

**Inhibition des Stat3-Signalweges durch
Peptid-Aptamere
- ein neuer Ansatzpunkt für die Tumorthherapie**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 15
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

**von Kerstin Nagel-Wolfrum
aus Karlsruhe**

Frankfurt im August 2004
(DF1)

Vom Fachbereich
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

Gutacher:

Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Deregulierte Signalwege als neue Angriffspunkte für Therapieansätze	1
1.2. Die Rolle von Stat-Molekülen in der Signaltransduktion	3
1.3. Stat3 - seine Funktionen im Organismus.....	7
1.4.. Stat3 in Tumorerkrankungen und als Zielstruktur für therapeutische Ansätze.....	9
1.5. Peptid-Aptamere: neue Modellstrukturen zur Tumorthherapie	13
1.6. Das Hefe-zwei-Hybrid-System als Grundlage zur Identifikation von Peptid-Aptamer-Protein-Interaktionen	15
1.7. Proteintransduktion als neue Methode zur therapeutischen Applikation von Peptiden	19
1.8. Ziel der Arbeit	21
2. Material und Methoden	23
2.1. Materialien	23
2.1.1. Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	23
2.1.2. Lösungen und Puffer.....	23
2.1.3. Plasmide.....	24
2.1.3.1. Hefe-Expressionsvektoren	24
2.1.3.2. Bakterielle Expressionsvektoren.....	24
2.1.3.3. Eukaryontische Expressionsvektoren	25
2.1.4. Primäre und sekundäre Antikörper	25
2.1.5. <i>E.coli</i> Stämme und Anzuchtbedingungen.....	26
2.1.6. Hefestamm und Anzuchtbedingungen.....	27
2.1.7. Zelllinien und Medien	27
2.1.8. Sequenzen verwendeter DNA-Oligomere	27
2.1.8.1. Oligonukleotide für Gelretardationsanalysen	28
2.1.8.2. Primer für Klonierungen der Stat3-Baitkonstrukte.....	28
2.2. Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1. Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese	28
2.2.2. Polymerase-Chain-Reaction (PCR).....	28
2.2.3. Enzymatische Behandlung von DNA	29
2.2.3.1. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	29
2.2.3.2. Dephosphorylierung von 5' Enden	29
2.2.3.3. Ligation von DNA-Fragmenten.....	29
2.2.4. Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	30

2.2.5. Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i>	30
2.2.5.1. Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	30
2.2.5.1.1. Chemokompetente Bakterien (<i>E. coli</i> XL-1 blue; <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS)	30
2.2.5.1.2. Elektrokompente Bakterien (DH10B)	30
2.2.5.2. Transformation in chemokompetente Bakterien.....	31
2.2.5.3. Transformation in elektrokompente Bakterien	31
2.2.6. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
2.2.6.1. Plasmidisolierung in analytischem Maßstab (Mini-Präparation)	31
2.2.6.2. Plasmidisolierung in präparativem Maßstab (Maxi-Präparation).....	32
2.2.7. DNA-Konzentrationsbestimmung	32
2.3. Proteinbiochemische Methoden	32
2.3.1. Proteinexpression in <i>E. coli</i>	32
2.3.1.1. Aufreinigung von rekombinant exprimierten Proteinen aus <i>E. coli</i> unter denaturierenden Bedingungen	32
2.3.1.1.1. Aufschluss der Bakterien.....	32
2.3.1.1.2. Reinigung durch Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie.....	33
2.3.1.1.3. Renaturierung des gereinigten Proteins mittels Dialyse.....	33
2.3.2. Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford	33
2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese.....	34
2.3.4. Coomassieblau-Färbung von Polyacrylamidgelen	34
2.3.5. Immunoblot (Western Blot Analyse).....	34
2.3.6. Ponceau-Färbung von Nitrocellulosemembranen.....	35
2.3.7. “Strippen” von Nitrocellulosemembranen.....	35
2.3.8. Immunopräzipitation (IP)	35
2.3.8.1. Immunopräzipitation des EGFR	36
2.3.8.2. Immunopräzipitation von Stat3.....	36
2.3.9. Gelretardationsanalyse (electrophoretic mobility shift assay)	36
2.3.9.1. Hybridisierung der komplementären Oligonukleotidstränge.....	37
2.3.9.2. Radioaktive Markierung eines Oligonukleotides.....	37
2.3.9.3. Herstellung des nativen 5% Acrylamid-Gel	38
2.3.9.4. Spezifische Bindung von Proteinen an radioaktiv- markierte Oligonukleotide.....	38
2.4. Methoden im Hefe-zwei-Hybrid-System	39
2.4.1. Lösungen und Medien	40
2.4.2. Transformation von Plasmiden in <i>S. cerevisiae</i> („Quickie“)	40
2.4.3. Transformation der Library-Vektoren in <i>S. cerevisiae</i>	41
2.4.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	41
2.4.5. Verifikation des Interaktionsphänotyps mittels Mating	41

2.5. Methoden der Zellkultur	42
2.5.1. Transfektion von Säugerzellen	42
2.5.2. Zellernte und Zellaufschluß	42
2.5.2.1. Triton-X 100 Puffer	43
2.5.2.2. HEPES-Puffer	43
2.5.3. Bestimmung der Überlebensrate.....	43
2.5.4. Messung der Luziferase- und β -Galaktosidase-Aktivität	44
2.5.5. Markierung apoptotischer Zellen mittels TUNEL (Td \bar{T} -mediated XdUTP \bar{n} ick \bar{e} nd labeling)	45
2.5.6. Indirekte Immunofluoreszenz.....	45
2.6. Statistische Auswertung	46
2.7. Tierexperimente.....	46
3. Ergebnisse.....	48
3.1. Identifikation von Peptid-Aptameren, die mit funktionellen Domänen des Transkriptionsfaktors Stat3 interagieren	48
3.2. Überprüfung der spezifischen Interaktion von isolierten Peptid-Aptameren mit ihrem Bait-Konstrukt in Hefen	51
3.3. Interaktion der isolierten Peptid-Aptamere mit Stat3 <i>in vitro</i>	53
3.4. Molekulare Charakterisierung des inhibitorischen Einflusses der isolierten Peptid- Aptamere auf die Stat3-Signaltransduktion <i>in vivo</i> nach exogener EGF-Stimulation .	56
3.4.1. Inhibition der transkriptionellen Aktivität	57
3.4.2. Stabile Transfektion der Herc-Zellen zur molekularen Charakterisierung der inhibitorischen Funktion der Peptid-Aptamere auf den Stat3-Signalweg ..	58
3.4.3. Einfluss der isolierten Peptid-Aptamere auf die DNA-Bindung von Stat3	59
3.4.4. Einfluss der isolierten Peptid-Aptamere auf die Phosphorylierung von Stat	60
3.4.5. Die isolierten Peptid-Aptamere interferieren weder mit der Aktivierung des EGFR noch mit dem nachgeschalteten MAPK-Signalweg.....	61
3.5. Einfluss von Peptid-Aptamer DBD-1 auf Tumorzellen mit konstitutiv-aktivem Stat3	64
3.5.1. Peptid-Aptamer DBD-1 hemmt die transkriptionelle Aktivität von Stat3 in murinen Melanomazellen	64
3.5.2. Peptid-Aptamer DBD-1 inhibiert die Expression von VEGF in murinen Melanomazellen.....	65
3.5.3. Transiente Expression von Peptid-Aptamer DBD-1 inhibiert die Proliferation von murinen Melanomazellen	66
3.5.4. Induktion von Apoptose als Folge der Transfektion von Peptid-Aptamer DBD-1 in murinen Melanomazellen.....	67

3.6. Proteintransduktion als neue Methode zur Applikation von Proteinen in eukaryontische Zellen.....	70
3.6.1. Expression, Aufreinigung und Aufnahme der rekombinant exprimierten Peptid-Aptamere.....	71
3.6.2. Funktionelle Analyse des transduzierten DBD-1-9R Peptid-Aptamers	73
3.6.3. Einfluss von Peptid-Aptamer DBD-1 auf das Überleben von humanen Myelomazellen.....	74
3.6.3.1. Peptid-Aptamer DBD-1 inhibiert die Proliferation von humanen Myelomazellen mit konstitutiv-aktivem Stat3.....	75
3.6.3.2. Reduktion der Expression von Bcl-x _L als Folge der Transduktion von Peptid-Aptamer DBD-1 in humane Myelomazellen.....	77
3.6.3.3. Induktion von Apoptose als Folge der Transduktion von Peptid- Aptamer DBD-1 in humane Myelomazellen	78
3.7. Peptid-Aptamer DBD-1 inhibiert das Tumorstadium <i>in vivo</i> in Mäusen	80
4. Diskussion.....	83
4.1. Peptid-Aptamere, die mit der Dimerisierungsdomäne von Stat3 interagieren, inhibieren spezifisch den Stat3-Signalweg.....	86
4.2. Peptid-Aptamere, die mit der DNA-Bindungsdomäne von Stat3-Molekülen interagieren, inhibieren spezifisch den Stat3-Signalweg.....	88
4.3. Model zur Inhibition des Stat3-Signalweges durch Peptid-Aptamere	90
4.4. Peptid-Aptamere: Moleküle für die Grundlagenforschung und für die Validierung von Zielproteinen in der Medikamentenentwicklung.....	92
4.5. Einfluss der isolierten Peptid-Aptamere auf Tumorzellen	95
4.5.1. Einfluß der isolierten Peptid-Aptamere auf die transkriptionelle Aktivität von Stat3	96
4.5.2. Peptid-Aptamer DBD-1 induziert Apoptose in Stat3-abhängigen Tumorzellen.....	98
4.5.3. Peptid-Aptamer DBD-1 beeinflusst die Überlebensrate von Stat3- unabhängigen Tumorzellen nicht.....	103
4.6. Peptid-Aptamere als Ausgangsstrukturen für die Entwicklung von neuen Medikamenten.....	105
4.7. Fusion von Peptid-Aptameren mit weiteren funktionelle Domänen – ein möglicher neuartiger therapeutischer Ansatz	107
4.7.1. Proteintransduktion als Methode zur transienten Applikation von Peptid-Aptameren	107
4.7.2. Modifizierte Peptid-Aptamere zum gezielten Abbau von interagierenden Proteinen	111
5. Literatur	115
6. Abkürzungsverzeichnis.....	126
7. Anhang.....	129

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten durch den Einsatz modifizierter Hefe-zwei-Hybrid-Screens erstmals Peptid-Aptamere isoliert werden, die spezifisch mit verschiedenen funktionellen Domänen von Stat3 interagieren und dadurch den Stat3-Signalweg auf unterschiedlichen Ebenen inhibieren. Als Zieldomänen im Hefe-zwei-Hybrid-System wurden die Dimerisierungs- bzw. die DNA-Bindedomäne von Stat3 verwendet.

Nach der erfolgreichen Identifikation von Peptid-Aptameren im modifizierten Hefe-zwei-Hybrid-System war es zunächst notwendig, die spezifische Interaktion der isolierten Peptid-Aptamere mit Stat3 zu demonstrieren. Die *in vitro* Interaktion der isolierten Peptid-Aptamere mit dem gesamten Stat3-Molekül wurde in Ko-Immunopräzipitationsexperimenten gezeigt. Im Folgenden bestätigte sich die spezifische Interaktion der isolierten Peptid-Aptamere mit ihren jeweiligen funktionellen Domänen von Stat3 in Hefen mittels Mating-Experimenten.

In den nächsten Schritten sollte die Bioaktivität der isolierten Peptid-Aptamere bei der Inhibition des Stat3-Signalweges in verschiedenen Zellsystemen validiert werden. Zunächst konnten in Herc-Zellen, die den Stat3-Signalweg nach exogenem Stimulus (EGF) aktivieren, die molekularen Wirkungsmechanismen, die der Inhibition des Stat3-Signalweges durch die Peptid-Aptamere zugrunde liegen, aufgeklärt werden. Durch den Einsatz eines biochemisch-molekularbiologischen Methodenrepertoires (Western Blot Analysen, Reporter-gen-Analysen, und Gelretardierungsexperimente) zeigte sich, dass die verschiedenen selektionierten Peptid-Aptamere mit dem Aktivierungsszenario des Stat3-Signalweges auf zwei unterschiedlichen Ebenen, der Phosphorylierung bzw. der DNA-Bindung von Stat3, interferieren.

Um die mögliche Anwendung der isolierten Peptid-Aptamere als potentielle Stat3-Inhibitoren in Tumorerkrankungen zu analysieren, wurden die Untersuchungen auf Tumorzelllinien mit konstitutiv-aktivem Stat3 (murine Melanomazelllinie B16 und humane Myelomazelllinie U266) ausgeweitet. Durch die zelluläre Applikation der für die isolierten Peptid-Aptamere codierenden DNA mittels Transfektion ergaben sich erste Einblicke über den Einfluss der isolierten Peptid-Aptamere auf die transkriptionelle Aktivität von Stat3. In weiteren Untersuchungen konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass durch die transiente Expression eines Peptid-Aptamers (DBD-1) Apoptose in murinen Melanomazellen induziert wird. Die biologische Aktivität des DBD-1 Peptid-Aptamers wurde dann mit Hilfe einer innovativen Methode zur zellulären Applikation von potentiell wirksamen Bio-Molekülen in eukaryotische Zellen studiert. Dabei konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die

Methode der Proteintransduktion für die Applikation von Peptid-Aptameren etabliert werden. Durch den Einsatz der Proteintransduktion ließ sich die Funktionalität des isolierten DBD-Peptid-Aptamers nicht nur in murinen, sondern auch in humanen Stat3-abhängigen Tumorzellen verifizieren. Dabei konnte auch eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Überlebensrate von Stat3-abhängigen Tumorzellen und der Menge an applizierten Peptid-Aptamer hergestellt werden. Darüber hinaus demonstrieren weitere Ergebnisse, dass das DBD-1 Peptid-Aptamer keinen Einfluss auf die Überlebensrate von nicht-Stat3-abhängigen Tumorzellen hat, wodurch die hohe Spezifität des DBD-1 Peptid-Aptamers bestätigt wird. Zusätzlich zu diesen funktionellen Analysen konnte der durch das Peptid-Aptamer induzierte Signalweg, der die Einleitung des programmierten Selbstmordes der Stat3-abhängigen Tumorzellen auslöst, charakterisiert werden.

Die vorliegenden Daten zeigen zudem die Funktionalität der rekombinant exprimierten Peptid-Aptamere fusioniert mit einer Proteintransduktionsdomäne in einem *in vivo* Tumormodell in der Maus. Für diesen tierexperimentellen Ansatz fanden B16-Tumorzellen Verwendung, die nach subkutaner Injektion in Mäusen lokale Tumore bilden. In diesem Tumormodell wurde mittels intratumorale Injektion des transduzierbaren DBD-Peptid-Aptamers ein viel versprechender, wachstumshemmender Effekt auf Tumorzellen erzielt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass Stat3 ein ideales Zielprotein für die Entwicklung neuer Tumorthapeutika ist. Dabei stellt nicht nur die Dimerisierungsdomäne, sondern auch die DNA-Bindungsdomäne ein attraktives Ziel für die Inhibition des Transkriptionsfaktors Stat3 dar. Die viel versprechenden Daten sowohl an Tumorzellen als auch im Gesamtorganismus des Maustumormodells, verbunden mit der hier herausgearbeiteten innovativen Applikationstechnik, lassen auf einen Einsatz der isolierten Peptid-Aptamere in der Tumorthapie hoffen. Zudem eröffnen die Daten zur Proteintransduktion von Peptid-Aptameren neue Perspektiven für die Applikation von Biomolekülen mittels „Protein-Therapie“ in der molekularen Bio-Medizin.

1. Einleitung

Die Entstehung vielzelliger Organismen geht einher mit der Ausbildung komplexer Signalnetzwerke, die die Differenzierung, das Überleben und die Proliferation der einzelnen Zellen des Organismus steuern. Die Regulation dieser Kommunikationsnetzwerke erfolgt über direkte Zell-Zell-Kontakte, Kontakte der Zelle zur extrazellulären Matrix, sowie über die Interaktion von sekretierten Botenstoffen mit ihren jeweiligen Rezeptoren. Sowohl die Interaktion der Zellen miteinander als auch die Bindung der sekretierten Botenstoffe an ihre spezifischen Oberflächenrezeptoren aktivieren intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden, die die Genexpressionsmuster der Zelle verändern und dadurch den Phänotyp der einzelnen Zellen beeinflussen. Störungen in diesem feinregulierten Kommunikationsnetzwerk, die die Homöostase zwischen den elementaren Untereinheiten des Organismus beeinflussen, haben häufig Erkrankungen des gesamten Organismus zur Folge.

1.1. Deregulierte Signalwege als neue Angriffspunkte für Therapieansätze

Die Folge deregulierter Signaltransduktionswege sind Veränderungen in Genexpressionsmustern, die wiederum häufig zu einem gestörtem Proliferations- und Apoptoseverhalten der Zellen führen. Während in degenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise *Retinitis pigmentosa*, Alzheimer, AIDS oder auch bei Herzinfarkten, zu viele Zellen absterben, zeigen Tumorzellen eine erhöhte Proliferationsrate und/oder Apoptoseresistenz (Reed 2002).

Das zunehmende Wissen über die molekularen Mechanismen, die an der Krebsentstehung beteiligt sind, hat zur Identifikation der Signalwegen geführt, die in Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen dereguliert sind (Hanahan and Weinberg 2000). Häufige Ursache für die Deregulation von Signalwegen in Tumorzellen sind Veränderungen im Aktivitätszustand von einem oder mehreren Molekülen, die in der Signalweiterleitung involviert sind. Der Grund für die veränderten Eigenschaften der Signalmoleküle ist die genetische Instabilität vieler Tumorzellen, die beispielsweise zu einer gesteigerten Mutationsrate in krebskritischen Genen führt. Diese Mutation können Funktionsgewinn („gain of function“)-Mutationen in Proto-Onkogenen oder aber Funktionsverlust („loss of function“)-Mutationen von Tumorsuppressorgene induzieren. Die Genprodukte dieser krebsrelevanten Gene nehmen häufig Schlüsselrollen in der intrazellulären Signalweiterleitung ein, sodass die Fehlfunktion, die durch Mutationen ausgelöst wird, zu Störungen in dem von ihnen regulierten Signalweg führt. Allerdings

reicht eine Mutation in einem krebskritischen Gen nicht aus, um eine gesunde Zelle in eine Krebszelle umzuwandeln. Die Krankheit Krebs spiegelt einen komplexen Phänotyp wider, bei der Veränderungen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen in Zellen akkumuliert werden (Felsher 2004). Da eine einzelne genetische Veränderung in der Zelle für die Entstehung von malignen Tumoren nicht ausreicht, stellt sich die Frage, inwieweit die Inhibition eines einzelnen, onkogen wirkenden Signalmoleküls die Transformation von Tumorzellen wieder rückgängig machen kann. In einer stetig wachsenden Anzahl von experimentellen Ansätzen konnte demonstriert werden, dass das Ausschalten eines einzelnen Onkogens ausreichend sein kann, um eine Tumorregression einzuleiten. Diese Beobachtungen beziehen sich nicht nur auf transgene Mausmodelle, die eine konditionale Expression von Onkogenen zulassen, sondern auch auf erfolgreiche Therapieansätze in Menschen (Sawyers 2002a; 2002b; Felsher 2003; 2004).

Allerdings eignet sich nicht jedes Onkogen als potentielle Zielstruktur für die Entwicklung neuer Tumorthapeutika, da nicht alle Onkogene gleichermaßen zur Tumorprogression beitragen. Häufig überwinden Tumorzellen die Abhängigkeit von dem Onkogen, das einmal ursächlich an der Tumorentstehung beteiligt war, und erhalten ihren malignen Phänotyp durch die Akkumulation von neuen, genetischen Modifikationen (Giuriaro and Felsher 2003). Dennoch gibt es einige Charakteristika, die ein Onkogen zu einem unabdingbaren Faktor für weiteres Tumorstadium machen und es damit als Zielstruktur für Entwicklung neuer Therapeutika prädestinieren. Zu den relevanten Punkten zählt unter anderem, dass das Onkogen a.) die Zellproliferation induziert, b.) die Differenzierung und Apoptose inhibiert, und zudem c.) eine entscheidende Rolle bei dem Erhalt der neoplastischen Eigenschaften der Tumorzellen spielt (Felsher 2004). Das gezielte Ausschalten eines solchen Onkogens kann die Transformation von Tumorzellen aufheben und dadurch die Regression des Tumors induzieren. Ein einzelnes, onkogen wirkendes Signalmolekül stellt folglich ein gutes „molekulares Zielprotein“ zur Entwicklung neuer spezifischer Tumorthapeutika dar.

Solche Möglichkeiten werden derzeit hauptsächlich für Moleküle angewandt, die sich durch distinkte enzymatische Wirkungsweise auszeichnen. Zu solchen Zielproteinen gehören beispielsweise die epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGF-Rezeptor oder der ErbB2-Rezeptor) sowie weitere Kinasen, wie zum Beispiel das BCR-Abl-Fusionsprotein. Die Entwicklung von spezifischen Substanzen, die die Funktion dieser Kinasen inhibieren, hat zu großen Erfolgen in der Behandlung von Tumorkranken geführt (Druker and Lydon 2000; Levitzki 2002; Dancy and Sausville 2003, Traxler 2003; Levitzki

2003; Noble et al. 2004). Zahlreiche Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass auch Komponenten, die in einer Signalkaskade erst später („downstream“) zur Wirkung kommen, eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Tumorerkrankungen spielen und zu der Familie der Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene gezählt werden können. Hierzu gehören beispielsweise das anti-apoptotische Bcl-2-Protein (Reed 1998) aber auch Transkriptionsfaktoren wie p53 und Stat3 (Bromberg et al. 1999; Vogelstein et al. 2000). Allerdings sind Inhibitoren für diese Signalmoleküle, z. B. für die nukleären Komponenten der Signaltransduktion, wesentlich schwieriger zu konzipieren (Darnell, Jr. 2002). Dennoch konnten in den letzten Jahren Peptide bzw. nieder-molekulare chemischen Verbindungen identifiziert werden, die in der Lage sind mit der Funktion dieser „downstream“-Komponenten zu interferieren. Die Inhibition dieser Signalmoleküle zeigte, dass auch diese Moleküle als „molekulare Targetproteine“ zur Entwicklung neuer Tumorthapeutika prädestiniert sind (Degterev et al. 2001; Tzung et al. 2001; Blaskovich et al. 2003; Calvin et al. 2003; Chene 2003; Snyder et al. 2004).

1.2. Die Rolle von Stat-Molekülen in der Signaltransduktion

Die Regulation der Proliferation, der Differenzierung und des Überlebens einer Zelle erfolgt über sekretierte Botenstoffe, wie beispielsweise Zytokine und Wachstumsfaktoren (Ligand), die als Liganden durch die Interaktion mit spezifischen Oberflächenrezeptoren auf der Zielzelle Signalkaskaden induzieren (Abb. 1.1.). Durch die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne seines spezifischen Rezeptors kommt es zur Aktivierung des Rezeptors, wodurch intrazelluläre Tyrosinkinasen der Rezeptoren oder rekrutierte Tyrosinkinasen, wie beispielsweise Src oder Janus-Kinasen (Jaks) aktiviert werden. Durch die Aktivierung der Tyrosinkinasen kommt es zur Phosphorylierung von Tyrosinresten der Rezeptoren und rekrutierter Signalmoleküle. Zu diesen Signalmolekülen gehören unter anderen die „Signal transducers and activators of transcription“ (Stat)-Moleküle. Diese Stat-Moleküle sind latente Transkriptionsfaktoren, die im nicht-aktiven Zustand im Zytoplasma vorliegen. Die Aktivierung der Stat-Moleküle und ihre nachfolgende Funktionsweise sind in Abbildung 1.1. schematisch dargestellt. Nach ihrer Aktivierung durch Tyrosin-Phosphorylierung dimerisieren sie und wandern in den Nukleus. Im Kern binden die Stat-Dimere an Sequenz-spezifische DNA-response-Elemente (Sequenz: TTNNNNNAA) und regulieren als Transkriptionsfaktoren zusammen mit anderen Faktoren (z. B. Koaktivatoren) die Transkription spezifischer Gene, die für die Differenzierung, die Proliferation und das

Überleben der Zelle essentiell sind (Darnell, Jr. 1997). Stat-Moleküle fungieren somit als „molekulare Schalter“ für die Regulation der Differenzierung, Proliferation und dem Überleben von Zellen. Die Funktion der Stat-Moleküle als aktive Transkriptionsfaktoren dauert von einigen Minuten bis Stunden, dann werden sie an ihrem Tyrosin dephosphoryliert und wandern zurück in das Zytoplasma (Haspel and Darnell, Jr. 1999; Bhattacharya and Schindler 2003).

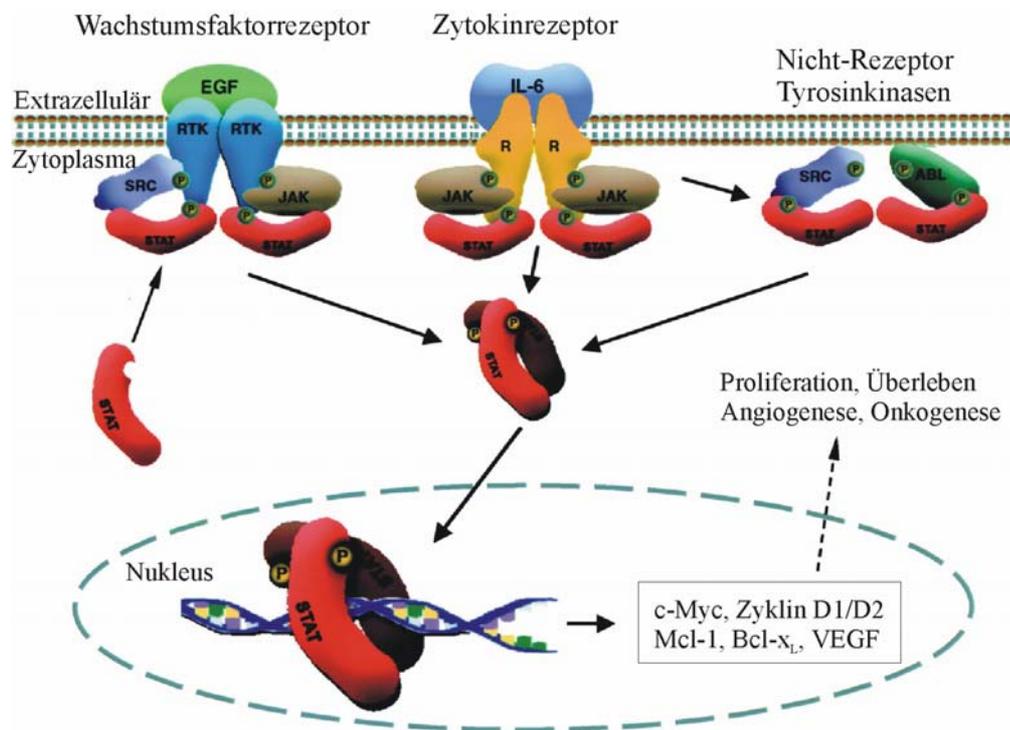


Abb. 1.1. Der Stat-Signalweg

Durch die Bindung eines Wachstumsfaktors (z. B. EGF) oder Zytokins (z. B. IL-6) an die extrazelluläre Domäne spezifischer Rezeptoren kommt es zur Aktivierung der Rezeptoren, wodurch die intrazellulären Tyrosinkinasedomänen der Rezeptoren (RTK) selbst oder rekrutierte Tyrosinkinasen (Src, Jak) aktiviert werden. Durch die Aktivierung der Tyrosinkinasen kommt es zur Phosphorylierung der Stat-Moleküle. Darüber hinaus können auch Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie Abl oder Src, Stat-Moleküle phosphorylieren. Nach ihrer Aktivierung durch spezifische Tyrosin-Phosphorylierungen dimerisieren die Stat-Moleküle und wandern als Dimer in den Nucleus, wo sie an Sequenz-spezifische DNA-response-Elemente binden und die Transkription der nachgeschalteten Gene regulieren. Diese Genprodukte steuern den Phänotyp der Zelle, beispielsweise durch Beeinflussung der Proliferation oder der Apoptoserate (verändert nach Buettner et al. 2000).

Bislang sind mehr als 40 verschiedene Polypeptide identifiziert worden, die den Stat-Signalweg einleiten können (Bromberg and Darnell, Jr. 2000). Einige der prominentesten Vertreter sind Zytokine, wie Mitglieder der Interleukin-Familie (IL-2-7, IL-9, IL-11-13, IL-15) und Interferone, sowie Mitglieder der Wachstumsfaktorfamilie (der epidermale

Wachstumsfaktor (EGF), der Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF)) oder Hormone wie beispielsweise Prolaktin (Calo et al. 2003). Diese Liganden binden an ihre spezifischen Rezeptoren, wie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Zytokinrezeptoren, die Tyrosinkinasen an ihre intrazellulären Domänen rekrutieren (z. B. Jaks oder Src) oder aber an Wachstumsfaktorrezeptoren, die eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität besitzen (Abb.1.1.). In Tumorzellen sind häufig Mutationen vorhanden, die zu einer Überexpression dieser Rezeptoren oder ihrer Liganden führen. Dadurch kommt es zu einer permanenten Aktivierung des Stat-Signalweges wodurch eine verstärkte Expression von Stat-Zielgenen induziert wird, die eine entscheidende Rolle bei der Onkogenese spielen (siehe 1.4.). Darüber hinaus zeigen weitere Untersuchungen, dass auch viele onkogen wirkende Tyrosinkinasen, wie beispielsweise v-Scr, v-Eyk, v-Ros oder v-Fps, Stat-Moleküle aktivieren können und somit zu einer Hyperaktivität der Stat-Moleküle führen, wodurch Tumorentstehung und Tumorprogression induziert werden kann (Garcia et al. 1997; Garcia and Jove 1998; Bromberg and Darnell, Jr. 2000) (Abb. 1.1.).

Die ersten Stat-Moleküle (Stat1 und Stat2) wurden vor über 10 Jahren bei Untersuchungen zur Aktivierung der Transkription von Genen durch Interferone entdeckt (Darnell, Jr. et al. 1994; Darnell, Jr. 1997; Stark et al. 1998). Bis heute umfasst die Stat-Proteinfamilie bei Säugern insgesamt sieben Mitglieder (Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b und Stat6), die eine Länge zwischen 780 und 800 Aminosäuren aufweisen. Die Funktionen der Stat-Proteine in der intrazellulären Signalweiterleitung und als Transkriptionsfaktor spiegelt sich in ihrem modularen Domänenaufbau wider (Takeda and Akira 2001) (Abb. 1.2):

Für die Aktivierung der Stat-Moleküle spielt die Dimerisierungsdomäne eine entscheidende Rolle. Dieser Bereich ist charakterisiert durch eine Src-Homologiedomäne (SH2-Domäne) und einen Tyrosinrest in der Nähe der Aminosäure 700. Im ersten Schritt des Stat-Signalweges kommt es zunächst zur Rekrutierung der Stat-Moleküle mit ihrer SH2-Domäne an aktivierte Rezeptoren bzw. Tyrosinkinasen. Nach dieser Interaktion, werden die Stat-Moleküle über eine sekundäre Modifikation in der Dimerisierungsdomäne aktiviert. Dies erfolgt durch die Phosphorylierung des um die Aminosäure 700 liegenden Tyrosinrestes und stellt den entscheidenden Schritt für die intrazelluläre Signalweiterleitung vermittelt über Stat-Moleküle („signal transducer“) dar. Die so aktivierten Stat-Moleküle dimerisieren durch reziprokes Wechselwirken ihres phosphorylierten Tyrosins mit der SH2-Domäne eines zweiten phosphorylierten Stat-Proteins (Shuai 1994; Darnell, Jr. 1997). Bei

der Dimerisierung kann es sowohl zur Homodimerbildungen (z. B. Stat3/Stat3, Stat5/Stat5) als auch zur Entstehung von Heterodimeren (z. B. Stat3/Stat1) kommen.

Die Tetramerisierungs-, die DNA-Bindungs- und die Transaktivierungsdomäne sind essentiell für die Funktion von Stat-Proteinen als Transkriptionsfaktoren („activator of transcription“). Die N-terminal gelegene Tetramerisierungsdomäne ermöglicht die Dimer-Dimer Interaktion zur Bildung von tetrameren Stat-Molekülen, eine Interaktion, die häufig eine Voraussetzung für die volle transkriptionelle Aktivität der Stat-Moleküle ist (Xu et al. 1996). Darüber hinaus stabilisiert die Tetramerisierung die DNA-Bindung der Stat-Moleküle an schwachen Promotoren (Vinkemeier et al. 1996; Johns et al. 1999). Zwischen der Tetramerisierungs- und der DNA-Bindungsdomäne liegt eine coiled-coil Domäne, die Protein-Protein Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren und anderen regulatorischen Proteinen ermöglicht (Bromberg und Darnell, Jr. 2000; Collum et al. 2000).

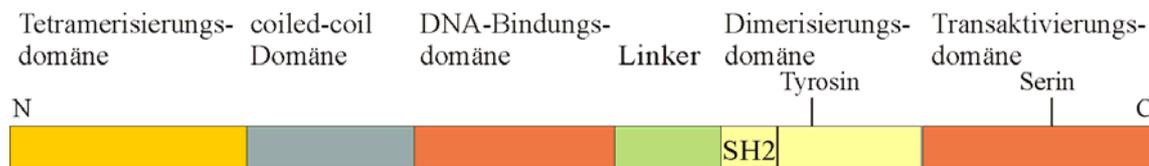


Abb. 1.2. Schematische Darstellung der funktionellen Domänen von Stat-Molekülen

Die Tetramerisierungsdomäne stabilisiert die Interaktion von zwei Stat-Molekülen, die an benachbarte DNA-Regionen gebunden sind. Die coiled-coil Domäne vermittelt die Interaktion mit Proteinen, die an der Regulation der Transkription beteiligt sind. Die DNA-Bindungsdomäne stellt den direkten Kontakt zur DNA her und vermittelt die Spezifität zu den palindromischen Sequenzen in den Promotorregionen der Zielgene. Die Aktivierung der Stat-Moleküle erfolgt über die Phosphorylierung eines Tyrosins in der Dimerisierungsdomäne. Ein phosphoryliertes Stat-Molekül interagiert mit der SH2-Domäne (Src-Homologie-Domäne) eines zweiten phosphorylierten Stat-Moleküls. Die C-terminale Transaktivierungsdomäne rekrutiert weitere Komponenten des transkriptionellen Apparates. Bei einigen Mitgliedern der Stat-Familie ist die Phosphorylierung des Serins in der Transaktivierungsdomäne wichtig für die volle transkriptionelle Aktivität.

Die DNA-Bindungsdomäne, die den Bereich der Aminosäuren 320-500 der Stat-Moleküle umfasst, stellt über hydrophobe Wechselwirkungen den direkten Kontakt zur DNA her und ist somit verantwortlich für die Spezifität der unterschiedlichen Stat-Moleküle bezüglich ihrer Bindung an die Promotorregionen der Zielgene (Becker et al. 1998; Chen et al. 1998). Die DNA-Bindedomäne ist über einen Linker mit der SH2-Domäne verbunden. Diese Linkersequenz ist wichtig für die Ausbildung der Tertiärstruktur der DNA-Bindedomäne. Mutationen in diesem Bereich führen bei Stat1 zu Proteinen, die zwar tyrosinphosphoryliert

sind, dimerisieren und an DNA binden können, jedoch nicht in der Lage sind die Transkription von Zielgenen einzuleiten (Yang et al. 1999). Die Transaktivierungsdomäne (TAD) am C-terminalen Ende der Stat-Moleküle ist verantwortlich für die Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie. Darüber hinaus beinhaltet diese Domäne bei Stat1 und Stat3 noch einen Serinrest, dessen Phosphorylierung die transkriptionelle Aktivität der Moleküle deutlich erhöht (Wen et al. 1995). TAD-defiziente Stat-Moleküle sind in der Lage an DNA zu binden, fungieren jedoch als dominant-negative Gegenspieler zu den „Wildtyp“-Stat-Molekülen (Caldenhoven et al. 1996; Sasse et al. 1997). Stat3 β stellt ein solch verkürztes Stat-Molekül dar, das unter physiologischen Bedingungen exprimiert wird, und eine wichtiger Gegenspieler von „Wildtyp“-Stat3 darstellt. So zeigen Stat3 β ^{-/-}-Mäuse eine langsamere Erholung nach einem endotoxischen Schock, sodass angenommen wird, dass Stat3 β eine fundamentale Rolle in der Kontrolle von Entzündungsreaktionen spielt (Yoo et al. 2002; Maritano et al. 2004).

Da der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit vor allem auf Untersuchungen des Stat3-Moleküles lag, soll im Folgenden näher auf die Funktionen dieses Stat-Familienmitgliedes eingegangen werden.

1.3. Stat3 - seine Funktionen im Organismus

Stat3 wurde zuerst in IL-6 stimulierten Hepatozyten als DNA-bindendes Protein entdeckt. Es interagiert spezifisch mit Promotorbereichen von „akuten-Phasen Genen“, sogenannten APRE (*engl.*: acute phase response element; akute Phase Antwort Element). Der ursprüngliche Name von Stat3 lautete deshalb auch APRF (*engl.*: acute phase response factor) (Akira et al. 1994; Zhong et al. 1994; Raz et al. 1994). Weitere Untersuchungen zeigten, dass alle zur IL-6-Familie gehörenden Proteine, sowie zahlreiche Wachstumsfaktoren (z. B. EGF) und Interferone Stat3 aktivieren können (Taga and Kishimoto 1997; Heinrich et al. 1998; Levy and Lee 2002). Der Stat3-Signalweg erfolgt wie in den in Abbildung 1.1. beschriebenen Schritten. Für die Aktivierung des Stat3-Signalweges, die beispielsweise über Jak1 oder Src erfolgt, ist die Phosphorylierung des Thyrosin 705 essentiell (Darnell, Jr. 1997). Nach der Dimerisierung und Translokation in den Nukleus binden Stat3-Dimere über ihre DNA-Bindungsdomänen an palindromische GAS-Elemente (Interferon- γ aktivierte Sequenz). Neben der Thyrosinphosphorylierung wird auch das in der Transaktivierungsdomäne der Stat3-Moleküle befindliche Serin 727 durch

verschiedenste Kinasen (wie Erk1, Erk2, p38, oder JNK) phosphoryliert (Decker and Kovarik 2000; Levy and Lee 2002).

Ganz im Gegensatz zu den weiteren Mitgliedern der Stat-Familie spielt Stat3 bereits in der frühen Embryonalentwicklung eine fundamentale Rolle (Akira 1999). Homozygote Stat3^{-/-}-Embryonen sterben bereits am Tag 6,5-7,5 der Embryonalentwicklung, während knock-out Mäuse der anderen Stat-Proteine mit recht milden Phänotypen geboren werden (Takeda et al. 1997; Akira 2000). Aufgrund des frühen letalen Phänotyps von Stat3^{-/-}-Mäusen konnte erst durch das Herstellen von konditionalen knock-out Mäusen die Rolle von Stat3 in verschiedensten Geweben, wie beispielsweise Thymus, Haut, Brustdrüse, Leber, Nervensystem und Blutzellen, näher untersucht werden (Akira 1999 und 2000). Bei den Untersuchungen zur Rolle von Stat3 in der Haut zeigte sich in konditionalen Keratin5-knock-out Mäusen, dass Stat3 eine wichtige Rolle bei Wundheilungsprozessen, der Wanderung von Keratinozyten und, mit zunehmendem Alter der Mäuse, dem Haarwachstum spielt (Sano et al. 1999). Darüber hinaus zeigte sich bei weiteren Untersuchungen dieser Tiere, dass das Fehlen von Stat3 in älteren Mäusen zu einer Hypoplasie des Thymus und damit verbunden zu einer reduzierten Anzahl an Thymozyten führt (Sano et al. 2001). Anders als die protektive Aufgabe von Stat3 im Thymus ist die Rolle von Stat3 in der Brustdrüse. Hier wird Stat3 während der Involution aktiviert und übernimmt somit eine proapoptotische Funktion in diesem Gewebe (Chapman et al. 1999). Das Ausschalten von Stat3 in myeloiden Zellen zeigte, dass diese Tiere eine erhöhte Anfälligkeit für einen endotoxischen Schock nach Infektionen zeigten und mit zunehmendem Alter eine chronische Enterokolitis (chronische Darmentzündung) entwickelten. Als molekulare Ursache wird die verstärkte Produktion von TNF- α angesehen, dessen Expression aufgrund des fehlenden Rückkopplungsprozesses über den IL-10/Stat3-Signalweg nicht reprimiert wird (Riley et al. 1999; Takeda et al. 1999).

Proteine, deren Expression von dem Transkriptionsfaktor Stat3 induziert werden, sind an der Regulation unterschiedlichster zellulärer Funktionen beteiligt. Über die Familie der IL-6-Zytokine reguliert Stat3 die Produktion der Proteine für die akute-Phase Antwort in Hepatozyten, aktiviert die terminale Differenzierung und Reifung von Monozyten, induziert die Proliferation in B-Zellen und ist mitverantwortlich für die Erhaltung der Pluripotenz und das Überleben von embryonalen Stammzellen (Akira et al. 1994; Boeuf et al. 1997; Heinrich et al. 1998; Niwa et al. 1998; Matsuda et al. 1999; Raz et al. 1999; Levy and Lee 2002). Abhängig vom Zelltyp können die Zielgene von Stat3 über unterschiedlichste Mechanismen somit die verschiedensten Phänotypen induzieren (Hirano et al. 2000). So wird die

Proliferation von B-Lymphozyten über die Reduzierung der Apoptoserate reguliert, dies erfolgt durch die vermehrte Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 in den Zellen (Levy and Lee 2002). Demgegenüber wird durch die Aktivierung des Stat3-Signalweges in Monozyten über eine reduzierte Expression von c-myc und c-myb in Verbindung mit einer verstärkten Expression von jun-B und IRF-1 ein Stopp der Proliferation induziert und die Differenzierung eingeleitet (Levy and Lee 2002). Auch bei der Reifung weiterer Zellen des Immunsystems spielt die Aktivierung des Stat3-Signalweges eine entscheidende Rolle, so vermittelt IL-10 über Stat3 die anti-inflammatorische Aktivität in Macrophagen (Riley et al. 1999).

Diese Untersuchungen belegen die wichtige und vielfältige Rolle, die Stat3 im Organismus von Säugetieren spielt. Darüber hinaus demonstrieren diese Daten, dass Störungen im Stat3-Signalweg die Proliferation, die Differenzierung und das Apoptoseverhalten einzelner Zellen des Organismus verändert, wodurch es zur Ausbildung von Krankheiten kommen kann.

1.4. Stat3 in Tumorerkrankungen und als Zielstruktur für therapeutische

Ansätze

Sowohl die Proliferation als auch das Überleben von Zellen wird durch das komplexe Zusammenspiel von Proteinen gesteuert. Transkriptionsfaktoren, die die Expression dieser regulatorischen Proteine an- und abschalten, sind die wichtigsten Knotenpunkte in diesem Regulationssystem. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass in Tumorzellen häufig Transkriptionsfaktoren hyperaktiv sind, die die Expression von proliferationsfördernden und apoptosehemmenden Genen steuern. Zu solchen Transkriptionsfaktoren zählen beispielsweise Stat3 und Stat5 (Abb. 1.3.) (Yu and Jove 2004). Während in gesunden Zellen die Phosphorylierung von Stat3 bzw. Stat5 und damit ihre Funktionalität als aktive Transkriptionsfaktoren nur einige Minuten bis Stunden andauert, zeigen Tumorzellen eine permanente Hyperaktivität von Stat3- bzw. Stat5-Molekülen. Durch die permanente Aktivierung der Stat-Transkriptionsfaktoren kommt es zu einer Überexpression von Stat-Zielgenen, wie beispielsweise die vermehrte Expression der anti-apoptotischen Proteine Survivin, Bcl-x_L oder Mcl-1, mit der Folge einer erhöhten Apoptoseresistenz der Tumorzellen (Abb.1.3.) (Catlett-Falcone et al. 1999; Gesbert and Griffin 2000; Grandis et al. 2000a; 2000b; Horita et al. 2000; Epling-Burnette et al. 2001; Niu et al. 2002; Zamo et al. 2002; Frank et al. 2003; Yu and Jove 2004)

Darüber hinaus steuern Stat3 und Stat5 die Expression der Zellzyklus regulierenden Proteine wie Cyclin D1 und Cyclin D2, und sie sind damit an der Regulation der Proliferation beteiligt (Abb. 1.3.) (Sinibaldi et al. 2000; Bromberg 2001; Martino et al. 2001; Kijima et al. 2002; Matsuda et al. 2002). Die erhöhte Aktivität von Stat3 bzw. Stat5 ist somit neben der Induktion der Apoptoseresistenz auch für eine erhöhte Proliferationsrate von Tumorzellen mitverantwortlich. In der Tat konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass Veränderungen im Aktivitätszustand von Stat-Molekülen, vor allem Stat3 und Stat5, ursächlich an der Krebsentstehung und Tumorprogression beteiligt sind (Buettner et al. 2002; Yu and Jove 2004). Eine konstitutive Aktivierung dieser Stat-Moleküle konnte in zahlreichen Tumorzelllinien, aber auch in humanen Tumorerkrankungen sowohl des hämatopoetischen Systems, wie Leukämien, multiplen Myelomen, als auch in soliden Tumoren wie Gehirn-, Brust- und Prostata Tumoren sowie Melanomen nachgewiesen werden (Bowman et al. 2000). Weitere molekularbiologische Hinweise für die Rolle von Stat3 bei der Tumorentstehung konnten durch die Generierung einer Stat3-Mutante gewonnen werden, die permanent als funktionell aktives Dimer vorliegt (Stat3C). Dies erfolgte durch das Ersetzen von Alanin 661 und Asparagin 663 durch Cysteine, wodurch die Dimerisierung zweier Stat3-Moleküle induziert wird. Durch die stabile Expression dieser Stat3C-Mutante in Ratten 3Y1 Fibroblasten konnte in Weichagar-Experimenten Kolonienwachstum detektiert werden, ein erster Hinweis darauf, dass die konstitutive Aktivierung von Stat3 einen transformierenden Einfluss auf Zellen hat. Darüber hinaus induzierten 3Y1-Zellen, die die Stat3C-Mutante stabil exprimierten, in Balb-c/nu/nu-Mäusen Tumoren (Bromberg et al. 1999). Diese Untersuchungen demonstrierten eindrucksvoll, dass Stat3 zu der Familie der nukleären Onkogene gezählt werden kann.

Die Fähigkeit von Tumorzellen sich unkontrolliert zu vermehren und Resistenz gegenüber apoptotischen Signalen aufzuweisen sind die Voraussetzungen, aber nicht ausreichend für die Entstehung von Krebs. So sind wachsende Tumore auf eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff angewiesen. Diese Versorgung ist nur gewährleistet, wenn es im Tumorgewebe zur Neovaskularisierung, d. h. der Entstehung von neuen Blutgefäßen, kommt. Das potenteste Angiogenese-induzierende Molekül ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF (*engl.*: vascular endothelial growth factor). VEGF bindet an seinen Rezeptor, der spezifisch auf Endothelzellen exprimiert wird. Über die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden wird in Endothelzellen Migration und Proliferation induziert, eine Voraussetzung für die Entstehung neuer Blutgefäße (Veikkola et al. 2000). Bereits publizierte Daten zeigen, dass Stat3 die Expression von VEGF induziert

und in Tumorzellen, die eine Hyperaktivierung von Stat3 aufweisen, VEGF eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Neoangiogenese von Tumoren spielt (Abb. 1.3.) (Wei et al. 2003a; 2003b).

Neueste Untersuchungen belegen darüber hinaus, dass die konstitutive Aktivierung von Stat3 in Tumorzellen, diese vor Attacken des Immunsystems schützt (Abb. 1.3.). So supprimiert die konstitutive Aktivierung von Stat3 einerseits die Produktion von pro-inflammatorischen Signalmolekülen (z. B. IL-6) und induziert andererseits die Synthese von verschiedensten Faktoren, die die Differenzierung und Reifung (Maturation) von dendritischen Zellen hemmt (z. B. IL-10) (Wang et al. 2004).

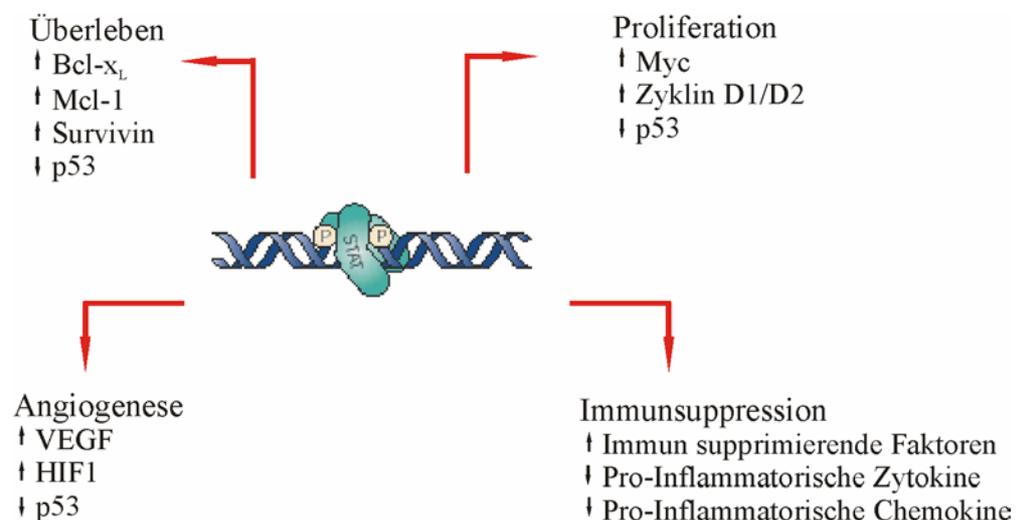


Abb. 1.3. Rolle der Stat-Proteine bei der Tumorentstehung

Tumorprogression basiert auf der Fähigkeit von Tumorzellen sich unkontrolliert vermehren zu können, resistent gegen apoptotischen Signalen zu sein, verstärkte Angiogenese im Tumorgewebe zu induzieren und das Immunsystem zu umgehen. Vor allem Stat3, das in zahlreichen Tumoren hyperaktiv ist, ist in der Regulation all dieser malignen Prozesse beteiligt. Sowohl Stat5 als auch Stat3 sind an der verstärkten Expression von Genen beteiligt, die für die Proliferation (Myc, Cyklin D1/D2) und das Überleben (Bcl-x_L, Mcl-1, Survivin) der Zellen nötig sind. Darüber hinaus inhibiert Stat3 die Expression von p53. Als ein Schlüsselaktivator für die Synthese des vaskulären epidermalen Wachstumsfaktors (VEGF) aktiviert der Stat3-Signalweg die Angiogenese in Tumoren. Des Weiteren fördert Stat3 die Tarnung der Tumorzellen vor dem Immunsystem, einerseits dadurch, dass es die Expression von Pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen hemmt und andererseits durch die verstärkte Synthese von Faktoren, die die Maturation von Immunzellen supprimieren (verändert nach Yu and Jove 2004).

