 und Serin 727 des Stat3-Proteins phosphoryliert [16, 171, 172]. Aufgrund der Phosphorylierung an der Aminosäure Tyrosin 705 wird die Bildung von Homo- oder Heterodimeren des Stat3-Proteins mit Stat1 induziert. Diese Dimere sind in der Lage, die Kernmembran zu passieren. Die phosphorylierte Aminosäure Serin 727 führt dagegen zur Verstärkung der transkriptionellen Promotoraktivität der Gene mit einem sogenannten IRS-Element (*Interferon-sensitive response*) und einem *Serum response element* (SRE) [58, 173, 174]. In den folgenden Versuchen wurde analysiert, ob die genannten Phosphorylierungen des Stat3-Proteins durch OSM induziert werden und ob eine Beeinflussung dieser Phosphorylierungen durch Heteroarylketone stattfindet.

Zunächst wurden die Kern- und Zytoplasmaextrakte unstimulierter und OSM-stimulierter Zellen mit Hilfe von Western-Blot-Analysen untersucht. Der Nachweis des aktivierten Stat3-Proteins erfolgte dabei mit phosphospezifischen anti-Stat3-Antikörpern gegen die Aminosäuren Tyrosin 705 sowie Serin 727. Sowohl in den Kernen als auch im Zytoplasma konnten die Phosphorylierungen des Transkriptionsfaktors Stat3 an beiden Aminosäuren nach der 6-stündigen OSM-Inkubation nachgewiesen werden (Abb. 3.39.). Dagegen wurden diese in den unstimulierten Proben nicht detektiert. Mittels der Normalisierung der Proben mit einem anti-Stat3-Antikörper gegen das Gesamtprotein erfolgte der Nachweis, dass die Menge des Stat3-Proteins innerhalb der Kern- und Zytoplasmaproben jeweils identisch war. Zur Kontrolle der Probenfraktionierung wurden die Blots anschließend mit einem Antikörper gegen das kernspezifische Protein YY1 [175] sowie einem Antikörper gegen das zytoplasmaspezifische α -Tubulin gefärbt. Die Ergebnisse weisen die gewählte Fraktionierungsmethode als geeignet aus.



3.39. OSM-induzierte Stat3-Phosphorylierung an den Aminosäuren Tyrosin 705 und Serin 727. Die Zellen wurden für 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM stimuliert. Nach der Extraktion der löslichen Proteine wurde je 40 μ g Gesamtproteinextrakt in einem Western-Blot analysiert. Die Detektion fand mit einem phosphospezifischen anti-Stat3- und einem sekundären HRP-konjugierten Antikörper statt. Als Referenz wurde die Expression des Stat3-Proteins sowie der Proteine YY1 und α -Tubulin herangezogen.

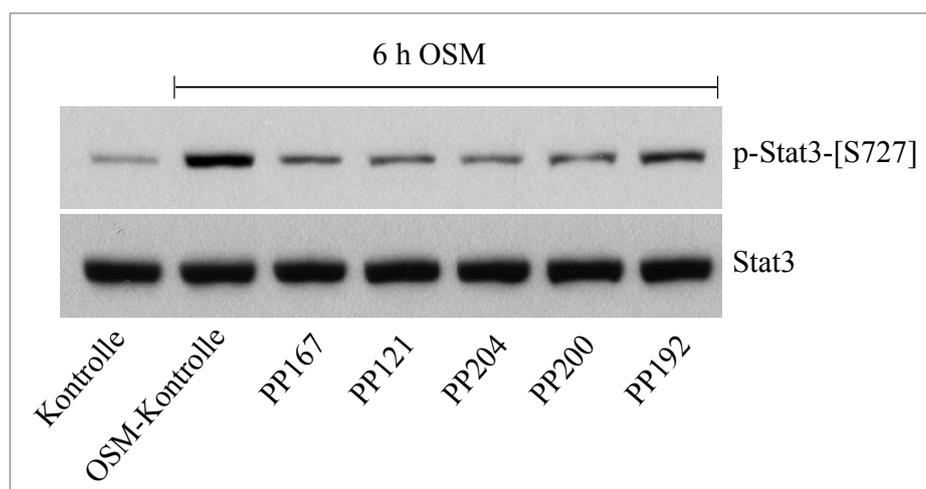
Da eine Induzierung der beschriebenen Phosphorylierungen am Stat3-Protein durch die Inkubation mit OSM nach einem Zeitraum von 6 Stunden stattfindet, wurde weiterhin überprüft, ob Heteroarylketone in der Lage sind, diese zu modifizieren. Dafür erfolgte die Inkubation OSM-stimulierter MG-U343 Gliomazellen mit PP167. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen sind in Abbildung 3.40. dargestellt.



3.40. Beeinflussung der OSM-induzierten Stat3-Phosphorylierung an den Aminosäuren Tyrosin 705 und Serin 727 durch das Heteroarylketon PP167. Die Zellen wurden für 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM und parallel mit je 20 μ M PP167 oder 0,2 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Nach der Probenfraktionierung wurden je 40 μ g Gesamtproteinextrakt in einem Western-Blot analysiert. Die Detektion fand mit spezifischen anti-Stat3-Antikörpern gegen die Phosphorylierung an (A) Tyrosin 705 und (B) Serin 727 sowie einem sekundären HRP-konjugierten Antikörper statt. Als Referenz wurde die Expression des Stat3-Proteins herangezogen.

Beide Phosphorylierungen wurden durch die Inkubation mit OSM induziert. Während im Fall der Tyrosin-Phosphorylierung keine Unterschiede in der Intensität zwischen stimulierten Zellen und PP167-behandelten Zellen festgestellt werden konnte, wurde die Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 727 durch die Zugabe von PP167 vermindert. Der abgebildete Western-Blot zeigt einen geringen Unterschied der Signalintensität zwischen der OSM-Kontrolle und der PP167-behandelten Probe, welcher in 3 nachfolgenden Analysen reproduziert werden konnte. Die Expression des Stat3-Proteins war jeweils ähnlich. Demzufolge haben Heteroarylketone einen Einfluss auf die OSM-induzierte Stat3-Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 727, aber nicht an der Aminosäure Tyrosin 705.

Da erstmals ein Unterschied zwischen PP167-behandelten Zellen und Kontrollzellen nachgewiesen wurde, sollte geprüft werden, ob die Inhibierung der Stat3-Phosphorylierung an Serin 727 mit der Hemmung der IL-6-Sekretion durch Heteroarylketone korreliert. Dafür wurden neben der unstimulierten und der OSM-stimulierten Kontrolle IL-6-bioaktive Substanzen (PP167, PP121, PP204, PP200) sowie ein IL-6-unwirksames Heteroarylketon (PP192) verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.41. dargestellt. Als Beladungskontrolle wurde die Expression des Stat3-Proteins herangezogen.

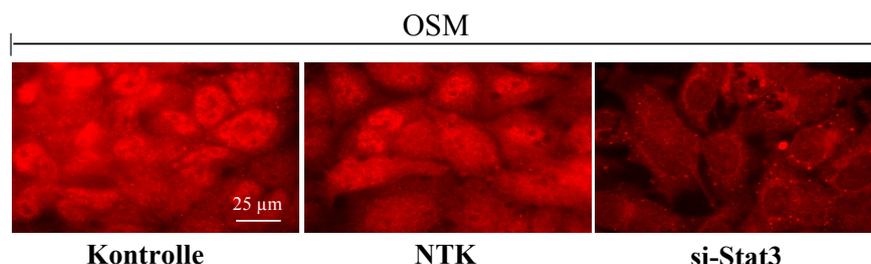


3.41. Beeinflussung der OSM-induzierten Stat3-Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 727 durch verschiedene Heteroarylketone. Die Zellen wurden für 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM und parallel mit je 20 μ M Heteroarylketon oder 0,2 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Nach der Extraktion der löslichen Proteine wurden je 20 μ g Gesamtproteinextrakt in einem Western-Blot analysiert. Die Detektion fand mit einem spezifischen Stat3-Antikörper gegen die Phosphorylierung des Serin 727 sowie einem sekundären HRP-konjugierten Antikörper statt. Als Referenz wurde die Expression des Stat3-Proteins herangezogen.

Alle Heteroarylketone, die in der Lage waren, die IL-6-Expression zu inhibieren, hatten auch einen hemmenden Einfluss auf die Phosphorylierung von Stat3 an der Aminosäure Serin 727. Die detektierten Signale in den jeweiligen Proben waren im Vergleich zur OSM-Kontrolle deutlich schwächer. Wenn dagegen die Inkubation von MG-U343 Gliomazellen mit einem IL-6-unwirksamen Heteroarylketon (PP192) erfolgte, konnte nur eine geringe Veränderung der Signalstärke gegenüber der stimulierten Kontrolle festgestellt werden.

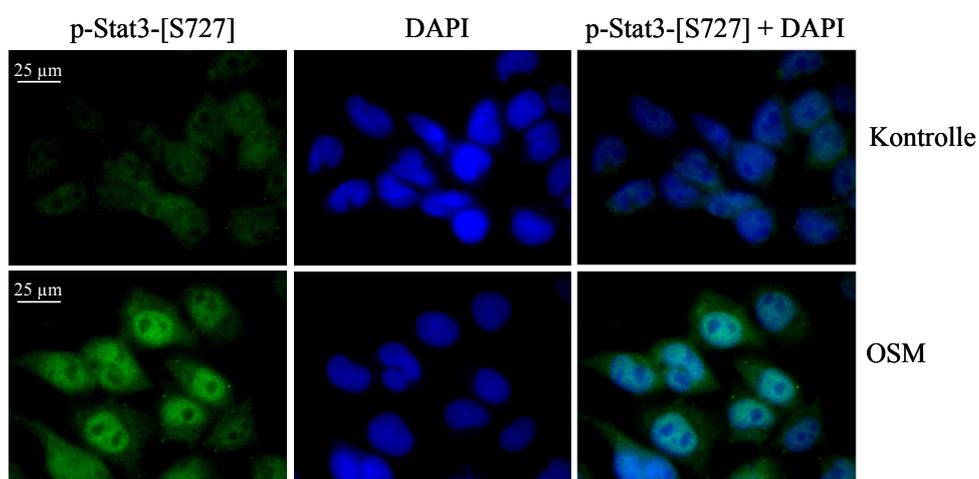
Aufgrund des nicht-linearen Umsatzes des zur Detektion verwendeten Chemilumineszenzsubstrates bei den hier gezeigten Western-Blot-Analysen ist die densitometrische Auswertung der phospho-Stat3-[S727]-Immunoblots kritisch zu bewerten. Um eine quantitative Aussage zu einer Korrelation zwischen der Senkung der IL-6-Expression und der Inhibierung der Phosphorylierung von Stat3 an der Aminosäure Serin 727 durch Heteroarylketone zu treffen, musste eine andere Methode etabliert werden.

Daher erfolgte die Durchführung eines Immunzytochemieassays für die Untersuchungen. Diese Methode erlaubt die densitometrische Auswertung. Zunächst war es notwendig, die Spezifität des Antikörpers bezüglich der Eignung für eine solche Anwendung zu überprüfen. Dafür fand die Transfektion von MG-U343 Gliomazellen mit siRNA gegen Stat3 sowie die anschließende Markierung dieser Zellen mit einem phosphospezifischen anti-Stat3-[S727]-Antikörper statt. Im Experiment wurden eine Transfektionskontrolle und eine NTK-Kontrolle mitgeführt. Die Immunzytochemieaufnahmen sind in der Abbildung 3.42. gezeigt.



- 3.42. Validierung des phosphospezifischen Stat3-Antikörpers für Immunzytochemieassays mit Hilfe der siRNA-Technik.** Nach der Transfektion der Zellen mit NTK-siRNA bzw. spezifischer siRNA gegen Stat3 wurden diese mit Methanol fixiert. Dann erfolgte die Markierung der transfizierten Zellen mit einem phosphospezifischen anti-Stat3-[S727]-Antikörper und einem sekundären Red-X-konjugierten Antikörper. Die Bildaufnahme der Zellen fand am Fluoreszenzmikroskop statt.

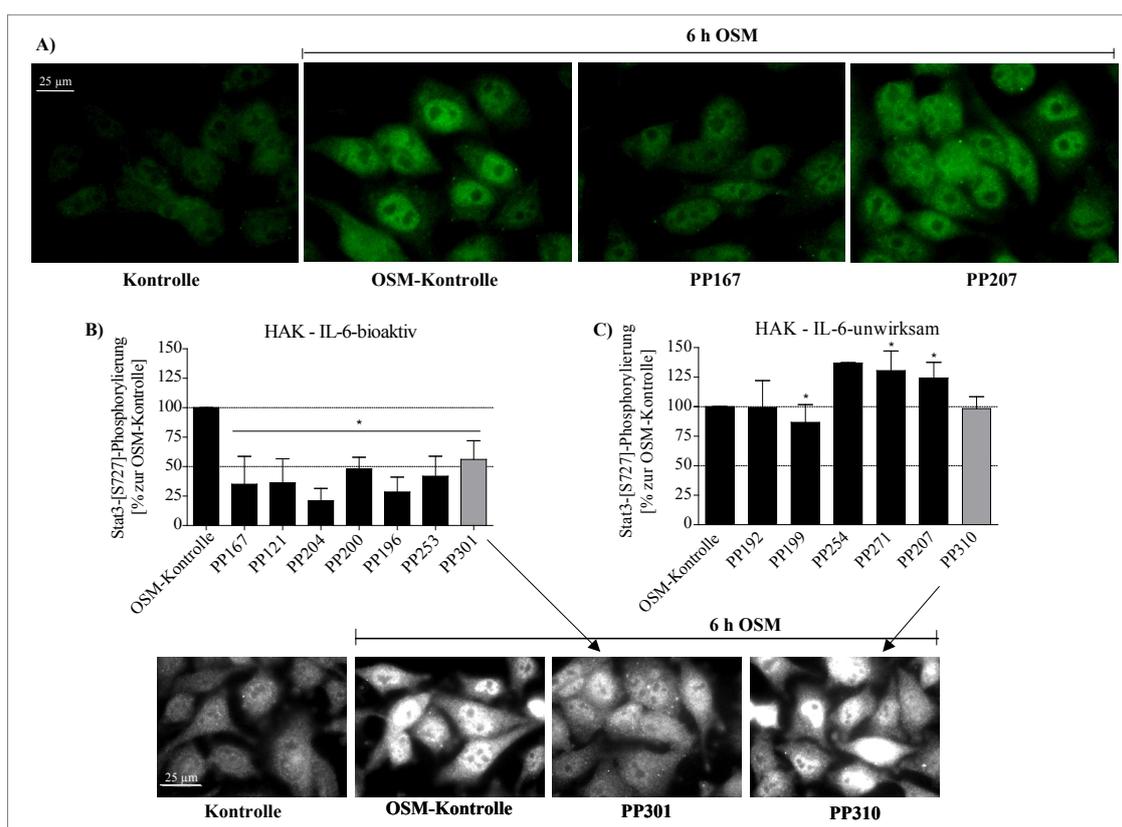
In beiden Kontrollen war jeweils eine starke Markierung der Zellen zu sehen, während diese in der siRNA-behandelten Probe nur gering ausgeprägt war. Infolge der Herunterregulation des Stat3-Proteins war der Antikörper nicht in der Lage, an sein Zielprotein, in diesem Fall Stat3, zu binden. Dieses Ergebnis beweist, dass der phosphospezifische anti-Stat3-[S727]-Antikörper für die Etablierung eines Immunzytochemieassays verwendet werden kann. Weiterhin wurde untersucht, ob das phosphorylierte Stat3-Protein nach der OSM-Stimulation in den Zellkern transloziert. Diese Lokalisation des aktivierten Transkriptionsfaktors wurde in der Literatur beschrieben und wäre für die Auswertung der Immunzytochemie-Experimente von Vorteil, da die Zellkerne einen klar abgrenzbaren Bereich innerhalb des Zellkörpers darstellen. Für diesen Test erfolgte die Markierung von OSM-stimulierten MG-U343 Gliomazellen mit dem Antikörper gegen phospho-Stat3-[S727] sowie mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Abb. 3.43.).



- 3.43. Untersuchungen zur Lokalisation und der OSM-Abhängigkeit des phosphorylierten Stat3-[S727] mittels Immunzytochemie-Analyse.** Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM stimuliert. Nach der Fixierung mit Methanol fand die Markierung der Zellen mit einem phosphospezifischen Stat3-Antikörper gegen Serin 727 und einem sekundären Cy2-konjugierten Antikörper bzw. durch DAPI statt. Die Bildaufnahme der Zellen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

In den stimulierten Zellen war im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine signifikante Verstärkung der grünen Markierung von phospho-Stat3-[S727] zu sehen. Durch die parallele Detektion der Zellkerne mit Hilfe von DAPI (blau) konnte gezeigt werden, dass in diesen Zellkompartimenten die Akkumulation des phosphorylierten Stat3-Proteins in Abhängigkeit von OSM stattfand. Somit ist die Auswertung der phospho-Stat3-[S727]-markierten Zellkerne in MG-U343 Gliomazellen zulässig.

Für die Validierung der Korrelation zwischen der Inhibierung der IL-6-Sekretion und der Hemmung der Stat3-Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 727 mit Hilfe des Immunzytochemieassays wurden 7 IL-6-bioaktive und 6 IL-6-unwirksame Heteroarylketone getestet. Die Stimulation der MG-U343 Gliomazellen mit OSM erfolgte über einen Zeitraum von 6 Stunden. Die mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgenommenen Bilder der Abb. 3.44. A zeigen repräsentative Zellen der unstimulierten und der stimulierten Kontrolle sowie PP167- (IL-6-bioaktiv) und PP207- (IL-6-unwirksam) behandelte Zellen.

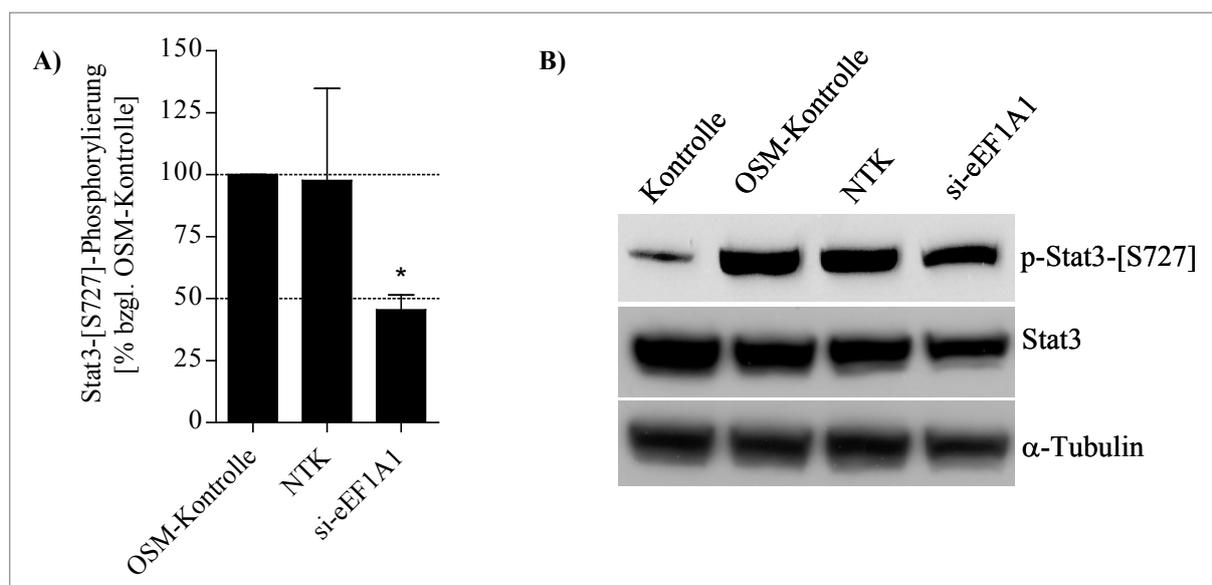


3.44. Quantifizierung von phosphoryliertem Stat3-[S727] nach 6 Stunden OSM-Stimulation und Heteroarylketon-Behandlung. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM und mit je 20 µM Heteroarylketon bzw. 40 µM biotinyliertem Heteroarylketon PP301 und PP310 inkubiert. Nach der Fixierung mit Methanol erfolgte die Markierung der Zellen mit einem phospho-spezifischen anti-Stat3-Antikörper gegen Serin 727 und einem sekundären Cy2-konjugierten Antikörper. Für die statistische Auswertung wurden je 4 mal 200 Zellkerne pro Probe mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie analysiert. (A) Beispiele von Fluoreszenzaufnahmen der markierten Zellen, welche mit nicht-biotinylierten Heteroarylketonen behandelt wurden. (B) Statistische Auswertung der markierten Zellen, die mit IL-6-bioaktiven und (C) mit IL-6-unwirksamen Heteroarylketonen behandelt wurden.

Es ist zu erkennen, dass die OSM-induzierte Markierung der Zellkerne durch die Inkubation mit PP167 gegenüber der stimulierten Kontrolle beträchtlich verringert und im Fall der PP207-behandelten Zellen kaum modifiziert wurde. Für die densitometrische Auswertung (Abb. 3.44. B und C) erfolgte die Durchführung von jeweils 4 Versuchen mit je 200 Zellkernen pro Heteroarylketon mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Für die Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität der unstimulierten und der stimulierten Zellen ermittelt. Die Differenz zwischen beiden Werten entspricht der OSM-induzierten Stat3-[S727] Phosphorylierung. Dieser Wert wurde 100 % gesetzt und die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten der Heteroarylketon-behandelten Proben darauf bezogen.

Aus den Ergebnissen kann eine Korrelation zwischen der Hemmung der IL-6-Expression und der Reduzierung der Stat3-Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 727 abgeleitet werden. Alle IL-6-bioaktiven Heteroarylketone waren in der Lage, die Phosphorylierung des Stat3-Proteins an der Aminosäure Serin 727 um mindestens 50 % zu inhibieren. Die dazugehörigen Kontrollen, welche keinen Einfluss auf die IL-6-Expression ausüben, haben dagegen diese Phosphorylierung nicht gehemmt. Die grau unterlegten Balken stellen die Resultate für die biotinylierten Inhibitoren PP301 und PP310 dar, welche für die Identifizierung der IL-6-relevanten Interaktionspartner von Heteroarylketonen mittels 2-D-Gelelektrophorese synthetisiert wurden. Auch hier konnte die Beeinflussung der entsprechenden Phosphorylierung von Stat3 in Abhängigkeit der Hemmung der IL-6-Expression nachgewiesen werden.

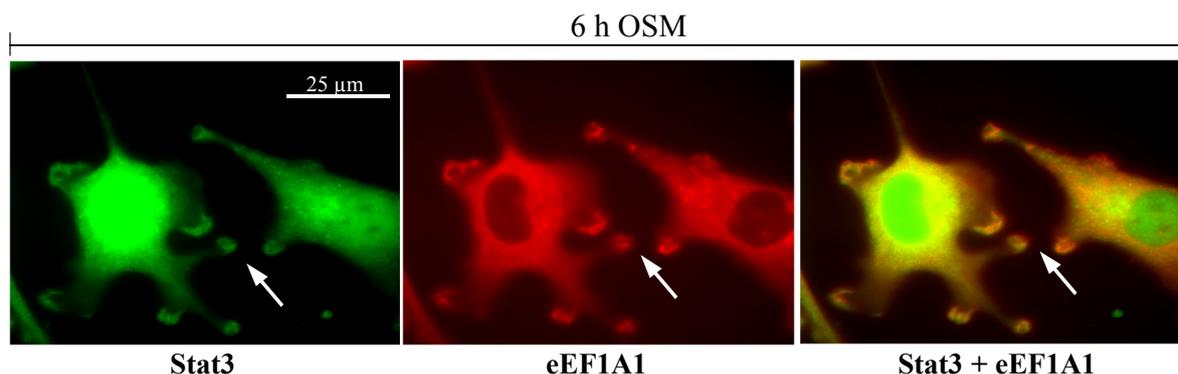
Aufgrund der oben beschriebenen Korrelation sollte ebenso der Einfluss des Zielproteins von Heteroarylketonen, eEF1A1, auf die Stat3-Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 727 untersucht werden. Dabei fand die Transfektion von MG-U343 Zellen mit spezifischer siRNA gegen eEF1A1 statt und im Anschluss daran die OSM-Stimulation für einen Zeitraum von 6 Stunden. Im Diagramm 3.45. A ist die relative Menge des phospho-Stat3-Proteins-[S727] der siRNA-behandelten Zellen dargestellt, welche durch die Anwendung des Immunzytochemieassays ermittelt wurde. Der abgebildete Immunoblot 3.45. B wurde mit spezifischen Antikörpern gegen die Proteine phospho-Stat3-[S727], Stat3 sowie α -Tubulin markiert.