Stat-Proteine, vor allem Stat3 und Stat5, spielen somit eine wichtige Rolle in der transkriptionellen Regulation von Genen, deren Genprodukte eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung und –progression zugeschrieben werden. Hierzu gehören Proteine, die

die Zellproliferation (z. B. Cyklin D1/D2) sowie die Neovaskularisierung (VEGF) aktivieren, die Apoptose (Bcl-x_L, Survivin) inhibieren, sowie das Immunsystems modulieren, so dass Tumorzellen von Immunzellen nicht erkannt werden.

Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahren demonstrieren, dass die Inhibition des Stat3- bzw. Stat5-Signalweges in Tumorzellen zu einem langsameren Wachstum und/oder einer verstärkten Apoptose, sowie zu einer Reduzierung der Neoangiogenese im Tumorgewebe führt (Grandis et al. 1998; Catlett-Falcone et al. 1999; Niu et al. 1999; Grandis et al. 2000a; Horita et al. 2000; Ni et al. 2000; 2002; Wei et al. 2003a; 2003b; Wang et al. 2004). Darüber hinaus induziert die Hemmung des Stat3-Signalweges in Tumorzellen die Produktion von pro-inflammatorisch wirkenden Zytokinen und Chemokinen. Diese wiederum aktivieren Zellen des angeborenen Immunsystems, die weitere immunologisch stimulierende Botenstoffe, wie TNF- α oder NO, produzieren, wodurch die immunologische Antwort gegen Tumorzellen verstärkt ausgelöst wird. Des Weiteren bewirken diese Botenstoffe, dass dendritische Zellen aktiviert werden. Da dendritische Zellen als entscheidendes Bindeglied zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem gelten, hat ihre Stimulierung die Aktivierung von Antigen-spezifischer-T-Zellen zur Folge. Durch die Hemmung des Stat3-Signalweges in Tumorzellen wird somit die körpereigene Abwehr aktiviert und damit die immunologische Antwort gegen den Tumor verstärkt.

Bisherige Ansätze zur Interferenz mit dem Stat3-Signalweg umfassen genterapeutische Ansätze, Peptide und Peptido-mimetische Moleküle sowie chemische Verbindungen. Bei den genterapeutischen Ansätze wurden die Transfektion von antisense, siRNA, Decoy-Oligonukleotiden und einer dominant-negativen-Stat3-Mutante angewandt (Grandis et al. 1998; Catlett-Falcone et al. 1999; Niu et al. 1999; Turkson and Jove 2000; Frank 2003; Konnikova et al. 2003; Leong et al. 2003; Yu and Jove 2004; Lee et al. 2004). Durch den Einsatz von Stat3-antisense bzw. -siRNA kommt es zum gezielten Abbau der für Stat3 kodierenden RNA, wodurch die zelluläre Konzentration des Stat3-Proteins reduziert wird. Die Transfektion von Decoy-Oligonukleotiden, bei denen es sich um kurze doppelsträngige DNA-Moleküle mit Stat3-Bindungsstellen handelt, führt dazu, dass dimerisierte Stat3-Moleküle an die Decoy-Oligonukleotiden binden. Bei einer ausreichenden hohen Anzahl dieser Oligonukleotide stehen keine Stat3-Dimere mehr für die Bindung an die Promotoren zur Verfügung und dadurch wird die Expression von Stat3-Zielgenen, die eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression spielen, reduziert (Leong et al. 2003). Ein anderer Mechanismus liegt der Wirkungsweise der dominant-negativen-Stat3-Mutante zugrunde. Diese Mutante, bei der die Transaktivierungsdomäne deletiert ist, bindet an die

Promotorregionen von Stat3-Zielgenen, kann jedoch aufgrund der fehlenden Transaktivierungsdomäne die Transkriptionsmaschinerie nicht rekrutieren, wodurch die Expression der Stat3-Zielgene unterbleibt. Durch die Transfektion dieser dn-Stat3-Mutante in murine B16-Tumore konnte erstmals *in vivo* gezeigt werden, dass Stat3 ein geeignetes Zielprotein für die Tumorthherapie darstellt (Niu et al. 1999).

Weitere Methoden basieren auf der direkten Inhibition der Stat3-Dimerbildung durch Phospho-Peptide und deren chemische Modifikationen (peptido-mimetische Verbindungen) (Turkson et al. 2001; 2004). Die aus der Sequenz von Stat3 abgeleiteten Phospho-Peptide verhindern die Stat3-Phosphotyrosin-SH2-Interaktion, blockieren dadurch die Dimerisierung und DNA-Bindung von Stat3. Eines dieser Phospho-Peptide konnte durch chemische Modifikation weiter optimiert werden und stellt eine peptido-mimetische Verbindungen dar, die in Stat3-abhängigen Tumorzellen Apoptose induziert (Turkson et al. 2004)

Des Weiteren sind chemische Inhibitoren bekannt, die die Aktivierung der Stat-Moleküle inhibieren, indem die Stat-aktivierenden Kinase blockiert (z. B. der JAK2-Kinase-Inhibitor AG490) oder aber wie bei JSI-124, ein Stoff aus Kürbisgewächsen (Cucurbitacea), direkt die Phosphorylierung von Stat3 inhibiert wird (Meydan et al. 1996; Burke et al. 2001; Blascovich et al. 2003). Untersuchungen mit diesen Inhibitoren zeigten, dass das Wachstum von Stat3-abhängigen Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* inhibiert werden kann, wohingegen bei nicht Stat3-abhängigen Tumorzellen keine Beeinflussung der Proliferationsrate, bzw. in nicht-transformierten hämatopoetischen Zellen keine Veränderung des Differenzierungspotentials, festgestellt werden konnte.

Basierend auf diesen Beobachtungen, wurde zu Beginn der vorliegenden Arbeit Stat3 als hervorragendes „molekulare Target“ für die Entwicklung neuer spezifischer Tumorthapeutika postuliert (Turkson and Jove 2000; Buettner et al. 2002; Yu and Jove 2004).

1.5. Peptid-Aptamere: neue Modellstrukturen zur Tumorthherapie

Eine neue Klasse von potentiell therapeutisch einsetzbaren Bio-Molekülen stellen Peptid-Aptamere dar. Das Wort Aptamer leitet sich aus den griechischen Wörtern *apt* = passen und *meros* = Teilchen ab. Peptid-Aptamere sind kurze Oligopeptide, die aus Aminosäuresequenzen zufälliger Reihenfolge bestehen und über diese variable Peptidomäne eine Affinität zu einem gegebenen Zielprotein herstellen. Sie interagieren dabei ähnlich wie

Antikörper *in vitro* und *in vivo* mit ihrem jeweiligen Bindungspartner und haben durch diese Bindung das Potential dessen Funktion zu beeinflussen.

Im vorliegenden Projekt erfolgte die Integration der Oligopeptide in ein Gerüstprotein („Scaffold“). Die Integration der Peptid-Aptamere in ein Gerüstmolekül hat mehrere Vorteile gegenüber linearen Peptid-Aptameren (Hoppe-Seyler and Butz 2000):

- Durch die Integration der Peptid-Aptamersequenzen erfolgt die Expression der Oligopeptide in einer eingeschränkten, stabilen Konformation („constrained conformation“).
- Aufgrund ihrer stabilen Konformation haben Peptid-Aptamere, die in Gerüstmolekülen exponiert werden, oft eine höhere Bindungsaffinität als lineare Peptid-Aptamere (Ladner 1995).
- Hydrophobe Aminosäuren können an der Oberfläche des Scaffold-Moleküls präsentiert werden, während diese bei linearen Peptiden im Inneren des Moleküls zu finden sind.
- Die stabile Konformation des integrierten Peptid-Aptamers kann genutzt werden, um seine Kristallstruktur, die der biologisch-aktiven Form des Peptides entspricht, zu charakterisieren. Diese Information kann dann als Leitstruktur für die Herstellung einer chemischen, peptido-mimetischen Verbindung dienen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das bakterielle Thioredoxinprotein als Gerüstmolekül verwendet. Das Thioredoxinprotein, dessen Struktur 1995 erstmals beschrieben wurde, besteht aus fünf β -Faltblättern (drei parallelen und 2 anti-parallelen), die von vier α -Helices umgeben sind (Holmgren 1995). Diese Struktur gibt dem Enzym eine sehr stabile Konformation. Das katalytisch aktive Zentrum des Enzyms ist zwischen dem β_2 -Faltblatt und der α_2 -Helix lokalisiert. Die Integration der Peptid-Aptamere erfolgte in das katalytisch aktive Zentrum des bakteriellen Thioredoxinproteins, dadurch wird die katalytische Aktivität des Enzyms zerstört, die Konformation des Proteins bleibt jedoch erhalten. Durch diese Integrationsstelle wird gewährleistet, dass die inserierten Peptidsequenzen an der Oberfläche des Thioredoxin-Moleküls präsentiert werden (Abb. 1.4.).

Die Identifikation der Interaktion von Peptid-Aptameren mit einem Zielprotein basiert auf einem modifizierten Hefe-zwei-Hybrid-System. In der vorliegenden Arbeit sollte durch den Einsatz dieses *in vivo* Screening-Systems die besten Voraussetzungen geschaffen

werden, um Peptid-Aptamere zu isolieren, die in der Lage sind *in vivo* mit Stat3 zu interagieren und dadurch mit der Funktion von Stat3 zu interferieren.

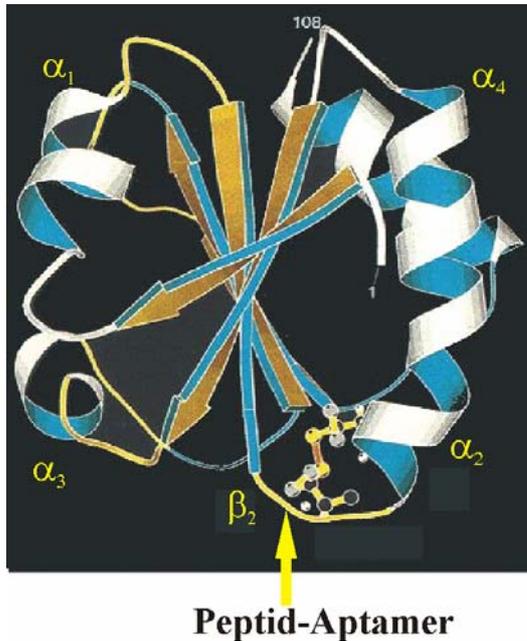


Abb. 1.4. Dreidimensionale Struktur des Thioredoxin-Proteins mit integriertem Peptid-Aptamer

Das Thioredoxin-Protein setzt sich aus fünf β -Faltblättern und vier α -Helices zusammen. Das aktive Zentrum ist zwischen dem β_2 -Faltblatt und der α_2 -Helix lokalisiert und ragt aus der dreidimensionalen Struktur des Proteins heraus. Bei der Generierung der Peptid-Aptamer-Bibliothek erfolgte die Integration der randomisierten Peptidsequenzen in den Bereich des aktiven Zentrums. Dadurch wird gewährleistet, dass die inserierten Aminosäuren in das umgebende Medium exponiert werden (verändert nach Holmgren 1995).

1.6. Das Hefe-zwei-Hybrid-System als Grundlage zur Identifikation von Peptid-Aptamer-Protein-Interaktionen

Das Hefe-zwei-Hybrid-System hat sich in den vergangenen Jahren als außerordentlich wertvolles Werkzeug zur Identifikation von Protein-Protein-Wechselwirkungen erwiesen. Die Methode nutzt den modularen Aufbau eukaryontischer Transkriptionsfaktoren aus. Eukaryontische Transkriptionsfaktoren weisen mindestens zwei unterschiedliche Domänen, eine DNA-Bindedomäne (DBD) und eine Transaktivierungsdomäne (TAD), auf, die nicht notwendigerweise innerhalb einer Polypeptidkette lokalisiert sein müssen, um ihre Funktion bei der Transkription zu erfüllen. Allerdings kann jede Domäne für sich alleine die Aktivierung der Transkription nicht bewirken. Erst durch die unmittelbare räumliche Nachbarschaft können sie sich in ihren funktionellen Eigenschaften komplementieren. Aus diesem Grund kann die Transkription eines Selektionsmarkers als Reporter genutz werden, um die Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen, wovon eines als Fusionskonstrukt mit der DNA-Bindedomäne und das andere Fusionsprotein mit der Transaktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors exprimiert wird, nachzuweisen. Die am häufigsten genutzten Domänen entstammen dem Galaktosidase4 (Gal4)-Trans-

kriptionsfaktor. Reportergene (Selektionsmarker), die eine Gal4-DNA-Bindungsdomäne in ihrem Promotor besitzen, können dann zur Selektion interagierender Proteindomänen genutzt werden. Solche Selektionsmarkergene kodieren häufig für Enzyme, die eine Schlüsselstelle bei der Biosynthese von Aminosäuren einnehmen, die für das Hefewachstum essentiell sind (z. B. Adenin-, Uracilsynthese).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein modifiziertes Hefe-zwei-Hybrid-System verwendet, um die Interaktion von Peptid-Aptameren mit einem Zielprotein zu identifizieren. Hierfür wurde ein Interaktionspartner mit der DNA-Bindungsdomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors fusioniert. Dieses Fusionskonstrukt, dessen Transkription von dem ADC1 Promotor reguliert wird, wurde in einem Hefe-zwei-Hybrid-Screen als „Köder“ („bait“) eingesetzt werden (Abb. 1.5A.). Während in „klassischen“ Screens mittels Hefe-zwei-Hybrid-Systemen eine cDNA-Bibliothek als Beute („prey“) zum Einsatz kommt, wurde in der vorliegenden Arbeit eine künstlich generierte Peptid-Aptamer-Bank als Bibliothek verwendet. Hierfür wurde die Gal4-Transaktivierungsdomäne mit dem bakteriellen Thioredoxin-(Trx)-Protein fusioniert (Butz et al. 2000). In die Sequenz, die für das katalytisch aktive Zentrum des Thioredoxins kodiert, wurden die zufallsgenerierten (randomisierten) Sequenzen, die für 20 Aminosäuresequenzen kodieren, inseriert (Abb. 1.4. und 1.5B.).

Durch die Definition der Codonusage NNK (N: A, T, C und G; K: G und C) wurde die Anzahl der möglichen Stopcodons von drei auf eins reduziert. Diese Peptid-Aptamer-Bibliothek („prey“) wurde, wie der in der vorliegenden Arbeit verwendete Hefestamm KF1, von dem Labor um F. Hoppe-Seyler (Heidelberg) zur Verfügung gestellt (Butz et al. 2000). Durch die Interaktion von „bait“ und „prey“ wird ein vollständiger Gal4-Transkriptionsfaktor regeneriert, der an einen Gal4-Promotor binden und auch die Transkription des nachgeschalteten Selektionsmakergenes induzieren kann (Abb. 1.5A., unten.).

Der verwendete Hefestamm erlaubte den Einsatz von drei Selektionsmarkern (Adenin2 (ADE2), Histidin3 (HIS3) und Uracil3 (URA3)), die jeweils unter der Kontrolle von verschiedenen Gal4-Promotoren mit unterschiedlicher Affinität für den GAL4-Transkriptionsfaktor stehen (Butz et al. 2000). Das *his*-Gen wird basal transkribiert und kann durch die Zugabe von 3-Aminotriazol kompetitiv gehemmt werden. Der SPO13-Promotor des Gens *ura3* enthält zusätzlich ein negativ-regulatorisches Element, sodass die Transkription nur durch eine starke Protein-Protein-Interaktion der „bait-“ und „prey-“ Konstrukte erfolgen kann. Durch den Einsatz der drei Gal4-Promotoren, die jeweils ein

anderes Reportergen regulieren kann die Anzahl der falsch-positiven Klone im Hefe-zwei-Hybrid-Screen minimiert werden (Fields and Sternglanz 1994).

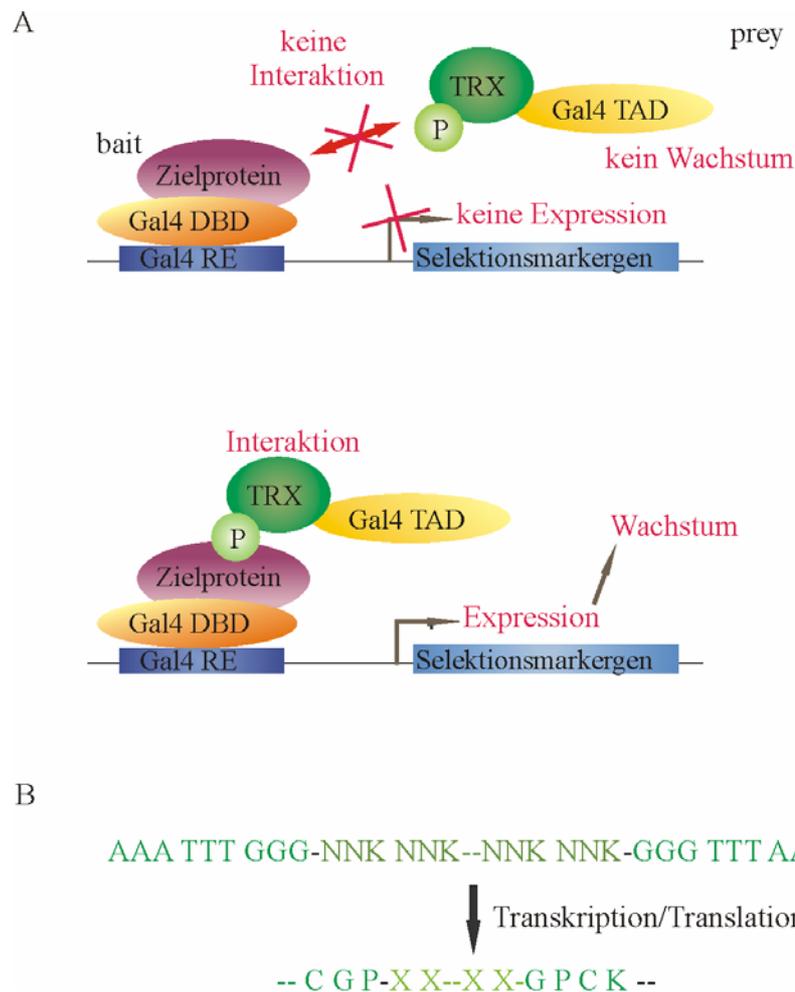


Abb. 1.5. Schema zur Selektion von Peptid-Aptameren im Hefe-zwei-Hybrid-System

A: Das Zielprotein wird mit der Gal4-DNA-Bindedomäne (Gal4-DBD), die Peptid-Aptamer-Bank mit der Gal4-Transaktivierungsdomäne (Gal4-TAD) fusioniert. Bei fehlender Interaktion der beiden Proteine erfolgt keine Transkription des Selektionsmarkergenes, wodurch die Hefen in ihrem Wachstum gehemmt sind (oben). Durch die Interaktion zwischen dem Bait-Konstrukt und dem Prey-Konstrukt wird ein funktionsfähiger Transkriptionsfaktor rekonstituiert. Dadurch wird die Expression eines Selektionsmarkergenes eingeleitet und ermöglicht das Wachstum der Hefen unter Selektionsbedingungen (unten). B: Die Integration der randomisierten Nukleotidsequenzen (NNK; hellgrün) erfolgte in die kodierende Sequenz für das katalytische Zentrum von Thioredoxin (dunkelgrün). Nach der Transkription/Translation werden die randomisierten Aminosäuresequenzen (XXX; hellgrün) an der Oberfläche von Thioredoxin exprimiert, wodurch eine Interaktion von Peptid-Aptamer mit dem Zielprotein im Hefe-zwei-Hybrid-System ermöglicht wird.

In der Literatur gibt es zahlreiche Beispiele dafür, dass durch den Einsatz des Hefe-zwei-Hybrid-Systems Peptid-Aptamere identifiziert werden konnten, die spezifisch mit ihren

Zielproteinen interagieren und darüber hinaus in der Lage sind, mit deren zellulären Funktionen zu interferieren. So konnten in unserem Labor Peptid-Aptamere isoliert werden, die spezifisch mit dem EGFR interagieren und dadurch die Proliferation von Tumorzellen reduzieren (Buerger et al. 2003). Darüber hinaus konnten auch Peptid-Aptamere identifiziert werden, die die Aktivität der Cyklin-abhängigen Kinase Cdk2 in humanen Zellen (Colas et al. 1996; Cohen et al. 1998) und der DmCdk1 und DmCdk2 in der Fruchtfliege *Drosophila* inhibieren (Kolonin and Finley, Jr. 1998). Nicht nur Proteine von eukaryotischen Zellen, sondern auch virale Proteine können in ihrer Funktion durch Peptid-Aptamere gehemmt werden. So konnte in der Arbeitsgruppe um F. Hoppe-Seyler ein Peptid-Aptamer identifiziert werden, das spezifisch an das Hepatitis B-Virus Kernprotein bindet und dadurch die virale Replikation inhibiert (Butz et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Peptid-Aptamer-Technologie verwendet werden kann, um die Funktion des Transkriptionsfaktors Stat3 zu inhibieren. Darüber hinaus sollte analysiert werden, ob die Peptid-Aptamer Technologie es ermöglicht, spezifische Inhibitoren für singuläre funktionelle Domänen eines Zielproteins zu identifizieren, ohne dass dabei die Funktion von benachbarten Domänen beeinflusst wird.

Aufgrund der Beobachtungen, dass Peptid-Aptamere eine spezifische, inhibitorische Funktion auf zelluläre Prozesse ausüben und dadurch phänotypische Veränderungen in den Zellen induzieren können, wird ihnen ein großes therapeutisches Potential zugeschrieben (Hoppe-Seyler and Butz 2000). Dabei sind für die therapeutische Applikation mehrere Strategien denkbar. Zum einen können die kodierenden Sequenzen mittels Gentransfer in Zellen eingebracht werden. Des Weiteren kann die stabile Konformation des integrierten Peptid-Aptameres genutzt werden, um seine Kristallstruktur zu charakterisieren. Die Struktur des Peptid-Aptamers kann anschließend als Leitstruktur zur Herstellung von chemischen, peptido-mimetischen Verbindungen dienen. Diesen peptido-mimetischen Substanzen werden pharmakologisch bessere Eigenschaften als Peptiden zugesprochen. Darüber hinaus gibt es mittlerweile auch Ansätze Proteine direkt als Therapeutika einzusetzen (Matsui et al. 2003). Diese Methode der „Protein-Therapie“ basiert auf der Beobachtung, dass Proteine, Peptide oder andere chemisch aktive Substanzen durch die Fusion mit einer Proteintransduktionsdomäne (PTD) durch die Zellmembran in Zellen aufgenommen werden und im Zytoplasma ihre Funktionalität wieder erlangen. Als Proteintransduktionsdomäne werden beispielsweise das TAT-Protein des HIV (human immuno-deficiency Virus) oder aber, wie in der vorliegenden Arbeit, poly-Arginine eingesetzt (Frankel and Pabo 1988; Green and Loewenstein, 1988; Wender et al. 2000).

1.7. Proteintransduktion als neue Methode zur therapeutischen Applikation von Peptiden

Die Zellmembran besteht aus einer Lipid-Doppelschicht, in die Protein und Glykoproteine integriert sind. Der hydrophobe Charakter dieser Lipidschicht macht Membranen für die meisten Proteine nicht permeabel. Somit war die Einschleusung von Proteinen in Zellen in der Regel nicht möglich. Im Jahre 1988 entdeckten jedoch zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, dass das TAT-Protein von HIV in der Lage ist Zellmembranen zu durchdringen (Frankel and Pabo 1988; Green and Loewenstein, 1988). Erstmals gelang es vor zehn Jahren ein heterologes Protein, fusioniert mit einem Teil des TAT-Proteins in Zellen zu transduzieren (Fawell et al. 1994). In den letzten Jahren konnten auch in anderen natürlich vorkommenden Proteinen Proteintransduktionsdomänen identifiziert werden, die für den oben beschriebenen Transfer einsetzbar sind (Tab. 1.1). Hierzu gehören beispielsweise die Homeodomäne von Antennapedia aus *Drosophila* (Joliot et al. 1991) oder das VP22-Protein des Herpes Simplex Virus (Elliot and O'Hare 1997). Alle bisher gefundenen Proteintransduktionsdomänen zeichnen sich durch das Vorkommen zahlreicher basischer Aminosäuren (Arginin und Lysin) aus.

PTD	Aminosäuresequenzen
HIV-1 TAT	Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg
HSV VP22	Asp-Ala-Ala-Thr-Ala-Thr-Arg-Gly-Arg-Ser-Ala-Ala-Ser-Arg-Pro-Thr-Glu-Arg-Pro-Arg-Ala-Pro-Ala-Arg-Ser-Ala-Ser-Arg-Pro-Arg-Arg-Pro-Val-Glu
Antennapedia	Arg-Gln-Iso-Lys-Iso-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys

Tab. 1.1. Aminosäuresequenzen natürlich vorkommender Proteintransduktionsdomänen (PTDs)

Alle bisher bekannten natürlich vorkommenden PTDs bestehen aus basischen Aminosäuren wie Arginin (rot) und Lysin (grün). Die minimale TAT-Transduktionsdomäne sind die basischen Aminosäuren 47-55. Im Herpes Simplex Virus (HSV) ist die Region 267-300 des VP22-Proteins für die Transduktion verantwortlich. Die PTD des Antennapedia-Protein von *Drosophila* umfasst die dritte Helix, die die Aminosäuren 43-58 beinhaltet (verändert nach Schwarze et al. 2000).

Neben den natürlich vorkommenden Proteintransduktionsdomänen konnten in den letzten Jahren auch Sequenzen generiert werden, die weitaus höhere Transduktions-

eigenschaften aufweisen. So zeigen jüngste Untersuchungen, dass Proteine fusioniert mit 9-L-Argininen 20-fach besser in Zellen transduziert werden können als ein TAT-Fusionsprotein (Wender et al. 2000). Darüber hinaus konnte in dieser Arbeitsgruppe auch gezeigt werden, dass Proteintransduktionsdomänen bestehend aus 9-D-Argininen noch effizienter die zelluläre Aufnahmen von Fusionsproteinen vermitteln (Wender et al. 2000). Da sich jedoch nur die L-Isomere der Aminosäuren rekombinant in Bakterien exprimieren lassen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Proteintransduktionsdomäne bestehend aus 9-L-Argininen verwendet.

Der Mechanismus dem die Proteintransduktion durch die Zellmembran zu Grunde liegt ist bislang noch nicht geklärt. Neueste Untersuchungen favorisieren Makropinocytose als Aufnahmemechanismus der an Transduktionsdomänen fusionierten Proteine (Wadia et al. 2004). Unabhängig von dem Mechanismus der Aufnahme in Zellen gibt es zahlreiche Beispiele die zeigen, dass nach der Einschleusung eines Proteins in Zellen mittels Proteintransduktion, das Protein intrazellulär biologisch aktiv vorliegt. So wurde beispielsweise durch die Fusion der Proteintransduktionsdomäne TAT an den Cdk-Inhibitor p27^{Kip} die Zellmigration induziert (Nagahara et al. 1998). Des Weiteren konnte zwei Stunden nach Transduktion eines Fusionsproteins aus TAT und β -Galaktosidase eine enzymatische β -Galaktosidase-Aktivität in den transduzierten Zellen nachgewiesen werden (Schwarze et al. 1999). Diese Ergebnisse bildeten die Basis für weiterführende Untersuchungen, die klären sollten inwieweit Proteine, fusioniert an Proteintransduktionsdomänen, therapeutisch einsetzbar sind. In Tumorzellen konnte durch die Applikation von p27-TAT sowie in einem weiteren Ansatz von PS2-TAT das Tumorzellwachstums reduziert werden (Snyder et al. 2003; Katterle et al. 2004). Darüber hinaus konnte durch den Einsatz von TAT-I κ ^{B46-317} in Osteoklasten die Osteogenese inhibiert werden (Abu-Amer et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit sollte die Möglichkeit der Anwendung der Proteintransduktion von Peptid-Aptameren fusioniert mit neun Argininen näher evaluiert werden. Hierfür sollten gegen Stat3 gerichtete Peptid-Aptamere in Tumorzellen eingeschleust werden. Anschließend sollte untersucht werden inwieweit das transduzierte Peptid-Aptamer das Überleben der Tumorzellen in Zellkulturexperimenten beeinflusst.

Studien an Tiermodellen zeigten, dass die Methode der Proteintransduktion auch in *in vivo* Systemen funktionell ist. So konnten in einem Mausmodell Gliomazellen für apoptotische Stimuli durch die lokale Behandlung mit Smac-TAT sensitiviert werden (Fulda et al. 2002). In einem anderen Ansatz konnte durch die Applikation von p53 fusioniert an eine Proteintransduktionsdomäne die Überlebensrate von Mäusen mit peritonealem

Carcinom deutlich erhöht werden (Snyder et al. 2004). Bereits publizierte Daten zeigen, dass sich die Methode der Proteintransduktion auch zur systemischen Applikation von therapeutisch einsetzbarem Protein eignet, wodurch sie eine attraktive Alternative zu gentherapeutischen Ansätzen liefert. In *in vivo* Experimenten in der Maus verteilte sich ein TAT- β -Galaktosidase-Fusionsprotein nach intraperitonealer Injektion in nahezu allen Geweben der Maus, und kann darüber hinaus die Blut-Hirn-Schranke passieren und dort seine enzymatische Aktivität entfalten (Schwarze et al. 1999). Zudem konnte die therapeutische Anwendungsmöglichkeit der Proteintransduktion in einem Mausmodell für zerebrale Ischämie nach systemischer Applikation der Peptide fusioniert an eine Proteintransduktionskaskade eindrucksvoll demonstriert werden (Asoh et al. 2002; Cao et al. 2002). Die Möglichkeit einer *in vivo* Applikation von Peptid-Aptameren fusioniert an eine Proteintransduktionsdomäne aus 9-Argininen in der Maus sollte in der vorliegenden Arbeit evaluiert werden.

1.8. Ziel der Arbeit

Vorrangiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es Peptid-Aptamere zu identifizieren, die in der Lage sind die Funktion des als Onkogen wirkenden Transkriptionsfaktors Stat3 zu inhibieren. Im Folgenden sind die wichtigsten Schritte zum Erreichen des gesteckten Ziels aufgeführt:

- Identifikation von Peptid-Aptameren, die spezifisch Stat3 interagieren.
- Verifizierung der Interaktion von isolierten Peptid-Aptameren und Stat3 *in vitro*.
- Aufklärung der molekularen Wirkungsmechanismen, die der Inhibition des Stat3-Signalweges durch die Peptid-Aptamere zugrunde liegen.
- Validierung der Funktionalität der identifizierten Peptid-Aptamere in Tumorzellen mit konstitutiv-aktivem Stat3 und Erstellen einer Dosis-Wirkungsbeziehung in Tumorzellen.
- Evaluation der zellulären Applikation von Peptid-Aptameren mittels Proteintransduktion.
- Untersuchung des wachstumshemmenden Effekts der transduzierbaren Peptid-Aptamere im Tumormodell der Maus (*Mus musculus*).

Im ersten Schritt sollte als Methode zur Identifikation der mit Stat3 interagierenden Peptid-Aptamere ein modifiziertes Hefe-zwei-Hybrid-System zur Anwendung kommen. Dabei

sollten durch den Einsatz speziell ausgewählter Bait-Konstrukte Peptid-Aptamere isoliert werden, die spezifisch mit unterschiedlichen funktionellen Domänen des Transkriptionsfaktors Stat3 interagieren.

Nach der Verifizierung der spezifischen Interaktion der isolierten Peptid-Aptamere und Stat3 *in vitro* war in den nächsten Schritten das Ziel die funktionelle Relevanz der isolierten Peptid-Aptamere bei der Inhibition des Stat3-Signalweges zu analysieren. Dabei sollten zunächst in einem Zellsystem die molekularen Wirkungsmechanismen, die der Inhibition des Stat3-Signalweges durch die Peptid-Aptamere zugrunde liegen, analysiert werden.

Im nächsten Schritt war geplant den Einfluss der isolierten Peptid-Aptamere in Tumorzelllinien mit konstitutiv-aktivem Stat3 zu evaluieren. Hierbei sollten zunächst Transfektionsexperimente Einblicke über den Einfluss der isolierten Peptid-Aptamere auf die transkriptionelle Aktivität von Stat3 und das Apoptoseverhalten der transfizierten Tumorzellen geben.

Neben der herkömmlichen Transfektionsmethode sollte als zweite Möglichkeit die Methode der Proteintransduktion, die das Einbringen von rekombinant exprimierten Proteinen in Zellen ermöglicht, für die Applikation der Peptid-Aptamere eingesetzt werden. Dabei sollte auch die Funktionalität des am potentiell wirksamsten Peptid-Aptamers in einer weiteren Stat3-abhängigen Tumorzelllinie näher analysiert werden. Hierbei sollte ein Dosis-abhängiger Zusammenhang zwischen der Überlebensrate von Stat3-abhängigen Tumorzellen (murine B16 und humane U266-Zellen) und appliziertem Peptid-Aptamer hergestellt werden. Darüber hinaus sollte der Einfluss des Peptid-Aptamers auf die Überlebensrate von in ihrem Wachstum nicht-Stat3-abhängigen Tumorzellen analysiert werden. Anschließend an diese funktionellen Analysen sollte der durch das isolierte Peptid-Aptamer ausgelöste Signalweg, der die Einleitung des programmierten Selbstmordes der Stat3-abhängigen Tumorzellen induziert, charakterisiert werden.

Um fundierte Therapieansätze vorzubereiten, sollte im abschließenden Projektteil die Wirksamkeit eines transduzierbaren Peptid-Aptamers in einer *in vivo* Applikation in einem Tiermodell näher analysiert werden. Für diesen tierexperimentellen Ansatz sollten B16-Tumorzellen verwendet werden, die nach subkutaner Injektion in Mäusen lokale Tumoren bilden. Durch intratumorale Injektion des isolierten Peptid-Aptamers sollte der wachstumshemmende Effekt in einem Tumormodell der Maus (*Mus musculus*) ermittelt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Grundchemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck, Fluka und Sigma bezogen. Restriktionsenzyme, weitere Enzyme der Molekularbiologie (z.B. T7-Polymerase), sowie Größenstandards für DNA-Fragmente stammen von New England BioLabs. Molekulargewichtsmarker für Proteine, sowie der Protein Assay Kit (Bradford) zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurden bei BioRad bezogen. Bestandteile von Nährmedien zur Anzucht von Hefen wurden bei der Firma BIO101 gekauft, während Nährmedien für diverse Zelllinien in der Zellkultur von Life Technologies bezogen wurden. Plastikwaren für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner, Costar, Beckton Dickinson oder Schleicher & Schuell bezogen.

2.1.2. Lösungen und Puffer

DNA-Gel Ladepuffer (6x):	Ficoll	15%
	EDTA	25 mM
	Bromphenolblau	
PBS (1x):	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	4,3 mM
	KH ₂ PO ₄	1,4 mM
SOB-Medium	Trypton/Pepton	20g
	Hefeextrakt	5g
	NaCl	0,5g
	KCl	600 µl 4M
	Ad 990 ml H ₂ O	
	pH 7,0	autoklavieren
SOC-Medium	MgCl ₂	10 ml 1M
	SOB-Medium + Glukose (steril)	20 ml /l 1M
TE (1x)	Tris-HCl pH 7,4	10 mM
	EDTA	1 mM
TAE (1x)	Tris-Acetat	40 mM
	EDTA	1mM

2.1.3. Plasmide

2.1.3.1. Hefe-Expressionsvektoren

Name	Insert	Referenz
pAD Trx Library	Peptid-Aptamer Library inseriert in das Thioredoxingen fusioniert mit der Gal4-Aktivierungsdomäne	F. Hoppe-Seyler, Heidelberg
pPC97 -DD	Bait-Konstrukt: Teile der Dimerisierungsdomäne von Stat3 fusioniert mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne	diese Arbeit
pPC97 -DBD	Bait-Konstrukt: Teile der DNA-Bindedomäne von Stat3 fusioniert mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne	S. Abrell

2.1.3.2. Bakterielle Expressionsvektoren

Name	Insert	Referenz
pGex 4T3-Trx	GST fusioniert mit TrxA	F. Hoppe-Seyler, Heidelberg
pGex DD-1 pGex DD-2 pGex DD-3	GST fusioniert mit verschiedenen Peptid-Aptameren	diese Arbeit (Daten nicht gezeigt)
pET30-Trx-9R	Thioredoxin mit 9 Arginin-PTD und His-Tag	I. Wittig
pET30-DD-1-9R pET30-DD-2-9R pET30-DD-3-9R pET30-DBD-1-9R	Verschiedene Peptid-Aptamere mit 9 Arginin-PTD und His-Tag	diese Arbeit
pET30-DD-1-9R-SOCS pET30-DD-2-9R-SOCS pET30-DD-3-9R-SOCS	Verschiedene Peptid-Aptamere mit 9 Arginin-PTD; SOCS-Box und His-Tag	diese Arbeit (Daten nicht gezeigt)

2.1.3.3. Eukaryontische Expressionsvektoren

Name	Insert	Referenz
pRC/CMV-VP22-Trx	VP22-PTD fusioniert mit Thioredoxingen	F. Hoppe-Seyler, Heidelberg diese Arbeit
pRC/CMV-VP22-DD-1	Verschiedene Peptid-Aptamere fusioniert mit VP22- PTD	
pRC/CMV-VP22-DD-2		
pRC/CMV-VP22-DBD-1		
p β -Gal	β -Galaktosidase-Expressionsvektor	AG Groner
p α MG-luc	STAT3-Reporterkonstrukt: α -Macroglobulin Promotor fusioniert mit Luziferasegen	AG Groner

2.1.4. Primäre und HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper

Spezifität	Ursprung; eingesetzte Verdünnung	Hersteller
Bcl-x _L	Maus, monoklonal (1:1000; WB)	BD PharMingen (Heidelberg)
EGFR, extrazelluläre Domäne (Sc-120)	Maus, monoklonal (IP)	Santa Cruz Biotechnology (Frankfurt a. M)
EGFR (Sc-03)	Kaninchen, polyklonal (WB: 1:1000)	Santa Cruz Biotechnology (Frankfurt a. M)
gespaltene Caspase-3	Kaninchen, polyklonal (WB: 1:1000)	Cell Signaling, NEB
PARP	Maus, monoklonal (1 WB: 1:1000)	BD PharMingen (Heidelberg)
Trx	Kaninchen, polyklonal (WB; IF: 1:1000)	Sigma
p42/p44 P-S/T Phospho-Serin/Threonin spezifisch	Kaninchen, polyklonal (WB: 1:1000)	Cell Signaling, NEB (Frankfurt a. M)
p42/p44 (Erk1/2)	Kaninchen, polyklonal (WB: 1:1000)	Cell Signaling, NEB (Frankfurt a. M)

Spezifität	Ursprung; eingesetzte Verdünnung	Hersteller
PT (Phospho-Tyrosin spezifisch)	Kaninchen, polyklonal (WB: 1:1000)	Cell Signaling, NEB (Frankfurt a. M)
Stat-PY 705 (P-Stat3) Stat3-Phospho-Tyrosin spezifisch	Kaninchen, polyklonal (WB: 1:1000)	Cell Signaling, NEB (Frankfurt a. M)
Stat3	Kaninchen, polyklonal (WB: 1:1000; IF: 1:100)	Santa Cruz Biotechnology (Frankfurt a. M)
Aktin (C-11)	Ziege, polyklonal (WB: 1:2000)	Santa Cruz Biotechnology (Frankfurt a. M)
anti-Maus-HRP	Schaf, polyklonal (WB: 1:5000)	Amersham Bioscience
anti-Kaninchen-HRP	Esel, polyklonal (WB: 1:5000)	Amersham Bioscience
anti-Ziege-HRP	Esel, polyklonal (WB: 1:5000)	Amersham Bioscience
anti-rabbit- Alexa Fluor®-488	Ziege, polyklonal (IF: 1:400)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

2.1.5. *E.coli* Stämme und Anzuchtbedingungen

Stamm	Genotyp	Referenz
BL-21 (DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (cam ^R)	Novagen Inc.
DH10B	F ⁻ <i>mcrA(mrr-hsdRMS-mcrBC)φ80d lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA endA1 araD139 Δara,leu)7697 galU galK λrpsL nupG</i>	Life Technologies
XL-1 blue	SupE44, <i>hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac⁻, F'(proAB⁺, lac I^q, lac Z,Δ M15, Tn110 (tet^r))</i>	Sambrook et al. 1989

Plasmidhaltige Bakterien wurden über Nacht bei 37°C und 200 Umdrehungen/Minute in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angezogen. Die langfristige Lagerung der plasmidhaltigen Stämme erfolgte bei -80°C in LB-Medium mit 50% Glycerin.

2.1.6. Hefestamm und Anzuchtbedingungen

Die Anzucht der Hefen erfolgte in den entsprechenden Voll- oder Selektionsmedien bei 30°C für 24-30 Stunden. Die langfristige Lagerung erfolgte in YPDA-Medium mit 50% Glycerin bei -80°C.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>KF1</i>	<i>MATα trp1-901 leu2-3112 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ SPAL10-URA3</i>	Butz et al. 2000

2.1.7. Zelllinien und Medien

Zelllinie	Herkunft/Eigenschaften	Referenz
B16	murine Melanomzellen, konstitutiv-aktives Stat3	Niu et al. 1999
U266	Humane Myelomazellen, konstitutiv-aktives Stat3	Catlett-Falcone et al. 1999
RPMI 8226	Humane Myelomazellen	Catlett-Falcone et al., 1999
Herc	NIH3T3-Zellen stabil transfiziert mit humanem EGFR	Di Fiore et al. 1987
Herc-Trx	NIH3T3-Zellen stabil transfiziert mit	diese Arbeit
Herc-DD-1-C1/ C4/C10	humanem EGFR und Peptid-Aptameren (C = unterschiedliche Einzelklone)	Nagel-Wolfrum et al. 2004
Herc-DD-2-C1		
Herc-DBD-1-C1		

Die verwendeten Säugerzelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, mindestens zweimal pro Woche mit Trypsin (5 min, 37°C) abgelöst und mit frischem RPMI-Medium verdünnt wieder ausgesät. Dem Medium wurde 10% hitzein-aktiviertes fötales Kälberserum (FCS), 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugegeben. Die Kultivierung der stabil mit Peptid-Aptamer trans-fizierten Herc-Zellen erfolgte in komplettem RPMI-Medium mit 1 mg/ml G418. Die Langzeitaufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff in einem Medium aus FCS/10% DMSO.

2.1.8. Sequenzen verwendeter DNA-Oligomere

Die Oligonukleotide wurden bei MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) bestellt.

2.1.8.1. Oligonukleotide für Gelretardationsanalysen

SIEm67 (sis inducible element, aus dem c-fos Promotor)

5'-CATTTCCCGTAAATC-3'

2.1.8.2. Primer für Klonierungen der Stat3-Baitkonstrukte

Stat3-DBD Sal I: 5'-ACGCCGGTCGACCGCCTTCGTGGTGGAGCGGCAGCC-3'

Stat3-DBD Not I: 5'-ATTACGGCGGCCGCCAGCATGTTATACCACAGGATT-3'

Stat3-DD Sma I: 5'-CGACCCGGGAATGGGCTATAAGATCATG-3'

Stat3-DD Bgl II: 5'-GAGCGACTCAAACCTGCCCAAGATCTGAG-3'

2.2. Molekularbiologische Methoden

Falls nicht anders vermerkt, wurden gängige Methoden sowie die Rezepte für Puffer aus Sambrook et al. 1989, entnommen. Etwaige Modifikationen sind an entsprechender Stelle vermerkt.

2.2.1. Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten und zur Reinigung von PCR-Produkten eingesetzt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente zur Anode ist dabei proportional zur Größe, die anhand eines DNA-Längenstandards abgeschätzt werden kann. Es wurden in der Regel 1-%ige TAE-Gele verwendet (Auftrennungsbereich 0,5 - 6 kb), die mit 0,002% (v/v) Ethidiumbromid, das in die DNA interkaliert und unter UV-Bestrahlung Licht emittiert, versetzt wurden. Der Gellauf erfolgte in 1 x TAE-Puffer bei einer kontinuierlichen Spannung von 10 mV/cm Gellänge. Anschließend wurden die Fragmente unter UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht und mit einer Videokamera (Geldoc 2000; Biorad, München) photographiert.

2.2.2. Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Spezifische DNA-Segmente wurden mit einem GeneAmp 9600 amplifiziert. Die Reaktion wurde in einem 50 µl Ansatz bestehend aus DNA-Template, DNA-Polymerase-Puffer, je 50 pmol der entsprechenden Primer (3' und 5' Primer), 40 pmol des dNTP-Mix und 2 U DNA-Polymerase durchgeführt. Die Denaturierung der DNA-Matrize erfolgte für eine Minute bei 95°C, die Hybridisierung der Primer wurde bei einer Temperatur ca. 5°C unter dem T_m

Wert für 30 Sekunden durchgeführt. Die Polymerasereaktion wurde bei 72°C mit einer Minute pro Kilobasenpaar durchgeführt. Es erfolgten 25-35 Zyklen, die durch eine abschließende 10 minütige Synthesephase bei 72°C abgeschlossen wurden (T3-Thermocycler, Whatman Biometra). Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, analysiert und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel eluiert.

2.2.3. Enzymatische Behandlung von DNA

2.2.3.1. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Doppelsträngige DNA kann durch Restriktionsendonukleasen an für diese Nukleasen spezifischen Sequenzmotiven geschnitten werden. Dazu wurden 1-10 Einheiten des jeweiligen Enzyms pro µg DNA in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer (New England BioLabs) eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 1-16 h bei der vom Hersteller empfohlenen Inkubationstemperatur (meist 37°C). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6x DNA-Ladepuffer abgestoppt.

2.2.3.2. Dephosphorylierung von 5' Enden

Um die Selbstligation von linearisierten Vektoren in nachfolgenden Klonierungen zu verhindern, wurden im Anschluß an den Restriktionsverdau 1-2 Einheiten (Units) Alkalische Phosphatase (New England BioLabs) pro µg DNA zugeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Alkalische Phosphatase entfernt 5' Phosphatgruppen, sodass eine Ligation nur mit dem Insert erfolgen kann, was die Ligationseffizienz, durch die Reduzierung von falsch-positiven Klone, erheblich erhöht.

2.2.3.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurden verschiedene molare Verhältnisse von dephosphoryliertem Vektor und einzufügendem Insert eingesetzt (1:2 bis 1:10). Die Ligrationsreaktion erfolgte mit 1 µl T4-DNA-Ligase (New England BioLabs: 40 U/µl) in 1 x Ligase-Puffer in einem 20-50 µl Gesamtansatz bei 16°C für 4-16 Stunden. Die Hälfte des Ligrationsansatzes wurde anschließend für die Transformation von *E.coli* XL1 blue eingesetzt.

2.2.4. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierungen wurden als Service von Margot Landersz durchgeführt. Es wurde die Dideoxy-Methode nach Sanger angewendet. Die Sequenzierungen wurde jeweils mit 20 pmol Primer durchgeführt, je Kilobase Vektor wurden 0,5 µg DNA benötigt.

2.2.5. Transformation von Plasmiden in *E.coli*

Um neuklonierte Plasmide zu selektieren und zu vervielfältigen, sowie für die bakterielle Expression der Peptid-Aptamere mussten die hierfür kodierenden Plasmide in Bakterien eingebracht werden.

2.2.5.1. Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Zellen

2.2.5.1.1. Chemokompetente Bakterien (*E.coli* XL-1 blue; *E.coli* BL21 (DE3) pLysS)

Aus einem Glycerolstock wurde eine Pipettenspitze mit gefrorenen Bakterien auf LB-Agarplatten ohne Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer angewachsenen Einzelkolonie der Bakterien konnten dann am nächsten Tag eine Flüssigkultur (5 ml LB-Medium) über Nacht inokuliert werden. Die Übernachtskultur wurde nächsten Tag in 500 ml LB verdünnt, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,46-0,5 angezogen und die Zellen anschließend durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 5.000 x g) geerntet. Die Zellen wurden in 200 ml kalter Lösung 1 (100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM KaAc, 10 mM CaCl₂, 13% Glycerol(v/v) pH 5,8; sterilfiltriert) resuspendiert und für 1-2 h auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden erneut durch Zentrifugation pelletiert und in 15 ml Lösung 2 (10 mM MOPS (pH 7,0), 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 13% Glycerol (v/v) pH 7,0; sterilfiltriert) vorsichtig resuspendiert. Aliquots von 200 µl der Bakteriensuspension wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C gelagert.

2.2.5.1.2. Elektrokompente Bakterien (DH10B)

Eine Pipettenspitze mit gefrorenen Bakterien (Glycerolstock aus -80°C) wurde auf LB-Agarplatten ohne Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert Am nächsten Tag wurde eine Einzelkolonie der Bakterien über Nacht in 5 ml LB-Medium angezogen und am nächsten Tag in 500 ml LB bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 wachsen gelassen. Die Zellen wurden anschließend für 10-15 min auf Eis gekühlt und 20 min bei 5.000xg und 4°C

zentrifugiert. Die Zellen wurden in 5 ml Eiswasser resuspendiert und weitere 500 ml Eiswasser hinzugegeben. Es erfolgte erneut eine Zentrifugation und die Zugabe von 500 ml Eiswasser. Die Zellen wurden wie oben zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in der verbleibenden Flüssigkeit gelöst. Die Zellen wurden frisch verwendet oder zur Lagerung mit 10% Glycerol versetzt, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Die Transformationseffizienz dieser Zellen beträgt ca. $\geq 10^9$ pro μg DNA.