3.45. Untersuchungen zur eEF1A1-Abhängigkeit der OSM-induzierten Stat3-Phosphorylierung-[S727] mittels Immunzytochemie- und Western-Blot-Analyse. Die Zellen wurden mit spezifischer siRNA gegen eEF1A1 transfiziert und danach mit 100 ng/ml OSM stimuliert. (A) Nach der Fixierung mit Methanol erfolgte die Markierung der Zellen mit einem phosphospezifischen anti-Stat3-Antikörper gegen Serin 727 und einem sekundären Cy2-konjugierten Antikörper. Für die statistische Auswertung wurden je 4 mal 200 Zellkerne pro Probe mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dargestellt ist die relative Änderung der Phosphorylierung des p-Stat3-[S727] durch die Herunterregulation von eEF1A1 im Vergleich zur OSM-stimulierten Kontrolle. (B) Nach der Extraktion der löslichen Proteine wurden je 20 μ g Gesamtproteinextrakt in einem Western-Blot analysiert. Die Detektion fand mit einem phosphospezifischen anti-Stat3-Antikörper-[S727] statt. Als Referenz wurde die Expression des Stat3-Proteins und des α -Tubulin herangezogen.

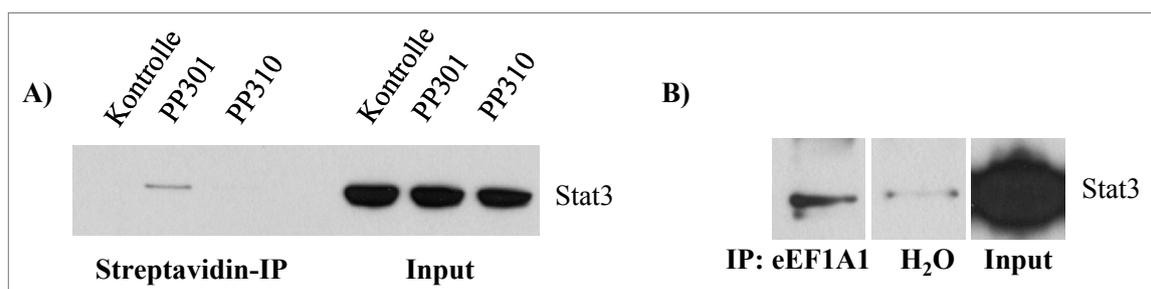
Die Ergebnisse zeigen, dass aufgrund der siRNA-spezifischen Herunterregulation des eEF1A1-Proteins die Phosphorylierung des Stat3-Proteins an der Aminosäure Serin 727 um 50 % erniedrigt wurde. Demnach führte der Einsatz von spezifischer siRNA gegen eEF1A1 in MG-U343 Gliomazellen zu einem vergleichbaren Effekt bezüglich dieser Stat3-Phosphorylierung wie die Inkubation mit IL-6-bioaktiven Heteroarylketonen. Somit ist die Stat3-Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 727 von der Expression des eEF1A1-Proteins abhängig und wird durch die Inkubation der Zellen mit Heteroarylketonen modifiziert. Als Konsequenz kann gefolgert werden, dass die IL-6-senkende Wirkung des eEF1A1-Heteroarylketon-Komplexes auf der Inhibierung der Phosphorylierung des Stat3-Proteins an der Aminosäure Serin 727 beruht.

Unterstützend dazu wurde mit Hilfe der Immunzytochemie belegt, dass sowohl Stat3 als auch eEF1A1 in den Zellen partiell kolokalisiert vorliegen. Beide Proteine wurden in den Zellfortsätzen von OSM-stimulierten MG-U343 Gliomazellen detektiert (Abb. 3.46.).



3.46. Kolokalisation von Stat3 und eEF1A1 in OSM-stimulierten Zellen. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM stimuliert. Nach der Fixierung mit Methanol erfolgte die Markierung mit einem spezifischen primären Antikörper gegen Stat3 bzw. eEF1A1 und einem Cy2- bzw. RedX-konjugierten Sekundärantikörper. Die Bildaufnahme der Zellen fand am Fluoreszenzmikroskop statt.

Mit Hilfe von Immunpräzipitationen konnte nachgewiesen werden, dass das eEF1A1-Protein und das Stat3-Protein in einem Komplex vorliegen. Zum einen erfolgte die Detektion des Stat3-Proteins im Streptavidin-präzipitierten Extrakt von PP301-behandelten Zellen (Abb. 3.47. A). Dagegen wurde in den Kontrollzellen kein Stat3-spezifisches Signal detektiert. Die für die IP eingesetzten Zellextrakte enthielten jeweils identische Konzentrationen des Stat3-Proteins (siehe Input). Zum anderen konnte mit einem anti-eEF1A1-Antikörper der Transkriptionsfaktor Stat3 immunpräzipitiert werden (Abb. 3.47. B). Während das detektierte Stat3-Signal in dieser Probe stark ausgeprägt war, wurde in der mitgeführten Kontrolle nur ein schwaches Signal detektiert.

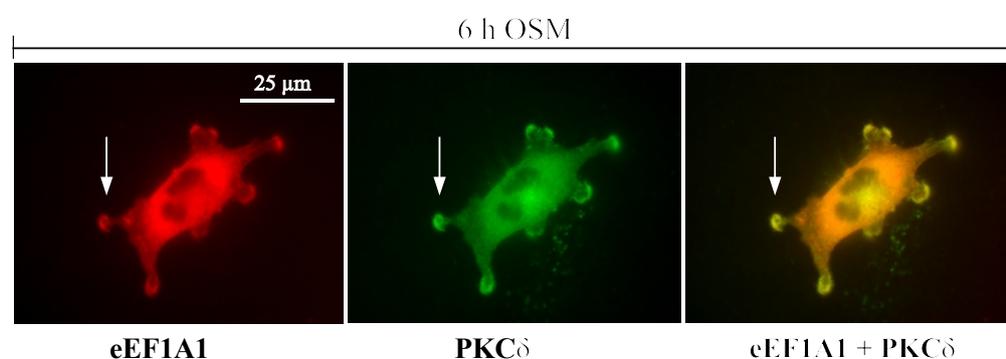


3.47. Detektion von Stat3 in einer Streptavidin-spezifischen IP mit PP301-behandeltem Zellextrakt und in einer eEF1A1-spezifischen IP. (A) Die Zellen wurden für 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM und 0,4 % DMSO, 40 μ M PP301 oder PP310 in serumfreiem Medium inkubiert. Nach der 10-minütigen Bestrahlung mit UV-Licht erfolgte ein Waschschritt mit Natriumorthovanadat/PBS (0,2 g/l) und die Lyse der Zellen. Je Probe wurden 300 μ g Gesamtprotein mit 40 μ l Streptavidin-gekoppelten Agarosebeads 1 Stunde bei 4 °C im Rotator präzipitiert. (B) Die Zellen wurden für 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM in serumfreiem Medium inkubiert. Nach der Lyse der Zellen wurden jeweils 250 μ g Gesamtprotein mit spezifischem eEF1A1-Antikörper über Nacht bei 4 °C im Rotator präzipitiert. Dann erfolgte die Präzipitation mit Protein G-gekoppelten Magnetbeads. Nach dem 3-maligen Waschen der Präzipitate mit je 600 μ l kaltem PBS fand die Resuspension der Beads in je 32 μ l Ladepuffer statt. Als Kontrolle wurde eine Präzipitation mit A. dest. mitgeführt. Die Präzipitate, sowie je 10 μ g Protein des Originalextrakts (Input) wurden mit einem Stat3-spezifischen Western-Blot analysiert.

Die Ergebnisse deuten auf eine Interaktion zwischen dem Stat3-Protein und dem eEF1A1-Protein hin. Die gemeinsame Lokalisation der Proteine unterstützt die Daten zur Bedeutung des eukaryotischen Elongationsfaktors 1A1 für die Phosphorylierung des Stat3-Proteins an der Aminosäure Serin 727.

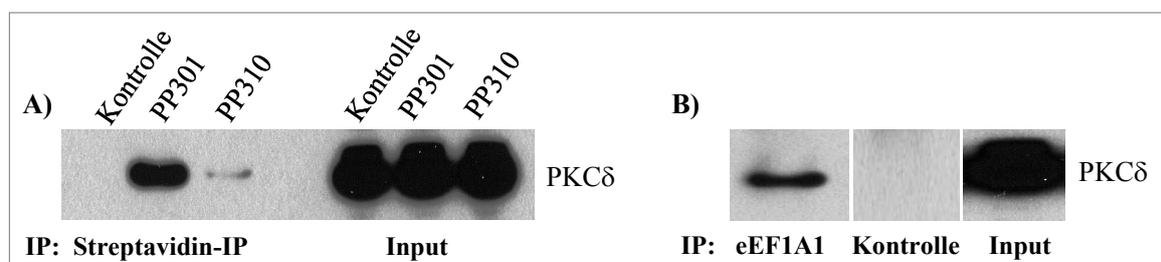
3.20. Erk1-abhängige Phosphorylierung des Stat3-Proteins an der Aminosäure Serin 727

In Kapitel 3.19. wurde die Rolle der Stat3-Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 727 für die OSM-induzierte IL-6-Expression untersucht. Diese Phosphorylierung ist vom eEF1A1-Protein abhängig. Da keine Kinaseaktivität für den Elongationsfaktor selbst beschrieben wurde, sollten nachfolgend die an der Phosphorylierung von p-Stat3-[Ser727] beteiligten Kinasen identifiziert werden. Aus dem Schema in Abbildung 3.30. wird ersichtlich, dass für die OSM-abhängige Aktivierung des Stat3-Proteins unter anderem die Erk1-Kinase bzw. die PKC δ -Kinase relevant sein können. Außerdem ist bereits bekannt, dass die PKC δ -Kinase und das eEF1A1-Protein miteinander wechselwirken [167]. Durch die Anwendung der Immunzytochemie-Technik konnte die Kolo-kalisation der beiden Proteine in MG-U343 Gliomazellen nachgewiesen werden. Ebenso wurden diese Angaben mit Hilfe der Immunpräzipitation des Elongationsfaktors und einer anschließenden PKC δ -spezifischen Western-Blot-Analyse im angewandten Modellsystem bestätigt (Abb. 3.48. und 3.49.). Die Aufnahmen der Immunzytochemie zeigen, dass die PKC δ -Kinase ebenso wie der Elongationsfaktor eEF1A1 u.a. in den Zellfortsätzen lokalisiert ist. Ein vergleichbares Bild wurde durch die Markierung von MG-U343 Gliomazellen mit einem Stat3-spezifischen Antikörper (vgl. Abb. 3.46.) beobachtet.



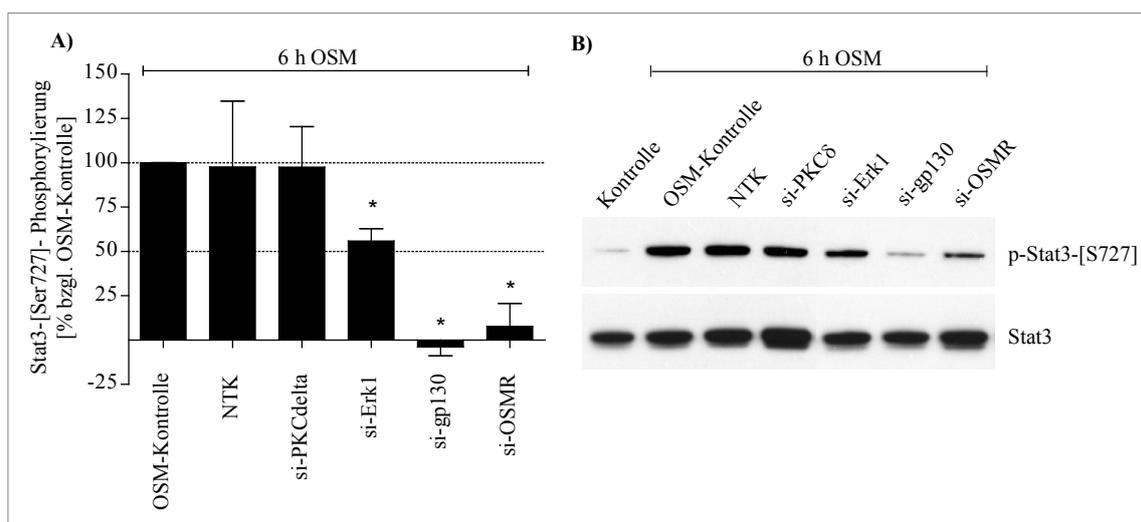
3.48. Kolo-kalisation von eEF1A1 und PKC δ in OSM-stimulierten Zellen. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM stimuliert. Nach der Fixierung mit Methanol erfolgte die Markierung mit einem primären Antikörper gegen die Proteine eEF1A1 bzw. PKC δ . Dann fand die Inkubation der Zellen mit Red-X- bzw. Cy2-konjugiertem sekundären Antikörper statt. Die Bildaufnahme erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

Weiterhin war die Detektion des PKC δ -Proteins in Streptavidin-präzipitierten Proben des Extrakts von PP301-behandelten Zellen möglich. Die mitgeführten Kontrollen zeigten dagegen nur eine schwache Ausprägung des Signals (Abb. 3.49. A). Ebenso wie das Stat3-Protein wurde auch die PKC δ -Kinase mit einem eEF1A1-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert (Abb. 3.49. B). Aufgrund der dargestellten Daten ist eine Komplexbildung dieser Kinase mit dem Elongationsfaktor 1A1 und dem Stat3-Protein sehr wahrscheinlich.



- 3.49. Detektion von PKC δ in einer Streptavidin-spezifischen IP mit PP301-behandeltem Zellextrakt und in einer eEF1A1-spezifischen IP.** (A) Die Zellen wurden für 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM und 0,4 % DMSO, 40 μ M PP301 oder PP310 in serumfreiem Medium inkubiert. Nach der 10-minütigen Bestrahlung mit UV-Licht erfolgte ein Waschschritt mit Natriumorthovanadat/PBS (0,2 g/l) und die Lyse der Zellen. Je Probe wurden 300 μ g Gesamtprotein mit 40 μ l Streptavidin-gekoppelten Agarosebeads 1 Stunde bei 4 $^{\circ}$ C im Rotator präzipitiert. (B) Die Zellen wurden für 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM in serumfreiem Medium inkubiert. Nach der Lyse der Zellen wurden jeweils 250 μ g Gesamtprotein mit spezifischem eEF1A1-Antikörper über Nacht bei 4 $^{\circ}$ C im Rotator präzipitiert. Dann erfolgte die Präzipitation mit Protein G-gekoppelten Magnetbeads. Nach dem 3-maligen Waschen der Präzipitate mit je 600 μ l kaltem PBS fand die Resuspension der Beads in je 32 μ l Ladepuffer statt. Als Kontrolle wurde eine Präzipitation mit A. dest. mitgeführt. Die Präzipitate, sowie je 10 μ g Protein des Originalextrakts (Input) wurden in einem PKC δ -spezifischen Western-Blot analysiert.

Basierend auf diesen Ergebnissen besteht die Möglichkeit, dass die PKC δ -Kinase tatsächlich einen Einfluss auf die Phosphorylierung des Stat3-Proteins an der Aminosäure Serin 727 hat. Deshalb sollte die siRNA-vermittelte spezifische Herunterregulation der PKC δ -Expression zu einer verringerten Phosphorylierung von Stat3 an der Aminosäure Serin 727 führen. Parallel zu diesem Experiment wurden MG-U343 Gliomazellen mit siRNAs transfiziert, welche spezifisch gegen die mRNAs von Erk1-Kinase sowie von den Rezeptorkomponenten gp130 und OSMR gerichtet waren. Diese Komponenten haben große Bedeutung in der OSM-induzierten Signalkaskade (Abb. 3.34.). Alle Zellen wurden 6 Stunden mit OSM stimuliert. In Abbildung 3.50. sind die Ergebnisse der Analysen zum einen als Auswertung der Immunzytochemie-Untersuchungen (A) und zum anderen als Western-Blot-Analyse (B) gezeigt.

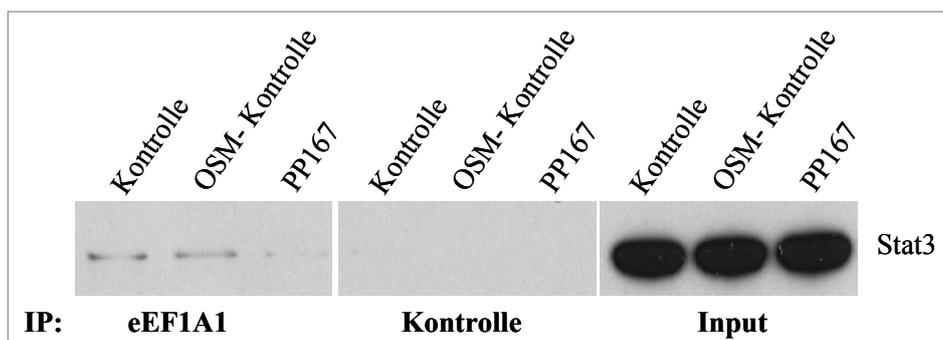


3.50. Analyse zur Abhängigkeit des OSM-induzierten p-Stat3-[S727] von Erk1 und PKC δ mittels qPCR und Western-Blot. Die Zellen wurden mit spezifischer siRNA gegen PKC δ , Erk1, gp130 und OSMR transfiziert und danach für 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM stimuliert. (A) Nach der Fixierung mit Methanol erfolgte die Markierung der Zellen mit einem phosphospezifischen anti-Stat3-Antikörper gegen Serin 727 und einem sekundären Cy2-konjugierten Antikörper. Für die statistische Auswertung wurden je 4 Mal 200 Zellkerne pro Probe mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dargestellt ist die relative Änderung der Phosphorylierung des p-Stat3-[S727] durch die Herunterregulation der o.g. Proteine im Vergleich zur OSM-stimulierten Kontrolle. (B) Nach der Extraktion der löslichen Proteine wurden je 20 μ g Gesamtproteinextrakt in einem phosphospezifischen Stat3-Western-Blot analysiert. Als Referenz wurde die Expression des Stat3-Proteins herangezogen.

Obwohl PKC δ für die IL-6-Expression wichtig und gemeinsam mit eEF1A1 in einem Komplex lokalisiert ist (vgl. Abb. 3.34. und Abb. 3.48.), wurde keine Modifikation der Stat3-[Ser727]-Phosphorylierung durch den Einsatz der spezifischen siRNA beobachtet. Im Gegensatz dazu kam es durch die Transfektion der Zellen mit der Erk1-siRNA zu einer Inhibierung dieser Phosphorylierung um 45 %. Demnach ist die Erk1-Kinase und nicht die PKC δ -Kinase an der Aktivierung von Stat3 beteiligt. Wie erwartet, wurde die Stat3-[Ser727]-Phosphorylierung durch die Transfektion der Zellen mit der siRNA der OSM-Rezeptorkomponenten OSMR und gp130 dramatisch reduziert.

In Kapitel 3.18. konnte die Beeinflussung der OSM-induzierten Aktivierung der Erk1-Kinase durch Heteroarylketone ausgeschlossen werden. Deshalb müssen diese Substanzen über die Interaktion mit dem eEF1A1-Protein in die Erk1-vermittelte Stat3-Phosphorylierung eingreifen, ohne dabei die Aktivierung der Erk1-Kinase selbst zu regulieren. Eine mögliche Beeinflussung ist aufgrund der beschriebenen Interaktion zwischen den phosphorylierten Tyrosinresten des Elongationsfaktors und den SH2-Domänen der SHP2-Phosphatase denkbar [146]. Die Mitglieder der Stat-Familie besitzen ebenso SH2-Domänen. Zudem wurde die Komplexbildung des Elongationsfaktors eEF1A1 mit dem Stat3-Protein nachgewiesen (Abb. 3.47.). Analog dazu wäre die Bindung des Elongationsfaktors an die SH2-Domäne des Stat3-

Proteins vorstellbar, welche möglicherweise die Erk1-abhängige Phosphorylierung des Stat3-Proteins an der Aminosäure Serin 727 beeinflusst. In diesem Fall könnten Heteroarylketone die Komplexbildung von Stat3/eEF1A1 und Erk1 unterdrücken. Mit Hilfe einer eEF1A1-spezifischen Immunpräzipitation sollte die Komplexbildung von Stat3/eEF1A1 in Abhängigkeit von PP167 untersucht werden. Die Präzipitate wurden anschließend in einer Stat3-spezifischen Western-Blot-Analyse eingesetzt (Abb. 3.51.).

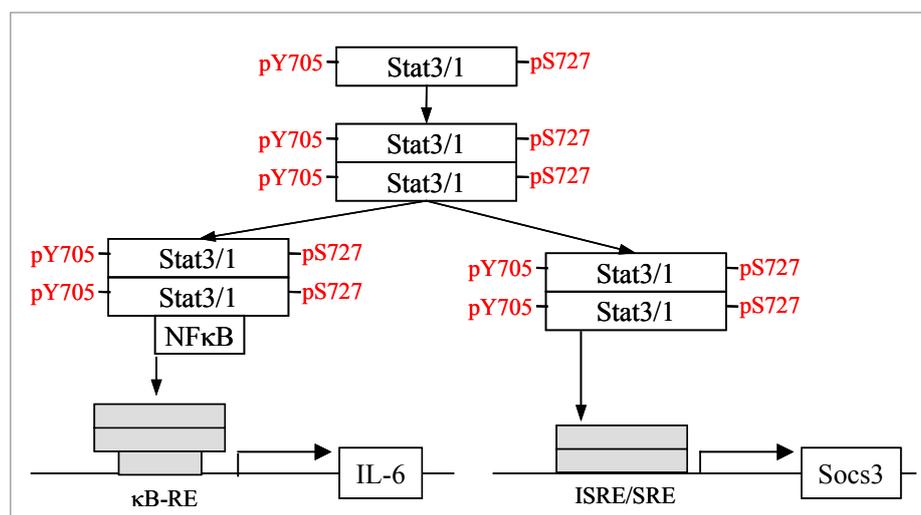


3.51. Untersuchung der Beeinflussung der Komplexbildung von Stat3/eEF1A1 durch PP167 mittels eEF1A1-spezifischer Immunpräzipitation. Die Zellen wurden für 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM und 20 μ M PP167 oder 0,2 % DMSO in serumfreiem Medium inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit Natriumorthovanadat/PBS (0,2 g/l) und der Extraktion der löslichen Proteine wurden je 250 μ g Gesamtprotein mit spezifischem eEF1A1-Antikörper über Nacht bei 4 °C im Rotator präzipitiert. Dann erfolgte die Präzipitation mit Protein G-gekoppelten Magnetbeads. Nach dem 3-maligen Waschen der Präzipitate mit je 600 μ l kaltem PBS fand die Resuspension der Beads in je 32 μ l Ladepuffer statt. Als Kontrolle wurde eine Präzipitation mit A. dest. mitgeführt. Die Präzipitate sowie je 10 μ g Protein des Originalextrakts (Input) wurden mit einem Stat3-spezifischen Western-Blot analysiert.

Diese Untersuchungen zeigten, dass die Komplexbildung der beiden Proteine zum einen unabhängig von OSM stattfindet und zum anderen durch die Inkubation mit dem IL-6-bioaktiven Heteroarylketon PP167 vermindert werden konnte, weil im abgebildeten Immunoblot ein deutlich schwächeres Stat3-Signal im Fall der PP167-behandelten Zellen gegenüber der stimulierten Kontrolle zu sehen ist. Die Stat3-Konzentrationen in den nichtpräzipitierten Zellextrakten waren identisch (Input). Demzufolge besitzt das eEF1A1-Protein vermutlich eine regulatorische Funktion. Aus dem Diagramm der Abbildung 3.50. geht ferner hervor, dass der Einsatz der Erk1-spezifischen siRNA nicht zu einer vollständigen Inhibierung der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Stat3 an der Aminosäure Serin 727 führt. Demnach sind an der Phosphorylierung der Aminosäure Serin 727 von Stat3 auch andere Kinasen beteiligt.

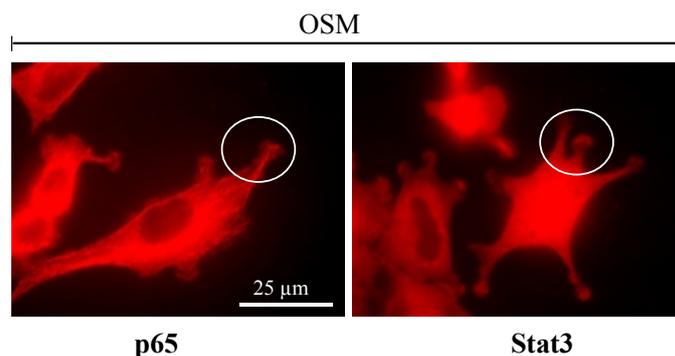
3.21. Beeinflussung der Komplexbildung von Stat3/NFκB durch Heteroarylketone

Die Abbildung 3.44. verdeutlicht, dass IL-6-hemmende Heteroarylketone in der Lage sind, die OSM-induzierte Phosphorylierung des Stat3-Proteins an der Aminosäure Serin 727 zu inhibieren. Aus der Literatur war bekannt, dass diese Aktivierung zu einer Verstärkung der Expression von Stat3-regulierten Genen, wie z.B. dem Negativregulator der IL-6-Expression Socs3, führt [176]. Entgegen dem Socs3-Promotor existieren auf dem IL-6-Promotor keine Stat3-Konsensussequenzen. Eine direkte Beeinflussung des IL-6-Gens durch Stat3 ist aber trotzdem möglich, da eine Bindung zwischen Stat3 und dem Transkriptionsfaktor NFκB beschrieben wurde und auf dem IL-6-Promotor Bindestellen für NFκB vorhanden sind [177]. Im Fall von Socs3 ist jedoch eine direkte Beeinflussung der Genexpression ohne die Involvierung von NFκB möglich (Abb. 3.52.).



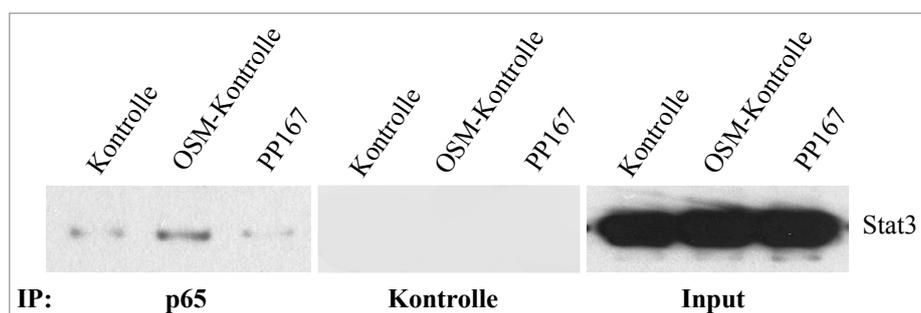
3.52. Schema der Beeinflussung der Genexpression von IL-6 und Socs3 durch das Stat3-Protein [16, 166, 177].

Wenn eine Beeinflussung der eEF1A1/Stat3-Komplexe durch Heteroarylketone relevant ist, dann wird möglicherweise auch die Komplexbildung von Stat3/NFκB durch diese Substanzen beeinflusst. Zu den NFκB-Transkriptionsfaktoren gehören u.a. die Komponenten p50 und p65. Es wurde beschrieben, dass das Dimer aus p50 und p65 am häufigsten in Zellen vorkommt und p65 eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung von Genen mit einem κB-Element im Promotor spielt [61]. Deshalb wurde im folgenden die Kollokalisierung des NFκB-Proteins p65 und Stat3 untersucht. Interessant war dabei, dass p65 genau wie Stat3, eEF1A1 und PKCδ unter anderem in den Zellfortsätzen von OSM-stimulierten MG-U343 Gliomazellen lokalisiert ist (Abb. 3.53.).



- 3.53. Lokalisation von p65 und Stat3 in OSM-stimulierten Zellen.** Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM stimuliert. Nach der Fixierung erfolgte die Markierung mit einem primären Antikörper gegen p65 oder Stat3 sowie die Inkubation mit Cy3-konjugierten sekundären Antikörpern. Die Bildaufnahme der Proben fand am Fluoreszenzmikroskop statt.

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass das p65-Protein mit dem Transkriptionsfaktor Stat3 immunpräzipitiert (Abb. 3.54.). Demnach existieren die in der Literatur beschriebenen p65/Stat3-Komplexe im angewandten Modellsystem. Im Gegensatz zu der Bildung von Stat3/eEF1A1-Komplexen ist die Bindung zwischen p65 und Stat3 von OSM abhängig (vgl. Abb. 3.51.). Wenn die Zellen mit OSM stimuliert wurden, konnte im Vergleich zur unstimulierten Probe ein stärkeres Signal detektiert werden. Dieses entspricht einer größeren Anzahl der p65/Stat3-Komplexe gegenüber den Kontrollzellen. Bei der Inkubation der Zellen mit dem Vertreter der Heteroarylketone PP167 wurde die Anzahl der nachweisbaren Komplexe vermindert. Das detektierte Signal glich dem der unstimulierten Kontrolle. Die geringere Zahl der p65/Stat3-Komplexe korreliert mit der verminderten Komplexbildung zwischen den Proteinen eEF1A1 und Stat3 (vgl. Abb. 3.51.). Die für die Immunpräzipitation verwendeten Zellextrakte enthielten jeweils identische Mengen des Stat3-Proteins (s. Input).

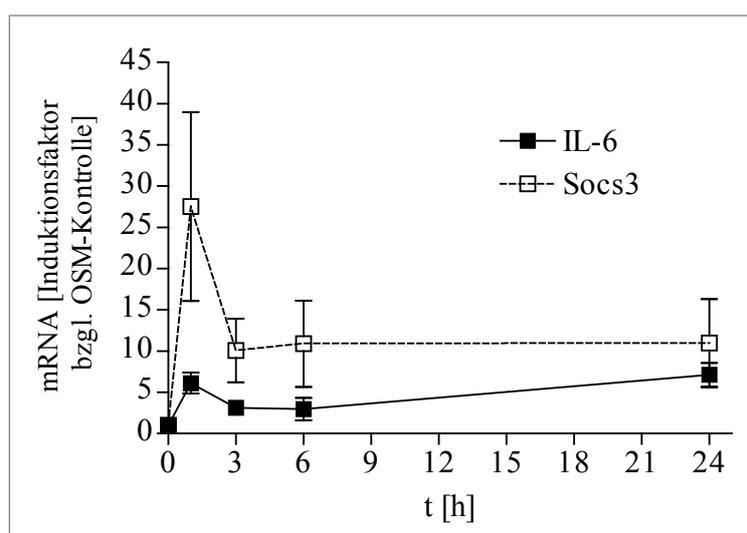


- 3.54. Untersuchung der Beeinflussung der Komplexbildung von Stat3 und p65 durch PP167 mittels p65-spezifischer Immunpräzipitation.** Die Zellen wurden für 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM und 20 μ M PP167 oder 0,2 % DMSO in serumfreiem Medium inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit Natriumorthovanadat/PBS (0,2 g/l) und der Extraktion der löslichen Proteine wurden je 250 μ g Gesamtprotein mit spezifischem p65-Antikörper über Nacht bei 4 °C im Rotator präzipitiert. Dann erfolgte die Präzipitation mit Protein G-gekoppelten Magnetbeads. Nach dem 3-maligen Waschen der Präzipitate mit je 600 μ l kaltem PBS fand die Resuspension der Beads in je 32 μ l Ladepuffer statt. Als Kontrolle wurde eine Präzipitation mit A. dest. mitgeführt. Die Präzipitate sowie je 10 μ g Protein des Originalextrakts (Input) wurden mit einem Stat3-spezifischen Western-Blot analysiert.

In der Literatur wurde beschrieben, dass durch die Komplexbildung beider Transkriptionsfaktoren die transkriptionelle Aktivität des IL-6-Promotors erhöht wird [178]. Aufgrund der Komplexbildung zwischen Stat3 und p65 ist Stat3 in der Lage, neben seiner Wirkung auf den Negativregulator Socs3, einen direkten Einfluss auf die IL-6-Expression auszuüben.

3.22. Einfluss von Heteroarylketonen und deren Interaktionspartner eEF1A1 auf die Socs3-Proteinexpression

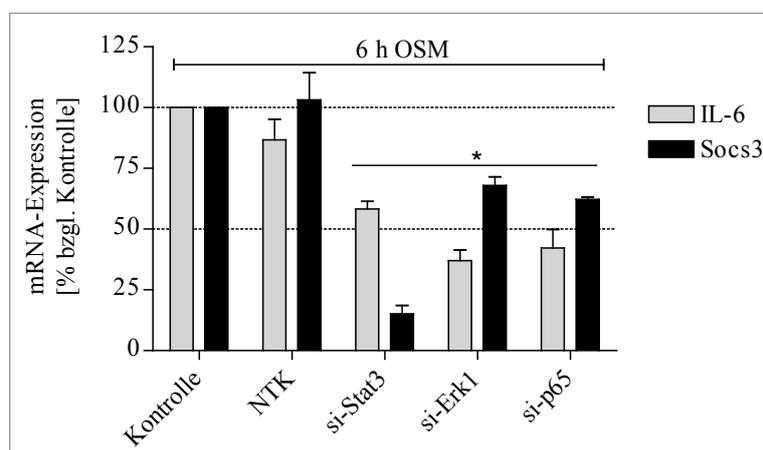
Neben der Regulation des IL-6-Gens sollte die Wirkung der Heteroarylketone auf die Genexpression von Socs3 analysiert werden, da dieses Protein ebenfalls durch OSM induziert und durch den Transkriptionsfaktor Stat3 reguliert wird. Socs3 ist ein Negativregulator der IL-6-Expression (vgl. Abb. 3.34.). Bei der Herunterregulation von Socs3 mit Hilfe der spezifischen siRNA wurde die IL-6-Expression dramatisch erhöht. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Socs3-Promotor eine Stat3-Konsensussequenz enthält (Abb. 3.52.) [15, 16, 166, 179]. Durch die Anschaltung der OSM-Signalkaskade wird das Stat3-Protein aktiviert und beeinflusst demzufolge die Socs3-Expression. Da Heteroarylketone und deren Interaktions-partner eEF1A1 die OSM-induzierte IL-6-Expression über die Regulation der Phosphorylierung von Stat3 an der Aminosäure Serin 727 beeinflussen, wurde nachfolgend überprüft, ob parallel dazu auch die Expression von Socs3 beeinflusst wird.



3.55. Zeitabhängigkeit der OSM-stimulierten Expression der IL-6- und der Socs3-mRNA. Die Zellen wurden mit 100 ng/ml OSM in serumfreiem Medium über einen Zeitraum von 1, 3, 6 und 24 Stunden inkubiert. Die mRNA-Gehalte wurden mittels qPCR bestimmt und mit Hilfe des mRNA-Gehalts von G6PDH, GAPDH und HPRT normiert. Dargestellt sind die ermittelten Werte als Induktionsfaktor der Kontrollen zum Zeitpunkt von 0 Stunden (Mittelwert \pm SD, n = 3).

Die Kinetik der Expression des Socs3-Gens in Abhängigkeit von OSM (Abb. 3.55.) zeigt, dass die Socs3-mRNA nach einer Stunde OSM-Stimulation auf das 28-fache erhöht wurde. Nach diesem Anstieg fiel die Menge der Socs3-mRNA bis zum Zeitpunkt von 3 Stunden auf das 10-fache der Ausgangskonzentration ab und stagnierte bei diesem Wert, während die Expression des IL-6-Gens biphasisch verlief und einen zweiten Anstieg der mRNA aufweist. Demnach werden beide Gene unterschiedlich reguliert (vgl. Abb. 3.52.).

Um die Bedeutung von Stat3 für die Expression des IL-6- bzw. des Socs3-Gens im verwendeten Modellsystem zu ermitteln, erfolgte die Transfektion der OSM-stimulierten Zellen mit spezifischer siRNA gegen Stat3. Parallel dazu wurden die Zellen mit der siRNA gegen Erk1 sowie p65 transfiziert, da beide Proteine in der OSM-Signalkaskade involviert sind. Im Anschluss daran fand die Quantifizierung der Socs3- und der IL-6-mRNA mit Hilfe der qPCR-Technik relativ zu den Kontrollen statt (Abb. 3.56.).



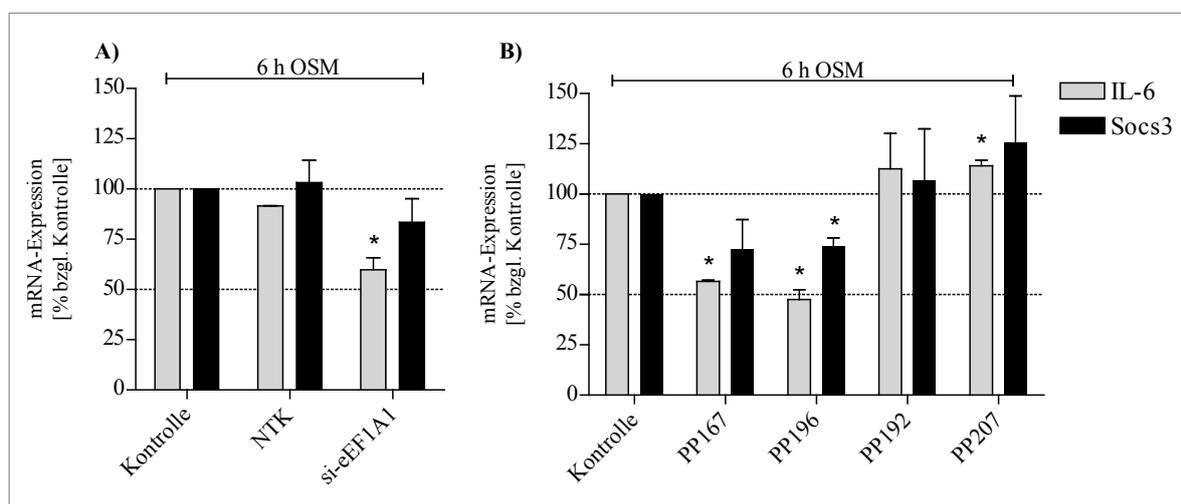
3.56. Analyse des Einflusses ausgewählter OSM-Signalkaskadekomponenten auf die IL-6- und die Socs3-mRNA-Expression mittels siRNA-Technik und qPCR. Die Zellen wurden mit spezifischer siRNA gegen die Proteine (siehe X-Achse) bzw. mit einer NTK-siRNA transfiziert. Nach der 6-stündigen Stimulation mit 100 ng/ml OSM fand die Quantifizierung der IL-6- und der Socs3-mRNA-Gehalte mit Hilfe der qPCR-Technik statt. Die Werte wurden mit Hilfe des mRNA-Gehalts von G6PDH und HPRT normiert. Dargestellt wurden jeweils die relativen mRNA-Gehalte im Vergleich zur OSM-Kontrolle (Mittelwert \pm SD, $n \geq 2$).

Im Diagramm ist zu erkennen, dass alle verwendeten siRNA-Spezies einen hemmenden Einfluss auf die Transkription der Socs3- und der IL-6-mRNA-Expression hatten. Dabei gab es qualitative Unterschiede in der Wirkung auf die Regulation. Durch die Transfektion der Zellen mit siRNA gegen Stat3 war es möglich, die mRNA des Socs3-Proteins auf 15 % gegenüber der stimulierten Kontrolle zu reduzieren. Dagegen erfolgte im Fall der IL-6-mRNA nur eine Hemmung auf 60 % des ursprünglichen mRNA-Gehalts von OSM-stimulierten Zellen. Bei der Herunterregulation der Proteine Erk1 und p65 fand jeweils eine stärkere Inhibierung der IL-6-Genexpression im Vergleich zur Socs3-Genexpression statt.

Dabei erfolgte die Senkung der IL-6-mRNA durch die Verwendung von siRNA gegen Erk1 um 62 % und im Fall des p65-Proteins um 57 %, während dementsprechend die Socs3-mRNA-Expression um 32 % (si-Erk1) und 39 % (si-p65) reduziert wurde.

Die Ergebnisse bestätigen die Angaben aus der Literatur, dass das Stat3-Protein für die Expression des Socs3-Gens essentiell ist [68, 180]. Außerdem wurde die partielle Abhängigkeit der Expression von Socs3 von den OSM-Signalkaskademitgliedern p65 und Erk1 nachgewiesen.

Da Heteroarylketone und deren Interaktionspartner eEF1A1 die Stat3-abhängige IL-6-Expression modifizieren, (Kapitel 3.19.) sollte auch die Beeinflussung der Expression des Stat3-abhängigen Socs3-Gens durch Heteroarylketone analysiert werden. Die Expression der IL-6-mRNA wurde vergleichend dazu untersucht. Die Ergebnisse sind in den Diagrammen der Abbildung 3.57. relativ zur stimulierten Kontrolle abgebildet.



3.57. Analyse des Einflusses von eEF1A1 und von Heteroarylketonen auf die IL-6- und die Socs3-mRNA-Expression mittels qPCR. (A) Die Zellen wurden mit einer spezifischen siRNA gegen eEF1A1 sowie mit einer NTK-siRNA transfiziert und anschließend für 6 Stunden mit 100 ng/ml OSM stimuliert. (B) Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 6 Stunden mit je 20 μ M der Heteroarylketone (siehe X-Achse) und mit je 100 ng/ml OSM stimuliert. Die Bestimmung der IL-6- und Socs3-mRNA-Gehalte erfolgte mit Hilfe der qPCR. Die Werte wurden gegen die mRNA-Gehalte der Referenzgene G6PDH und HPRT normalisiert. Dargestellt wurden die relativen mRNA-Gehalte im Vergleich zur OSM-stimulierten Kontrolle (Mittelwert \pm SD, $n \geq 2$).

Das Diagramm 3.57. A zeigt, dass bei der siRNA-vermittelten Herunterregulation von eEF1A1 eine signifikante Reduzierung um 41 % der IL-6-mRNA auftrat, während die Socs3-mRNA nur geringfügig gesenkt wurde. Ein ähnliches Inhibierungsmuster ergibt die Behandlung der Zellen mit den IL-6-bioaktiven Heteroarylketonen PP167 und PP196. Auch hier ist die Expression der IL-6-mRNA stärker betroffen als die des Socs3-Gens. Beide getesteten Inhibitoren reduzieren die IL-6-mRNA etwa um die Hälfte im Vergleich zur

stimulierten Kontrolle. Dagegen beträgt die Hemmung der Transkription der Socs3-mRNA-Expression ca. 30 %. Die dazugehörigen Negativkontrollen, die IL-6-unwirksamen Heteroarylketone PP192 und PP207, verursachten keine Senkung der Genexpression von IL-6 und Socs3, sondern erhöhten diese leicht.

Entsprechend der Daten haben die Heteroarylketone und deren Interaktionspartner eEF1A1 einen unterschiedlich starken Einfluss auf die Expression von IL-6 bzw. Socs3, welche mit der jeweiligen Art und Weise der dazugehörigen Promotor-Aktivierung korreliert. Der Einfluss von Heteroarylketonen beruht dabei auf der Modifikation der Phosphorylierung des Stat3-Proteins an der Aminosäure Serin 727. Während diese Phosphorylierung eine entscheidende Rolle für die Verstärkung der IL-6-Genexpression spielt, ist sie im Fall der Socs3-Genexpression von geringerer Bedeutung. Aufgrund der unterschiedlichen Abhängigkeit der Promotoren von der Stat3-[S727]-Phosphorylierung besteht die Möglichkeit, dass Heteroarylketone selektiv die Expression von Genen beeinflussen. Basierend darauf könnten mit Hilfe dieser Substanzen pathophysiologische Prozesse hochspezifisch modifiziert werden.

4. DISKUSSION

Heteroarylketone als potentielle Therapeutika für die Behandlung von RA

RA ist eine der am häufigsten vorkommenden chronisch entzündlichen Gelenkerkrankungen, deren Behandlung allein in Deutschland jährlich mehr als 10 Milliarden Euro Behandlungs- und Folgekosten verursacht [181]. Die Autoimmunerkrankung wird charakterisiert durch verschiedene Symptome, wie z.B. das Anschwellen und die zunehmende Zerstörung von Knorpel- und Knochengewebe in den Gelenken. Diese Prozesse werden durch die Einwanderung von Immunzellen in die Gelenke ausgelöst, welche proinflammatorische Zytokine sekretieren. Eine besondere Rolle wird dabei den Zytokinen $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 zugesprochen. Im Fall von RA ist das Gleichgewicht der Sekretion dieser Zytokine gestört und die entzündlichen Prozesse werden verstärkt. Neben diesen Faktoren sind jedoch weitere Komponenten an der Entstehung von RA beteiligt und somit Gegenstand intensiver Forschung. Dazu gehört auch das proinflammatorische Zytokin IL-6. Mehrere Studien zeigen die große Bedeutung dieses Proteins im Krankheitsgeschehen von RA [81-83, 97-100]. So konnte beispielsweise eine direkte Korrelation zwischen der Konzentration von IL-6 bzw. dem löslichen Rezeptor sIL-6R in der synovialen Flüssigkeit und dem Schweregrad der Erkrankung nachgewiesen werden [10, 114]. Zudem sind transgene Mäuse, denen ein funktionelles IL-6-Gen fehlt, resistent gegenüber der Antigen-vermittelten Induktion von RA [88]. Durch die Therapie von RA-Patienten mit einem IL-6-Rezeptor-blockierenden Antikörper, wie z.B. Tocilizumab, konnte eine beträchtliche Verbesserung des Krankheitsbildes erreicht werden [79]. Diese Daten zeigen, dass durch die Blockade der IL-6-Proteinsekretion die Entstehung von RA eingegrenzt werden kann. Eine vollständige Heilung der Erkrankung mit den zur Zeit zur Verfügung stehenden Medikamenten ist nicht möglich, da die Ursachen bis zum heutigen Zeitpunkt weitgehend unverstanden sind.

Die Behandlung erfolgt derzeit durch den Einsatz von Methotrexat (MTX) in Kombination mit anderen Substanzen aus den Klassen der NSAIDS, der DMARDS, der Glukokortikoide bzw. den sogenannten "Biologicals". Bei diesen Therapeutika handelt sich meist um $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Inhibitoren. Die Klasse der "Biologicals" beinhaltet blockierende oder antagonistisch wirkende (Rezeptor-)Antikörper gegen $\text{TNF}\alpha$ und das Zytokin IL-1 [92, 93, 110-113]. Allerdings sind diese Therapien nicht bei allen Patienten erfolgreich und verursachen neben teilweise starken Nebenwirkungen auch hohe Kosten. Deshalb stellen gegen IL-6 bzw. den IL-6-Rezeptor gerichtete Therapeutika eine Alternative zu den bisherigen Medikamenten dar.

Eine Reihe der von der Probiodrug AG synthetisierten Vertreter der Substanzklasse der Heteroarylketone sind in der Lage, die IL-6-Expression in 5 humanen Karzinomzelllinien zu inhibieren [9]. Ihre Wirksamkeit ist auch in primären Astrozyten der Ratte und der Maus sowie im akuten Sepsis-Mausmodell validiert worden (unveröffentlichte Daten, Probiodrug AG). Die Stimulierung der IL-6-Sekretion in diesem Tiermodell erfolgte durch die Zugabe von LPS. Durch die Injektion des Heteroarylketons PP167 konnte die IL-6-mRNA-Expression konzentrationsabhängig und organspezifisch, insbesondere in Hippocampus, Muskel, Leber und Plasma herunterreguliert werden. Als Kontrolle wurde Dexamethason injiziert. Das Heteroarylketon PP167 war im Vergleich mit der handelsüblichen Dosierung von Dexamethason ebenso potent bzgl. der Inhibierung der IL-6-Expression (unveröffentlichte Daten, Probiodrug AG). Die Blockade der IL-6-Sekretion durch Heteroarylketone in humanen Zellen findet über einen bisher nicht bekannten Wirkmechanismus statt. Im Gegensatz zu den monoklonalen anti-IL-6-(Rezeptor)-Antikörpern sind Heteroarylketone relativ kostengünstig synthetisierbar und stellen bei gleicher bzw. größerer anti-inflammatorischer Potenz eine marktrelevante Alternative für die Behandlung von IL-6-assoziierten Erkrankungen dar. Eine Kombination von Heteroarylketonen mit den bereits verfügbaren Therapeutika wäre ein weiterer vielversprechender Therapieansatz.