2.2.5.2. Transformation in chemokompetente Bakterien

Zu 50 μl chemokompetenten Zellen (XL1-blue; BL21 (DE3) pLysS), auf Eis aufgetaut, wurde die Hälfte eines Ligationsansatzes bzw. 1 μg Plasmid-DNA gegeben. Die Aufnahme der Fremd-DNA in die Zellen wurde durch Kältestress (30 min auf Eis) und anschließendem Hitzeschock (90 s, 42°C) forciert. Die Zellen wurden kurz auf Eis abgekühlt und dann mit 500 μl LB-Medium (ohne Antibiotika) 0,5 h bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert, die Hälfte des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit den angewachsenen Kolonien konnten dann am nächsten Tag Flüssigkulturen inokuliert werden.

2.2.5.3. Transformation in elektrokompetente Bakterien

Die Transformation in elektrokompetente Zellen (DH10B) wurde zur Amplifikation von gering-konzentrierten Plasmidpräparationen, z.B. nach Isolierung von Plasmiden aus Hefezellen, verwendet. Die Elektroporations-Apparatur wird auf 2,5 kV und 25 μF eingestellt mit einem Pulse-Kontroller von 200Ω . Es wurden 5 μl der Hefe-Plasmid Präparation zu 70 μl eisgekühlten elektrokompetenten Zellen gegeben und für 1 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in vorgekühlte Elektroküvetten gegeben und wie oben beschrieben gepulst. Die Zellen wurden in 700 μl SOC-Medium aufgenommen und 30-60 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in 80 μl SOC-Medium aufgenommen und auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

2.2.6. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

2.2.6.1. Plasmidisolierung in analytischem Maßstab (Mini-Präparation)

Für analytische Zwecke wurde Plasmid-DNA mit dem NucleoleoSpin Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel isoliert. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

2.2.6.2. Plasmidisolierung in präparativem Maßstab (Maxi-Präparation)

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden aus 500 ml Kulturen mittels des Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen bzw. der Firma Macherey-Nagel präpariert. Dabei wurde nach den Protokollen der Hersteller vorgegangen.

2.2.7. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Messung der Extinktion von DNA-Lösungen bei 260 und 280 nm gibt Auskunft sowohl über deren Konzentration als auch deren Reinheit. Eine OD_{260} entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA. Da aber auch aromatische Aminosäuren bei dieser Wellenlänge absorbieren wird zusätzlich die Extinktion bei 280 nm bestimmt, bei der Proteine stärker als DNA absorbieren. Ist der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} kleiner als 1,8, so deutet dies auf Verunreinigungen mit Proteinen hin.

2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.3.1. Proteinexpression in *E. coli*

Zur Proteinproduktion wurden die entsprechenden Expressionsvektoren in den *E.coli* Stamm BL21 (DE3) pLysS transformiert und in 0,5 bis 1 Liter LB- Medium bis zu einer OD_{600} von ca. 0,5-0,7 angezogen. Da die Multiple Cloning Site dieser Vektoren unter der Kontrolle eines vom Laktose-Operon abgeleiteten Promotor steht, kann die Expression durch Glukose reprimiert und durch IPTG induziert werden. Die Induktion erfolgte mit 0,5 mM IPTG für 4-5 Stunden bei RT.

2.3.1.1. Aufreinigung von rekombinant exprimierten Proteinen aus *E. coli* unter denaturierenden Bedingungen

2.3.1.1.1. Aufschluss der Bakterien

Da die in *E.coli* rekombinant exprimierten Peptid-Aptamere in sogenannten „inclusion bodies“ der Bakterien eingelagert wurden, mussten die rekombinant exprimierten Peptide unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt werden. Dazu wurde die Bakterien nach der Induktion mit IPTG (siehe 2.3.1.) abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 30 ml 8 M Harnstoff/PBS aufgenommen, die Zellen mit 2 x 3 min Ultraschall aufgeschlossen und für

30 min auf einem Rollenschüttler inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (30 min, 20.000 x g, 4°C) entfernt und der Überstand zusätzlich filtriert.

2.3.1.1.2. Reinigung durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie

Da die in *E.coli* exprimierten Proteine ein Histidin-Tag besitzen, konnten sie über eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Eine entsprechende Säule wurde mit 4 ml chelatierender Sepharose gefüllt und an eine Pumpe angeschlossen. Die Säule wurde zunächst mit 10 ml Wasser gewaschen, dann mit 6 ml 2% NiSO₄ beladen und zum Entfernen von nicht gebundenem Ni²⁺ wieder mit Wasser gewaschen. Die Säule wurde mit 8 M Harnstoff /PBS äquilibriert. Dann wurde das Bakterienlysat auf die Säule aufgetragen und mit je 20 ml 8 M Harnstoff /PBS und 40 mM Imidazol/8 M Harnstoff /PBS gewaschen. Die Elution erfolgte mit 6 x 2ml 250 mM Imidazol/ 8M Harnstoff /PBS, wobei Fraktionen von je 2 ml gesammelt wurden, die dann im Coomassie-gefärbten Gel auf das Vorhandensein von aufgereinigtes Protein überprüft wurden (siehe 2.3.4.). Die das Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und einem Renaturierungsschritt unterworfen.

2.3.1.1.3. Renaturierung des gereinigten Proteins mittels Dialyse

Der gereinigte Proteinextrakt wurde in einen Dialyseschlauch überführt und 1 M L-Arginin/PBS bis zu einer Endkonzentration von 400 mM Arginin zugegeben. Die Dialyse zur Entfernung des denaturierenden Harnstoffes erfolgte gegen 400 mM Arginin/PBS über Nacht bei 4°C. Der umgebende Puffer wurde am nächsten Tag schrittweise durch PBS ersetzt. Hierbei wurde alle 1,5 h je fünfmal ¼ des umgebenden Puffers ersetzt. Ausgefallene Proteine wurden durch Zentrifugation entfernt. Die Proteinkonzentration und Reinheit des so erhaltenen Extrakts wurden sowohl photometrisch (siehe 2.3.2.) als auch mit Hilfe von einem Coomassie-Gel (siehe 2.3.4.) bestimmt. Zur Abschätzung der Proteinmenge im Coomassie-Gel wurden als Proteinstandarts definierte Mengen an BSA aufgetragen.

2.3.2. Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten und aufgereinigten bzw. dialysierten Peptid-Aptameren erfolgte mit dem Protein Assay Kit der Firma BioRad, der auf der Methode von Bradford basiert.

2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist ein kontinuierliches Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht.

SDS-PAGE Laufpuffer: 25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1% SDS

Die Proben wurden für 5 min bei 95°C in 4 x denaturierendem SDS-Ladepuffer (Roth) inkubiert und durch das SDS mit einer kontinuierlichen negativen Ladung versetzt. Der Gellauf erfolgte in Form von vertikalen Plattengelen mit 6 bis 12%igen Trenn- und 5%igen Sammelgelen in SDS-Laufpuffer. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 50 mA pro Gel.

2.3.4. Coomassieblau-Färbung von Polyacrylamidgelen

Coomassie-Färbelösung: 0,1% Coomassie G250, 40% Ethanol, 10% Eisessig
Entfärberlösung: 25% Ethanol, 10% Eisessig

Zur Sichtbarmachung aller im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurde das Gel für 30 min in Coomassie-Färbelösung auf einem Schüttler gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch mehrfaches Wechseln der Entfärberlösung aus dem Gel entfernt. Das Gel wurde zur Dokumentation auf einem Whatman-Papier getrocknet.

2.3.5. Immunoblot (Western Blot Analyse)

Die Western Blot Analyse dient dem qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen durch Antikörper.

Anoden-Puffer I: 300 mM Tris-HCl (pH 10,4), 20 % Methanol (v/v)
Anoden-Puffer II: 25 mM Tris-HCl (pH 10,4), 20% Methanol (v/v)
Kathoden-Puffer: 25 mM Tris-HCl (pH 10,4), 20 % Methanol (v/v),
40 mM ϵ -Aminocapronsäure
TBS (1x): 10 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl
TBS-T: TBS mit 0,05% Tween 20

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden in Halbtrockenkammern auf Nitrocellulose-Membranen bei 1 mA/cm² Membranfläche für 1-2 h übertragen (Blotting Apparatur BioRad). Dazu wurde ein "Sandwich" aus 3 Lagen Whatmann-3MM-Papier in Anoden-Puffer I, 3 Lagen Whatmann-3MM-Papier in Anoden-Puffer II, Nitrocellulose-

membran, SDS-Gel und 6 Lagen Whatmann-3MM-Papier in Kathoden-Puffer aufgebaut. Nach dem Blotten wurde die Membran für 30 min in 5% Milchpulver in TBS-T geblockt. Es erfolgten 3 Waschschrte je 5 min mit 15 ml TBS-T und die Inkubation des primären Antikörpers über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde dreimal für 5–10 min mit TBS-T gewaschen und mit einem sekundären Antikörper, der Peroxidase gekoppelt ist, für 45-60 min bei RT inkubiert. Nach drei erneuten Waschschrten erfolgte die Detektion der Peroxidase-Aktivität mit dem ECL-System der Firma Amersham und Nachweis der Lichtemission mit einem Röntgenfilm (Röntgen Bender).

2.3.6. Ponceau-Färbung von Nitrocellulosemembranen

Zur Überprüfung gleicher Proteinmengen in den einzelnen Spuren einer Western Blot Membran, wurde die Membran für 5 min in Ponceau S-Lösung (Sigma) gefärbt und durch Waschen mit 10%-iger Essigsäure entfärbt. Anschließend wurde die Membran für 30 min in TBS-T gewaschen und wie in 2.3.5. beschreiben weiterbehandelt.

2.3.7. “Strippen” von Nitrocellulosemembranen

Das Strippen der Membran dient dazu, bereits gebundene Antikörper zu entfernen, so dass ein Nachweis mit einem anderen primären Antikörper möglich wird. Hierfür wurde die Membran unter Rotation 0,5 h bei 60°C mit Stripping-Puffer (2% SDS; 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7; 100 mM β -Mercaptoethanol) inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Leitungswasser gewaschen bis kein β -Mercaptoethanol-Geruch mehr wahrnehmbar war (ca. 1 h). Die Membran wurde mit TBS-T für 0,5 h gewaschen, und anschließend geblockt und eine erneute Immunodetektion durchgeführt (siehe 2.3.5.).

2.3.8. Immunopräzipitation

Bei der Immunopräzipitation kann ein spezifisches Protein aus einem Totallysat isoliert werden. Dabei wird das Protein an einen spezifischen Antikörper gebunden und zusammen mit seinem(n) Interaktionspartner(n) aus dem Lysat herausgezogen. Die Immobilisierung des Antikörpers erfolgt über Protein A (oder Protein G), das an magnetischen Kügelchen (magnetic beads) fixiert ist. Protein A (oder Protein G) binden mit hoher Spezifität und Affinität an die F_c-Region von Immunglobulinen. Durch den Einsatz der magnetischen Kügelchen kann der gesamte an die Kügelchen gebundene Komplex durch magnetische

Anziehung pelletiert werden und etwaige Interaktionspartner können mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse detektiert werden. Aufgrund der unterschiedlichen Affinitäten der Antikörper zu ihren spezifischen Interaktionspartnern wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Protokolle bei der Ko-Immunpräzipitation durchgeführt.

2.3.8.1. Immunopräzipitation des EGFR

Zum Zellextrakt wurde 1 µg des spezifischen Antikörpers gegeben und bei 4°C für 2 h auf einem Rotator inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl Protein-A Sepharose-Beads (Amersham Bioscience, Freiburg), die zuvor mit Lysispuffer äquilibriert wurden, und eine erneute Inkubation für eine Stunde bei 4 °C auf einem Rotator. Die Beads wurden zweimal mit X100-Zellextraktionspuffer und einmal mit TNE-T (50 mM Tris, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton) gewaschen. Die an die magnetischen Kügelchen gebundenen Proteine wurden durch Zugabe von SDS-Gelladepuffer eluiert und der Überstand auf eine SDS-PAGE aufgetragen und eine Immunoblot Analyse durchgeführt.

2.3.8.2. Immunopräzipitation von Stat3

Da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass rekombinant exprimierte Peptid-Aptamere unspezifisch an die magnetischen Kügelchen binden, wurden die Beads über Nacht bei 4°C mit 5% BSA blockiert. Für die Ko-Immunopräzipitation wurde Lysat und rekombinant exprimiertes Peptid-Aptamer, bzw. rekombinant exprimiertes Stat3 zusammen mit rekombinant exprimiertem Peptid-Aptamer 2 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Zu diesem Ansatz wurde 1 µg des spezifischen Stat3-Antikörpers (Santa Cruz) gegeben und für 1 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Dann erfolgt die Zugabe von 50 µl der geblockten Protein-A Sepharose-Beads und eine erneute Inkubation für 30 min bei 4°C auf einem Rotator. Anschließend wurden zum Entfernen von unspezifisch bindenden Proteinen die magnetischen Kügelchen 3x mit PBS gewaschen. Die an die magnetischen Kügelchen gebundenen Proteine wurden durch Zugabe von SDS-Gelladepuffer eluiert und der Überstand auf eine SDS-PAGE aufgetragen und eine Immunoblot Analyse durchgeführt.

2.3.9. Gelretardationsanalyse (electrophoretic mobility shift assay; EMSA)

Diese Methode dient zum Nachweis der DNA-Bindung von Stat3 an ein sequenzspezifisches Oligonukleotid. Hierfür wurden Zelllysate (HEPES-Puffer; siehe 2.5.2.2.) mit radioaktiv-

markierten Oligonukleotiden inkubiert und der Komplex in einem nativen Acrylamidgel aufgetrennt. Durch die Bindung von Stat3 an das Oligonukleotid kommt es zu einer langsameren Wanderung der Oligonukleotide („Band shift“) im elektrischen Feld.

2.3.9.1. Hybridisierung der komplementären Oligonukleotidstränge

Die komplementären Einzelstränge wurden in einem äquimolaren Verhältnis (1:1) in 1x Puffer 2 (New England Biolabs, Schwalbach) gemischt und für 4 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben langsam (über Nacht) im abgeschalteten Heizblock auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Lagerung der „annealten“ (doppelsträngigen) Probe erfolgte bei -20°C.

2.3.9.2. Radioaktive Markierung des Oligonukleotids

Für die Gelretardationsanalyse wurde ein annealtes hSIE-Oligonukleotid (high affinity mutant sis-inducible element) mit einer T4-Polynukleotidkinase unter Verwendung von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP radioaktiv markiert (Garcia et al. 1997). Dieses Enzym ist in der Lage matrizenunabhängig Nukleotide an das 3'-Ende eines beliebigen DNA-Stücks anfügen. Hierfür wurden folgende Komponenten gemischt:

- 100-200 ng hSIE-Oligonukleotids (doppelsträngig)
- 3 μl 10x T4 Polynukleotid Kinase Puffer
- 7,5 μl $\gamma^{32}\text{P}$ ATP
- 4 μl (40 Einheiten) T4 Polynukleotid Kinase (PNK)
- add steriles ddH₂O auf 30 μl

Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 μl 0,5M EDTA pH 8 abgestoppt und mit H₂O auf ein Volumen von 50 μl verdünnt. 1 μl wurde für die Messung im Szintillations-Analysierer abgenommen. Zum Aufreinigen der radioaktiv-markierten Oligonukleotide wurde MicroSpin G-25 Säulchen (Pharmacia Biotech) verwendet. Dieses wurde vor Gebrauch kurz gevortext und 1 min bei 3.000 rpm zentrifugiert. Dann wurden die 50 μl des Reaktionsansatzes auf die Säule gegeben und 2 min bei 3.000 rpm zentrifugiert. In dem Durchfluss befand sich nun das radioaktiv markierte Oligonukleotid, überschüssiges, freies $\gamma^{32}\text{P}$ ATP blieb in der Säule hängen. Der Durchfluss wurde mit H₂O auf ein Volumen von 200 μl verdünnt und wieder wurde 1 μl für die Messung im Szintillations-Analysierer abgenommen. Zu dem jeweils 1 μl wurden 4 ml Szintillations-

cocktail gegeben und die Menge an Radioaktivität (Counts) mit dem Programm für ^{32}P in einem Szintillationszähler gemessen. Für den späteren Gebrauch wurden 100.000 cpm/ μl (counts per min) radioaktiv-makiertes Oligonukleotid verwendet.

2.3.9.3. Herstellung des nativen 5% Acrylamid-Gel

Zuerst mussten Glasplatten, Spacer und Kämme gründlich mit Ethanol gereinigt werden und die kleine Glasplatte mit Anti-Haft-Mittel (Gel Slick, FMC Bio Products) behandelt werden. Dann wurde das System zusammen gebaut (BioRad, vertikales Gelsystem) und das native Gel hergestellt.

Rezept natives Gel:

52 ml	steriles H_2O
1,63 ml	10 \times TBE
3,25 ml	50% Glycerol
8,13 ml	40% Acrylamid-Lösung (39:1)
162,5 μl	30% APS
37,4 μl	TEMED

Das Gel wurde luftblasenfrei gegossen, der Taschenkamm eingesetzt und zur Polymerisierung über Nacht bei 4°C aufbewahrt.

2.3.9.4. Spezifische Bindung von Proteinen an radioaktiv markierte Oligonukleotide und native Polyacrylamidgelelektrophorese

Als erstes wurde je Probe 10 μl radioaktive Reaktionsmischung vorbereitet.

Reaktionsmischung:

10 mM HEPES pH 7,9
10 % Glycerol
1 mM DTT
0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Poly(dI:dC)
0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA
100.000 cpm/ μl radioaktiv-markiertes Oligonukleotid
add steriles dd H_2O .

Poly dI:dC-Oligonukleotide beugen der unspezifischen Bindung von Proteinen an das markierte Oligonukleotid vor. Anschließend wurden je Probe 10 µl Bindereaktionsmischung vorbereitet.

Bindereaktionsmischung:

- 4 µg Gesamtzellextrakt,
- 10 µl 1× HEPES-Puffer
- (1 µl Antikörper*)
- add steriles ddH₂O

* Für den „Supershift“ wurde zu dem Ansatz 1 µl Stat3-Antikörper hinzugegeben (C20 Santa Cruz). Für diesen Ansatz müssen Lysat und Antikörper 20 min. bei Zimmertemperatur prä-inkubieren, damit der Antikörper an Stat3 binden kann.

10 µl der radioaktiven Reaktionsmischung wurden zu den 10 µl der Bindereaktionsmischung hinzugegeben und 30 min. bei 30°C inkubiert. Inzwischen wurde das Gel in Laufpuffer (0,25×TBE) bei 200 Volt mindestens 30 min. lang vorlaufen gelassen, davor und danach die Taschen gründlich gespült. Nach der Inkubationszeit wurden die Geltaschen mit den Proben beladen und zur Orientierung wurde in eine Tasche 5 µl DNA-Probenpuffer gegeben. Das Gel wurde bei 200 Volt laufen gelassen, bis der DNA-Probenpuffer ca. $\frac{3}{4}$ durch das Gel gelaufen war. Anschließend wurde das Gel auf Whatman-Papier ca. 1 h auf einem Geltdrockner getrocknet und dann über Nacht oder bei Bedarf länger ein Röntgenfilm aufgelegt.

2.4. Methoden im Hefe-zwei-Hybrid-System

Das Hefe-zwei-Hybrid-System ermöglichte es, Protein-Protein-Interaktionen in zellulären Systemen zu untersuchen. Das zentrale Element des Hefe-zwei-Hybrid-System ist das Protein GAL4, ein Hefe-Transkriptionsfaktor, der aus einer DNA-Bindungsdomäne und einer Aktivierungsdomäne besteht. Um die Transkription auszulösen, bedarf es lediglich der räumlichen Nähe der beiden Domänen. Diese Tatsache macht man sich in einem zwei-Hybrid-Screen zu nutze, indem man miteinander interagierende Proteine mit den beiden Domänen fusioniert und über die Wechselwirkungen der Fusionsproteine einen vollständigen Transkriptionsfaktor regeneriert. Dieser ermöglicht dann die Transkription von Selektionsmarkergenen. Im verwendeten Hefestamm KF1 kodieren diese Reportergene jeweils für ein Protein der Adenin-, Histidin- und Uracil-Biosynthese (ADE2, HIS3, URA3). Ihre Transkription, deren Reuglation über verschiedene “Gal4-response-Elementen” erfolgt, stellt das Wachstum auf den jeweiligen Selektivmedien sicher. Über die Stärke der

Promotoren lässt sich die Stärke der Protein-Protein-Wechselwirkung bestimmen. Im vorliegenden Fall besitzt *ade2* einen starken, und *ura3* einen schwachen Promotor. *Ura3* wird durch den SPO13-Promotor reguliert, der ein negativ-regulatorisches Element enthält und nur durch starke Protein-Protein-Interaktionen aktiviert werden kann. Das *his3*-Gen wird basal transkribiert. Diese basale Transkription kann durch kompetitive Hemmung mit 3-Aminotriazol (3-AT) verhindert werden, was gleichzeitig eine Titration der Bindungsstärke ermöglicht.

2.4.1. Lösungen und Medien

SD (Synthetic Dropout)-Medium
(Flüssig-Selektionsmedium):

1,7g YNB (Yeast Nitrogen Base)
5 g (NH₄)₂SO₄
0,59 g CSM-Aminosäuremix

YPDA-Medium (Vollmedium):

YPD-Medium der Firma Bio101 mit 50 mM
Adenin

DOBA (Dropout base agar)
Medium zur Herstellung von
Selektionsagarplatten)

DOBA Basis der Firma Bio101 mit
entsprechendem CSM-Aminosäuremix

2.4.2. Transformation von Plasmiden in *S. cerevisiae* („Quickie“)

LiAc/TE : 100 mM LiAc pH7,5, 10 mM Tris, 1 mM EDTA

LiAc/TE/PEG: 100 mM LiAc pH7,5, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 40% PEG 4000

Für die Transformation von Plasmiden in Hefe wurde eine Streichholzkopf-große Kolonie des KF1-Stammes und in 300 µl LiAc/TE-Puffer resuspendiert und zentrifugiert (1 min RT; 14.000 rpm). Das Pellet wurde erneut in LiAc/TE-Puffer resuspendiert und die Hefesuspension für die Transformation verwendet.

„Quickie“-Transformationsansatz

50 µg Träger-DNA (Salmon Sperm DNA: 10 mg/ml)

1 µg Plasmid

50 µl Hefesuspension

300 µl LiAc/TE/PEG

Der Transformationsansatz wurde 30 min bei 30°C und 15 min bei 42°C inkubiert und anschließend 2 min bei 3.000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Wasser

resuspendiert und auf Selektionsplatten ausplattiert. Die Hefen wurden 2-4 Tage bei 30°C inkubiert.

2.4.3. Transformation der Library-Vektoren in *S. cerevisiae*

Die Hefekolonien, die das Baitprotein exprimierten, wurden für die Transformation der Library-Vektoren in 30 ml SD-L über Nacht kultiviert. Die Hefen wurden mit 250 ml YPDA bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 ± 0,1 angezogen, 2 min bei 2.000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde zunächst zweimal mit Wasser und anschließend einmal mit LiAc/TE-Puffer gewaschen. Die gründlich resuspendierten Zellen wurden in 20 ml LiAc/TE aufgenommen. Je 10 Transformationsansätze zu á 2 ml wurden pipettiert.

Transformationsansatz:

20 µg	Library-DNA
180 µl	Träger-DNA (Salmon Sperm DNA: 10 mg/ml)
2 ml	Hefesuspension
12 ml	LiAc/TE/PEG-Puffer

Die Einzelansätze wurden 30 min bei 30°C und 15 min bei 42°C inkubiert. Die Zellen wurden 5 min bei 3.500 rpm zentrifugiert, die Einzelansätze vereinigt und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10,5 ml Wasser resuspendiert und je 700 µl auf 15 großen DOBA-LTA Platten ausplattiert. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden Verdünnungsreihen (10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵) hergestellt, die auf DOBA-LT Platten ausplattiert wurden.

2.4.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Die DNA-Isolierung aus Hefezellen wurde mit Hilfe des Yeast plasmid extraction Kit der Firma BIO 101 durchgeführt. Die Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.4.5. Verifikation des Interaktionsphänotyps mittels Mating

Die Methode diente dazu, die Interaktion der gescreenten Aptamere mit dem Targetprotein zu verifizieren. Die beiden haploiden Mating-Typen a bzw. α von *S. cerevisiae* PJ69 (Clontech, Heidelberg) wurden mit dem Bait- bzw. den isolierten Prey-Konstrukten transformiert. Klone, der so transformierten Mating-Typen wurden gemeinsam über Nacht

bei 30°C in YPDA Medium inkubiert und am folgenden Tag auf DOBA-LT (DOBA ohne Leucin/Threonin) ausplattiert. Die gewachsenen diploiden Kolonien wurden auf den entsprechenden Selektivmedien ausgestrichen und das Wachstum überwacht.

2.5. Methoden der Zellkultur

2.5.1. Transfektion von Säugerzellen

Säugerzellen können unter bestimmten Bedingungen von außen zugesetzter Fremd-DNA aufnehmen (Transfektion) und die von dieser DNA kodierte Gene exprimieren. Dazu wurden 2×10^5 Zellen in einer 12-Well-Plate ausgesät und nach dem Absetzen, mit Medium ohne FCS und ohne Penicillin/Streptomycin versetzt. 2 µg DNA wurden in 100 µl DMEM Medium (ohne FCS/Penicillin/Streptomycin) resuspendiert, 4 µl Lipofectamine 2000 (LifeTechnologies; Karlsruhe) mit 100 µl Medium (ohne FCS/Penicillin/Streptomycin) gemischt. Beide Lösungen wurden vereinigt und zur Bildung von DNA-Lipofectamine-Komplexen 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde für 6-8 h zu den Zellen gegeben. Anschließend wurde das Medium gewechselt, und die Zellen in ihrem „normalen“ Medium, jedoch ohne Penicillin/Streptomycin weiter kultiviert. Für eine transiente Transfektion wurden die Zellen nach 48 h geerntet. Für die Herstellung stabil exprimierender Zellen, wurden die Zellen 48 h nach Transfektion verdünnt ausgesät und für 14 Tage mit 1 mg/ml G418 selektiert, wobei das Medium alle zwei Tage erneuert wurde. Nach zwei Wochen wurden Einzelkolonien gepickt, diese weiterkultiviert und dann auf die Expression des Konstruktes in Western Blot Analysen hin untersucht.

2.5.2. Zellernte und Zellaufschluß

Zum Ernten der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in 1 ml PBS-Puffer aus der Kulturschale geschabt und der Puffer durch Zentrifugation (2.500 rpm, 7 min, 4°C) entfernt. Die Zellyse erfolgte mit Triton-X 100 Puffer, in Luciferase-Lysispuffer (siehe 2.5.4.) oder, falls Lysate für Gelretardionsexperimente angefertigt wurden, mit HEPES-Puffer.

2.5.2.1. Triton-X 100 Puffer

50 mM Tris pH 7,5	frisch hinzugeben
5 mM EGTA	20 µM PAO, 2 mM NaVO ₃ , 1 mM Pefabloc, 50 mM NaF,
150 mM NaCl	10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin
150 mM NaCl	

Das Pellet wurde in 20 bis 50 µl Triton X100-Puffer resuspendiert und 15 min zur Zellyse auf Eis inkubiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (14.000 rpm, 10 min, 4°C; Eppendorf Kühlzentrifuge; Eppendorf, Hamburg)) entfernt. Der Gesamtprotein-gehalt wurde mittels der Bradford-Methode bestimmt. Die Extrakte wurden bei -80°C gelagert.

2.5.2.2. HEPES-Puffer

20 mM HEPES	frisch hinzugeben
20% Glycerin	20 µM PAO, 2 mM NaVO ₃ , 1 mM Pefabloc, 50 mM NaF,
400 mM KCl	10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin
0,1 mM EDTA	
1,5 mM MgCl ₂	

Das Pellet wurde in seinem dreifachen Volumen in HEPES-Puffer resuspendiert und durch dreimaliges Einfrieren in flüssigen Stickstoff und Auftauen bei 37°C lysiert. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei 4°C und 14.000 rpm in einer Eppendorf Kühlzentrifuge abzentrifugiert (Eppendorf Kühlzentrifuge; Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5.3. Bestimmung der Überlebensrate

Die relative Anzahl von lebenden Zellen in einer Probe wurde mittels eines XTT-Test (XTT based proliferation kit II, Roche Mannheim) bestimmt. Dies erfolgt durch die Zugabe des Tetrazoliumsalzes XTT, das von stoffwechselaktiven Zellen zu einem Formazan metabolisiert wird und dadurch einen Farbumschlag zeigt, der quantifiziert werden kann.

Zunächst wurden die Zellen in einer 96-Lochplatte ausgesät. Nach Absetzen der Zellen wurde mit dem zugeben der Peptid-Aptamere begonnen. Die relative Anzahl an lebenden Zellen wurde alle 24 h bestimmt. Dafür wurden je 50 µl XTT/PMS (50:1) zugeben und für 4 h bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert. Das Zellwachstum wurde durch Messung der Extinktion bei 595 und 690 nm quantifiziert (SpectraMAX 340; MWG-Biotech). Es wurde

jeweils dreifach Bestimmungen durchgeführt. Als Leerwert dienen Ansätze, die nur Medium enthielten.

2.5.4. Messung der Luziferase- und β -Galaktosidase-Aktivität

Zur Messung der Transaktivierungsaktivität von Transkriptionsfaktoren wurde ein Reporterkonstrukt bestehend aus einem Promotor mit Bindungsstellen für den entsprechenden Transkriptionsfaktor und dem Luziferase-Gen in Zellen transfiziert. Kann der Transkriptionsfaktor die Transkription von diesem Promotor aus aktivieren, wird das aktive Enzym Luziferase in den Zellen exprimiert. Dieses katalysiert nach Zugabe eines Luziferinsubstrats eine Reaktion bei der Licht emittiert wird, das durch einen Photoelektronenvervielfacher detektiert werden kann. Das emittierte Licht ist somit proportional zur Transaktivierungsaktivität des Faktors.

Luziferase-Lysispuffer:	1% Triton X-100, 25mM Glycylglycin, 15 mM MgSO ₄ , 4mM EGTA, 1mM DTT (frisch hinzugeben)
Luziferin-Substrat:	2,97 g Glycylglycin, 2,7 g ATP (pH 7,8); 50 mg Beetle Luziferin; ad 900 ml H ₂ O
Reaktionspuffer:	100 mM N ₂ HPO ₄ , 1 mM MgCl ₂ , 1x Galacton (Tropix; Bedford, MA, USA)
Amplifierlösung:	10% Emerald (Tropix; Bedford, MA, USA), 0,2 M NaOH

Die transfizierten Zellen wurden mit PBS gewaschen, in PBS aus der Zellkulturschale gekratzt und der Puffer durch Zentrifugation (5 min, 2.500 rpm, 4°C) entfernt. Das Pellet wurde in 70 μ l Luziferase-Lysispuffer (pro 12-Lochplatte) resuspendiert und zur Zellyse 10 min auf Eis inkubiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt und der Überstand weiterverwendet. 20 μ l des Zellysats wurden in einer Luziferaseplatte vorgelegt. Die Messung der Chemolumineszenz erfolgte automatisch nach 20 s der automatischen Zugabe von 50 μ l Luziferin-Substrat im Luminometer (Berthold; Vista, CA, USA). Um die Luziferase-Aktivität mit der Transfektionseffizienz abzugleichen, wurde ein konstitutiv exprimiertes β -Galaktosidase-Konstrukt transfiziert. Die Messung der Galaktosidase-Aktivität wird von 3 μ l Lysat unter Zugabe von 33 μ l Reaktionspuffer nach 30 minütiger Inkubation für 10 s gemessen, wobei der Amplifier automatisch zugegeben wird. Sowohl die Messung der Luziferase- als auch der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte in Triplett-Messungen.

2.5.5. Markierung apoptotischer Zellen mittels TUNEL (TdT-mediated XdUTP nick end labeling)

Zur Markierung apoptotischer Zellen wurde der „in situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein“ (Fa. Roche, Mannheim, Deutschland) verwendet. Dieser Ansatz erlaubt die Detektion und Quantifizierung von Apoptose auf der Ebene von Einzelzellen. Mit Hilfe dieser Methode werden die bei der Apoptose entstehenden DNA-Strang Brüche an ihrem 3'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, sodass die apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden können.

Die Durchführung des TUNEL-Experimentes erfolgte etwas verändert zu den Angaben des Herstellers. Es wurden die Zellen auf Deckgläser in einer Zellkulturschale ausgesät und zum gegebenen Zeitpunkt 2 x mit PBS gewaschen und luftgetrocknet und der Ort der Färbung mit einem Glycerinstift (Liquid Blocker Pap Pen; Fa. Daido Sangyo, Tokyo, Japan) eingegrenzt. Anschließend wurden die Präparate für 1 h bei Raumtemperatur mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach 2-maligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,1% TritonX/0,1% Natrium-Citrat in PBS permeabilisiert. Dies erfolgte durch eine 20-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und dadurch die Permeabilisierung gestoppt. Als Positivkontrolle wurde mit einem Ansatz wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Diese interne Kontrolle wurde (5 µl DNase, 5 µl DNase-Puffer, 40 µl steriles ddH₂O) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und 2 x mit PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem TUNEL-Reaktionsgemisch (nach Angaben des Herstellers). 1 Volumenanteil Enzymlösung („enzyme solution“, Lösung 1) wurde mit 9 Volumenanteilen Markierlösung („labeling solution“, Lösung 2) gemischt und jeweils 50 µl auf jedes Deckglas gegeben. Als Negativkontrolle diente ein Präparat, das ohne zu Zugabe von Enzymlösung behandelt wurde. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 1 h in einer feuchten Kammer. Sowohl Kontrollen als auch die zu analysierenden Präparate wurden gewaschen (3 x 10 min) und anschließend eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Allerdings wurde in den TUNEL-vorbehandelten Präparaten keine Methanolfixierung sondern sogleich die Permeabilisierung mit PBS/0.05% Tween durchgeführt. Die weiteren Schritte erfolgten wie in 2.5.6. beschrieben.

2.5.6. Indirekte Immunfluoreszenz

Die Proteinlokalisierung zellulärer bzw. transduzierter Proteine in Zellkulturzellen erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz (modifiziert nach Wolfrum 1995). Hierbei wurden die

fixierten Zellen zunächst mit einem primären Antikörper inkubiert, der spezifisch gegen das zu visualisierenden Zielprotein gerichtet ist. Anschließend wurde der primäre Antikörper durch einen zweiten (sekundären) Fluorochrom-gekoppelten Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, visualisiert.

Hierfür wurden die Zellen auf Deckgläser in einer Zellkulturschale ausgesät und zum gegebenen Zeitpunkt mit 95% Methanol für 10 min bei -20°C fixiert. Das Methanol wurde abgesaugt, und nach Trocknung des Glases der Ort der Färbung mit einem Glycerinstift (Liquid Blocker Pap Pen; Fa. Daido Sangyo, Tokyo, Japan) eingegrenzt. Um die Zellmembran für die Aufnahme der Antikörper zu permeabilisieren, wurde das Präparat mit PBS/0.05% Tween 20 Minuten inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Nach 30 min Blockieren (0,5% Fischgelatine, 0,1% Ovalalbumin in PBS) erfolgte die Inkubation mit Primärantikörper (verdünnt in Blockierungslösung) bei 4°C über Nacht. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper (Alexa Fluor®-488; Fa. Molecular Probes, Leiden, Niederlande, 1:400) 1,5 h bei RT im Dunkeln gefärbt. Nach erneutem Waschen wurden die Salze mit Aqua dest. gewaschen, das Präparat mit Filterpapier getrocknet und mit Mowiol® (4.88, Fa. Hoechst)/DAPI ($1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$) luftblasenfrei auf einem Objektträger aufgebracht. Die Proben wurden unter Lichtausschluss bei 4°C bis zur weiteren Auswertung am Mikroskop (Eclipse TE 300; Nikon) gelagert.

2.6. Statistische Auswertung

Für die Beurteilungen der XTT-Tests (2.5.3.) sowie der Untersuchung der Luziferase- und β -Galaktosidase Aktivität (2.5.4.) waren statistische Auswertungen nötig. Die statistische Auswertung, wie Mittelwertbestimmung, die Errechnung der Standardabweichung sowie der Signifikanz, erfolgte mit dem Statistikprogramm Microsoft Excel. Für die Ermittlung der Signifikanz wurde der Studentische T-Test verwendet, ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als Signifikanzgrenze definiert.

2.7. Tierexperimente

Die Haltung der Mäuse erfolgt unter Standardbedingungen im Tierhaus des Georg Speyer Hauses. Die Durchführung des Tierversuches wurde vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt.

B16-Zellen wurden am Tag vor der geplanten Injektion in die Mäuse 1:3 gesplittet. Zum Bestimmen der Zellzahl wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und in einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl ermittelt. Zum Einstellen der Zellzahl von 1×10^7 Zellen/ml wurde PBS verwendet. 5×10^5 B16-Zellen wurden subkutan in die Seitenflanken injiziert für die Injektion in die Mäuse. Nach Injektion der Tumorzellen wurde, sobald Tumore messbar waren, deren Größe gemessen und daraus das Tumolvolumen berechnet. Berechnung des Tumolvolumens (in mm^3):

$$\frac{\text{Länge (mm)} \times \text{Pi} \times \text{Breite (mm)}^2}{6}$$

Am Ende des Versuches wurden die Tiere getötet (CO_2 -Kammer und cerebrale Dislokation) und die Tumoren präpariert. Die isolierten Tumore wurden über Nacht in 4% Paraformaldehyd mit 20% Sucrose fixiert. Am nächsten Tag wurden die fixierten Präparate entsprechend der geplanten Einbettung (Cryofixierung oder Parafineinbettung) weiterverarbeitet (Daten nicht gezeigt).

3. Ergebnisse

3.1. Identifizierung von Peptid-Aptameren, die mit funktionellen Domänen des Transkriptionsfaktors Stat3 interagieren

Ziel der vorliegenden Arbeit war es Peptid-Aptamere zu isolieren, die die Signaltransduktion des Transkriptionsfaktors Stat3 inhibieren können. Das Schema in Abbildung 3.1. zeigt die funktionellen Domänen des Stat3-Moleküls, die für die intrazelluläre Signalweiterleitung und für die Funktion von Stat3 als Transkriptionsfaktor verantwortlich sind (detailliertere Angaben siehe Abb. 1.2.). Essentiell für die Aktivierung von Stat3 ist die Phosphorylierung des Tyrosins 705 in der Dimerisierungsdomäne, wodurch die Stat3/Stat3-Homo- bzw. Stat3/Stat1-Heterodimerbildung und deren Transport in den Nukleus induziert werden. Im Nukleus wirken Stat3-Dimere als Transkriptionsfaktoren und binden über ihre DNA-Bindedomäne an spezifische DNA-Sequenzen in den Promotorregionen von Zielgenen. Nach der Rekrutierung von Co-Aktivatoren kommt es zum Start der Transkription dieser Zielgene.

Zwei für die Funktion des Stat3-Moleküls essentielle Domänen wurden in der vorliegenden Arbeit als Zielstruktur zur Interferenz mit dem Stat3-Signalweg gewählt: Zum einen sollten Peptid-Aptamere isoliert werden, die an die Dimerisierungsdomäne von Stat3 binden und dadurch die Dimerbildung von Stat3-Monomeren inhibieren. Zum anderen sollte durch Maskieren der Stat3-DNA-Bindedomäne mittels eines Peptid-Aptamers die Bindung von bereits gebildeten Stat3-Dimeren an die Promotorregionen von Stat3 Zielgenen inhibiert werden. Die Identifikation von Peptid-Aptameren, die mit den verschiedenen funktionellen Domänen von Stat3 interagieren, erfolgte in einem Hefe-zwei-Hybrid-System. Der verwendete Hefestamm KF-1 und die eingesetzte Peptid-Aptamer-Bibliothek (Prey-Konstrukte) wurden von dem Labor um F. Hoppe-Seyler, DKFZ Heidelberg zur Verfügung gestellt (Butz et al. 2000). Als Bait-Konstrukte wurden jeweils ein ca. 100 Aminosäuren (aa) umfassendes Fragment der Dimerisierungsdomäne (aa 655 – aa 755) und der DNA-Bindedomäne (aa 322 - aa 483) von Stat3 abgeleitet (Abb. 3.1.).

Die für die jeweils verwendeten Bait-Konstrukte relevanten Sequenzen wurden aus einer murinen Stat3-cDNA mittels spezifischer Primer durch PCR (polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion) amplifiziert. Zusätzlich wurden an die Primer Restriktionsschnittstellen angehängt, sodass die Amplifikate nach Restriktionsverdau in den entsprechend geschnittenen Bait-Vektor (pPC97) inseriert werden konnten. Die Sequenzen

(Stat3-DD, Stat3-DBD) wurden in der Leserahmen (*in frame*) mit der GAL4-DNA-Bindedomäne des pPC97-Vektors (BD Clontech) kloniert und mittels Sequenzierung verifiziert. Sowohl pPC97-Stat3-DD als auch pPC97-Stat3-DBD wurden in den Hefestamm *S. cerevisiae* KF1 transformiert und die erhaltenen Transformanten auf DOBA-L Selektionsmedium selektioniert.

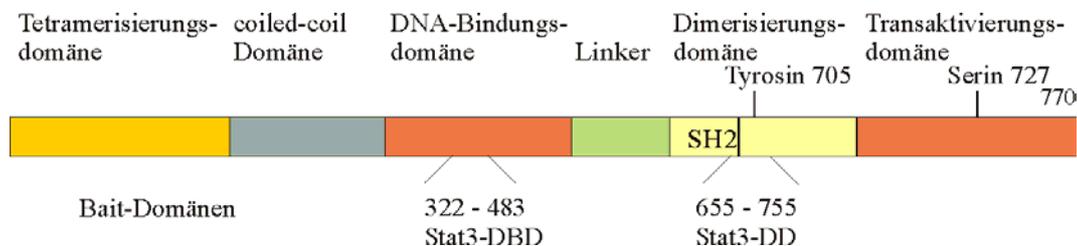


Abb. 3.1. Gewählte Bait-Konstrukte im Hefe-zwei-Hybrid-Screen gegen funktionelle Domänen von Stat3

Als Bait-Konstrukte für den Hefe-zwei-Hybrid-Screen wurden Bereiche aus der Dimerisierungsdomäne (aa 655 – aa 755) und der DNA-Bindungsdomäne (aa 322 – aa 483) von Stat3 verwendet. Im Folgenden werden die Konstrukte als Stat3-DD (Dimerisierungsdomäne) und Stat3-DBD (DNA-Bindungsdomäne) bezeichnet.

Um eine Aktivierung des Adeninselektionsmarkers vermittelt durch das Bait-Konstrukt auszuschließen, wurden die erhaltenen Klone auf dem Selektionsmedium DOBA-LA ausgestrichen. Keiner der erhaltenen Klone zeigte im autonomen Aktivierungstest Wachstum (Daten nicht gezeigt), so dass die untersuchten Klone für Hefe-zwei-Hybrid-Screens verwendet werden konnten. In einem zweiten Transformationsschritt wurde je ein Stat3-DD bzw. Stat3-DBD exprimierender Klon mit der Peptid-Aptamer-Bank transformiert und der Ansatz auf DOBA-LTA Platten ausplattiert. Unter diesen Selektionsbedingungen konnten nur Klone wachsen in denen Bait- und Prey-Konstrukt interagierten. Mit jedem Bait-Konstrukt wurden zwei Screens durchgeführt. Da bei jedem Versuchsansatz die Anzahl der gescreenten Klone 1×10^7 betrug, wurden mit jedem Bait-Konstrukt ca. 2×10^7 Klone durchmustert. Da die Diversität der Bank 5×10^7 Klone umfasst, wurde folglich mit den Screens nicht die gesamte Anzahl der unterschiedlichen Klone erfasst. Arbeiten in unserem Labor (Buerger et al. 2003) und in dem Labor um Hoppe-Seyler (Butz et al. 2000) haben jedoch gezeigt, dass sich schon ab 10^7 gescreenter Klone hochaffine Bindungspartner ableiten lassen. Aus diesem Grund konnten die Screens als erfolgreich angesehen werden und die isolierten Klone wurden weiter charakterisiert.

Für das Bait-Konstrukt pPC97-Stat3-DD wurden zahlreiche Interaktionspartner gefunden. In den beiden Screeningansätzen wurden zunächst über 100 Klone isoliert. Die

Anzahl der Klone konnte jedoch durch die Erhöhung der Selektionsstringenz in den folgenden Selektionsrunden (DOBA-LTA, DOBA-LTH, und DOBA-LTU) auf sechs reduziert werden. Vor allem die Selektion aus DOBA-LTU Platten erwies sich als sehr effektiv. Ursache hierfür ist der SPO1 Promotor des Uracil-Selektionsmarkergens. Dieser Promotor enthält ein negatives Regulationselement, sodass die Expression des nachgeschalteten Gens nur durch einen sehr stabilen Gal4-Transkriptionsfaktor aktiviert werden kann (Butz et al. 2000). Das Wachstum der Klone auf DOBA-LTU Platten weist somit auf eine starke Interaktion von Peptid-Aptamer und Bait-Konstrukt hin. Mit dem Bait-Konstrukt pPC97-Stat3-DBD konnte trotz mehrfacher Screeningansätze nur ein Klon (DBD-1) isoliert werden. Der erhaltene Klon wurde wiederholt auf DOBA-LTA Platten ausgestrichen sowie auf DOBA-LTH Platten und DOBA-LTU Platten weiter selektioniert. Auf allen drei Selektionsmedien zeigte Klon DBD-1 ein deutliches Wachstum. Dies deutet auf eine Interaktion von Peptid-Aptamer DBD-1 und Bait-Konstrukt DBD-Stat3 hin.

Im nächsten Schritt wurden die für die Peptid-Aptamere kodierenden Plasmide aus den Hefen isoliert und im Bakterienstamm *E. coli* DH10B amplifiziert. Hierbei erwies es sich als Vorteil, dass es sich bei den Library-Vektoren im Gegensatz zu den Bait-Vektoren um „high-copy“-Plasmide handelte. Die Library-Vektoren wurden somit in den Bakterien in einem viel höheren Maß amplifiziert als die ebenfalls mit isolierten Bait-Vektoren. Nach Isolierung und Restriktionsverdau der amplifizierten Plasmide wurde mittels Sequenzierung die Peptid-Aptamersequenz ermittelt. Zur Sequenzierung wurde ein Primer verwendet, der im N-Terminus der Thioredoxin (Trx)-Sequenz bindet. Bei der Sequenzanalyse der isolierten Peptid-Aptamere für das Bait-Konstrukt Stat3-DD zeigte sich, dass drei der isolierten Peptid-Aptamere keine 20 Aminosäuren als Insert aufwiesen, sondern die Peptid-Aptamere ein 42 Aminosäure-Insert besaßen (Tab. 3.1A.). Diese Duplizierung des Inserts ist eine Folge der Klonierungsstrategie die bei der Generierung der Peptid-Aptamer-Bank verwendet wurde (Butz et al. 2000). Die Sequenzen der drei isolierten Peptid-Aptamere mit 42 Aminosäure-Insert sind in Tabelle 3.1A. aufgelistet und werden im Folgenden als DD-1 – DD-3 bezeichnet. Bei den drei weiteren isolierten Peptid-Aptameren handelte es sich um lineare Peptide, da ein Stopcodon im Bereich des Inserts kodiert wurde (Sequenzen nicht gezeigt). Das Erhalten von Stopcodons ist durch die Definition der „Codonusage“, die bei der Synthese der Library verwendet wurde, zu erklären. Durch die Definition der Codonusage NNK (N: kann für jede beliebige Nukleotid kodieren; K: nur G und C) wird die Anzahl der möglichen Stopcodons von 3 auf 1 reduziert. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass ein weiteres Stopcodon (ATC) in das Insert integriert wird.

Die Sequenz des isolierten Klons der Stat3-DBD-Screens zeigte ein 20 Aminosäureinsert, die Sequenz ist in Tabelle 3.1B. aufgelistet. Dieses Peptid-Aptamer wird im Folgenden als DBD-1 bezeichnet. Bei der Durchführung einer BLAST-Suche (basic alignment search tool) zeigte keine der erhaltenen Peptid-Aptamersequenzen Homologien zu bereits bekannten Proteinen.

A: Peptid-Aptamere, die mit der Dimerisierungsdomäne von Stat3 interagieren

DD-1: PPLVCIRSWCPLMVPHSADLGPASQWLCHRVASIALLPRYSS

DD-2: VGWTWMSVLVCCDGSGLVPEGPVVVQAGGAVPISGSVALMTD

DD-3: SPISIPIGFVVRHCALHMAVGPLSWPARVSGYSFALEVLTNF

B: Peptid-Aptamer, das mit der DNA-Bindedomäne von Stat3 interagiert

DBD-1: PLTAVFWLIYVLAKALVTVC

Tab. 3.1. Peptidsequenzen der isolierten Peptid-Aptamere, die im Hefe-zwei-Hybrid-Screen mit unterschiedlichen funktionellen Domänen von Stat3 identifiziert wurden.

3.2. Überprüfung der spezifischen Interaktion von isolierten Peptid-Aptameren mit ihrem Bait-Konstrukt in Hefen

Zur Überprüfung der spezifischen Interaktion der isolierten Peptid-Aptamere und ihrem jeweiligen Bait-Konstrukt wurden Mating-Experimente in Hefen durchgeführt. Hierzu wurde der haploide Hefestamm PJ96-a mit den isolierten Prey-Plasmiden transformiert und auf DOBA-T Platten selektioniert. Für diesen Ansatz wurden auch Plasmide, die für die linearen Peptid-Aptamere kodieren, untersucht. Unterschiedliche Bait-Konstrukte wurden in den Hefestamm PJ69- α transformiert und die Transformanden auf DOBA-L Platten selektioniert. Als Kontrollen wurden der „leere“-Bait-Vektor und ein Bait-Vektor, in den ein Teil der Dimerisierungsdomäne von Stat5 (aa 644 – aa 744) kloniert wurde, verwendet. Darüber hinaus diente das Bait-Konstrukt Stat3-DD für das Peptid-Aptamer DBD-1 als Kontrolle und umgekehrt wurde das Bait-Konstrukt Stat3-DBD als Kontrolle der isolierten Peptid-Aptamere der Stat3-DD-Screens verwendet. Je eine Kolonie der beiden Mating-Typen wurde gemischt, über Nacht bei 30°C inkubiert und auf dem Selektionsmedium DOBA-LT ausplattiert. Unter diesen Bedingungen konnten nur entstandene diploide Hefen wachsen. Um die Interaktion der Bait- und Prey-Konstrukte zu überprüfen, wurden die erhaltenen Klone auf DOBA-LTA Medium ausgestrichen. Ein Wachstum der Hefen in

Adenin-defizientem Medium ist nur möglich, wenn durch die Interaktion des Bait- und Prey-Konstruktes ein vollständiger GAL4-Transkriptionsfaktor rekonstituiert wird. Dieser Transkriptionsfaktor ist dann in der Lage die Transkription des nachgeschalteten Adenings einzuleiten, dadurch können Hefen auf Adenin-defizientem Medium wachsen.