Heteroarylketone als Inhibitoren der PEP und der IL-6-Expression

Heteroarylketone wurden ursprünglich als Inhibitoren der Elastase synthetisiert [182]. Später konnte gezeigt werden, dass bestimmte Heteroarylketone in der Lage sind, die PEP zu inhibieren [183]. Aufgrund der Kollokalisierung der Peptidase mit Tubulin wurde die Beteiligung von PEP beim intrazellulären Transport von Proteinen und speziell der Sekretion von Zytokinen und Chemokinen diskutiert. Demzufolge könnten durch die Inhibierung des PEP-Enzyms auch Transportprozesse von Proteinen beeinflusst werden. In darauf aufbauenden Untersuchungen wurde tatsächlich nachgewiesen, dass eine Verminderung der IL-6-Sekretion durch Heteroarylketone stattfindet. Das Ausmaß der Hemmung der IL-6-Sekretion ist dabei lediglich abhängig von der Wahl der Aminosäure bzw. der Kombination von zwei Aminosäuren zwischen dem Heteroaryl-Rest und der Schutzgruppe. Zudem wurden die Substanzen in der Art und Weise verändert, dass der inhibierende Effekt auf die Aktivität der PEP limitiert werden konnte (Tab. 4.1.). In diesem Fall erfolgte der Austausch der Aminosäure Prolin, welche für die Aktivitätshemmung der PEP essentiell ist, durch eine andere Aminosäure, wie zum Beispiel Alanin. Die Hemmung der IL-6-Sekretion blieb davon unbeeinflusst. In der Tabelle wurde die inhibierende Wirkung der Heteroarylketone auf die PEP-Aktivität und die IL-6-Sekretion jeweils mit grauem Untergrund dargestellt.

4.1. Charakterisierung verschiedener Heteroarylketone und deren Effekte bzgl. der Inhibierung der PEP-Aktivität und der IL-6-Sekretion (Z = Schutzgruppe Benzylloxycarbonyl, BT = Benzothiazol, Th = Thiazol, Phe = Phenylalanin, Pro = Prolin, Ala = Alanin, Arg = Arginin, Lys = Lysin, Leu = Leucin).

HAK-Verbindung	Charakterisierung	Effekt auf PEP-Aktivität [K_i -Wert]	verbleibende IL-6 Sekretion [% bezüglich Kontrolle \pm SD]
PP121	Z-Phe-Pro-BT	$4,6 * 10^{-9}$	$19,5 \pm 5,0$
PP168	Z-Phe-Pro-Th	$3,8 * 10^{-11}$	$32,8 \pm 13,7$
PP167	Z-Ala-Pro-BT	$3,8 * 10^{-11}$	$24,9 \pm 6,3$
PP192	Z-Arg-Pro-BT	$3,2 * 10^{-9}$	$98,4 \pm 19,9$
PP197	Z-Lys-Pro-BT	$4,1 * 10^{-9}$	$96,5 \pm 21,1$
PP253	Z-Ala-BT	$4,4 * 10^{-5}$	$13,1 \pm 3,6$
PP200	Z-Phe-Leu-BT	$> 6,6 * 10^{-5}$	$30,0 \pm 8,4$
PP271	Z-Ala-Th	$> 2,3 * 10^{-6}$	$79,5 \pm 13,2$
PP199	Z-Phe-Phe-BT	$> 2,6 * 10^{-4}$	$182,8 \pm 25,4$

Als Kontrolle wurde der in der Literatur beschriebene und nicht zur Klasse der Heteroarylketone gehörende spezifische PEP-Inhibitor Fmoc-Ala-Pyrr-CN verwendet [8, 118]. Durch diesen Inhibitor konnte die Konzentration des sekretierten IL-6-Proteins im Zellkulturüberstand von MG-U343 Gliomazellen nicht reduziert werden. Ferner blieb die IL-6-Expression von der siRNA-vermittelten Herunterregulation der PEP unbeeinflusst. Demzufolge wurde geschlussfolgert, dass die IL-6-Hemmung durch Heteroarylketone unabhängig von der Aktivität und vom Vorhandensein der Peptidase erfolgt. Trotz dieser Resultate kann die Beteiligung von PEP am Transport bzw. der Sekretion anderer Proteine nicht ausgeschlossen werden. Daher ist die Diskussion bezüglich der Beeinflussung solcher Prozesse durch PEP noch immer relevant und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die IL-6-inhibierenden Vertreter der Substanzklasse der Heteroarylketone müssen neben der PEP mindestens mit einem weiteren Protein interagieren. Diese Interaktion führt in einer speziellen Art und Weise zu der Reduzierung der IL-6-Sekretion. Um Heteroarylketone bezüglich ihres Einsatzes als Therapeutika optimieren zu können, ist die Kenntnis des neuen Zielproteins notwendig. Dieses sollte in der vorliegenden Arbeit identifiziert werden. Außerdem war beabsichtigt, den zugrunde liegenden molekularen Mechanismus der IL-6-hemmenden Wirkung von Heteroarylketonen aufzuklären.

Bei der Entwicklung eines Therapeutikums ist für gewöhnlich das therapeutisch-relevante Zielprotein bekannt. Aufgrund der Kenntnisse der Proteinstruktur, des aktiven katalytischen Zentrums und der physiologisch wichtigen Proteindomänen werden bioaktive inhibitorische Moleküle synthetisiert. Diese erfahren im Verlauf der weiteren Entwicklung im Hinblick auf ihre pharmakokinetischen Eigenschaften eine Optimierung. In dieser Arbeit musste jedoch

die umgekehrte chemische Analyse, ein sogenannter *reverse chemical approach*, angewandt werden. Dabei ist der einzige Ausgangspunkt für die Entwicklung des Wirkstoffs der therapeutisch-relevante Effekt. Im Fall der Heteroarylketone ist dies die Hemmung der IL-6-Expression. Ein gleicher Ansatz wurde auch für die Identifizierung des Zielproteins von Gamendazole, einem Inhibitor der Spermatogenese, durchgeführt [147]. Wie im Fall der Heteroarylketone war auch hier der Interaktionspartner nicht bekannt, sondern lediglich der Effekt des Wirkstoffs. Die Analyse erforderte die Modifikation der Heteroarylketone in der Art und Weise, dass zum einen die intrazelluläre Lokalisation und die Wiederfindung der Substanzen möglich wird und zum anderen ein stabiler Komplex aus Heteroarylketon und dessen Zielprotein entsteht. Gleichzeitig sollte die Ausgangssubstanz lediglich die IL-6-inhibierende Funktion haben und PEP nicht mehr in seiner Aktivität beeinflussen. Als Basis für die Synthese der modifizierten Inhibitoren wurde deshalb die Substanz PP200 mit den Aminosäuren Phenylalanin und Leucin ausgewählt. Dieses Heteroarylketon ist kein Inhibitor von PEP. Stattdessen findet nur die Hemmung der IL-6-Sekretion durch den Heteroaryl-Rest statt. Der Ausgangssubstanz wurde eine Biotin-Gruppe hinzugefügt, welche mit Streptavidin interagieren kann. Um eine stabile Verknüpfung zwischen Zielprotein und Heteroarylketon zu bewerkstelligen, wurde außerdem eine Azid-Gruppe angefügt. Bei der Bestrahlung mit UV-Licht findet die Bildung eines Nitrens statt. Aufgrund des elektrophilen Status dieser Elektronenmangelverbindung wird eine kovalente Bindung zwischen dem Inhibitor und dem Zielprotein ausgebildet. Somit kann der Komplex zwischen Heteroarylketon und Zielprotein mit Hilfe des Biotins intrazellulär lokalisiert sowie in einer Streptavidin-spezifischen Western-Blot-Analyse detektiert werden. In der Literatur ist die Biotinylierung sowie das Hinzufügen einer Azid-Gruppe an bestimmte Wirkstoffe mehrfach beschrieben worden [147, 184-186]. Diese Modifizierungen verursachen häufig einen Wandel der pharmakokinetischen Eigenschaften der eingesetzten Verbindungen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der biotinylierte Inhibitor PP301 auch unter Einfügung dieser strukturellen Veränderungen hemmend auf die IL-6-Expression im angewandten Modellsystem wirkt und somit bioaktiv ist. Allerdings musste dieser, im Unterschied zu der Ausgangssubstanz PP200, in einer Konzentration von 40 μM statt 20 μM eingesetzt werden, um eine adäquate Hemmung der IL-6-Sekretion zu erreichen. Zeitgleich zu dem biotinylierten Inhibitor wurde eine Negativkontrolle (PP310) synthetisiert. Diese beinhaltet dieselben Aminosäuren sowie die Biotin- und die Azid-Gruppe, jedoch nicht den Heteroaryl-Rest. Die Negativkontrolle hatte keinen Einfluss auf die IL-6-Expression im verwendeten Modellsystem.

Stimuli der IL-6-Sekretion in humanen MG-U343 Gliomazellen

Alle Heteroarylketone wurden unter bestimmten Bedingungen in einem Modellsystem validiert. Das Modell soll die pathologischen Prozesse von IL-6-korrelierten Erkrankungen simulieren. Dabei wurde die humane Gliomazelllinie MG-U343 durch den Einsatz von insgesamt 18 aus der Literatur bekannten Stimuli der IL-6-Expression zur Sekretion des IL-6-Proteins angeregt [187, 188]. Lediglich 4 von diesen erhöhten das in den Zellkulturüberstand sekretierte IL-6-Protein deutlich (> 10 -fach). Es handelte sich um die Substanzen PMA, OSM, STS und Forskolin. Die anderen eingesetzten Stimuli haben im Modellsystem der MG-U343 Gliomazellen keine bzw. nur eine sehr geringe Wirkung. Möglicherweise fehlen der verwendeten Zelllinie die Rezeptoren für diese Substanzen oder die an der Signalweiterleitung beteiligten Proteine. Speziell für MG-U343 Gliomazellen wurde bisher nur die IL-6-stimulierende Wirkung von OSM beschrieben [189]. Die Erhöhung der IL-6-Proteinexpression beruht bei den 4 ausgewählten Stimuli auf der Steigerung der Transkriptionsrate des IL-6-Gens. Es liegen jedoch unterschiedliche IL-6-mRNA-Expressionsmuster vor, welche auf die Nutzung verschiedener Signalwege zurückzuführen sind [190-192]. Im Fall von OSM und Forskolin konnte eine biphasische Expression des IL-6-Gens nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe um Van Wagoner zeigte 2000 übereinstimmend mit dieser Arbeit den biphasischen Verlauf der IL-6-Genexpression in humanen Astrozyten unter dem Einfluss von OSM [25]. Im Gegensatz dazu konnte bei der PMA-vermittelten IL-6-mRNA-Expression nur ein Anstieg innerhalb der ersten 6 Stunden und bei der STS-vermittelten Expression ein kontinuierlicher Anstieg über den gesamten Zeitraum verzeichnet werden. Heteroarylketone sind in der Lage, neben der autokrinen IL-6-Sekretion die OSM- sowie die STS-vermittelte Signalkaskade über die Hemmung der IL-6-mRNA-Neusynthese zu inhibieren. Aufgrund des Wissens über viele der beteiligten Proteine der OSM-vermittelten IL-6-Sekretion wurde dieses Modellsystem zum Zeitpunkt von 6 Stunden für die Identifizierung der Zielproteine von Heteroarylketonen ausgewählt. Der ermittelte Zeitpunkt resultiert aus den Ergebnissen von qPCR- und Immunzytochemie-Untersuchungen. Die Beeinflussung der IL-6-mRNA durch Heteroarylketone findet im Zeitraum zwischen 3 und 6 Stunden statt. In diesem Zeitfenster war auch die stärkste Markierung der Zellen durch den biotinylierten Inhibitor zu beobachten. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die verzögerte Gabe von Heteroarylketonen 6 Stunden nach der OSM-Stimulation zu einer Hemmung der IL-6-Sekretion führt. Vermutlich findet in dem genannten Zeitraum ein Umbau der Proteinkomplexe am IL-6-Promotor bzw. in der OSM-

vermittelten Signalkaskade in der Art und Weise statt, dass Heteroarylketone in diese eingreifen können.

Intrazelluläre Lokalisation von Heteroarylketonen

Mit Hilfe des Biotins der modifizierten Inhibitoren PP301 und PP310 war es möglich, Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation durchzuführen. Dabei konnte keine Markierung der MG-U343 Gliomazellen beobachtet werden, wenn diese mit der Negativkontrolle PP310 behandelt wurden. Die Verwendung des bioaktiven Heteroarylketons PP301 hatte eine Markierung der Zellen zur Folge. Die Färbung der Zellen durch Cy3-konjugiertes Streptavidin erfolgte dabei in Abhängigkeit der Konzentration des Inhibitors PP301 und der Inkubationszeit. Wie bereits erwähnt, war zum Zeitpunkt von 6 Stunden die intensivste Markierung der Zellen durch das Heteroarylketon PP301 zu sehen, während diese nach 24 Stunden deutlich geringer ausgeprägt war. Das Biotin des Inhibitors konnte weder im Kern noch membranständig detektiert werden. Hauptsächlich war eine zytoplasmatische, insbesondere eine perinukleäre und vesikuläre Lokalisation zu beobachten. Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine Interaktion mit membranständigen Rezeptoren und mit kernlokalisierten Transkriptionsfaktoren sehr unwahrscheinlich. Der Inhibitor wird stattdessen, basierend auf den physiko-chemischen Eigenschaften, in bestimmten Kompartimenten, wie z.B. im cis-Golgi-Netzwerk, in den Lysosomen und im ER akkumuliert. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss jedoch bedacht werden, dass keine Daten zum Metabolismus der verwendeten Heteroarylketone in MG-U343 Gliomazellen vorliegen. So kann mittels der Färbung mit Cy3-konjugiertem Streptavidin lediglich das Biotin in der Zelle nachgewiesen werden. Wenn dieses von dem eigentlichen Wirkstoff des Inhibitors abgespalten wird, liegen beide Moleküle getrennt voneinander vor und können daher unterschiedlich lokalisiert sein. Der für die IL-6-Hemmung verantwortliche Heteroaryl-Rest könnte sich demnach in einem anderem Kompartiment befinden als das abgespaltene Biotin, wobei jedoch nur das Letztere sichtbar markiert werden kann. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass der gebundene Inhibitor nicht mehr durch das Streptavidin detektiert werden kann, da das Biotin nicht mehr frei zugänglich ist.

Die oben genannten Lokalisationen des Inhibitors PP301 im ER und in den späten Endosomen wurden näher untersucht. Die Analyse der Verteilung im ER erfolgte mit Hilfe des Markerproteins Calnexin. Die Markierung der späten Endosomen fand durch die Verwendung des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors (MPR) statt. Generell konnte in beiden Kompartimenten die Koloalisation der biotinylierten Substanz PP301 mit den markierten

Proteinen nachgewiesen werden. Im Fall von PP301 und Calnexin sind die Markierungen allerdings nicht in allen Bereichen der Zelle identisch. Das markierte Calnexin stellt jedoch nur eins von mehreren Proteinen des ER dar, d.h. es werden nicht alle Bereiche dieses Kompartiments markiert. Um eine konkretere Aussage zur Lokalisation des Inhibitors PP301 im ER zu treffen, müssten daher weitere Koloalationen mit anderen ER-Proteinen durchgeführt werden, wie z.B. der Protein-Disulfid-Isomerase und Calreticulin. Im Gegensatz zur Koloalation des Inhibitors mit Calnexin konnte das bioaktive Heteroarylketon PP301 fast vollständig mit dem Markerprotein der späten Endosomen, MPR, koloalisiert werden.

Dieses gemeinsame Vorkommen deutet auf eine Interaktion von Heteroarylketonen mit Proteinen des endosomalen Transports hin. Zudem findet im sauren Milieu der Endosomen der Abbau bzw. der Wiederaufbau von Rezeptoren, wie z.B. des *Low-Density-Lipoprotein*-Rezeptors statt [137]. Möglicherweise kann die Bindung von Heteroarylketonen an diese Rezeptoren nur bei einer nicht membranständigen Lokalisation realisiert werden, da lediglich in diesem Fall die Bindungsstelle zugänglich wird. Wenn beispielsweise die Aktivierung von Proteinen aufgrund einer Ligandenbindung stattfindet, ändert sich deren Konformation und u. U. auch die Lokalisation. Diese Konformationsänderungen ermöglichen die Bindung von neuen Proteinen, welche zuvor infolge der für die Bindung ungünstigen Stereometrie nicht binden konnten. Tritt zudem eine Modifikation der Lokalisierung auf, so befindet sich der gebundene Wirkstoff vor der Ligandenbindung in anderen Zellkompartimenten als danach. Würde keine Lokalisationsänderung, wie z.B. die Internalisierung von Rezeptorkomplexen stattfinden, hätte die Inkubation der Zellen mit dem bioaktiven Heteroarylketon PP301 die Markierung der Zellmembran zur Folge. Nach Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit konnte jedoch keine Membranmarkierung beobachtet werden.

Im Fall der kovalenten Verknüpfung der Heteroarylketone mit deren Zielproteinen ist die beobachtete Verteilung des Inhibitors in mehreren Zellkompartimenten entweder mit der Multifunktionalität von einem Zielprotein oder mit der Bindung an mehrere unterschiedliche Proteine zu erklären. Aufgrund der engen Wechselwirkung zwischen ER und Kernmembran wurde in der nachfolgenden ein- und zweidimensionalen Western-Blot-Analyse, neben dem Extrakt mit allen löslichen Proteinen der Zelle, sowohl die Kern- als auch die Zytoplasmafraktion verwendet.

Potentielle Zielproteine von Heteroarylketonen

Bereits in der eindimensionalen Western-Blot-Analyse konnten durch die Behandlung der Zellen mit dem bioaktiven Inhibitor PP301 sehr viele Biotin-markierte Proteine detektiert werden. Dagegen war die Anzahl der Banden in der Western-Blot-Analyse des Negativ-

kontrollextrakts gering. Dementsprechend wurde auch in den Streptavidin-spezifischen Immunoblots der 2-D-Gelelektrophorese der PP301-behandelten Zellextrakte eine große Anzahl von markierten Proteinen im Vergleich zur Negativkontrolle identifiziert. In Bezug auf diese Ergebnisse sind die hier gezeigten Arbeiten mit denen zur Identifikation der Zielproteine der Wirkstoffe Gamendazole und Indomethacin ähnlich. In diesen Untersuchungen wurde ebenfalls eine Vielzahl von Proteinen *in vivo* mit einer biotinylierten Substanz markiert [147, 186]. Aufgrund der Versuchsbedingungen zur Identifikation der Zielproteine von Heteroarylketonen war keine vollständige Erfassung aller in Frage kommenden Proteine möglich. Die Untersuchungen wurden beispielsweise durch die verwendeten Gele und die Detektionsgrenzen der angewandten Methoden limitiert. Nach der Zuordnung der Streptavidin-markierten Proteinspots der Immunoblots zu den mittels Silbergefärbten Proteinspots der dazugehörigen Gele erfolgte die massenspektroskopische Analyse. Bei einigen der Streptavidin-markierten Proteine war die Zuordnung zu einem Proteinspot im Silbergel nicht möglich. Diese Proteine lagen vermutlich in einer zu geringen Konzentration vor und konnten deshalb nicht mittels der verwendeten Färbung detektiert werden. Die Detektionsgrenze von silbergefärbten Gelen liegt bei etwa 0,5 ng (Herstellerangabe, Pierce). Der Streptavidin-konjugierte Antikörper weist jedoch eine höhere Empfindlichkeit auf, so dass auch markierte Proteine im Immunoblot sichtbar gemacht werden konnten, welche auf dem Silbergel nicht detektiert wurden. Außerdem fand aufgrund der verwendeten Gele nur die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 10 kDa und 150 kDa statt. Alle Proteine, die ein höheres oder geringeres Molekulargewicht hatten, wurden nicht erfasst. Bei einigen der Proteinspots des Silbergels erfolgte massenspektroskopisch keine Identifizierung. Insgesamt wurden 32 Proteine aus dem Zytoplasma- und dem Kernextrakt sowie dem Extrakt aller löslichen Proteine von PP301- und PP310-behandelten MG-U343 Gliomazellen identifiziert. Dabei erfolgte in keinem Fall dieser Analysen der Nachweis eines biotinylierten Proteinfragments. Fünf der in der Negativkontrolle gefundenen Proteine konnten auch in den Proben nachgewiesen werden, welche mit dem biotinylierten bioaktiven Inhibitor PP301 behandelt wurden. Diese entweder endogen biotinylierten oder unspezifisch markierten Proteine können aus diesem Grund als spezifische Interaktionspartner von Heteroarylketonen ausgeschlossen werden. Zu den 27 Proteinen, welche nur in den PP301-behandelten Zellextrakten vorhanden waren, wurde eine Literaturrecherche bezüglich der Eigenschaften durchgeführt, welche auf die Involvierung in der OSM-vermittelten IL-6-Expression hinweisen. Auf dieser Grundlage wurden 3 Kandidaten ausgewählt. Dabei handelt es sich um das *Valosin containing protein 1* (VCP1),

Filamin A (FLNA) und den eukaryotischen Elongationsfaktor 1A1 (eEF1A1). Das VCP1-Protein, auch p97 genannt, gehört zur AAA-Superfamilie (*ATPases associated with various cellular activities*). Es ist beteiligt am Ubiquitin/Proteasom-vermitteltem Abbau von Proteinen, beim Vesikeltransport und deren Fusion, bei der Assemblierung von Peroxisomen, in der Regulation des Zellzyklus und beim ER-assoziierten Abbau (ERAD) von Proteinen. Zudem ist VCP1 als Interaktionspartner der Akt-Kinase sowie durch die Beteiligung am Abbau des Inhibitors der NF κ B-Transkriptionsfaktoren (I κ B α) in intrazellulären Signalkaskaden involviert [155-160]. Diese Transkriptionsfaktoren sind u.a. wichtig für die Regulation des Zellwachstums, der Zellproliferation, der Zellapoptose sowie der Immunantwort und werden speziell in der OSM-vermittelten Signalkaskade aktiviert. NF κ B ist ein wichtiger Regulator der IL-6-Genexpression. Seine Bedeutung für die Aktivierung des IL-6-Gens und anderer Proteine wird u.a. durch die Verwendung von NF κ B-Inhibitoren als Therapeutika für die Behandlung von inflammatorischen Erkrankungen deutlich. Das Protein FLNA wurde als aktinbindendes Protein identifiziert, welches für die Bindung des Aktins an Membranglykoproteine verantwortlich ist. FLNA ist involviert in der Ausbildung und der Regulation des Zytoskeletts und damit wichtig für die Zellmigration und die Zellform. Von dem 280 kDa großen Protein wird durch limitierte Proteolyse am C-Terminus ein 90 kDa Fragment abgespalten, welches an Integrine, membrangebundene Rezeptoren und sekundäre Botenstoffe binden und in den Zellkern translozieren kann [149, 150, 193].