Die Mating-Experimente zeigten, dass die Peptid-Aptamere DD-1, DD-2 und DD-3 spezifisch nur mit dem Bait-Konstrukt Stat3-DD interagierten und dadurch Wachstum unter Selektionsbedingungen erfolgte (Abb. 3.2.). Kein Wachstum unter Selektionsbedingungen und damit keine Interaktion der Peptid-Aptamere DD-1 bis DD-3 erfolgte mit der Dimerisierungsdomäne von Stat5, dem leeren Bait-Vektor oder der DNA-Bindedomäne von Stat3.

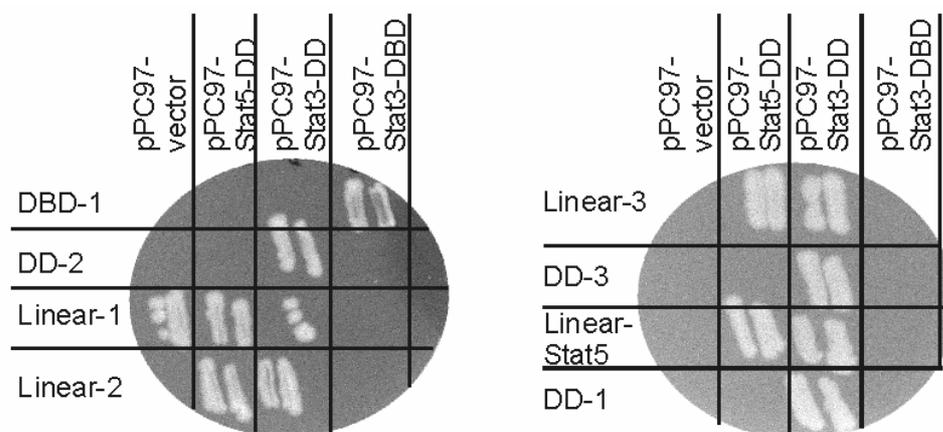


Abb. 3.2. In Mating-Experimenten interagierten die isolierten Peptid-Aptamere spezifisch mit ihren Bait-Konstrukten

Der haploide Hefestamm PJ96-a wurde mit den isolierten Prey-Plasmiden, die unterschiedlichen Bait-Konstrukte wurden in den haploiden Hefestamm PJ69- α transformiert. Die je eine Kolonie des α - bzw. α -Stammes wurden gemischt, über Nacht bei 30°C inkubiert. Die entstandenen diploiden Hefen wurden zur Verifikation der Interaktion auf DOBA-LTA-Platten ausgestrichen. Spezifische Interaktion wurde bei den Peptid-Aptameren DD-1 bis DD-3 und dem Bait-Konstrukt pPC97-Stat3-DD nachgewiesen. Peptid-Aptamer DBD-1, das in dem Hefe-zwei-Hybrid-Screen mit dem Bait-Konstrukt Stat3-DBD isoliert wurde, interagiert in den Mating-Experimenten nur mit dem relevanten Bait-Konstrukt Stat3-DBD. Kein Wachstum und damit keine Interaktionen erfolgten bei den Peptid-Aptameren DD-1 bis DD-3 mit den Negativkontrollen pPC97-Vektor, pPC-Stat3-DBD, pPC-Stat5-DD. Bait-Konstrukt Stat3-DBD zeigt keine Interaktion mit den verwendeten unspezifischen Bait-Konstrukten pPC97-Vektor, pPC-Stat3-DD, pPC-Stat5-DD. Die linearen Peptid-Aptamere zeigten unspezifische Interaktion mit verschiedenen Bait-Konstrukten.

Demgegenüber interagiert das im Stat3-DD-Screen isolierte lineare Peptid-Aptamer Linear-1 unspezifisch mit dem „leeren“-pPC97-Vektor und ebenfalls mit dem Bait-Konstrukt Stat5-DD (Abb. 3.2.). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass dieses

lineare Peptid-Aptamer unspezifisch mit der GAL4-DNA-Bindedomäne interagiert. Die ebenfalls linearen Peptid-Aptamere Linear-2 und Linear-3 wuchsen unter Selektionsbedingungen in Gegenwart des unspezifischen Bait-Konstruktes pPC97-Stat5-DD (Abb. 3.2.). Das ebenfalls lineare Peptid-Aptamer Linear-5, das in einem Hefescreen mit der Dimerisierungsdomäne von Stat5 isoliert wurde, zeigte Wachstum unter Adenin-defizienten Bedingungen in Gegenwart des unspezifischen Bait-Konstruktes pPC97-Stat3-DD. Aufgrund der unspezifischen Interaktion der linearen Peptid-Aptamere mit den Negativkontrollen wurden diese Peptid-Aptamere in den folgenden Versuchen nicht weiter berücksichtigt. Peptid-Aptamer DBD-1 zeigte nur in Gegenwart des Stat3-DBD Bait-Konstrukts Wachstum unter Selektionsbedingungen (Abb. 3.2.). Kein Wachstum auf Adenin-defizientem Medium Interaktion und damit keine konnte mit den unspezifischen Bait-Konstrukten pPC97-Stat3-DD, pPC97-Stat5-DD oder dem „leeren“-Bait-Vektor beobachtet werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die aus dem Hefe-zwei-Hybrid-Screen isolierten Peptid-Aptamere DD-1 bis DD-3 spezifisch mit der Dimerisierungsdomäne von Stat3 interagierten. Bei dem Hefe-zwei-Hybrid-Screen mit dem pPC97-Stat3-DBD Bait-Konstrukt konnte ein spezifisch bindendes Peptid-Aptamer identifiziert werden, das mit der DNA-Bindungsdomäne von Stat3 interagiert.

3.3. Interaktion der isolierten Peptid-Aptamere mit Stat3 *in vitro*

Nachdem im Mating-Ansatz die spezifische Interaktion der isolierten Peptid-Aptamere und den Bait-Konstrukten in Hefen gezeigt werden konnte, sollte im nächsten Schritt die *in vitro* Interaktion der isolierten Peptid-Aptamere mit dem gesamten Stat3-Molekül untersucht werden. Hierfür wurden Gesamtzelllysate aus humanen Stat3 exprimierenden Myelomazellen hergestellt (RPMI 8226-Zellen). Die Lysate wurden mit rekombinant exprimierten Peptid-Aptameren inkubiert. Im Anschluss wurden Stat3-Moleküle und daran assoziierte Peptid-Aptamere mit Hilfe eines Stat3-spezifischen Antikörpers an Sepharose-A-Kügelchen immobilisiert und nicht gebundene zelluläre Proteine und Peptid-Aptamere durch Waschen entfernt. Für den Nachweis der Peptid-Aptamere im Immunopräzipitat wurde ihre Integration in das Thioredoxingerüstprotein ausgenutzt. Die entstandenen Komplexe wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die im Komplex enthaltenen Peptid-Aptamere mit Hilfe eines gegen Thioredoxin (Trx) gerichteten Antikörpers mittels Western Blot Analyse detektiert (Abb. 3.3A.). Jeweils 10% der eingesetzten Peptid-Aptamer Menge wurde als

Inputkontrolle in einem weiteren Immuno Blot mit Thioredoxin-Antikörpern nachgewiesen (Abb. 3.3A., unten). Eine deutliche Interaktion konnte zwischen den Peptid-Aptameren DD-1 bis DD-3 und Stat3 nachgewiesen werden (Abb. 3.3A., Spur 1, 2 und 5).

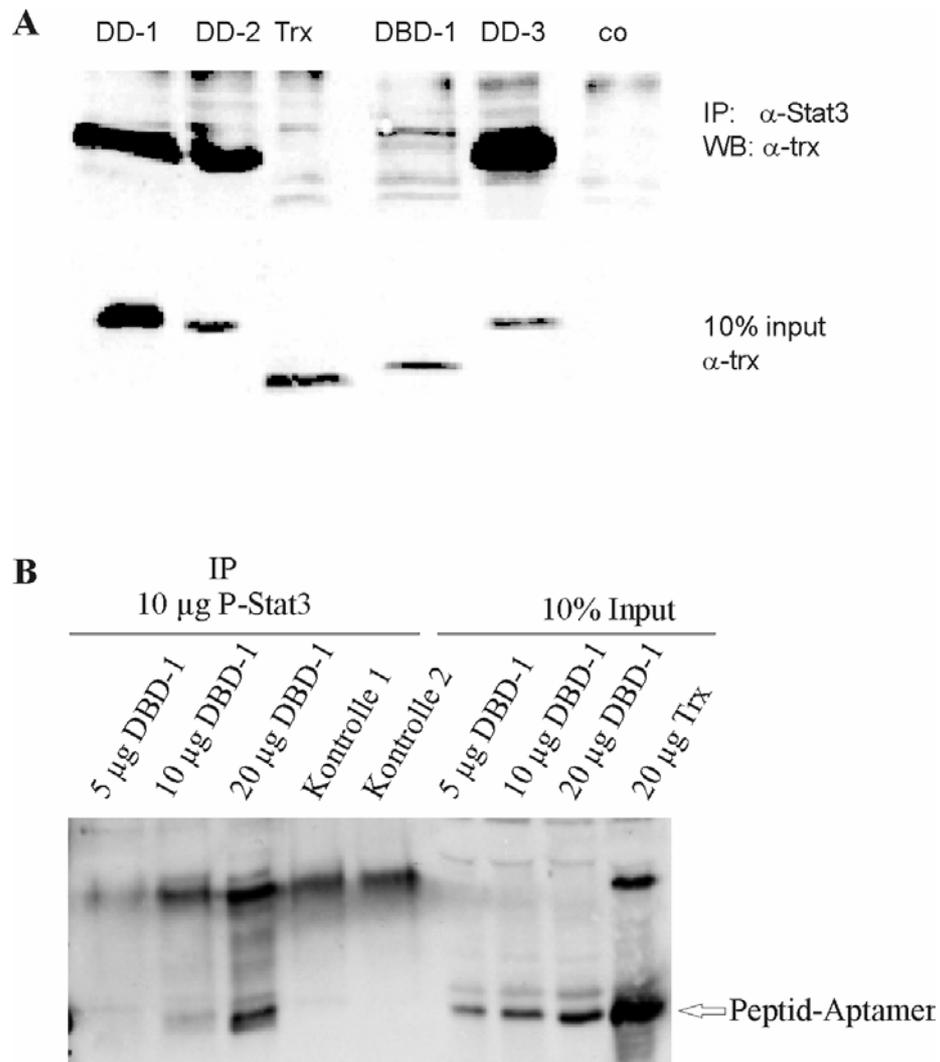


Abb. 3.3. *In vitro* Interaktion der isolierten Peptid-Aptamere mit Stat3

A: Gesamtzelllysate aus RPMI 8226-Zellen wurden mit rekombinant exprimierten Peptid-Aptameren inkubiert. B: Rekombinant exprimiertes Stat3, das phosphoryliert und dimerisiert vorliegt, wird mit unterschiedlichen Mengen an rekombinant exprimierten Peptid-Aptamer DBD-1-9R inkubiert. Für beide experimentellen Ansätze wurde mit Hilfe eines Stat3-spezifischen Antikörpers Stat3-Moleküle und daran assoziierte Peptid-Aptamere an Sepharose-A-Kügelchen immobilisiert, nicht gebundene Peptid-Aptamere durch Waschen entfernt und der erhaltene Komplex in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Im Immuno Blot konnten im Komplex vorhandene Peptid-Aptamere durch einem gegen Thioredoxin (α -Trx) gerichteten Antikörper nachgewiesen werden. Als Ladekontrolle dienten jeweils 10% der eingesetzten Peptid-Aptamer Menge. In der Western Blot Analyse konnte eine starke Bindung zwischen den Peptid-Aptameren DD-1-3 und Stat3 nachgewiesen werden (A). Mit steigenden Konzentrationen an eingesetztem Peptid-Aptamer DBD-1 konnte stärkere Interaktion zwischen Peptid-Aptamer DBD-1 und Stat3 detektiert werden (B).

Peptid-Aptamer DBD-1 zeigte in diesem *in vitro* Assay nur eine sehr schwache Interaktion mit Stat3 (Abb. 3.3A., Spur 4). Allerdings wurde im Vergleich zu den anderen Peptid-Aptameren auch eine deutlich geringere Menge an Peptid-Aptamer DBD-1 eingesetzt (Abb. 3.3A, unten.). Als Negativkontrollen dienten Gesamtzellextrakte ohne Peptid-Aptamer und Zelllysat inkubiert mit rekombinant exprimiertem Thioredoxin. In beiden Ansätzen konnte kein Thioredoxin im Komplex nachgewiesen werden (Abb. 3A., Spur 3 und 6). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Peptid-Aptamer DBD-1 eine sehr schwache Interaktion mit Stat3 zeigt (Abb. 3.3A.). Demgegenüber konnte eine deutliche Interaktion zwischen allen drei DD-Peptid-Aptameren und Stat3 nachgewiesen werden (Abb. 3.3A.).

In einem weiteren Ko-Immunopräzipitationsansatz wurde die Interaktion von Peptid-Aptamer DBD-1 mit phosphorylierten und dimerisierten Stat3-Molekülen untersucht. Das für diesen experimentellen Ansatz verwendete rekombinant exprimierte Stat3 (Becker et al. 1998) wurde von der Arbeitsgruppe um C. Müller (Grenoble) zur Verfügung gestellt. Jeweils 10 µg dimerisiertes Stat3 wurde mit steigenden Konzentrationen an rekombinant exprimiertem Peptid-Aptamer DBD-1-9R (5, 10, 20 µg) bzw. 20 µg Trx-9R gemischt. Stat3-Moleküle und daran assoziierte Peptid-Aptamere wurden durch den Einsatz von Stat3-spezifischen Antikörpern an Sepharose-A-Kügelchen immobilisiert. Nicht gebundene Peptid-Aptamere durch Waschen entfernt. Der Nachweis der Peptid-Aptamere im Präzipitat erfolgte mittels Western Blot Analyse, unter Verwendung eines anti-Thioredoxin-Antikörpers. Eine schwache Interaktion mit Stat3 und DBD-1 konnte bereits bei der Inkubation mit 10 µg des Peptid-Aptameres detektiert werden (Abb. 3.3B., Spur 2). Bei der Inkubation von 20 µg DBD-1 mit Stat3 konnte eine deutliche Interaktion festgestellt werden (Abb. 3.3B., Spur 3). Als Negativkontrolle 1 wurde dimerisiertes Stat3 mit Thioredoxin (20 µg) inkubiert. Es konnte keine Interaktion von Thioredoxin mit Stat3 detektiert werden (Abb. 3.3B., Spur 4). Als Negativkontrolle 2 diente rekombinant exprimiertes Stat3 inkubiert mit DBD-1, jedoch ohne die Zugabe von Stat3-Antikörpern. Es wurde keine unspezifische Bindung von Peptid-Aptamer DBD-1 an die Sepharose-Kügelchen nachgewiesen (Abb. 3.3B., Spur 5). Peptid-Aptamer DBD-1 ist somit in der Lage mit dimerisiertem Stat3 zu interagieren.

3.4. Molekulare Charakterisierung des inhibitorischen Einflusses der isolierten Peptid-Aptamere auf die Stat3-Signaltransduktion *in vivo* nach exogener EGF-Stimulation in Herc-Zellen

Nachdem mittels der *in vitro* Interaktionsanalysen eine Interaktion zwischen den Peptid-Aptameren und Stat3-Molekülen nachgewiesen werden konnte, sollte der Einfluss der isolierten Peptid-Aptamere auf den Stat3-Signalweg *in vivo* in Zellkultursystemen untersucht werden. Um den inhibitorischen Einfluss der Peptid-Aptamere auf die Signaltransduktion von Stat3 zu zeigen, wurden Herc-Zellen verwendet. In dieser Zelllinie ist es möglich den Stat3-Signalweg nach externem Stimulus mit dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF (engl. epidermal growth factor) zu aktivieren (Di Fiore et al. 1978).

Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die Aktivierung des Stat3-Signalweges nach Stimulation von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise des epidermalen Wachstumsfaktors EGF. Durch EGF-Stimulation kommt es zur Aktivierung der EGF-Rezeptoren, wodurch an die Rezeptoren prä-assozierte Stat3-Moleküle von c-Src phosphoryliert werden und anschließend dimerisieren. Die Stat3-Dimere wandern in den Nukleus und binden mit ihren DNA-Bindedomänen an sequenzspezifische Promotorregionen von Zielgenen und regulieren die Transkription der entsprechenden Gene (siehe Abb. 1.1.).

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die in den Hefe-zwei-Hybrid-Screens isolierten Peptid-Aptamere in der Lage sind, mit der Phosphorylierung, DNA-Bindung und der transkriptionellen Aktivität von Stat3 zu interferieren. Als Zellsystem für diese Analysen wurden Herc-Zellen verwendet. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um NIH3T3-Fibroblasten, die den humanen EGF-Rezeptor (EGFR) stabil exprimieren (Di Fiore et al. 1978). Die Stimulation der Zellen mit EGF hat die Aktivierung des Stat3-Signalweges zur Folge. Für die Transfektionsexperimente wurden die Sequenzen der Peptid-Aptamere und die Thioredoxinwildtypsequenz in den eukaryontischen Expressionsvektor pRc-CMV-VP22 subkloniert (VP22-Trx, VP22-DD-1, VP22-DD-2, VP22-DBD-1). Nach diesem Klonierungsschritt standen die Peptid-Aptamere für Transfektionsexperimente zur Verfügung und es konnten beispielsweise Reporter-gen-Experimente, DNA-Bindungsuntersuchungen, durchgeführt werden, sowie der Stat3-Phosphorylierungsstatus mittels Western Blot Analysen analysiert werden.

3.4.1. Inhibition der transkriptionellen Aktivität von Stat3 in transient transfizierten Herc-Zellen

Zunächst wurde in Reportergergenanalysen untersucht, ob die transkriptionelle Aktivität von Stat3 in Gegenwart der isolierten Peptid-Aptamere beeinflusst wird. Hierfür wurden Luziferase-Reportergergen-Experimente durchgeführt. Herc-Zellen wurden mit den Peptid-Aptameren, subkloniert in den eukaryotischen Expressionsvektor pRc-CMV-VP22, einem Stat3-abhängigen Reporterkonstrukt und einem für β -Galaktosidase kodierenden Vektor ko-transfiziert. Als Reportergergen wurde ein Luziferasegen verwendet, das unter der Kontrolle des Stat3 regulierten α -Makroglobulin-Promotors steht. Das β -Galaktosidasegen steht unter der Kontrolle eines CMV-Promotors, so dass die β -Galaktosidase kontinuierlich exprimiert wird und zur Normalisierung der Transfektionseffizienz verwendet werden kann. Das Verhältnis der Luziferaseaktivität von EGF-stimulierten Zellen zu nicht induzierten Zellen wurde berechnet und die Induktion der kontrolltransfizierten Herc-Zellen auf 100% gesetzt (Abb. 3.4., roter Balken).

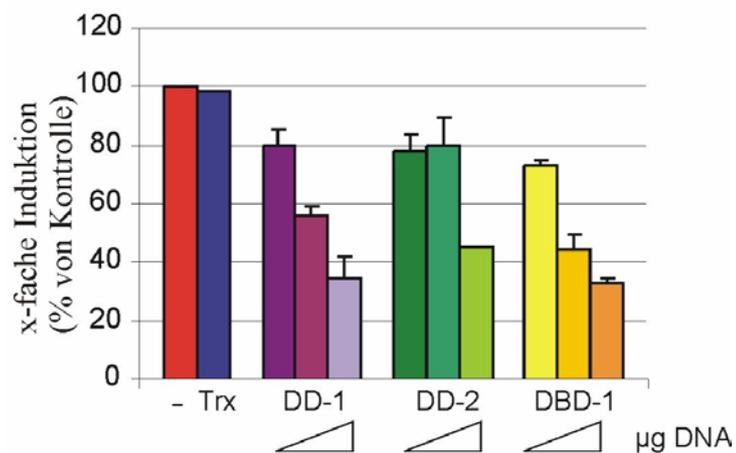


Abb. 3.4. Peptid-Aptamere inhibieren die EGF-abhängige Transaktivierungsaktivität von Stat3

Herc-Zellen wurden mit steigenden DNA-Mengen (0,5 μ g, 1,0 μ g, 1,5 μ g) pRc-CMV-VP22-DD-1 (lila), -VP22-DD-2 (grün), -VP22-DBD-1 (gelb) bzw. 1,5 μ g -VP22-Trx (blau), 0,5 μ g eines α MG-Luziferase-Expressionsvektors und 30 ng eines β -Galaktosidase-Expressionsvektors ko-transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde den Zellen für 8 Stunden das Serum entzogen, anschließend über Nacht mit 50 ng/ml EGF induziert, die Luziferase-Aktivität der Lysate bestimmt und mit den β -Galaktosidasewerten normalisiert. Das Verhältnis der EGF-stimulierten zu nicht induzierten Luziferaseaktivitäten wurde errechnet und die Werte der kontrolltransfizierten Zellen auf 100% gesetzt. Es konnte eine signifikante konzentrationsabhängige Abnahme der Luziferaseaktivität in Zellen transfiziert mit den Peptid-Aptameren im Vergleich zu Thioredoxin- bzw. kontrolltransfizierten Zellen detektiert werden ($p \leq 0,05$). *Säulen*: Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, *Balken*: Standardabweichungen.

Die erhaltenen Resultate zeigen, dass die isolierten Peptid-Aptamer die transkriptionelle Aktivität von Stat3 unterschiedlich stark inhibieren. Die Induktion der Luziferase-Aktivität und damit die transkriptionelle Aktivität von Stat3 wurde in Gegenwart steigender Mengen an transfizierten Peptid-Aptameren VP22-DD-1 (lila) und VP22-DBD-1 (gelb) konzentrationsabhängig reduziert (Abb. 3.4.). Das Peptid-Aptamer, das gegen die DNA-Bindedomäne von Stat3 gerichtet ist, zeigte schon bei geringster Menge an transfiziertem VP22-DBD-1 Expressionsplasmid eine Inhibition der EGF-induzierten Luziferase-Aktivität (Abb. 3.4.). Peptid-Aptamer VP22-DD-2 (grün) zeigte ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von Stat3 (Abb. 3.4.). Die Gegenwart von Thioredoxin (Trx, dunkelblau) hatte keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von Stat3. Die durchgeführten Reporter-Gen-Analysen zeigen, dass die isolierten Peptid-Aptamere in der Lage sind, die transkriptionelle Aktivität von Stat3 zu reduzieren.

3.4.2. Stabile Transfektion der Herc-Zellen zur molekularen Charakterisierung der inhibitorischen Funktion der Peptid-Aptamere auf den Stat3-Signalweg

Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Reporter-Gen-Analysen zeigen, dass die Peptid-Aptamere in der Lage sind die transkriptionelle Aktivität von Stat3 zu reduzieren. In den folgenden Untersuchungen sollte nun der molekulare Mechanismus, der dieser Reduktion der transkriptionellen Aktivität von Stat3 zugrunde liegt, aufgeklärt werden.

Hierzu wurden zunächst Herc-Zellen generiert, die stabil die Peptide-Aptamere exprimieren. Hierfür wurden Herc-Zellen mit den Peptid-Aptameren, subkloniert in den pRc-CMV-VP22-Vektor, transfiziert, 14 Tage in Selektionsmedium kultiviert (1 mg/ml G418), einzelne Klone isoliert, expandiert und in Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen Thioredoxin auf die Expression der Peptid-Aptamere hin untersucht. Die Expressionsanalysen zeigten, dass von allen untersuchten Einzelklonen das Wildtyp-Thioredoxin am stärksten exprimiert wurde (Abb. 3.5. unten). Aber auch die Peptid-Aptamere DD-1, DD-2 und DBD-1 wurden in den isolierten Einzelklonen exprimiert. Dabei zeigte ein Klon von Peptid-Aptamer DD-2, DD-2C1, die stärkste Expression. Von Peptid-Aptamer DD-1 wurden drei Klone weiteruntersucht, die unterschiedlich hohe Expressionsniveaus von diesem Peptid-Aptamer exprimierten (DD-1-C4 > DD-1-C19 > DD-1-C1). Die Peptid-Aptamere der Klone DD-1-C1 und DBD-1-C1 zeigten jeweils gleich starke Expressionslevels ihrer jeweiligen Peptid-Aptamere (Abb. 3.5., unten). Diese in der

vorliegenden Arbeit neugenerierten Zelllinien bildeten die Basis für die Identifikation des molekularen Mechanismus, der der Inhibition des Stat3-Signalweges durch die isolierten Peptid-Aptamere zugrunde liegt.

3.4.3. Einfluss der isolierten Peptid-Aptamere auf die DNA-Bindung von Stat3

Herc-Zellen, die eine stabile Expression der Peptid-Aptamere zeigten, wurden in Gelretardierungsexperimente eingesetzt und die DNA-Bindung von Stat3-Molekülen in Gegenwart der Peptid-Aptamere untersucht. Hierfür wurden jeweils gleiche Mengen an Lysat aus EGF stimulierten stabil transfizierten Herc-Zellen mit radioaktiv-markiertem hSIE-Oligonukleotid (high affinity mutant sis-inducible element) (Garcia et al. 1997) inkubiert und die entstandenen Komplexe auf einem nativen Gel aufgetrennt.

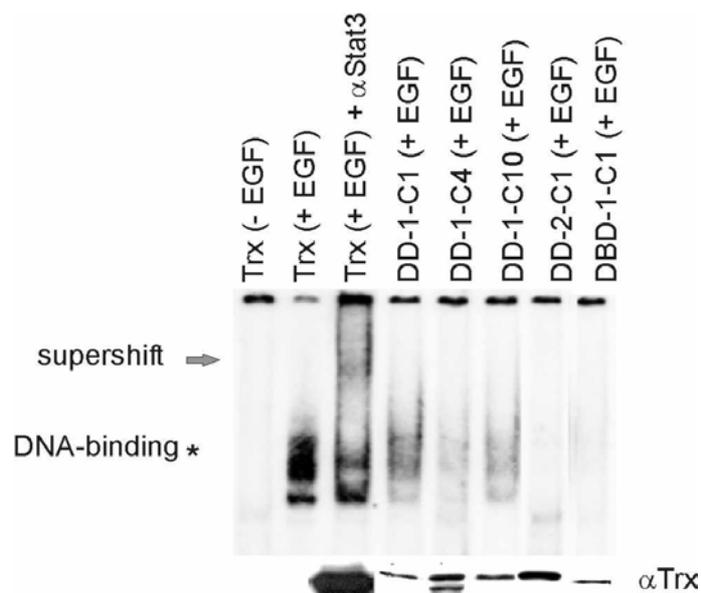


Abb. 3.5. Expression der Peptid-Aptamere inhibiert die EGF-induzierte DNA-Bindung von Stat3

Stabil mit Peptid-Aptameren transfizierte Herc-Zellen wurden über Nacht ohne Serum kultiviert, anschließend 20 Minuten mit EGF stimuliert und Gesamtzellextrakte hergestellt. Oben: Im Gelretardierungsexperiment wurden jeweils gleiche Mengen an Zelllysate mit radioaktiv-markiertem hSIE-Oligonukleotiden inkubiert und auf einem nativen Gel aufgetrennt. Für die Supershiftanalyse wurde das Lysat vor Zugabe des Oligonucleotides mit einem Stat3-spezifischen Antikörpers inkubiert. Die DNA-Bindung von Stat3 ist in Gegenwart der Peptid-Aptamere DD-1, DD-2 und DBD-1 im Vergleich zu Thioredoxin-exprimierenden Herc-Zellen deutlich reduziert. Unten: Gesamtzelllysate wurden auf einem 12% SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der Nachweis der Expressionslevels der Peptid-Aptamere erfolgte durch den Einsatz eines anti-Thioredoxin Antikörpers.

Wie in Abbildung 3.5. gezeigt, war die DNA-Bindung von Stat3 in Gegenwart der Peptid-Aptamere DD-1, DD2 und DBD-1 im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich reduziert (Abb. 3.5.). Demgegenüber zeigten Trx-exprimierende Herc-Zellen nach EGF-Stimulation eine starke Bindung von Stat3-Molekülen an das radioaktiv-markierte hSIE-Oligonukleotid (Abb. 3.5., Spur 2). Die Gegenwart des Thioredoxinproteins interferiert demnach nicht mit der DNA-Bindungsfähigkeit von Stat3-Molekülen. Die Spezifität der Stat3-Oligonukleotidbindung konnte durch Zugabe eines gegen Stat3 gerichteten Antikörpers nachgewiesen werden. Hierbei zeigten die gebildeten Stat3-Oligonukleotid-Antikörper-Komplexe ein langsames Wanderungsverhalten („Supershift“) als die Stat3-Oligonukleotid-Komplexe (Abb. 3.5., Spur 3). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass durch die Expression der Peptid-Aptamere DD-1, DD2 und DBD-1 die DNA-Bindung von Stat3-Molekülen inhibiert wird.

3.4.4. Einfluss der isolierten Peptid-Aptamere auf die Phosphorylierung von Stat3

Die oben dargestellten Gelretardierungsexperimente hatten gezeigt, dass die DNA-Bindung, ein finaler Schritt der Signaltransduktionskaskade, von Stat3 in Gegenwart der Peptid-Aptamere reduziert ist. Im Folgenden sollte in Immuno Blot Analysen der Einfluss der Peptid-Aptamere auf den Phosphorylierungsstatus von Stat3 untersucht werden. Der in den Western Blot Analysen verwendete anti-Phospho-Stat3-Antikörper ist in der Lage, spezifisch das phosphorylierte Tyrosin 705 von Stat3 zu detektieren. Die Phosphorylierung des Tyrosins 705 ist essentiell für die Aktivierung von Stat3-Molekülen (Levy and Darnell 2002).

Nach EGF-Stimulation der Kontrollzellen sowie der Thioredoxin-exprimierenden Herc-Zellen konnte eine deutliche Phosphorylierung von Tyrosin 705 detektiert werden (Abb. 3.6., Spuren 1 bis 3). Alle drei untersuchten Klone von Peptid-Aptamer DD-1, sowie der analysierte Klon von Peptid-Aptamer DD-2 zeigten eine schwächere Phosphorylierung des Tyrosins 705 nach EGF-Stimulation als Kontrollzellen und Thioredoxin-transfizierten Zellen (Abb. 3.6.). Demgegenüber hatte die Expression von Peptid-Aptamer DBD-1 keinen Einfluss auf die EGF induzierte Phosphorylierung von Stat3, wie der Vergleich mit Thioredoxin-transfizierten und nichttransfizierten Kontrollzellen zeigt (Abb. 3.6.). Die Ladekontrolle, bei der die Stat3-Gesamtmenge detektiert wurde, zeigte, dass jeweils gleiche Mengen an Protein für den Immuno Blot eingesetzt wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass

Peptid-Aptamer DBD-1, gerichtet gegen die DNA-Bindedomäne von Stat3, die Phosphorylierung von Stat3 nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu reduzieren die Peptid-Aptamere DD-1 und DD-2, die gegen die Dimerisierungsdomäne von Stat3 gerichtet sind, die Phosphorylierung von Stat3.

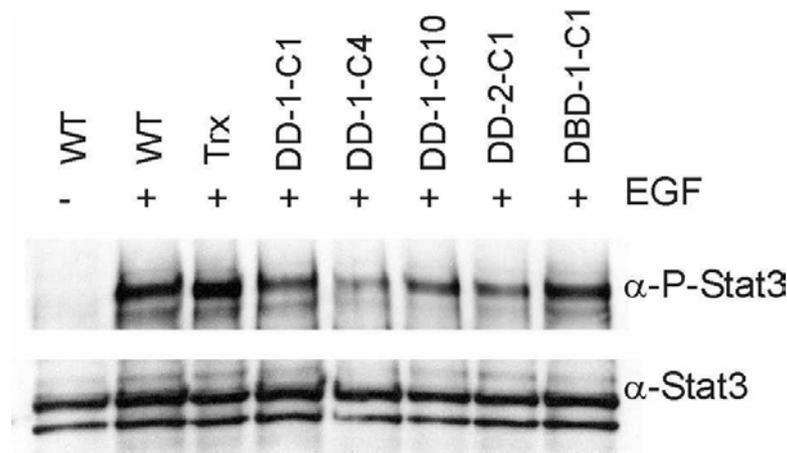


Abb. 3.6. Peptid-Aptamere, die mit der Dimerisierungsdomäne von Stat3 interagieren, reduzieren die Phosphorylierung von Stat3 nach EGF-Induktion

Stabil mit Peptid-Aptameren transfizierte Herc-Zellen wurden über Nacht ohne Serum kultiviert, anschließend 10 Minuten mit 50 ng/ml EGF stimuliert, Gesamtzellextrakte hergestellt und jeweils 20 µg auf einem 8%-igen SDS-Gel aufgetrennt. In Western Blot Analysen wurde zunächst die Menge an phosphoryliertem Stat3 mittels eines anti-Phospho-Stat3-Antikörpers, der das phosphorylierte Tyrosin 705 von nicht-phosphorylierten Tyrosin 705 diskriminieren kann, detektiert. Anschließend wurde die Membran „gestrippt“ und als Ladekontrolle die Gesamtmenge an Stat3 im aufgetragenen Lysat visualisiert. Hierfür wurde ein Antikörper verwendet, der sowohl phosphorylierte als auch nicht-phosphorylierte Stat3-Moleküle detektiert. Kein Unterschied im Phosphorylierungsgrad von Stat3 ist bei Peptid-Aptamer DBD-1-exprimierenden Zellen oder Thioredoxin-exprimierenden im Vergleich zu nichttransfizierten Kontrollzellen zu sehen. Demgegenüber ist eine reduzierte Stat3-Phosphorylierung in Klonen, die die Peptid-Aptamere DD-1 und DD-2 exprimieren, zu beobachten.

3.4.5. Die isolierten Peptid-Aptamere interferieren weder mit der Aktivierung des EGFR noch mit dem nachgeschalteten MAPK-Signalweg

Die reduzierte Phosphorylierung von Stat3 in Gegenwart der DD-Peptid-Aptamere kann auf mehreren Mechanismen beruhen. Aufgrund der gewählten Bait-Konstrukte im Hefe-zwei-Hybrid-System sollten die isolierten Peptid-Aptamere Regionen im Stat3-Molekül maskieren, die für dessen Phosphorylierung essentiell sind. Theoretisch könnten die DD-Peptid-Aptamere jedoch auch mit dem EGFR interagieren, sodass dessen Tyrosinphosphorylierung beeinflusst wird und somit nachgeschaltete Signalwege inhibiert werden.

Um diese zwei Möglichkeiten zu validieren wurde die Tyrosinphosphorylierung des EGFR nach EGF-Stimulation in Gegenwart der Peptid-Aptamere untersucht. Hierfür wurden stabil Peptid-Aptamer exprimierende Herc-Zellen mit EGF induziert und aus den hergestellten Gesamtzelllysaten der EGFR immunpräzipitiert. In einer Immuno Blot Analyse mit einem Antikörper, der phosphorylierte Tyrosinreste erkennt, wurde der Aktivierungsstatus des EGFR detektiert. Nach Stimulation der Wildtyp Herc-Zellen mit EGF war eine deutlich Zunahme der Tyrosinphosphorylierung im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen nachweisbar (Abb. 3.7., Spur 1 und 2). Weder die Gegenwart von Thioredoxin, noch die Expression der Peptid-Aptamere beeinflusste die Tyrosinphosphorylierung und damit den Aktivierungsstatus des EGFR (Abb. 3.7., Spur 3 und 8). Zwar wurde in den Klonen DD-2-C1 und DBD-1-C1 eine etwas schwächere Tyrosinphosphorylierung detektiert (Abb. 3.7., Spur 7 und 8) als in den anderen untersuchten Klonen (Abb. 3.7., Spur 2-6), doch zeigte die Inkubation der Membran mit einem EGFR-spezifischen Antikörper, dass in diesen Bahnen auch etwas geringere Mengen an Protein für die Western Blot Analyse eingesetzt wurde (Abb. 3.7, unten).

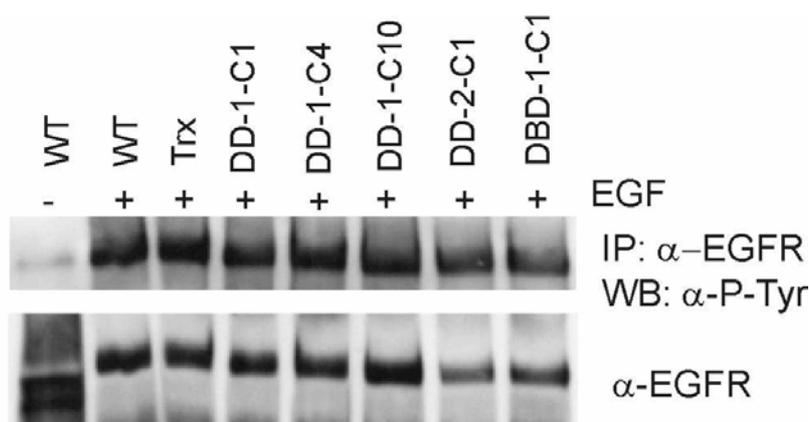


Abb. 3.7. Die isolierten Peptid-Aptamere interferieren nicht mit der Aktivierung des EGFR

Stabil Peptid-Aptamer exprimierende Herc-Zellen wurden über Nacht in serum-freien Medium kultiviert und für 10 Minuten mit EGF (50 ng/ml) stimuliert. Aus 200 µg Gesamtzellextrakt wurde mit Hilfe eines EGFR-spezifischen Antikörpers und Sepharose A-Kügelchen der EGFR immobilisiert und nach Elution auf einem 6% SDS-Gel aufgetrennt. Im Immuno Blot wurden die Phosphorylierung und damit die Aktivierung des EGFR durch den Einsatz eines Antikörpers, der spezifisch phosphorylierte Tyrosinreste erkennt, visualisiert. Als Ladekontrolle wurde die Membran mit einem Antikörper gegen den EGFR inkubiert. Stimulation der Herc-Zellen mit EGF führt zu einer starken Zunahme der Tyrosinphosphorylierung des EGFR. Die Expression von Wildtyp-Thioredoxin sowie der Peptid-Aptamer beeinflussen die Aktivierung des Rezeptors nicht.

Durch die Stimulation des EGFR kommt es zur Aktivierung von mehreren nachgeschalteten Signalwegen. Zu diesen Signalwegen gehört neben der Aktivierung des Stat3-Signalweges beispielsweise auch der Ras-Raf-Signalweg, der zur Aktivierung der MAP-Kinasen p42 und p44 führt (Olayioye et al. 2000). In Western Blot Analysen wurde der Einfluss der Peptid-Aptamer Expression auf die Aktivierung der MAP-Kinasen p42/p44 untersucht. Hierfür wurde ein Antikörper verwendet, der die phosphorylierten Threoninreste 202 und 203 der p42/p44 MAP-Kinasen nachweist. In Abwesenheit von EGF war nur eine basale Aktivität der p42/p44 MAP-Kinasen zu erkennen (Abb. 3.8., Spur 1), nach Stimulation der Herc-Zellen mit EGF wurde eine deutliche Phosphorylierung der MAP-Kinasen p42/p44 detektiert (Abb. 3.8., Spur 2). Weder in Zellen, die das Wildtyp-Thioredoxin noch in Zellen, die stabil die Peptid-Aptamere exprimieren, war die Phosphorylierung der beiden MAP-Kinaseformen p42/44 im Vergleich zu Kontrollzellen verändert (Abb. 3.8., Spuren 3 - 8).

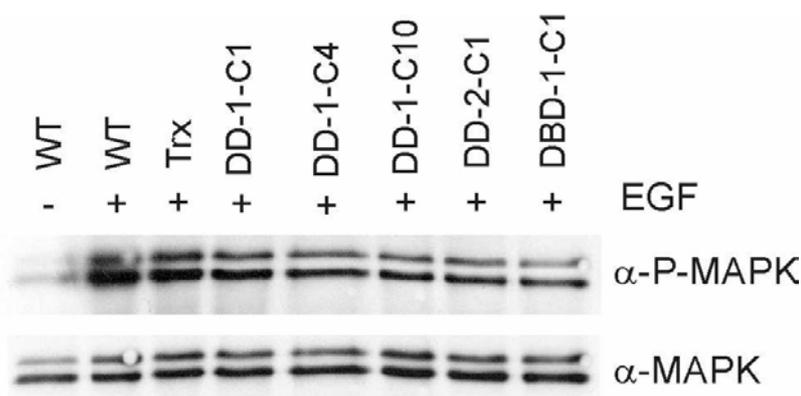


Abb. 3.8. Die Aktivierung der p42/p44 MAP-Kinasen ist in Gegenwart der Peptide-Aptamere nicht beeinflusst.

Stabil Peptid-Aptamer exprimierende Herc-Zellen wurden über Nacht in serum-freiem Medium kultiviert und für 10 Minuten mit EGF (50 ng/ml) stimuliert. 20 µg Gesamtzelleextrakt wurden auf eine 12%-igen SDS-Gel aufgetrennt. Mittels Western Blot Analyse wurde die Aktivierung der MAP-Kinasen mit einem anti-phospho-MAPK-Antikörper, der spezifisch die phosphorylierten Formen der MAP-Kinasen p42/p44 erkennt, detektiert. Die Membran wurde „gestrippt“ und als Ladekontrolle mit einem anti-MAP-Kinase Antikörper inkubiert, der die Gesamtmenge an p42/p44 MAP-Kinasen erkennt. EGF-Stimulation der Herc-Zellen führte in gleichem Maße in Kontrollzellen, in Wildtyp-Thioredoxin (Trx) oder Peptid-Aptamer exprimierenden Zellen zur Phosphorylierung der MAP-Kinasen p42/p44. Inkubation der Membran mit einem anti-MAP-Kinase-Antikörper zeigte gleiche Mengen an eingesetzten Proteinen.

Der Nachweis der gesamten p42/p44 MAP-Kinasen zeigte, dass die gleichen Mengen an Protein geladen wurden (Abb. 3.8., unten). Die Ergebnisse zur Aktivierung des EGFR (Abb. 3.7.) und des nachgeschalteten MAPK-Signalweges (Abb. 3.8.) zeigen, dass deren

Phosphorylierungen durch die Gegenwart der Peptid-Aptamer nicht beeinflusst wurden. Basierend auf diesen Daten lässt dies die Schlussfolgerung zu, dass die die isolierten DD-Peptid-Aptamere spezifisch mit der Phosphorylierung von Stat3 interferieren.

3.5. Einfluss von Peptid-Aptamer DBD-1 auf Tumorzellen mit konstitutiv-aktivem Stat3

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass in verschiedensten Tumorzelllinien, eine konstitutive Aktivierung von Stat3 vorliegt (Bowman et al. 2000). Die Blockierung des Stat3-Signalweges mit unterschiedlichsten Inhibitoren hatte eine Reduzierung des Tumorzellwachstums zur Folge und häufig kam es zur Initiation des programmierten Zelltodes (Catlett-Falcone et al. 1999; Niu et al. 1999; Epling-Burnette et al. 2001). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde in weiteren Versuchen der Einfluss der isolierten Peptid-Aptamere auf den Stat3-Signalweg in zwei Tumorzelllinien mit konstitutiver Aktivierung von Stat3 näher analysiert. Hierfür wurden zwei Methoden zur Applikation der Peptid-Aptamer in Zellen eingesetzt. Zum einen wurden die kodierenden Sequenzen der Peptid-Aptamere, wie oben beschrieben, subkloniert in einen eukaryotischen Expressionsvektor mittels Transfektion in Zellen eingebracht. Zum anderen wurden rekombinant exprimierte Peptid-Aptamere als Oligopeptide mittels Proteintransduktion in Zellen eingeschleust.

3.5.1. Peptid-Aptamer DBD-1 hemmt die transkriptionelle Aktivität von Stat3 in murinen Melanomzellen

Zunächst wurde der Einfluss der Peptid-Aptamere in der murinen Melanomzelllinie B16, die eine konstitutive Aktivierung des Stat3-Signalwegs aufweist, untersucht (Niu et al. 1999). Durch transiente Transfektionen sollte in Reporter-Gen-Experimenten untersucht werden, ob die isolierten Peptid-Aptamere auch in Tumorzellen mit konstitutiv-aktiviertem Stat3 in der Lage sind, die transkriptionelle Aktivität von Stat3 zu inhibieren. B16-Zellen wurden hierfür mit einem Stat3-abhängigen Luziferasereporterkonstrukt (α MG-luc), den Peptid-Aptamersequenzen (VP22-trx, VP22-D-2 oder VP22-DBD-1) und einem β -Galaktosidase-Expressionsvektor ko-transfiziert.

36 Stunden nach Transfektion wurde die Luziferase-Aktivität gemessen und zur Normalisierung der Transfektionseffizienz die Werte gegen die β -Galaktosidasewerte

abgeglichen. Die Luziferaseaktivität der kontrolltransfizierten B16-Zellen wurden als 100% gesetzt (Abb. 3.9.). Sowohl die Transfektion von VP22-Trx als auch die Transfektion mit VP22-DD-1 oder VP22-DD-2 hatte keinen Einfluss auf die Luziferaseaktivität (Abb. 3.9.). Somit interferieren beide Proteine nicht mit der transkriptionellen Aktivität von Stat3. Im Gegensatz dazu kam es nach Transfektion von VP22-DBD-1 zu einer deutlichen Reduktion der Luziferaseaktivität (Abb. 3.9.). Das Peptid-Aptamer DBD-1 ist somit in der Lage die Stat3-Signaltransduktion zu inhibieren.

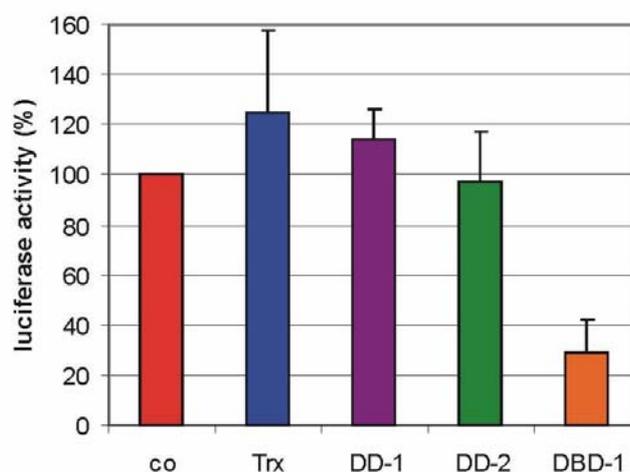


Abb. 3.9. Peptid-Aptamer DBD-1 inhibiert die transkriptionelle Aktivität von Stat3

B16-Zellen wurden mit 1,5 µg VP22-DD-1, VP22-DD-2, VP22-DBD-1 und VP22-Trx, bzw. 0,5 µg αMG-Luziferase-Expressionsvektors und 30 ng β-Galaktosidase-Expressionsvektors ko-transfiziert. 36 Stunden nach Transfektion wurde die Luziferaseaktivität bestimmt und mit den β-Galaktosidasewerten normalisiert. Die Luziferaseaktivitäten der kontroll-transfizierten Zellen wurden auf 100% gesetzt. Eine signifikante Abnahme der Luziferaseaktivität konnte in Zellen transfiziert mit Peptid-Aptamer DBD-1 (orange) im Vergleich zu Thioerodoxin- (blau), DD-1 (lila), DD-2 (grün) bzw. kontrolltransfizierten (rot) Zellen detektiert werden ($p \leq 0,05$). *Säulen*: Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, *Balken*: Standardabweichungen.

3.5.2. Peptid-Aptamer DBD-1 inhibiert die Expression von VEGF in murinen Melanomazellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Peptid-Aptamer DBD-1 in der Lage ist die transkriptionelle Aktivität von Stat3 am αMG-Promotor zu inhibieren, wurde in einem weiteren Versuch analysiert, ob diese Interferenz auch bei einem Zielprotein von Stat3 nachgewiesen werden kann. Ein bekanntes Zielprotein stellt der vaskuläre epitheliale Wachstumsfaktor VEGF (*engl.*: vascular endothelial growth factor) dar (Niu et al. 2002).

Für diesen experimentellen Ansatz wurden B16-Zellen transient mit den Peptid-Aptamersequenzen (VP22-trx, VP22-D-2 oder VP22-DBD-1) transfiziert, Lysate hergestellt und im Western Blot Analysen auf die vorhandenen Mengen an VEGF untersucht. Gleiche Expressionslevel von VEGF konnte in kontrolltransfizierten, Trx-transfizierten, und mit einem Kontrollpeptid transfizierten B16-Zellen detektiert werden (Abb. 3.10., Spur 1-3). Im Gegensatz dazu konnte eine deutliche Reduktion der VEGF-Expression in DBD-1, DD-1- und DD-2 transfizierten B16-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.10., Spur 4).

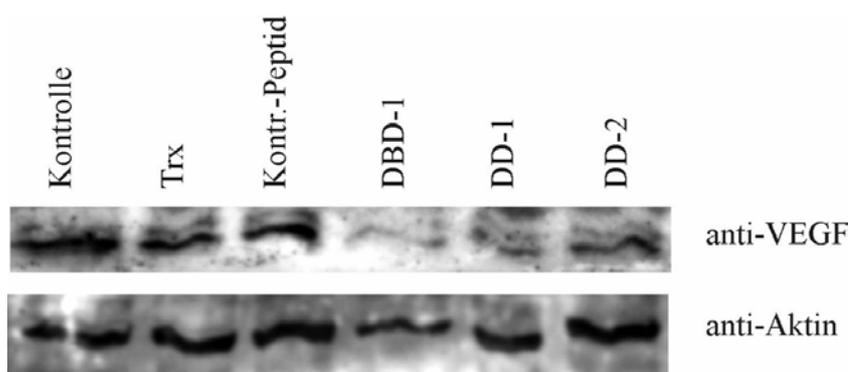


Abb. 3.10. Peptid-Aptamere reduzieren die Expression des Stat3-Zielgens VEGF

B16-Zellen wurden mit 2 µg VP22-Trx, VP22-Kontr.-Peptid, VP22-DD-1, VP22-DD-2, VP22-DBD-1 transfiziert, 36 Stunden nach der Transfektion geerntet und Gesamtzellextrakte hergestellt. Je 50 µg Gesamtzelllysate wurden auf eine 12% SDS-Gel geladen, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem VEGF-spezifischen Antikörper inkubiert. Der Nachweis erfolgte mittels Meerrettichperoxidase-gekoppelter sekundärer Antikörper. Als Ladekontrolle wurde die Membran mit Antikörpern gegen Aktin inkubiert. Eine Reduktion der VEGF-Expression konnte in DBD-1, DD-1 und DD-2 transfizierten Zellen nachgewiesen werden.