Der Elongationsfaktor 1A1 ist ein Bestandteil des Proteinbiosynthese-Komplexes und gewährleistet eine hohe Effektivität und Genauigkeit bei der Translation von Proteinen in Eukaryoten. Das eEF1A1-Protein wurde als GTP-bindendes Protein identifiziert und ist verantwortlich für den Transport sowie die Bindung von Aminoacyl-tRNA an die A-Position des Ribosomenkomplexes [143, 194]. Als Teil des Proteinbiosynthese-Apparats und der Fähigkeit, Aktinfilamente zu bündeln und damit in die Anordnung des Zytoskeletts einzugreifen [142, 145, 148], stellt das eEF1A1-Protein eine wichtige Verknüpfung zwischen der Translation und dem Transport von Proteinen dar. Zudem wurde nachgewiesen, dass eEF1A1 mit wichtigen Signalproteinen über die Bindung an SH2-Domänen interagieren kann [141, 147]. Unter anderem findet über eine Interaktion mit den SH2-Domänen der SHP2-Phosphatase die Regulation des Ras/Raf/Erk-Signalswegs statt [146]. Diese Kinasen werden durch die Inkubation der Zellen mit OSM stimuliert und beeinflussen nachfolgend die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B p65 oder Stat3 [15, 173]. Außerdem konnte die Wechselwirkung mit der PKC δ -Kinase gezeigt werden, welche ebenfalls bei der Bindung von OSM an den Rezeptorkomplex gp130/OSMR rekrutiert wird [144]. Mit diesem

Hintergrund steigt die Wahrscheinlichkeit der Involvierung des eEF1A1-Proteins in der OSM-vermittelten Signalkaskade. Außerdem wurde es in den Analysen der vorliegenden Arbeit in der Kern- und der Zytoplasmafraktion, sowie in der Fraktion mit allen löslichen zellulären Proteinen identifiziert. Dies könnte jedoch auch auf die Häufigkeit dieses Proteins zurückzuführen sein, welches 1 - 2 % des Gesamtproteins einer Zelle darstellt [161]. Die 3 putativen Kandidaten wurden mittels einer Streptavidin-spezifischen Immunpräzipitation bezüglich der *in vivo* Biotinylierung überprüft.

Die Ergebnisse der Analysen zeigten, dass ausschließlich eEF1A1 in der PP301-behandelten Probe biotinyliert war, während dies für FLNA und VCP1 ausgeschlossen werden konnte. Zudem wurde die Bindung von eEF1A1 an das biotinylierte Heteroarylketon durch die Anwendung der Methode der Oberflächenplasmonenresonanz eindeutig bestätigt. Im Gegensatz dazu erfolgte keine Bindung von VCP1 und FLNA an das biotinylierte Heteroarylketon PP301 (Daten nicht gezeigt). Schlussfolgernd aus diesen Ergebnissen wurde der Elongationsfaktor mit Hilfe dieser Methoden als potentieller Interaktionspartner von Heteroarylketonen validiert. Die Proteine VCP1 und FLNA wurden dagegen verworfen. Beide Proteine sind mit einem hohen Anteil in der Zelle vertreten. Es ist möglich, dass die jeweils signalgebenden Proteine des Streptavidin-spezifischen Immunoblots gleiche Eigenschaften bezüglich des isoelektrischen Punkts und des Molekulargewichts wie VCP1 bzw. FLNA aufwiesen. Damit wären sowohl die detektierten Proteine VCP1 und FLNA als auch die, durch den biotinylierten Inhibitor PP301-spezifisch markierten, Proteine im Gel ähnlich lokalisiert. Aufgrund der geringen Konzentration der signalgebenden Proteine und den gleichzeitig hohen Konzentrationen von VCP1 und FLNA konnten nur die letztgenannten Proteine im entsprechenden Silbergel identifiziert werden. Möglich ist auch, dass die signalgebenden Proteine in geringem Abstand zu den identifizierten Proteinen VCP1 bzw. FLNA lagen, sodass eine Verschiebung zwischen Protein und Signal stattfand und keine korrekte Zuordnung erfolgte. Daher wurden nur VCP1 und FLNA nachgewiesen und nicht das eigentliche biotinylierte Protein. Im Gegensatz dazu konnte der Elongationsfaktor mit einem spezifisch gegen eEF1A1-gerichteten Antikörper nachgewiesen werden. Demnach bindet dieses Protein mit großer Wahrscheinlichkeit an Heteroarylketone. Ein weiterer Hinweis für die Wechselwirkung zwischen eEF1A1 und dem biotinylierten Inhibitor PP301 ist die teilweise parallele intrazelluläre Lokalisation und die modifizierte Markierung der Zellen durch den biotinylierten Inhibitor bei der siRNA-vermittelten Herunterregulation des eEF1A1-Proteins. In der Zelle liegt der Elongationsfaktor u.a. perinukleär im Zytoplasma vor. Diese Markierungen sind vergleichbar mit denen des Heteroarylketons PP301. Die

zytoplasmatische perinukleäre Lokalisation des eEF1A1-Proteins wurde in der Literatur bereits beschrieben [195]. Dort konnte das Protein speziell im ER lokalisiert werden, was mit der Funktion des Elongationsfaktors in der Proteinbiosynthese erklärt werden kann. Eine Translokation des Proteins in den Nukleus konnte in dieser Arbeit im Gegensatz zu anderen Untersuchungen nicht gezeigt werden [196]. Ein Grund dafür könnte die Wechselwirkung von eEF1A1 mit anderen Proteinen sein, durch welche das für die Markierung benötigte Epitop nicht zugänglich ist. Neben der perinukleären Lokalisation ist das eEF1A1-Protein in dieser Arbeit zum ersten Mal in den Zellfortsätzen von humanen Gliomazellen nachgewiesen worden. Diese membranständige Lokalisation des Elongations-faktors ist vermutlich mit der Bindung an Rezeptorproteine zu erklären. Das eEF1A1-Protein hat eine GTPase-Aktivität und könnte damit eine ähnliche Funktion wie die Ras-GTPase, welche für die Aktivierung des Ras/Raf/Erk1-Signalwegs von entscheidender Bedeutung ist, haben. Die Ras-GTPase wird durch die SHP2-Phosphatase aktiviert. Es ist bekannt, dass das eEF1A1-Protein in der Lage ist, an die SH2-Domänen der SHP2-Phosphatase zu binden. Diese Lokalisation würde somit mittels der Bindung an die SHP2-Phosphatase erklärt. Im Fall der Heteroarylketone konnte keine Membranmarkierung beobachtet werden. Entweder kann der Inhibitor dort nicht an sein Zielprotein binden oder er ist im gebundenen Zustand nicht detektierbar. Möglicherweise findet eine Komplexierung mehrerer Proteine statt, durch welche das Biotin für die Markierung durch das Cy3-konjugierte Streptavidin nicht mehr verfügbar ist. Es wurde auch beschrieben, dass eEF1A1 durch die Hydrolyse von GTP zu GDP einer der größten Konformationsänderungen, verglichen mit anderen GTPasen, unterliegt [140, 197]. Die Abspaltung eines Phosphatrestes von GTP und die daraus folgende Änderung der sterischen Form ist häufig mit einer Modifikation der funktionellen Eigenschaften des Proteins und damit seiner intrazellulären Lokalisation verbunden. Es ist zu vermuten, dass der Inhibitor PP301 nur an eine dieser beiden Konformationen von eEF1A1 binden kann und demzufolge nur die dazu gehörige Lokalisation aufweist. In diesem Fall wäre das GTP-eEF1A1-Protein in den Zellfortsätzen an bestimmte membranständige Rezeptorproteine gebunden. Die Bindung des Heteroarylketons PP301 wird jedoch aufgrund der Konformation des Proteins verhindert. Durch die Katalyse von GTP zu GDP liegt das eEF1A1-Protein in einer anderen Form vor und ist nicht mehr an der Zellmembran lokalisiert. Aufgrund der genannten Modifikationen kann der Inhibitor PP301 an das Protein binden. Dies würde die Lokalisation des biotinylierten Inhibitors in den späten Endosomen erklären. In diesen findet der Abbau bzw. das Recycling der internalisierten Rezeptor-komplexe statt [137]. Neben der Bindung des Inhibitors an das eEF1A1-Protein wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt,

dass der Elongationsfaktor in die OSM-Signalkaskade involviert ist. Es besteht eine Korrelation zwischen der siRNA-vermittelten Herunterregulation des eEF1A1-Proteins und der Senkung der IL-6-mRNA-Expression sowie der IL-6-Sekretion. Somit haben Heteroarylketone und die Verminderung des eEF1A1-Protein denselben Effekt auf die IL-6-Genexpression im Modellsystem. Es ist daher wahrscheinlich, dass Heteroarylketone die IL-6-mRNA-Synthese und in der Konsequenz die Sekretion dieses Zytokins über die Bindung an das eEF1A1-Protein beeinflussen.

eEF1A1 in der OSM-vermittelten IL-6-Expression

Aufgrund der oben dargestellten Zusammenhänge muss der Elongationsfaktor auf eine bestimmte Art und Weise mit einem oder mehreren Mitgliedern der OSM-Signalkaskade interagieren. Die Möglichkeiten der Beeinflussung des Signalwegs ergeben sich aus den bekannten Interaktionspartnern des eEF1A1-Proteins. Es wurde beschrieben, dass eEF1A1 mit der PKC δ -Kinase interagiert, sowie über phosphorylierte Tyrosine in Kontakt mit SH2-Domänen, wie z.B. in der SHP2-Phosphatase, treten kann [15, 144, 146, 167, 198, 199]. Die beiden genannten Enzyme sind direkt in die OSM-Signalkaskade involviert [200]. Die OSM-vermittelte Rekrutierung der SHP2-Phosphatase an das gp130-Protein führt zur Aktivierung des Ras/Raf/Erk-Signalwegs [60, 163, 201]. Als Konsequenz der Interaktion von Heteroarylketonen mit dem Elongationsfaktor käme es zu einer Beeinflussung der Aktivierung der Erk1/2-Kinase. Der Elongationsfaktor könnte außerdem an den für die IL-6-Sekretion sehr wichtigen Transkriptionsfaktor Stat3 binden, da dieser ebenfalls SH2-Domänen aufweist. Mit Hilfe der siRNA-vermittelten Herunterregulation von Proteinen wurde nachgewiesen, dass die PKC δ -Kinase, die Erk1-Kinase und der Transkriptionsfaktor Stat3 große Bedeutung als Positivregulatoren der OSM-vermittelten IL-6-Expression im verwendeten Zellkulturmodell besitzen. Im Gegensatz dazu wurde die IL-6-Sekretion nicht durch die Erk2-Kinase beeinflusst.

Heteroarylketone sind in der Lage, die OSM-vermittelte Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 727 des Stat3-Proteins zu inhibieren. Diese Reduktion der Phosphorylierung konnte ebenso durch die siRNA-vermittelte Herunterregulation des eEF1A1-Proteins erreicht werden. Dagegen findet keine Beeinflussung der Stat3-Phosphorylierung an der Aminosäure Tyrosin 705 statt. Die genannten beschriebenen Phosphorylierungen des Stat3-Proteins sind in unterschiedlichen Prozessen bedeutsam. Während die Aktivierung der Aminosäure Tyrosin 705 die Dimerisierung sowie die nachfolgende Translokation von Stat3-Homodimeren und Stat1/Stat3-Heterodimeren in den Zellkern zur Folge hat, ist die

Phosphorylierung des Serin 727 wichtig für die Verstärkung der transkriptionellen Aktivität von Promotoren mit einer Stat3-Konsensussequenz [134, 162-164]. Schlussfolgernd aus den Ergebnissen dieser Arbeit spielt die PKC δ -Kinase keine Rolle für die Phosphorylierung des Stat3-Proteins an der Aminosäure Serin 727. Demgegenüber hat die Erk1-Kinase einen großen Einfluss auf diese Phosphorylierung. Es wurde jedoch auch belegt, dass weder Heteroarylketone noch deren Interaktionspartner eEF1A1 die OSM-vermittelte Aktivierung der Erk1/2-Kinase über die Phosphorylierung an den Aminosäuren Threonin 202 und Tyrosin 204 modifizieren können und damit nicht der Ras/Raf/Erk1-Signalweg bzw. die Rekrutierung der SHP2-Phosphatase an den Rezeptorkomplex beeinflusst wird. Aufgrund der vorliegenden Daten muss die Erk1-vermittelte Phosphorylierung des Stat3-Proteins an der Aminosäure Serin 727 durch Heteroarylketone beeinflusst werden. Möglicherweise ist der Elongationsfaktor für die Rekrutierung der Erk1-Kinase an das Stat3-Protein notwendig. Mittels Immunzytochemie konnte nachgewiesen werden, dass das eEF1A1-Protein und der Transkriptionsfaktor Stat3 kolokalisiert in den Zellfortsätzen vorliegen. Auch die PKC δ -Kinase wurde dort detektiert. Durch die Anwendung von Immunpräzipitationen wurden die Komplexbildungen von eEF1A1 und Stat3 sowie von eEF1A1 und PKC δ nachgewiesen. Demzufolge interagieren die genannten Proteine intrazellulär miteinander. Diese Interaktionen werden durch die Inkubation der Zellen mit Heteroarylketonen derartig beeinflusst, dass die Phosphorylierung des Stat3-Proteins an der Aminosäure Serin 727 nur noch in reduziertem Maße stattfindet. Durch die Herunterregulation des Erk1-Proteins um 92 % wird die Phosphorylierung des Stat3-Proteins lediglich um 60 % vermindert. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Phosphorylierung nicht ausschließlich von der Erk1-Kinase abhängt, sondern auch andere Kinasen beteiligt sind. In der Literatur sind eine Reihe von Kinasen beschrieben, welche in die Phosphorylierung von Stat3 an der Aminosäure Serin 727 involviert sein können. Dazu gehören neben der Erk1/2- und der PKC δ -Kinase unter anderem die p38/MAPK-, die c-Jun-, die MAPK/Erk-Kinase-Kinase 1 (MEKK1) sowie die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase II [202-208]. Diese Kinasen werden jeweils durch unterschiedliche Stimuli aktiviert. Die Untersuchungen zur Beeinflussung weiterer Kinasen durch einen Vertreter der Heteroarylketone, welcher über keine PEP-inhibierende Wirkung verfügt, wurde im Rahmen dieser Arbeit in Auftrag gegeben (Cerep, Frankreich). Dabei erfolgte jeweils die Messung der Änderung des Umsatzes eines bekannten Substrats der Kinase nach der Inkubation dieser mit dem Inhibitor. Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität der ausgewählten Kinasen nicht durch Heteroarylketone beeinträchtigt wird (Tab. 4.2.).

4.2. Beeinflussung der Aktivität ausgewählter Kinasen durch das Heteroarylketon PP167.

Kinase	Referenz bzgl. des Substrats	Relative Kinase Aktivität \pm SD [% bzgl. Kontrolle]
Akt 1/PKB α	[209]	103,6 \pm 4,2
Erk1	[210]	106,2 \pm 4,5
Erk2	[211]	92,1 \pm 0,0
IKK α	[212]	102,7 \pm 2,8
JNK1	[213]	100,9 \pm 1,8
Lck-Kinase	[214]	98,6 \pm 11,2
Lyn-Kinase	[215]	84,5 \pm 5,7
p38 α -Kinase	[216]	95,8 \pm 15,2
PDK1	[217]	106,8 \pm 0,1
PKA	[218]	93,6 \pm 2,0
PKC α	[219]	97,7 \pm 1,3
PKC δ	[219]	107,9 \pm 2,0
Src-Kinase	[215]	121,8 \pm 2,8

Wie bereits erwähnt, hat die PKC δ -Kinase in dem verwendeten Modellsystem keinen Einfluss auf die Phosphorylierung des Stat3-Proteins an der Aminosäure Serin 727. Jedoch hat sie gleichartig wie die Erk1-Kinase eine große Bedeutung für die OSM-vermittelte IL-6-Expression. In der Konsequenz heißt das, dass die IL-6-Expression nicht allein von der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Stat3 abhängt. Tatsächlich wurde durch die Behandlung der Zellen mit einer spezifischen siRNA gegen Stat3 die IL-6-mRNA-Synthese lediglich um 45 % reduziert. Es ist bekannt, dass das Stat3-Protein nicht direkt an den Promotor des IL-6-Gens binden kann, da dieser keine Stat3-Konsensussequenz enthält. Dagegen enthält das als Negativregulator beschriebene Socs3-Gen eine Stat3-Konsensussequenz auf seinem Promotor und ist damit direkt vom Stat3-Protein abhängig. Diese unterschiedlichen Abhängigkeiten konnten mit Hilfe der siRNA-vermittelten Stat3-Herunterregulation gezeigt werden. Dabei wurde die Expression des Socs3-Gens mit 80 % stärker durch den Einsatz der spezifischen siRNA abgesenkt als die des IL-6-Gens (40 %). Bisher war das Stat3-Protein durch die Beeinflussung des Socs3-Gens als Negativregulator der IL-6-Expression beschrieben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen allerdings die Rolle von Stat3 als Positivregulator auf. Das bedeutet, dass Stat3 in der Lage ist, die Expression des IL-6-Gens zu verstärken. Die direkte Beeinflussung der IL-6-Expression findet dabei über die Komplexbildung mit anderen Transkriptionsfaktoren und die Bindung

dieser Komplexe an den IL-6-Promotor statt. Aus der Literatur ist bekannt, dass Stat3 zusammen mit dem Transkriptionsfaktor p65 die Expression des IL-6-Gens reguliert [220, 221]. In den Untersuchungen dieser Arbeit wurde belegt, dass die Reduzierung der OSM-vermittelten Komplexbildung der beiden Transkriptionsfaktoren durch Heteroarylketone vermindert wird. Diese Modifikation der Komplexbildung durch Heteroarylketone ist vergleichbar mit der Beeinflussung der Stat3-Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 727. Deshalb wird vermutet, dass die Komplexbildung teilweise von dieser Phosphorylierung abhängt. Für die Aktivierung des Socs3-Gens wird kein Adapterprotein benötigt, da Stat3 direkt an den Socs3-Promotor binden kann [176]. Mit Hilfe der siRNA-vermittelten Herunterregulation der Erk1-Kinase konnte gezeigt werden, dass die Beeinflussung der Phosphorylierung der Aminosäure Serin 727 an Stat3 eine geringe Auswirkung auf die Expression des Socs3-Proteins hat. In diesem Fall wurde die IL-6-Expression stärker abgesenkt als die Socs3-Expression. Es wird vermutet, dass die Aktivierung des Socs3-Gens von der Stat3-Phosphorylierung an der Aminosäure Tyrosin 705 abhängt. Diese Überlegungen werden durch die Ergebnisse der Beeinflussung der Socs3-Expression durch Heteroarylketone unterstützt, denn es konnte gezeigt werden, dass sowohl IL-6-bioaktive Heteroarylketone als auch die siRNA-vermittelte Herunterregulation des eEF1A1-Proteins die IL-6-Expression stärker hemmen als die des Socs3-Proteins.

Die Entwicklung eines Therapeutikums, welches mit einem der wichtigsten Proteine der Proteinbiosynthesemaschinerie interagiert, ist kritisch zu diskutieren. Der Elongationsfaktor ist verantwortlich für den Transport sowie die Bindung von Aminoacyl-tRNA an die A-Position des Ribosomenkomplexes [143, 194]. Er ist ubiquitär im Organismus verbreitet und stellt mit einem Anteil von 1 - 2 % des Gesamtproteins einer Zelle eines der häufigsten Proteine dar [161]. Außer der bekannten Funktion des Elongationsfaktors in der Proteinbiosynthese sind eine Reihe anderer Funktionen bekannt (Tab. 4.3.).

Aufgrund der Multifunktionalität dieses Proteins sollte untersucht werden, ob möglicherweise weitere Funktionen durch Heteroarylketone modifiziert werden. Daher ist ein Vergleich zwischen diesen Inhibitoren und einem bekannten Inhibitor des eEF1A1-Proteins zweckmäßig. Das als Kinaseinhibitor beschriebene Flavonoid Quercetin ist ein solcher Inhibitor. Diese Substanz hemmt die Proteinbiosynthesefunktion des Elongationsfaktors durch eine direkte Blockade der tRNA-Bindungsstelle von eEF1A1 [222]. Dadurch werden sowohl das Wachstum der Zellen als auch deren Proliferation inhibiert.

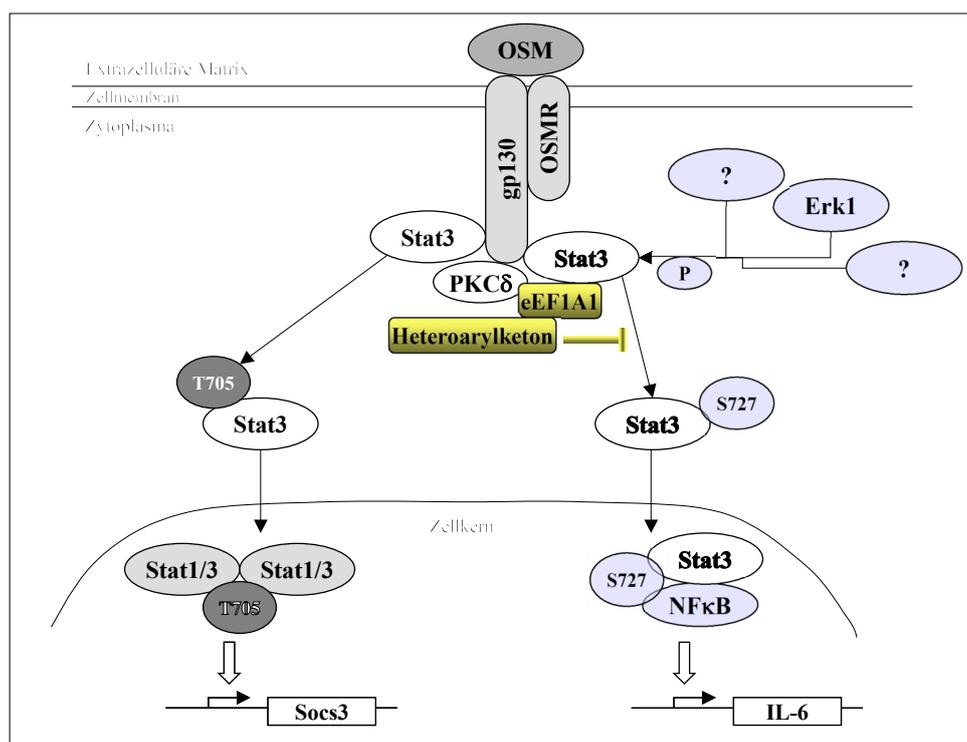
4.3. Funktionen von eEF1A1 in der Zelle.

Zellulärer Prozess	Biologische Aktivität	funktionelle Relevanz	Zitat
Transport	tRNA-Bindung	Proteinbiosynthese	[223]
Aktinzytoskelett	Bündelung von Aktinfilamenten	Metastasierung	[142, 145, 148]
Transport	Kernexport von Proteinen	Proteintransport	[224]
Mikrotubulinzytoskelett	Abbau der Mikrotubuli	Apoptose	[225-227]
Signaltransduktion	Genexpression von Akt1, NFκB und IL-1	Spermatogenese	[147]
Signaltransduktion	Bindung an SH2-Proteindomänen	Kanzerogenese	[141, 146]
Zellzyklus	bindet an HIV-1 Gag	RNA-Replikation	[228]
Signaltransduktion	Interaktionspartner von Akt2	Kanzerogenese	[229]
Proteinbiosynthese	Interaktionspartner des <i>Testis-specific protein Y-encoded</i> (TSPY)	Kanzerogenese/Verstärkung der Proteinbiosynthese	[230]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde belegt, dass Quercetin im verwendeten Zellkulturmodell nicht die gleichen Eigenschaften wie HAK-Inhibitoren bezüglich der Hemmung der IL-6-Sekretion besitzt (unveröffentlichte Daten, Probiodrug AG). Zudem hatten weder IL-6-bioaktive noch IL-6-unwirksame Heteroarylketone eine signifikante Auswirkung auf die Zellproliferation. Demgegenüber wurde die Gesamtmenge der Proteine der behandelten Zellen gegenüber den Kontrollen durch die siRNA-vermittelte Herunterregulation der eEF1A1-Expression stark vermindert, was auf die Rolle des Elongationsfaktor in der Proteinbiosynthese zurückzuführen ist. Aufgrund dieser Daten ist eine Blockade der tRNA-Bindungstelle durch HAK-Inhibitoren unwahrscheinlich. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit dem Wirkstoff Gamendazole, einem Inhibitor der Spermatogenese, erzielt. Diese Substanz interagiert ebenfalls wie Heteroarylketone direkt mit dem Elongationsfaktor 1A1. Sie beeinflusst jedoch nicht dessen Funktion in der Proteinbiosynthese [147]. Der Wirkmechanismus von Gamendazole ist ebenso wie der der Heteroarylketone noch nicht vollständig aufgeklärt. Deshalb sind weitere zellbiologische, biochemische und molekularbiologische Untersuchungen notwendig. Außer dem bereits erwähnten Wirkstoff Gamendazole sind bisher keine weiteren Substanzen bekannt, welche ebenfalls mit eEF1A1 wechselwirken und dabei bestimmte, außerhalb der Proteinbiosynthese wirkende, eEF1A1-abhängige physiologische Prozesse blockieren.

Hypothese des molekularen Wirkmechanismus von Heteroarylketonen bezüglich der Hemmung der IL-6-Expression

Aufgrund der OSM-Stimulation werden verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert. Als Auslöser der zu differenzierenden Signalwege dient jeweils die Bindung von OSM an den gp130/OSMR-Rezeptorkomplex.



4.4. Beeinflussung der IL-6-Genexpression durch Heteroarylketone über die Phosphorylierung des Stat3-Proteins an der Aminosäure Serin 727.

Im Verlauf der Signalkaskaden führt die Aktivierung verschiedener Kinasen u.a. zur Phosphorylierung des Stat3-Proteins an der Aminosäure Serin 727. Es wurde belegt, dass diese Phosphorylierung verstärkend auf die IL-6-Genexpression wirkt. Ebenso wird durch diese Modifikation des Proteins die Komplexbildung mit dem Transkriptionsfaktor p65 gesteigert. Sowohl die Stat3-Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 727, die Komplexbildung des Stat3-Proteins mit p65 als auch die IL-6-Expression können mittels Heteroarylketonen verringert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte das eEF1A1-Protein als Bindungspartner der Heteroarylketone identifiziert werden. Die Herunterregulation dieses Proteins führt zu denselben Konsequenzen wie der Einsatz der Heteroarylketone. Der Elongationsfaktor weist dieselbe subzelluläre Lokalisation wie die Proteine p65 und Stat3 auf. Alle genannten Proteine konnten in den Zellfortsätzen der MG-U343 Gliomazellen

detektiert werden. Ebenso wurde die Komplexbildung dieser Proteine mittels Immunpräzipitationsversuchen validiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Heteroarylketone ihre IL-6-senkende Wirkung über die Interaktion mit dem eEF1A1-Protein vermitteln. Aufgrund dieser Wechselwirkung findet die Hemmung der Stat3-Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 727 statt. Als Ursache dieser Phosphorylierung ist unter anderem die Erk1-Kinase zu nennen. Allerdings zeigen die Resultate dieser Arbeit auch, dass weder Heteroarylketone noch die siRNA-vermittelte Herunterregulation von eEF1A1 einen Einfluss auf die Erk1/2-Kinaseaktivität haben. Somit stellt die Erk1-Kinase einen wichtigen Faktor für die Phosphorylierung des Stat3-Proteins dar. Sie ist allerdings nicht der alleinige Auslöser für diese spezielle Modifizierung an dem Transkriptionsfaktor Stat3. Aus diesem Grund sind weitere Untersuchungen zur Identifizierung der beteiligten Kinasen und Proteine notwendig.

5. AUSBLICK

Obwohl ein Teil des molekularen Wirkmechanismus der Heteroarylketone bezüglich ihrer IL-6-hemmenden Wirkung in der vorliegenden Arbeit aufgeklärt werden konnte, sind zur detaillierten Untersuchung der relevanten Interaktion zwischen der Substanzklasse der Heteroarylketone und deren Bindungspartner eEF1A1 weitere Experimente nötig. Zum einen muss die Wechselwirkung und die Komplexbildung der Proteine eEF1A1 und Stat1, Stat3 und Erk1 sowie von Stat3 und p65 mit geeigneten Methoden näher untersucht werden. Zum anderen sind Studien zur Promotorbindungsaktivität erforderlich, um eine direkte Bindung der Transkriptionsfaktoren an die jeweiligen Konsensussequenzen nachzuweisen.

Für die Untersuchungen der Komplexe muss die Röntgenkristallstruktur des Elongationsfaktors in den verschiedenen Konformationen, d.h. unter Bindung von GTP bzw. GDP bekannt sein. Infolgedessen ist es wichtig, zu analysieren, wie der Transkriptionsfaktor Stat3 an eEF1A1 bindet sowie die Frage zu beantworten, ob diese Bindung mit Hilfe des phosphorylierten Tyrosins des Elongationsfaktors an die SH2-Domänen von Stat3 stattfindet. Da in der vorliegenden Arbeit kein absoluter Nachweis erfolgte, ob eine Bindung zwischen den Proteinen Stat3 und eEF1A1 stattfindet, sollte diese These mittels der Methode der Oberflächenplasmonenresonanz bestätigt werden. Möglicherweise wird der Elongationsfaktor durch die Stimulation der MG-U343 Gliomazellen mit OSM modifiziert, was zu einer differenzierten Kinetik der Bindung zwischen beiden Proteinen führen könnte. Die bisherigen Daten lassen keinen Schluss auf die Modifikation des Elongationsfaktors eEF1A1 durch die Einwirkung von OSM zu. Deswegen ist eine ausführliche Analyse zu möglichen Phosphorylierungen, Glykosylierungen, Acetylierungen oder auch Methylierungen von eEF1A1 notwendig [140]. Obwohl andere Modifikationen des eEF1A1-Proteins bekannt sind, wurde ein funktioneller Zusammenhang bisher nur für die Phosphorylierung an der Aminosäure Threonin 431 von eEF1A1 durch PKC δ oder die S6-Kinase beschrieben [167]. Weiterhin sollte eine Immunpräzipitation mit Stat3 durchgeführt und in dem Präzipitat das Erk1-Protein nachgewiesen werden.

Einige Daten aus der Literatur beschreiben, dass auch für Stat1 eine Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 727 möglich ist [215, 231]. In diesem Fall müsste überprüft werden, ob Heteroarylketone diese Phosphorylierung beeinflussen können und welche Auswirkungen diese mögliche Modifizierung auf nachfolgende Signaltransduktionsprozesse hat.

Für die Analysen zur Promotorbindung wären der *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) oder die Chromatin-Immunpräzipitation-(ChIP) Technik zweckmäßig, da mit diesen Methoden ein direkter Nachweis der Bindung von Stat3 bzw. p65 an den jeweiligen Promotor und deren Modifizierung durch eEF1A1 erbracht werden kann.

Wenn der Mechanismus aufgeklärt werden konnte, ist zudem die Validierung des Wirkmechanismus in anderen Zelllinien oder Modellsystemen erforderlich.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen die selektive Wirkung von Heteroarylketonen auf den Elongationsfaktor, wobei nur eine der bekannten Funktionen dieses multifunktionellen Proteins beeinflusst wird. Daher sollte fortführend auch die Wirkung von Heteroarylketonen auf weitere Eigenschaften des eEF1A1-Proteins analysiert werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung des Zielproteins von Heteroarylketonen. Diese Substanzklasse ist in der Lage, die Expression des Zytokins Interleukin-6 (IL-6) in verschiedenen humanen Karzinomzelllinien zu senken. Die Erhöhung der Sekretion dieses pro-inflammatorischen Proteins ist im Zusammenhang mit chronisch inflammatorischen Erkrankungen, wie z.B. RA, beschrieben worden. Daher stellen Heteroarylketone eine Basis für die Entwicklung eines Therapeutikums zur Behandlung dieser IL-6-korrelierten Erkrankungen dar, dessen Wirkung auf der Absenkung eines pathophysiologisch erhöhten IL-6-Spiegels beruht. Bisher war unklar, welches Protein als Interaktionspartner der Heteroarylketone fungiert. Aufgrund von Untersuchungen zur IL-6-Sekretion sowie zur IL-6-mRNA-Synthese in MG-U343 Gliomazellen unter dem Einfluss verschiedener IL-6-Stimuli erfolgte die Auswahl der Oncostatin M (OSM)-vermittelten IL-6-Expression zum Zeitpunkt von 6 Stunden als Modellsystem. In diesem System wurden modifizierte, mit Biotin markierte Inhibitoren eingesetzt, welche mit Hilfe einer Azidgruppe unter Bestrahlung von UV-Licht an putative Interaktionspartner gekoppelt wurden. Die Auftrennung der Proteine der so behandelten Zellextrakte erfolgte zweifach mittels einer zweidimensionalen Gelelektrophorese. Während für eines der Gele eine Silberfärbung stattfand, wurde das andere in einer Streptavidin-spezifischen Western-Blot-Analyse verwendet. Anschließend erfolgte die Zuordnung der Proteinspots des Silbergels mit denen des Immunoblots und die Identifizierung der relevanten Proteine mittels nanoLC-ESI-MS/MS und einem Sequenzvergleich. Zu den 32 identifizierten Proteinen fand eine Literaturrecherche statt. Auf dieser Basis wurden 3 Proteine aufgrund ihrer Eigenschaften als putative Interaktionspartner von Heteroarylketonen ausgewählt: der Elongationsfaktor 1A1 (eEF1A1), das *Valosin-containing-Protein 1* (VCP1) und Filamin A (FLNA). Nachfolgend wurden diese Proteine mit Hilfe einer Streptavidin-spezifischen Immunpräzipitation validiert. Dabei konnte nur das eEF1A1-Protein in der Western-Blot-Analyse detektiert werden. Eine Reihe von Experimenten zeigte zudem, dass

- die Bindung von eEF1A1 an das biotinylierte Heteroarylketon stattfindet,
- die Lokalisation des biotinylierten Inhibitors durch die siRNA-vermittelte Hemmung des eEF1A1-Proteins modifiziert wird und
- die siRNA-vermittelte Herunterregulation des Elongationsfaktors, ebenso wie die Heteroarylketone, einen hemmenden Einfluss auf die IL-6-Expression hatte.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass Heteroarylketone in der Lage sind, die OSM-vermittelte IL-6-Expression über die Interaktion mit dem eEF1A1-Protein zu inhibieren.

Es konnte die Beteiligung verschiedener Proteine, darunter der Transkriptionsfaktoren *Signal transducer and activator of transcription 3* (Stat3) und p65 und der Kinasen *Extracellular regulated kinase 1* (Erk1) sowie der Proteinkinase C delta (PKC δ) in der OSM-vermittelten IL-6-Expression bestätigt werden [15, 16, 144]. In der Literatur ist die Wechselwirkung zwischen dem eEF1A1-Protein und der Proteinkinase PKC δ sowie den SH2-Domänen der SHP2-Phosphatase (SHP2) beschrieben worden [146, 167]. Infolge dieser Kenntnisse wurde auch die Interaktion zwischen dem eEF1A1-Protein und dem Transkriptionsfaktor Stat3 vermutet, da dieser ebenfalls SH-Domänen aufweist.

Die Überprüfung der Hypothese konnte belegen, dass sowohl Heteroarylketone als auch deren Interaktionspartner eEF1A1 die OSM-induzierte Phosphorylierung des Stat3-Proteins an der Aminosäure Serin 727 beeinflussen. Ebenso war die Koimmunpräzipitation und die Kollokalisierung von eEF1A1 und Stat3 erfolgreich. Die anschließende Analyse der an der Phosphorylierung beteiligten Kinasen erbrachte den Beweis, dass die Erk1-Kinase teilweise für die Phosphorylierung verantwortlich ist und nicht die PKC δ -Kinase. Zuvor war es möglich die Beeinflussung der SHP2-vermittelten Erk1-Kinase-Aktivität durch Heteroarylketone auszuschließen. Deshalb müssen die verwendeten Substanzen über die Interaktion mit dem eEF1A1-Protein in die Erk1-vermittelte Stat3-Phosphorylierung eingreifen. Tatsächlich wurde nachgewiesen, dass Heteroarylketone die Komplexbildung zwischen eEF1A1 und Stat3 vermindern. Auf dem Promotor des IL-6-Gens ist die Bindung von Stat3 nur indirekt über einen Vermittler, in diesem Fall das p65-Protein, möglich. Eine Untersuchung zur Komplexbildung der beiden Proteine zeigte, dass diese durch OSM induziert und im ausgewählten Modellsystem durch Heteroarylketone vermindert wird. Auf der Basis der unterschiedlichen Abhängigkeit der Promotoren von der Stat3-Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 727 besteht die Möglichkeit, dass Heteroarylketone auf die Expression von Genen sehr selektiv wirken. Um dies zu überprüfen, wurde die Beeinflussung des Negativregulators der IL-6-Expression, Socs3, durch Heteroarylketone untersucht. Die Expression von Socs3 wird durch OSM induziert und auf dem dazugehörigen Promotor ist eine Stat3-Bindestelle vorhanden. Wie zu erwarten, wurden beide Gene unterschiedlich stark durch Heteroarylketone und deren Interaktionspartner eEF1A1 beeinflusst. Demzufolge könnten durch die Verwendung von Heteroarylketonen pathophysiologische Prozesse hochspezifisch modifiziert werden. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass Heteroarylketone die

Funktion von eEF1A1 in der Proteinbiosynthesemaschinerie nicht modifizieren. In diesem Fall wird das Risiko von relevanten Nebenwirkungen erheblich eingeschränkt. Deswegen könnten Heteroarylketone einen Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Therapeutika zur Inhibierung der IL-6-Sekretion darstellen, welche über einen neuartigen Wirkmechanismus bzw. ein neues Zielprotein in die IL-6-Expression eingreifen.

Für die Realisierung dieser Entwicklung ist die Durchführung von Promotor-Analysen (ChIP und EMSA) und weiteren Experimenten zur Bindung von Stat3 und eEF1A1 (Oberflächenplasmonenresonanz) sowie die Validierung der Heteroarylketone in einem spezifischen RA-Tiermodell bzgl. der Hemmung der IL-6-Expression notwendig. Außerdem ist die Kenntnis des Bindungsmodus von Heteroarylketonen an das eEF1A1-Protein erforderlich, wofür eine Röntgenkristallstruktur des Elongationsfaktors obligat wäre.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Cunningham, D. F. und O'Connor, B. (1997) Proline specific peptidases *Biochim. Biophys. Acta* **1343**, 160-186.
2. Kato, T., Nakano, T., Kojima, K., Nagatsu, T. und Sakakibara, S. (1980) Changes in prolyl endopeptidase during maturation of rat brain and hydrolysis of substance P by the purified enzyme *J. Neurochem.* **35**, 527-535.
3. Rennex, D., Hemmings, B. A., Hofsteenge, J. und Stone, S. R. (1991) cDNA cloning of porcine brain prolyl endopeptidase and identification of the active-site seryl residue *Biochemistry* **30**, 2195-2203.
4. Kato, A., Fukunari, A., Sakai, Y. und Nakajima, T. (1997) Prevention of amyloid-like deposition by a selective prolyl endopeptidase inhibitor, Y-29794, in senescence-accelerated mouse *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **283**, 328-335.
5. Katsube, N., Sunaga, K., Aishita, H., Chuang, D. M. und Ishitani, R. (1999) ONO-1603, a potential antidementia drug, delays age-induced apoptosis and suppresses overexpression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cultured central nervous system neurons *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **288**, 6-13.
6. Schneider, J. S., Giardinere, M. und Morain, P. (2002) Effects of the prolyl endopeptidase inhibitor S 17092 on cognitive deficits in chronic low dose MPTP-treated monkeys *Neuropsychopharmacology* **26**, 176-182.
7. Katsube, N., Sunaga, K., Chuang, D. M. und Ishitani, R. (1996) ONO-1603, a potential antidementia drug, shows neuroprotective effects and increases m3-muscarinic receptor mRNA levels in differentiating rat cerebellar granule neurons *Neurosci. Lett.* **214**, 151-154.
8. Schulz, I., Gerhartz, B., Neubauer, A., Holloschi, A., Heiser, U., Hafner, M. und Demuth, H. U. (2002) Modulation of inositol 1,4,5-triphosphate concentration by prolyl endopeptidase inhibition *Eur. J. Biochem.* **269**, 5813-5820.
9. Engel, C (2005), Einfluss von Inhibitoren der Prolylendopeptidase auf die Sekretion des inflammatorischen Zytokins Interleukin-6
10. Nishimoto, N. und Kishimoto, T. (2004) Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases *Curr. Opin. Pharmacol.* **4**, 386-391.
11. Nishimoto, N., Kishimoto, T. und Yoshizaki, K. (1999) Anticytokine therapy in autoimmune diseases *Intern. Med.* **38**, 178-182.
12. Nishimoto, N. (2005) Clinical studies in patients with Castleman's disease, Crohn's disease, and rheumatoid arthritis in Japan *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **28**, 221-230.
13. Viedma, J. A., Perez-Mateo, M., Dominguez, J. E. und Carballo, F. (1992) Role of interleukin-6 in acute pancreatitis. Comparison with C-reactive protein and phospholipase A *Gut* **33**, 1264-1267.

14. Adachi, Y., Yoshio-Hoshino, N. und Nishimoto, N. (2008) The blockade of IL-6 signaling in rational drug design *Curr. Pharm. Des* **14**, 1217-1224.
15. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. und Graeve, L. (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway *Biochem. J.* **334 (Pt 2)**, 297-314.
16. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G. und Schaper, F. (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation *Biochem. J.* **374**, 1-20.
17. Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M. und Taga, T. (1995) Interleukin-6 family of cytokines and gp130 *Blood* **86**, 1243-1254.
18. Choy, E. (2004) Clinical experience with inhibition of interleukin-6 *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **30**, 405-15, viii.
19. Taga, T. und Kishimoto, T. (1997) Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 797-819.
20. Antunes, T. T., Gagnon, A., Langille, M. L. und Sorisky, A. (2008) Thyroid-stimulating hormone induces interleukin-6 release from human adipocytes through activation of the nuclear factor-kappaB pathway *Endocrinology* **149**, 3062-3066.
21. Bell, A., Gagnon, A. und Sorisky, A. (2003) TSH stimulates IL-6 secretion from adipocytes in culture *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, e65-e66.
22. Gruol, D. L. und Nelson, T. E. (1997) Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system *Mol. Neurobiol.* **15**, 307-339.
23. Van Wagoner, N. J., Oh, J. W., Repovic, P. und Benveniste, E. N. (1999) Interleukin-6 (IL-6) production by astrocytes: autocrine regulation by IL-6 and the soluble IL-6 receptor *J. Neurosci.* **19**, 5236-5244.
24. Norris, J. G., Tang, L. P., Sparacio, S. M. und Benveniste, E. N. (1994) Signal transduction pathways mediating astrocyte IL-6 induction by IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha *J. Immunol.* **152**, 841-850.
25. Van Wagoner, N. J., Choi, C., Repovic, P. und Benveniste, E. N. (2000) Oncostatin M regulation of interleukin-6 expression in astrocytes: biphasic regulation involving the mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and p38 *J. Neurochem.* **75**, 563-575.
26. Grimaldi, M., Arcone, R., Ciliberto, G. und Schettini, G. (1995) Synergistic stimulation of interleukin 6 release and gene expression by phorbol esters and interleukin 1 beta in rat cortical astrocytes: role of protein kinase C activation and blockade *J. Neurochem.* **64**, 1945-1953.
27. Akira, S., Hirano, T., Taga, T. und Kishimoto, T. (1990) Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF) *FASEB J.* **4**, 2860-2867.
28. Heinrich, P. C., Horn, F., Graeve, L., Dittrich, E., Kerr, I., Muller-Newen, G., Grotzinger, J. und Wollmer, A. (1998) Interleukin-6 and related cytokines: effect on the acute phase reaction *Z. Ernährungswiss.* **37 Suppl 1**, 43-49.

29. Akira, S. und Kishimoto, T. (1992) IL-6 and NF-IL6 in acute-phase response and viral infection *Immunol. Rev.* **127**, 25-50.
30. Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A. und . (1986) Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin *Nature* **324**, 73-76.
31. Caruso, C., Lio, D., Cavallone, L. und Franceschi, C. (2004) Aging, longevity, inflammation, and cancer *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1028**, 1-13.
32. Okada, M., Kitahara, M., Kishimoto, S., Matsuda, T., Hirano, T. und Kishimoto, T. (1988) IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells *J. Immunol.* **141**, 1543-1549.
33. Jansen, J. H., Kluin-Nelemans, J. C., Van Damme, J., Wientjens, G. J., Willemze, R. und Fibbe, W. E. (1992) Interleukin 6 is a permissive factor for monocytic colony formation by human hematopoietic progenitor cells *J. Exp. Med.* **175**, 1151-1154.
34. Chen, T. W., Yao, C. L., Chu, I. M., Chuang, T. L., Hsieh, T. B. und Hwang, S. M. (2009) Large generation of megakaryocytes from serum-free expanded human CD34+ cells *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378**, 112-117.
35. Hollen, C. W., Henthorn, J., Koziol, J. A. und Burstein, S. A. (1992) Serum interleukin-6 levels in patients with thrombocytosis *Leuk. Lymphoma* **8**, 235-241.
36. Mitani, H., Katayama, N., Araki, H., Ohishi, K., Kobayashi, K., Suzuki, H., Nishii, K., Masuya, M., Yasukawa, K., Minami, N. und Shiku, H. (2000) Activity of interleukin 6 in the differentiation of monocytes to macrophages and dendritic cells *Br. J. Haematol.* **109**, 288-295.
37. Castell, J. V., Gomez-Lechon, M. J., David, M., Hirano, T., Kishimoto, T. und Heinrich, P. C. (1988) Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes *FEBS Lett.* **232**, 347-350.
38. Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P. und Baumann, H. (1987) Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**, 7251-7255.
39. Heinrich, P. C., Castell, J. V. und Andus, T. (1990) Interleukin-6 and the acute phase response *Biochem. J.* **265**, 621-636.
40. Akira, S., Taga, T. und Kishimoto, T. (1993) Interleukin-6 in biology and medicine *Adv. Immunol.* **54**, 1-78.
41. Baumhauer, J. F., O'Keefe, R. J., Schon, L. C. und Pinzur, M. S. (2006) Cytokine-induced osteoclastic bone resorption in charcot arthropathy: an immunohistochemical study *Foot Ankle Int.* **27**, 797-800.
42. Chen, L., Wei, X. Q., Evans, B., Jiang, W. und Aeschlimann, D. (2008) IL-23 promotes osteoclast formation by up-regulation of receptor activator of NF-kappaB (RANK) expression in myeloid precursor cells *Eur. J. Immunol.* **38**, 2845-2854.