3.5.3. Transiente Expression von Peptid-Aptamer DBD-1 inhibiert die Proliferation von murinen Melanomazellen

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die Expression der Peptid-Aptamere das Überleben der B16-Zellen beeinflusst. Hierfür wurden B16-Zellen transfiziert und 12 Stunden nach Transfektion in einer 96-Lochplatte ausgesät. In Zeitintervallen von 24 Stunden wurde die relative Anzahl an lebenden Zellen mittels eines XTT-Testes (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt) bestimmt. Die relative Anzahl der lebenden Zellen wird über die Extinktionsänderung, die bei der Umsetzung des Tetrazoliumsalzes durch eine mitochondrialen Dehydrogenase entsteht, errechnet.

Dabei gilt, je größer die Extinktionsänderung ist, desto höher ist die Anzahl an lebenden Zellen in der Probe. Die Veränderung der Extinktion der Kontrollzellen am Tag 3 wurde als 100% lebende Zellen definiert. Die relative Anzahl der lebenden Zellen wurde bezogen auf die Extinktionsänderung der Kontrollzellen von Tag 3 berechnet (in %). Die Expression der Peptid-Aptamere DBD-1 (gelb) und DD-1 (lila) reduzierte die relative Anzahl der lebenden Zellen im Versuchsansatz deutlich im Vergleich zu kontroll- (rot) bzw. Trx- (blau) transfizierten Zellen (Abb. 3.11.). Die Gegenwart von Peptid-Aptamer DD-2 (grün) beeinträchtigte ebenfalls die relative Anzahl an lebenden Zellen (Abb.3.11.).

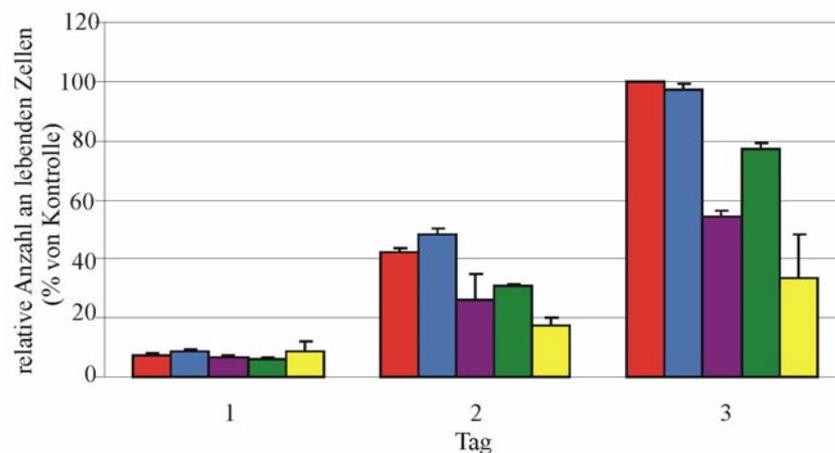


Abb. 3.11. Transiente Expression der Peptid-Aptamere inhibiert die Proliferation von murinen Melanomazellen

B16-Zellen wurden transfiziert und 12 Stunden nach der Transfektion 10^3 B16-Zellen / Loch in einer 96-Lochplatte ausgesät. Die relative Anzahl der lebenden Zellen wurde alle 24 Stunden mittels XTT bestimmt. Die relative Zellzahl der Kontrollzellen (rot) am Tag 3 wurde 100% gesetzt. Die Expression der Peptid-Aptamere reduziert die Anzahl der lebenden Zellen im Vergleich zu Kontroll- oder Trx-behandelten B16-Zellen. Kontrolle: rot; Trx: blau; DD-1: lila; DD-2 grün; DBD-1: gelb. Säulen repräsentieren drei unabhängige Experimente; Balken: Standardabweichung.

3.5.4. Induktion von Apoptose als Folge der Transfektion von Peptid-Aptamer DBD-1 in murinen Melanomazellen

Bereits publizierte Daten belegen, dass das Überleben von B16-Melanomazellen von der konstitutiven Aktivierung von Stat3 abhängig ist (Niu et al. 1999; Niu et al. 2000). Im Folgenden sollte daher validiert werden, ob die isolierten Peptid-Aptamere in der Lage sind den Stat3-Signalweg so effektiv zu inhibieren, um in den transfizierten Zellen Apoptose auszulösen. Ein Charakteristikum für Apoptose ist die Fragmentierung von genomischer DNA. Mit Hilfe eines TUNEL-assays (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein-dUTP Nick End Labeling) können die bei der Fragmentierung von DNA

entstehenden freien 3'OH DNA-Überhänge enzymatisch verlängert werden und dabei fluoreszenz-markierte dUTPs inkorporiert werden. Die Nuklei apoptotischer Zellen können anschließend fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden.

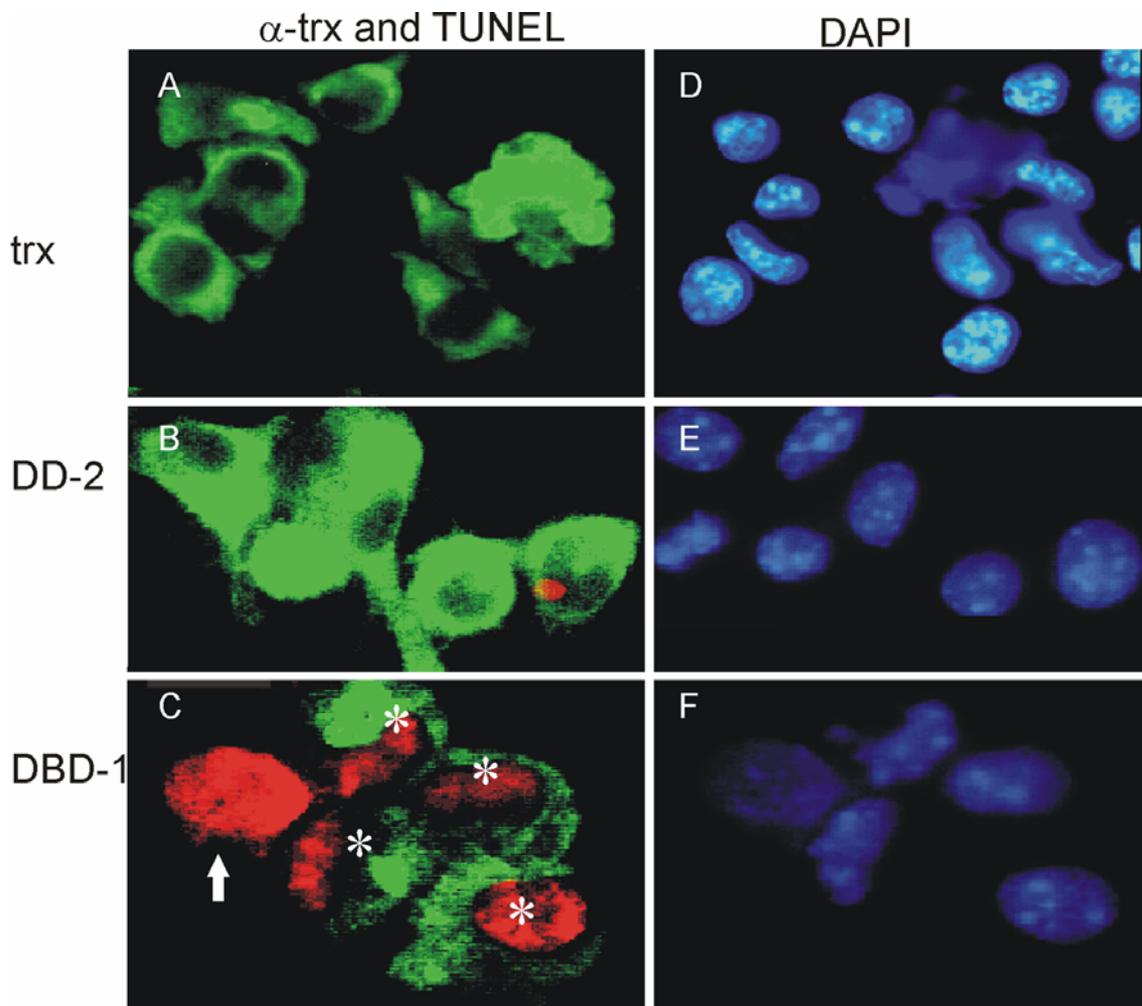


Abb. 3.12. Peptid-Aptamer DBD-1 induziert Apoptose in B16-Zellen

B16-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und mit 1,5 µg VP22-Trx, VP22-DD-1, VP22-DD-2 oder VP22-DBD-1 transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen einer TUNEL-Färbung unterzogen. Im Anschluss wurde eine indirekte Immunofluoreszenz mit einem primären Antikörper gegen Thioredoxin durchgeführt. Die Visualisierung der gebundenen Thioredoxin-Antikörper erfolgte mittels AlexaFluor488 gekoppelter sekundärer Antikörper. Der Kernfarbstoff DAPI diente zur Visualisierung aller Zellen. Transfizierte Zellen zeigten eine grüne cytoplasmatische Färbung, apoptotische Zellen sind anhand ihrer roten Nuklei zu identifizieren. Eine positive TUNEL-Reaktion ist nur in den DBD-1 transfizierten B16-Zellen zu detektieren. Keine TUNEL-Färbung ist in Trx-, bzw. DD-2 transfizierten Zellen nachweisbar. *Stern*: Trx +/TUNEL+ -Zellen; *Pfeil*: Trx-/TUNEL+-Zelle.

Für diesen experimentellen Ansatz wurden B16-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und mit VP22-Trx, VP22-DD-1, VP22-DD-2 oder VP22-DBD-1 transfiziert. 48 Stunden nach

Transfektion wurden die Zellen einer Trippelmarkierung unterzogen. Hierfür wurde mit denselben Zellen zunächst einer TUNEL-Färbung durchgeführt. Um Zellen zu identifizieren, die die transfizierten Peptid-Aptamere exprimieren, wurde im Anschluß an die TUNEL-Reaktion noch eine indirekte Immunfluoreszenz mit einem primären Antikörper gegen Thioredoxin durchgeführt, zur Visualisierung wurde ein AlexaFluor488 gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet. Zur Visualisierung aller Zellen wurde der DNA-Farbstoff DAPI (4'-Diämino-2-Phenylindol) verwendet (Abb. 3.12D-F.). In Abbildung 3.12 sind exemplarisch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen dieser angefärbten B16-Zellen dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die grüne zytoplasmatische Trx-Färbung der transfizierten Zellen (Abb. 3.12 A-C). Ein Vergleich der Trx-angefärbten Zellen mit den DAPI-gefärbten Nuklei zeigte, dass nicht alle Zellen transfiziert wurden. Die Transfektionsrate lag zwischen 65 – 90 %. Bei Trx- (Abb. 3.12A.), DD-1- (nicht gezeigt) bzw. DD-2-transfizierten Zellen (Abb. 3.12A.) konnten nur vereinzelt TUNEL-positive Zellen detektiert werden. Wohingegen zahlreiche Zellen, die mit dem Peptid-Aptamer VP22-DBD-1 transfiziert wurden, eine TUNEL-positive rote Färbung der Nuklei zeigten (Abb. 3.12C., Stern). Peptid-Aptamer DBD-1 ist demnach in der Lage in den Stat3-abhängigen murinen Melanomazellen Apoptose einzuleiten.

Zur Quantifizierung dieses Experimentes wurde die Anzahl an TUNEL-positiven Nuklei mit der Anzahl an DAPI-gefärbten Nuklei korreliert. Das Ergebnis dieser Quantifizierung ist in Tabelle 3.2. dargestellt. Die Zahl apoptotischer Zellen in den VP22-DBD-1 transfizierten Melanomazellen beträgt ca. 50%. Im Gegensatz dazu wiesen VP22-Trx, VP22-DD-1 und VP22-DD-2 transfizierte Zellen jeweils ca. 3% TUNEL-positive und damit apoptotische Zellen auf (Tab. 3.2.). Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder der transfizierten B16-Zellen ergaben darüber hinaus, dass nicht nur Zellen, die das Peptid-Aptamer DBD-1 exprimierten, sondern auch benachbarte nicht-transfizierte Zellen TUNEL positiv waren (Abb. 3.12C., Pfeil).

In der Quantifizierung der TUNEL-Daten wurde zudem die Anzahl Peptid-Aptamer exprimierender und TUNEL-positiver Zellen (Trx+/TUNEL+) mit nicht-exprimierenden, aber ebenfalls TUNEL-positiven Zellen (Trx-/TUNEL+) korreliert. Nach der Transfektion von Wildtyp-Thioredoxin (Trx), Peptid-Aptamer DD-1 oder DD-2 war Apoptose zum größten Teil nur in transfizierten, d.h. das Peptid-Aptamer exprimierenden Zellen nachweisbar. Weniger als 0,5% der Zellen waren nicht-transfiziert und TUNEL positiv (Trx-/TUNEL+) (Tab. 3.2). Im Gegensatz dazu resultierte die Transfektion von Peptid-Aptamer DBD-1 in 11% Trx-/TUNEL+ Zellen. Dieses Ergebnis lässt einen „Bystander-Effekt“,

vergleichbar zu den bereits publizierten Daten mit dominant-negativem Stat3 in B16-Zellen, vermuten (Niu et al. 1999).

Peptid- Aptamer	TUNEL+ (% Gesamtzellzahl)	Trx+ / TUNEL+ (% Gesamtzellzahl)	Trx - / TUNEL+ (% Gesamtzellzahl)
Co	2.0	2.0	0.0
Trx	2.9	2.7	0.2
DD-1	2.3	2.0	0.3
DD-2	2.1	1.9	0.2
DBD	51.1	40.0	11.1

Tab. 3.2. Quantifizierung der TUNEL-positiven B16-Zellen nach Transfektion mit Peptid-Aptameren

Die bisher gewonnenen Daten aus transfizierten B16-Zellen zeigen, dass die Peptid-Aptamere gegen die Dimerisierungsdomäne von Stat3 weniger effektiv in ihrer inhibierenden Funktion gegen Stat3 sind. Demgegenüber wurde mit Peptid-Aptamer DBD-1 ein potenter Inhibitor des Stat3 Signalweges identifiziert. Durch die Blockierung des Stat3-Signalweges ist Peptid-Aptamer DBD-1 in der Lage die transkriptionelle Aktivität von Stat3 zu inhibieren und darüber hinaus in Stat3-abhängigen murinen Melanomzellen Apoptose zu induzieren.

3.6. Proteintransduktion als neue Methode zur Applikation von Proteinen in eukaryontische Zellen

Die Zellmembran ist für Proteine meist nicht permeabel. In den letzten Jahren konnten jedoch Proteindomänen identifiziert werden, die es ermöglichen daran fusionierte Proteine durch die Zellmembran zu schleusen (Schwarze and Dowdy, 2000, Frankel and Pabo 1988; Green and Loewenstein 1988). Neben der Transfektion der Peptid-Aptamer DNA wurde in der vorliegenden Arbeit diese Methode zur Einbringung der Peptid-Aptamere in Zielzellen etabliert. Hierfür wurden Peptid-Aptamere als Fusionsproteine mit Hilfe einer Proteintransduktionsdomäne, bestehend aus neun Argininen (9R), in Zielzellen eingeschleust.

3.6.1. Expression, Aufreinigung und Aufnahme der rekombinant exprimierten Peptid-Aptamere

Für die Proteintransduktion wurde zunächst ein bakterieller Expressionsvektor konstruiert, der für eine Proteintransduktionsdomäne bestehend aus 9 L-Argininen (9R), Histidin-Tags zur Aufreinigung der rekombinant exprimierten Proteine und der Peptid-Aptamersequenzen kodiert (pET-9R) (Abb. 3.13.).

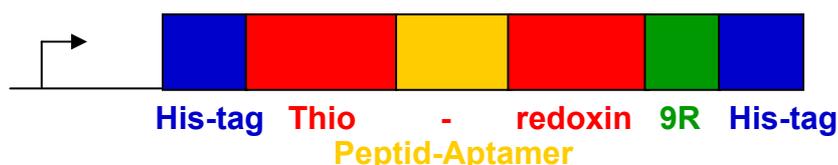


Abb. 3.13. Aufbau des Konstruktes für die rekombinante Expression von Peptid-Aptameren mit einer Proteintransduktionsdomäne

In den bakteriellen Expressionsvektor pET30a+ (Novagen) wurde die kodierende Sequenz der Peptid-Aptamere (gelb) im Thioredoxinscaffold (rot) C-terminal mit einer Proteintransduktionsdomäne kodierend für neun Arginine (9R, grün) kloniert. Die Expression des Fusionskonstruktes wird über den T7-Promotor reguliert. Die Histidin-Markierungen (His-tags, blau) dienen der Aufreinigung des exprimierten Konstruktes über eine Ni^{2+} -Affinitätschromatographiesäule.

Die bakterielle Expression der Peptid-Aptamere wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG für 4-5 Stunden bei Raumtemperatur induziert. Die Lyse der Bakterien erfolgt unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff), da Vorexperimente darauf hingewiesen hatten, dass das rekombinant exprimierte Peptid-Aptamer vor allem in den „inclusion bodies“ der Bakterien verpackt wurde. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der Peptid-Aptamere aus dem Bakterienlysat über eine Nickel²⁺-Affinitätschromatographiesäule. Die Elution erfolgte mit 250 mM Imidazol/8 M Harnstoff in PBS. Hierbei wurden je 6 Fraktionen à 2 ml gesammelt. Die Fraktionen, die eluierte Peptid-Aptamere enthielten (Abb. 3.14A., Spuren 5-7), wurden durch Dialyse gegen PBS renaturiert. Nach der Dialyse wurde die Peptid-Aptamer-Konzentration sowohl photometrisch (Bradford) als auch über den Vergleich zu BSA-Standards im SDS-Gel nach Coomassiefärbung bestimmt (Abb. 3.14B.).

Die rekombinant exprimierten Proteine werden im Folgenden als DD-1-9R, DD-2-9R, DD-3-9R, DBD-1-9R oder Trx-9R bezeichnet.

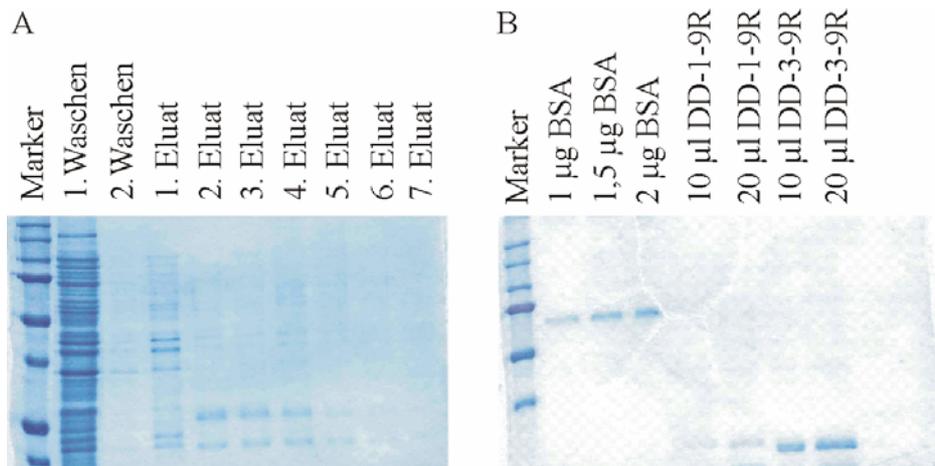


Abb. 3.14. Reinigung rekombinant exprimierter Peptid-Aptamere mittels Affinitätschromatographie und deren Konzentrationsbestimmung nach Renaturierung

A: Der Bakterienstamm *E. coli* BL21 (DE3)LysS wurden mit den entsprechenden bakteriellen Expressionsvektoren (z. B. pET-9R-DD-1) transformiert und die bakterielle Expression der Peptid-Aptamere durch 0,5 mM IPTG, bei vier Stunden Raumtemperatur induziert. Die Aufreinigung der Peptid-Aptamere erfolgte unter denaturierenden Bedingungen über eine Ni²⁺-Affinitätschromatographiesäule. Es wurden zwei Waschfraktionen (Spur 2 und 3) sowie 7 Elutionsfraktionen (Spur 4 - 10) entnommen, von denen jeweils 10 µl auf einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Coomassiefärbung visualisiert wurden. Die Eluate 2 bis 4 (Spur 5 bis 7) wurden in die Dialyse eingesetzt. **B:** Densitometrische Bestimmung der Peptid-Aptamer-Konzentration nach der Renaturierung. 10 bzw. 20 µl der renaturierten Peptid-Aptamere DD-1-9R (Spur 4 und 6) und DD-3-9R (Spur 5 und 7) wurden auf einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt. Zur Abschätzung der Proteinkonzentration wurden 1 µg, 1,5 µg und 2 µg BSA aufgetragen (Spur 1-3). Das Gel wurde mit Coomassie Blue gefärbt, anschließend entfärbt und die Konzentration der Proteinlösung durch Vergleich mit den Intensitäten der BSA-Banden abgeschätzt.

Zunächst wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz untersucht, ob die rekombinant exprimierten, gereinigten und renaturierten Peptid-Aptamere von den Zielzellen aufgenommen wurden (Abb. 3.15). Dazu wurden 0,5 mM renaturierte Peptid-Aptamere für vier Stunden zu Zellen in das Kulturmedium gegeben. Anschließend wurden die Zellen intensiv gewaschen, fixiert und eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Zur Detektion der Peptid-Aptamere wurde ihre Integration in das Thioredoxingerüstprotein ausgenutzt. Nach der Inkubation mit einem anti-Thioredoxinantikörper erfolgte die Visualisierung der Peptid-Aptamere durch Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern (grüne Markierung). Zur Visualisierung aller Zellen wurden die Nuklei mit dem „Kernfarbstoff“ DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole) angefärbt. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung ergab, dass durch Proteintransduktion das rekombinant exprimierte Peptid-Aptamer DBD-1-9R in nahezu 100% der murinen B16-Zellen eingeschleust werden konnte (Abb. 3.15.).

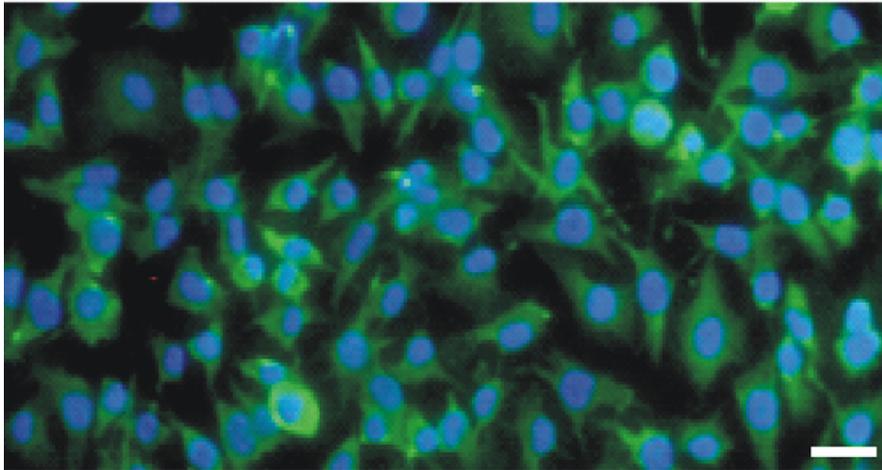


Abb. 3.15. Peptid-Aptamere, fusioniert mit einer Proteintransduktionsdomäne aus neun Argininen transduzieren effizient in B16-Zellen

Auf Deckgläschen ausgesäte B16-Zellen wurden für 4 Stunden mit Peptid-Aptamer DBD-1-9R transduziert, mit PBS gewaschen und mit Methanol fixiert. Anschließend wurde eine Doppelmarkierung durch indirekte Immunfluoreszenz und Anfärbung der Nuklei mit DAPI durchgeführt. Als primärer Antikörper wurde ein anti-Thioredoxinantikörper (Kaninchen), als sekundärer ein anti-Kaninchen Alex488 Antikörper verwendet. Die grüne cytoplasmatische Färbung zeigt deutlich die Aufnahme der Peptid-Aptamere in die Zellen. Die Nuklei der Zellen wurden mit DAPI gefärbt (blau). *Größenbalken* 10 μm .

3.6.2. Funktionelle Analyse des transduzierten DBD-1-9R Peptid-Aptamers

Nachdem die Transduktion des rekombinanten Peptid-Aptamers DBD-1-9R in die murinen B16-Zellen gezeigt werden konnte, sollte untersucht werden, ob das aufgenommen Peptid-Aptamer in der Lage ist die Überlebensrate der B16-Zellen zu beeinflussen. Hierfür wurden die Zellen in einer 96-Lochplatte ausgesät und alle 12 Stunden mit 180 nM bzw. 360 nM Peptid-Aptamer DBD-1-9R, als Kontrolle wurde die Zellen mit entsprechenden Mengen an Trx-9R transduziert. In Zeitintervallen von 24 Stunden wurde die relative Anzahl an lebenden Zellen mittels eines XTT-Testes bestimmt. Die relative Anzahl der lebenden Zellen wurde über die Extinktionsänderung, die bei der Umsetzung des Tetrazoliums Salzes durch eine mitochondriale Dehydrogenase entstand, errechnet. Die Änderung der Extinktion der Kontrollzellen am Tag 3 im Vergleich zum Leerwert wurde als 100% lebende Zellen definiert. Die relative Anzahl der lebenden Zellen wurde bezogen auf die Extinktionsänderung der Kontrollzellen von Tag 3 berechnet (in %).

Die Transduktion von Peptid-Aptamer DBD-1-9R resultierte sowohl bei 180 nM (orange) als auch bei 360 nM (gelb) in einer signifikanten Abnahme in der Anzahl von lebenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Transduktion von 180 nM Trx-9R (hellblau) hatte keinen Einfluss auf die Überlebensrate der Zellen (Abb. 3.16.).

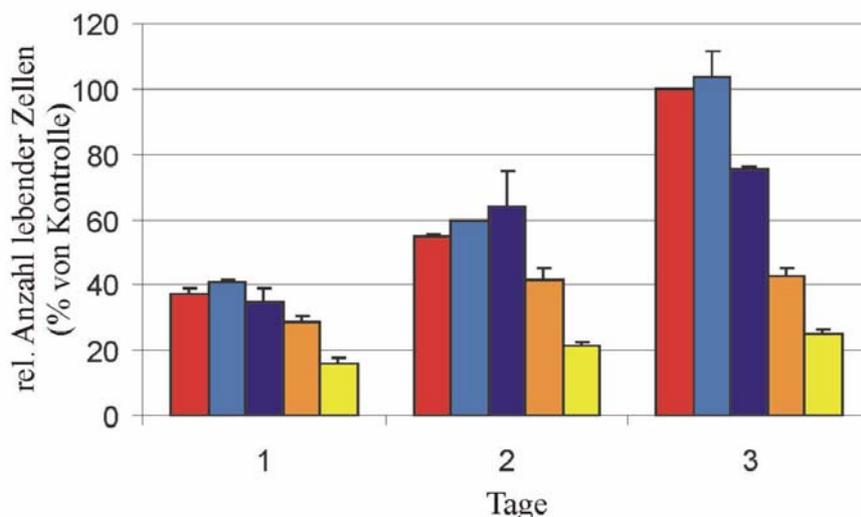


Abb. 3.16. Transduktion von Peptid-Aptamer DBD-1-9R reduziert die Überlebensrate von murine Melanomzellen

10^3 B16-Zellen/Loch einer 96-Lochplatte wurden ausgesät und alle 12 Stunden mit den angegebenen Mengen an Peptid-Aptamer DBD-1-9R-, bzw. Trx-9R- behandelt. Die relative Anzahl der lebenden Zellen wurde alle 24 Stunden mittels XTT bestimmt. Die relative Zellzahl der Kontrollzellen am Tag 3 wurde 100% gesetzt. In Gegenwart von Peptid-Aptamer DBD-1 ist die Anzahl der lebenden Zellen im Vergleich zu Kontroll- oder Trx-behandelten B16-Zellen signifikant reduziert. Kontrolle: rot; 180 nM Trx-9R: hellblau; 360 nM Trx-9R: dunkelblau, 180 nM DBD-1-9R: orange; 360 nM DBD-1-9R: gelb. Säulen: Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, Balken: Standardabweichung ($p \leq 0,05$).

Demgegenüber konnte mit Peptid-Aptamer DBD-1-9R bereits bei dieser geringen Menge eine signifikante Reduzierung der Überlebensrate beobachtet werden. Bei der Transduktion von 360 nM Trx-9R (dunkelblau) wurde ebenfalls eine Reduktion der Lebensfähigkeit im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet. Dieser hemmende Effekt war jedoch im Vergleich zu dem induzierten Effekt des Peptid-Aptamers DBD-1-9R signifikant geringer.

3.6.3. Einfluss von Peptid-Aptamer DBD-1 auf das Überleben von humanen Myelomzellen

Der wachstumsinhibitorische Effekt von Peptid-Aptamer DBD-1 sollte in einer weiteren Zelllinie mit konstitutiv-aktivem Stat3 verifiziert werden. Hierfür wurde die humane Myelomazelllinie U266 gewählt, die in ihrem Überleben von einer konstitutiven Aktivierung des Interleukin-6/Jak/Stat3-Signalweges abhängig ist (Catlett-Falcone et al. 1999). Da diese Zelllinie eine niedrige Transfektionseffizienz aufweist (eigene Daten nicht gezeigt; siehe

Catlett-Falcone et al. 1999), wurden die im Folgenden beschriebenen Experimente mit Proteintransduktion von rekombinant exprimierten Proteinen durchgeführt.

3.6.3.1. Peptid-Aptamer DBD-1 inhibiert die Proliferation von humanen Myelomazellen mit konstitutiv-aktivem Stat3

Um den Einfluss des Peptid-Aptamers DBD-1 auf das Wachstum der humanen Myelomazelllinie U266 zu testen, wurden die Zellen alle 12 Stunden transduziert und die Zellzahl alle 24 Stunden ermittelt. Hierbei wurden steigende Konzentrationen (90 nM - 450 nM) von Peptid-Aptamer DBD-1 eingesetzt. Es zeigte sich, dass bereits die Transduktion von 180 nM DBD-1-9R (rosa) einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation der Myelomazellen im Vergleich zu Trx-9R bzw. kontroll-behandelten Zellen hatte. Eine 50%ige Wachstumsinhibition wurde mit 270 nM DBD-1-9R (orange) erreicht (Abb. 3.17.). Als Kontrolle dienten Zellen, die mit Trx-9R transduziert wurden. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen hatte die Zugabe von 450 nM Trx-9R (grün) nur einen sehr geringen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der U266-Zellen (Abb. 3.17.). Geringere Dosen an Trx-9R beeinflussten das Wachstum der U266-Zellen nicht (Daten nicht gezeigt). Demnach ist Peptid-Aptamer DBD-1-9R in der Lage die Proliferation der humanen U266-Tumorzellen zu inhibieren.

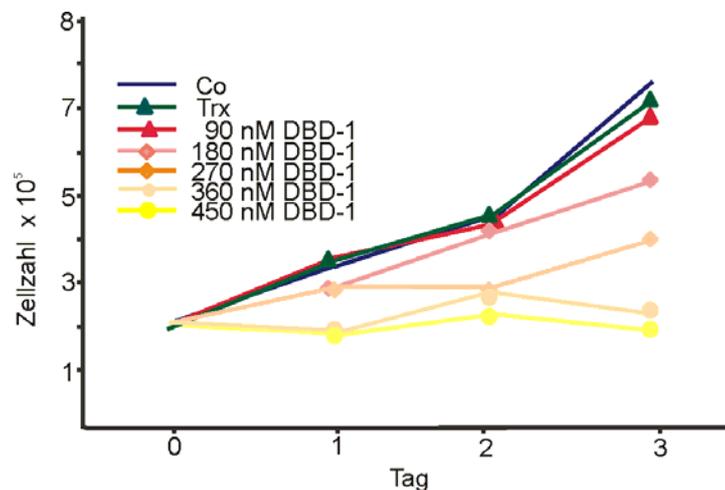


Abb. 3.17. Peptid-Aptamer DBD-1 hemmt die Proliferation in humanen Myelomazellen

2×10^5 U266-Zellen/ml wurden ausgesät und alle 12 Stunden mit den angegebenen Mengen an Peptid-Aptamer DBD-1-9R, bzw. Trx-9R behandelt. Die Zellzahl wurde alle 24 Stunden bestimmt. Peptid-Aptamer DBD-1-9R hemmt die Proliferation der Zellen dosis-abhängig. Trx-9R hingegen hatte nur einen geringen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen im Vergleich zu Kontrollbehandelten U266-Zellen.

Um die Spezifität von Peptid-Aptamer DBD-1 und sein Effekt auf die Überlebensrate von Zellen zu untersuchen, wurde im Weiteren der Einfluss des Peptid-Aptamers in Zelllinien getestet, die in ihrem Überleben von Stat3-unabhängig (RPMI 8226) bzw. Stat3-abhängig (U266) sind. Für beide Ansätze wurden die Zellen alle 12 Stunden mit 180 nM bzw. 360 nM DBD-1-9R bzw. Trx-9R transduziert und alle 24 Stunden die relative Zellzahl mittels eines XTT-Testes quantifiziert. Erneut wurde die Änderung der Extinktion der Kontrollzellen am Tag 3 im Vergleich zum Leerwert als 100% lebende Zellen definiert. Die relative Anzahl der lebenden Zellen in den Proben wurde bezogen auf die Extinktionsänderung der Kontrollzellen von Tag 3 berechnet (in %).

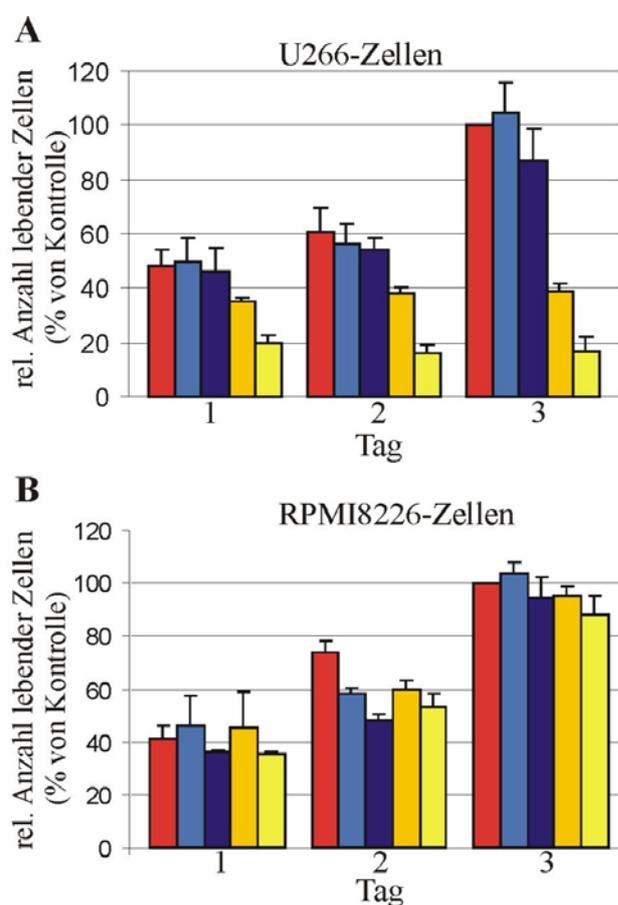


Abb. 3.18. Peptid-Aptamer DBD-1 beeinflusst die Überlebensrate von Stat3-abhängigen U266-Zellen, aber nicht von Stat3-unabhängigen RPMI8226-Zellen 2×10^5 U266-Zellen/ml (A) bzw. RPMI 8226 (B) wurden ausgesät und alle 12 Stunden mit den angegebenen Mengen an Peptid-Aptamer DBD-1-9R, bzw. Trx-9R transduziert. Die relative Anzahl der lebenden Zellen wurde alle 24 Stunden mittels XTT-Test bestimmt. Die Zellzahl der Kontrollzellen am Tag 3 wurde 100% gesetzt. In Gegenwart von Peptid-Aptamer DBD-1 ist die Anzahl der lebenden Zellen im Vergleich zu Kontroll- oder Trx-behandelten U266-Zellen deutlich reduziert (A). Demgegenüber hatte Peptid-Aptamer DBD-1-9R nur einen geringen Einfluss auf die relative Anzahl der lebenden Zellen in der Stat3-unabhängigen Zelllinie RPMI 8226 (B). *Säulen*: Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, *Balken*: Standardabweichung.

Trx-9R hatte nur einen geringen Einfluss auf das Überleben von den untersuchten Stat3-abhängigen U266-Myelomazellen. Demgegenüber zeigte sich, dass die Transduktion von Peptid-Aptamer DBD-1-9R die relative Anzahl an lebenden U266-Zellen deutlich reduzierte (Abb. 3.18A.). Im Gegensatz dazu hatte die Transduktion von Peptid-Aptamer DBD-1-9R sowie Trx-9R nur einen geringen Einfluss auf die Überlebensrate der Stat3-unabhängigen RPMI8226 Zellen (Abb. 3.18B.). Diese Daten zeigen, dass Peptid-Aptamer DBD-1 spezifisch das Überleben von Stat3-abhängigen Tumorzellen beeinflusst, während nicht Stat3-abhängige Zellen in ihrem Überleben nicht beeinflusst werden.

3.6.3.2. Reduktion der Expression des Bcl-x_L-Proteins als Folge der Transduktion von Peptid-Aptamer DBD-1 in humane Myelomazellen

Die im vorangegangenen Abschnitt (3.6.3.1.) gezeigte geringere Überlebensrate der U266-Zellen in Gegenwart von Peptid-Aptamer DBD-1 kann sowohl durch eine Inhibition des Zellzyklus als auch durch eine erhöhte Apoptoserate der transduzierten Zellen verursacht werden. Catlett-Falcone et al. (1999) konnten zeigen, dass das anti-apoptotische Bcl-x_L-Protein in U266-Zellen unter der transkriptionellen Kontrolle des Transkriptionsfaktors Stat3 steht und diese erhöhte Expression von Bcl-x_L die Zellen vor Apoptose schützt. Durch die Hemmung des Stat3-Signalweges mittels Transfektion von dominant-negativem Stat3 in U266-Zellen konnte die Expression des anti-apoptotischen Gens Bcl-x_L reduziert werden mit der Folge, dass die Zellen den programmierten Zelltod einleiteten. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob die transkriptionelle Aktivität von Stat3 in U266-Zellen durch Transduktion des Peptid-Aptamers DBD-1-9R reduziert werden kann. Hierfür wurden U266-Zellen für 2 Tage alle 12 Stunden mit 360 nM Trx-9R, DD-3-9R oder DBD-1-9R transduziert und Gesamtzelllysate hergestellt. Anschließende Western Blot Analysen sollten Aufschluss über den Einfluss der Peptid-Aptamere auf die Bcl-x_L-Expression geben.

Eine deutliche Reduktion (72%) der Bcl-x Expression konnte nach Transduktion des Peptid-Aptameres DBD-1-9R nachgewiesen werden (Abb. 3.19., Spur 4). Eine sehr deutliche Abnahme des anti-apoptotischen Proteins (32%) wurde nach Transduktion des Peptid-Aptamers DD-3-9R detektiert (Abb. 3.19., Spur 3). Durch die Transduktion von Trx-9R kam es zu einer minimalen Reduzierung (12%) der intrazellulären Bcl-x_L-Konzentration im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 3.19., Spuren 1-2). Die Ladekontrollen des Immuno Blots mit Antikörpern gegen Stat3 und Aktin machen deutlich, dass jeweils gleiche Proteinmengen für den Versuch eingesetzt wurden. Diese Ergebnisse zeigten, dass durch die

Transduktion des Peptid-Aptamer DBD-1-9R in humane U266-Myelomazellen die transkriptionelle Aktivität von Stat3 reduziert wird und somit die Expression des anti-apoptotischen Genproduktes Bcl-x_L erniedrigt wurde.

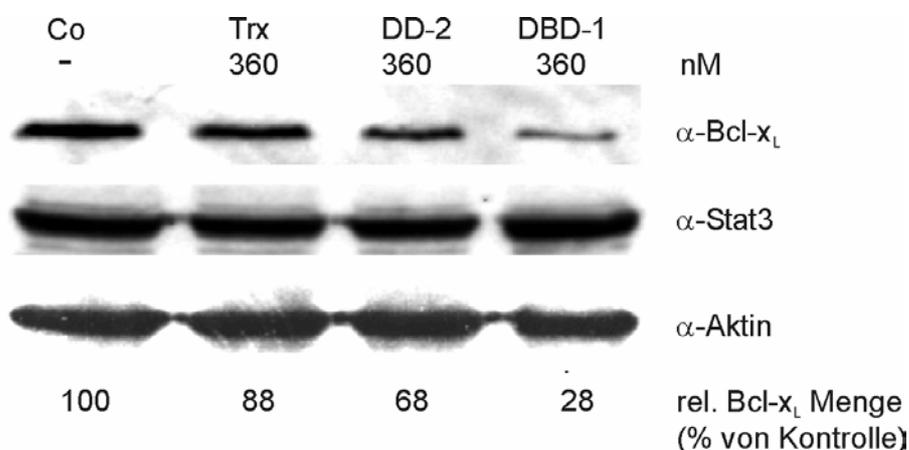


Abb. 3.19. Peptid-Aptamer DBD-1 reduziert die Expression des anti-apoptotischen Bcl-x_L-Proteins

U266-Zellen wurden 2,5 Tage alle 12 Stunden mit 360 nM der Trx-9R, DD-2-9R bzw. DBD-1-9R transduziert und Gesamtzelllysate hergestellt. Im Immuno Blot wurde die Menge des anti-apoptotischen Bcl-x_L-Proteins mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert. Inkubation der Membran mit anti-Stat3- und anti-Aktin-Antikörpern zeigten die gleiche Menge an geladenen Proteinmengen. Eine deutliche Reduktion der Bcl-x_L-Expression wurde nach Transduktion von Peptid-Aptamer DBD-1-9R im Gegensatz zu Trx-9R transduzierten und kontrollbehandelten Zellen gezeigt. Peptid-Aptamer DD-2-9R hatte nur einen geringen Einfluss auf das Expressionsniveau von Bcl-x_L.

3.6.3.3. Induktion von Apoptose als Folge der Transduktion von Peptid-Aptamer DBD-1 in humanen Myelomazellen

Die Reduzierung der Expressionsrate des anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieds Bcl-x_L führt zu Veränderungen im Verhältnis von Bcl-x_L zu pro-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern wie Bax oder Bad. Die Verschiebung des Gleichgewichts auf die Seite der pro-apoptotischen Familienmitglieder führt zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Cory and Adams 2002). Dies führt zur Aktivierung von Caspasen, wie beispielsweise der Effektor-Caspase-3, mit der Folge, dass Zielproteine der Caspasen ebenfalls prozessiert werden. Ein solches Zielprotein stellt beispielsweise die poly-ADP-Ribosyl-Polymerase (PARP) dar (Patel et al. 1996; Reed, 2000). Die proteolytische Spaltung von Caspase-3 und PARP sollten in der vorliegenden Arbeit nun als molekulare Marker für die Induktion von Apoptose ausgenutzt werden.

Durch die Transduktion von Peptid-Aptamere DD-3-9R und vor allem durch Peptid-Aptamer DBD-1-9R wurde die Expression des anti-apoptotischen Protein Bcl-x_L in U266-Zellen reduziert (Abb. 3.19.). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im folgenden Experiment untersucht, ob die Inhibition des Stat3-Signalweges, wie von Catlett-Falcone et al. (1999) beschrieben, mit der Induktion von Apoptose korreliert. Hierfür wurden Gesamtzelllysate transduzierter humaner Myelomazellen in einem Immuno Blot auf das Vorhandensein von Caspase-3- und PARP-Spaltprodukten untersucht.

Eine deutliche Spaltung sowohl von Caspase-3 als auch von PARP wurde nach Transduktion von 500 nM DBD-1-9R bzw. 1 μ M DD-3-9R detektiert (Abb. 3.20., Reihe 3 und 4). Demgegenüber wurde weder Caspase-3 noch PARP-Spaltung nach Transduktion von 1 μ M Trx-9R, bzw. in den unbehandelten Kontrollzellen beobachtet (Abb. 3.20., Reihe 1 und 2). Die Ladekontrolle der Membran mit einem anti-Stat3-Antikörper zeigte gleiche Mengen eingesetzter Proteinkonzentrationen (Abb. 3.20.). Die Transduktion der Peptid-Aptamere DD-3-9R und DBD-1-9R kann somit in der humanen Myelomazelllinie U266 den programmierten Zelltod induzieren.

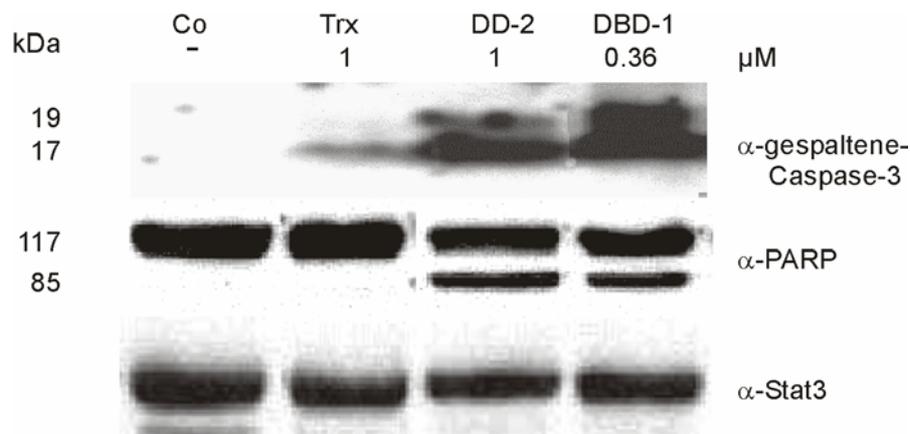


Abb. 3.20. Peptid-Aptamere induzieren Apoptose in humanen U266-Zellen

U266-Zellen wurde mit 360 nM DBD-1-9R, 1 μ M DD-2-9R bzw 1 μ M Trx-9R transduziert und Gesamtzelllysate hergestellt. Im Immuno Blot wurde ein anti-Caspase-3 Antikörper verwendet, der die 17 und 19 kDa Fragmente der gespaltenen Caspase-3 detektiert (oben). Zur Detektion von PARP wurde ein Antikörper verwendet, der sowohl ungespaltenes PARP als auch das 85 kDa große Spaltprodukt von PARP erkennt (mitte). Die Ladekontrolle, durchgeführt mit einem anti-Stat3-Antikörper (unten), zeigte gleiche Mengen an eingesetzten Zelllysaten. Caspase-3- und PARP-Spaltprodukte konnten nach Transduktion von 360 nM 9R-DBD-1 und 1 μ M 9R-DD-2 in den U266-Zellen detektiert werden. Kontrollzellen (Co) und Zellen (Trx), die mit 1 μ M Trx-9R behandelt wurden, zeigten keine Spaltung von Caspase-3 bzw. PARP.

3.7. Peptid-Aptamer DBD-1 inhibiert das Tumorwachstum *in vivo* in Mäusen

Die Ergebnisse der Untersuchungen in Tumorzellen zeigten eindrucksvoll, dass das Peptid-Aptamer DBD-1 in der Lage ist, in Stat3-abhängigen Tumorzellen den Stat3-Signalweg zu inhibieren und dadurch Apoptose in den Zellen zu induzieren. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob dieser anti-tumorigene Effekt auch in einem *in vivo* Mausmodell für die B16-Melanomzellen nachweisbar ist. Die Behandlung sollte mittels Proteintransduktion durch lokale Injektion des Peptid-Aptameres erfolgen. Hierfür wurde zunächst der im Rahmen dieser Doktorarbeit gestellte Tierversuchsantrag (Gen. Nr.123/10) gemäß der neuen Applikation der Peptid-Aptamere mittels Proteintransduktion umgeschrieben und nach erfolgter Genehmigung der Änderungsanzeige mit dem Versuch begonnen.

Für einen Vorversuch wurden 5×10^5 B16-Zellen subkutan in die Seitenflanken von C57BL/6-Mäusen injiziert und das Wachstum der Tumorzellen alle zwei Tage überprüft. Am Tag sieben nach Injektion der Tumorzellen waren Tumore in den Seitenflanken der Mäuse tastbar. Nach neun Tagen waren in den Mäusen Tumore messbar, sodass am Tag 10 mit der Behandlung der Tiere begonnen wurde.

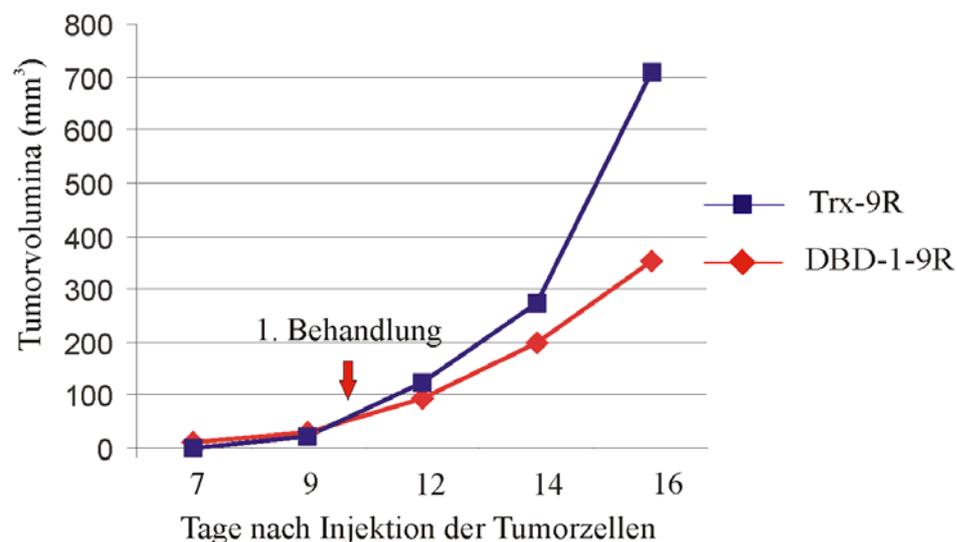


Abb. 3.21. Behandlung mit Peptid-Aptamer DBD-1-9R inhibiert das Tumorwachstums *in vivo* in Mäusen

C57BL/6 Mäuse wurden 5×10^5 B16-Zellen subkutan in die Seitenflanken injiziert. Am Tag 10 erfolgte die erste intratumorale Behandlung (Pfeil) der Mäuse mit 50 μ l Peptid-Aptamer DBD-1-9R bzw. Trx-9R als Kontrolle. An den Tagen 12 und 14 wurden die Tumorgrößen gemessen und die Behandlung der Mäuse mit den Peptiden wiederholt. Es zeigte sich, dass die Tumorumfänge der kontrollbehandelten Mäuse schneller anstiegen als bei Mäusen, die mit Peptid-Aptamer DBD-1-9R behandelt wurden. Die Messpunkte stellen die Mittelwerte der Tumorumfänge aus Gruppen von vier Tieren dar.

Den Mäusen wurde jeden zweiten Tag jeweils 50 μl Peptid-Aptamer DBD-1-9R bzw. Trx-9R (jeweils 100 ng/ μl) als Kontrolle in den Tumor gespritzt, weiterhin die TumorgroÙe gemessen und daraus das Tumolvolumen berechnet (Abb. 3.21.). Mäuse, die mit Peptid-Aptamer DBD-1-9R behandelt wurden, zeigten einen langsameren Anstieg des Tumolvolumens als kontrollbehandelte Mäuse (Abb. 3.21.).

Im Hauptversuch wurde die Anzahl der Tiere pro Gruppe auf sieben weibliche Tiere (6-7 Wochen alt) erhöht. Neben der Versuchsgruppe, die mit Peptid-Aptamer DBD-1-9R behandelt wurde, wurden zwei Kontrollgruppen in diesen Versuchsansatz mitgeföhrt. Zum einen wurden sieben Mäuse, wie im Vorversuch auch, mit Trx-9R behandelt. Darüber hinaus wurde einer weiteren Gruppe von sieben Mäusen PBS gespritzt. Nach der Inokulation der Tumorzellen wurden die Tiere jeden zweiten Tag auf das Wachstum der Tumorzellen in den Seitenflanken der Mäuse überprüft.

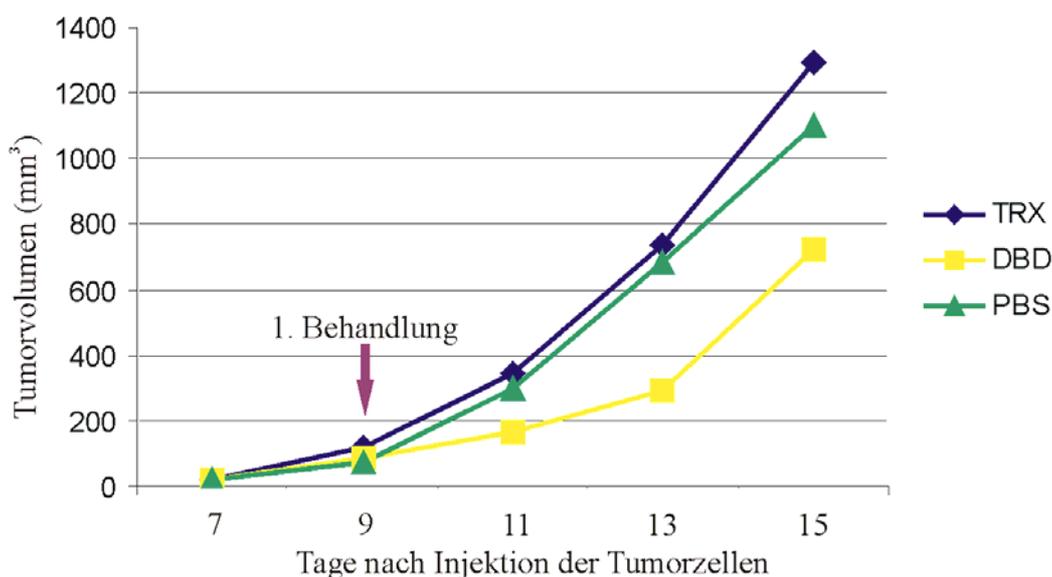


Abb. 3.22. Behandlung mit Peptid-Aptamer DBD-1-9R inhibiert das Tumorstwachstum *in vivo* in Mäusen

Weiblichen C57BL/6 Mäusen wurden 5×10^5 B16-Zellen subkutan in die Seitenflanken injiziert. Am Tag 9 nach Injektion der Tumorzellen erfolgte die erste intratumorale Behandlung (Pfeil) der Mäuse mit 50 μl Peptid-Aptamer DBD-1-9R (gelb), Trx-9R (blau) bzw. PBS (grün) als Kontrollen. An den Tagen 11 und 13 wurden die Tumorstgrößen gemessen und die Behandlung der Mäuse mit den Peptiden wiederholt. Nach der Messung des Tumorstvolumens am Tag 15 wurden die Tiere getötet. Es zeigte sich, dass die Tumorstvolumina der kontrollbehandelten Mäuse schneller anstiegen als bei Mäusen, die mit Peptid-Aptamer DBD-1-9R behandelt wurden. Die Messpunkte stellen die Mittelwerte der Tumorstvolumina aus Gruppen von sieben (fünf) Tieren (siehe Text) dar.

Am Tag sechs nach Injektion der Tumorstzellen waren Tumore in den Seitenflanken der Mäuse tastbar. Nach acht Tagen waren in den Mäusen Tumore messbar, sodass am Tag 9

mit der Behandlung der Tiere begonnen wurde. Den Mäusen wurden jeden zweiten Tag jeweils 50 µl Peptid-Aptamer DBD-1-9R, Trx-9R (jeweils 100 ng/µl) bzw. PBS intratumoral injiziert, die Tumorgröße gemessen und daraus die Tumorumfänge errechnet (Abb. 3.22.). Am Tag 10 starben zwei Mäuse aus der DBD-1-9R behandelten Gruppe aus nicht geklärten Gründen. Mäuse, die mit Peptid-Aptamer DBD-1-9R behandelt wurden zeigten einen langsameren Anstieg des Tumorumfanges als kontrollbehandelte Mäuse (Abb. 3.22.).

Die Experimente der vorliegenden Arbeit zeigten deutlich, dass Peptid-Aptamer DBD-1-9R nicht nur in Experimenten in der Zellkultur funktionell aktiv ist und mit dem Stat3-Signalweg interferiert, sondern auch als Fusionsprotein mit einer Proteintransduktionsdomäne *in vivo* im Tiermodell in der Lage ist, seine inhibitorische Funktion auf den Stat3-Signalweg zu entfalten. So konnte durch die Blockierung des Stat3-Signalweges in Zellkulturansätzen in Stat3-abhängige Tumorzellen durch das Peptid-Aptamer DBD-1 Apoptose induziert werden, und darüber hinaus das Tumorstadium in DBD-1-9R behandelten Tieren im Vergleich zu kontrollbehandelten Mäusen deutlich reduziert werden. Dieses abschließende *in vivo* Mausmodell demonstrierte nochmals eindrücklich, dass mit dem im Hefe-zwei-Hybrid-System isolierten Peptid-Aptamer DBD-1 ein potenter Inhibitor des Stat3-Signalwegs identifiziert werden konnte.

4. Diskussion

Die Ursachen von Krebs sind Mutationen in Proto-Onkogenen bzw. Tumorsuppressorgenen (Sherr 2004). Mutationen, die die Fehlfunktion von Proto-Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen induzieren, führen zur Deregulation von Signalwegen, die Veränderungen im Proliferations- und Differenzierungsverhalten sowie der Apoptoserate der Zellen zur Folge haben (Hanahan and Weinberg 2000).

Durch das Ausschalten von Onkogenen, die eine besonders wichtige Rolle in der Tumorentstehung und -progression einnehmen, können solche deregulierte Signalwege gestoppt werden, sodass der transformierte Phänotyp der Tumorzellen revertiert wird und eine Regression des Tumorwachstums eintritt (Felsher 2004; siehe Einleitung 1.1). Jedoch führt die Inaktivierung eines Onkogens nicht zwangsläufig zum therapeutischen Erfolg. Voraussetzungen dafür, dass sich ein Onkogen als potentielles Zielprotein für die Entwicklung eines spezifischen Inhibitors eignet, sind beispielsweise, dass das Onkogen an der Regulation des Zellzyklus, der Differenzierung, des programmierten Zelltods und der Angiogenese beteiligt ist und, als wichtigster Punkt, dass seine Aktivierung unabdingbar für das weitere Tumorwachstum ist (Felsher 2004). Das in der vorliegenden Arbeit gewählte Stat3-Molekül erfüllt in beispielhafter Weise diese Kriterien: die konstitutive Aktivierung von Stat3 ist essentiell für das Wachstum und Überleben der untersuchten Tumorzellen und die Inhibition der Stat3-Funktion induziert Apoptose, reduziert die Proliferation, die Angiogenese und die Tumorprogression (Abb. 3.10.-12.; 3.16.-18A.; 3.19.-22.; Grandis et al. 1998; Catlett-Falcone et al. 1999; Niu et al. 1999; Ni et al. 2000; Garcia et al. 2001; Epling-Burnette et al. 2001; Buettner et al. 2002; Song et al. 2003; Wei et al. 2003a; 2003b; Blascovich et al. 2003).

Ein weiterer Ansatzpunkt zur gezielten Interferenz von deregulierten Signalwegen sind Transkriptionsfaktoren (Darnell, Jr. 2002). Diese Moleküle stellen die molekularen Schalter für die Aktivierung von Genexpressionsmustern dar, deren Effekte schließlich zu dem malignen Phänotyp der Zelle führt und sich als Krebserkrankung manifestiert. So stellen eine limitierte Anzahl von Transkriptionsfaktoren die Knotenpunkte dar, an dem deregulierte Signalwege konvergieren (Yu and Jove 2004). Da die Inhibition eines einzelnen Transkriptionsfaktors die Effekte einer Vielzahl von deregulierten Signalwegen blockiert, stellen Transkriptionsfaktoren ideale Zielproteine für die Entwicklung neuer Anti-Krebs-Strategien dar (Darnell, Jr. 2002). Auch in diesem Zusammenhang heben die Ergebnisse der

vorliegenden Arbeit sowie bereits publizierte Daten anderer Labore, die Rolle von Stat3 als geeignetes Zielprotein für die Entwicklung neuer Therapeutika hervor (Bowman et al. 2000; Darnell, Jr. 2002; Buettner et al. 2002; Yu and Jove, 2004).

Eine weitere Problematik bei der Suche nach geeigneten Zielproteinen stellt die genetische Instabilität von Tumorzellen dar, die zu einer erhöhten Mutationsrate der Tumorzellen führt. Betreffen solche Mutationen das kodierende Gen für das Zielprotein, kann seine Proteinstruktur und damit seine Bindungseigenschaft an einen Inhibitor beeinflusst werden. Diese Veränderung der Konformation im Zielprotein kann dazu führen, dass ein zuvor wirkender molekularer Inhibitor nicht mehr in der Lage ist an das Zielprotein zu binden und das vormals wirksame Tumorthapeutikum seine Funktionalität verliert. Ein solcher Mechanismus wird häufig bei Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie, die das onkogene Bcr-Abl-Protein exprimieren, beobachtet (Gorre and Sawyers 2002; Shah et al. 2002). Der synthetische Wirkstoff Glivec (gleich: Gleevec oder STI-571) ist in der Lage an die Kinasedomäne des chimären Bcr-Abl-Proteins zu binden und seine Funktion zu inhibieren. Dadurch kommt es bei der Mehrzahl der Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie zu einem Rückgang der leukämischen Zellen im Blut. Allerdings gibt es auch Patienten, die nicht auf die Behandlung mit diesem Kinase-Inhibitor ansprechen. Ursache hierfür sind Mutationen im Bcr-Abl-Fusionsprotein, die bewirken, dass der Bcr-Abl-Kinase-Inhibitor Glivec nicht mehr an das mutierte Onkogen binden kann und das Therapeutikum dadurch seine inhibitorische Wirkung verliert. Tumorzellen, die eine solche Mutation tragen, sind resistent gegenüber der Glivec-Behandlung und die Patienten mit dieser Mutation werden rückfällig, d. h. es kommt zu einem Fortschreiten der Leukämie (Gorre and Sawyers 2002; Shah et al. 2002). Bei der Auswahl von geeigneten Zielproteinen für die Entwicklung von spezifisch wirkenden Inhibitoren sollte demnach darauf geachtet werden, dass das kodierende Gen nicht bzw. nur selten mutiert. Bei dem in der vorliegenden Arbeit ausgewählten Zielprotein Stat3 konnten bislang in Tumorpatienten keine Mutationen im kodierenden Gen identifiziert werden (Turkson and Jove 2000). Dieser Daten lassen die Hoffnung zu, dass es im Laufe einer Tumorthherapie mit einem Anti-Stat3-Therapeutikums zu keiner Resistenz kommt, die aufgrund einer veränderten Affinität des Zielproteins Stat3 zu seinem Inhibitor entsteht. Auch aus diesem Grund eignet sich Stat3 als molekulares Zielprotein für die Entwicklung eines potenten Krebstherapeutikums.

Zudem sind aus gesundheitspolitischer Sicht Inhibitoren interessant, die ein breites Anwendungsspektrum in der Tumorthherapie versprechen. Hierfür müssten sie entweder Onkogene inaktivieren, die in häufig vorkommenden Krebserkrankungen (z. B. Brustkrebs,

Leukämien, Lymphome) oder aber bei zahlreichen, selteneren Tumoren eine entscheidende Rolle spielen. Eine erhöhte Stat3-Aktivität und eine Korrelation mit erhöhtem Tumorzellwachstum sowie Apoptoseresistenz konnte in zahlreichen Tumorzellen und Tumorgeweben aus Patienten nachgewiesen werden, darunter auch Tumorgewebe von häufig auftretenden Tumorerkrankungen, wie Brustkrebs und Leukämien (neueste Übersicht siehe: Yu and Jove, 2004). Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen in Übereinstimmung mit bereits publizierte Daten, dass in Tumorzellen aus unterschiedlichsten Geweben durch die Interferenz mit dem Stat3-Signalweg das Tumorzellwachstum reduziert sowie Apoptose in den behandelten Tumorzellen induziert wird (Abb. 3.10.; 3.12.; 3.16.-18A.; 3.19.-22.; Grandis et al. 1998; Catlett-Falcone et al. 1999; Niu et al. 1999; Ni et al. 2000; Epling-Burnette et al. 2001; Garcia et al. 2001; Buettner et al. 2002; Blascovich et al. 2003; Song et al. 2003; Yu and Jove 2004).

Aus zahlreichen molekularbiologischen Analysen ist bekannt, dass für die Aktivierung und Funktionalität von Stat3 als Transkriptionsfaktor sowohl intramolekulare Modifikation als auch intermolekulare Interaktionen nötig sind (Levy and Darnell, 2002). Dazu gehören die Phosphorylierung des Tyrosins 705 von Stat3-Monomeren, deren Dimerisierung und die darauf folgende Bindung der Dimere über die DNA-Bindedomäne an Promotorregionen von Zielgenen, sowie die Assoziierung mit akzessorischen Molekülen. Unter physiologischen Bedingungen führt die direkte Interaktion von Stat3 mit negativen Regulatoren, wie beispielsweise PIAS3 oder GRIM-19, zur Inhibition des Stat3-Signalweges (Chung et al. 1997; Lufei et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte das Potential von mit Stat3 interagierenden Peptiden (Peptid-Aptamere), ihre Fähigkeit mit dem Stat3-Signalweg zu interferieren und dadurch Tumorzellen in ihrem Wachstum und Überleben zu hemmen, eindrucksvoll demonstriert werden.

Studien mit den „Modellmolekülen“ Mdm2/p53, Bcl-x_L und Bcl-2 hatten gezeigt, dass synthetische Peptide, die die Protein-Protein-Interaktionsdomänen dieser Zielproteine besetzten, in der Lage sind die Funktionalität der Proteine zu beeinflussen (Degterev et al. 2001; Tzung et al. 2001; Chene 2003). Phospho-Peptide gegen die Region um das Tyrosin 705 von Stat3 wurden bereits benutzt um die Dimerisierung dieses Transkriptionsfaktors zu inhibieren (Turkson et al. 2001; Ren et al. 2003; Turkson et al. 2004). Grundvoraussetzung für diese Ansätze war jedoch immer, dass die Oberflächenstrukturen, die für Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich sind, bekannt waren. In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuartiger Ansatz gewählt, der nicht *a priori* auf eine exakte Information der Oberflächenstruktur angewiesen ist. Diese Vorgehensweise bediente sich des Hefe-zwei-

Hybrid-Systems, das sich als Methode zur Identifikation von Protein-Protein Interaktionen bereits bewährt hat (Colas and Brent 1998). Anstelle der bei konventionellen Screens nach Interaktionspartnern verwendeten cDNA-Bibliothek wurde bei dieser Screening-Strategie eine randomisierten Peptid-Aptamer-Bibliothek verwendet und diese auf ihre Bindungsfähigkeit an funktionelle Domänen von Stat3 durchmustert. Als Zieldomänen dieser Screens wurden die Dimerisierungs- und die DNA-Bindedomäne von Stat3 gewählt, beides Domänen deren Funktionen essentiell im Stat3-Signalweg sind. Die durchgeführten Ansätze resultierten in der Identifikation von drei Peptid-Aptameren (DD-1, DD-2- und DD-3), die mit der Stat3-Dimerisierungsdomäne und einem Peptid-Aptamer DBD-1, das mit der Stat3-DNA-Bindedomäne interagiert (Tab. 3.1.). Die Interferenz der erfolgreich isolierten Peptid-Aptamere mit der biologischen Funktion von Stat3 wurde dann im nächsten Schritt evaluiert. In der Tat konnten mit Hilfe dieses Ansatzes mehrere Peptid-Aptamere isoliert werden, die spezifisch an unterschiedliche funktionelle Domänen von Stat3-Molekülen binden und in zellulären Systemen nach EGF-Stimulation den Stat3-Signaltransduktionsweg inhibieren.

4.1. Peptid-Aptamere, die mit der Dimerisierungsdomäne von Stat3 interagieren, inhibieren spezifisch den Stat3-Signalweg

Nach der erfolgreichen Identifikation der Peptid-Aptamere im Hefe-zwei-Hybrid-System, konnte deren Bindungsspezifität für Stat3 gezeigt und anschließend ihre biologische Funktionalität bei der Inhibition des Stat3-Signalwegs demonstriert werden. Die durchgeführten Experimente zur Validierung der Funktionalität der DD-Peptid-Aptamere zeigten, dass alle drei Biomoleküle mit Stat3 interagierten und die zelluläre Funktion von Stat3 inhibieren. Dabei demonstrierten Ko-Immunopräzipitations- und GST-pull-down-Experimente eine *in vitro* Interaktion zwischen DD-Aptameren und Stat3-Molekülen (Abb. 3.3A. und Daten nicht gezeigt). Mating-Experimente in Hefezellen zeigten, dass die Wechselwirkungen zwischen den Peptid-Aptameren *in vivo* spezifisch über die Dimerisierungsdomäne von Stat3 erfolgte (Abb. 3.2.). Insgesamt gaben diese Ergebnisse erste wertvolle Hinweise darauf, dass im Hefe-zwei-Hybrid-System Peptid-Aptamere isoliert werden können, die spezifisch an eine funktionelle Domäne von Stat3 binden.

Weiterführende *in vivo* Analysen in einem EGF-induzierbarem Zellsystem bestätigten zum einen die Interaktion zwischen DD-Aptameren und Stat3 und demonstrierten zudem die biologische Aktivität der DD-Aptamere bei der Inhibition der Stat3-Funktion in

Säugetierzellen. In Herc-Zellen, einem experimentellen Modellsystem für den EGF-induzierten Stat3-Signaltransduktionsweg, reduzierten die DD-Aptamere die Stat3-Phosphorylierung, wie die Ergebnisse der durchgeführten Western Blot Analysen mit einem Phospho-Stat3-spezifischen Antikörper zeigten (Abb. 3.6.). Demnach inhibiert die Bindung der DD-Aptamere an die Dimerisierungsdomäne von Stat3 die Phosphorylierung von Stat3. Eine Phosphorylierung von Stat3 am Tyrosin 705 ist jedoch eine essentielle Vorbedingung für die Dimerisierung von Stat3-Molekülen (Darnell, Jr. 1997). Die Reduzierung der Stat3-Phosphorylierung in Gegenwart der DD-Peptid-Aptamere sollte somit eine verminderte Stat3-Dimerbildung zur Folge haben. Dadurch dürften auch die nachfolgenden Schritte der Signaltransduktionskaskade beeinflusst werden. Diese Hypothese konnte in der vorliegenden Arbeit in weiteren Experimenten bestätigt werden. So zeigten die durchgeführten Gelretardierungsexperimente, dass die DNA-Bindung von Stat3 durch den Einfluss der DD-Peptid-Aptamere deutlich erniedrigt wird (Abb. 3.5.). Darüber hinaus sprechen auch die Ergebnisse der durchgeführten Luziferase-Experimente, die als Maß der transkriptionellen Aktivität von Stat3 herangezogen wurden, für diese Hypothese. Aufgrund der Hemmung der Stat3-Phosphorylierung durch DD-Peptid-Aptamere wird die Expression des Stat3-abhängigen Luziferase-Konstrukts in Abhängigkeit der intrazellulären Konzentration der DD-Peptid-Aptamere dosis-abhängig reduziert (Abb. 3.4.). Die entscheidende Rolle der Tyrosin-Phosphorylierung bei der Aktivierung des Stat3-Signalweges bestätigen auch kürzlich publizierte Arbeiten von Turkson et al. (2001; 2004). Diese Arbeitsgruppe konnte durch die Anwendung einer etwas anderen Strategie, bei der ein synthetisches Phospho-Peptid bestehend aus der Stat3-Sequenz um Tyrosin 705 eingesetzt wurde, den Stat3-Signaltransduktionsweg hemmen. Dabei bindet, vergleichbar zu den hier isolierten DD-Peptid-Aptameren, das Phospho-Peptid an Stat3-Monomere und verhindert dadurch die Aktivierung des nachgeschalteten Stat3-Signalweges (Turkson et al. 2001).

Beim Vergleich der erhaltenen Peptid-Aptamersequenzen mit Sequenzen von bekannten Stat3-Inhibitoren, wie beispielsweise Konsensussequenzen von Phospho-Peptiden, die an die SH2-Domäne von Stat3 binden (Turkson et al. 2001; Ren et al. 2003), konnte keine Homologie festgestellt werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das im Hefe-zwei-Hybrid verwendete Bait-Konstrukt neben der SH2-Domäne und dem Tyrosin 705 noch zusätzliche flankierende Sequenzen enthielt. Somit ist das präzise Bindungsepitop der Peptid-Aptamere nicht exakt definiert, könnte jedoch in einer Ko-Kristallisation des Stat3-Aptamer-Komplexes ermittelt werden. Dennoch sind Peptid-Aptamere, die an dieses Epitop binden, in der Lage die Phosphorylierung von Stat3 zu

inhibieren (Abb. 3.6.). Es wäre durchaus möglich, dass beispielsweise, aufgrund der Größe des gebundenen Peptid-Aptamers, die Rekrutierung von Stat3 an den aktivierten Rezeptor sterisch blockiert wird, sodass keine Phosphorylierung des Stat3-Moleküls erfolgen kann. Demnach erwies sich die angewandte Strategie der Hemmung des Stat3-Signalweges durch Blockierung der Stat3-Phosphorylierungsstelle mittels DD-Peptid-Aptamere als sehr effektiv und sehr spezifisch, da weder die Phosphorylierung des EGFRs noch der dem EGFR nachgeschaltete MAPK p42/44-Signalweg von der Expression der Peptid-Aptamere beeinflusst wurde (Abb. 3.7. und 3.8.).

4. 2. Peptid-Aptamere, die mit der DNA-Bindungsdomäne von Stat3-Molekülen interagieren, inhibieren spezifisch den Stat3-Signalweg

In einem weiteren Ansatz zur Interferenz der Stat3-Funktion war es das Ziel die DNA-Bindung von bereits vorhandenen Stat3-Dimeren zu inhibieren. Als intramolekulares „Target“ für die Inhibition wurde die DNA-Bindedomäne von Stat3 gewählt. Strukturdaten der DNA-Bindedomäne von Stat3 zeigen, dass die Interaktion von Stat3-Dimeren mit sequenzspezifischen DNA-Bereichen auf den Wechselwirkungen der hydrophoben Aminosäuren I431, V343, M331 und I467 im Stat3-Molekül und der DNA beruhen (Becker et al. 1998). Da hydrophobe Domänen eines Proteins in intermolekularen Wechselwirkungen in der Regel mit hydrophoben Domänen eines zweiten Proteins interagieren, war es für den Screen mit der DNA-Bindedomäne als Bait-Konstrukt notwendig, hydrophobe Aminosäuren in der Peptid-Aptamer-Bank an der Oberfläche der Prey-Konstrukte zu präsentieren. Im Gegensatz zu linearen Banken, wurde in der hier eingesetzten Peptid-Aptamer-Bibliothek durch die Integration der Aptamere-Aminosäuresequenzen in das katalytische Zentrum des Thioredoxin-Proteins gewährleistet, dass hydrophobe Aminosäuren an der Oberfläche präsentiert werden (Ladner 1995). Mittels eines Bait-Konstrukts, das Bereiche der DNA-Bindungsstelle von Stat3 umfasste (Stat3-DBD), konnte aus dieser Peptid-Aptamer-Bank erfolgreich ein DBD-Peptid-Aptamer isoliert werden. Das DBD-Peptid-Aptamer umfasste ein 20 Aminosäuren-Insert, deren nähere Analyse einen hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren (z. B. I, V, L,) ergab (Tab. 3.1.). Das isolierte hydrophobe DBD-Peptid-Aptamer dürfte an den hydrophoben Bereich der DNA-Bindedomäne von Stat3-Molekülen binden. Die bereits geplante Ko-Kristallisation des Stat3-Aptamer-Komplexes sollte darüber konkrete Auskunft geben. Die Charakterisierung des isolierten DBD-1-Peptid-Aptamer zeigte, dass mit dieser Strategie ein biologisches Molekül identifiziert werden konnte, das

spezifisch mit der DNA-Bindedomäne von Stat3 interagiert (Abb. 3.2.), mit der DNA-Bindung von Stat3 interferiert (Abb. 3.5.) und somit Stat3-Signalweg hemmt (Abb. 3.4.).

Die spezifische Interaktion zwischen dem isolierten DBD-Peptid-Aptamer und Stat3 wurde in der vorliegenden Arbeit in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen überprüft. In *in vitro* Bindungsstudien mittels Ko-Immunopräzipitationen mit rekombinant exprimiertem, dimerisiertem Stat3 konnte eine Interaktion mit dem isolierten DBD-Aptamer detektiert werden (Abb. 3.2B). Zudem konnte eine schwache Interaktion zwischen Peptid-Aptamer DBD-1 und Stat3 aus Zellysaten in Ko-Immunopräzipitationen gefunden werden (Abb. 3.3A.). Im Gegensatz zu der schwachen Interaktion *in vitro*, konnte in der vorliegenden Arbeit unter *in vivo* Bedingungen in Mating-Experimenten eine Interaktion (Abb. 3.2.) sowie in weiteren *in vivo* Ansätzen in Zellkultur und Tierexperiment ein biologischer Effekt von Peptid-Aptamer DBD-1 in Stat3-abhängigen Tumorzellen gezeigt werden (Abb. 3.9.-12.; 3.16.-18A.; 3.19.-22.). Ein solch gegensätzliches Verhalten von Peptid-Aptamern zwischen *in vitro* und *in vivo* Ansätzen wurde bereits in der Literatur beschrieben (Butz et al. 2000). So konnte für ein Peptid-Aptamer, das gegen das virale HPV-E6 Onkogen gerichtet ist, keine *in vitro* Interaktion detektiert werden. Demgegenüber war dieses Peptid-Aptamer *in vivo* in der Lage, spezifische Effekte zu induzieren. Demnach wird im verwendeten Screeningprotokoll in der Hefe für Interaktionen selektioniert, die unter *in vivo* Konditionen stabil sind, wohingegen diese unter *in vitro* Bedingungen, unter Umständen aufgrund inadäquater Konformationsausbildung des rekombinant exprimierten Peptid-Aptamers, nicht gegeben sind.

Die Ergebnisse der weiterführenden Experimente zeigten die biologische Aktivität des DBD-Peptid-Aptamers in Zellsystemen *in vivo*. Dabei wurde die Funktionalität des isolierten DBD-Peptid-Aptamers *in vivo* in Gelretardierungsexperimenten und Luziferase-Experimenten in transfizierten Herc-Zellen demonstriert. Die Gelretardierungsexperimente zeigten, dass in Gegenwart des DBD-Peptid-Aptameres die DNA-Bindungsfähigkeit von Stat3-Molekülen deutlich reduziert wird (Abb. 3.5). Zudem konnte eine DBD-Peptid-Aptamer dosis-abhängige Reduktion der transkriptionellen Aktivität von Stat3 in Luziferase-Experimenten durch den Einsatz eines Stat3-abhängigen Luziferase-Reporterkonstruktes detektiert werden (Abb. 3.4.). Ganz im Gegensatz zu den Effekten der DD-Peptid-Aptamere, wiesen Western Blot Analysen mit einem Anti-Phospho-Stat3 Antikörper eindeutig darauf hin, dass die Hemmung des Stat3-Signalweges durch das DBD-Peptid-Aptamer nicht mit einer Reduktion der Phosphorylierung von Stat3 einhergeht. Demnach beeinträchtigt das DBD-Peptid-Aptamer nicht die Phosphorylierung des Tyrosins 705 von Stat3-Molekülen

(Abb. 3.6.). Obwohl eine Interferenz des DBD-Peptid-Aptamers auf die Dimerisierung von Stat3 nicht auszuschließen ist, weist die Tatsache, dass das Peptid-Aptamer spezifisch mit der DNA-Bindedomäne von Stat3 interagiert (Abb. 3.2.), eher auf einen inhibitorischen Effekt des DBD-Peptid-Aptamers auf die DNA-Bindung von Stat3-Dimeren hin. Untersuchungen mit dem Transkriptionsfaktor E2F hatten im Vorfeld gezeigt, dass ein Peptid, das spezifisch an die DNA-Bindedomäne dieses Transkriptionsfaktors bindet, die DNA-Bindung von E2F inhibiert, ohne jedoch dessen Heterodimerisierung zu hemmen (Montigiani et al. 2003). Durch die Interaktion des DBD-Peptid-Aptamers mit den DNA-Bindedomänen von Stat3-Dimeren, könnte somit, vergleichbar zu der Wirkungsweise GRIM-19, entweder der nukleäre Transport von Stat3-Dimeren gehemmt werden, oder aber wie durch PIAS3 die DNA-Bindung der Stat3-Dimere blockiert werden (Chung et al. 1997; Lufei et al. 2003).

4.3. Modell zur Inhibition des Stat3-Signalweges durch Peptid-Aptamere

Basierend auf den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen und diskutierten Daten kann das in Abbildung 4.1. dargestellte zusammenfassende Modell zur Inhibition der Stat3-Signaltransduktion durch Peptid-Aptamere postuliert werden. Peptid-Aptamere, die mit der Dimerisierungsdomäne von Stat3 interagieren (DD-Peptid-Aptamere), assoziieren mit monomeren Stat3-Molekülen, verhindern damit die Phosphorylierung der Stat3-Moleküle (I) und folglich die Dimerisierung der Stat3-Monomere. Diese Heteroduplexe aus Peptid-Aptameren und Stat3-Molekülen können nicht an sequenzspezifische Promotorregionen binden (III) und es erfolgt keine Transkription von Stat3-abhängigen Genen (IV). Abhängig von der intrazellulären DD-Peptid-Aptamer Konzentration können noch vorhandene freie Stat3-Monomere phosphoryliert werden und damit nach Dimerisierung und DNA-Bindung ihre transkriptionelle Aktivität entfalten.

Das Peptid-Aptamer, das gegen die DNA-Bindedomäne von Stat3 gerichtet ist (DBD-Peptid-Aptamer), interferiert nicht mit der Phosphorylierung von Tyrosin 705 in Stat3-Molekülen (II). Jedoch wird die DNA-Bindung der Stat3-Dimere durch die Gegenwart der DBD-Peptid-Aptamere inhibiert (III). Ursache hierfür dürfte sein, dass die hydrophoben Aminosäuren des DBD-Peptid-Aptamers an den hydrophoben Bereich der DNA-Bindedomäne von Stat3 binden. Durch diese Interaktion wird die Domäne von Stat3-Molekülen blockiert, die normalerweise den direkten Kontakt mit der DNA vermittelt. Dadurch stehen für die Bindung an die Promotoren Stat3-abhängiger Zielgene keine oder nur

eine reduzierte Anzahl an Stat3-Molekülen zur Verfügung. Somit kann sowohl durch die Inhibition der Phosphorylierung von Stat3 als auch durch die Blockierung der DNA-Bindungsdomäne von Stat3 durch Peptid-Aptamere die Transkription von Stat3-Zielgenen reduziert werden (IV).

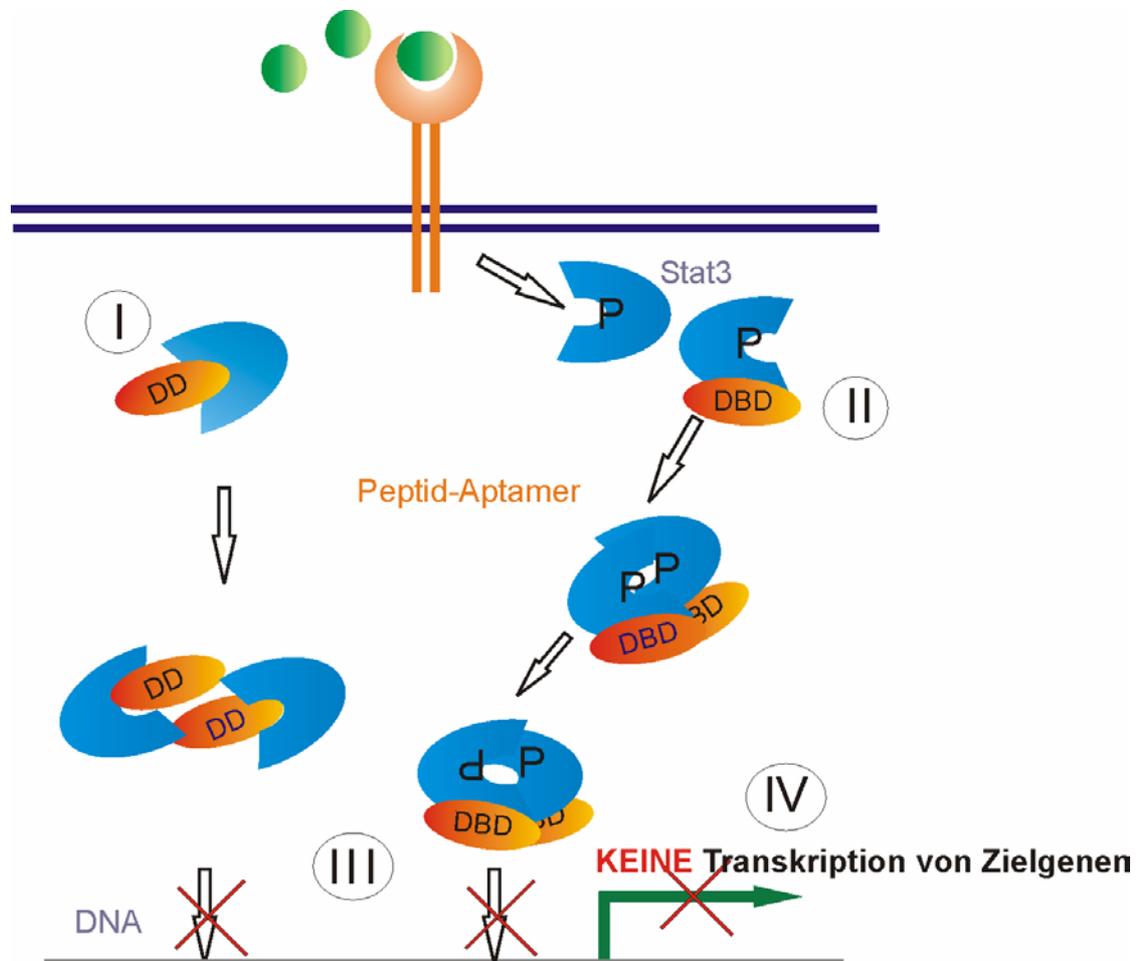


Abb. 4.1. Modell zur Interaktion der isolierten Peptid-Aptamere mit Stat3

Peptid-Aptamere, die gegen unterschiedliche funktionelle Domänen von Stat3 gerichtet sind, interferieren mit unterschiedlichen Schritten im Aktivierungsszenario von Stat3. Peptid-Aptamere, die an die Dimerisierungsdomäne von Stat3 binden (DD), inhibieren die Phosphorylierung von Stat3 (I). Der Heteroduplex aus Stat3:Peptid-Aptamer ist nicht in der Lage an Promotorregionen von Stat3-Zielgenen zu binden (III). Das Peptid-Aptamer, das an die DNA-Bindedomäne von Stat3 bindet (DBD), beeinflusst die Phosphorylierung von Stat3 nicht (II). Allerdings interferiert das DBD-Peptid-Aptamer mit der DNA-Bindung von Stat3 (III). Sowohl durch die DD-Peptid-Aptamere als auch das DBD-Peptid-Aptamer kommt es zur Reduzierung der transkriptionellen Aktivität von Stat3 (IV).

Die Daten der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass beide Typen von Peptid-Aptameren, trotz der Unterschiede in ihren spezifischen Wirkmechanismen, den Stat3-Signalweg effektiv hemmen können. Aufgrund der unterschiedlichen Bindungsbereiche der

Peptid-Aptamere erfolgt die Inhibition des Stat3-Signalwegs auf verschiedenen Stufen im Aktivierungsszenario von Stat3 (Abb. 4.1.).

4.4. Peptid-Aptamere: Moleküle für die Grundlagenforschung und für die Validierung von Zielproteinen in der Medikamentenentwicklung

Die hier aufgezeigten Ergebnisse der isolierten DD-Peptid-Aptamere und des Peptid-Aptamers, das mit der DNA-Bindedomäne von Stat3 interagiert, belegen deutlich, dass Peptid-Aptamere verwendet werden können, um individuelle Schritte im Aktivierungsszenario von Stat3 zu inhibieren. Abhängig von der Bindungsstelle des Peptid-Aptamers an ein Zielprotein können individuelle Aspekte der Aktivierung bzw. Funktion des Zielproteins beeinflusst werden, ohne die Funktion von benachbarten funktionellen Domänen zu beeinflussen. Dies dürfte ein Vorteil gegenüber klassischen genetischen Untersuchungen zur Interferenz mit der Proteinfunktion darstellen, wie beispielsweise in RNAi (RNA-Interferenz) Ansätzen. Durch den Einsatz von siRNA (small interfering RNA) kommt es zur Degradierung der entsprechenden mRNA und damit zum Translationstopp des Proteins. Da dadurch das gesamte Protein betroffen ist, können folglich unterschiedliche funktionelle Domänen eines Proteins nicht unabhängig voneinander untersucht werden. Die Peptid-Aptamer-Technologie sollte es ermöglichen, dass Peptid-Aptamere verwendet werden können, um einzelne funktionelle Domänen eines Zielproteins zu charakterisieren und nachgeschaltete Signalwege zu identifizieren.

Durch die Möglichkeit Peptid-Aptamere zu identifizieren, die gezielt gegen bestimmte Domänen eines Zielproteins gerichtet sind, stellt die Peptid-Aptamer-Technologie eine Alternative zum Einsatz von Decoy-Oligonukleotide dar. So können, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, Peptid-Aptamere isoliert werden, die spezifisch mit der DNA-Bindedomäne von Transkriptionsfaktoren interagieren (Abb. 3.2.). Durch dieses Maskieren der DNA-Bindungsstelle wird verhindert, dass der Transkriptionsfaktor an den sequenz-spezifischen Bereich der Promotoren von Zielgenen bindet, wodurch die Expression dieser Gene unterbleibt. Ein vergleichbarer Inhibitionsmechanismus liegt der Wirkungsweise von Decoy-Oligonukleotide zugrunde. Decoy-Oligonukleotide sind kurze, Sequenz-spezifische, doppelsträngige DNA-Moleküle, die für den Bindebereich des jeweiligen Transkriptionsfaktors im Promotor des Zielgens kodieren. Durch die Transfektion von Decoy-Oligonukleotide, kommt es über die DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors zur Interaktion mit den Decoy-Oligonukleotiden, wodurch die DNA-Bindungsstelle des

Transkriptionsfaktors maskiert wird. Diese Konkurrenz resultiert in der reduzierten Anzahl von Transkriptionsfaktoren, die an die Promotoren der Zielgene binden.

Nach wie vor stellt das Herstellen von knock-out Mäusen ein wichtiger Schritt für die Charakterisierung der Funktionen eines Proteins im Gesamtorganismus dar. Trotz zahlreicher routinewordener Arbeitsschritte ist das Erzeugen einer knock-out Maus ein sehr zeitaufwendiger Prozess. Demgegenüber können transgene Mäuse, bei denen ein fremdes Gen in das Genom eingebracht wird, mit deutlich geringerem Zeitaufwand hergestellt werden. Der Einsatz von Peptid-Aptameren in der transgenen Maus-Technologie könnte sich als sehr vorteilhaft erweisen. So könnten transgene Mäuse hergestellt werden, die in ihrem Genom die Sequenz für ein Peptid-Aptamer tragen, das gegen das „auszuschaltende“ Protein gerichtet ist. Durch die Expression des Peptid-Aptamers würde dann die Funktion des Zielproteins effektiv inhibiert werden und durch die Untersuchung dieser transgenen Mäuse könnten dann Aussagen über die Rolle des zu untersuchenden Proteins im Organismus getroffen werden. Damit sollte das Generieren von solchen transgenen Peptid-Aptamer-Mäusen eine wirkungsvolle, weniger aufwändige und zeitsparende Alternative zur Herstellung von knock-out Mäusen darstellen.

Solche transgenen Peptid-Aptamer-Mäuse sollten wiederum weitere interessante Verwendungsmöglichkeiten, nicht nur in der Grundlagenforschung sondern auch der molekularen Medizin, eröffnen. Interferiert das eingeschleuste Peptid-Aptamer mit der Funktion eines krankheitsrelevanten Genprodukts, könnten die transgenen Peptid-Aptamer-Mäuse bei der Validierung des Proteins als potentielle Zielstruktur für die Medikamentenentwicklung eingesetzt werden. Hierfür müssten die transgenen Peptid-Aptamer-Mäuse mit den transgenen Mäusen, die das krankheitsrelevante Genprodukt exprimieren, gekreuzt werden. Die Nachkommen dieser Mäuse sollten dann sowohl das Peptid-Aptamer als auch das krankheitsrelevante Protein exprimieren. Anhand dieser doppel-transgenen Mäuse lassen sich dann für die medizinische Forschung u. a. folgende wichtige Frage klären: Wie beeinflusst die Inhibition des Genprodukts den Ausbruch und den Verlauf der Krankheit? Kommt es durch die Expression des Peptid-Aptamers zu einem abgeschwächten Krankheitsverlauf so eignet sich das krankheitsrelevante Protein als Zielprotein für die Entwicklung eines Therapeutikums. Eine weitere Strategie wäre es, das Peptid-Aptamer selbst zu einem möglichen Medikament weiterzuentwickeln, entweder in gentherapeutischen Ansätzen, als Peptid durch die Fusion mit einer Proteintransduktionsdomäne oder als chemische Verbindung durch die Herstellung eines peptidomimetischen Moleküls (siehe 4.6. und 4.7.).

Eine weitere Frage, die sich durch den Einsatz der doppel-transgenen Mäuse beantworten lässt, ist die Frage nach den Nebenwirkungen, die die Inhibition des Zielproteins verursacht. Dieser Punkt ist entscheidend für die therapeutische Relevanz des Zielproteins. Häufig sind krankheitsrelevante Proteine mutierte zelluläre Proteine, wie Onkogene, deren nicht-mutierte Formen (Proto-Onkogene) wichtige Rollen in der Signalweiterleitung normaler (nicht-transformierte) Zellen spielen (Felsher 2003). Deshalb gilt es zu evaluieren inwieweit sich der Verlust des Zielproteins negativ auf „normale“ gesunde Zellen und somit den gesamten Organismus auswirkt.

Sollten durch die Expression des Peptid-Aptamers gravierende Nebenwirkungen auftreten, so stehen für weiterführende Analysen mehrere Strategien zur Verfügung. So belegen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass es möglich ist Peptid-Aptamere zu isolieren, die spezifisch an einzelnen funktionellen Domänen des Zielproteins binden (Abb. 3.2.). Mit dem Einsatz eines Bait-Konstrukts, das für das mutierte krankheitsrelevante Gen kodiert, könnte bei dem Durchmustern einer Peptid-Aptamer-Bibliothek im Hefe-zwei-Hybrid-System ein Peptid-Aptamer isoliert werden, das spezifisch mit der mutierten Form des Zielproteins interagiert, während die Funktion der nicht-mutierten Form unbeeinflusst bleibt. Durch die Identifikation eines solchen spezifischen Peptid-Aptamers könnten mögliche Nebenwirkungen auf den Organismus verhindert werden.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Generierung von Mausmodellen, die das Peptid-Aptamer gewebe-spezifisch exprimieren. Der Einfluss, den die Peptid-Aptamer-Expression auf das von der Krankheit betroffene Gewebe hat, kann dann einen Einblick auf den therapeutischen Nutzen der Inaktivierung des Zielproteins und der potentiell therapeutischen Wirkung des Peptid-Aptamers geben. Für therapeutische Ansätze könnte zwar eine systemische Applikation des Peptid-Aptamers oder seiner daraus entwickelten Derivate (siehe 4.6. und 4.7.) nicht erfolgen, doch wäre eine lokale Behandlung mit dem Inhibitor denkbar. So konnte in der vorliegenden Arbeit durch die lokale Applikation eines Peptid-Aptamers, fusioniert an eine Proteintransduktionsdomäne (DBD-1-9R), eine Reduzierung des Tumorstwachstums in Mäusen beobachtet werden (Abb. 3.21. und 3.22.)

Vorangegangene und hier durchgeführte Untersuchungen zur gezielten Interferenz vermittelt durch Peptid-Aptamere zeigen, dass gegen die unterschiedlichsten zellulären (Rezeptoren, Cykline, Transkriptionsfaktoren) und viralen (Hepatitis B-Virus Kernprotein) Proteine inhibitorisch wirkende Peptide identifiziert werden können (diese Arbeit; Colas et al. 1996; Kolonin and Finley 1998; Cohen et al. 1998; Butz et al. 2000; 2001; Buerger et al. 2003). Demgegenüber ist der Einsatz von siRNA- bzw. antisense-Ansätzen auf Zielproteine

beschränkt, die in der Zelle kontinuierlich translatiert werden. Da es nur bei der permanenten Synthese von mRNA zum Abbau derselben kommen kann, mit der Folge, dass die zelluläre Konzentration des Zielproteins erniedrigt wird. Bei Zielproteinen, die eine lange Halbwertszeit haben, wie dies z. B. bei dem Bcr-Abl Fusionsprotein p210^{Bcr-Abl} der Fall ist, haben sich die therapeutischen Hoffnungen von siRNA- bzw. anti-sense-Ansätzen nicht erfüllt (Jahagirdar et al. 2001). Der Einsatz von spezifisch an das Bcr-Abl-Fusionsprotein bindende Peptid-Aptamere wäre auch hier ein möglicher therapeutischer Ansatz.

4.5. Einfluss der isolierten Peptid-Aptamere auf Tumorzellen

Tumorzellen zeichnen sich sowohl durch höhere Proliferationsraten als auch durch erhöhte Apoptoseresistenzen aus (Hanahan and Weinberg, 2000). Die zurzeit in klinischer Anwendung befindlichen Chemotherapeutika inhibieren Tumorwachstum und eliminieren Tumorzellen durch Induktion von Apoptose (Herr and Debatin, 2001; Johnstone et al. 2002). Im Gegenzug umgehen Tumorzellen die Funktion der Therapeutika durch die Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen, wie Bcl-x_L oder Bcl-2. Die Reduktion der Expression oder die funktionelle Inhibition der anti-apoptotischen Proteine sollte deshalb Tumorzellen für die Therapie mit Chemotherapeutika sensitivieren und dadurch den therapeutischen Erfolg erhöhen. So konnte in Zellkulturansätzen gezeigt werden, dass die Sensitivität von Tumorzellen nach der Reduzierung von Bcl-x_L für Chemotherapeutika wie Cisplatin deutlich erhöht wird (Heere-Ress et al. 2002). In Xenograft-Modellen in der Maus konnte der Apoptose-induzierende und chemosensitivierende Effekt von Bcl-2 anti-sense Oligonukleotiden so eindrucksvoll demonstriert werden, dass die Kombination von Bcl-2 anti-sense Oligonukleotiden und DTIC (Dimethyltriazeno-Imidazol-Carbosamid), einem Chemotherapeutikum das bei Melanompatienten eingesetzt wird, für die klinischen Studien der Phase I/II zugelassen wurde (Jansen et al. 1998; 2000).

Ein weiterer Angriffspunkt für die Verlangsamung des Wachstums solider Tumore stellt die Inhibition des VEGF-Signalweges dar. So ist die Neoangiogenese, die durch VEGF induziert wird, einerseits essentiell für Tumorwachstum, da die sich teilenden Zellen auf Nährstoffe und Sauerstoff angewiesen sind. Andererseits aber müssen auch toxische Stoffwechselprodukte, wie Kohlendioxyd, abtransportiert werden. Darüber hinaus ist die Vaskularisierung des Tumors entscheidend für die Metastasierung von Tumorzellen (Veikkola et al. 2000; Hughes 2004). Um die Neubildung von Blutgefäßen in soliden

Tumoren zu inhibieren sind VEGF-spezifische Antikörper (Bevacizumab) sowie Kinase-Inhibitoren des VEGFR (SU5416) in der klinischer Anwendung (Noble et al. 2004).