43. Fischer, C. P. (2006) Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc. Immunol. Rev.* **12**, 6-33.
44. Gruol, D. L. und Nelson, T. E. (2005) Purkinje neuron physiology is altered by the inflammatory factor interleukin-6 *Cerebellum*. **4**, 198-205.
45. Tsukihara, S., Harada, T., Deura, I., Mitsunari, M., Yoshida, S., Iwabe, T. und Terakawa, N. (2004) Interleukin-1beta-induced expression of IL-6 and production of human chorionic gonadotropin in human trophoblast cells via nuclear factor-kappaB activation *Am. J. Reprod. Immunol.* **52**, 218-223.
46. Jones, S. A. und Rose-John, S. (2002) The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex *Biochim. Biophys. Acta* **1592**, 251-263.
47. Muller-Newen, G., Kuster, A., Hemmann, U., Keul, R., Horsten, U., Martens, A., Graeve, L., Wijdenes, J. und Heinrich, P. C. (1998) Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses *J. Immunol.* **161**, 6347-6355.
48. Scheller, J., Ohnesorge, N. und Rose-John, S. (2006) Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer *Scand. J. Immunol.* **63**, 321-329.
49. Scheller, J., Grotzinger, J., and Rose-John, S. (2006) Updating interleukin-6 classic- and trans-signaling *Signal Transduction* **6**, 240-259
50. Mullberg, J., Oberthur, W., Lottspeich, F., Mehl, E., Dittrich, E., Graeve, L., Heinrich, P. C. und Rose-John, S. (1994) The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site *J. Immunol.* **152**, 4958-4968.
51. Mackiewicz, A., Schooltink, H., Heinrich, P. C. und Rose-John, S. (1992) Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins *J. Immunol.* **149**, 2021-2027.
52. Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T. und Kishimoto, T. (1989) Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130 *Cell* **58**, 573-581.
53. Bazan, J. F. (1989) A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 788-795.
54. Stahl, N., Boulton, T. G., Farruggella, T., Ip, N. Y., Davis, S., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S. und . (1994) Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components *Science* **263**, 92-95.
55. Radtke, S., Hermanns, H. M., Haan, C., Schmitz-Van De Leur, H., Gascan, H., Heinrich, P. C. und Behrmann, I. (2002) Novel role of Janus kinase 1 in the regulation of oncostatin M receptor surface expression *J. Biol. Chem.* **277**, 11297-11305.
56. Behrmann, I., Hermanns, H. M., Haan, C., Kortylewski, M., Radtke, S., Greiser, J. und Heinrich, P. C. (2000) Signalling of interleukin-6 type cytokines via gp130,

- leukemia inhibitory factor (LIF) receptor and oncostatin M receptor *Eur. Cytokine Netw.* **11**, 491-492.
57. Anhuf, D., Weissenbach, M., Schmitz, J., Sobota, R., Hermanns, H. M., Radtke, S., Linnemann, S., Behrmann, I., Heinrich, P. C. und Schaper, F. (2000) Signal transduction of IL-6, leukemia-inhibitory factor, and oncostatin M: structural receptor requirements for signal attenuation *J. Immunol.* **165**, 2535-2543.
 58. Darnell, J. E., Jr. (1997) STATs and gene regulation *Science* **277**, 1630-1635.
 59. Haan, S., Keller, J. F., Behrmann, I., Heinrich, P. C. und Haan, C. (2005) Multiple reasons for an inefficient STAT1 response upon IL-6-type cytokine stimulation *Cell Signal* **17**, 1542-1550.
 60. Schaper, F., Gendo, C., Eck, M., Schmitz, J., Grimm, C., Anhuf, D., Kerr, I. M. und Heinrich, P. C. (1998) Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression *Biochem. J.* **335 (Pt 3)**, 557-565.
 61. Ghosh, S. und Karin, M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle *Cell* **109 Suppl**, S81-S96.
 62. Vermeulen, L., De Wilde, G., Van Damme, P., Vanden Berghe, W. und Haegeman, G. (2003) Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) *EMBO J.* **22**, 1313-1324.
 63. Palmieri, M., Sasso, M. P., Monese, R., Merola, M., Faggioli, L., Tovey, M. und Furia, A. (1999) Interaction of the nuclear protein CBF1 with the kappaB site of the IL-6 gene promoter *Nucleic Acids Res.* **27**, 2785-2791.
 64. Libermann, T. A. und Baltimore, D. (1990) Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor *Mol. Cell Biol.* **10**, 2327-2334.
 65. Wormald, S. und Hilton, D. J. (2004) Inhibitors of cytokine signal transduction *J. Biol. Chem.* **279**, 821-824.
 66. Wang, Y. und Fuller, G. M. (1994) Phosphorylation and internalization of gp130 occur after IL-6 activation of Jak2 kinase in hepatocytes *Mol. Biol. Cell* **5**, 819-828.
 67. Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P. C. und Schaper, F. (2000) SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130 *J. Biol. Chem.* **275**, 12848-12856.
 68. He, B., You, L., Uematsu, K., Matsangou, M., Xu, Z., He, M., McCormick, F. und Jablons, D. M. (2003) Cloning and characterization of a functional promoter of the human SOCS-3 gene *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 386-391.
 69. Gatto, L., Berlatto, C., Poli, V., Tininini, S., Kinjyo, I., Yoshimura, A., Cassatella, M. A. und Bazzoni, F. (2004) Analysis of SOCS-3 promoter responses to interferon gamma *J. Biol. Chem.* **279**, 13746-13754.

70. Gadiant, R. A. und Patterson, P. H. (1999) Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury *Stem Cells* **17**, 127-137.
71. Baldini, V., Mastropasqua, M., Francucci, C. M. und D'Erasmus, E. (2005) Cardiovascular disease and osteoporosis *J. Endocrinol. Invest* **28**, 69-72.
72. Kanda, T. und Takahashi, T. (2004) Interleukin-6 and cardiovascular diseases *Jpn. Heart J.* **45**, 183-193.
73. Zhao, B. und Schwartz, J. P. (1998) Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological diseases: recent progress and perspectives *J. Neurosci. Res.* **52**, 7-16.
74. Trikha, M., Corringham, R., Klein, B. und Rossi, J. F. (2003) Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence *Clin. Cancer Res.* **9**, 4653-4665.
75. Kiecolt-Glaser, J. K., Preacher, K. J., MacCallum, R. C., Atkinson, C., Malarkey, W. B. und Glaser, R. (2003) Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 9090-9095.
76. Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Miyasaka, N., Yamamoto, K., Kawai, S., Takeuchi, T., Hashimoto, J., Azuma, J. und Kishimoto, T. (2004) Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial *Arthritis Rheum.* **50**, 1761-1769.
77. Frei, K., Fredrikson, S., Fontana, A. und Link, H. (1991) Interleukin-6 is elevated in plasma in multiple sclerosis *J. Neuroimmunol.* **31**, 147-153.
78. Kishimoto, T. (1989) The biology of interleukin-6 *Blood* **74**, 1-10.
79. Ding, C. und Jones, G. (2006) Anti-interleukin-6 receptor antibody treatment in inflammatory autoimmune diseases *Rev. Recent Clin. Trials* **1**, 193-200.
80. Morales-Montor J (2005) The role of the pleiotropic cytokine interleukin-6 (IL-6) during disease *Mod.Asp.Immunobiol.* **16**, 21-26
81. McGeer, P. L. und McGeer, E. G. (1995) The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases *Brain Res. Brain Res. Rev.* **21**, 195-218.
82. Patterson, P. H. (1995) Cytokines in Alzheimer's disease and multiple sclerosis *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 642-646.
83. Rogers, J., Webster, S., Lue, L. F., Brachova, L., Civin, W. H., Emmerling, M., Shivers, B., Walker, D. und McGeer, P. (1996) Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis *Neurobiol. Aging* **17**, 681-686.
84. Waage, A., Brandtzaeg, P., Halstensen, A., Kierulf, P. und Espevik, T. (1989) The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome *J. Exp. Med.* **169**, 333-338.

85. Campbell, I. L., Hobbs, M. V., Kemper, P. und Oldstone, M. B. (1994) Cerebral expression of multiple cytokine genes in mice with lymphocytic choriomeningitis *J. Immunol.* **152**, 716-723.
86. Fattori, E., Lazzaro, D., Musiani, P., Modesti, A., Alonzi, T. und Ciliberto, G. (1995) IL-6 expression in neurons of transgenic mice causes reactive astrocytosis and increase in ramified microglial cells but no neuronal damage *Eur. J. Neurosci.* **7**, 2441-2449.
87. Campbell, I. L., Hobbs, M. V., Dockter, J., Oldstone, M. B. und Allison, J. (1994) Islet inflammation and hyperplasia induced by the pancreatic islet-specific overexpression of interleukin-6 in transgenic mice *Am. J. Pathol.* **145**, 157-166.
88. Boe, A., Baiocchi, M., Carbonatto, M., Papoian, R. und Serlupi-Crescenzi, O. (1999) Interleukin 6 knock-out mice are resistant to antigen-induced experimental arthritis *Cytokine* **11**, 1057-1064.
89. Okuda, Y., Sakoda, S., Bernard, C. C., Fujimura, H., Saeki, Y., Kishimoto, T. und Yanagihara, T. (1998) IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein *Int. Immunol.* **10**, 703-708.
90. Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., Zinkernagel, R., Bluethmann, H. und Kohler, G. (1994) Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice *Nature* **368**, 339-342.
91. http://www.internisten-im-netz.de/de_was-ist-rheumatoide-arthritis_166.html
92. Langenegger, T. und Michel, B. A. (1999) Drug treatment for rheumatoid arthritis *Clin. Orthop. Relat Res.* 22-30.
93. Lee, S. J. und Kavanaugh, A. (2003) Pharmacological treatment of established rheumatoid arthritis *Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **17**, 811-829.
94. De Benedetti, F., Massa, M., Robbioni, P., Ravelli, A., Burgio, G. R. und Martini, A. (1991) Correlation of serum interleukin-6 levels with joint involvement and thrombocytosis in systemic juvenile rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum.* **34**, 1158-1163.
95. De Benedetti, F., Robbioni, P., Massa, M., Viola, S., Albani, S. und Martini, A. (1992) Serum interleukin-6 levels and joint involvement in polyarticular and pauciarticular juvenile chronic arthritis *Clin. Exp. Rheumatol.* **10**, 493-498.
96. De Benedetti, F., Massa, M., Pignatti, P., Albani, S., Novick, D. und Martini, A. (1994) Serum soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6/soluble IL-6 receptor complex in systemic juvenile rheumatoid arthritis *J. Clin. Invest* **93**, 2114-2119.
97. Guerne, P. A., Zuraw, B. L., Vaughan, J. H., Carson, D. A. und Lotz, M. (1989) Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis *J. Clin. Invest* **83**, 585-592.

98. Houssiau, F. A., Devogelaer, J. P., Van Damme, J., de Deuxchaisnes, C. N. und Van Snick, J. (1988) Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides *Arthritis Rheum.* **31**, 784-788.
99. Kotake, S., Sato, K., Kim, K. J., Takahashi, N., Udagawa, N., Nakamura, I., Yamaguchi, A., Kishimoto, T., Suda, T. und Kashiwazaki, S. (1996) Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation *J. Bone Miner. Res.* **11**, 88-95.
100. Robak, T., Gladalska, A., Stepień, H. und Robak, E. (1998) Serum levels of interleukin-6 type cytokines and soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis *Mediators. Inflamm.* **7**, 347-353.
101. Desgeorges, A., Gabay, C., Silacci, P., Novick, D., Roux-Lombard, P., Grau, G., Dayer, J. M., Vischer, T. und Guerne, P. A. (1997) Concentrations and origins of soluble interleukin 6 receptor-alpha in serum and synovial fluid *J. Rheumatol.* **24**, 1510-1516.
102. Madhok, R., Crilly, A., Watson, J. und Capell, H. A. (1993) Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity *Ann. Rheum. Dis.* **52**, 232-234.
103. Sack, U., Kinne, R. W., Marx, T., Heppt, P., Bender, S. und Emmrich, F. (1993) Interleukin-6 in synovial fluid is closely associated with chronic synovitis in rheumatoid arthritis *Rheumatol. Int.* **13**, 45-51.
104. De Benedetti, F. und Martini, A. (1998) Is systemic juvenile rheumatoid arthritis an interleukin 6 mediated disease? *J. Rheumatol.* **25**, 203-207.
105. Pignatti, P., Ciapponi, L., Galle, P., Hansen, M. B., Massa, M., Meazza, C., Paonessa, G., Novick, D., Ciliberto, G., Martini, A. und De Benedetti, F. (2003) High circulating levels of biologically inactive IL-6/SIL-6 receptor complexes in systemic juvenile idiopathic arthritis: evidence for serum factors interfering with the binding to gp130 *Clin. Exp. Immunol.* **131**, 355-363.
106. Nishimoto, N., Sasai, M., Shima, Y., Nakagawa, M., Matsumoto, T., Shirai, T., Kishimoto, T. und Yoshizaki, K. (2000) Improvement in Castleman's disease by humanized anti-interleukin-6 receptor antibody therapy *Blood* **95**, 56-61.
107. Nishimoto, N., Kishimoto, T. und Yoshizaki, K. (2000) Anti-interleukin 6 receptor antibody treatment in rheumatic disease *Ann. Rheum. Dis.* **59 Suppl 1**, i21-i27.
108. Steinhilber and Schubert-Zsilavecz (2005), Medizinische Chemie, Roth, DAV Stuttgart
109. Sato, K., Tsuchiya, M., Saldanha, J., Koishihara, Y., Ohsugi, Y., Kishimoto, T. und Bendig, M. M. (1993) Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin 6-dependent tumor cell growth *Cancer Res.* **53**, 851-856.
110. Carreno, L., Lopez-Longo, F. J., Gonzalez, C. M. und Monteagudo, I. (2002) Treatment options for juvenile-onset systemic lupus erythematosus *Paediatr. Drugs* **4**, 241-256.

111. Gaffo, A., Saag, K. G. und Curtis, J. R. (2006) Treatment of rheumatoid arthritis *Am. J. Health Syst. Pharm.* **63**, 2451-2465.
112. Smith, R. J. (2005) Therapies for rheumatoid arthritis: hope springs eternal *Drug Discov. Today* **10**, 1598-1606.
113. Vavricka, S. R. und Rogler, G. (2009) [Treatment of Crohn's disease] *Praxis. (Bern. 1994.)* **98**, 77-81.
114. Nakahara, H. und Nishimoto, N. (2006) Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy in rheumatic diseases *Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug Targets.* **6**, 373-381.
115. Matsumoto, I., Zhang, H., Yasukochi, T., Iwanami, K., Tanaka, Y., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A. und Sumida, T. (2008) Therapeutic effects of antibodies to tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 immunoglobulin in mice with glucose-6-phosphate isomerase induced arthritis *Arthritis Res. Ther.* **10**, R66.
116. Takagi, N., Mihara, M., Moriya, Y., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Takeda, Y. und Ohsugi, Y. (1998) Blockage of interleukin-6 receptor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis *Arthritis Rheum.* **41**, 2117-2121.
117. Mihara, M., Kotoh, M., Nishimoto, N., Oda, Y., Kumagai, E., Takagi, N., Tsunemi, K., Ohsugi, Y., Kishimoto, T., Yoshizaki, K. und Takeda, Y. (2001) Humanized antibody to human interleukin-6 receptor inhibits the development of collagen arthritis in cynomolgus monkeys *Clin. Immunol.* **98**, 319-326.
118. Schulz, I., Zeitschel, U., Rudolph, T., Ruiz-Carrillo, D., Rahfeld, J. U., Gerhartz, B., Bigl, V., Demuth, H. U. und Rossner, S. (2005) Subcellular localization suggests novel functions for prolyl endopeptidase in protein secretion *J. Neurochem.* **94**, 970-979.
119. Nishimoto, N. und Kishimoto, T. (2006) Interleukin 6: from bench to bedside *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **2**, 619-626.
120. Koczan, D., Drynda, S., Hecker, M., Drynda, A., Guthke, R., Kekow, J. und Thiesen, H. J. (2008) Molecular discrimination of responders and nonresponders to anti-TNF alpha therapy in rheumatoid arthritis by etanercept *Arthritis Res. Ther.* **10**, R50.
121. Maini, R. N., Taylor, P. C., Szechinski, J., Pavelka, K., Broll, J., Balint, G., Emery, P., Raemen, F., Petersen, J., Smolen, J., Thomson, D. und Kishimoto, T. (2006) Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate *Arthritis Rheum.* **54**, 2817-2829.
122. Woo, P., Wilkinson, N., Prieur, A. M., Southwood, T., Leone, V., Livermore, P., Wythe, H., Thomson, D. und Kishimoto, T. (2005) Open label phase II trial of single, ascending doses of MRA in Caucasian children with severe systemic juvenile idiopathic arthritis: proof of principle of the efficacy of IL-6 receptor blockade in this type of arthritis and demonstration of prolonged clinical improvement *Arthritis Res. Ther.* **7**, R1281-R1288.

123. Agro, A., Langdon, C., Smith, F. und Richards, C. D. (1996) Prostaglandin E2 enhances interleukin 8 (IL-8) and IL-6 but inhibits GM-CSF production by IL-1 stimulated human synovial fibroblasts in vitro *J. Rheumatol.* **23**, 862-868.
124. Chen, S. H. und Benveniste, E. N. (2004) Oncostatin M: a pleiotropic cytokine in the central nervous system *Cytokine Growth Factor Rev.* **15**, 379-391.
125. Ding, S. Z., Cho, C. H. und Lam, S. K. (2000) Regulation of interleukin 6 production in a human gastric epithelial cell line MKN-28 *Cytokine* **12**, 1129-1135.
126. Vanden Berghe, W., De Bosscher, K., Boone, E., Plaisance, S. und Haegeman, G. (1999) The nuclear factor-kappaB engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the interleukin-6 gene promoter *J. Biol. Chem.* **274**, 32091-32098.
127. Webb, S. J., McPherson, J. R., Pahan, K. und Koka, S. (2002) Regulation of TNF-alpha-induced IL-6 production in MG-63 human osteoblast-like cells *J. Dent. Res.* **81**, 17-22.
128. Pontremoli, S., Melloni, E., Salamino, F., Sparatore, B., Michetti, M., Sacco, O. und Horecker, B. L. (1986) Phosphorylation of proteins in human neutrophils activated with phorbol myristate acetate or with chemotactic factor *Arch. Biochem. Biophys.* **250**, 23-29.
129. Balazs, R., Miller, S., Chun, Y., O'Toole, J. und Cotman, C. W. (1998) Metabotropic glutamate receptor agonists potentiate cyclic AMP formation induced by forskolin or beta-adrenergic receptor activation in cerebral cortical astrocytes in culture *J. Neurochem.* **70**, 2446-2458.
130. Tamaoki, T. und Nakano, H. (1990) Potent and specific inhibitors of protein kinase C of microbial origin *Biotechnology (N. Y.)* **8**, 732-735.
131. Schumacher, A., Arnhold, S., Addicks, K. und Doerfler, W. (2003) Staurosporine is a potent activator of neuronal, glial, and "CNS stem cell-like" neurosphere differentiation in murine embryonic stem cells *Mol. Cell Neurosci.* **23**, 669-680.
132. Tanaka, M. und Miyajima, A. (2003) Oncostatin M, a multifunctional cytokine *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* **149**, 39-52.
133. Zhong, Z., Wen, Z. und Darnell, J. E., Jr. (1994) Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6 *Science* **264**, 95-98.
134. Wegenka, U. M., Buschmann, J., Luttkien, C., Heinrich, P. C. und Horn, F. (1993) Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level *Mol. Cell Biol.* **13**, 276-288.
135. Gilmore, T. D. (2006) Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives *Oncogene* **25**, 6680-6684.
136. Wu, M. H. und Yung, B. Y. (1994) Cell cycle phase-dependent cytotoxicity of actinomycin D in HeLa cells *Eur. J. Pharmacol.* **270**, 203-212.

137. Bruce Alberts, Dennis Bray Julian Lewis (1995), *Molekularbiologie der Zelle*, 4. Aufl., Wiley-VCH, **Lothar Jaenicke**
138. Wada, I., Rindress, D., Cameron, P. H., Ou, W. J., Doherty, J. J., Louvard, D., Bell, A. W., Dignard, D., Thomas, D. Y. und Bergeron, J. J. (1991) SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane *J. Biol. Chem.* **266**, 19599-19610.
139. Griffiths, G., Hoflack, B., Simons, K., Mellman, I. und Kornfeld, S. (1988) The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes *Cell* **52**, 329-341.
140. Ejiri, S. (2002) Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 1-21.
141. Kim, M. J., Si, F., Kim, S. J., Hong, S. B., Hwang, J. I., Lee, H. J., Lee, S. J., Chang, J. S., Lee, Y. H., Ryu, S. H. und Suh, P. G. (1999) The SH2-SH2-SH3 domain of phospholipase C-gamma1 directly binds to translational elongation factor-1alpha *Mol. Cells* **9**, 631-637.
142. Kurasawa, Y., Watanabe, Y. und Numata, O. (1996) Characterization of F-actin bundling activity of Tetrahymena elongation factor 1 alpha investigated with rabbit skeletal muscle actin *Zoolog. Sci.* **13**, 371-375.
143. Negrutskii, B. S. und El'skaya, A. V. (1998) Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **60**, 47-78.
144. Novotny-Diermayr, V., Zhang, T., Gu, L. und Cao, X. (2002) Protein kinase C delta associates with the interleukin-6 receptor subunit glycoprotein (gp) 130 via Stat3 and enhances Stat3-gp130 interaction *J. Biol. Chem.* **277**, 49134-49142.
145. Owen, C. H., DeRosier, D. J. und Condeelis, J. (1992) Actin crosslinking protein EF-1a of Dictyostelium discoideum has a unique bonding rule that allows square-packed bundles *J. Struct. Biol.* **109**, 248-254.
146. Panasyuk, G., Nemazanyy, I., Filonenko, V., Negrutskii, B. und El'skaya, A. V. (2008) A2 isoform of mammalian translation factor eEF1A displays increased tyrosine phosphorylation and ability to interact with different signalling molecules *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 63-71.
147. Tash, J. S., Chakrasali, R., Jakkaraj, S. R., Hughes, J., Smith, S. K., Hornbaker, K., Heckert, L. L., Ozturk, S. B., Hadden, M. K., Kinzy, T. G., Blagg, B. S. und Georg, G. I. (2008) Gamendazole, an orally active indazole carboxylic acid male contraceptive agent, targets HSP90AB1 (HSP90BETA) and EEF1A1 (eEF1A), and stimulates Il1a transcription in rat Sertoli cells *Biol. Reprod.* **78**, 1139-1152.
148. Yang, F., Demma, M., Warren, V., Dharmawardhane, S. und Condeelis, J. (1990) Identification of an actin-binding protein from Dictyostelium as elongation factor 1a *Nature* **347**, 494-496.
149. Zhu, T. N., He, H. J., Kole, S., D'Souza, T., Agarwal, R., Morin, P. J. und Bernier, M. (2007) Filamin A-mediated down-regulation of the exchange factor Ras-GRF1

- correlates with decreased matrix metalloproteinase-9 expression in human melanoma cells *J. Biol. Chem.* **282**, 14816-14826.
150. van der, F. A. und Sonnenberg, A. (2001) Structural and functional aspects of filamins *Biochim. Biophys. Acta* **1538**, 99-117.
151. Uribe, R. und Jay, D. (2009) A review of actin binding proteins: new perspectives *Mol. Biol. Rep.* **36**, 121-125.
152. Garcia, E. und Jay, D. (2006) [Platelet filamin: a cytoskeletal protein involved in cell signal integration and function] *Arch. Cardiol. Mex.* **76 Suppl 4**, S67-S75.
153. Flanagan, L. A., Chou, J., Falet, H., Neujahr, R., Hartwig, J. H. und Stossel, T. P. (2001) Filamin A, the Arp2/3 complex, and the morphology and function of cortical actin filaments in human melanoma cells *J. Cell Biol.* **155**, 511-517.
154. Feng, Y. und Walsh, C. A. (2004) The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling *Nat. Cell Biol.* **6**, 1034-1038.
155. Lass, A., McConnell, E., Nowis, D., Mechref, Y., Kang, P., Novotny, M. V. und Wojcik, C. (2007) A novel function of VCP (valosin-containing protein; p97) in the control of N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum *Arch. Biochem. Biophys.* **462**, 62-73.
156. Asai, T., Tomita, Y., Nakatsuka, S., Hoshida, Y., Myoui, A., Yoshikawa, H. und Aozasa, K. (2002) VCP (p97) regulates NFkappaB signaling pathway, which is important for metastasis of osteosarcoma cell line *Jpn. J. Cancer Res.* **93**, 296-304.
157. Zhang, H., Wang, Q., Kajino, K. und Greene, M. I. (2000) VCP, a weak ATPase involved in multiple cellular events, interacts physically with BRCA1 in the nucleus of living cells *DNA Cell Biol.* **19**, 253-263.
158. Dai, R. M., Chen, E., Longo, D. L., Gorbea, C. M. und Li, C. C. (1998) Involvement of valosin-containing protein, an ATPase Co-purified with IkappaBalpha and 26 S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha *J. Biol. Chem.* **273**, 3562-3573.
159. Vij, N., Fang, S. und Zeitlin, P. L. (2006) Selective inhibition of endoplasmic reticulum-associated degradation rescues DeltaF508-cystic fibrosis transmembrane regulator and suppresses interleukin-8 levels: therapeutic implications *J. Biol. Chem.* **281**, 17369-17378.
160. Mimnaugh, E. G., Xu, W., Vos, M., Yuan, X. und Neckers, L. (2006) Endoplasmic reticulum vacuolization and valosin-containing protein relocalization result from simultaneous hsp90 inhibition by geldanamycin and proteasome inhibition by velcade *Mol. Cancer Res.* **4**, 667-681.
161. Condeelis, J. (1995) Elongation factor 1 alpha, translation and the cytoskeleton *Trends Biochem. Sci.* **20**, 169-170.
162. Wen, Z., Zhong, Z. und Darnell, J. E., Jr. (1995) Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation *Cell* **82**, 241-250.