Auch in diesem Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten herausgearbeitet werden, dass Stat3 ein geeignetes Zielprotein für die Entwicklung neuer Tumorthapeutika darstellt, da es nicht nur die Expression von Zellzyklus- (z. B. Cyclin D1, c-Myc, p21, p53), Angiogenese- (VEGF) sondern auch von Apoptose-regulierenden Genen (TRAIL, CD95, Bcl-x_L, Survivin) steuert (Nakajima et al. 1996; Bellido et al. 1998; Catlett-Falcone et al. 1999; Kiuchi et al. 1999; Sinibaldi et al. 2000; Bowman et al. 2001; Ivanov et al. 2001; Aoki et al. 2003; Wei et al. 2003a; 2003b; Yu and Jove, 2004; Nagel-Wolfrum et al. 2004). So führt die Inhibition des Stat3-Signalwegs zu einem langsameren Tumorzellwachstum, zu einer Reduzierung der Angiogenese und zur Apoptose in Tumorzellen mit konstitutiv-aktivem Stat3 (Nielsen et al. 1997; Catlett-Falcone et al. 1999; Niu et al. 1999; 2000; Epling-Burnette et al. 2001; Garcia et al. 2001; Mora et al. 2002; Rahaman et al. 2002; Alas and Bonavida 2003; Wei et al. 2003a; 2003b; Nagel-Wolfrum et al. 2004).

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden zwei Tumorzelllinien mit konstitutiv-aktivem Stat3-Signalweg, die murine Melanomazelllinie B16 und die humane Myelomazelllinie U266, herangezogen. Sowohl in B16- als auch in U266-Zellen ist das Überleben der Zellpopulationen vom konstitutiv-aktivem Stat3-Signalweg abhängig. Eine Blockierung des Stat3-Signalwegs führt zum programmierten Zelltod (Catlett-Falcone et al. 1999; Niu et al. 1999; 2000). Mittels komplementierender Methodik konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass vor allem das Peptid-Aptamer DBD-1 in den beiden untersuchten Tumorzelllinien mit hyperaktivem Stat3 den Stat3-Signalweg inhibiert und Apoptose induziert.

4.5.1. Einfluss der isolierten Peptid-Aptamere auf die transkriptionelle Aktivität von Stat3

Transfektionsexperimente in der murinen Melanomazelllinie B16 zeigten den Einfluss der isolierten Peptid-Aptamere auf die transkriptionelle Aktivität von Stat3. Eine Reduktion der VEGF-Expression, einem bekannten Zielgen von Stat3, konnte sowohl mit den DD-Aptameren, als auch mit Peptid-Aptamer DBD-1 demonstriert werden (Abb. 3.10.). VEGF spielt eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression von soliden Tumoren, beispielsweise von Melanomen. Untersuchungen der VEGF-Signalübermittlung heben die wichtige Rolle

von Stat3 in diesem Signalweg hervor. So reguliert Stat3 direkt die Expression des Liganden VEGF (Wei et al. 2003b), sodass es durch die Inhibition des Stat3-Signalweges zu einer Reduzierung der VEGF-Expression kommt (Abb. 3.10.; Niu et al. 2000). Da VEGF die Proliferation und Migration von Endothelzellen induziert, kann durch eine erniedrigte VEGF-Konzentration auch die Angiogenese in soliden Tumoren inhibiert werden (Wei et al. 2003a; 2003b). Darüber hinaus zeigen neueste Untersuchungen, dass die Signalweiterleitung des VEGFR-Signals nicht nur über den MAPK-Signalweg erfolgt (Landgren et al. 1998), sondern auch über Stat3 (Yahath et al. 2003). Des Weiteren zeigten Yahath et al. (2003), dass durch die Inhibition des Stat3-Signalweges die Migration und die charakteristische Röhrenformation von dermalen mikrovaskulären Endothelzellen inhibiert wird. Die direkte Interferenz mit dem Stat3-Signalweg kann demnach die Angiogenese in Tumorzellen auf zwei Ebenen inhibieren: Erstens durch die Hemmung der Transkription von VEGF, wodurch der Signalweg nicht angeschaltet wird und zweitens durch das Blockieren der morphologischen Veränderungen von mikrovaskulären Epithelzellen, die für die Bildung von Blutgefäßen in Rahmen der Neovaskularisierung des Tumorgewebes wichtig sind. Die Peptid-Aptamer vermittelte Reduzierung der VEGF-Expression ist somit ein wichtiger positiver Aspekt bei der Beurteilung der Funktionalität der isolierten Peptid-Aptamere.

Neben der Erniedrigung der VEGF-Expression konnte auch eine Reduzierung der Anzahl an lebenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen nach Transfektion der isolierten Peptid-Aptamere gezeigt werden (Abb. 3.11.). Des Weiteren demonstrierten Luziferase-Reporter-Experimente einen deutlichen inhibitorischen Effekt des DBD-Peptid-Aptamers, auf die Expression des Reportergens (Abb. 3.9.), sowie einen Apoptose-induzierenden Einfluss von Peptid-Aptamer DBD-1 in der murinen Melanomazelllinie B16 (Abb. 3.12.; Tab. 3.2.). Diese Ergebnisse bestätigen, dass durch das DBD-1-Peptid-Aptamer der Stat3-Signalweg effektiv gehemmt wird. Entgegen den inhibitorischen Effekten des DBD-1-Peptid-Aptamers konnte weder in Luziferase-Reporter-Experimente noch in TUNEL-Färbungen der inhibitorisch wirkende Effekt der DD-Aptamere weiter verifiziert werden. Bislang ist nicht klar, warum die DD-Peptid-Aptamere die Expression von VEGF und die Überlebensrate reduzieren, jedoch in Luziferase-Reporter-Experimenten und TUNEL-Analysen keinen Effekt hatten. Es wäre möglich, dass die Bindung der DD-Peptid-Aptamere an Stat3 die Rekrutierung von Co-Faktoren, die eine wichtige Rolle bei der Regulation der Proliferation bzw. VEGF-Expression spielen, inhibieren, während die Interaktion mit Faktoren, die eine Funktion bei der Induktion der Apoptose spielen, nicht beeinflusst wird. Die molekularen Mechanismen, die hierfür verantwortlich sind, könnten in weiterführenden

Experimenten, wie Chromatin-Immunoprecipitation mit anschließender Analyse der in den Komplexen enthaltenen Proteine, aufgeklärt werden. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass die intrazelluläre Menge an exprimierten DD-Peptid-Aptameren nach der transienten Transfektion zu gering ist, um einen Effekt auf die Apoptoserate der Tumorzellen auszuüben, jedoch ausreicht um die Transkription von VEGF zu reduzieren. Untersuchungen von Wei et al. (2003b) zeigten, dass die Expression von VEGF bereits durch eine minimale Reduzierung der Stat3-Aktivität deutlich reduziert wird. Im Gegensatz dazu könnten Gene, die für Apoptose-relevante Genprodukte kodieren, unter einer weniger feinregulierten Kontrolle des Transkriptionsfaktors Stat3 stehen. Dies hätte zur Folge, dass deutlich mehr Stat3-Molekülen in ihrer Funktion gehemmt werden müssen, um eine Veränderung in der Expression des Apoptose-regulierenden Genprodukts zu erreichen. Demnach sollte eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration der DD-Peptid-Aptamere zu einer Steigerung des biologischen Effektes führen. Genau dies zeigte sich bei den durchgeführten Transduktionsexperimenten. So konnten bei der Transduktion einer hohen Konzentration von Peptid-Aptamer DD-2 biologische Effekte, wie beispielsweise PARP-Spaltung, detektiert werden (Abb. 3.20.).

4.5.2. Peptid-Aptamer DBD-1 induziert Apoptose in Stat3-abhängigen Tumorzellen

Bei den durchgeführten Untersuchungen zum Apoptoseverhalten von B16-Zellen zeigten TUNEL-Assays eindrucksvoll, dass durch Transfektion des DBD-1-Peptid-Aptamers über 50% der Zellen im Versuchsansatz in Apoptose gehen (Tab. 3.2.). Demnach ist Peptid-Aptamer DBD-1 in der Lage den Stat3-Signalweg effektiv zu inhibieren und dadurch den programmierten Zelltod in B16-Zellen zu induzieren. Peptid-Aptamer DBD-1 erwies sich somit als der potenteste Initiator von Apoptose in diesen Experimenten (Abb. 3.12.; Tab. 3.2.). Des Weiteren zeigten detailliertere Analysen der TUNEL-Markierungen, dass nicht nur transfizierte Zellen in Apoptose (Trx+/TUNEL+) gehen, sondern auch Zellen, die sich in Nachbarschaft der transfizierten Zellen (Trx-/TUNEL+) befinden, den programmierten Zelltod einleiten (Abb. 3. 12.; Tab. 3.2.). Vergleichbare Beobachtungen, die auf diesen sogenannten „Bystander-Effekt“ hinweisen, wurden nach der Transfektion eines dominant-negativen Stat3-Konstrukts in B16-Tumorzellen *in vivo* beobachtet (Niu et al. 1999; 2001). Niu et al. (2001) führten diesen „Bystander“-Effekt auf die Sekretion des Apoptose-induzierenden TRAIL-Liganden durch transfizierten Zellen, als Folge der Inhibition ihres

Stat3-Signalwegs, zurück. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Hypothese, dass TRAIL ein negativ-reguliertes Zielgen von Stat3 ist.

Der Apoptose-induzierende TRAIL-Faktor hat große Bedeutung für die Tumorthherapie. TRAIL stellt eines der wenigen Moleküle dar, das in den meisten nicht-transformierten Zellen keine Apoptose auslöst, während eine Vielzahl von Tumorzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* sensitiv auf TRAIL-induzierte Apoptose reagieren (Ashkenazi and Dixit, 1998; Walczak and Krammer 2000; Smythe et al. 2002; Ivanov et al. 2003). Darüber hinaus konnte in Tumormodellen sowohl in Mäusen als auch in Primaten gezeigt werden, dass die systemische Gabe von TRAIL zu einer deutlichen Tumorregression führt, ohne Nebenwirkungen hervorzurufen (Ashkenazi et al. 1999; Walczak et al. 1999). Basierend auf diesen Daten kam die TRAIL-vermittelte Tumorthherapie in klinischen Studien zu Einsatz und hat bei der Behandlung von Melanompatienten zu vielversprechenden Ergebnissen geführt (Ivanov et al. 2003). Die direkte Induktion der TRAIL-Expression in Tumorzellen sollte daher von großem therapeutischem Wert sein.

Bei dem Vergleich der Daten der vorliegenden Arbeit mit Untersuchungen eines synthetischen Stat3-Inhibitors zeigte sich, dass mit dem Hefe-zwei-Hybrid-System ein ebenso potenter Inhibitor des Stat3-Signalwegs identifiziert wurde, wie mit einem aufwendigen, maschinellen Verfahren („high-throughput cytoblot“). Dieser chemische Stat3-Inhibitor JSI-124 (Curcubitacin I; siehe 1.4.) wurde aus 1992 chemischen Komponenten isoliert und reduziert die Phosphorylierung von Stat3-Molekülen (Blaskovich et al. 2003). In vergleichbaren Experimenten, allerdings in anderen Tumorzelllinien, kam es bei der Behandlung mit dem niedermolekularen Hemmstoff JSI-124 in Zellkulturansätzen lediglich zu einer Erhöhung der Apoptoserate um 11,1–17,6%, während die transiente Transfektion des DBD-Peptid-Aptamer die Apoptoserate um das 25-fache erhöhte (Tab. 3.2.). Zusätzlich reduziert dieser Inhibitor, vergleichbar zu den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen (Abb. 3.11.; 3.16.-18A.), das Tumorzellwachstum in Zellkulturansätzen (Blaskovich et al. 2003).

Des Weiteren unterstützen Ergebnisse dieser Arbeit, dass durch die Blockierung von Stat3 das Tumorstadium *in vivo* inhibiert werden kann. So reduziert das Peptid-Aptamer DBD-1 (Abb. 3.21; Abb. 3.22), gleich dem niedermolekularen Stat3-Inhibitor JSI-124 (Blaskovich et al. 2003) im B16-Mausmodell das Tumorstadium. In beiden tierexperimentellen Therapieansätzen konnte das Wachstum der Tumoren um ca. 50% reduziert werden. Erste histologische Untersuchungen anhand von Hämatoxylin-Eosin-Färbungen deuten darauf hin, dass die Blutgefäßbildung in DBD-1 behandelten Tumoren im

Vergleich zu kontrollbehandelten Tumoren verändert ist (B. Brill, persönliche Mitteilung). Diese Beobachtungen würden die bereits publizierten Daten bestätigen, die darauf hinweisen, dass Stat3 eine wichtige Rolle bei der Neovaskularisierung spielt (siehe 4.5.1.; Wei et al. 2003a; 2003b; Yahata et al. 2003). Zu einer genauen Klärung wären jedoch immunhistochemische Untersuchungen zur Visualisierung der Blutgefäße, beispielsweise durch die subtumorale Lokalisation des Faktor XIII oder CD31, notwendig.

Durch die Applikation der Peptid-Inhibitoren von Stat3 (DBD-1: Abb. 3.21.; 3.22. bzw. JSI-124: Blaskovitch et al. 2003) wurde keine vollständige Regression der Tumore bewirkt. Eine Strategie in weiteren therapeutischen Ansätzen zur Verstärkung der Wachstumsinhibition, wäre eine Parallelbehandlung mit den Peptid-Inhibitoren zusätzlich zu „konventionellen“ Chemotherapeutika. Eine solche Möglichkeit wurde bereits in vorangegangenen Untersuchungen an Tumorzelllinien erfolgreich eingesetzt. Diese Daten zeigten, dass durch die Inhibition des Stat3-Signalwegs Tumorzellen für die Wirkung der Zytostatika sensitiviert werden. So konnte durch die Kombinationstherapie von Stat3-Inhibitoren und Chemotherapeutika ein synergischer Effekt bei der Initiation von Apoptose erreicht werden (Alas et al. 2001; Burdelya et al. 2002; Alas and Bonavida 2003). Eine weitere Möglichkeit wäre es, die Größe des Peptid-Aptamers zu reduzieren, um die Diffusion im extrazellulären Raum des Tumorgewebes zu erhöhen. Diese und weitere Optimierungsmöglichkeiten von Peptid-Aptameren werden im Abschnitten 4.6. und 4.7. näher diskutiert.

Wie bereits oben ausgeführt, stellt die Deregulation des Apoptose-Signalwegs ein Schlüsselereignis sowohl für die Krebsentstehung als auch für die Resistenzentwicklung während der Tumorthherapie dar. So revolutionierte die Entdeckung, dass Bcl-2 als Onkogen wirkt, die bisherigen Konzepte zur Tumorentstehung (Vaux et al. 1988). Neueste Untersuchungen zeigen, dass die Regulation anti-apoptotisch wirkender Proteine ein wichtiger Mechanismus darstellt, der an der Entstehung von Apoptoseresistenz beteiligt ist (Alas and Bonavida 2003). Während in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten B16-Melanomazellen die Ursache der Protektion vor Apoptose nicht abschließend geklärt ist, stellt die Überexpression von Bcl-x_L in der ebenfalls untersuchten Myelomazelllinie U266 die molekulare Ursache für die Apoptoseresistenz dar (Abb. 3.19. und 3.20.; Catlett-Falcone et al. 1999). Die Überexpression von anti-apoptotisch wirkenden Bcl-2 Familienmitgliedern, wie Bcl-x_L und Bcl-2, kann in vielen Tumorzellen beobachtet werden und trägt in großem Maße zu der neoplastischen Zellvermehrung bei (Reed 1998; Debatin et al. 2002).

Die Entwicklung von Chemoresistenzen stellt das größte Problem bei der Behandlung von Tumorpatienten dar. So sprechen viele Patienten zunächst gut auf die chemotherapeutische Behandlung an, aber im Laufe der Therapie kommt es aufgrund der Entstehung von chemoresistenten Tumorzellen zum Rückfall (Alas and Bonavida 2003). Darüber hinaus zeigen zahlreiche Studien, dass Patienten mit erhöhter Bcl-x_L- oder Bcl-2-Expression nur unzureichend auf die Chemotherapie ansprechen und somit eine schlechte Prognose haben (Dole et al. 1995; Debatin et al. 2002). Die Inhibition anti-apoptotisch wirkender Proteine sollte demnach Tumorzellen für die Induktion von Apoptose sensitiveren (Reed 2000a). In der Tat bestätigen sowohl anti-sense Ansätze als auch niedermolekulare Inhibitoren für Bcl-x_L diese These (Simoes-Wust et al. 2000; Leech et al. 2000; Degterev et al. 2001; Tzung et al. 2001; Smythe et al. 2002). Die Daten der vorliegenden Arbeit (Abb. 3.19.; 3.20.) zeigten, gleich den anti-sense Experimenten, dass durch die Reduzierung der intrazellulären Bcl-x_L-Konzentration Tumorzellen den programmierten Zelltod einleiten.

Aus bereits publizierten Daten ist zudem der molekulare Mechanismus dieses Apoptose-Signalweges bekannt (Reed 2000b). So führt die reduzierte Menge an Bcl-x_L zu Änderungen im Gleichgewicht von Bcl-x_L:pro-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern (zum Beispiel: Bad, Bax). Diese Verschiebung die Seite der pro-apoptotischen Familienmitglieder führt zur Cytochrom c Ausschüttung aus den Mitochondrien (Cory and Adams 2002). Dadurch kommt es zur Aktivierung von Caspasen, wie beispielsweise die Spaltung der Effektor-Caspase-3, die wiederum zahlreiche Substrate, zum Beispiel PARP (polyADP-ribosyl Polymerase) spaltet (Reed 2000b). Die Degradation von PARP und die Detektion seiner Spaltprodukte werden als Indikator von Apoptose angesehen (Patel et al. 1996). Genau diese Spaltung von Caspase-3 sowie von PARP konnte in der vorliegenden Arbeit nach der Reduzierung der intrazellulären Bcl-x_L-Konzentration nachgewiesen werden (Abb. 3.19.; 3.20.). Eine Initiation des Apoptose-Signalweges sollte nicht nur durch die gezielte Hemmung der Proteinfunktion oder die Inhibition der Translation, sondern auch durch die direkte Blockierung der Bcl-x_L-Transkription erzielt werden. Untersuchungen der vorliegenden Arbeit (Abb. 3.19.), sowie bereits publizierte Daten an der humanen Myelomazelllinie U266 (Catlett-Falcone et al. 1999) haben gezeigt, dass das anti-apoptotische Protein Bcl-x_L unter der transkriptionellen Kontrolle von Stat3 steht. Beide Arbeiten bestätigen somit, dass die Inhibition von Stat3 zu einer Reduzierung der Bcl-x_L-Expression führt. Die proteolytischen Spaltung von Caspase-3 und PARP-Proteins konnten in der vorliegenden Arbeit nach Applikation der Peptid-Aptamere in Western Blot Analysen demonstriert werden (Abb. 3.20.). Durch die Blockierung des Transkriptionsfaktors Stat3

vermittelt durch Peptid-Aptamere kommt es als Folge der reduzierten Bcl-x_L-Expression zur Auslösung von Apoptose (Abb. 3.20.). Ein vergleichbarer Effekt konnte durch Applikation von dominant-negativem Stat3 erzielt werden (Catlett-Falcone et al. 1999).

Die Daten der vorliegenden Arbeit ergänzen zudem bereits publizierte Daten, die darauf hinweisen, dass in der humanen Myelomazelllinie U266 der IL-6-Jak-Stat3 Signalweg eine essentielle Rolle nicht nur in der Regulation der Zellzyklusregulation spielt (Oshiro et al. 2001), sondern vielmehr auch eine Protektion vor dem programmierten Zelltod darstellt (Abb. 3.20.; Catlett-Falcone et al. 1999). Durch die autokrine Sekretion von IL-6 in den U266-Zellen kommt es zur konstitutiven Aktivierung von Stat3. Dies verursacht einerseits eine verstärkte Expression des Cyklin D1-Gens, wodurch die Proliferationsrate der Zellen erhöht wird (Fukada et al. 1998; Masuda et al. 2002). Andererseits bewirkt die konstitutive Aktivierung von Stat3 eine vermehrte Expression von Bcl-x_L, das die Zellen vor Apoptose schützt. Die Blockierung des Stat3-Signalweges resultiert somit in einer reduzierten Proliferationsrate (Fukada et al. 1998; Catlett-Falcone et al. 1999; Masuda et al. 2002) und induziert darüber hinaus Apoptose (Abb. 3.20.; Catlett-Falcone et al. 1999; Masuda et al. 2002).

Häufig sind die molekularen Ursachen, die die Hyperaktivität von Stat3 verursachen bekannt. In der hier verwendeten Myelomazelllinie ist die konsitutive Aktivierung von Stat3 auf die autokrine Sekretion von IL-6 zurückzuführen. Das Stilllegen des negativen Regulators SOCS-1 konnte in Leberkarzinomzellen als Mechanismus der erhöhten Stat3-Aktivität nachgewiesen werden (Yoshikawa et al. 2001). Die Kenntnis des genauen Stat3-Signalweges bietet die Möglichkeit auch die Stat3 aktivierende Kinase zu inhibieren, beispielsweise durch den Jak2-Inhibitor AG490 (siehe 4.5.3.). Jedoch gibt es auch zahlreiche Tumore in denen die molekulare Ursache für die Hyperaktivität von Stat3 oder anderer deregulierter Transkriptionsfaktoren noch nicht identifiziert wurde, sodass die Möglichkeit, die Aktivitäten dieser Knotenpunkten der Signaltransduktion mittels Kinase-Inhibitoren zu hemmen, nicht gegeben ist. Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Strategie zur direkten Interferenz eines Transkriptionsfaktors durch Peptid-Aptamere stellt somit einen guter und neuartiger Ansatzpunkt für die Entwicklung potentiell therapeutisch einsetzbarer Transkriptions-Inhibitoren dar.

4.5.3. Peptid-Aptamer DBD-1 beeinflusst die Überlebensrate von Stat3-unabhängigen Tumorzellen nicht

Ein andere wichtige Hürde, die für potente Inhibitoren von Tumorzellen genommen werden muss, um als potentielles Therapeutikum zu fungieren, ist neben ihren anti-tumoralen Eigenschaften auch eine möglichst geringe Toxizität gegenüber nicht-malignen Zellen (Yu and Jove 2004). Um ein möglichst breites therapeutisches Fenster zu erhalten, sollten die Unterschiede in der Sensitivität von Tumorzelle für das Therapeutikum im Vergleich zu nicht-malignen Zellen möglichst groß sein. So wirken die zur Zeit eingesetzte Tumorthapeutika, wie Taxol, das die Mikrotubuli im Cytoskelett stabilisiert, Cisplatin, das DNA-Schäden induziert oder Gencitabin, das die DNA-Synthese und -Reparatur hemmt, unselektiert auf alle stark proliferierenden Zellen des Organismus. Zwar zeigen Tumorzellen häufig eine erhöhte Sensitivität gegenüber den Medikamenten, dennoch kommt es zu starken Nebenwirkungen, wie Übelkeit, Anämie und Haarausfall, die die PatientInnen psychisch und physisch stark belasten können. Ziel der derzeitigen Medikamentenforschung ist es hochspezifische Therapien zu entwickeln, die die molekularen Ursachen des Tumorwachstums berücksichtigen und dadurch vor allem Proliferation und/oder das Überleben der transformierten Zellen inhibieren. Viel versprechende Ansätze, die sich auch schon im therapeutische Einsatz befinden, gibt es beispielsweise für Patienten mit EGFR überexprimierenden Tumoren (Cetuximab, IRESSA), für Brustkrebspatientinnen, die eine erhöhte Expression des Erb2-(HER2/Neu)-Rezeptor aufweisen (Herceptin) oder CML-Patienten mit einer Bcr-Abl Translokation (Glivec; STI-1571) (Noble et al. 2004). Diese spezifisch wirkenden Medikamente zeichnen sich durch eine deutlich niedrigere Toxizität gegenüber nicht-transformierten Zellen aus, wodurch die Nebenwirkungen auch deutlich schwächer sind als bei der „klassischen“ Chemotherapie.

In diesem Punkt konnte in der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten gezeigt werden, dass Stat3 ein geeignetes Zielprotein für die Entwicklung neuer molekularer Inhibitoren darstellt (Catlett-Falcone et al. 1999; Niu et al. 1999; 2000; Blaskovich et al. 2003). So konnte durch die Applikation von Peptid-Aptamer DBD-1 die Lebensfähigkeit von Stat3-abhängigen Tumorzellen deutlich reduziert werden (Abb. 3.18A.), während Tumorzellen, die kein konstitutiv-aktives Stat3 aufwiesen, also unabhängig vom Stat3-Signalweg proliferieren, in ihrem Wachstum nicht beeinflusst waren (Abb. 3.18B.). Als möglicher Mechanismus der erhöhten Sensitivität von Tumorzellen mit konstitutiv-aktivem Stat3 gegenüber Stat3-Inhibitoren wird diskutiert, dass diese malignen Zellen in ihrer Proliferation und ihrem Überleben vom Stat3-Signalweg abhängig sind

(Burke et al. 2001). Im Gegensatz dazu können nicht-transformierte Zellen alternative Signalwege nutzen, um den Verlust des Stat3-Signalweges zu kompensieren (Burke et al. 2001). Bestätigung für die Hypothese, dass Zellen, die kein konstitutiv-aktives Stat3 besitzen, möglicherweise bis zu einem gewissen Grad resistent gegen eine Stat3-gerichtete Therapie sind, finden sich, neben den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Daten (Abb. 3.18B.), zahlreich in der Literatur. So konnten Blaskovich et al. (2003) bei der Applikation des niedermolekularen Inhibitors JC-124 zeigen, dass das Tumorwachstum von Stat3-hyperaktiven Zellen reduziert wurde, während Ras-transformierte Tumorzellen in ihrem Wachstum nicht gehemmt wurden. Des Weiteren wurden in Tierexperimenten keine Nebenwirkungen, wie Gewichtsabnahme, reduzierte Aktivität, verändertes Fressverhalten, bei der systemischen Applikation des JSI-124 Inhibitors in den behandelten Mäusen beobachtet. Allerdings entwickelten die JSI-124-behandelten Mäuse, sowohl bei der systemischen als auch bei der lokalen Applikation, an den Injektionsstellen Ödeme (Blaskovich et al. 2003). Solche Lokalreaktionen wurden bei der intratumoralen Applikation des Peptid-Aptamers DBD-1-9R nie beobachtet.

Der Einsatz von Stat3 antisense-Oligonukleotiden oder eines dominant-negativem Stat3-Konstrukts induzierte in Lungenkarzinomazellen mit hyperaktivem Stat3 Apoptose, während Lungenkarzinomazellen, die kein konstitutiv-aktives Stat3 exprimierten, den programmierten Zelltod nicht einleiteten (Song et al. 2003). In Untersuchungen mit einem weiteren Stat3-Inhibitor, dem Tyrosine-Kinase Blocker AG490, weisen die Daten darauf hin, dass auch Brustkrebs- und Ovarienzelllinien mit konstitutiv-aktivem Stat3 durch die Zugabe des Inhibitors in ihrem Wachstum gehemmt werden (Burke et al. 2001). Vergleichbare Studien mit dem AG490-Inhibitor an Zellen aus Leukämiepatienten zeigten, dass das Tumorzellwachstum *in vitro* und *in vivo* inhibiert werden kann. Weiterführende Analysen ergaben, dass keine Nebenwirkungen auf die normale Hämatopoese festgestellt werden konnte (Meydan et al. 1996). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit übereinstimmend mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass die Inhibition des Stat3-Signalwegs eine gute Möglichkeit zur Tumorbehandlung mit hohem therapeutischen Index darstellt.

4.6. Peptid-Aptamere als Ausgangsstrukturen für die Entwicklung von neuen Medikamenten

Die in Herc-Zellen durchgeführten Experimente zeigten deutlich, dass die DD-Peptid-Aptamere in der Lage sind mit der Phosphorylierung von monomeren Stat3-Molekülen zu interferieren (Abb. 3.6.). Allerdings konnte ihre Funktionalität in Tumorzellen mit konstitutiv-aktivem Stat3 nicht (Abb. 3.9.; 3.12; Tab. 3.2.) bzw. nur bedingt (Abb. 3.19.; 3.20.) validiert werden. Es könnte sein, dass die isolierten Peptid-Aptamer aufgrund ihrer Größe nicht in der Lage sind, bereits gebildete Stat3-Dimere, wie sie in Tumorzellen mit konstitutiv-aktivem Stat3 vorliegen, in deren Funktion zu inhibieren. So sind die bisher isolierten Peptid-Inhibitoren gegen die Dimerisierungsdomäne von Stat3 nur wenige Aminosäuren lang (Blaskovich et al. 2003; Ren et al. 2003). In weiteren Arbeitsschritten könnte deshalb versucht werden das Molekulargewicht der erheblich größeren, isolierten Peptid-Aptamer zu reduzieren. Durch Deletionen in der Peptid-Aptamersequenz würde dann der Bereich identifiziert werden, der essentiell für die Interaktion mit Stat3 ist. Mit diesem Ansatz könnte die Anzahl der für die spezifische Interaktion mit Stat3 essentiellen Aminosäuren unter Umständen auf weniger als zehn Aminosäuren reduziert, und die flankierenden Bereiche, die keine Rolle bei der Interaktion mit Stat3 spielen, deletiert werden. So zeigte der von Turkson et al. (2003) aus sechs Aminosäuren identifizierte Phospho-Peptid-Inhibitor eine Spezifität für Stat3 und eine effektive Inhibition des Stat3-Signalweges. Allerdings sollte der interagierende Bereich des Peptid-Aptameres nicht zu klein gewählt werden, da mit der Größe der Makromoleküle auch der Grad ihrer Bindungsinformationen ansteigen dürfte (Snyder et al. 2004). Durch Mutagenese in der kodierenden Sequenz der Peptid-Aptamere könnte des Weiteren die Affinität der Peptid-Aptamere an Stat3 erhöht werden. Im Bezug auf solche „modifizierten“ Peptid-Aptamere sollten dann zunächst in Interaktionsstudien, wie Ko-Immunopräzipitationen oder vergleichbar zu den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Mating-Experimenten in Hefen, die Spezifität der verkleinerten Peptid-Aptamere überprüft und in weiterführenden Experimenten ihre Funktionalität validiert werden.

Im nächsten Schritt könnte darüber hinaus versucht werden das Scaffold-Protein Thioredoxin entweder zu reduzieren oder gegen ein anderes, kleineres Gerüstmolekül auszutauschen. Ein vollständiger Verzicht auf das Scaffold-Protein würde zu linearen Peptid-Aptameren führen, die ein deutlich reduziertes Molekulargewicht aufweisen. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass lineare Peptide eine 10-1000-fach geringere Bindungsaffinität und damit verbunden auch eine reduzierte inhibitorische Affinität

aufweisen als die „Original“-Peptid-Aptamere in ihrem Scaffold-Protein (Colas et al. 1998; Fabrizio et al. 1999). Weitere Studien weisen darauf hin, dass das Ersetzen des Thioredoxin-Scaffold durch ein anderes, beispielsweise das grün fluoreszierende Protein GFP, zu einer Verschlechterung der Funktionalität des ursprünglichen Peptid-Aptamers führen kann (Klevenz et al. 2002). Bei der Reduzierung/Veränderung des Thioredoxin-Scaffolds sollte demnach auf den Erhalt der Konformation des integrierten Peptides geachtet werden. Das so gewonnene „kleine“-Peptid-Aptamer könnte dann auf seine Funktionalität in Tumorzellen mit konstitutiv-aktivem Stat3 getestet werden. In weiterführenden Untersuchungen müsste dann geklärt werden, ob das „kleine“-Peptid-Aptamer in *in vivo* Experimenten, beispielsweise nach intratumoralen Injektion, eine andere Verteilung im Gewebe aufweist als das ursprüngliche Peptid-Aptamer. Die Verkleinerung der Peptid-Aptamere könnte sich generell als vorteilhaft für ihre klinische Anwendung erweisen. So machen solide Tumoren 90% von humanen Tumorerkrankungen aus. Große Moleküle, wie Antikörper, die tumorspezifische Antigene erkennen, haben hier nur geringe Verwendung, da die großen Immunkonjugate nicht in der Lage sind Tumorgewebe zu penetrieren (Dvorak et al. 1991; Shockley et al. 1991). Die Identifikation von kleinen Peptiden, die spezifisch mit einem tumorspezifischen Oberflächenantigen interagieren, eröffnen somit neue therapeutische Möglichkeiten, und besitzen nicht die Limitation ihrer großen Antikörpervorgänger (Hong and Clayman 2000).

Die Integration der Peptid-Aptamere in das Thioredoxinmolekül schafft jedoch auch die Grundlage peptido-mimetische Verbindungen zu entwickeln (Butz et al. 2001). Die dahinter stehende Strategie beruht auf den Fakten, dass die Struktur von Thioredoxin bereits aufgeklärt wurde und die Peptid-Aptamere durch ihre Integration in das Scaffoldmolekül eine stabile Konformation einnehmen (Ladner 1995). Diese Tatsachen sollten helfen, um ausgehend von der Proteinstruktur der selektierten Peptid-Aptamere, synthetische peptido-mimetische Verbindungen zu generieren. Untersuchungen mit einem aus der Sequenz von Stat3 abgeleiteten Phospho-Peptid zeigen, dass durch chemische Modifikation die Effektivität des Inhibitors deutlich erhöht werden kann (Turkson et al. 2004). Ein solches „drug-design“, ausgehend von einer Proteinstruktur bis zu einem Medikament, wurde auch bei der Entwicklung von HIV-Proteaseinhibitoren schon erfolgreich angewendet (Leung et al. 2000).

4.7. Fusion von Peptid-Aptameren mit weiteren funktionelle Domänen

– ein möglicher neuartiger therapeutischer Ansatz

Die klinische Anwendbarkeit von Peptid-Aptameren steckt noch in ihren „Kinderschuhen“. Jedoch besitzen, wie im vorherigen Abschnitt ausgeführt, Peptid-Aptamere das Potential Ausgangsmoleküle für die Medikamentenentwicklung zu sein. Durch Modifikationen der Peptid-Aptamere wie die Fusion mit zusätzlichen funktionellen Domänen, könnten sich Einsatzmöglichkeiten von diesen Molekülen jedoch noch weiter erhöhen lassen. Dabei sollte neben der Verkürzung der Peptid-Aptamere, vor allem die Fusion mit zusätzlichen funktionellen Domänen, die Effektivität der Peptid-Aptamere steigern und damit ihr Anwendungsspektrum erweitern.

4.7.1. Proteintransduktion als Methode zur transienten Applikation von Peptid-Aptameren

Neben der klassischen Methode der Transfektion, bei der die kodierenden DNA-Sequenzen der Peptid-Aptamere in die Zelle eingebracht werden, wurden in der vorliegenden Arbeit die Peptid-Aptamere mittels einer alternativen Methode, der Proteintransduktion, erfolgreich in Zellen eingeschleust. Die Proteintransduktion ermöglicht die Aufnahme rekombinant exprimierter Proteine durch die Zellmembran in das Zytoplasma von Zellen, in dem sie ihre physiologische Funktion entfalten können. Als Proteintransduktionsdomäne (PTD) wurde in der vorliegenden Arbeit die von Wender et al. (2000) beschriebenen 9-Arginin-Domäne verwendet. Die Ergebnisse der hier durchgeführten indirekten Immunfluoreszenz zeigten, dass rekombinant exprimierte Fusionsproteine, bestehend aus Peptid-Aptamer und 9-Argininen, in der Lage sind Zellmembranen zu passieren und in die Zellen einzudringen (Abb. 3.15.). Des Weiteren zeigten die PTD-Experimente der vorliegenden Arbeit, dass in 100% der Zellen, die mit einem Peptid-Aptamer fusioniert an die PTD aus neun Argininen behandelt wurden, das Protein in den Zellen detektiert werden konnte (Abb. 3.15.). Vergleichbare Transduktionsresultate konnten auch bei der Transduktion der humanen Myelomazelllinie U266 erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis steht ganz im Gegensatz zu den durchgeführten Transfektionsexperimenten mittels herkömmlichen Methoden (mit z. B. Elektroporation, Lipofectamine 2000) der U266-Zellen, mit denen eine Transfektionseffizienz von nur ca. 1% erreicht werden konnte (Daten nicht gezeigt). Somit ist die Effizienzrate der Proteintransduktion um ein vielfaches höher als die Effizienz in

Transfektionsexperimenten. Diese Daten unterstützen die Beobachtungen, dass in Zellen, die nur geringe Transfektionsraten aufweisen oder aber eine hohe Toxizität gegenüber Transfektionsreagentien zeigen, durch Proteintransduktion mit hoher Effizienz Proteine eingeschleust werden können (Schwarze and Dowdy 2000; Green et al. 2003). So können beispielsweise Osteoklasten oder periphere mononukleare Blutzellen (PMBCs, *engl.*: peripheral-blood mononuclear cells), die sich nur schlecht transfizieren oder ausschließlich mit Hilfe von Retroviren transduzieren lassen, mittels PTD effektiv transduziert werden (Schutze-Redelmeier et al. 1996; Chellaiah et al. 2000; Dolgilevich et al. 2002).

Nicht nur die Aufnahme des transduzierten Peptid-Aptamers in die Zellen, sondern auch seine intrazelluläre Funktionalität ist ausschlaggebend für seinen inhibitorischen Einfluss auf Stat3. Die hier durchgeführten Experimente, die diese Fragestellung klären sollten, zeigten, dass das transduzierte Peptid-Aptamer DBD-1-9R intrazellulär funktionell aktiv ist und den Stat3-Signalweg effektiv hemmt (Abb. 3.16.-18A.; 3.19.-22.). Zudem konnten die aus den *in vivo* Analysen der murinen B16-Zellen gewonnenen Erkenntnisse in weiterführenden Untersuchungen in einer zweiten Tumorzelllinie mit konstitutiv-aktivem Stat3 (humane U266-Zellen) validiert werden (3.17.; 3.18A.-20.).

Probleme bei gentherapeutischen Ansätzen sind die präzise Kontrolle der Menge und der Dauer der Expression der therapeutischen Proteinmoleküle (Ford et al. 2000). Für die Bestimmung der Wirksamkeit eines Therapeutikums ist es von großer Bedeutung eine genaue Dosis-Wirkungskorrelation zu erstellen. Auch hier zeigte die in der vorliegenden Arbeit angewandte Strategie zur direkten Applikation der Peptid-Aptamer über Proteintransduktion seine Vorzüge. So hat die Methode der Proteintransduktion gegenüber der endogenen Expression von Proteinen nach Transfektion den Vorteil, dass die Menge an applizierten Peptiden genau dosierbar ist und somit eine sehr präzise Dosis-Wirkungsbeziehung ermittelt werden kann (Schwarze et al. 2000). So konnte in der vorliegenden Arbeit durch den Einsatz von unterschiedlichen Konzentrationen eine graduelle Abnahme der relativen Anzahl an lebenden Zellen in den mit Peptid-Aptamer DBD-1-9R behandelten Tumorzellen im Vergleich zu den Kontrollen demonstriert werden (Abb. 3.16.-18A).

Vorläufige eigene Ergebnisse mit der 9R-Transduktionsdomäne, sowie bereits publizierte Daten mit der Tat-Transduktionsdomäne haben gezeigt, dass sich die Methode der Proteintransduktion auch zur systemischen Applikation von Proteinen eignet, da sich das transduzierte Protein im gesamten Organismus verteilt (Schwarze et al. 1999; Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus sind Proteine fusioniert mit der Tat-Transduktionsdomäne in der

Lage ist die Blut-Hirn-Schranke zu passieren (Schwarze et al. 1999; Cao et al. 2002). Wie in Abschnitt 4.4 diskutiert, stellt das Herstellen von transgenen Mäusen (v. a. knock-out Mäuse) ein zeitaufwendiger, jedoch bislang unabdingbarer Schritt bei der funktionellen Analyse eines Proteins im Gesamtorganismus und der Validierung von Proteinen als potentielle Ziele für die Entwicklung neuer Medikamente dar. Die Möglichkeit der systemische Applikation von Peptid-Aptamer eröffnet eine gute, und vor allem deutlich schnellere, Alternative zur die Herstellung von transgenen Mäusen. Anstatt die kodierende Gensequenz des zu untersuchenden Proteins im Genom der Mäuse auszuschalten, kann das transduzierbare Peptid-Aptamer, das die Funktion des Zielproteins inhibiert, in die Maus (intravenös oder intraperitoneal) injiziert werden. Bereits nach 2-4 Stunden, und nicht wie im Falle von transgenen Mäusen bestenfalls nach Wochen, können dann die geplanten Untersuchungen an den mit Peptid-Aptamer behandelten Mäusen vorgenommen werden. Der Einsatz transduzierbarer Proteine ist nicht nur der schnellere Ansatz als die Herstellung transgener Tiere, mit ihm ist darüber hinaus eine genauere Dosis-Wirkungsbeziehung möglich, da die Menge an eingesetztem Peptid-Aptamer beliebig variiert werden kann (siehe oben). Eine solch präzise Dosierung der Proteinexpression ist selbst bei dem Einsatz von Tet-Systemen noch nicht ausreichend etabliert (Giuriato et al. 2004).

Bei zahlreichen Erkrankungen, wie zystische Fibrose oder Duchenne's Muskel-dystrophie, ist eine lange Expressionszeit des Transgens häufig über Jahre erforderlich. Aus diesem Grund bieten sich für solche Krankheiten gentherapeutische Ansätze an, da bei dieser Methode das therapeutisch wirkende Gen in das Genom integriert wird, und eine permanente Expression ermöglicht. Eine solche Langzeittherapie ist jedoch im Fall von Tumorerkrankungen kein vielversprechender, therapeutischer Ansatz (Felsher 2003). Ziel der Tumorthherapie ist es, möglichst schnell Apoptose in den Zellen des Tumorgewebes auszulösen. Durch die Applikation des Transgens soll das Tumorwachstum möglichst schnell gestoppt werden und der programmierte Zelltod in den Tumorzellen induziert werden. Das für die Abtötung der Tumorzellen verantwortliche Molekül braucht demnach nur solange im Körper des Patienten vorhanden sein, bis alle Tumorzellen eliminiert wurden. Diese nur transient benötigte Präsenz des therapeutischen Genproduktes eröffnet die Möglichkeit, dass anstelle der Transfektion des Gens das gleiche Resultat auch durch die direkte Gabe des Proteins erreicht werden kann (Ford et al. 2001). In der Tat konnte durch das Einschleusen der Peptid-Aptamere DBD-1 und DD-2 in U266-Zellen Apoptose induziert werden, die bereits nach 2,5 Tagen anhand von gespaltener Caspase-3 und Spaltprodukten von PARP detektiert werden konnte (Abb. 3.19.; 3.20.).

Während im Rahmen der Gentherapie nach Gentransfer auch nach erfolgreicher Behandlung, das Transgen noch im System integriert bleibt, ist dies bei einer auf Peptiden fusioniert an eine PTD basierenden Therapie nicht der Fall. Untersuchungen haben gezeigt, dass Peptide, fusioniert an eine PTD, sowohl in der Zelle als auch im Organismus schnell abgebaut werden (Niesner et al. 2002; Buerger et al. 2003; Borsello et al. 2003; Chene et al. 2003; Snyder et al. 2003). Mit dem Absetzen der Verabreichung werden die Peptide in kurzer Zeit abgebaut und somit im Organismus nicht mehr nachweisbar. Vor dem Hintergrund, dass über die Langzeiteffekte von gentherapeutischen Ansätzen noch nicht allzu viele Daten vorliegen, kann dies als ein großer Vorteil der Peptid-Aptamer Applikation gewertet werden.

Die durchgeführten Tierexperimente der vorliegenden Arbeit demonstrierten eindrücklich den therapeutischen Nutzen von Peptid-Aptameren fusioniert an 9-Arginine in prä-klinischen Ansätzen in der Maus (Abb. 3.21.; 3.22.). Weitere Studien zu unterschiedlichsten Erkrankungen belegen die Anwendbarkeit von Peptiden, fusioniert mit einer Proteintransduktionsdomäne, in den jeweiligen Mausmodellen (Mai et al. 2001; Turkson et al. 2001; Fulda et al. 2002; Asoh et al. 2002; Snyder et al. 2004). Für die bessere klinische Applikation der Peptid-Aptamer bieten sich dennoch mehrere Modifikationsmöglichkeiten an. Da in Zellkultur die Stabilität der Peptid-Aptamere nur ca. 24 Stunden betrug, sollte für die bessere Anwendbarkeit der Peptid-Aptamere zunächst die intrazelluläre Stabilität der Peptid-Aptamere erhöht werden (Buerger et al. 2003). So konnte in einigen bereits publizierten Studien gezeigt werden, dass beispielsweise durch das Einführen von nicht-natürlichen Aminosäuren oder D-Isomeren die intrazelluläre Stabilität der transduzierten Peptide deutlich erhöht wird (Niesner et al. 2002; Borsello et al. 2003; Chene et al. 2003; Snyder et al. 2003). Allerdings wurde in den Untersuchungen von Snyder et al. (2003) mit einem transduzierbaren p53-Peptid auch gezeigt, dass bei der Verwendung von D-Isomeren unter Umständen eine höhere Dosis des Peptids appliziert werden muss. Vorteilhaft erwies sich jedoch, dass durch die einmalige Gabe von p53-D-Isomeren noch 7 Tage nach der Applikation ein Wachstumsstopp der Zellen *in vitro* detektiert werden konnte. Bei der Verwendung des p53-L-Isomers hielt dieser Effekt dagegen nur 24 Stunden an. Ein weiterer Nachteil des Einsatzes von D-Isomeren ist jedoch, dass diese bislang in keinem biologischen System rekombinant exprimiert werden können. Diese Peptide müssten somit synthetisch hergestellt werden, wodurch eine Beschränkung auf bislang maximal 35-40 Aminosäuren gegeben wäre (persönliches Gespräch mit Produktspezialist von Coring System Diagnostik, Gernsheim). In wie weit eine Reduzierung der Aminosäuren der Peptid-

Aptamere fusioniert an eine Proteintransduktionsdomäne unter Beibehaltung der Spezifität möglich ist, gilt es in weiterführenden Experimenten zu klären (siehe Ausführungen unter 4.4.). Die Vorteile der erhöhten intrazellulären Stabilität kleiner synthetischer Peptide mit unter Umständen unspezifischeren Bindungen an das Zielprotein müssen somit gegen die intrazellulär zwar instabileren, jedoch spezifischeren, rekombinant exprimierbaren Proteine abgewogen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass die intrazelluläre Stabilität der Peptid-Aptamere fusioniert an eine Proteintransduktionsdomäne ausreicht, um bei einer Applikation alle 48 Stunden das Tumorstadium in Mäusen zu drastisch reduzieren (Abb. 3. 21.; 3.22.).

4.7.2. Modifizierte Peptid-Aptamere zum gezielten Abbau von interagierenden Proteinen

Eine weitere Möglichkeit die Wirkungsweise von Stat3 zu inhibieren wäre, neben der Interferenz mit der zellulären Funktion, der gezielte Abbau von Stat3. Durch die gezielte Degradierung von Stat3 würde seine intrazelluläre Konzentration reduziert und damit ebenfalls seine Funktionalität gehemmt. So erfolgt auch unter physiologischen Bedingungen die Regulation von Proteinfunktionen nicht nur über deren Aktivierung/Deaktivierung durch beispielsweise Phosphorylierung/Dephosphorylierung, sondern auch über den Abbau von nicht mehr benötigten Proteinen (Zhou et al. 2000). Ein gezieltes Ausnutzen der zellulären Maschinerie, die zum Abbau von Zielproteinen führt, sollte somit eine wertvolle Strategie zur Inhibition von Signalwegen darstellen. Der Hauptweg mit dem zelluläre Proteine degradiert werden, ist die Ubiquitin-abhängige Proteolyse durch das Proteasom (Zhou et al. 2000). Proteine, die für den proteosomalen Abbau bestimmt sind, werden zunächst über mehrere Schritte poly-ubiquityliert und dann über das 26S Proteasom abgebaut (Ciechanover et al. 2000). Über einen solchen Mechanismus erfolgt z. B. auch eine negative Regulation des Jak/Stat-Signalwegs. Verantwortlich für den gezielten Abbau der Jak-Proteine sind SOCS-Proteine (*engl.: suppressors of cytokine signaling*) (Krebs and Hilton 2001). Die SOCS-Proteine sind einerseits gekennzeichnet durch eine SH2-Domäne, mit der sie Kontakt zu den Jak- bzw. Stat-Proteinen aufnehmen. Andererseits besitzen sie am C-Terminus eine SOCS-Box-Domäne mit der sie den Kontakt zu einem E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex herstellen (Zhang et al. 1999; Ungureanu et al. 2002) (Abb. 4.2.). Somit markiert die SOCS-Box interagierende Proteine durch Ubiquitylierung für den späteren

proteasomalen Abbau, während die SH2-Domäne die Spezifität für das abzubauenende Zielprotein herstellt.

Fusioniert man die SOCS-Box eines SOCS-Proteins mit einem Peptid-Aptamer könnte dem so modifizierten Peptid-Aptamer eine zusätzliche Funktion, nämlich der gezielte Abbau des interagierenden Zielproteins, gegeben werden, und damit die Funktion des Peptid-Aptamers optimiert werden. Die Fusion eines Peptid-Aptamers, das spezifisch mit Stat3 interagiert, mit der SOCS-Box-Domäne sollte somit zu einem gezielten Abbau von Stat3 führen.