163. Stahl, N., Farruggella, T. J., Boulton, T. G., Zhong, Z., Darnell, J. E., Jr. und Yancopoulos, G. D. (1995) Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors *Science* **267**, 1349-1353.
164. Boulton, T. G., Stahl, N. und Yancopoulos, G. D. (1994) Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors *J. Biol. Chem.* **269**, 11648-11655.
165. Nicholson, S. E., Willson, T. A., Farley, A., Starr, R., Zhang, J. G., Baca, M., Alexander, W. S., Metcalf, D., Hilton, D. J. und Nicola, N. A. (1999) Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction *EMBO J.* **18**, 375-385.
166. Fischer, P., Lehmann, U., Sobota, R. M., Schmitz, J., Niemand, C., Linnemann, S., Haan, S., Behrmann, I., Yoshimura, A., Johnston, J. A., Muller-Newen, G., Heinrich, P. C. und Schaper, F. (2004) The role of the inhibitors of interleukin-6 signal transduction SHP2 and SOCS3 for desensitization of interleukin-6 signalling *Biochem. J.* **378**, 449-460.
167. Kielbassa, K., Muller, H. J., Meyer, H. E., Marks, F. und Gschwendt, M. (1995) Protein kinase C delta-specific phosphorylation of the elongation factor eEF-alpha and an eEF-1 alpha peptide at threonine 431 *J. Biol. Chem.* **270**, 6156-6162.
168. Brantley, E. C. und Benveniste, E. N. (2008) Signal transducer and activator of transcription-3: a molecular hub for signaling pathways in gliomas *Mol. Cancer Res.* **6**, 675-684.
169. Murray, P. J. (2007) The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration *J. Immunol.* **178**, 2623-2629.
170. Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R. L., Scherle, P. A. und Trzaskos, J. M. (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase *J. Biol. Chem.* **273**, 18623-18632.
171. Krona, A., Jarnum, S., Salford, L. G., Widegren, B. und Aman, P. (2005) Oncostatin M signaling in human glioma cell lines *Oncol. Rep.* **13**, 807-811.
172. Berishaj, M., Gao, S. P., Ahmed, S., Leslie, K., Al Ahmadie, H., Gerald, W. L., Bornmann, W. und Bromberg, J. F. (2007) Stat3 is tyrosine-phosphorylated through the interleukin-6/glycoprotein 130/Janus kinase pathway in breast cancer *Breast Cancer Res.* **9**, R32.
173. Schindler, C. und Darnell, J. E., Jr. (1995) Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 621-651.
174. Coffey, P., Lutticken, C., van Puijenbroek, A., Klop-de Jonge, M., Horn, F. und Kruijer, W. (1995) Transcriptional regulation of the junB promoter: analysis of STAT-mediated signal transduction *Oncogene* **10**, 985-994.

175. Yao, Y. L., Dupont, B. R., Ghosh, S., Fang, Y., Leach, R. J. und Seto, E. (1998) Cloning, chromosomal localization and promoter analysis of the human transcription factor YY1 *Nucleic Acids Res.* **26**, 3776-3783.
176. Sun, W., Snyder, M., Levy, D. E. und Zhang, J. J. (2006) Regulation of Stat3 transcriptional activity by the conserved LPMSP motif for OSM and IL-6 signaling *FEBS Lett.* **580**, 5880-5884.
177. Kang, S. H., Brown, D. A., Kitajima, I., Xu, X., Heidenreich, O., Gryaznov, S. und Nerenberg, M. (1996) Binding and functional effects of transcriptional factor Sp1 on the murine interleukin-6 promotor *J. Biol. Chem.* **271**, 7330-7335.
178. Uskokovic, A., Dinic, S., Mihailovic, M., Grigorov, I., Ivanovic-Matic, S., Bogojevic, D., Grdovic, N., Arambasic, J., Vidakovic, M., Martinovic, V., Petrovic, M. und Poznanovic, G. (2007) STAT3/NFkappaB interplay in the regulation of alpha2-macroglobulin gene expression during rat liver development and the acute phase response *IUBMB. Life* **59**, 170-178.
179. Heinrich, P. C., Graeve, L., Rose-John, S., Schneider-Mergener, J., Dittrich, E., Erren, A., Gerhartz, C., Hemann, U., Luttkicken, C., Wegenka, U. und . (1995) Membrane-bound and soluble interleukin-6 receptor: studies on structure, regulation of expression, and signal transduction *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **762**, 222-236.
180. Xu, J., Sylvester, R., Tighe, A. P., Chen, S. und Gudas, L. J. (2008) Transcriptional activation of the suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) gene via STAT3 is increased in F9 REX1 (ZFP-42) knockout teratocarcinoma stem cells relative to wild-type cells *J. Mol. Biol.* **377**, 28-46.
181. Hermanns, H. M. (2009) Oncostatin M-ein pro-inflammatorisches Zytokin *BIOspektrum* **15. Jahrgang**, 396-398
182. Edwards, P. D., Wolanin, D. J., Andisik, D. W. und Davis, M. W. (1995) Peptidyl alpha-ketoheterocyclic inhibitors of human neutrophil elastase. 2. Effect of varying the heterocyclic ring on in vitro potency *J. Med. Chem.* **38**, 76-85.
183. Tsutsumi, S., Okonogi, T., Shibahara, S., Ohuchi, S., Hatsushiba, E., Patchett, A. A. und Christensen, B. G. (1994) Synthesis and structure-activity relationships of peptidyl alpha-keto heterocycles as novel inhibitors of prolyl endopeptidase *J. Med. Chem.* **37**, 3492-3502.
184. Hilario, E. (2002) Photobiotin labeling *Methods Mol. Biol.* **179**, 19-22.
185. Kan, T., Kita, Y., Morohashi, Y., Tominari, Y., Hosoda, S., Tomita, T., Natsugari, H., Iwatsubo, T. und Fukuyama, T. (2007) Convenient synthesis of photoaffinity probes and evaluation of their labeling abilities *Org. Lett.* **9**, 2055-2058.
186. Sato, S., Kwon, Y., Kamisuki, S., Srivastava, N., Mao, Q., Kawazoe, Y. und Uesugi, M. (2007) Polyproline-rod approach to isolating protein targets of bioactive small molecules: isolation of a new target of indomethacin *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 873-880.
187. Tuttolomondo, A., Di Raimondo, D., di Sciacca, R., Pinto, A. und Licata, G. (2008) Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke *Curr. Pharm. Des* **14**, 3574-3589.

188. Sawada, M., Suzumura, A. und Marunouchi, T. (1992) TNF alpha induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia *Brain Res.* **583**, 296-299.
189. Halfter, H., Postert, C., Friedrich, M., Ringelstein, E. B. und Stogbauer, F. (2000) Activation of the Jak-Stat- and MAPK-pathways by oncostatin M is not sufficient to cause growth inhibition of human glioma cells *Brain Res. Mol. Brain Res.* **80**, 198-206.
190. Ruegg, U. T. und Burgess, G. M. (1989) Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases *Trends Pharmacol. Sci.* **10**, 218-220.
191. Meggio, F., Donella, D. A., Ruzzene, M., Brunati, A. M., Cesaro, L., Guerra, B., Meyer, T., Mett, H., Fabbro, D., Furet, P. und . (1995) Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition. Kinetic studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2 *Eur. J. Biochem.* **234**, 317-322.
192. Lee, S. K. und Stern, P. H. (1994) Studies on the mechanism of desensitization of the parathyroid hormone-stimulated calcium signal in UMR-106 cells: reversal of desensitization by alkaline phosphatase but not by protein kinase C downregulation *J. Bone Miner. Res.* **9**, 781-789.
193. Wang, Y., Kreisberg, J. I., Bedolla, R. G., Mikhailova, M., deVere White, R. W. und Ghosh, P. M. (2007) A 90 kDa fragment of filamin A promotes Casodex-induced growth inhibition in Casodex-resistant androgen receptor positive C4-2 prostate cancer cells *Oncogene* **26**, 6061-6070.
194. Ejiri, S. und Honda, H. (1985) Effect of cyclic AMP and cyclic GMP on the autophosphorylation of elongation factor 1 from wheat embryos *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128**, 53-60.
195. Kjaer, S., Wind, T., Ravn, P., Ostergaard, M., Clark, B. F. und Nissim, A. (2001) Generation and epitope mapping of high-affinity scFv to eukaryotic elongation factor 1A by dual application of phage display *Eur. J. Biochem.* **268**, 3407-3415.
196. Sanders, J., Brandsma, M., Janssen, G. M., Dijk, J. und Moller, W. (1996) Immunofluorescence studies of human fibroblasts demonstrate the presence of the complex of elongation factor-1 beta gamma delta in the endoplasmic reticulum *J. Cell Sci.* **109 (Pt 5)**, 1113-1117.
197. Sprinzl, M. (1994) Elongation factor Tu: a regulatory GTPase with an integrated effector *Trends Biochem. Sci.* **19**, 245-250.
198. Xu, D. und Qu, C. K. (2008) Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway *Front Biosci.* **13**, 4925-4932.
199. Lehmann, U., Schmitz, J., Weissenbach, M., Sobota, R. M., Hortner, M., Friederichs, K., Behrmann, I., Tsiaris, W., Sasaki, A., Schneider-Mergener, J., Yoshimura, A., Neel, B. G., Heinrich, P. C. und Schaper, F. (2003) SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130 *J. Biol. Chem.* **278**, 661-671.

200. Smyth, D. C., Kerr, C. und Richards, C. D. (2006) Oncostatin M-induced IL-6 expression in murine fibroblasts requires the activation of protein kinase Cdelta *J. Immunol.* **177**, 8740-8747.
201. Schiemann, W. P., Bartoe, J. L. und Nathanson, N. M. (1997) Box 3-independent signaling mechanisms are involved in leukemia inhibitory factor receptor alpha- and gp130-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase. Evidence for participation of multiple signaling pathways which converge at Ras *J. Biol. Chem.* **272**, 16631-16636.
202. Uddin, S., Sassano, A., Deb, D. K., Verma, A., Majchrzak, B., Rahman, A., Malik, A. B., Fish, E. N. und Platanius, L. C. (2002) Protein kinase C-delta (PKC-delta) is activated by type I interferons and mediates phosphorylation of Stat1 on serine 727 *J. Biol. Chem.* **277**, 14408-14416.
203. Schuringa, J. J., Jonk, L. J., Dokter, W. H., Vellenga, E. und Kruijer, W. (2000) Interleukin-6-induced STAT3 transactivation and Ser727 phosphorylation involves Vav, Rac-1 and the kinase SEK-1/MKK-4 as signal transduction components *Biochem. J.* **347 Pt 1**, 89-96.
204. Schuringa, J. J., Dekker, L. V., Vellenga, E. und Kruijer, W. (2001) Sequential activation of Rac-1, SEK-1/MKK-4, and protein kinase Cdelta is required for interleukin-6-induced STAT3 Ser-727 phosphorylation and transactivation *J. Biol. Chem.* **276**, 27709-27715.
205. Nair, J. S., DaFonseca, C. J., Tjernberg, A., Sun, W., Darnell, J. E., Jr., Chait, B. T. und Zhang, J. J. (2002) Requirement of Ca²⁺ and CaMKII for Stat1 Ser-727 phosphorylation in response to IFN-gamma *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 5971-5976.
206. Lim, C. P. und Cao, X. (2001) Regulation of Stat3 activation by MEK kinase 1 *J. Biol. Chem.* **276**, 21004-21011.
207. Jain, N., Zhang, T., Kee, W. H., Li, W. und Cao, X. (1999) Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner *J. Biol. Chem.* **274**, 24392-24400.
208. Abe, K., Hirai, M., Mizuno, K., Higashi, N., Sekimoto, T., Miki, T., Hirano, T. und Nakajima, K. (2001) The YXXQ motif in gp 130 is crucial for STAT3 phosphorylation at Ser727 through an H7-sensitive kinase pathway *Oncogene* **20**, 3464-3474.
209. Barnett, S. F., DeFeo-Jones, D., Fu, S., Hancock, P. J., Haskell, K. M., Jones, R. E., Kahana, J. A., Kral, A. M., Leander, K., Lee, L. L., Malinowski, J., McAvoy, E. M., Nahas, D. D., Robinson, R. G. und Huber, H. E. (2005) Identification and characterization of pleckstrin-homology-domain-dependent and isoenzyme-specific Akt inhibitors *Biochem. J.* **385**, 399-408.
210. Yung, Y., Yao, Z., Aebersold, D. M., Hanoch, T. und Seger, R. (2001) Altered regulation of ERK1b by MEK1 and PTP-SL and modified Elk1 phosphorylation by ERK1b are caused by abrogation of the regulatory C-terminal sequence of ERKs *J. Biol. Chem.* **276**, 35280-35289.

211. Bardwell, A. J., Abdollahi, M. und Bardwell, L. (2003) Docking sites on mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinases, MAPK phosphatases and the Elk-1 transcription factor compete for MAPK binding and are crucial for enzymic activity *Biochem. J.* **370**, 1077-1085.
212. Huynh, Q. K., Boddupalli, H., Rouw, S. A., Koboldt, C. M., Hall, T., Sommers, C., Hauser, S. D., Pierce, J. L., Combs, R. G., Reitz, B. A., Diaz-Collier, J. A., Weinberg, R. A., Hood, B. L., Kilpatrick, B. F. und Tripp, C. S. (2000) Characterization of the recombinant IKK1/IKK2 heterodimer. Mechanisms regulating kinase activity *J. Biol. Chem.* **275**, 25883-25891.
213. Bennett, B. L., Sasaki, D. T., Murray, B. W., O'Leary, E. C., Sakata, S. T., Xu, W., Leisten, J. C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S. S., Manning, A. M. und Anderson, D. W. (2001) SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 13681-13686.
214. Park, C., Choi, Y. und Yun, Y. (1998) Son of sevenless binds to the SH3 domain of src-type tyrosine kinase *Mol. Cells* **8**, 518-523.
215. Cheng, H. C., Nishio, H., Hatase, O., Ralph, S. und Wang, J. H. (1992) A synthetic peptide derived from p34cdc2 is a specific and efficient substrate of src-family tyrosine kinases *J. Biol. Chem.* **267**, 9248-9256.
216. Frantz, B., Klatt, T., Pang, M., Parsons, J., Rolando, A., Williams, H., Tocci, M. J., O'Keefe, S. J. und O'Neill, E. A. (1998) The activation state of p38 mitogen-activated protein kinase determines the efficiency of ATP competition for pyridinylimidazole inhibitor binding *Biochemistry* **37**, 13846-13853.
217. Hill, M. M., Andjelkovic, M., Brazil, D. P., Ferrari, S., Fabbro, D. und Hemmings, B. A. (2001) Insulin-stimulated protein kinase B phosphorylation on Ser-473 is independent of its activity and occurs through a staurosporine-insensitive kinase *J. Biol. Chem.* **276**, 25643-25646.
218. Hagiwara, M., Brindle, P., Harootunian, A., Armstrong, R., Rivier, J., Vale, W., Tsien, R. und Montminy, M. R. (1993) Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A *Mol. Cell Biol.* **13**, 4852-4859.
219. Chen, S. J., Klann, E., Gower, M. C., Powell, C. M., Sessoms, J. S. und Sweatt, J. D. (1993) Studies with synthetic peptide substrates derived from the neuronal protein neurogranin reveal structural determinants of potency and selectivity for protein kinase C *Biochemistry* **32**, 1032-1039.
220. Plaisance, S., Vanden Berghe, W., Boone, E., Fiers, W. und Haegeman, G. (1997) Recombination signal sequence binding protein Jkappa is constitutively bound to the NF-kappaB site of the interleukin-6 promoter and acts as a negative regulatory factor *Mol. Cell Biol.* **17**, 3733-3743.
221. Vales, L. D. und Friedl, E. M. (2002) Binding of C/EBP and RBP (CBF1) to overlapping sites regulates interleukin-6 gene expression *J. Biol. Chem.* **277**, 42438-42446.

-
222. Marcinkiewicz, C., Galasinski, W. und Gindzienski, A. (1995) EF-1 alpha is a target site for an inhibitory effect of quercetin in the peptide elongation process *Acta Biochim. Pol.* **42**, 347-350.
223. McKeehan, W. L. und Hardesty, B. (1969) Purification and partial characterization of the aminoacyl transfer ribonucleic acid binding enzyme from rabbit reticulocytes *J. Biol. Chem.* **244**, 4330-4339.
224. Khacho, M., Mekhail, K., Pilon-Larose, K., Pause, A., Cote, J. und Lee, S. (2008) eEF1A is a novel component of the mammalian nuclear protein export machinery *Mol. Biol. Cell* **19**, 5296-5308.
225. Moore, R. C. und Cyr, R. J. (2000) Association between elongation factor-1alpha and microtubules in vivo is domain dependent and conditional *Cell Motil. Cytoskeleton* **45**, 279-292.
226. Lamberti, A., Caraglia, M., Longo, O., Marra, M., Abbruzzese, A. und Arcari, P. (2004) The translation elongation factor 1A in tumorigenesis, signal transduction and apoptosis: review article *Amino. Acids* **26**, 443-448.
227. Lamberti, A., Longo, O., Marra, M., Tagliaferri, P., Bismuto, E., Fiengo, A., Viscomi, C., Budillon, A., Rapp, U. R., Wang, E., Venuta, S., Abbruzzese, A., Arcari, P. und Caraglia, M. (2007) C-Raf antagonizes apoptosis induced by IFN-alpha in human lung cancer cells by phosphorylation and increase of the intracellular content of elongation factor 1A *Cell Death. Differ.* **14**, 952-962.
228. Cimarelli, A. und Luban, J. (1999) Translation elongation factor 1-alpha interacts specifically with the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein *J. Virol.* **73**, 5388-5401.
229. Lau, J., Castelli, L. A., Lin, E. C. und Macaulay, S. L. (2006) Identification of elongation factor 1alpha as a potential associated binding partner for Akt2 *Mol. Cell Biochem.* **286**, 17-22.
230. Kido, T. und Lau, Y. F. (2008) The human Y-encoded testis-specific protein interacts functionally with eukaryotic translation elongation factor eEF1A, a putative oncoprotein *Int. J. Cancer* **123**, 1573-1585.
231. Xu, W., Nair, J. S., Malhotra, A. und Zhang, J. J. (2005) B cell antigen receptor signaling enhances IFN-gamma-induced Stat1 target gene expression through calcium mobilization and activation of multiple serine kinase pathways *J. Interferon Cytokine Res.* **25**, 113-124.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen herzlichen Dank aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Herrn Prof. Hans-Ulrich Demuth und Herrn PD Konrad Glund für die Möglichkeit die Arbeit bei der Probiodrug AG in Halle/Saale anfertigen zu können und für die Gewährung der optimalen Arbeitsbedingungen in dieser Firma sowie für das mir geschenkte Vertrauen.

Ein riesengroßes Dankeschön gilt Herrn Dr. Ingo Schulz, ohne den die Arbeit in dieser Form vermutlich nicht entstanden wäre.

Ingo, Du warst mir ein sehr gewissenhafter Betreuer und ich habe die vielen Diskussionen zu kritischen Sachverhalten, kleinen und großen Problemen schätzen gelernt. Es hat mich gefreut und bereichert, in den 6 Jahren, in denen ich bei der Probiodrug AG gewirkt habe, mit Dir zusammenzuarbeiten.

Ich möchte ebenso Frau PD Astrid Kehlen danken. Sie hat mit ihrem Blick für das Wesentliche den Entstehungsprozess der Arbeit begleitet und damit zum vorliegenden Ergebnis beigetragen. Ich möchte mich ebenso für die Unterstützung bei der Durchflußzytometrie-Methode sowie für die Beantwortung aller organisatorischen Fragen und die diesbezüglichen Hilfen bedanken.

Ein herzliches „Danke!“ geht an die gesamte Belegschaft der Probiodrug AG für das super Arbeitsklima und die sehr gute Zusammenarbeit.

Insbesonderer Dank gilt folgenden Personen, die mir bei der Lösung der Fragestellungen dieser Arbeit mit verschiedenen Methoden und kritischen Diskussionen stets zur Seite standen:

Herrn Dr. André J. Niestroj – ein großes Dankeschön für die Synthese und die Bereitstellung der Inhibitoren und für die ausführlichen Erklärungen chemischer Sachverhalte, die viel zu meinem Verständnis der Thematik aus dieser Perspektive beitrugen.

Herrn Dr. Martin Kleinschmidt – vielen Dank für die Einführung in die Oberflächenplasmonenresonanz-Methode und auch für die Hilfe bei der Durchführung von dieser.

Den Praktikanten Daniel Maucher und Christoph Pille sei gedankt für die Hilfe bei der Durchführung, Etablierung und Auswertung der Immunzytochemieuntersuchungen bezüglich der Phosphorylierung von Stat3.

Danke! Frau Susann Wendler und Frau Diplombiologin Katja Menge für das Legen von Grundsteinen meiner Arbeit: Die zahlreichen Vorversuche in Hinblick auf die Charakterisierung von IL-6-Inhibitoren sowie die Durchführung und Vorbereitung von qPCR-Analysen für die Validierung der Inhibition der IL-6-Expression durch Heteroarylketone im Mausmodell.

Den Mitarbeitern der Probiodrug AG Frau Dipl.-Ing. Anja Weber, Herrn Dipl.-Ing. Michael Wehrmann, der Diplombiologin Birgit Koch, Herrn Dr. David-Ruiz Carillo, Herrn Dr. Jens-Ulrich Rahfeld und Frau Nadine Jänkel für die Hilfestellung bei der Reinigung des Elongationsfaktors sowie bei den Versuchen zur Klonierung des eEF1A1-Gens sei gedankt.

Ein Dankeschön gilt zudem:

Frau Dr. Karola Lehmann und Ihren Kollegen in der Proteome Factory AG in Berlin für die Durchführung der 2-D-Gelelektrophorese und die Identifizierung der Proteinspots.
Frau Dr. Petra Lutter und Ihrem Team, die ebenso an der Identifizierung der putativen Interaktionspartner von Heteroarylketonen mitgewirkt haben.

Für die Behandlung der Mäuse des Tiermodells und die nachfolgende Probennahme bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Steffen Roßner und seiner Kollegin Frau Dr. Ulrike Zeitschel im Paul-Flechsig-Institut in Leipzig.

Ebenso gilt mein Dank den Gutachtern.

Meiner Familie möchte ich ganz besonders herzlich DANKE sagen, für deren immerwährende Unterstützung in allen Lebenslagen sowie für den Zuspruch und die Aufmunterung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die den genutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Halle/Saale, am 17.03.2010

Erklärung zu früheren Versuchen zur Erlangung des angestrebten akademischen Grades

Ich habe mich mit dieser Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen universitären Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben.

Halle/Saale, am 17.03.2010

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Claudia Engel
Geburtsdatum: 09.02.1980
Geburtsort: Wolfen
Anschrift: Neue Reihe 33, 06766 Thalheim
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Staatsangehörigkeit: Bundesrepublik Deutschland

Ausbildung

08/1991 – 07/1998 Besuch des Gymnasiums Wolfen/Nord; Sachsen-Anhalt
09.07.1998 Abitur am Gymnasium Wolfen/Nord; Sachsen-Anhalt
10/1998 – 09/1999 Studium der Soziologie an der Universität Leipzig
10/1999 – 09/2005 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
26.09.2005 Diplomarbeit mit dem Thema „*Charakterisierung der Hemmung der IL-6-Sekretion in humanen Zelllinien durch Heteroarylketone*“, Anfertigung der Diplomarbeit unter Anleitung von Dr. rer. nat. habil. K. Humbeck (Abteilung Pflanzenphysiologie; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) und Dr. rer. nat. I. Schulz (Probiodrug AG) in der Probiodrug AG, Halle/Saale

Berufspraxis

10/2005 – 03/2009 wissenschaftliche Mitarbeiterin bei der Probiodrug AG, Halle/Saale
Schwerpunkte:
Kultivierung humaner Karzinomzelllinien Erforschung von Signaltransduktionsprozessen mit Hilfe zellbasierter Assays; Anfertigung der vorliegenden Promotionsarbeit unter Leitung und Betreuung von Dr. rer. nat. I. Schulz (Probiodrug AG) und Prof. Dr. S.-E. Behrens (Abteilung Mikrobielle Biotechnologie; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) in der Probiodrug AG, Halle/Saale
ab 03/2009 Arbeitssuchende bzw. weiterbildende Tätigkeiten

Auslandsaufenthalte

08/2002 – 12/2002 Universität Turku/Finnland
Studentenaustausch zwischen der MLU-Halle und der Universität von Turku