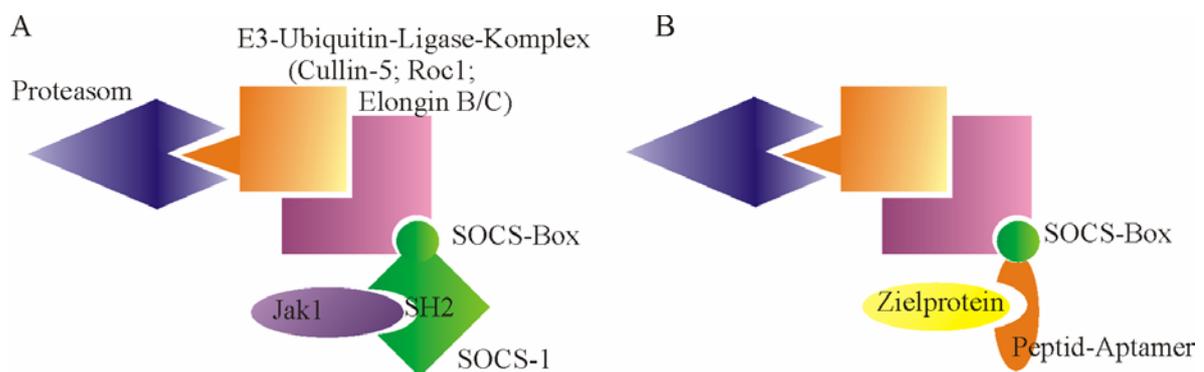


Abb. 4.2. Peptid-Aptamer vermittelter proteasomaler Abbau eines Zielproteins

A: Unter physiologischen Bedingungen interagiert SOCS-1 über seine SH2-Domäne mit dem zu degradierenden Protein, z. B. Jak1. Der Kontakt zum E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex wird über die SOCS-Box vermittelt. Nach der Poly-Ubiquitylierung erfolgt der proteosomale Abbau des gesamten Komplexes. B: Durch die Fusion eines Peptid-Aptamers und einer SOCS-Box-Domäne kommt es zum gezielten Abbau des Zielproteins. Hierbei stellt das Peptid-Aptamer den Kontakt zum Zielprotein her, während die SOCS-Box den Kontakt zur proteasomalen Degradationsmaschinerie über den E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex vermittelt.

Basierend auf diesen Überlegungen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein modifiziertes Peptid-Aptamer Fusionskonstrukt generiert, das durch drei funktionelle Domänen charakterisiert ist: (1) Peptid-Aptamersequenz, die den Kontakt zum Zielprotein, im vorliegenden Fall zu Stat3 herstellt („affinity-domain“; Spezifität); (2) Proteintransduktionsdomäne, bestehend aus neun Argininen („delivery-domain“, Applikation) und (3) SOCS-Box aus dem SOCS-1-Protein, die den proteasomalen Abbau vermittelt („functional-domain“; Degradierung) (Abb. 4.3.). Dieses modifizierte Peptid-Aptamer-Fusionskonstrukt kann in Bakterien rekombinant exprimiert, aufgereinigt, dialysiert und dann zu Kulturzellen gegeben werden. In nachfolgenden Western Blot Analysen kann dann die zelluläre Konzentration von Stat3 detektiert werden.



Abb. 4.3. Aufbau eines TPDV, ein Fusionsprotein mit drei funktionelle Domänen

Das targeted protein degradation vehicle (TPDV) setzt sich aus drei funktionellen Domänen zusammen: 1: Das Peptid-Aptamer (gelb), integriert in das Thioredoxin-Scaffold (rot), vermittelt den Kontakt zum Zielprotein und ist somit essentiell für die Spezifität und Bindung an Zielprotein („affinity-domain“). 2: Die PTD aus neun Argininen (grün) erlaubt die zelluläre Aufnahme der rekombinant exprimierten Fusionsproteine in Zielzellen („delivery-domain“). 3: Die SOCS-Box (lila) stellt die Verbindung zum E3-Ligase-Komplex her und induziert somit den proteasomalen Abbau des Fusionsproteins und den daran assoziierten Proteinen („functional domain“). Die His-tags (blau) dienen der Aufreinigung der bakteriell exprimierten TPDVs.

Vorläufige, eigene Ergebnisse, sowie weitere Daten aus unserer Arbeitsgruppe, weisen darauf hin, dass Peptid-Aptamere fusioniert mit einer SOCS-Box in der Tat in der Lage sind, den gezielten Abbau von interagierenden Zielproteinen zu induzieren (Daten nicht gezeigt; Bürger 2002; Sahn 2004). Sollten sich diese „proof of principle“-Experimente bestätigen, könnten solche Fusionskonstrukte, auch TPDVs (*engl.*: targeted protein degradation vehicles) genannt, für zahlreiche weitere Applikationen eingesetzt werden. Die gezielte Degradation eines Proteins, gleichzusetzen mit einer „loss of function“-Mutation (Verlust der Funktion), könnte beispielsweise verwendet werden, um die Eignung eines Protein als molekulares Ziel für therapeutische Interventionen zu überprüfen (Zhou et al. 2000). Neben der Validierung neuer Zielproteine zur Therapeutikaentwicklung, könnte diese Methode auch verwendet werden, um bereits bekannte, mit Krankheiten assoziierte Protein gezielt abzubauen (z.B. Onkogene; Apoptose-relevante Proteine). Darüber hinaus könnte, aufgrund der hohen Spezifität mit der Peptid-Aptamere mit ihrem Zielprotein interagieren, durchaus auch versucht werden, Degradierungskomplexe aufzubauen, die gezielt solche „pathogenen“ Proteine abbauen, die sich strukturell von ihrem physiologischen Protein unterscheiden (z. B. das Scrapie-Protein, Huntingtin). Durch die Fusion der Peptid-Aptamere mit einer Proteintransduktionsdomäne eröffnen sich zudem neue Perspektiven der therapeutischen Anwendung.

In der vorliegenden Arbeit konnten spezifische Peptid-Aptamere isoliert werden, die durch ihre Bindung an unterschiedliche Domänen von Stat3 die Funktion des Transkriptionsfaktors inhibieren. Die dadurch bedingte Blockierung spezifischer Schritte in der Signalkaskade von Stat3 stellt einen Vorteil gegenüber der bisher eingesetzten Strategien zur Interferenz mit der Proteinfunktion auf DNA- und RNA-Ebene (knock-out-Systeme, antisense- und siRNA-Ansätze) dar: So können Peptid-Aptamere, im Gegensatz zu Ansätzen auf Basis der RNA, genutzt werden, um mit der Funktion von Proteinen zu interferieren, die eine lange Halbwertszeit aufweisen. Zudem stellen Peptid-Aptamere auch molekulare Werkzeuge dar, um einzelne funktionelle Domänen eines Zielproteins zu charakterisieren und nachgeschaltete Signalwege zu identifizieren. Die in der vorliegenden Arbeit vorgenommene Fusion von Peptid-Aptameren mit einer Proteintransduktionsdomäne eröffnet neue Perspektiven für die Applikation von Biomolekülen bei Tumorerkrankungen mittels „Protein-Therapie“. Die Effekte des identifizierten DBD-Peptid-Aptamers, das spezifisch mit der DNA-Bindedomäne von Stat3 interagiert, weisen auf das große therapeutische Potential der Peptid-Aptamere hin. Vor allem dieses Peptid-Aptamer eignet sich als Modellmolekül für die Entwicklung zukünftiger therapeutischer Ansätze.

5. Literatur

- Abu-Amer Y, Dowdy SF, Ross FP, Clohisy JC, Teitelbaum SL (2001) TAT fusion proteins containing tyrosine 42-deleted IkappaBalpha arrest osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 276:30499-30503
- Akira S (1999) Functional roles of Stat family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells* 17:138-146
- Akira S (2000) Roles of Stat3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* 19:2607-2611
- Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wei S, Matsusaka T, Yoshida K, Sudo T, Naruto M, Kishimoto T (1994) Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 77:63-71
- Alas S, Bonavida B (2003) Inhibition of constitutive Stat3 activity sensitizes resistant non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma to chemotherapeutic drug-mediated apoptosis. *Clin Cancer Res* 9:316-326
- Alas S, Emmanouilides C, Bonavida B (2001) Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clin Cancer Res* 7:709-723
- Aoki Y, Feldman GM, Tosato G (2003) Inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood* 101:1535-1542
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-1308
- Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokh Z, Schwall RH (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104:155-162
- Asoh S, Ohsawa I, Mori T, Katsura K, Hiraide T, Katayama Y, Kimura M, Ozaki D, Yamagata K, Ohta S (2002) Protection against ischemic brain injury by protein therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:17107-17112
- Becker S, Groner B, Muller CW (1998) Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature* 394:145-151
- Bellido T, O'Brien CA, Roberson PK, Manolagas SC (1998) Transcriptional activation of the p21(WAF1,CIP1,SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 273:21137-21144
- Bhattacharya S, Schindler C (2003) Regulation of Stat3 nuclear export. *J Clin Invest* 111:553-559
- Blaskovich MA, Sun J, Cantor A, Turkson J, Jove R, Sebt SM (2003) Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res* 63:1270-1279
- Boeuf H, Hauss C, Graeve FD, Baran N, Kedinger C (1997) Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *J Cell Biol* 138:1207-1217
- Borsello T, Clarke PG, Hirt L, Vercelli A, Repici M, Schorderet DF, Bogousslavsky J, Bonny C (2003) A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat Med* 9:1180-1186

- Bowman T, Broome MA, Sinibaldi D, Wharton W, Pledger WJ, Sedivy JM, Irby R, Yeatman T, Courtneidge SA, Jove R (2001) Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7319-7324
- Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R (2000) Stats in oncogenesis. *Oncogene* 19:2474-2488
- Bromberg J, Darnell JE, Jr. (2000) The role of Stats in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19:2468-2473
- Bromberg JF (2001) Activation of Stat proteins and growth control. *Bioessays* 23:161-169
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr. (1999) Stat3 as an oncogene. *Cell* 98:295-303
- Bürger C (2002) Inhibition der Signaltransduktion des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors durch Peptid-Aptamere – ein neuer Ansatz zur Krebstherapie; Doktorarbeit, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt a. M.
- Buerger C, Nagel-Wolfrum K, Kunz C, Wittig I, Butz K, Hoppe-Seyler F, Groner B (2003) Sequence-specific peptide aptamers, interacting with the intracellular domain of the epidermal growth factor receptor, interfere with Stat3 activation and inhibit the growth of tumor cells. *J Biol Chem* 278:37610-37621
- Buettner R, Mora LB, Jove R (2002) Activated Stat signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* 8:945-954
- Burdelya L, Catlett-Falcone R, Levitzki A, Cheng F, Mora LB, Sotomayor E, Coppola D, Sun J, Sebt S, Dalton WS, Jove R, Yu H (2002) Combination therapy with AG-490 and interleukin 12 achieves greater antitumor effects than either agent alone. *Mol Cancer Ther* 1:893-899
- Burke WM, Jin X, Lin HJ, Huang M, Liu R, Reynolds RK, Lin J (2001) Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells. *Oncogene* 20:7925-7934
- Butz K, Denk C, Ullmann A, Scheffner M, Hoppe-Seyler F (2000) Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6693-6697
- Butz K, Denk C, Fitscher B, Crnkovic-Mertens I, Ullmann A, Schroder CH, Hoppe-Seyler F (2001) Peptide aptamers targeting the hepatitis B virus core protein: a new class of molecules with antiviral activity. *Oncogene* 20:6579-6586
- Caldenhoven E, van Dijk TB, Solari R, Armstrong J, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, De Groot RP (1996) Stat3beta, a splice variant of transcription factor Stat3, is a dominant negative regulator of transcription. *J Biol Chem* 271:13221-13227
- Calo V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, Russo A (2003) Stat proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol* 197:157-168
- Calvin DP, Nam S, Buettner R, Sekharam M, Torres-Roca J, Jove R (2003) Inhibition of Stat3 activity with Stat3 antisense oligonucleotide (Stat3-ASO) enhances radiation-induced apoptosis in DU145 prostate cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57:S297
- Cao G, Pei W, Ge H, Liang Q, Luo Y, Sharp FR, Lu A, Ran R, Graham SH, Chen J (2002) In Vivo Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the TAT Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis. *J Neurosci* 22:5423-5431
- Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna JL, Nunez G, Dalton WS, Jove R (1999) Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10:105-115
- Chapman RS, Lourenco PC, Tonner E, Flint DJ, Selbert S, Takeda K, Akira S, Clarke AR, Watson CJ (1999) Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev* 13:2604-2616

- Chellaiah MA, Soga N, Swanson S, McAllister S, Alvarez U, Wang D, Dowdy SF, Hruska KA (2000) Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption. *J Biol Chem* 275:11993-12002
- Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE, Jr., Kuriyan J (1998) Crystal structure of a tyrosine phosphorylated Stat-1 dimer bound to DNA. *Cell* 93:827-839
- Chene P (2003) Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3:102-109
- Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K (1997) Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278:1803-1805
- Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL (2000) The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. *J Cell Biochem* 77:40-51
- Cohen BA, Colas P, Brent R (1998) An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14272-14277
- Colas P, Brent R (1998) The impact of two-hybrid and related methods on biotechnology. *Trends Biotechnol* 16:355-363
- Colas P, Cohen B, Jessen T, Grishina I, McCoy J, Brent R (1996) Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 380:548-550
- Collum RG, Brutsaert S, Lee G, Schindler C (2000) A Stat3-interacting protein (StIP1) regulates cytokine signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10120-10125
- Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2:647-656
- Dancey J, Sausville EA (2003) Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov* 2:296-313
- Darnell JE, Jr. (1997) Stats and gene regulation. *Science* 277:1630-1635
- Darnell JE, Jr. (2002) Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2:740-749
- Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR (1994) Jak-Stat pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415-1421
- Debatin KM, Poncet D, Kroemer G (2002) Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 21:8786-8803
- Decker T, Kovarik P (2000) Serine phosphorylation of Stats. *Oncogene* 19:2628-2637
- Degterev A, Lugovskoy A, Cardone M, Mulley B, Wagner G, Mitchison T, Yuan J (2001) Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL. *Nat Cell Biol* 3:173-182
- Di Fiore PP, Pierce JH, Fleming TP, Hazan R, Ullrich A, King CR, Schlessinger J, Aaronson SA (1987) Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell* 51:1063-1070
- Dole MG, Jasty R, Cooper MJ, Thompson CB, Nunez G, Castle VP (1995) Bcl-xL is expressed in neuroblastoma cells and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 55:2576-2582
- Dolgilevich S, Zaidi N, Song J, Abe E, Moonga BS, Sun L (2002) Transduction of TAT fusion proteins into osteoclasts and osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 299:505-509
- Druker BJ, Lydon NB (2000) Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 105:3-7
- Dvorak HF, Nagy JA, Dvorak AM (1991) Structure of solid tumors and their vasculature: implications for therapy with monoclonal antibodies. *Cancer Cells* 3:77-85

- Elliott G, O'Hare P (1997) Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88:223-233
- Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, Turkson J, Oshiro M, Kothapalli R, Li Y, Wang JM, Yang-Yen HF, Karras J, Jove R, Loughran TP, Jr. (2001) Inhibition of Stat3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest* 107:351-362
- Fabbrizio E, Le Cam L, Polanowska J, Kaczorek M, Lamb N, Brent R, Sardet C (1999) Inhibition of mammalian cell proliferation by genetically selected peptide aptamers that functionally antagonize E2F activity. *Oncogene* 18:4357-4363
- Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B, Barsoum J (1994) Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:664-668
- Felsher DW (2003) Cancer revoked: oncogenes as therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 3:375-380
- Felsher DW (2004) Reversibility of oncogene-induced cancer. *Curr Opin Genet Dev* 14:37-42
- Fields S, Sternglanz R (1994) The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* 10:286-292
- Ford KG, Darling D, Souberbielle B, Farzaneh F (2000) Protein transduction: a new tool for the study of cellular ageing and senescence. *Mech Ageing Dev* 121:113-121
- Ford KG, Souberbielle BE, Darling D, Farzaneh F (2001) Protein transduction: an alternative to genetic intervention? *Gene Ther* 8:1-4
- Frank DA (2003) Stat signaling in cancer: insights into pathogenesis and treatment strategies. *Cancer Treat Res* 115:267-291
- Frankel AD, Pabo CO (1988) Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55:1189-1193
- Fukada T, Ohtani T, Yoshida Y, Shirogane T, Nishida K, Nakajima K, Hibi M, Hirano T (1998) Stat3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition. *EMBO J* 17:6670-6677
- Fulda S, Wick W, Weller M, Debatin KM (2002) Smac agonists sensitize for Apo2L/T. *Nat Med* 8:808-815
- Garcia R, Bowman TL, Niu G, Yu H, Minton S, Muro-Cacho CA, Cox CE, Falcone R, Fairclough R, Parsons S, Laudano A, Gazit A, Levitzki A, Kraker A, Jove R (2001) Constitutive activation of Stat3 by the Src and Jak tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 20:2499-2513
- Garcia R, Jove R (1998) Activation of Stat transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *J Biomed Sci* 5:79-85
- Garcia R, Yu CL, Hudnall A, Catlett R, Nelson KL, Smithgall T, Fujita DJ, Ethier SP, Jove R (1997) Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 8:1267-1276
- Gesbert F, Griffin JD (2000) Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through Stat5. *Blood* 96:2269-2276
- Giuriato S, Felsher DW (2003) How cancers escape their oncogene habit. *Cell Cycle* 2:329-332
- Giuriato S, Rabin K, Fan AC, Shachaf CM, Felsher DW (2004) Conditional animal models: a strategy to define when oncogenes will be effective targets to treat cancer. *Semin Cancer Biol* 14:3-11
- Gorre ME, Sawyers CL (2002) Molecular mechanisms of resistance to STI571 in chronic myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 9:303-307

- Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, Zhou MY, Zeng Q, Pitt AS, Tweardy DJ (1998) Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth *In vitro*. *J Clin Invest* 102:1385-1392
- Grandis JR, Drenning SD, Zeng Q, Watkins SC, Melhem MF, Endo S, Johnson DE, Huang L, He Y, Kim JD (2000a) Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4227-4232
- Grandis JR, Zeng Q, Drenning SD (2000b) Epidermal growth factor receptor-mediated stat3 signaling blocks apoptosis in head and neck cancer. *Laryngoscope* 110:868-874
- Green I, Christison R, Voyce CJ, Bundell KR, Lindsay MA (2003) Protein transduction domains: are they delivering? *Trends Pharmacol Sci* 24:213-215
- Green M, Loewenstein PM (1988) Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55:1179-1188
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70
- Haspel RL, Darnell JE, Jr. (1999) A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10188-10193
- Heere-Ress E, Thallinger C, Lucas T, Schlagbauer-Wadl H, Wacheck V, Monia BP, Wolff K, Pehamberger H, Jansen B (2002) Bcl-X(L) is a chemoresistance factor in human melanoma cells that can be inhibited by antisense therapy. *Int J Cancer* 99:29-34
- Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/Stat pathway. *Biochem J* 334 (Pt 2):297-314
- Herr I, Debatin KM (2001) Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 98:2603-2614
- Hirano T, Ishihara K, Hibi M (2000) Roles of Stat3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 19:2548-2556
- Holmgren A (1995) Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* 3:239-243
- Hong FD, Clayman GL (2000) Isolation of a peptide for targeted drug delivery into human head and neck solid tumors. *Cancer Res* 60:6551-6556
- Hoppe-Seyler F, Butz K (2000) Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine. *J Mol Med* 78:426-430
- Horita M, Andreu EJ, Benito A, Arbona C, Sanz C, Benet I, Prosper F, Fernandez-Luna JL (2000) Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med* 191:977-984
- Hughes RM (2004) Strategies for cancer gene therapy. *J Surg Oncol* 85:28-35
- Ivanov VN, Bhoumik A, Krasilnikov M, Raz R, Owen-Schaub LB, Levy D, Horvath CM, Ronai Z (2001) Cooperation between Stat3 and c-jun suppresses Fas transcription. *Mol Cell* 7:517-528
- Ivanov VN, Bhoumik A, Ronai Z (2003) Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene* 22:3152-3161
- Jahagirdar BN, Miller JS, Shet A, Verfaillie CM (2001) Novel therapies for chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 29:543-556
- Jansen B, Schlagbauer-Wadl H, Brown BD, Bryan RN, van Elsas A, Muller M, Wolff K, Eichler HG, Pehamberger H (1998) bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. *Nat Med* 4:232-234

- Jansen B, Wacheck V, Heere-Ress E, Schlagbauer-Wadl H, Hoeller C, Lucas T, Hoermann M, Hollenstein U, Wolff K, Pehamberger H (2000) Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. *Lancet* 356:1728-1733
- John S, Vinkemeier U, Soldaini E, Darnell JE, Jr., Leonard WJ (1999) The significance of tetramerization in promoter recruitment by Stat5. *Mol Cell Biol* 19:1910-1918
- Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108:153-164
- Joliot A, Pernelle C, Deagostini-Bazin H, Prochiantz A (1991) Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1864-1868
- Katterle Y, Brandt BH, Dowdy SF, Niggemann B, Zanker KS, Dittmar T (2004) Antitumour effects of PLC-gamma1-(SH2)2-TAT fusion proteins on EGFR/c-erbB-2-positive breast cancer cells. *Br J Cancer* 90:230-235
- Kijima T, Niwa H, Steinman RA, Drenning SD, Gooding WE, Wentzel AL, Xi S, Grandis JR (2002) Stat3 activation abrogates growth factor dependence and contributes to head and neck squamous cell carcinoma tumor growth *in vivo*. *Cell Growth Differ* 13:355-362
- Kiuchi N, Nakajima K, Ichiba M, Fukada T, Narimatsu M, Mizuno K, Hibi M, Hirano T (1999) Stat3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med* 189:63-73
- Klevenz B, Butz K, Hoppe-Seyler F (2002) Peptide aptamers: exchange of the thioredoxin-A scaffold by alternative platform proteins and its influence on target protein binding. *Cell Mol Life Sci* 59:1993-1998
- Kolonin MG, Finley RL, Jr. (1998) Targeting cyclin-dependent kinases in Drosophila with peptide aptamers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14266-14271
- Konnikova L, Kotecki M, Kruger MM, Cochran BH (2003) Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells. *BMC Cancer* 3:23
- Krebs DL, Hilton DJ (2001) SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 19:378-387
- Ladner RC (1995) Constrained peptides as binding entities. *Trends Biotechnol* 13:426-430
- Landgren E, Schiller P, Cao Y, Claesson-Welsh L (1998) Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase C-gamma and migration of endothelial cells expressing Flt 1. *Oncogene* 16:359-367
- Lee CK, Raz R, Gimeno R, Gertner R, Wistinghausen B, Takeshita K, DePinho RA, Levy DE (2002) Stat3 is a negative regulator of granulopoiesis but is not required for G-CSF-dependent differentiation. *Immunity* 17:63-72
- Lee SO, Lou W, Qureshi KM, Mehraein-Ghomi F, Trump DL, Gao AC (2004) RNA interference targeting Stat3 inhibits growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells. *Prostate* 60:303-309
- Leech SH, Olie RA, Gautschi O, Simoes-Wust AP, Tschopp S, Haner R, Hall J, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U (2000) Induction of apoptosis in lung-cancer cells following bcl-xL anti-sense treatment. *Int J Cancer* 86:570-576
- Leong PL, Andrews GA, Johnson DE, Dyer KF, Xi S, Mai JC, Robbins PD, Gadiparthi S, Burke NA, Watkins SF, Grandis JR (2003) Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4138-4143
- Leung D, Abbenante G, Fairlie DP (2000) Protease inhibitors: current status and future prospects. *J Med Chem* 43:305-341
- Levitcki A (2002) Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *Eur J Cancer* 38 Suppl 5:S11-S18
- Levitcki A (2003) EGF receptor as a therapeutic target. *Lung Cancer* 41 Suppl 1:S9-14

- Levy DE, Darnell JE, Jr. (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:651-662
- Levy DE, Lee CK (2002) What does Stat3 do? *J Clin Invest* 109:1143-1148
- Lufeï C, Ma J, Huang G, Zhang T, Novotny-Diermayr V, Ong CT, Cao X (2003) GRIM-19, a death-regulatory gene product, suppresses Stat3 activity via functional interaction. *EMBO J* 22:1325-1335
- Mai JC, Mi Z, Kim SH, Ng B, Robbins PD (2001) A proapoptotic peptide for the treatment of solid tumors. *Cancer Res* 61:7709-7712
- Maritano D, Sugrue ML, Tininini S, Dewilde S, Strobl B, Fu X, Murray-Tait V, Chiarle R, Poli V (2004) The Stat3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions. *Nat Immunol* 5:401-409
- Martino A, Holmes JH, Lord JD, Moon JJ, Nelson BH (2001) Stat5 and Sp1 regulate transcription of the cyclin D2 gene in response to IL-2. *J Immunol* 166:1723-1729
- Masuda M, Suzui M, Yasumatu R, Nakashima T, Kuratomi Y, Azuma K, Tomita K, Komiyama S, Weinstein IB (2002) Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 62:3351-3355
- Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, Yokota T (1999) Stat3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J* 18:4261-4269
- Matsui H, Tomizawa K, Lu YF, Matsushita M (2003) Protein Therapy: *in vivo* protein transduction by polyarginine (11R) PTD and subcellular targeting delivery. *Curr Protein Pept Sci* 4:151-157
- Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, Leeder JS, Freedman M, Cohen A, Gazit A, Levitzki A, Roifman CM (1996) Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature* 379:645-648
- Montigiani S, Muller R, Kontermann RE (2003) Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by novel tetravalent peptides inhibiting DNA binding of E2F. *Oncogene* 22:4943-4952
- Mora LB, Buettner R, Seigne J, Diaz J, Ahmad N, Garcia R, Bowman T, Falcone R, Fairclough R, Cantor A, Muro-Cacho C, Livingston S, Karras J, Pow-Sang J, Jove R (2002) Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res* 62:6659-6666
- Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Snyder EL, Ho A, Latham DG, Lissy NA, Becker-Hapak M, Ezhevsky SA, Dowdy SF (1998) Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat Med* 4:1449-1452
- Nagel-Wolfrum K, Buerger C, Wittig I, Butz K, Hoppe-Seyler F, Groner B (2004) The interaction of specific Peptide aptamers with the DNA binding domain and the dimerization domain of the transcription factor stat3 inhibits transactivation and induces apoptosis in tumor cells. *Mol Cancer Res* 2:170-182
- Nakajima K, Yamanaka Y, Nakae K, Kojima H, Ichiba M, Kiuchi N, Kitaoka T, Fukada T, Hibi M, Hirano T (1996) A central role for Stat3 in IL-6-induced regulation of growth and differentiation in M1 leukemia cells. *EMBO J* 15:3651-3658
- Ni Z, Lou W, Leman ES, Gao AC (2000) Inhibition of constitutively activated Stat3 signaling pathway suppresses growth of prostate cancer cells. *Cancer Res* 60:1225-1228
- Nielsen M, Kaltoft K, Nordahl M, Ropke C, Geisler C, Mustelin T, Dobson P, Svejgaard A, Odum N (1997) Constitutive activation of a slowly migrating isoform of Stat3 in mycosis fungoides:

- tyrphostin AG490 inhibits Stat3 activation and growth of mycosis fungoides tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6764-6769
- Niesner U, Halin C, Lozzi L, Gunthert M, Neri P, Wunderli-Allenspach H, Zardi L, Neri D (2002) Quantitation of the tumor-targeting properties of antibody fragments conjugated to cell-permeating HIV-1 TAT peptides. *Bioconjug Chem* 13:729-736
- Niu G, Bowman T, Huang M, Shivers S, Reintgen D, Daud A, Chang A, Kraker A, Jove R, Yu H (2002) Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene* 21:7001-7010
- Niu G, Heller R, Catlett-Falcone R, Coppola D, Jaroszeski M, Dalton W, Jove R, Yu H (1999) Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor *in vivo*. *Cancer Res* 59:5059-5063
- Niu G, Shain KH, Huang M, Ravi R, Bedi A, Dalton WS, Jove R, Yu H (2001) Overexpression of a dominant-negative signal transducer and activator of transcription 3 variant in tumor cells leads to production of soluble factors that induce apoptosis and cell cycle arrest. *Cancer Res* 61:3276-3280
- Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A (1998) Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of Stat3. *Genes Dev* 12:2048-2060
- Noble ME, Endicott JA, Johnson LN (2004) Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* 303:1800-1805
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19:3159-3167
- Oshiro MM, Landowski TH, Catlett-Falcone R, Hazlehurst LA, Huang M, Jove R, Dalton WS (2001) Inhibition of Jak kinase activity enhances Fas-mediated apoptosis but reduces cytotoxic activity of topoisomerase II inhibitors in U266 myeloma cells. *Clin Cancer Res* 7:4262-4271
- Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH (1996) The role of proteases during apoptosis. *FASEB J* 10:587-597
- Rahaman SO, Harbor PC, Chernova O, Barnett GH, Vogelbaum MA, Haque SJ (2002) Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene* 21:8404-8413
- Raz R, Durbin JE, Levy DE (1994) Acute phase response factor and additional members of the interferon-stimulated gene factor 3 family integrate diverse signals from cytokines, interferons, and growth factors. *J Biol Chem* 269:24391-24395
- Raz R, Lee CK, Cannizzaro LA, d'Eustachio P, Levy DE (1999) Essential role of Stat3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2846-2851
- Reed JC (2002) Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 1:111-121
- Reed CJ (2000a) Apoptosis and cancer: strategies for integrating programmed cell death. *Semin Hematol* 37:9-16
- Reed JC (2000b) Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 157:1415-1430
- Reed JC (1998) Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17:3225-3236
- Ren Z, Cabell LA, Schaefer TS, McMurray JS (2003) Identification of a high-affinity phosphopeptide inhibitor of Stat3. *Bioorg Med Chem Lett* 13:633-636
- Riley JK, Takeda K, Akira S, Schreiber RD (1999) Interleukin-10 receptor signaling through the Jak-Stat pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem* 274:16513-16521
- Sahm C (2004) Targeted degradation of Stat3; Bachelorarbeit, Fachhochschule Bonn

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: A laboratory manual 2nd edition, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N. Y.
- Sano S, Itami S, Takeda K, Tarutani M, Yamaguchi Y, Miura H, Yoshikawa K, Akira S, Takeda J (1999) Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO J* 18:4657-4668
- Sano S, Takahama Y, Sugawara T, Kosaka H, Itami S, Yoshikawa K, Miyazaki J, van Ewijk W, Takeda J (2001) Stat3 in thymic epithelial cells is essential for postnatal maintenance of thymic architecture and thymocyte survival. *Immunity* 15:261-273
- Sasse J, Hemmann U, Schwartz C, Schniertshauer U, Heesel B, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Heinrich PC, Horn F (1997) Mutational analysis of acute-phase response factor/Stat3 activation and dimerization. *Mol Cell Biol* 17:4677-4686
- Sawyers CL (2002) Disabling Abl-perspectives on Abl kinase regulation and cancer therapeutics. *Cancer Cell* 1:13-15
- Sawyers CL (2002a) Disabling Abl-perspectives on Abl kinase regulation and cancer therapeutics. *Cancer Cell* 1:13-15
- Sawyers CL (2002b) Finding the next Gleevec: FLT3 targeted kinase inhibitor therapy for acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 1:413-415
- Schindler C, Darnell JE, Jr. (1995) Transcriptional responses to polypeptide ligands: the Jak-Stat pathway. *Annu Rev Biochem* 64:621-651
- Schutze-Redelmeier MP, Gournier H, Garcia-Pons F, Moussa M, Joliot AH, Volovitch M, Prochiantz A, Lemonnier FA (1996) Introduction of exogenous antigens into the MHC class I processing and presentation pathway by *Drosophila* antennapedia homeodomain primes cytotoxic T cells *in vivo*. *J Immunol* 157:650-655
- Schwarze SR, Dowdy SF (2000) *In vivo* protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol Sci* 21:45-48
- Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF (1999) *In vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285:1569-1572
- Schwarze SR, Hruska KA, Dowdy SF (2000) Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends Cell Biol* 10:290-295
- Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, Sawyers CL (2002) Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2:117-125
- Sherr CJ (2004) Principles of tumor suppression. *Cell* 116:235-246
- Shockley TR, Lin K, Nagy JA, Tompkins RG, Dvorak HF, Yarmush ML (1991) Penetration of tumor tissue by antibodies and other immunoproteins. *Ann N Y Acad Sci* 618:367-382
- Shuai K (2000) Modulation of Stat signaling by Stat-interacting proteins. *Oncogene* 19:2638-2644
- Simoës-Wust AP, Olie RA, Gautschi O, Leech SH, Haner R, Hall J, Fabbro D, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U (2000) Bcl-x1 antisense treatment induces apoptosis in breast carcinoma cells. *Int J Cancer* 87:582-590
- Sinibaldi D, Wharton W, Turkson J, Bowman T, Pledger WJ, Jove R (2000) Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated Stat3 signaling. *Oncogene* 19:5419-5427
- Smythe WR, Mohiuddin I, Ozveran M, Cao XX (2002) Antisense therapy for malignant mesothelioma with oligonucleotides targeting the bcl-x1 gene product. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123:1191-1198
- Snyder EL, Meade BR, Dowdy SF (2003) Anti-cancer protein transduction strategies: reconstitution of p27 tumor suppressor function. *J Control Release* 91:45-51

- Snyder EL, Meade BR, Saenz CC, Dowdy SF (2004) Treatment of Terminal Peritoneal Carcinomatosis by a Transducible p53-Activating Peptide. *PLoS Biol* 2:E36
- Song L, Turkson J, Karras JG, Jove R, Haura EB (2003) Activation of Stat3 by receptor tyrosine kinases and cytokines regulates survival in human non-small cell carcinoma cells. *Oncogene* 22:4150-4165
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67:227-264
- Taga T, Kishimoto T (1997) Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 15:797-819
- Takeda K, Akira S (2001) Multi-functional roles of Stat3 revealed by conditional gene targeting. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 49:279-283
- Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Förster I, Akira S (1999) Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 10: 39-49
- Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T Akira S (1997) Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3801-3804
- Traxler P (2003) Tyrosine kinases as targets in cancer therapy - successes and failures. *Expert Opin Ther Targets* 7:215-234
- Turkson J, Jove R (2000) Stat proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 19:6613-6626
- Turkson J, Kim JS, Zhang S, Yuan J, Huang M, Glenn M, Haura E, Sebt S, Hamilton AD, Jove R (2004) Novel peptidomimetic inhibitors of signal transducer and activator of transcription 3 dimerization and biological activity. *Mol Cancer Ther* 3:261-269
- Turkson J, Ryan D, Kim JS, Zhang Y, Chen Z, Haura E, Laudano A, Sebt S, Hamilton AD, Jove R (2001) Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. *J Biol Chem* 276:45443-45455
- Tzung SP, Kim KM, Basanez G, Giedt CD, Simon J, Zimmerberg J, Zhang KY, Hockenbery DM (2001) Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3. *Nat Cell Biol* 3:183-191
- Ungureanu D, Saharinen P, Junttila I, Hilton DJ, Silvennoinen O (2002) Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Mol Cell Biol* 22:3316-3326
- Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335:440-442
- Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K (2000) Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 60:203-212
- Vinkemeier U, Cohen SL, Moarefi I, Chait BT, Kuriyan J, Darnell JE, Jr. (1996) DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO J* 15:5616-5626
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408:307-310
- Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF (2004) Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med* 10:310-315
- Walczak H, Krammer PH (2000) The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 256:58-66
- Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH (1999)

- Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo*. *Nat Med* 5:157-163
- Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, Bhattacharya R, Gabrilovich D, Heller R, Coppola D, Dalton W, Jove R, Pardoll D, Yu H (2004) Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 10:48-54
- Wei D, Le X, Zheng L, Wang L, Frey JA, Gao AC, Peng Z, Huang S, Xiong HQ, Abbruzzese JL, Xie K (2003a) Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene* 22:319-329
- Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Chou CH, Lai KB, LeeCN, Hsieh CY (2003b) Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a Stat3 pathway. *Oncogene* 22: 1517-1527
- Wen Z, Zhong Z, Darnell JE, Jr. (1995) Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82:241-250
- Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, Pelkey ET, Steinman L, Rothbard JB (2000) The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13003-13008
- Wolfrum U (1995) Centrin in the photoreceptor cells of mammalian retinae. *Cell Motil Cytoskeleton* 32:55-64
- Xu X, Sun YL, Hoey T (1996) Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the Stat amino-terminal domain. *Science* 273:794-797
- Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Sayama K, Hanakawa Y, Detmar M, Hashimoto K (2003) Nuclear translocation of phosphorylated Stat3 is essential for vascular endothelial growth factor-induced human dermal microvascular endothelial cell migration and tube formation. *J Biol Chem* 278:40026-40031
- Yang E, Wen Z, Haspel RL, Zhang JJ, Darnell JE, Jr. (1999) The linker domain of Stat1 is required for gamma interferon-driven transcription. *Mol Cell Biol* 19:5106-5112
- Yoo JY, Huso DL, Nathans D, Desiderio S (2002) Specific ablation of Stat3beta distorts the pattern of Stat3-responsive gene expression and impairs recovery from endotoxic shock. *Cell* 108:331-344
- Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS, Jackson P, Groopman JD, Manning JE, Harris CC, Herman JG (2001) SOCS-1, a negative regulator of the Jak/Stat pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet* 28:29-35
- Yu H, Jove R (2004) The Stats of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 4:97-105
- Zamo A, Chiarle R, Piva R, Howes J, Fan Y, Chilosi M, Levy DE, Inghirami G (2002) Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene* 21:1038-1047
- Zhang JG, Farley A, Nicholson SE, Willson TA, Zugaro LM, Simpson RJ, Moritz RL, Cary D, Richardson R, Hausmann G, Kile BJ, Kent SB, Alexander WS, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M (1999) The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2071-2076
- Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. (1994) Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4806-4810
- Zhou P, Bogacki R, McReynolds L, Howley PM (2000) Harnessing the ubiquitination machinery to target the degradation of specific cellular proteins. *Mol Cell* 6:751-756

6. Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Amino-1, 2, 4-triazol
aa	Aminosäure (<i>engl.</i> : <u>a</u> mino <u>a</u> cid)
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>engl.</i> : <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin) carboxanilide inner salt
Cdk	Cyklin abhängige Kinase (<i>engl.</i> : cycline dependent kinase)
CIP	Calf intestine Phosphatase
d. h.	das heißt
DAPI	4'6-Diamino-2-Phenylindol
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOBA	Mangelmedium <i>engl.</i> : <u>d</u> ropout <u>m</u> edium
DOBA-L	Dropout ohne Leucin
DOBA-LA	Dropout ohne Leucin, Adenin
DOBA-LTA	Dropout ohne Leucin, Tryptophan, Adenin
DOBA-LTH	Dropout ohne Leucin, Tryptophan, Histidin
DOBA-LTU	Dropout ohne Leucin, Tryptophan, Uracil
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>engl.</i> : <u>e</u> pidermal <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
EGFR growth	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (<i>engl.</i> : epidermal factor receptor)
EMSA	Gelretardationsanalyse (<i>engl.</i> : <u>E</u> lectromobility <u>s</u> hift <u>a</u> ssay)
ErbB	Erythroblastosis-Retrovirus
FCS	Fötale Kälberserum (<i>engl.</i> : fetal calf serum)
GAS	γ -Interferon-aktivierte Sequenz (<i>engl.</i> : γ -interferone activated sequence)

GRIM19	<i>engl.</i> : genes associated with <u>r</u> etinoid- <u>I</u> FN- induced mortality
h	Stunde
HEPES	4-(2- <u>H</u> ydroxy <u>e</u> thyl-) <u>1</u> - <u>p</u> iperazin- <u>e</u> thansulfonsäure
Herc	humane EGFR Zellen (<i>engl.</i> : <u>h</u> uman <u>E</u> GFR <u>c</u> ells)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>engl.</i> : <u>h</u> orse <u>r</u> adish <u>p</u> eroxidase)
I	Isoleucin
IF	<u>I</u> mmun <u>f</u> luoreszenz
IFN	<u>I</u> nter <u>f</u> eron
IL	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin
IP	Immunopräzipitation
IPTG	<u>I</u> sopropyl-beta-D- <u>t</u> hiogalactosid
Jak	<u>J</u> anus- <u>K</u> inase
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Leucin
LB	Luria-Bertani-Medium
M	im Kontext von Aminosäuren: Methionin
M	Mol
mA	Milliampere
MAPK	<u>M</u> itogen- <u>a</u> ktivierte <u>P</u> rotei <u>n</u> kinase
mg	Milligramm
mm	Milimeter
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> : Messenger ribonucleotide acid)
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> ele <u>e</u> ktrophorese
PAO	Phenylarsenoxid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>engl.</i> : <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl.</i> : <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PIAS	Proteininhibitor von aktivierten Stats (<i>engl.</i> : <u>p</u> rotein <u>i</u> nhibitor of activated Stats)
PTD	Proteintransduktionsdomäne
PY	Phospho-Tyrosin
RE	Antwortelement (<i>engl.</i> : <u>r</u> esponse <u>e</u> lement)

rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl.</i> : rounds per minute)
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natrium Dodecylsulfat (<i>engl.</i> : sodium dodecylsulfate)
SH2	<u>S</u> rc- <u>H</u> omologie <u>D</u> omäne <u>2</u>
SIE	<u>s</u> is- <u>i</u> nduzierbares <u>E</u> lement
siRNA	<i>engl.</i> : small interfering
SOCS	<i>engl.</i> : supressor of cytokine signaling
Stat	<i>engl.</i> : signal transducer and activator of transcription
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (<i>engl.</i> : Tris buffered saline)
TEMED	N, N, N', N'- <u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min
TNF	<i>engl.</i> : tumor necrosis factor
TPDV	<i>engl.</i> : <u>t</u> argeted <u>p</u> rotein <u>d</u> egradation <u>v</u> ehicle
TRAIL	<i>engl.</i> : TNF-related apoptosis-inducing ligand
Trx	Thioredoxin
UV	ultraviolett
V	im Kontext von Aminosäuren: Valin
V	Volt
VEGF	<i>engl.</i> : <u>v</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
VEGFR	<i>engl.</i> : <u>v</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor
v/v	Volumen /Volumen
w/V	Masse/Volumen
WB	Western Blot Analyse
WCE	Gesamtzellextrakt (<i>engl.</i> : whole cell extract)
well	<i>engl.</i> : Vertiefung; Loch
Wt	Wildtyp
XTT	(2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt)
z. B.	zum Beispiel

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Bernd Groner für die Möglichkeit der Bearbeitung des interessanten Themas und der Betreuung der Arbeit. Die Diskussionsbereitschaft, aber auch die Möglichkeit eigene Ideen zu verwirklichen haben dazu beigetragen, dass sich das Projekt im Rahmen dieser Promotion gut entwickeln konnte und meine Selbstständigkeit im wissenschaftlichen Arbeiten gefördert wurde.

Bei Frau Starzinski-Powitz bedanke ich mich herzlich für die Übernahme der Betreuung der Arbeit von Seiten der Fakultät für Biologie und Informatik der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt.

Ein großer Dank auch an die Deutsche Krebshilfe Dr. Mildred Scheel Stiftung für Krebsforschung, Bonn, und der Novartis Stiftung für Therapeutische Forschung, ohne deren finanzielle Unterstützung dieses Projektes nicht hätte durchgeführt werden können.

Allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Groner danke ich für die nette, herzliche und diskussionsfreudige Atmosphäre. Das Eisessen, Kabatrinken, abendliche diskutieren, Sekttrinken, WM-tippen und die Italienerbesuche haben dazu beigetragen, dass der Laboralltag nie langweilig wurde und der Laborfrust viel erträglicher wurde. Ein besonderer Dank auch an die Mitglieder der Arbeitsgruppe Zörnig, für die vielen Diskussionen über Apoptose, und der Arbeitsgruppe Pfitzner, für die Hilfe bei den Gelretardationsexperimenten. Aber auch ein großes Dankeschön all den anderen Mitarbeitern des Instituts, die durch Worte oder Taten dazu beigetragen haben, dass die Zeit im Georg- Speyer-Haus sehr schön und lehrreich war.

Auch den zahlreichen Korrekturlesern dieser Arbeit, Daniela, Marco, Uwe, Christina, Beate, Claudia, Ina, Jacky und Wibke, sei nochmals herzlich gedankt!

Last but not least danke ich meiner Familie, in der jeder einzelne ein Vorbild war und mir dadurch den Mut gegeben hat meinen Weg zu gehen. Ganz besonders danke ich Uwe, der mir in den letzten Jahren immer zur Seite stand.

Lebenslauf

Name	Kerstin Nagel-Wolfrum, geb. Nagel
Geburtsdatum und –ort	30.09.1969; Karlsruhe
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch
Schulbildung	Grundschule Linkenheim Abitur 1989 am Gymnasium Neureut
Freiwilliges soziales Jahr	01.09.1989 – 30.03.1990: Arbeiterwohlfahrt Baden e. V. Schülerhort Leopoldshafen
Berufsausbildung zur Medizinisch Technischen Laboratoriumsassistentin	01.04. – 30.07.1990: Vorpraktikum am Institut für Mikrobiologie und Immunologie im klinisch-chemischen Labor des Städtischen Klinikums Karlsruhe August 1990: Krankenpflegepraktikum in der Kinderklinik des Städtischen Klinikums Karlsruhe 1990 – 1992: MTLA-Schule des Städtischen Klinikums Karlsruhe Abschluss: Staatlich geprüfte Medizinisch Technische Laboratoriumsassistentin
Studium	1992/93 Immatrikulation an der Universität Karlsruhe (TH) Studiengang Biologie/Diplom 1997/98 Diplomhauptprüfung in Zoologie, Genetik, Biochemie und Organischer Chemie 01.06.1998 – 12.03.1999: Diplomarbeit am Institut für Genetik, Universität Karlsruhe/Forschungszentrum für Technik und Umwelt Karlsruhe, Gutachter Prof. Dr. P. Herrlich und PD Dr. M. Blum Thema: Einfluss von Retinsäure auf asymmetrisch exprimierte Gene in der Embryogenese der Maus (<i>Mus musculus</i>)
Laboraufenthalt	01.07.1999 – 30.12.1999 Laboraufenthalt bei Prof. Dr. U. Wolfrum, Institut für Zoologie, Abt. Zoologie I, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
Promotion	seit Mitte Januar 2000 Doktorarbeit bei Prof. Dr. B. Groner, Georg Speyer Haus, Frankfurt a. M.

Zusätzliche Qualifikationen

Tierversuchskundekurs I, (Charles River Laboratories, Georg Speyer Haus, Frankfurt a. M.)

Tierversuchskundekurs II (Charles River Laboratories, Georg Speyer Haus, Frankfurt a. M.)

Confokaler-Laser-Scanning-Mikroskopie-Kurs (Leica, Heidelberg)

Praktikumsbetreuung als studentische Hilfskraft an der Universität Karlsruhe

WS 1996/97 und WS 1997/98: Zoologisches Anfängerpraktikum (Praktikumsleiter Prof. Dr. R. Paulsen)

Versorgung und Zucht von Versuchstieren als studentische Hilfskraft

1995 – 1999: Institut für Genetik der Universität Karlsruhe/Forschungszentrum für Technik und Umwelt Karlsruhe

1997 – 1998: Zoologisches Institut, Abt. Zell- und Neurobiologie, Univ. Karlsruhe

Publikationsliste

Nagel-Wolfrum K, Buerger C, Wittig I, Butz K, Hoppe-Seyler F and Groner B (2004) The interaction of specific peptide aptamers with the DNA binding domain and the dimerisation domain of the transcription factor Stat3 inhibits transactivation and induces apoptosis in tumor cells. *Mol Cancer Res* 2: 170-182

Nagel-Wolfrum K (2004) Peptid-Aptamere: Molekulare Werkzeuge gegen Krebs? *Biologie in unserer Zeit* 3: 136 - 137

Buerger C, Nagel-Wolfrum K, Kunz C, Wittig I, Butz K, Hoppe-Seyler F and Groner B (2003) Sequence-specific peptide-aptamers, interacting with the intracellular domain of the epidermal growth factor receptor, interfere with Stat3 activation and inhibit the growth of tumor cells. *J Biol Chem* 278: 37610 - 37621

Tagungsbeiträge und Kurzpublikationen

Nagel-Wolfrum K, Bürger C, Wittig I, Butz K, Hoppe-Seyler F and Groner B (2004) The interaction of specific peptide aptamers with Stat3 induces apoptosis in tumor cells. Signal Transduction Meeting, EMBL, Heidelberg

Nagel-Wolfrum K, Bürger C, Kunz C, Wittig I, Butz K, Hoppe-Seyler F and Groner B (2003) Peptide aptamers – novel molecules for cancer therapy interfering with the Stat3 signaling pathway. 12th international AEK cancer congress, Würzburg

Bürger C, Nagel-Wolfrum K, Kunz C, Wittig I, Butz K, Hoppe-Seyler F and Groner B (2003) Sequence specific peptide aptamers, interacting with the intracellular domain of the epidermal growth factor receptor, interfere with Stat3 activation and inhibit the growth of tumor cells. 12th international AEK cancer congress, Würzburg

Bähr C, Belaus A, Bürger C, Nagel K, Butz K, Hoppe-Seyler F and Groner B (2003) Impairment of IGF-1R Signaling by interacting peptide-aptamers. 12th international AEK cancer congress, Würzburg

Wittig I, Nagel-Wolfrum K, Bürger C, Kunz C, Gewinner C, Pfitzner E, Hoppe-Seyley F and Groner B (2003) Targeted interference of Stat5a by peptide aptamers and dominant negative variants. 12th international AEK cancer congress, Würzburg

Nagel-Wolfrum K, Bürger C, Kunz C, Bähr C, Wittig I, Butz K, Hoppe-Seyley F and Groner B (2002) Inhibition of signal transduction with peptide aptamers - a new tool for cancer therapy. NGFN-Meeting, Georg Speyer Haus Frankfurt

Nagel K, Bürger C, Wittig I, Butz K, Hoppe-Seyley F and Groner B (2001) Inhibition of Stat3 signaling by peptide aptamers. 5th Joint meeting, Signal Transduction Society, Weimar

Wolfrum U, Schmitt A, Wottrich R, Nagel K, Huntley BK, Kubicki K (2000) Molecular characterization of the centrin cytoskeleton in sensory cells. Europ J Cell Biol [Supplement] 79:36

Nagel K, Campione M, Deissler K, Schweickert A, Blum M (2000) Retinoic acid affects left-right patterning. Europ J Cell Biol [Supplement] 79:63

Schweickert A, Steinbeisser H, Campione M, Nagel K, Lowe LA, Kuehn MR and Blum M (1999) Regulation of Pitx2 expression during the generation of left-right asymmetry. 13. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie, Freiburg

Vorträge

2003, Entwicklungsbiologisches Seminar, Abteilung für Zoologie, Universität Stuttgart Hohenheim, Titel: „Induction of apoptosis in tumor cells by inhibition of Stat3 signaling with peptide-aptamers”

Patent

Bürger C, Groner B, Nagel-Wolfrum K, Kunz C, Wittig I (eingereicht 2003) Titel: „Targeted protein degradation vehicles (TPDVs), nucleic acid constructs encoding them and their use.”

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Linkenheim, den 26. August 2004

Kerstin Nagel-Wolfrum